



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Factores genéticos pronósticos y de susceptibilidad
en el cáncer de cuello de útero.

Autor:

Vicente Santaclara Maneiro

Director:

Dr. D. Pablo Conesa Zamora

Murcia, Julio de 2022



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Factores genéticos pronósticos y de susceptibilidad
en el cáncer de cuello de útero.

Autor:

Vicente Santaclara Maneiro

Director:

Dr. D. Pablo Conesa Zamora

Murcia, Julio de 2022



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Pablo Conesa Zamora como Director de la Tesis Doctoral titulada "Factores genéticos pronósticos y de susceptibilidad en el cáncer de cuello de útero" realizada por D. Vicente Santaclara Maneiro en el Departamento de Ciencias de la Salud, autoriza su presentación a trámite dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, en Murcia a 25 de Junio de 2022

Dr. D. Pablo Conesa Zamora

RESUMEN

FACTORES GENÉTICOS PRONÓSTICOS Y DE SUSCEPTIBILIDAD EN EL CÁNCER DE CUELLO DE ÚTERO.

Introducción

El cáncer de cérvix supone la cuarta neoplasia más frecuente en la mujer a nivel mundial, después del cáncer de mama, el colorrectal y el de pulmón, con una incidencia de más de medio millón de casos nuevos al año.

En la Unión Europea, en 2020, la tasa de incidencia era de 16,6/100.000 mujeres/año y la tasa de mortalidad de 2,9/100.000 mujeres/año. En los últimos 50 años se ha producido un descenso mayor del 75% en la mortalidad de estos tumores en los países desarrollados, esto es debido fundamentalmente a la aparición de programas de diagnóstico precoz y prevención primaria, pero no así en países en desarrollo donde estos parámetros continúan aumentando.

Diversos estudios epidemiológicos apuntan a que el cáncer de cuello uterino es una enfermedad multifactorial en la que se encuentran involucrados una serie de factores de riesgo, aunque cada vez existe más evidencia sobre el papel desempeñado por el Virus del Papiloma Humano (VPH) como principal agente etiológico.

El VPH pertenece a la familia Papovaviridae. Incluye más de 100 genotipos de los que aproximadamente 40 infectan al área genital masculina y femenina. Por su capacidad oncogénica han sido como clasificados de alto riesgo los genotipos denominados como (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), de probable alto

riesgo (26, 53, 66, 68, 73, 82) y el resto de genotipos, como de bajo riesgo de producir cáncer cervical.

El VPH es un virus pequeño con cápsula formada sólo por proteínas. Su genoma está constituido por alrededor de 8.000 pares de bases y parte del mismo codifica unos productos génicos tempranos causantes de la replicación del ADN, de la regulación transcripcional y de la transformación de la célula infectada, pero también son oncoproteínas que, una vez expresadas, inactivan los productos génicos celulares supresores de tumores p53 y pRb y causan una proliferación celular descontrolada.

La mayoría de las infecciones por este virus son transitorias y el virus de forma aislada no es suficiente para producir cáncer. En los casos en los que la infección se cronifica, el tiempo desde la infección hasta que se desarrolla el carcinoma no invasivo y finalmente un cáncer invasivo es de alrededor de 15 años.

La etiopatogenia exacta del desarrollo del cáncer cervical se desconoce. Todavía hoy en día es un enigma por qué algunas mujeres afectadas con un genotipo de alto riesgo de VPH sufren una infección transitoria y sin embargo otras acaban desarrollando una lesión intraepitelial de alto grado (HSIL), que puede acabar desarrollando un cáncer invasivo. Se cree que en esta discriminación juega un papel importante la susceptibilidad genética de cada paciente. Esta podría estar relacionada con genes involucrados en la respuesta inmune entre otros, ya que se ha demostrado que la persistencia del virus durante períodos prolongados de tiempo es necesaria para el desarrollo del tumor. Por otro lado, también podrían existir variantes en genes que codifican proteínas relacionadas con la apoptosis (o muerte celular programada), proceso cuya alteración ha sido relacionada frecuentemente con el desarrollo del cáncer, por ser un mecanismo de control fisiológico de proliferación y de reparación de daño celular.

Objetivo

El principal objetivo ha sido intentar demostrar si determinados polimorfismos en algunos genes implicados en la respuesta inmune y/o en mecanismos de muerte celular programada permiten explicar el diferente comportamiento del desarrollo tumoral en la mujer infectada por VPH principalmente de alto riesgo (VPH-AR).

Material y métodos

Se ha diseñado un estudio retrospectivo de casos y controles a partir de pacientes en seguimiento durante dos años del Hospital Universitario Santa María del Rosell de Cartagena. Se establecieron dos grupos principales dentro de los casos: mujeres con una lesión intraepitelial cervical de bajo grado (LSIL) y aquellas que evolucionaron a una lesión intraepitelial de alto grado (HSIL). El número de pacientes estudiadas se ha situado en torno a 400 dependiendo del tipo de análisis. Asimismo, se han analizado unas 230 muestras de pacientes control de una población homogénea con respecto a los casos.

Las técnicas utilizadas han sido procedimientos de biología molecular que incluyen desde la extracción del ADN, genotipado del VPH mediante sondas de hibridación, hasta el genotipado de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) por análisis de tamaños de fragmentos de restricción (RFLP) y de discriminación alélica mediante PCR en tiempo real.

Se han estudiado los siguientes polimorfismos:

Genes asociados a respuesta inmune asociados a citotoxicidad dependiente de anticuerpos: *FcGR2A* (*rs1801274*) y *FcGR3A* (*rs396991*).

Genes asociados a fenómenos de apoptosis por la vía extrínseca: *FAS* (*rs1800682*), *FASL* (*rs763110*), *TRAILR1A* (*rs2230229*) y *TRAIL* (*rs12488654*).

Resultados

Se ha hecho un análisis de los resultados obtenidos para los distintos genotipos correspondientes a los 6 polimorfismos involucrados. Para ello se han clasificado y comparado los genotipos en la población control y en la de casos. Estos últimos se han clasificado a su vez según aquellas pacientes con hallazgo de lesiones intraepiteliales de alto o bajo grado (HSIL o LSIL), y en subgrupos dependiendo de si estaban infectadas por VPH de alto riesgo o no. Se ha establecido el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg para toda la población de controles para todos y cada uno de los genotipos estudiados.

Para el polimorfismo en el gen *FcGR2A*: no se han observado diferencias significativas al comparar genotipos en las distintas asociaciones según patología.

Para el polimorfismo en gen *FcGR3A* se observó que las pacientes del grupo I (LSIL) poseen, de forma significativa, el genotipo FF en un porcentaje menor que las del grupo II (HSIL). Al considerar los genotipos FF frente a FV y VV en combinación, el grado de significación fue incluso mayor, del mismo modo que cuando se consideraron sólo a aquellas pacientes con VPH-AR. Sin embargo, la distribución de genotipos en muestras citológicas normales fue similar a las frecuencias encontradas en las muestras objeto de estudio (grupos I y II en conjunto).

Para el polimorfismo en el gen *FAS* existe una ligera proporción mayor del genotipo TC en la población de pacientes afectadas de una LSIL que en el grupo control. Esta tendencia sólo se observa al tener en cuenta este grupo de pacientes y en todo caso no llega a ser una diferencia significativa.

Si comparamos el número de pacientes con genotipo CC para el polimorfismo en *FASL* frente a los que no lo poseen, encontramos diferencias son significativas al comparar el grupo pacientes con HSIL con respecto a LSIL ($p=0,0039$). Si además tenemos en cuenta que las poblaciones de casos totales con respecto a la de controles tienen distribuciones de los genotipos muy semejantes, podríamos suponer que el genotipo CC podría no tener incidencia en el desarrollo

de una lesión intraepitelial en pacientes sanas, pero podría influir en la progresión hacia HSIL tras una LSIL previa. Esta relación se acentúa cuando consideramos a su vez a aquellas pacientes poseedoras de un genotipo VPH de alto riesgo.

Mientras que para el polimorfismo en *TRAIL* (*rs12488654*) no se han observado diferencias significativas al comparar genotipos en las distintas asociaciones según patología, para el polimorfismo en *TRAILR1* (*rs2230229*) se constató que el genotipo AA parece predisponer a desarrollar una LSIL en pacientes infectadas de VPH-AR. Sin embargo, aunque esta relación es significativa, su fuerza de asociación según los coeficientes estadísticos no es grande.

Conclusiones:

El estudio sobre polimorfismos asociados a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, el *FcGR3A* proporciona la primera evidencia de una asociación entre un polimorfismo del FcGR y un mayor riesgo de progresión en lesiones precancerosas del cuello uterino. Sin embargo, serían necesarios estudios posteriores con un tamaño de muestra más grande y diferentes entornos de población.

En cuanto a los polimorfismos asociados con apoptosis, nuestros resultados informan por primera vez la asociación entre un SNP en el gen *FASL*, con la progresión de LSIL a HSIL, destacando así el interés de genotiparlos con objeto de evaluar el riesgo de progresión en mujeres con LSIL infectadas con VPH-AR.

Palabras clave: Cáncer Cérvix Uterino, VPH, polimorfismos, *FcGR3A*, *FcGR2A*, *TNF*, *FAS*, *TRAIL*, citotoxicidad dependiente de anticuerpo, apoptosis, LSIL, HSIL, regresión, progresión, inmunoprivilegio.

ABSTRACT

PROGNOSTIC GENETIC AND SUSCEPTIBILITY FACTORS IN CERVICAL CANCER.

Introduction

Cervical cancer is the fourth most common neoplasm in women worldwide, after breast, colorectal and lung cancer, with an incidence of more than half a million new cases per year. In the European Union, in 2020, the incidence rate was 16.6/100,000 women/year and the mortality rate was 2.9/100,000 women/year. In the last 50 years there has been a drop of more than 75% in the mortality of these tumors in developed countries, this is fundamentally due to the appearance of early diagnosis and primary prevention programs, but not so in developing countries where these parameters continue to increase. Various epidemiological studies indicate that cervical cancer is a multifactorial disease in which a series of risk factors are involved, although there is increasing evidence on the role played by the Human Papilloma Virus (HPV) as the main etiological agent. HPV belongs to the Papovaviridae family. It includes more than 100 genotypes, of which approximately 40 infect the male and female genital area. Due to their oncogenic capacity, the genotypes known as (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), probable high risk (26, 53, 66, 68, 73, 82) and the rest of the genotypes, as low risk of producing cervical cancer. HPV is a small virus with an envelope made up of only protein. Its genome is made up of around 8,000 base pairs and part of it encodes early gene products that cause DNA replication, transcriptional regulation and transformation of the infected cell, but are also oncoproteins that, once expressed, they inactivate the cellular tumor suppressor gene products p53 and pRb and cause uncontrolled cell proliferation. Most infections by this virus are transient and the virus alone is not enough to cause cancer. In cases where the infection becomes chronic, the time from infection to development of non-invasive

carcinoma and finally invasive cancer is around 15 years. The exact etiopathogenesis of cervical cancer development is unknown. It is still an enigma today why some women affected by a high-risk genotype of HPV suffer a transient infection and yet others end up developing a high-grade intraepithelial lesion (HSIL), which can end up developing invasive cancer. It is believed that the genetic susceptibility of each patient plays an important role in this discrimination. This could be related to genes involved in the immune response, among others, since it has been shown that the persistence of the virus for long periods of time is necessary for tumor development. On the other hand, there could also be variants in genes that encode proteins related to apoptosis (programmed cell death), a process whose alteration has been frequently related to the development of cancer, as it is a physiological control mechanism for cell proliferation and repair of cell damage.

Objectives

The main objective has been to demonstrate whether certain polymorphisms in some genes involved in the immune response and/or in mechanisms of programmed cell death can explain the different behavior of tumor development in women infected with HPV, mainly high-risk (HR-HPV).

Material and methods

A retrospective case-control study was designed based on patients followed up for two years at the Santa María del Rosell University Hospital in Cartagena. Two main groups were established within the cases: women with a low-grade cervical intraepithelial lesion (LSIL) and those who progressed to a high-grade intraepithelial lesion (HSIL). The number of patients studied has been around 400 depending on type of analysis. Likewise, some 230 samples of control patients have been analyzed from a homogeneous population with respect to the cases. The techniques used have been molecular biology procedures that range from DNA

extraction, HPV genotyping using hybridization probes, to single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping by restriction fragment size analysis (RFLP) and allelic discrimination by real-time PCR. The following polymorphisms have been studied:

Genes associated with immune response associated with antibody-dependent cytotoxicity: *FcGR2A* (*rs1801274*) and *FcGR3A* (*rs396991*).

Genes associated with apoptosis phenomena by the extrinsic pathway: *FAS* (*rs1800682*), *FASL* (*rs763110*), *TRAILR1A* (*rs2230229*) and *TRAIL* (*rs12488654*).

Results

An analysis has been made of the results obtained for the different genotypes corresponding to the 6 polymorphisms involved. For this, the genotypes in the control population and in the case population have been classified and compared. The latter have been classified in turn according to those patients with a finding of high-grade or low-grade intraepithelial lesions (HSIL or LSIL), and into subgroups depending on whether they were infected with high-risk HPV or not. The calculation of the Hardy-Weinberg equilibrium has been established for the entire population of controls for each and every one of the genotypes studied.

For the polymorphism in the *FcGR2A* gene: no significant differences have been observed when comparing genotypes in the different associations according to pathology.

For the polymorphism in the *FcGR3A* gene, it was observed that patients in group I (LSIL) have, significantly, the FF genotype in a lower percentage than those in group II (HSIL). When considering the FF versus FV and VV genotypes in combination, the degree of significance was even higher, in the same way as when only those patients with HR-HPV are considered. However, the distribution of genotypes in normal cytological samples was similar to the frequencies found in the samples under study (groups I and II together).

For the polymorphism in the *FAS* gene there is a slightly higher proportion of the TC genotype in the population of patients affected by LSIL than in the control group. This trend is only observed when taking this group of patients into account and in any case it does not amount to a significant difference.

If we compare the number of patients with the CC genotype for the *FASL* polymorphism versus those who do not, we find significant differences when comparing the group of patients with HSIL with respect to LSIL ($p=0.0039$). If we also take into account that the populations of total cases with respect to that of controls have very similar distributions of genotypes, it is assumed that the CC genotype could not have an impact on the development of an intraepithelial lesion in healthy patients, but could influence progression to HSIL after a previous LSIL. This relationship is accentuated when we consider those patients with a high-risk HPV genotype.

While for the polymorphism in *TRAIL* (*rs12488654*) no significant differences have been observed when comparing genotypes in the different associations according to pathology, for the polymorphism in *TRAILR1* (*rs2230229*) it was found that the AA genotype seems to predispose to the development of LSIL in patients infected with HR-HPV. However, although this relationship is significant, its strength of association according to the statistical coefficients is not great.

Conclusions

The study on polymorphisms associated with evidence-dependent cell cytotoxicity, *FcGR3A* provides the first evidence of an association between an FcGR polymorphism and an increased risk of progression in precancerous lesions of the cervix. However, further studies with larger sample size and different population settings will be necessary. Regarding the polymorphisms associated with apoptosis, our results report for the first time the association between a SNP in the *FASL* gene, with the progression from LSIL to HSIL, thus highlighting the interest of genotyping them in order to assess the risk of progression in women with LSIL infected with HR-HPV.

Keywords: Cervical Cancer, HPV, polymorphisms, *FcGR3A*, *FcGR2A*, *TNF*, *FAS*, *TRAIL*, mechanism-dependent cytotoxicity, apoptosis, LSIL, HSIL, regression, progression, immunoprivilege.

A Iago,
por mostrarme que en una sonrisa
se puede encontrar toda la verdad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería reconocer al Dr. Conesa su infinita paciencia y ayuda. Te estoy enormemente agradecido Pablo, porque sólo siendo como tú eres se habría podido terminar esta tesis.

No menos paciencia de la que has tenido tú, Raquel. Gracias por creer en mí, por tu confianza, por tu dulzura y comprensión, soportando como os he robado a ti y a nuestro pequeño, el tiempo y la dedicación que os merecéis. Os quiero.

Quiero mostrar también mi gratitud a todos mis amigos y compañeros de trabajo (cuesta en ocasiones encontrar la diferencia), y a mi "familia lorquina", que de algún modo me han apoyado y animado cuando más me costaba encontrar el camino y más lejos veía el final del mismo.

Y gracias también a mi familia: mi madre, mis hermanas..., porque siempre me habéis transmitido la ilusión de terminar esta tesis. Espero que ahora estéis orgullosos de mí, especialmente mi padre, allí donde estés...

Incluso la gente que afirma que no podemos hacer nada para cambiar nuestro destino, mira antes de cruzar la calle"

Stephen Hawking (1942-2018).

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

SIGLAS Y ABREVIATURAS 29

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS..... 33

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN..... 39

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE CUELLO DE ÚTERO..... 39

1.2. ETIOLOGÍA..... 43

1.3. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO..... 46

1.4. CARCINOGENÉISIS INDUCIDA POR VPH..... 47

1.5. MANEJO DE LA MUJER CON SIL..... 50

1.6. EL DETERIORO DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO TRAS LA
INFECCIÓN POR VPH..... 54

1.6.1. Estrategias del VPH para evadir el sistema inmunológico del
Huésped..... 54

1.6.2. Características inmunes dependientes del huésped 57

1.7. CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS 60

1.8. APOPTOSIS..... 61

1.8.1. Mecanismos de apoptosis..... 61

1.8.2. Receptores involucrados en la apoptosis (vía extrínseca)..... 62

CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS 71

2.1 JUSTIFICACIÓN 71

2.2 HIPÓTESIS 72

CAPÍTULO III: OBJETIVOS	77
3.1 PRINCIPAL.....	77
3.2 SECUNDARIOS.....	77
CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODOS	81
4.1 POBLACIÓN A ESTUDIO.....	81
4.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN EN LOS ESTUDIOS	81
4.3 ESTUDIOS GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD Y APOPTOSIS	82
4.3.1 Muestras	82
4.3.2 Extracción de ADN y cuantificación	82
4.3.3 Genotipado de VPH.....	83
4.3.4 Genotipado de <i>FcGR2A</i>	83
4.3.5 Genotipado de <i>FcGR3A</i>	84
4.3.6 Genotipado de <i>FAS</i> , <i>FASL</i> y <i>TRAILR</i>	85
4.3.7 Análisis estadístico.....	87
CAPÍTULO V: RESULTADOS.....	93
5.1 ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS CON LA SUSCEPTIBILIDAD INMUNE A LA PROGRESIÓN DESDE LSIL A HSIL.....	93
5.1.1 Resultados del polimorfismo <i>rs1801274</i> (H131R) en el gen <i>FcGR2A</i>	94
5.1.2 Resultados del polimorfismo <i>rs396991</i> (V158F) en el gen <i>FcGR3A</i>	96
5.2 ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE APOPTOSIS CON LA SUSCEPTIBILIDAD INMUNE A LA PROGRESIÓN DESDE LSIL A HSIL	98
5.2.1 Resultados del polimorfismo <i>rs1800682</i> (A670G) en el gen <i>FAS</i>	99
5.2.2 Resultados del polimorfismo <i>rs763110</i> (C844T) en el gen <i>FASL</i>	101

5.2.3	Resultados del polimorfismo <i>rs12488654</i> (A716G) en el gen <i>TRAILR</i> (TRAILR4)	103
5.2.4	Resultados del polimorfismo <i>rs2230229</i> (A1322G) en el gen <i>TRAILR</i> (TRAILR9)	105

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN.....	111
------------------------------------	------------

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES.....	123
--	------------

CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
--	------------

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ACO: Anticonceptivos Orales.

ADCC: Citotoxicidad Dependiente de Anticuerpos.

AEPCC: Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia.

AP-1: Activador de Proteína tipo 1.

APC: Célula Presentadora de Antígeno.

ARNm: Transcrito Primario del Ácido Ribonucleico.

ARNt: Ácido Ribonucleico de transferencia.

BCL-2: gen o proteína tipo 2 del Linfoma de Células B.

CCU: Carcinoma de Cérvix de Útero.

CCDA: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos.

CD: Clúster de Diferenciación

CD95L: Ligando del Clúster de Diferenciación 95 (también conocido como FASL)

CFRT: Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística.

CIN: Carcinoma Intraepitelial.

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

CTL: Linfocito T Citotóxico.

CTLA-4: Antígeno 4 asociado a Linfocitos T Citotóxicos.

DCR: Receptor Falso (Decoy Receptor).

DR: Receptor de muerte (Death Receptor).

EEC: Estudio Endocervical.

ETS: Enfermedad de Transmisión Sexual.

FADD: Dominio de Muerte Asociado a FAS.

FAS: Fragmento Estimulante de la Apoptosis (Apoptosis Stimulating Fragment).

FASL: Ligando de unión a FAS.

FRET: Transferencia de Energía Fluorescente mediante Resonancia.

FOXP3: Forkhead Box P3 (también llamada escurfina)

Fc: Fracción cristalizante de una inmunoglobulina.

FcGR: Receptor Gamma de la Fc.

HLA: Antígeno Leucocitario Humano.

HSIL: Lesión Intraepitelial de Alto Grado.

HUSMR: Hospital Universitario Santa María del Rosell.

HUSL: Hospital Universitario Santa Lucía de Cartagena

IC: Intervalo de Confianza.

IFN: Interferón.

IL: Interleuquina.

KIR: Receptor de células Asesinas tipo Inmunoglobulina (Killer-cell immunoglobulin-like receptor)

LC: Células de Langerhans.

LIT: Linfocitos Infiltrantes de Tumor.

LSIL: Lesión Intraepitelial de Bajo Grado.

OD: Razón de probabilidad (Odds Ratio)

NK: Célula asesina natural (Natural Killer)

NKG2: Receptor de células NK tipo lectina.

NFkB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NlaIII: enzima de restricción 3 de *Nesisseria lactamica*.

dNTP: dinucleótidos Trifosfato.

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa.

RFLP: Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica.

SIL: Lesión Intraepitelial Escamosa.

SNIP: Polimorfismo de Nucleótido Simple.

TAP-1: Proteína transportadora tipo 1 (Transporter 1)

Th: Linfocito T colaborador (T helper)

Treg: Linfocito T regulador.

TLR: Receptor de Linfocitos T.

TRADD: Dominio de Muerte Asociado a TNFR-1

TRAIL: Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con el TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand).

TRAILR: Receptor de TRAIL.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

TNFR: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral.

VLP: Partículas Similares a Virus (Virus-Like Particles)

VPH: Virus del Papiloma Humano.

VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo.

VPH-BR: Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo.

ZT: Zona de Transformación.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasas de incidencia mundial del cáncer de cérvix estandarizadas por edad.....	41
Figura 2. Tasas de mortalidad del cáncer de cérvix estandarizadas por edad.	42
Figura 3. Tasas de incidencia de cáncer atribuible a VPH en 2018 estandarizadas por edad.	45
Figura 4. Distribución de genotipos de VPH más comunes según diagnóstico citológico.....	46
Figura 5. Modelo de carcinogénesis cervical.....	49
Figura 6. Algoritmo de decisión clínica ante LSIL en cribado primario.	51
Figura 7. Algoritmo de decisión clínica ante HSIL/CIN 2-3 tras biopsia.	53
Figura 8. Apoptosis: mecanismos extrínsecos e intrínsecos.....	67
Figura 9. (A) Gel de agarosa: genotipado del polimorfismo V158F en el gen <i>FcGR3A</i> . (B) Electroferograma de un homocigoto portador del genotipo FF.	84
Figura 10. Transmisión de fluorescencia de las sondas FRET.	86
Figura 11. Distribución del polimorfismo H131R entre los distintos los grupos.	94
Figura 12. Distribución del polimorfismo V158F entre los distintos los grupos.	96
Figura 13. Distribución del polimorfismo A670G entre los distintos los grupos.....	99
Figura 14. Distribución del polimorfismo C844T entre los distintos los grupos.....	101
Figura 15. Distribución del polimorfismo A716G entre los distintos los grupos.....	103
Figura 16. Distribución del polimorfismo A1322G entre los distintos los grupos.	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Polimorfismos estudiados	87
Tabla 2: Asociación del polimorfismo H131R y los grupos de regresión y progresión	94
Tabla 3: Asociación del polimorfismo V158F y los grupos de regresión y progresión	96
Tabla 4: Asociación del polimorfismo A670G y los grupos de regresión y progresión	99
Tabla 5: Asociación del polimorfismo C844T y los grupos de regresión y progresión	101
Tabla 6: Asociación del polimorfismo A716G y los grupos de regresión y progresión	103
Tabla 7: Asociación del polimorfismo A1322G y los grupos de regresión y progresión	105

I - INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

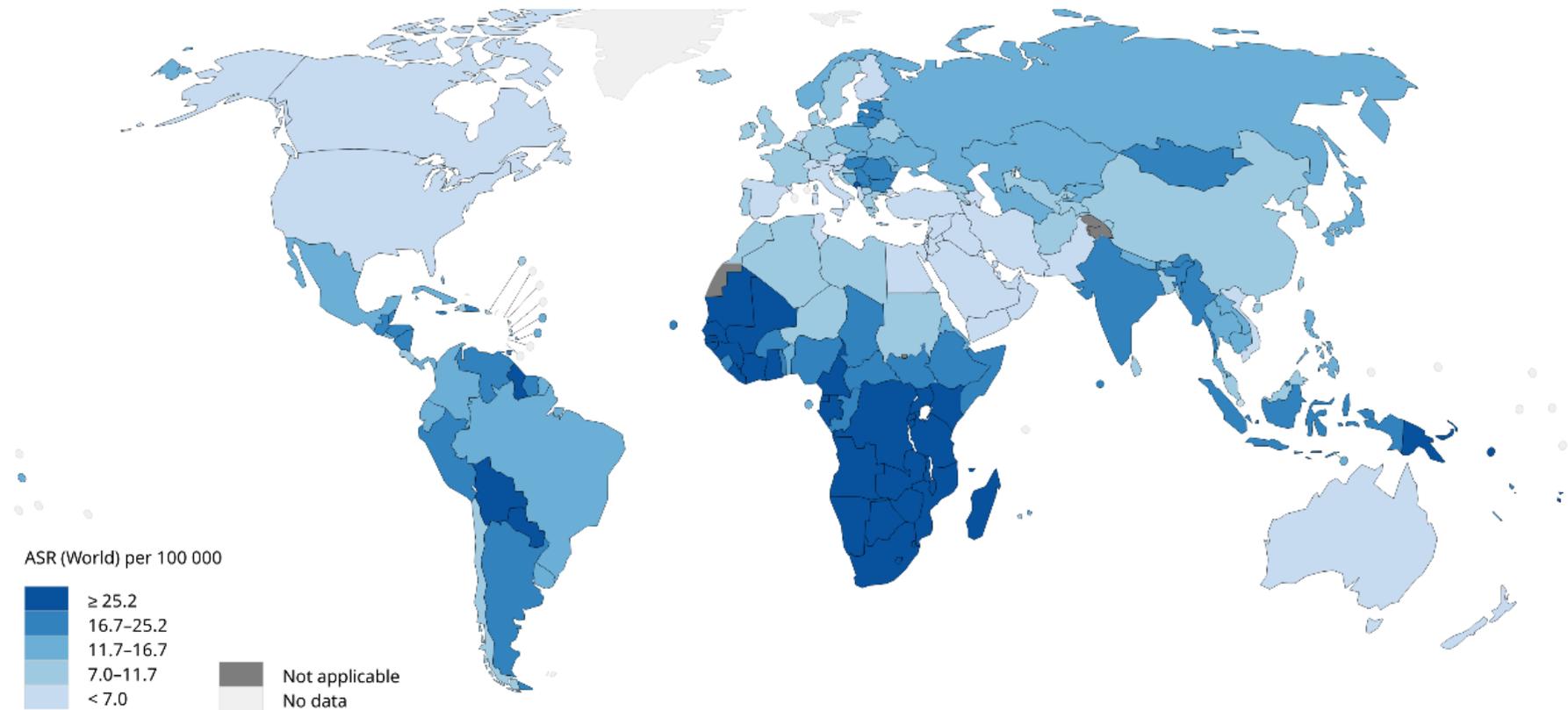
1.1. EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE CUELLO DE ÚTERO

El cáncer de cérvix supone la cuarta neoplasia más frecuente en la mujer a nivel mundial, después del cáncer de mama, el colorrectal y el de pulmón, con una incidencia de 570.000 nuevos casos en el año 2018(1). Diez años antes, ocupaba la tercera posición en frecuencia total en mujeres con una incidencia ligeramente inferior (529.000 nuevos casos en 2008)(2); y en 2002 era el segundo más frecuente (con una incidencia de 493.000 nuevos casos)(3)

Estos datos nos sugieren, que pese a la pérdida de importancia relativa al resto de cánceres su incidencia no sólo no ha descendido, sino que ha aumentado en un grado no despreciable. Este aumento tiene una importancia mayor si tenemos en cuenta los datos desagregados en países desarrollados con respecto a los que no lo son, de manera que en los primeros se observa un claro descenso de la incidencia y la mortalidad, mientras que, en los segundos, ambas continúan aumentando(4). Se estima que el 85-90% de las muertes se produjeron en los países subdesarrollados, con una tasa de mortalidad 18 veces mayor en los países de ingresos bajos o medios respecto a los países ricos(1-3) siendo esto debido fundamentalmente a la aparición y a la accesibilidad a los programas de diagnóstico precoz e inmunoterapia.

La incidencia de este tumor sigue una distribución bimodal con pico de incidencia entre los 25 y los 40 años para el carcinoma *in situ* y otro pico entre los 48 y los 52 años para el carcinoma invasor. La mayoría de casos se dan en mujeres

que no se hacen una citología regularmente y en pacientes afectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Data source: GLOBOCAN 2020
 Graph production: IARC
 (<http://gco.iarc.fr/today>)
 World Health Organization



Figura 1. Tasas de incidencia mundial del cáncer de cérvix estandarizadas por edad. Fuente GLOBOCAN 2020 (OMS)

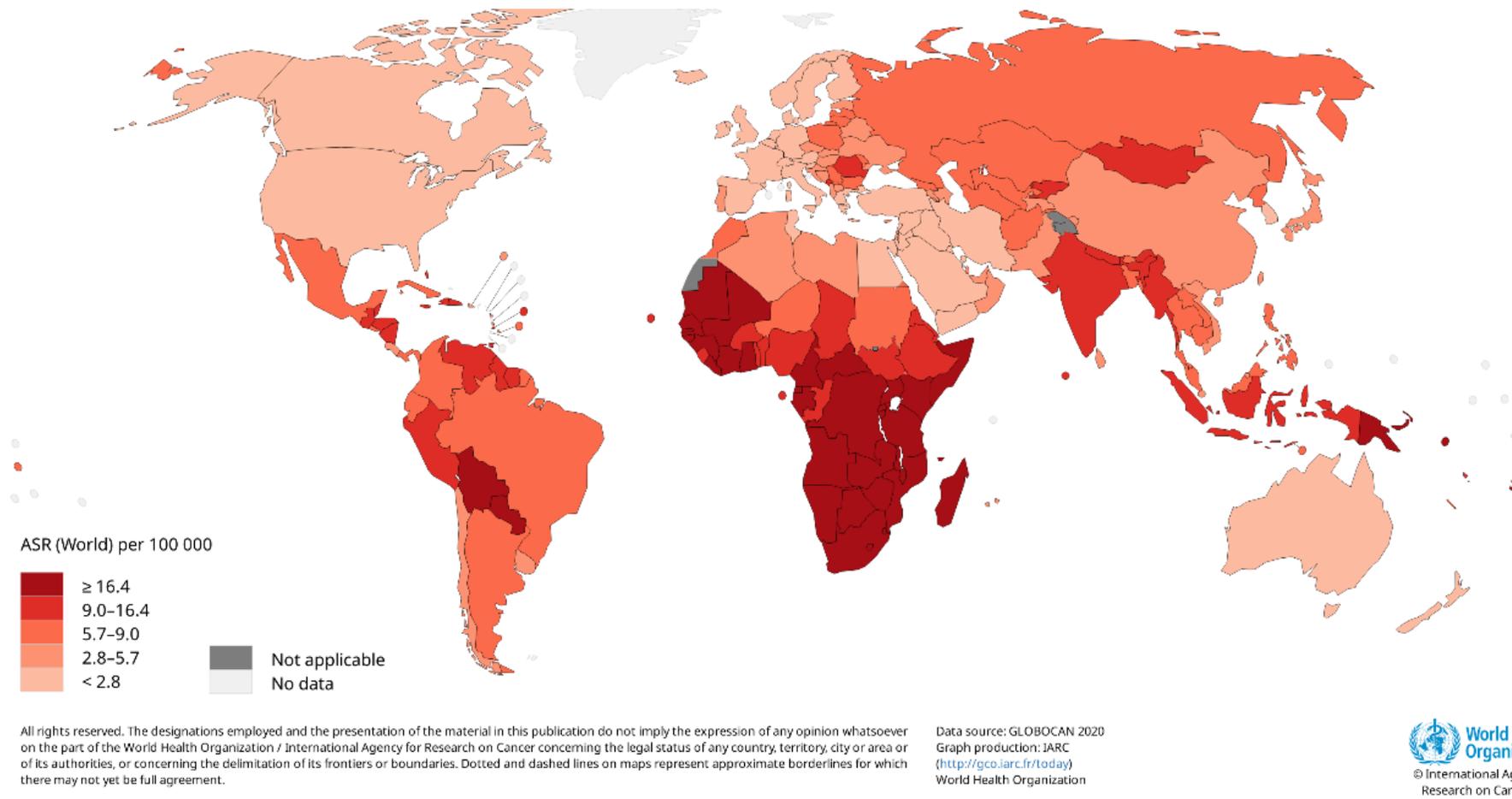


Figura 2. Tasas de mortalidad del cáncer de cérvix estandarizadas por edad. Fuente GLOBOCAN 2020 (OMS)

1.2. ETIOLOGÍA

Diversos estudios epidemiológicos apuntan a que el CCU es una enfermedad multifactorial en la que se encuentran involucrados una serie de factores de riesgo, aunque existe evidencia clara sobre el papel desempeñado por el virus del papiloma humano (VPH) como principal agente etiológico(5,6).

La infección por el VPH es un importante e independiente predictor de la presencia de lesiones intraepiteliales escamosas y CCU(7-9) en mujeres(10) y del carcinoma escamoso anal en hombres(11), además de producir otras lesiones benignas como las verrugas genitales.

La infección por el VPH es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo.

Sin embargo, gran parte de las infecciones originadas por el VPH en mujeres en edad sexualmente activa, son transitorias y el virus de forma aislada no es suficiente para producir cáncer. En el comienzo de la historia natural del CCU aparecen cambios citológicos denominados lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL), también conocidas como neoplasias cervicales intraepiteliales de tipo 1 (CIN1) o condiloma acuminado, que pueden evolucionar, en un 11% de los casos, a una lesión de alto grado (HSIL), también conocidas como CIN2-3. Se considera que tan solo un 10-12% desarrollarán una infección persistente con un riesgo elevado de progresión a neoplasia intraepitelial cervical de grado 3 (CIN3)(12-15). En los casos en los que la infección se cronifica, el tiempo desde la infección hasta que se desarrolla el carcinoma no invasivo y finalmente el cáncer invasivo es de alrededor de 15 años(16).

Además, se considera que no todos los tipos de VPH son igual de oncogénicos. Los genotipos 16 y 18 se encuentran en el 70% de lesiones CIN3(17) y en el 75% de los casos de CCU(18). Está comprobado que el riesgo de desarrollar CIN3 en las mujeres infectadas por estos genotipos es bastante mayor que en las infectadas por otros genotipos distintos(19).

Otros factores de riesgo que podrían jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer de cérvix son los siguientes:

- a. Inicio temprano de las relaciones sexuales.
- b. Múltiples parejas sexuales.
- c. Pareja sexual de alto riesgo debido a su promiscuidad y, por lo tanto, a la probabilidad de contagio del VPH (20).
- d. Tabaco (21): se asocia con un aumento del riesgo de padecer carcinoma epidermoide pero no adenocarcinoma.
- e. Infección por el VIH (22): se relaciona con una persistencia (o reactivación) alta de VPH y con una agresividad mayor del tumor.
- f. Historia de ETS por *Chlamydia trachomatis* (23) mientras que existe controversia sobre la influencia del virus herpes simple (VHS) tipo 2(24), o del virus de Epstein-Barr (25).
- g. Uso prolongado de anticonceptivos orales (ACO) (26). El adenocarcinoma parece tener mayor asociación con el uso de ACO que el carcinoma epidermoide, y se relaciona con la duración de su uso.
- h. Multiparidad (20).
- i. Estado del microbioma vaginal (27).
- j. Condición socioeconómica baja.
- k. Antecedentes familiares.
- l. Otros factores: dietilestilbestrol (28): aumenta la incidencia de carcinoma de células claras de cérvix y de vagina. Los varones circuncidados(29) tienen un riesgo menor de padecer infecciones genitales por VPH, y, en aquéllos con historia de parejas sexuales múltiples, el riesgo de cáncer de cérvix en las parejas posteriores es menor. Esto podría explicar la menor incidencia en mujeres judías o musulmanas.

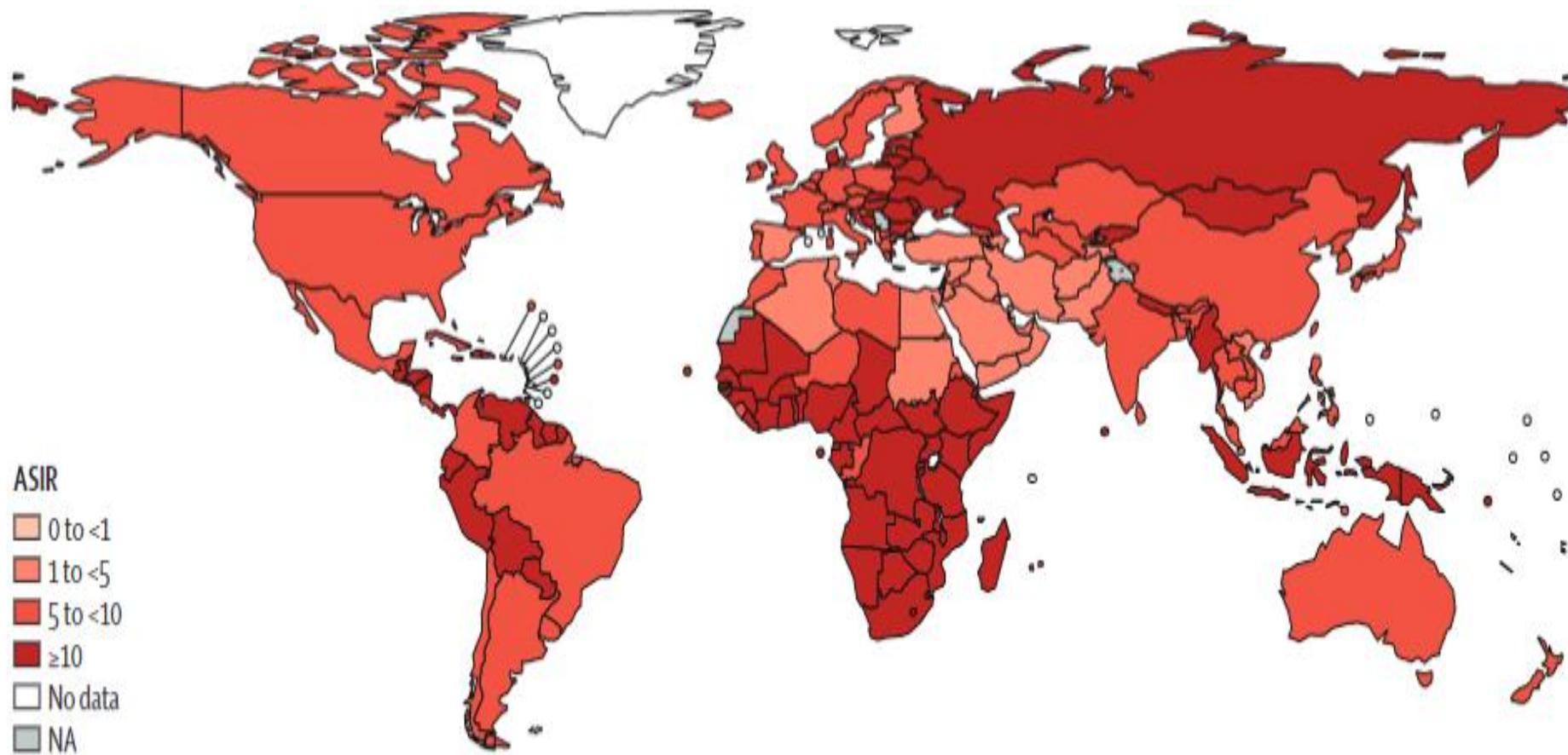


Figura 3. Tasas de incidencia de cáncer atribuible a VPH en 2018 estandarizadas por edad. Fuente: Catherine de Martel et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*. 2020 Feb 1;8(2):e180–90(1).

1.3. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El VPH pertenece a la familia *Papovaviridae*. Incluye más de 100 genotipos de los que aproximadamente 40 infectan al área genital masculina y femenina. Por su capacidad oncogénica han sido como clasificados de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) (VPH-AR), de probable alto riesgo (VPH-pAR) (26, 53, 66, 68, 73, 82) y el resto de genotipos, como de bajo riesgo de producir cáncer cervical (VPH-BR)(6).

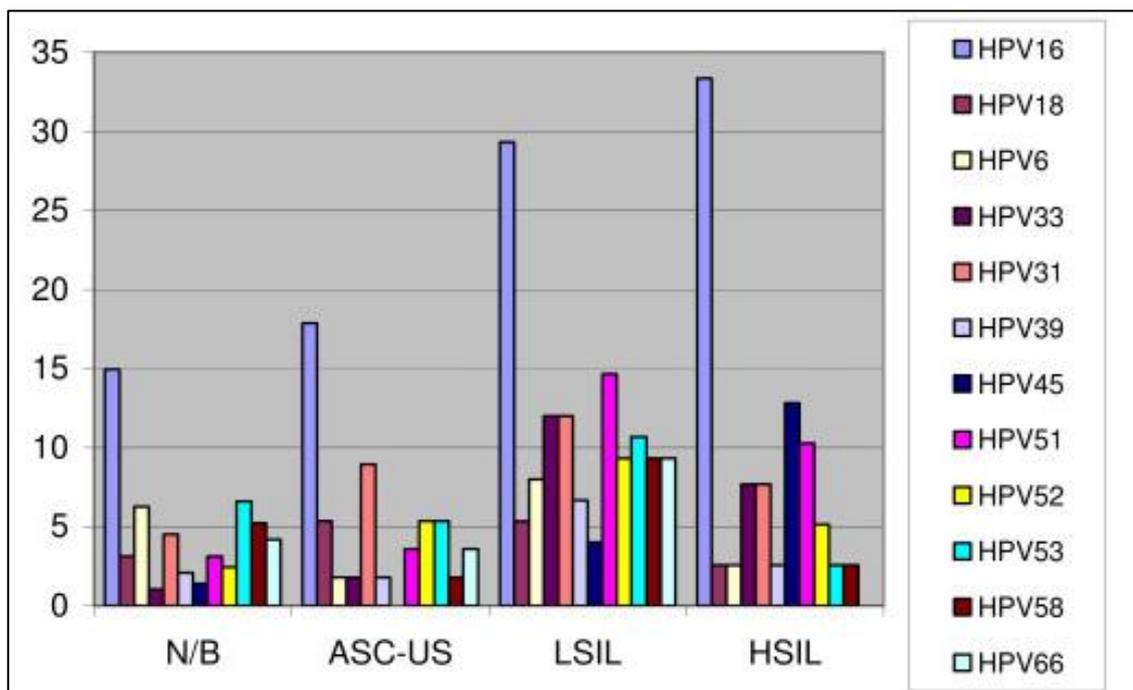


Figura 4. Distribución de genotipos más comunes encontrados en las muestras citológicas de una serie de pacientes de una población de Lorca y Cartagena y, por tanto, similar a la de nuestro estudio. Se representan los diagnósticos citológicos ASCUS, LSIL, y HSIL frente a la frecuencia relativa de cada genotipo. Fuente: Conesa et al.(30)

El VPH es un virus pequeño con cápsula formada sólo por proteínas. Su genoma está constituido por alrededor de 8.000 pares de bases y está organizado en diferentes áreas(31,32):

Región de genes tempranos (E1, E2, E4-E7). Esta región temprana codifica para las proteínas E6, E7, E1, E2, E4 y E5, que son la causa de la replicación del ADN, de la regulación transcripcional y de la transformación de la célula infectada.

Región de genes tardíos (L1 y L2). La región de genes tardíos codifica para las proteínas L1 y L2, que forman la cápsula viral.

Ambos grupos de genes están separados por una región reguladora superior, de aproximadamente 1.000 pares de bases que no codifica proteínas, pero contiene elementos cis requeridos para regular la expresión génica, la replicación del genoma y su empaquetamiento en partículas virales.

Los productos de los genes tempranos actúan como oncoproteínas que, expresadas en todos los tumores, inactivan los productos génicos celulares supresores de tumores p53 y pRb y causan una proliferación celular descontrolada.

1.4. CARCINOGENESIS INDUCIDA POR VPH

¿Dónde está el fallo de la respuesta inmune en la carcinogénesis cervical impulsada por el VPH?

La infección por VPH requiere que las partículas del virus accedan a la capa basal del epitelio cervical a través de microlesiones. El VPH no tiene maquinaria enzimática para la replicación del ADN, por lo que la célula de la capa basal es la diana del virus, ya que es la célula encargada de la renovación epitelial y la única que tiene actividad proliferativa. Esta infección conduce al establecimiento del genoma del VPH como episomas estables en estas células. Para un ciclo viral eficaz, el VPH necesita el proceso de diferenciación de los queratinocitos desde las células basales hasta las células en exfoliación, para expresar las proteínas virales en su justo momento. De esta manera, las proteínas virales tempranas E1 y E2 se expresan

para iniciar la replicación del ADN viral, mientras que E6 y E7 inducen la actividad del ciclo celular en las células suprabasales, lo que permite la replicación del genoma del VPH más allá de las capas basales (33). Luego, el ADN viral se replica de manera coordinada con los cromosomas de la célula huésped, pero las proteínas del VPH se expresan a niveles extremadamente bajos. Solo en las capas epiteliales superiores, donde las células sufren exfoliación y la vigilancia inmunológica es baja, el VPH expresa las proteínas inmunogénicas L1 y L2 que se ensamblan para construir la cápside viral. Esta estructura permite el empaquetamiento de los genomas replicados, favoreciendo la propagación viral hacia la luz cervical. Por este motivo, el tiempo desde la infección hasta la liberación viral es de unas tres semanas, que es el tiempo que tarda el queratinocito basal en descamarse (34).

En un pequeño porcentaje de casos, los genotipos de VPH-AR (más predominantemente el VPH 16 y 18) pueden ejercer inicialmente una alteración en el control del ciclo celular de los queratinocitos, que puede evidenciarse morfológicamente por cambios citológicos que conducen a una LSIL. Aunque aproximadamente el 30 % de las HSIL revierten (35), hay una activación continua de la proliferación a causa de la proteína E7, junto con un aumento en la inestabilidad cromosómica impulsada por E6, que es capaz de inhibir la función de la proteína p53. La proteína E5, por su parte ejerce una inhibición de las proteínas del punto de control (checkpoint) del huso acromático (Bub1 y Mad5) (36).

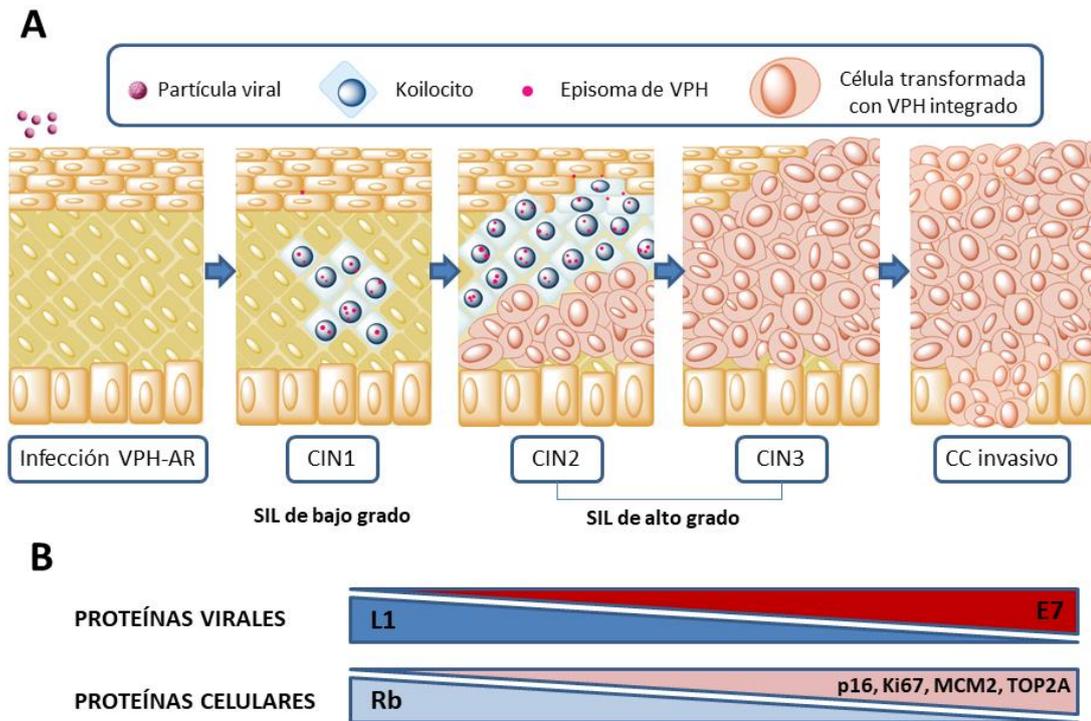


Figura 5. Modelo de carcinogénesis cervical. A Lesiones cervicales siguientes a la infección por VPH-AR. B. Diferencias entre las actividades de las proteínas virales y celulares durante la secuencia de la carcinogénesis cervical. Fuente: Conesa-Zamora (37)

Aproximadamente el 20% de las CIN1 progresarán a CIN2, y el 30% de estas lesiones progresarán a CIN3 que, en el 40% de los casos, terminarán en CCU invasivo (38). La HSIL tiene una fase de proliferación más extensa que la LSIL, ya que la amplificación del genoma viral ocurre más cerca de la superficie epitelial. Esto se debe principalmente a los cambios en los niveles de expresión de las proteínas víricas E6 y E7 que se producen tras la integración del genoma vírico en el cromosoma de la célula huésped. El ADN del VPH integrado se detecta en la mayoría de los CCU invasivos y en un subconjunto de las HSIL (39) y refleja un fallo del proceso infeccioso del VPH, ya que las células cancerígenas no pueden producir viriones.

1.5. MANEJO CLÍNICO DE LA MUJER CON SIL

La LSIL supone el 2-3% de todas las citologías realizadas. Un porcentaje mayor del 70% de las mujeres con citología LSIL poseen un resultado positivo para la prueba de VPH de las cuales el 80% es por genotipos de alto riesgo, y aproximadamente el 12-16% tiene un grado de lesión de al menos HSIL/CIN2 tras el estudio con colposcopia y biopsia. La Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC) recomienda, dentro del programa de cribado primario de cáncer de cérvix, las siguientes medidas:

- Remitir a colposcopia a todas las mujeres con citología LSIL en el cribado primario.
- No realizar una prueba de VPH ante una citología LSIL (ya que en su mayoría van a ser positivas y no resulta eficiente realizarla).
- En los casos con citología LSIL en los que se ha realizado un co-test (citología + prueba VPH):
 - Remitir a colposcopia si la prueba VPH es positiva (en ausencia de genotipado). En caso de disponer de información del genotipado remitir a colposcopia únicamente los casos VPH 16/18.
 - Realizar co-test al año si la prueba VPH es negativa o positiva para VPH no 16/18.

El algoritmo de decisión clínica valora aspectos como un estudio endocervical (EEC) o de la llamada zona de transformación (ZT), que es una parte del cuello uterino en la que se presenta metaplasia escamosa (cambios celulares de células cilíndricas a planas). Esta zona se clasifica en 3 tipos: tipo 1 (totalmente ectocervical y visible), tipo 2 (componente ectocervical y otro endocervical) y tipo 3 (endocervical no totalmente visible y uno ectocervical más o menos extenso).

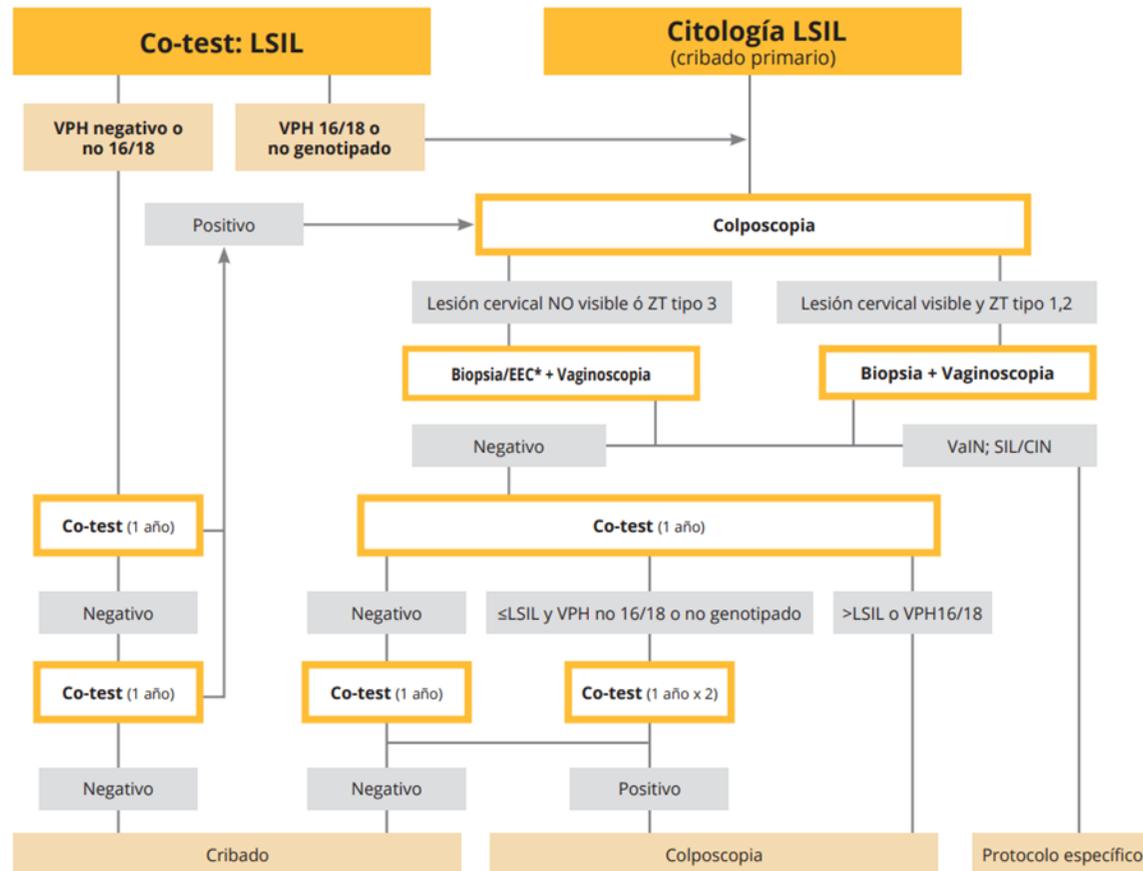


Figura 6. Algoritmo de decisión clínica ante LSIL en cribado primario. Fuente: Guía para la Prevención del Cáncer de Cérnix de la AEPCC 2022(40).

La conducta ante el diagnóstico histológico de HSIL/CIN2-3 está basada en el mejor conocimiento desarrollado durante los últimos años, sobre la evolución de las lesiones. Se ha encontrado que el verdadero precursor del CCU es el HSIL/CIN3, ya que los casos de HSIL/ CIN2 han mostrado ser un grupo heterogéneo de entidades con un riesgo variable de progresión o regresión.

El objetivo principal implica identificar que casos tienen un verdadero riesgo de progresión, de forma que haya que tratarlos prioritariamente, y cuales excepcionalmente podrían evolucionar a una regresión espontánea. En estos últimos, se podría plantear una conducta conservadora para evitar el sobretreatmento y la morbilidad obstétrica derivada del mismo.

En todo caso, los factores asociados a regresión son diversos: la edad de la paciente, la extensión de la lesión, la negativización del VPH o la ausencia de infección por VPH16. Todos ellos son tenidos en cuenta, junto a otros como la opinión de la paciente y su estado gestacional, en la toma de decisiones clínicas.

Se ha propuesto el siguiente algoritmo de actuación:

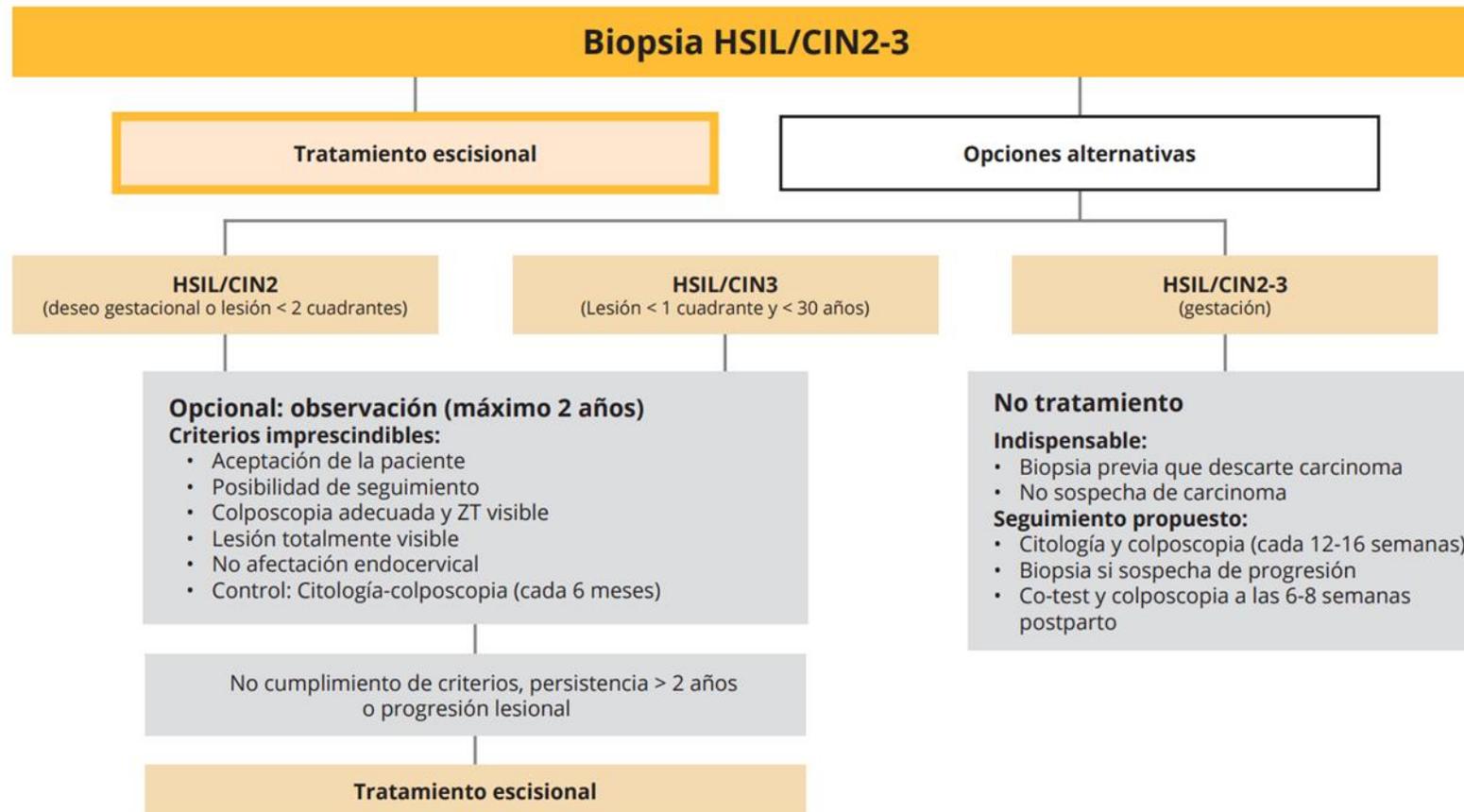


Figura 7. Algoritmo de decisión clínica ante HSIL/CIN 2-3 tras biopsia. Fuente: Guía para la Prevención del Cáncer de Cérvix de la AEPCC 2022(40).

1.6. EL DETERIORO DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO TRAS LA INFECCIÓN POR VPH

La probabilidad de que una infección por VPH se vuelva persistente y se traduzca en el desarrollo de un CCU invasivo debe entenderse como el efecto combinado de ciertas características virales (la más importante, el genotipo del VPH) y dependientes del huésped (básicamente, el estado inmunológico femenino). En esta sección revisaremos el conocimiento actual que existe tanto sobre los aspectos contribuyentes, cómo en la manera en la que la presumible concurrencia de los mismos está afectando al sistema inmunitario del huésped.

1.6.1. Estrategias del VPH para evadir el sistema inmunológico del huésped

Los mecanismos de evasión inmune del VPH están impulsados por el deterioro de diferentes etapas en la inmunidad innata y adaptativa, incluyendo la entrega de antígenos, la expresión de citoquinas, el procesado y presentación de antígenos. En la Figura 2A se proporciona una descripción general de estos mecanismos.

El VPH rara vez se detecta en ubicaciones sistémicas o en otros tipos de células distintas de la célula epitelial escamosa, lo que minimiza la exposición de los antígenos del VPH a las células inmunitarias. Esto se debe a que la actividad del VPH depende en gran medida del programa de diferenciación del queratinocito. De esta manera, las proteínas tempranas del VPH son expresadas en cantidades bajas y solo en la capa epitelial basal donde las células tienen la capacidad de proliferar, lo que garantiza la replicación del virus simultáneamente con la renovación del epitelio. Por el contrario, las proteínas tardías del VPH, que son las más inmunogénicas, solo se expresan en la capa más distal donde las células presentadoras de antígeno (APCs) no son muy abundantes y el queratinocito se desprende hacia la luz cervical favoreciendo la propagación del virus (41). Los VPH

han evolucionado para reducir y retrasar la expresión de las proteínas (L1 y L2) de la cápside (o tardías) y este mecanismo se basa en parte en el uso preferencial por parte del VPH de codones que las células de mamíferos rara vez usan, por lo que la producción de proteínas de la cápside está disminuida en las células basales, por la falta de disponibilidad del tRNA correspondiente (42). A diferencia de otros virus, el VPH no lisa las células epiteliales y, como resultado, las APC no pueden engullir viriones y presentar sus antígenos a las células inmunitarias. Además, la proteína E7 del VPH16 se expresa en el núcleo de queratinocitos donde es inaccesible para las APC (43) y utiliza motivos comunes compartidos con proteínas humanas para evadir el reconocimiento de antígenos (44).

Incluso en ausencia de citólisis viral-inducida, los queratinocitos infectados por VPH deberían secretar interferones tipo I ($\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$). Sin embargo, E6 interfiere con el factor de transcripción IRF-3 que se une al promotor de $\text{IFN}\beta$, lo que disminuye su efecto transactivador sobre el promotor de $\text{IFN}\beta$ (45,46) y también parece estar involucrado en el silenciamiento epigenético de $\text{IFN}\kappa$ en queratinocitos inmortalizados. No es sorprendente que, en comparación con los pacientes de control, el $\text{IFN}\kappa$ estuviera regulado a la baja en el tejido de CCU (47). A su vez, E7 bloquea la expresión de genes inducibles por $\text{IFN}\alpha$ (48) y también el IRF-1 de $\text{IFN}\beta$ (49). Además, las proteínas E6 y E7 reducen la expresión de TLR9 (50) y la del $\text{IFN}\alpha$ en células "Natural Killer" (NK) (51,52). Varias evidencias indican que las lesiones asociadas con el VPH son generalmente transitorias debido a respuestas inmunes efectivas celulares más que humorales (53–57). Por el contrario, las posibles estrategias de subversión de los microorganismos para evadir la respuesta de las células T efectoras podrían dirigirse directamente a las células T (como lo hace el VIH) o interferir con el proceso de presentación de antígenos, como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis* y el VPH. Dado que E6 y E7 son proteínas extrañas que no tienen su equivalente humana, las células de Langerhans (LC), las APC profesionales del epitelio escamoso, deberían potencialmente reconocerlas y presentarlas a través de moléculas HLA a las células T que posteriormente se diferencian en CTL y migran al epitelio para destruir los queratinocitos infectados. Sin embargo, este proceso no se ejecuta correctamente en el caso de la infección por VPH (58). Las oncoproteínas del VPH E5, E6 y E7 inducen una regulación negativa de la maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos al inhibir la expresión del transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP) y

de moléculas del CMH (59,60). En este contexto, las diferencias entre los genotipos de VPH en términos de actividad oncogénica no solo se refieren a los mecanismos de activación del ciclo celular y resistencia apoptótica sino también a la evasión inmune (61–63). Los genotipos de alto y bajo riesgo de VPH difieren en la capacidad de regular negativamente la expresión del CMH de clase I y se demostró que la región C-terminal dentro del dominio de dedo de zinc de la E7 del VPH afecta la actividad de la histona desacetilasa y es responsable de los contradictorios efectos de los genotipos de bajo riesgo VPH11 y de alto riesgo VPH16 sobre la inhibición del (64). No es de extrañar que el tiempo requerido para la eliminación de los tipos de VPH-AR, en particular del VPH16, tenga un promedio de 8 a 14 meses, mientras que para los VPH-BR este período suele ser más corto (5 a 6 meses) (65).

Es de destacar que la modificación en los epítomos virales puede influir en un reconocimiento adecuado del antígeno, lo que perjudica el aclaramiento del VPH. Incluso dentro del VPH16, existen variantes clasificadas en cuatro linajes principales basados en patrones filogenéticos comunes de polimorfismos de un solo nucleótido (asiático europeo, africano 1-3 y asiático-americano/del norte). Como resultado, Cornet et al. han demostrado que los riesgos relativos de cáncer de cuello uterino parecen depender del tipo de población humana considerada (66). Se ha demostrado que algunos linajes europeos del VPH16 tienen un cambio de nucleótido en la posición 350 (T>G; Leu>Val) que estaba más asociado con la infección persistente por VPH que el prototipo (67). Se ha informado que esta variante altera un epítomo de unión al péptido HLA-B7 que posiblemente influya en el reconocimiento inmunitario por parte de los CTL (68), aunque estudios posteriores no pudieron confirmar esta observación (69).

Los pacientes con neoplasias asociadas al VPH que muestran un perfil de citoquinas Th1 muestran un mejor resultado clínico en comparación con los pacientes que muestran un perfil Th2 (70). De hecho, la progresión del cáncer de cuello uterino se ha asociado con un cambio de tipo de citocina Th1 a Th2 indeseable inducido por dos epítomos derivados de E7 (71) y una expresión aumentada de IL10 (72–75). La respuesta de tipo Th1 es baja o está ausente en pacientes con verrugas genitales que no regresan (76,77), HSIL (78) y CCU (79–81). El mantenimiento de la población de CTL está impulsado por Th1 y, en consecuencia, los CTL rara vez se encuentran en muestras de sangre de pacientes

con HSIL y CCU, mientras que dicha población se detecta fácilmente en controles normales (82–84). A diferencia de las células Th1, la filtración del tumor con linfocitos T reguladores (Tregs) FOXP3+ se asocia con una peor supervivencia en varios tipos de cáncer, incluido el CCU (85) y, además, una proporción baja de CD8+/Tregs está fuertemente asociada con un mal pronóstico (86). Además, se han identificado Treg específicas para los antígenos E6 y E7 en linfocitos infiltrantes de CCU y HSIL (87), mientras que en modelos animales se ha demostrado que la deplección de Treg conduce a respuestas inmunitarias antitumorales (88,89).

Es importante mencionar que el sistema inmunológico ejerce una presión selectiva contra el tumor lo que lo obliga a desarrollar un mecanismo de evasión inmunológica conocido como inmunoedición. Dichos mecanismos comprenden: reducir la expresión de antígenos tumorales; evitar la presentación de antígenos por regulación negativa del CMH de clase 1 y/o el procesamiento ineficaz de antígenos; resistencia a la apoptosis inducida por el sistema inmunitario; expresión de moléculas con actividad inmunosupresora y reclutamiento de células inmunes que disminuyen la reacción inmune. Estos mecanismos son los mismos que ejercen las proteínas E6 y E7 del VPH y, por lo tanto, se superponen en la carcinogénesis cervical, siendo difícil separar qué es la evasión inmune impulsada por el VPH y el tumor, ya que el aumento de la expresión de E6 y E7 está asociado con el desarrollo del CCU.

1.6.2. Características inmunes dependientes del huésped

El grado del comentado estado tolerogénico (90,91) puede estar influenciado por el estado inmunológico del huésped que, a su vez, puede ser consecuencia de características adquiridas o constitutivas (línea germinal). Resaltando la importancia de la condición inmune adquirida de las mujeres con infección por VPH, se ha observado una mayor frecuencia de lesiones SIL en pacientes inmunocomprometidos como mujeres infectadas por VIH, receptoras de trasplante de órganos y pacientes que padecen otros tipos de neoplasias en el desarrollo de neoplasias malignas de cuello uterino. Los factores del estilo de vida también podrían afectar el estado inmunológico de las mujeres. La investigación

epidemiológica, bioquímica e histológica ha revelado que fumar se considera un factor de riesgo para CCU (92–94). Otros estudios epidemiológicos han demostrado que el uso de hormonas anticonceptivas orales durante más de cinco años fue asociado con un aumento de casi tres veces en el riesgo de CCU (95). Esta relación también podría estar relacionada con las características inmunológicas, ya que el tratamiento de células con concentraciones biológicamente relevantes de hormonas sexuales esteroideas suprimió la respuesta inflamatoria y mejoró la respuesta de Treg a las VLP del VPH-16 (96).

Con respecto a los factores de susceptibilidad de la línea germinal, muchos informes han estudiado la influencia de los polimorfismos en los genes relacionados con la inmunidad y la susceptibilidad al riesgo de CCU. La identificación de tales variantes genéticas tendría la ventaja de identificar a aquellos pacientes con mayor probabilidad de desarrollar SIL o CC después de una infección por VPH, complementando así el valor del riesgo asociado al genotipo de VPH. Dada su naturaleza altamente polimórfica y su papel fundamental en la presentación de antígenos, gran parte de la investigación sobre la susceptibilidad genética de SIL y CC se ha centrado en los genes del CMH (97). Los alelos del grupo del CMH de clase II DRB1*15 (especialmente DRB1*1503) se han asociado con CC escamoso en población brasileña y europea (98,99), mientras que otros autores encontraron otros alelos (DRB1*1001, DRB1*1101 y DQB1*0301) asociados con este riesgo en la población norteamericana (100). También podrían producirse variaciones genéticas similares en los genes del CMH en el tumor como resultado del proceso oncogénico y, por lo tanto, constituir cambios somáticos adquiridos (por ejemplo, codones de parada en HLA-B15 y -A24) que favorecen la pérdida del CMH y el escape del tumor a la respuesta de células T citotóxicas restringida por CMH (101).

Algunos autores han estudiado otros genes cuyas proteínas codificadas participan en la presentación de antígenos. Einstein et al. encontraron que dos polimorfismos en el gen TAP1 (I333V y D637D) estaban asociados con el desarrollo de HSIL (102). Otros grupos de estudio han evaluado polimorfismos en genes de citoquinas. Por ejemplo, las variantes en los genes IL4, IL10, TNF e IFN- γ se han relacionado con un mayor riesgo de CC (103–106).

Según la evidencia actual, los polimorfismos de TLR no parecen influir en la susceptibilidad al CCU, aunque se han informado algunas asociaciones significativas con los polimorfismos de TLR 2 y TLR 4, pero no con TLR3 y TLR9 (107,108).

Los genes KIR y HLA de los receptores de células NK son altamente polimórficos. Por ejemplo, la unión de los inhibidores de KIR 2DL y 3DL a los alotipos de HLA se correlaciona con la incapacidad de las NK para inducir la citólisis en células que portan estos HLA (109). Por esta razón, ciertos alelos KIR se han asociado con predisposición a infecciones virales, incluida la neoplasia cervical inducida por VPH (110,111). Carrington et al. demostraron que los pares de ligandos inhibidores específicos de KIR/HLA disminuyen el riesgo de desarrollar neoplasia cervical (HSIL y CCU), mientras que la activación de KIR 3DS1 se asoció con un mayor riesgo (111). Los NKG2 también son receptores NK que juegan un papel frente a antígenos virales y tumorales, siendo NKG2C y NKG2D potentes activadores de NK. Mientras que el polimorfismo nulo en NKG2C parece jugar un papel importante en la susceptibilidad al CCU (112), algunos estudios informaron asociaciones significativas entre ciertas variantes en NKG2D, o en uno de sus ligandos (MICB) con un riesgo reducido de CCU (113,114).

Dado el papel de CTLA4 en la inmunotolerancia al contrarrestar la señal coestimuladora de CD28 en las células T, Su et al. estudió la relación entre el riesgo de CCU y la distribución de genotipos de un polimorfismo en el promotor de CTLA4, el cual fue asociado con una mayor expresión de la proteína y se encontró una mayor frecuencia de portadores de -318T entre los casos de VPH16 y CCU (115).

Sin embargo, a pesar de la cantidad de datos y asociaciones presentados, no existe un único polimorfismo con una relación clara con la probabilidad de infección persistente o con la progresión de las lesiones inducidas por el VPH. Más bien, parece que las diferentes susceptibilidades genéticas se basan en muchas variantes polimórficas con una pequeña contribución fenotípica. Las técnicas de alto rendimiento y análisis de todo el genoma (GWAS) podrían proporcionar un enfoque óptimo para tal escenario. En este sentido, un estudio GWAS que involucró a 4811 sujetos de un estudio europeo de casos y controles sobre cáncer demostró que un polimorfismo (*rs9357152*) ubicado en la región del CMH II estaba

fuertemente asociado con la seropositividad de VPH8 (116). No obstante, todos estos análisis deberían considerar que la ausencia de replicación o validación de las variantes significativas podría deberse posiblemente a diferencias étnicas y ambientales en las poblaciones estudiadas.

1.7. CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (CCDA).

El sistema inmune posee dos vías posibles de citotoxicidad mediada por diferentes células citolíticas como son las células NK, los linfocitos T, los macrófagos y los granulocitos. Ambas vías tienen como una de sus principales funciones la eliminación de virus y de células tumorales. Una de ellas es de carácter inespecífico y forma parte de la inmunidad innata. La otra, es una respuesta específica mediada por la inmunidad humoral a través de inmunoglobulinas, de tal forma que se consigue dirigir la acción inespecífica citolítica mediante moléculas de la inmunidad adaptativa. En esta CCDA tienen un papel crítico los receptores Fc γ , que expresan en su superficie algunas células como las NK. Estos reconocen recíprocamente la fracción cristalizante (Fc) de la IgG favoreciendo la unión de agentes citolíticos a patógenos como virus o a células cancerígenas opsonizadas.

Existen 3 tipos de receptores para la Fc de la IgG: el Fc γ RI se une a la IgG monomérica con alta afinidad, mientras que el Fc γ RII y el Fc γ RIII (CD16) se unen solo a inmunocomplejos que posean este anticuerpo. El análisis de los genes que codifican para estos receptores reveló que provenían de un gen ancestral común miembro de la superfamilia de las Inmunoglobulinas. Están compuestos por un dominio extracelular homólogo a las mismas, un dominio transmembrana y otro intracelular con el que interactúan con las vesículas citoplasmáticas de las células citotóxicas(117), cuya presencia va a determinar las funciones divergentes estimuladora o inhibitoria del receptor(118). En estas vesículas se encuentran almacenadas diversas moléculas de la familia de las serín-proteasas, las granzimas, cuya función está íntimamente relacionada con la apoptosis y la muerte celular. La otra molécula de vital importancia en el proceso citolítico es la perforina, que se encarga de facilitar la penetración de las granzimas en la célula diana una vez se establece la sinapsis inmunológica entre esta y la célula efectora (119).

El Fc γ RII une los inmunocomplejos de IgG de tipo multimérico y se expresa mayoritariamente en células mieloides. La isoforma IIa lo hace predominantemente en fagocitos mononucleares, neutrófilos y plaquetas. El polimorfismo *rs1801274* en el gen que codifica para dicha isoforma posee dos alelos que se expresan de manera codominante: el R131 y el H131, los cuales difieren en un aminoácido de la posición 131 (arginina o histidina respectivamente) orientado hacia el dominio extracelular de la molécula. La sustitución de este aminoácido determina la capacidad para unir las IgG2. El Fc γ RIIa con histidina es la variante en humanos que más eficientemente se une a la IgG2, por el contrario, la variante con arginina se une pobremente(118).

Un segundo polimorfismo importante codificante para los receptores Fc γ es el *rs396991*, que se produce en el dominio extracelular 2 del Fc γ RIIIa. En función del SNP presente ocurriría una sustitución de las bases T>G, cuya consecuencia sería un cambio en los aminoácidos valina por fenilalanina en la posición 158. El residuo en la posición 158 interactúa directamente con la región bisagra inferior de la IgG1. Se ha demostrado que las células NK de donantes homocigotos para *FcGR3A 158V* unían más IgG1 en comparación con las células de donantes que eran homocigotos para *FcGR3A 158F* (120).

1.8. APOPTOSIS

La apoptosis, también denominada muerte celular programada, podría definirse como un mecanismo fisiológico que, a través de un conjunto de reacciones bioquímicas, llevan a la muerte celular de una forma ordenada y silenciosa. De esta forma se puede controlar el número de células, la dimensión de los tejidos y se mantiene una homeostasis correcta de los mismos, se regula el desarrollo embrionario o se gestionan los procesos selectivos del sistema inmune.

La célula apoptótica está sometida a una serie de alteraciones morfológicas que la caracterizan: la membrana plasmática se altera, el volumen celular se reduce considerablemente y el citoplasma se condensa. Por otro lado, el núcleo disminuye su tamaño y la cromatina se hace más densa, hasta colapsar dividiéndose en varias esferas(121). Una vez han finalizado estos procesos es fagocitada por células

vecinas o por macrófagos presentes en el tejido, de forma que se evita la respuesta inflamatoria local que transcurre durante la necrosis.

Uno de los grandes descubrimientos en la historia del proceso apoptótico ocurrió en 1982, cuando Horvitz publicó sus estudios genéticos realizados sobre el nematodo *C. elegans*, abriendo así las puertas a un conocimiento mayor de las bases moleculares y genéticas del mismo(122,123). Así, debido a la homología entre genes y tomando el proceso en este nematodo como referente para todos los sistemas, se ha podido identificar una gran parte de la red de mecanismos involucrados. Las alteraciones ocurridas en esta red pueden conllevar al desarrollo de patologías como el cáncer, trastornos neurodegenerativos y enfermedades autoinmunes(123–125)

1.8.1. Mecanismos de apoptosis

Las moléculas del proceso apoptótico que han persistido evolutivamente desde organismos como el *C. elegans* hasta los mamíferos superiores, desarrollan un mecanismo que se inicia por señales provenientes del interior de la célula, como consecuencia de eventos que alteran el correcto funcionamiento de la misma: la pérdida de contacto con las células que la rodean, el estrés celular o señales contradictorias y simultáneas en relación al inicio de su ciclo de división. Esto provoca la identificación de la célula como un potencial agente peligroso para todo el sistema o tejido donde está englobada, por lo que se desencadena un proceso de destrucción, que finaliza en la eliminación de la misma. Esta cadena de sucesos se conoce como mecanismo “intrínseco” y es incapaz de transcurrir sin la presencia de alguno de los daños mencionados anteriormente. Existen situaciones en las que es necesario dirigir activamente la célula hacia la apoptosis, pues su eliminación es necesaria para la obtención de un objetivo fisiológico común, sin que exista un daño celular previo. Los mamíferos han evolucionado hasta conseguir esta forma de apoptosis de vital importancia para el sistema inmune. En este mecanismo denominado “extrínseco” adquieren un rol fundamental los llamados receptores de muerte, los cuales detectan señales en la superficie celular de ligandos de muerte específicos. Los receptores pueden activar directamente a unas proteínas

involucradas de manera crucial en todo el proceso denominadas caspasas, unas cisteín-proteasas específicas de aspartato, que disparan la secuencia de eventos apoptóticos.

Existe un tercer mecanismo que conecta con otro esencial para la función efectora de los linfocitos citotóxicos y las células NK, a través de la vía de la granzima/perforina.

1.8.2. Receptores involucrados en la apoptosis (vía extrínseca)

Estos receptores se encuentran localizados preferentemente en la membrana citoplasmática, de forma que están en contacto con el espacio extracelular para poder recibir señales externas a la célula. Existen dos grupos principalmente:

- Receptores “de muerte”. Los receptores de muerte están caracterizados por mostrar un dominio extracelular, rico en cisteína y un segundo dominio citoplasmático llamado «dominio de la muerte» que se encarga de activar la maquinaria apoptótica. De tal modo que, una vez activos, transfieren la información al interior celular a través de un intrincado sistema de interacciones proteína-proteína, que activan diversas cascadas intracelulares como la ruta de las caspasas. Son los receptores conocidos como la superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y los mejor caracterizados son: el TNFR1, el FAS (también denominado CD95), y los receptores del “ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF” o TRAIL (de sus siglas en inglés TNF-related apoptosis-inducing ligand); con sus respectivos ligandos TNF, FASL y TRAIL.
- Receptores de glutamato, de trombina y canales iónicos dependientes de voltaje. Estos receptores desempeñan en condiciones normales una función fisiológica, pero su sobreactivación puede desencadenar la vía extrínseca.

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria que posee tanto una forma transmembrana como una soluble, aunque las dos son fisiológicamente activas, y

median su efecto a través de sus receptores TNFR1 y TNFR2. Estos son glicoproteínas transmembranales de la superfamilia de receptores del TNF (TNFRSF). TNFR1 y TNFR2 se encuentran en todas las células, excepto en hematíes, aunque la distribución del primero es más ubicua que la del TNFR2 y la expresión del TNFR1 es constitutiva frente a la del segundo, que ocurre de forma inducida. La pareja TNFR1/TNF puede transmitir dos tipos de señales muy diferentes a través del complejo TRADD (dominio de muerte asociado a TNFR): activa a los factores de transcripción NFkB y AP-1 dando lugar a la inducción de genes de carácter proinflamatorio e inmunomodulador; y por otro lado puede originar una señal de apoptosis.

El receptor de muerte FAS/CD95 es una proteína identificada inicialmente a través de un anticuerpo dirigido contra ella, que definió un antígeno localizado en la superficie de células como linfocitos humanos B y T activados, algunas líneas tumorales linfoides o en hepatocitos. El gen que la codifica se encuentra en humanos en el brazo corto del cromosoma 10. La proteína transmembrana FAS, en su porción intracelular, enlaza con FADD (dominio de muerte asociado a FAS), el cual facilita la interacción con la procaspasa 8 desencadenando la cascada de reacciones que llevan a la muerte celular controlada(126).

Su ligando fisiológico, el FASL (o CD95L) se encuentra presente en diversos tipos celulares, pero se expresa predominantemente en células T y NK activadas y de manera constitutiva en tejidos que disfrutan de "privilegio inmune". Esto ha sugerido una implicación determinante en procesos fisiológicos relacionados con el sistema inmune, como luego se ha demostrado con la regulación negativa de la respuesta inmune mediada por apoptosis de células T activadas cuando ya han cumplido su función(127), o en la delección de clones autorreactivos de linfocitos B. Por otro lado, también parece estar involucrado en el mecanismo de citotoxicidad de linfocitos T y células NK, en unión al clásico mediado por el sistema perforina/granzima B. De hecho, este último desencadena la apoptosis mediante procesos que confluyen en la caspasa 3, con los procesos activados por el receptor FAS (128).

Algunos órganos y tejidos como el ojo o los testículos no tienen la capacidad de soportar un proceso inflamatorio, por la propia fragilidad e idiosincrasia de los

mismos. Por lo tanto, se encuentran aislados para poder ser protegidos, de manera que se conocen como "sitios de privilegio inmune". En el pasado, se postulaba que esto se lograba evitando la entrada de células activadas en los mismos. Actualmente, se cree que los mecanismos de evasión son otros: las células activadas pueden acceder a estos tejidos, pero, una vez allí, se destruyen por muerte programada vía FAS/FASL(129). Esto se confirmó con el hallazgo de una expresión basal de CD95L en estos tejidos.

En otro aspecto, se ha postulado la implicación del FAS y otros receptores de muerte en la oncogénesis, probablemente debido a una desregulación de los mecanismos apoptóticos(130), e incluso se ha sugerido la activación de los mismos en células tumorales como estrategia de terapias anticancerígenas(131). En contraste, los mismos procesos que confieren un privilegio inmune en determinados tejidos podrían estar favoreciendo la estrategia de supervivencia de células malignas, en neoplasias en cuyo microambiente se encuentra el ligando de forma constitutiva(132).

TRAIL (o Apo2L) es un ligando que presenta gran similitud con FASL, aunque en contra de este, su ARNm se expresa constitutivamente en muchos tejidos y de forma incrementada en linfocitos T estimulados de sangre periférica. La activación de su señal genera apoptosis en gran variedad de células tumorales(133), así como se ha descrito su función en la supresión de linfocitos T periféricos(134). Otro importante papel en la apoptosis mediada por Apo2L es la eliminación de células infectadas por virus(135,136). Se puede unir con distintos receptores como el TRAILR1 (también conocido como DR4) y el TRAILR2 (DR5), que poseen un dominio de unión citoplasmático; o con los TRAILR3 y TRAILR4 localizados en la membrana, sobre los cuales, se ha sugerido que participan en los mecanismos de protección celular contra la apoptosis, recibiendo el nombre de receptores falsos (decoy o DCRs), que compiten con el DR4 y DR5 en su unión al TRAIL(137).

Los polimorfismos en genes funcionales, que codifican proteínas involucradas en la apoptosis podrían estar relacionados con una respuesta dependiente del individuo. De tal forma que, distintos alelos podrían ocasionar diferentes actividades proteicas con influencia en el resultado final del proceso

apoptótico (138) En este sentido, los polimorfismos *rs1800682* y *rs763110* en genes del sistema FAS/FASL, y los polimorfismos *rs12488654* y *rs2230229* en genes del receptor de TRAIL, han sido propuestos en diversos estudios por poseer variantes genotípicas cuyo fenotipo resultante ha demostrado diferentes implicaciones clínicas en cáncer y otras enfermedades.

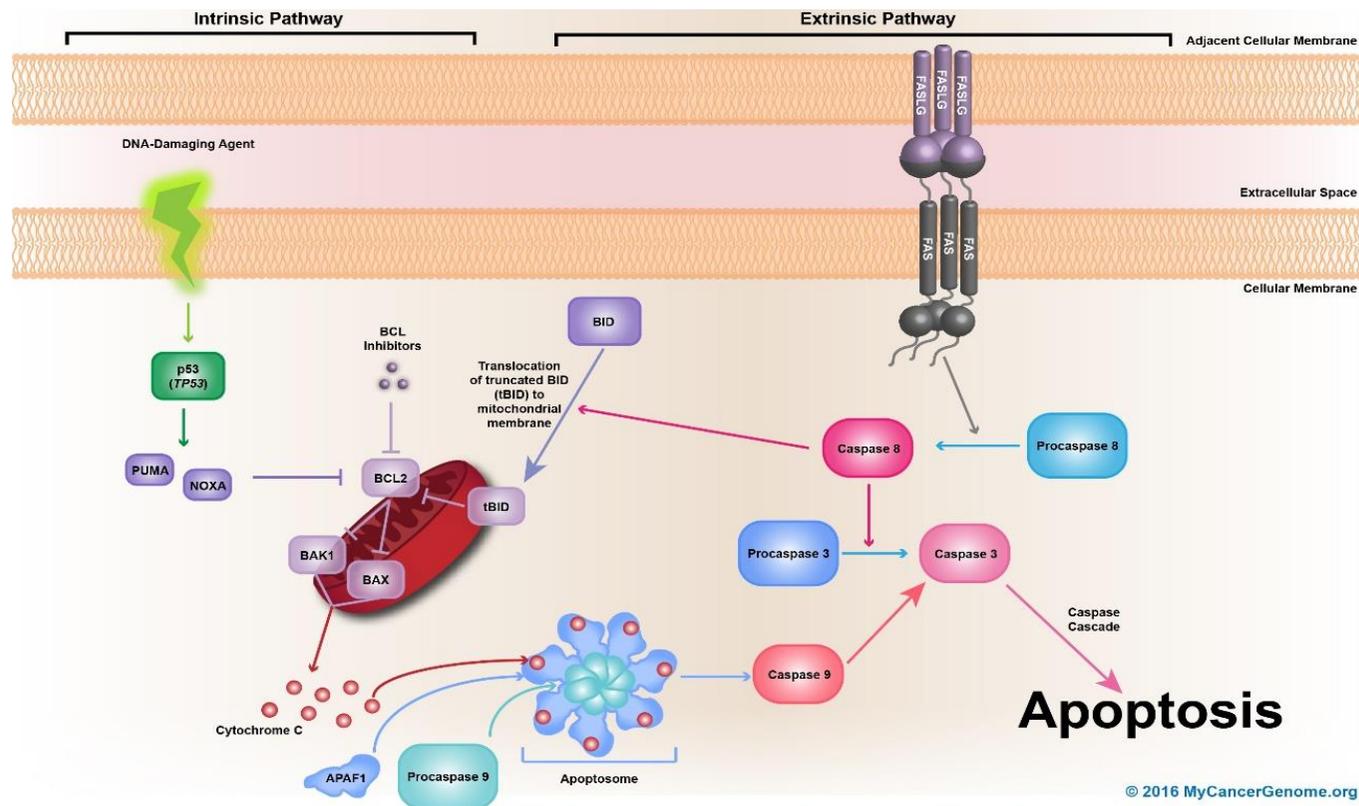


Figura 8. Apoptosis: mecanismos extrínsecos e intrínsecos. La vía extrínseca se activa mediante la unión de ligandos a su receptor correspondiente, como ocurre con FASLG y su receptor FAS, que desencadena la cascada de caspasas. La vía intrínseca se activa por estrés intracelular causado por toxinas celulares, infecciones virales, radicales libres, radiación o daño en el ADN. La activación es iniciada por proteínas de la familia BCL-2 en la mitocondria. La activación mitocondrial descarga proteínas pro-apoptóticas en el citosol provocando la activación de caspasas. Fuente: MycancerGenome.org (Vanderbilt-Ingram Cancer Center).

II – JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

II - JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.1. JUSTIFICACIÓN.

La infección por VPH es la ETS más frecuente y su relación como principal factor de riesgo con el CCU está plenamente demostrada. Además, existe un incremento mundial en el número de casos de cáncer, principalmente en los países menos desarrollados. El seguimiento de las SIL, como programas de prevención secundaria, ha demostrado su utilidad para anticiparse al desarrollo del CCU. Además del genotipo viral y la morfología citológica no se dispone de más parámetros para evaluar el riesgo de progresión. La progresión de LSIL a HSIL constituye un punto crucial en el proceso de carcinogénesis cervical ya que aproximadamente el 20% de las mismas progresarán a CIN2, el 30% de estas lesiones lo harán a CIN3 que, en el 40% de los casos, terminarán en CCU invasivo.

La etiopatogenia exacta del desarrollo del cáncer cervical se desconoce. Todavía hoy en día es un enigma por qué algunas mujeres afectadas con un genotipo de alto riesgo de VPH sufren una infección transitoria y sin embargo otras acaban desarrollando el proceso maligno. Se cree que en esta discriminación juega un papel importante la susceptibilidad genética de cada paciente. Esta podría estar relacionada con genes involucrados en la respuesta inmune entre otros, ya que se ha demostrado que la persistencia del virus durante períodos prolongados de tiempo es necesaria para el desarrollo del tumor. Por otro lado, también podrían existir variantes en genes que codifican proteínas relacionadas con la apoptosis (o muerte celular programada), proceso que ha sido relacionado intensamente con el

cáncer, por ser un mecanismo de control fisiológico de proliferación y de reparación de daño celular.

2.2. HIPÓTESIS.

La carcinogénesis cervical se debe a un efecto combinado de factores virales (VPH de alto riesgo) y de condicionantes inmunológicos de la mujer infectada. Al margen de estados de inmunosupresión, que son infrecuentes, los polimorfismos en genes implicados en la apoptosis y en la respuesta inmunitaria deben tener una implicación en la probabilidad de que una mujer con SIL de bajo grado progrese a alto grado.

III – OBJETIVOS

III - OBJETIVOS

3.1. PRINCIPAL

Evaluar si los polimorfismos en los receptores de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (*FcGR3A* y *FcGR2A*) o de apoptosis por la vía extrínseca (*TRAIL*, *FAS/FASL*, *TNFR*) desempeñan un papel en la progresión de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo a alto grado.

3.2. SECUNDARIOS

Conocer la distribución de genotipos de los polimorfismos *rs1801274*, *rs396991*, *rs1800682*, *rs763110*, *rs12488654* y *rs2230229* pertenecientes a los genes *FcGR2A*, *FcGR3A*, *FAS*, *FASL* y dos en *TRAILR* respectivamente en una población de mujeres con lesiones escamosas intraepiteliales del cuello uterino.

Comparar dicha distribución de genotipos con las de un grupo de mujeres sanas de control.

Averiguar la relación de dichos polimorfismos con la presencia de infecciones por VPH según su riesgo asociado.

IV – MATERIAL Y MÉTODOS

IV - MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN A ESTUDIO

Las pacientes objeto del estudio constituyen un grupo de 372 mujeres diagnosticadas de una SIL y sometidas a un seguimiento de 40 meses. Se registró toda la información clínica durante este período, para ser revisada por el personal facultativo de los servicios de Ginecología y Anatomía Patológica de los Hospitales Universitarios Santa María del Rosell y Santa Lucía de Cartagena (HUSMR y HUSL).

En el estudio sobre marcadores de apoptosis, 182 mujeres con registro de LSIL estable o regresivo en dos años de seguimiento fueron asignadas al grupo I (grupo de regresión), y 190 mujeres que desarrollaron HSIL durante el período de estudio fueron asignadas al grupo II (grupo de progresión). Se incluyeron también sesenta y siete donantes de sangre en el grupo de control, todas eran mujeres de edades conocidas y pertenecientes a la misma área geográfica (Área de Salud II de la Región de Murcia), que los grupos de pacientes.

En el estudio de susceptibilidad por polimorfismos en genes del FcGR los casos constituyen un subconjunto de las muestras citológicas y comprende 138 mujeres diagnosticadas como SIL y seguidas durante el período de enero de 2006 a marzo de 2009, que se comparó con un grupo de 115 controles sanos de entre las donantes ya mencionadas.

4.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN EN LOS ESTUDIOS

Todas las pacientes participaron de forma libre, voluntaria y consciente tras firmar un documento de consentimiento informado, el cual estaba elaborado conforme a la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica, y tras aprobación del Comité de Ética de los hospitales HUSMR y HUSL (referencia de aprobación: 10/12/CM-13-08).

Los identificadores fueron eliminados para proteger la confidencialidad de las pacientes.

Criterios de inclusión:

Pacientes diagnosticadas de LSIL debidamente informadas y bajo seguimiento por los Servicios de Ginecología y Anatomía Patológica de ambos hospitales.

Criterios de exclusión:

Pacientes con menos de dos años de seguimiento, antecedentes de CCU invasivo u otros tipos de cáncer, estado de inmunosupresión o haber declinado la inclusión en el estudio.

4.3. ESTUDIOS GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD Y APOPTOSIS

4.3.1. Muestras

Durante los 40 meses de seguimiento, si había presencia de LSIL, se realizaba un test de Papanicolaou y colposcopia en 6 meses. Si en la colposcopia o la citología se encontraba un mayor grado que la LSIL, se realizaba una biopsia. Si la LSIL persistía, se tomó una muestra de citología un año después del diagnóstico inicial.

El genotipado de VPH se realizó utilizando una muestra citológica (citocepillado) en el diagnóstico inicial y cada 6 meses tras el diagnóstico de LSIL y 3 meses después del de HSIL. Los diagnósticos de HSIL y LSIL se realizaron en muestras histológicas y citológicas, respectivamente. Algunas LSIL también se confirmaron mediante biopsia. Todos los frotis cumplieron con la Criterios actuales de adecuación de Bethesda Systems (139)

4.3.2. Extracción de ADN y cuantificación

La muestra de raspado cérvico-vaginal de las pacientes con LSIL y HSIL se recolectó y, a partir de ésta, se extrajo el ADN empleando el Kit de purificación de ADN celular Maxwell 16 (#AS1020 Promega, Madison, EE.UU.) y el extractor de ADN automatizado Maxwell 16 (Promega, Madison, EE.UU.) según el manual de

instrucciones. El ADN fue cuantificado por técnicas de absorbancia UV mediante el espectrofotómetro Biophotometer de Eppendorf (Hamburgo, Alemania). La concentración promedio de ADN en las muestras fue 60 ng/ μ l.

4.3.3. Genotipado de VPH

El genotipado se realizó con el kit Clart HPV 2 según instrucciones del fabricante (Genomica, Madrid, España; ClonDiag, Jena, Alemania) [6,8]. Los tipos de VPH genotipados con el kit incluyeron los genotipos de VPH-AR 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82; los genotipos de bajo riesgo 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 66, 70, 72, 81 y 89 y los genotipos con probabilidad de alto riesgo 20, 53 y 66. La amplificación de la región conservada L1 se realizó utilizando cebadores marcados con biotina y los amplicones fueron desnaturalizados e hibridados en una matriz de tubos de baja densidad que contenían sondas específicas del tipo de VPH. Este kit tiene la marca CE y ha sido validado en varios estudios [8,9]. Su sensibilidad analítica está entre 10-103 copias virales y la sensibilidad y especificidad diagnósticas para cada genotipo fueron 98,2% y 100%, respectivamente. Se incluyó en cada ensayo un control positivo de hibridación que contenía biotina, un control interno del gen CFRT humano y controles negativo y positivo del VPH.

4.3.4. Genotipado de *FcGR2A* H131R (*rs1801274*)

El polimorfismo se determinó en una mezcla de volumen total de 10 μ l que contenía 10 ng de ADN, 5 μ l de TaqMan GTXpress Master Mix (2X) y 0,5 μ l de TaqMan validada para ensayos de genotipado de discriminación alélica (por Applied Biosystems) utilizando un termociclador en tiempo real 7500F (Applied Biosystems, EE.UU.). Las condiciones de ciclado fueron 20 segundos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 3 segundos y annealing/extensión a 60 °C durante 30 segundos. Los alelos se asignaron usando el software SDS (Applied Biosystems).

4.3.5. Genotipado de *FcGR3A* V158F

El genotipado de *FcGR3A* V158F se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada y la técnica basada en fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) como se ha descrito anteriormente (140) con algunas modificaciones. Brevemente, en la primera PCR, se amplificó 1 µl de ADN en una mezcla de reacción de volumen 10 µl, que contenía dNTPs 0,4 mM, 3 pmol de cada uno de los cebadores, MgCl₂ 7,5 mM y 1U de Taq ADN polimerasa (temperatura de annealing, 57 °C).

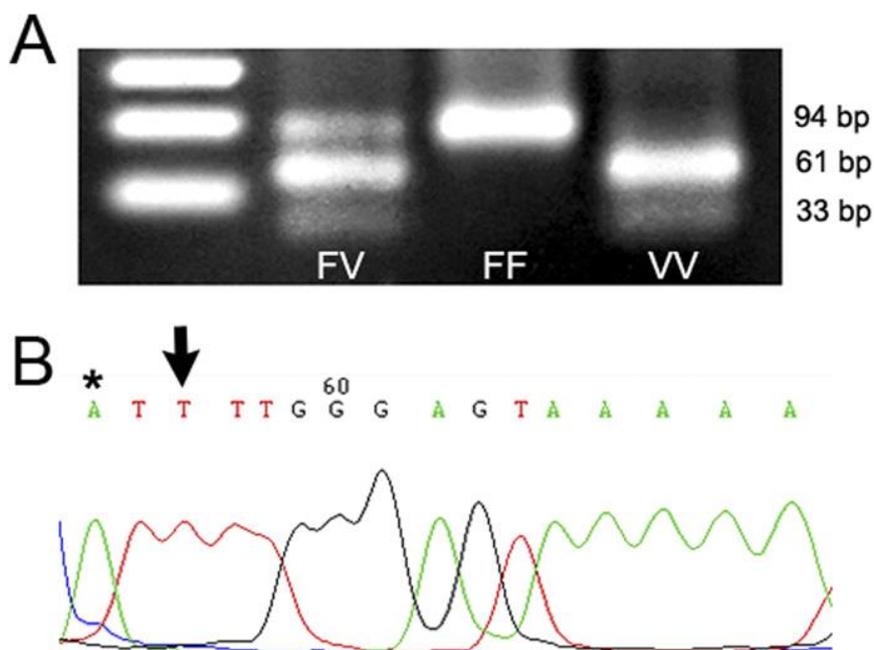


Figura 9. (A) Gel de agarosa: genotipado del polimorfismo V158F en el gen *FcGR3A* en células de cuello uterino exfoliado por PCR-RFLP. Se muestran los genotipos FF (94 pb), FV (94, 61 y 33 pb) y VV (61 y 33 pb). (B) Electroferograma de un homocigoto portador del genotipo FF (TTT). El nucleótido polimórfico está marcado con una flecha. El nucleótido marcado con un asterisco es el desajuste (mismatch) utilizado en el diseño del cebador para el sitio de reconocimiento de NlaIII. Fuente: Conesa et al.(141)

Se amplificó un microlitro del producto de PCR en las mismas condiciones que en la PCR anterior excepto por la temperatura de annealing de los cebadores (64 °C). Todos los reactivos de PCR fueron proporcionados por Promega, Madison, EE.UU. Cinco microlitros del amplicón de la segunda PCR fueron digeridos con 0,5 µl de NlaIII (Fermentas, Vilnius, Lituania) en un volumen de 10 µl durante 10 horas. El producto de la digestión fue analizado por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión al 2% (figura 9A).

Adicionalmente, un subconjunto de 36 muestras citológicas normales también fue genotipado para el polimorfismo de un sólo nucleótido V158F. Con intención de evaluar la sensibilidad del método PCR-RFLP para el genotipado de V158F, se secuenció una selección representativa de 20 muestras (que contenían genotipos FF, FV y VV) directamente usando el analizador ABI Prism Genetic (Figura 8B). Todas las muestras mostraron una perfecta concordancia entre ambas técnicas de genotipado para la discriminación de FF de genotipos no FF. La evaluación del genotipo se realizó sin conocimiento previo de asignación a los grupos de enfermedad.

4.3.6. Genotipado de *FAS*, *FASL* y *TRAILR*

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) *FAS* *rs1800682* y *FASL* *rs763110* fueron determinados mediante PCR competitiva alelo-específica utilizando el kit de Kbioscience chemistry (LGC Genomics, Herts, UK) que diseña ensayos de genotipado basados en el SNP y sus secuencias flanqueantes y su propia PCR competitiva específica de alelo patentada (KASPar), un sistema de genotipado de SNP que utiliza sondas FRET (fluorescence resonance energy transfer).

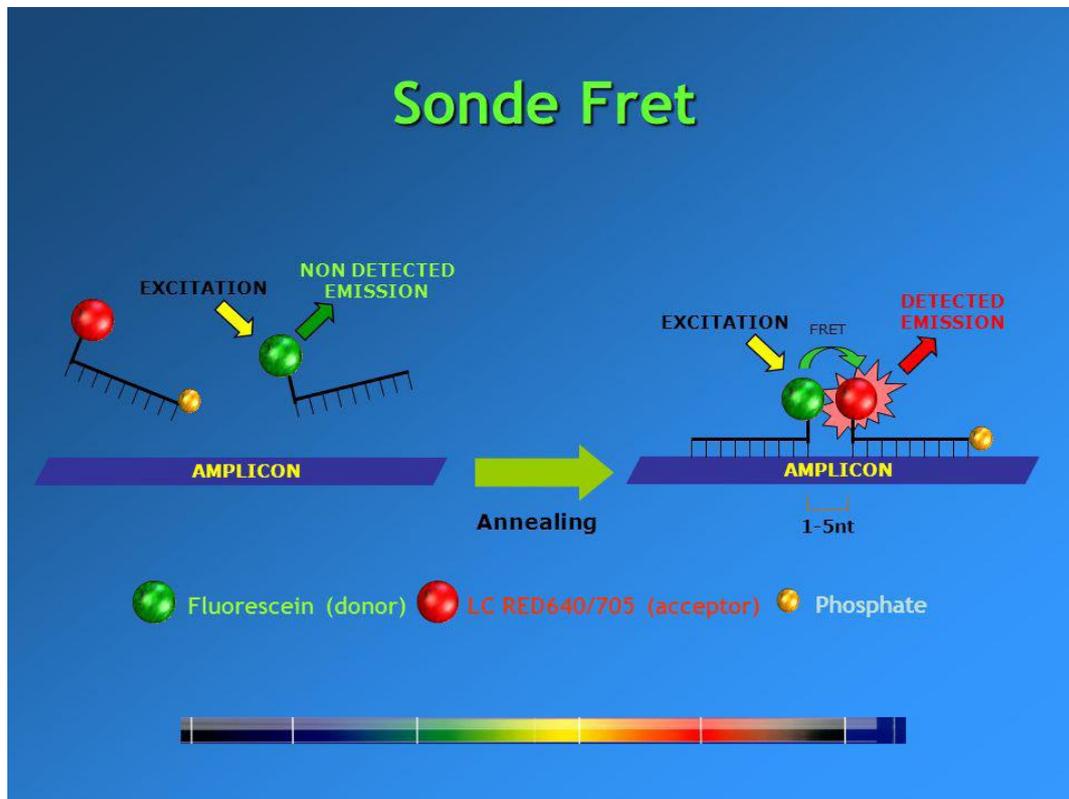


Figura 10. Transmisión de fluorescencia de las sondas FRET. A. Las sondas se encuentran separadas, no se transmite la energía de resonancia y no hay emisión de fluorescencia por el fluorocromo aceptor. B. Durante la hibridación, la distancia entre fluorocromos de las sondas es menor de 5 nucleótidos, se produce la transferencia de energía, el fluorocromo aceptor emite fluorescencia que es detectada. Fuente: tesis de María Jesús Zamora Gimeno (Estudio de Factores Genéticos Relacionados con la Variabilidad Interindividual en la Respuesta a Antagonistas del TNF en Pacientes con Espondilitis Anquilosante. 2015).

Los ensayos KASP on Demand (KOD) son puestos a punto por la empresa proveedora utilizando un panel de validación de 44 muestras de ADN, para cada SNP que se vaya a determinar. El cóctel de PCR (10 μ l de volumen total) incluye 2 μ l ADN; 0,117 μ l de $MgCl_2$ con concentración 50 mM; 0,064 μ l de mezcla de ensayo KASP, que contiene dos cebadores específicos de alelo (uno para cada alelo SNP) con una única secuencia de cola sin etiquetar en el extremo 5' y una sonda común (inversa) y 4 μ l de KASP 2x Master Mix que contiene los casetes específicos de FRET (uno marcado con sonda fluorescente azul que emite a 518 nm o FAMTM y otro

con sonda verde que emite a 553 nm o HEX™), polimerasa Taq especialmente modificada para PCR específica de alelo y un tampón optimizado. Según las instrucciones del fabricante, las condiciones de ciclado de PCR para el SNP FAS fueron 94 °C durante 15 min, seguido de 35 ciclos de 57 °C durante 25s y 72 °C durante 40s; mientras que para el polimorfismo en FASL fueron los siguientes: 15 min a 94 °C, seguido de una serie de 10 ciclos (10s a 94 °C, 60s a 61 °C, bajando 0,6 °C por ciclo hasta alcanzar la temperatura de hibridación (annealing) de 55 °C) y una segunda serie de 26 ciclos (10s a 94 °C y 60s a 55 °C). Ambos SNPs se determinaron utilizando un termociclador en tiempo real 7500F (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

POLIMORFISMOS ESTUDIADOS						
Proceso	CCDA	CCDA	Apoptosis	Apoptosis	Apoptosis	Apoptosis
Gen	<i>FcGR2A</i>	<i>FCGR3A</i>	<i>FAS</i>	<i>FASL</i>	<i>TRAIL</i>	<i>TRAILR</i>
Código rs	<i>rs1801274</i>	<i>rs396991</i>	<i>rs1800682</i>	<i>rs763110</i>	<i>rs12488654</i>	<i>rs2230229</i>
Descripcion común del cambio en la bibliografía	H131R	V158F	A670G	C844T	A716G	A1322G
Alelo mayoritario*	A	A	A	C	G	T

Tabla 1. Polimorfismos estudiados. *Alelo mayoritario en población europea.

4.3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de asociación entre genotipos, tanto en los estudios de susceptibilidad como en aquellos que implicaron polimorfismos relacionados con la apoptosis, y los grupos de regresión o progresión se realizó utilizando el software Epidat Versión 3.1. (Xunta de Galicia, A Coruña, España; Organización Panamericana de la Salud, Washington DC). Se utilizó la prueba χ^2 de Pearson para evaluar la significación estadística considerando $p < 0,05$ como significativo.

Las razones de probabilidades (Odds Ratio) se calcularon a partir de tablas de 2x2 utilizando la prueba exacta de Fisher. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue determinado utilizando la calculadora proporcionada por la Universidad de Tufts.

V – RESULTADOS

V - RESULTADOS

5.1. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS CON LA SUSCEPTIBILIDAD INMUNE A LA PROGRESIÓN DESDE LSIL A HSIL.

La media de edad del grupo de regresión (37,8 con una desviación estándar (DE)=9.72) no difirió sustancialmente de la del grupo de progresión (39,1 con una desviación estándar (DE)=9.29). La mayoría de las mujeres eran caucásicas (85,7% para el grupo I y 81,5% para el grupo II) seguido de amerindias (14,3% para el grupo I y 16,7% para el grupo II). No se encontraron diferencias entre las etnias en ambos grupos ($p > 0,05$). Se observó positividad para VPH-AR en el 67,9% de los casos del grupo I y en el 87,0% de los casos del grupo II (Tabla 1) siendo el VPH16 el más frecuente en ambos grupos (datos no mostrados).

5.1.1. Resultados del polimorfismo *rs1801274* (H131R) en el gen *FcGR2A*

GRUPO	N	Genotipo			Ji Cuadrado P (frente a controles)
		AA (%)	AG (%)	GG (%)	
CASOS TOTALES	110	20 (18,18)	58 (52,73)	32 (29,09)	0,9729
LSIL	64	14 (21,87)	34 (53,13)	16 (25,00)	0,8044
HSIL	46	6 (13,04)	24 (52,17)	16 (34,78)	0,5974
LSIL VPH 16	22	7 (31,82)	9 (40,91)	6 (27,27)	0,4105
HSIL VPH 16	15	2 (13,33)	8 (53,33)	5 (33,33)	0,8480
CONTROLES	109	21 (19,27)	56 (51,38)	32 (29,36)	

Tabla 2. Asociación del polimorfismo H131R y los grupos de regresión y progresión.

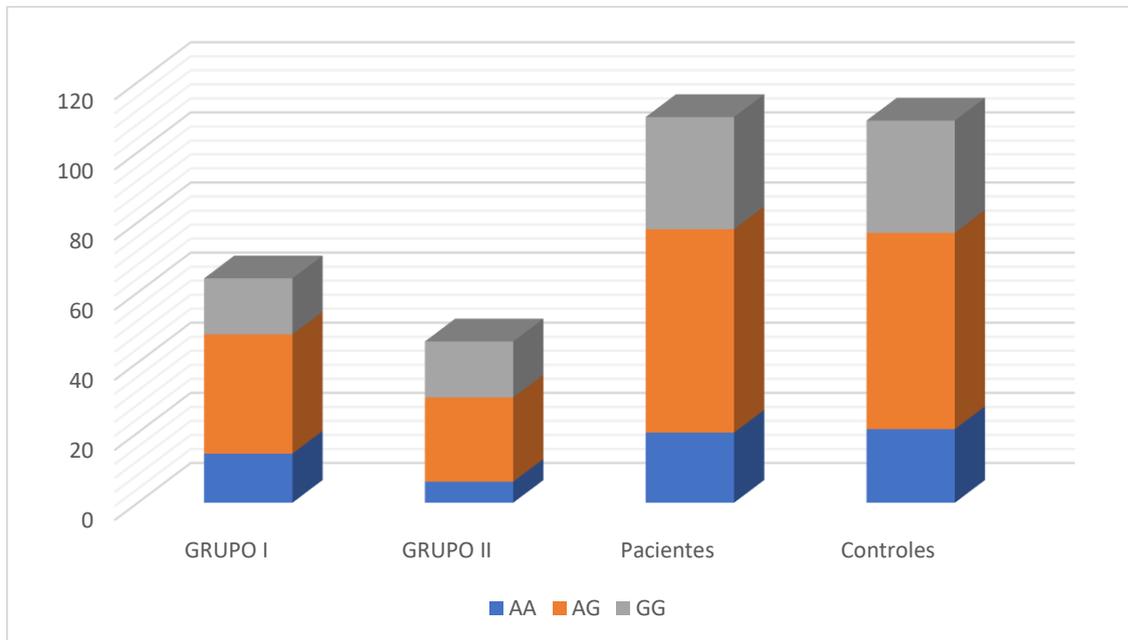


Figura 11. Distribución del polimorfismo H131R entre los distintos los grupos.

La distribución de genotipos para H131R en el grupo control fue similar a la observada en otros estudios (142,143) y fue consistente con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,691$).

Distribución del genotipo H131R en casos y controles:

La distribución del genotipo *FcGR2A* H131R en controles y casos (grupo I y grupo II en conjunto) fue la siguiente; controles: HH 19,3%, HR 51,4%, RR 29,3% y casos: HH 18,1%, HR 52,6%, RR 29,3% ($p=0,9729$). Elegimos enfrentar fenotipo AA frente a no AA porque parece que de haber diferencias significativas sería agrupando de esta manera. Cuando se compararon los dos grupos de pacientes, las frecuencias AA vs GA+GG fueron 21,9% vs 78,1% en el grupo I y 13,0% vs 87,0% en el grupo II, respectivamente ($p=0,2292$). La distribución de los controles con respecto al grupo I era muy similar, por lo que se decidió ya no compararlos con el grupo II.

En cuanto a los pacientes infectados por VPH16 treinta y siete pacientes de 110 mostraron positividad para VPH16. El genotipo *FcGR2A* HH se observó en el 31,8 % del grupo I y en el 13,3 % del grupo II de pacientes infectados con VPH16 ($p=0,1865$).

5.1.2. Resultados del polimorfismo *rs396991* (V158F) en el gen *FcGR3A*

GRUPO	N	Genotipo			Ji Cuadrado P (frente a controles)	Ji Cuadrado P (frente a LSIL)
		FF (%)	FV (%)	VV (%)		
CASOS TOTALES	138	51 (37,0)	59 (42,7)	28 (20,3)	0,5986	
LSIL	84	23 (27,4)	43 (51,2)	18 (21,4)	0,1564	
HSIL	54	28 (51,9)	16 (29,6)	10 (18,5)	0,2556	0,0109 0,0033*
LSIL VPH 16	57	14 (24,6)	32 (56,1)	11 (19,3)	0,1279	
HSIL VPH 16	47	26 (55,3)	14 (29,8)	7 (14,9)	0,2481	0,0045** 0,0013***
CONTROLES	80	33 (41,3)	35 (43,7)	12 (15,0)		

Tabla 3. Asociación del polimorfismo V158F y los grupos de regresión y progresión. *Valor de p cuando se analizó FF frente a FV y VV en combinación. **Valor de p enfrentando sólo a aquellas pacientes con genotipo 16 del VPH. *** Valor de p cuando se analizó FF frente a FV y VV en combinación en pacientes VPH16.

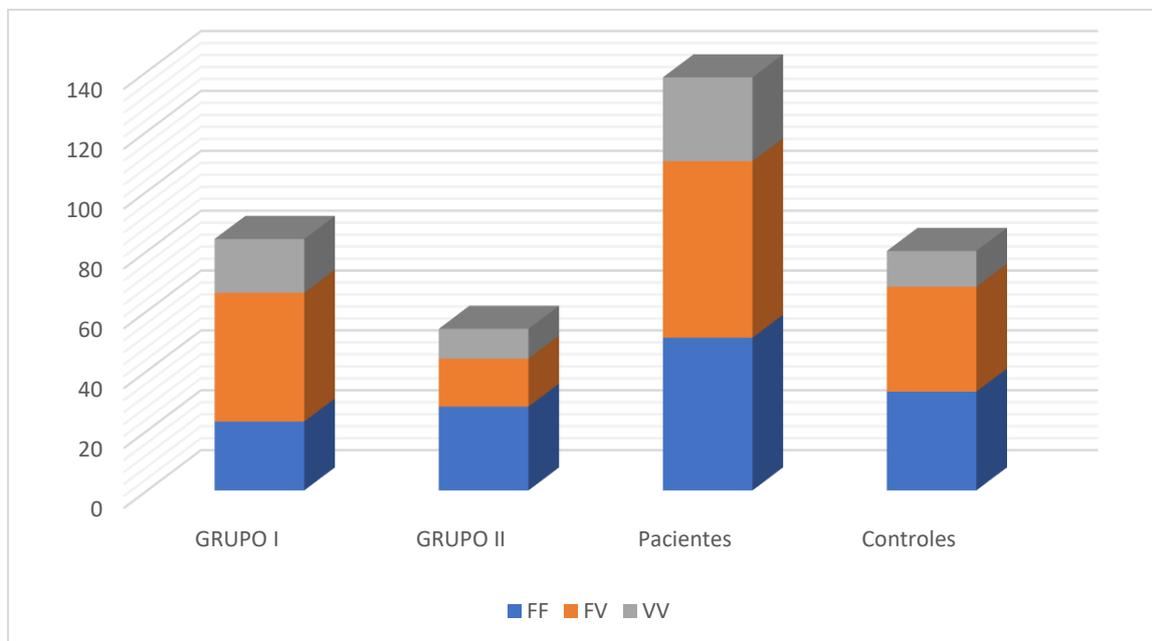


Figura 12. Distribución del polimorfismo V158F entre los distintos los grupos.

La frecuencia de los genotipos en los controles para el polimorfismo en *FcGR3A* cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,589992$). Asimismo, se encontró que la distribución alélica en nuestra serie también lo cumplía ($p=0,156917$).

Como se muestra en la Tabla 2, el 27,4% de las pacientes del grupo I tenían el genotipo FF, mientras que el porcentaje fue del 51,9% en el grupo II. La distribución de genotipos fue significativamente diferente entre los dos grupos ($p=0,0109$). Al considerar los genotipos FF frente a FV y VV en combinación, se obtuvo un valor de p significativo de 0,0033 y una razón de probabilidades (OR) de 2,856 (con un intervalo de confianza al 95% [IC] de 1,4 -5,8). Al analizar sólo mujeres infectadas con VPH-AR, se detectó el genotipo FF en el 24,6% de las pacientes del grupo I y en el 55,3% de las pacientes del grupo II, proporcionando una diferencia aún más significativa ($p=0,0045$) que la obtenida considerando toda la serie. Cuando se enfrentó el genotipo FF contra FV y VV en combinación, el valor de p fue de 0,0013 con una OR=3,8 (IC 95%=1,7-8,8). No se observaron diferencias estadísticas al comparar la distribución de genotipos entre las pacientes del grupo I con (8 FF, 10 FV, y 6 VV) o sin (14 FF, 35 FV y 11 VV) diagnóstico de LSIL confirmado por biopsia ($p>0,05$). La distribución de genotipos en muestras citológicas normales fue de 41,3% FF, 43,7% FV y 15,0% VV. No se observaron diferencias significativas entre estas frecuencias y las de las muestras objeto de estudio (grupos I y II en conjunto) cuyo resultado fue de 37,0% FF, 42,7% FV y 20,3% VV ($p=0,5986$).

5.2. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES INVOLUCRADOS EN APOPTOSIS CON LA SUSCEPTIBILIDAD INMUNE A LA PROGRESIÓN DESDE LSIL A HSIL.

La edad media para el grupo de regresión (35,1 años, DE= 10,2) no difirió sustancialmente de la del grupo de progresión (37,6 años, DE= 10,3). La mayoría de las mujeres eran caucásicas (85,7% para el grupo I y 81,5% para el grupo II) seguido de latinas (14,3% para el grupo I y 16,7% para el grupo II). No se encontraron diferencias entre las etnias en ambos grupos ($p > 0,05$). Se observó positividad para VPH-AR en el 64,84% de los casos del grupo I y en el 58,42% de los casos del grupo II (Tabla 1 del artículo de 2021) siendo el VPH16 el más frecuente en ambos grupos (datos no mostrados).

5.2.1. Resultados del polimorfismo rs1800682 (A670G) en el gen FAS

GRUPO	N	Genotipo			Ji Cuadrado P (frente a controles)
		AA (%)	GG (%)	AG (%)	
CASOS TOTALES	374	88 (23,53)	91 (24,33)	195 (52,14)	0,1252
LSIL	183	41 (22,40)	41 (22,40)	101 (55,20)	0,0801
HSIL	191	47 (24,61)	50 (26,18)	94 (49,21)	0,3137
LSIL VPH alto riesgo	118	30 (25,42)	27 (22,88)	61 (51,69)	0,3139
HSIL VPH alto riesgo	112	27 (24,11)	28 (25,00)	57 (50,89)	0,3104
CONTROLES	85	28 (32,94)	22 (25,88)	35 (41,18)	

Tabla 4. Asociación del polimorfismo A670G y los grupos de regresión y progresión.

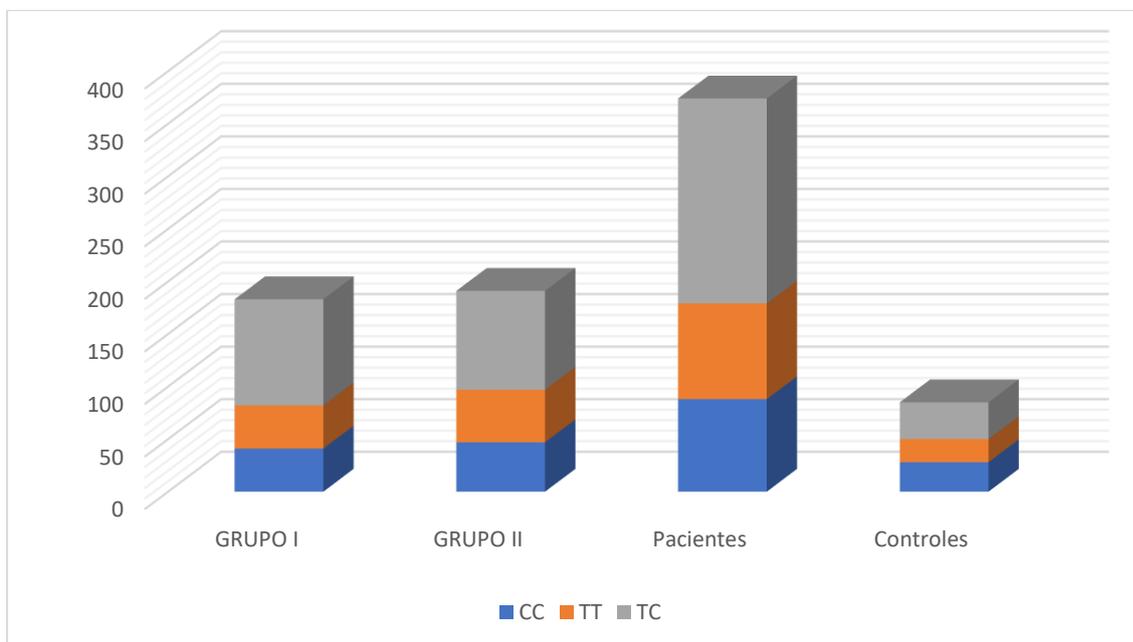


Figura 13. Distribución del polimorfismo A670G entre los distintos los grupos.

La frecuencia de los genotipos en los controles para el polimorfismo en FAS cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,112070$)

A priori, lo primero que observamos es un ligero predominio del genotipo AG en detrimento de los homocigotos AA en los casos (52,14%) con respecto a los controles (41,18%). Esta proporcionalidad en el número de pacientes con genotipo AG, se mantiene al restringir los casos según tipo de lesión (55,20% en LSIL y 49,21% en HSIL); o por pacientes infectadas por VPH de alto riesgo según tipo de lesión: 51,69% para LSIL infectadas con VPH de alto riesgo (VPH-AR) y 50,89% para HSIL infectadas por VPH-AR. En todas las situaciones en las que se comparó algún grupo de pacientes con respecto al grupo control se encontró una cierta tendencia al aumento de los heterocigotos, alcanzándose el mayor grado de significación estadística cuando se enfrentaron los pacientes totales (sin discriminación según el genotipo para VPH) del grupo I con los controles ($p=0,0801$). En este mismo contexto al enfrentar las pacientes AA frente a aquellas con distinto genotipo el grado de significación se apuró todavía un poco más ($P=0,07$); pero sin alcanzar, en ningún caso, la significación estadística. La tendencia se ve más acentuada cuanto mayor es la presencia del haplotipo A, por lo que este podría tener un ligero papel protector; aunque no podemos confirmar esta asociación.

5.2.2. Resultados del polimorfismo rs763110 (C844T) en el gen FASL

GRUPO	N	Genotipo			Ji Cuadrado P (frente a controles)	Ji Cuadrado P (frente a LSIL)
		CC (%)	TT (%)	TC (%)		
CASOS TOTALES	372	161 (43,28)	58 (15,59)	153 (41,13)	0,6761	
LSIL	182	65 (35,71)	33 (18,13)	84 (46,16)	0,8277	
HSIL	190	96 (50,52)	25 (13,16)	69 (36,32)	0,2087	0,0152 0,0039*
LSIL VPH-AR	118	44 (37,29)	20 (16,95)	54 (45,76)	0,8511	
HSIL VPH-AR	111	63 (56,76)	16 (14,41)	32 (28,83)	0,0668	0,0098** 0,0024***
CONTROLES	67	26 (38,81)	13 (19,40)	28 (41,79)		

Tabla 5. Asociación del polimorfismo C844T y los grupos de regresión y progresión. *Valor de p cuando se analizó CC frente a TT y TC en combinación. **Valor de p enfrentando sólo a aquellas pacientes con genotipos VPH-AR. *** Valor de p cuando se analizó CC frente a TT y TC en combinación en pacientes VPH-AR.

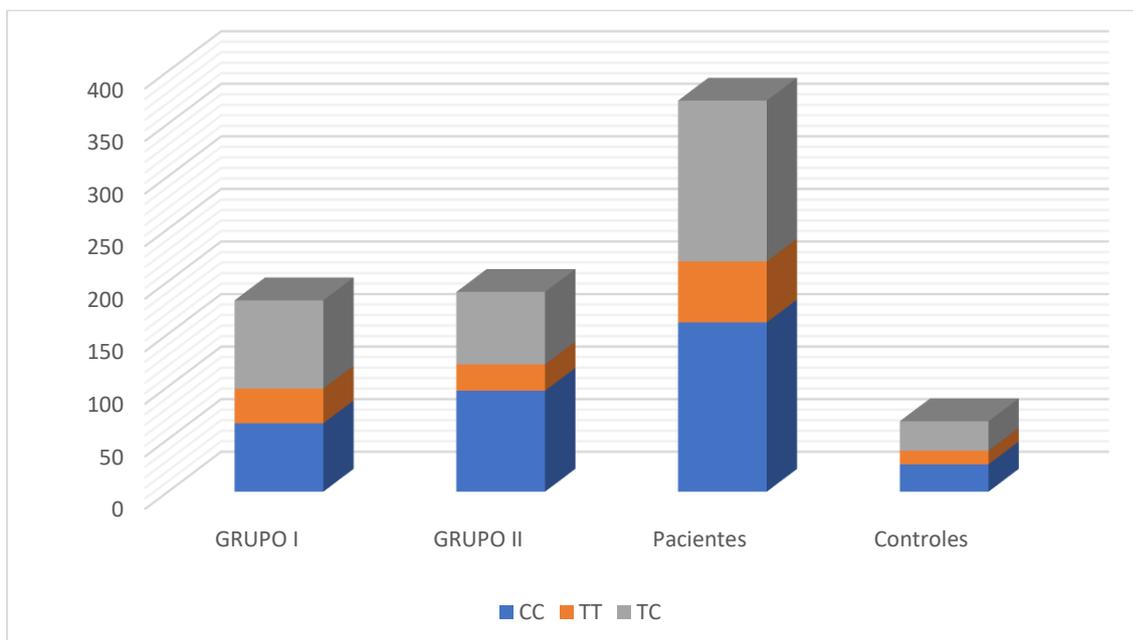


Figura 14. Distribución del polimorfismo C844T entre los distintos los grupos.

La concordancia de las distribuciones de genotipos con el equilibrio de Hardy-Weinberg se testó en un grupo previamente caracterizado (112) de 67 mujeres sanas del mismo origen étnico y geográfico obteniéndose frecuencias que cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg para ambos polimorfismos (Tabla 2 de artículo de 2021)- siendo similares a las que se encuentran en bases de datos públicas y estudios previos sobre población caucásica. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).

No obstante, el genotipo CC *rs763110* de *FASL* estuvo presente en el 35,7% de los pacientes del grupo I mientras que este porcentaje fue del 50,5% en el grupo II. Por lo tanto, la distribución de genotipos fue significativamente diferente entre los dos grupos ($p=0,0152$). Cuando se valoró el genotipo CC frente a los genotipos CT y TT combinados, se obtuvo un valor de p significativo de 0,0039 y un Odd ratio (OR) de 1,83 (IC 95 % = 1,21-2,79) (Tabla 4). Al analizar sólo las mujeres infectadas con VPH-AR, el genotipo CC se detectó en el 37,3% del grupo I y en el 56,8% de mujeres del grupo II y el valor de p fue de 0,0098. Finalmente, cuando el genotipo CC fue enfrentado contra CT y TT en conjunto, se obtuvo un valor de p de 0,0024 y una OR = 2,21 (IC 95% = 1,30-3,75).

5.2.3. Resultados del polimorfismo rs12488654 (A716G) en el gen TRAIL (TRAIL4)

GRUPO	N	Genotipo			Ji Cuadrado P (frente a controles)
		AA (%)	GG (%)	GA (%)	
CASOS TOTALES	375	9 (2,40)	273 (72,80)	93 (24,80)	0,3347
LSIL	187	5 (2,67)	135 (72,19)	47 (25,14)	0,3813
HSIL	188	4 (2,13)	138 (73,40)	46 (24,47)	0,3875
LSIL VPH alto riesgo	119	4 (3,36)	86 (72,27)	29 (24,37)	0,5150
HSIL VPH alto riesgo	110	2 (1,82)	81 (73,64)	27 (24,55)	0,4113
CONTROLES	85	3 (3,53)	67 (78,82)	15 (17,65)	

Tabla 6. Asociación del polimorfismo A716G y los grupos de regresión y progresión.

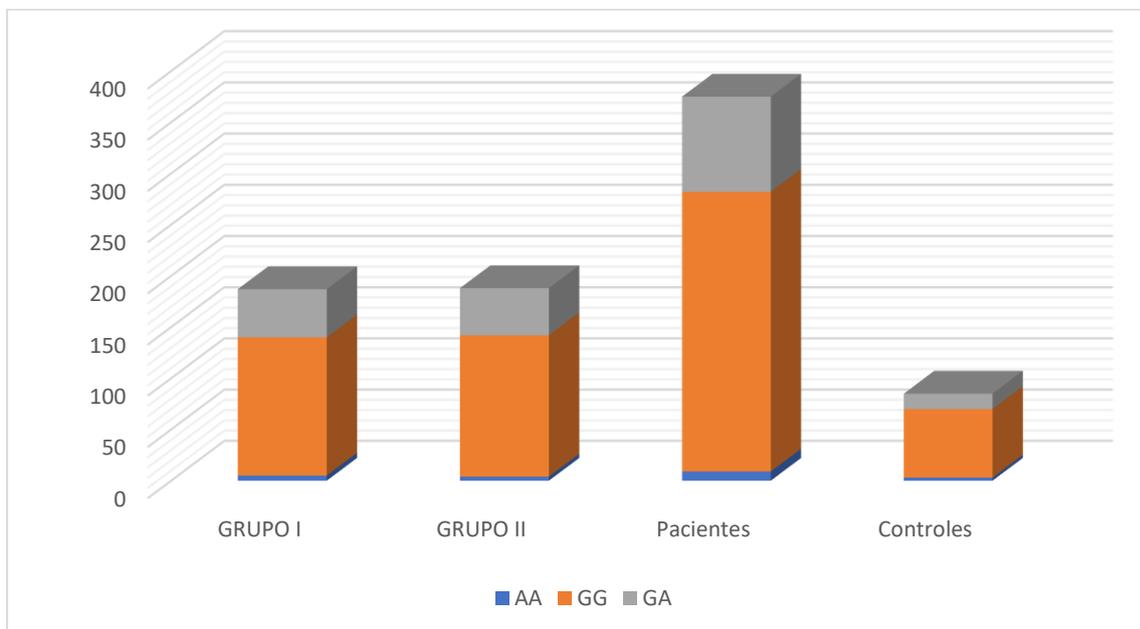


Figura 15. Distribución del polimorfismo A716G entre los distintos los grupos.

La frecuencia de los genotipos en los controles para el polimorfismo en TRAILR4 cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,088$).

Al analizar este polimorfismo nos encontramos una distribución de genotipos extremadamente homogénea en todos los casos y también con respecto a los controles. Esta situación, unida a la baja prevalencia del genotipo homocigoto AA mostró como resultado unos valores de significación mínimos.

5.2.4. Resultados del polimorfismo *rs2230229* (A1322G) en el gen *TRAILR* (TRAILR9)

GRUPO	N	Genotipo			Ji Cuadrado P (frente a controles)
		AA (%)	GG (%)	GA (%)	
CASOS TOTALES	372	297 (79,84)	8 (2,15)	67 (18,01)	0,4565
LSIL	184	147 (79,89)	5 (2,72)	32 (17,39)	0,6363
HSIL	188	150 (79,78)	3 (1,60)	35 (16,62)	0,3965
LSIL VPH alto riesgo	122	104 (85,25)	0 (0)	18 (14,75)	0,0357
HSIL VPH alto riesgo	107	86 (80,37)	0 (0)	21 (19,63)	0,1082
CONTROLES	101	76 (75,25)	4 (3,96)	21 (20,79)	

Tabla 7. Asociación del polimorfismo A1322G y los grupos de regresión y progresión.

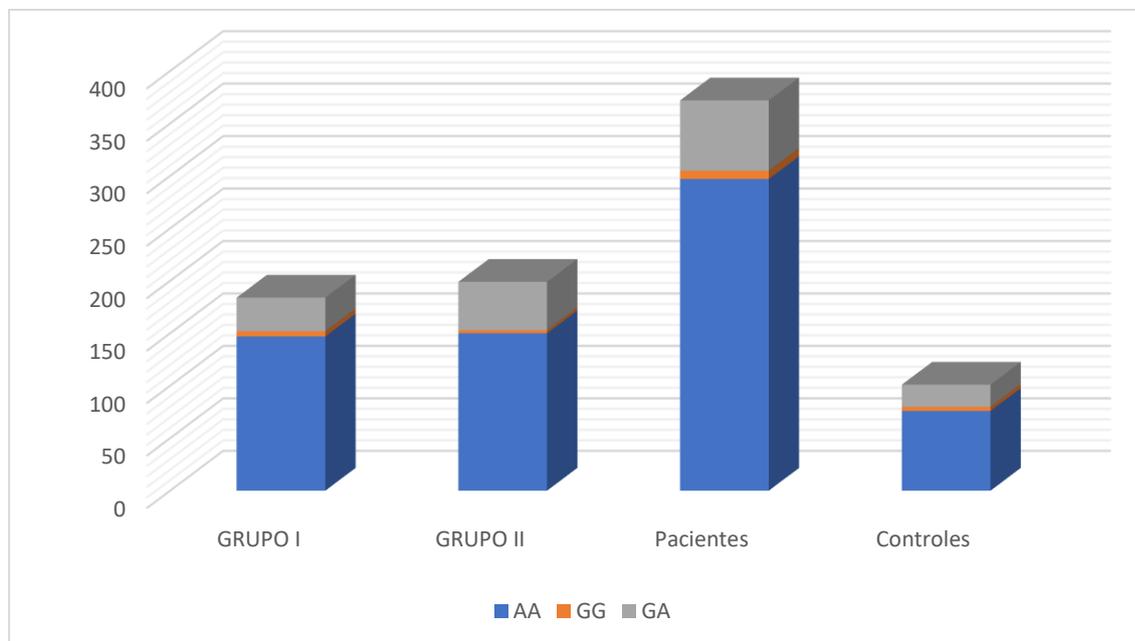


Figura 16. Distribución del polimorfismo A1322G entre los distintos los grupos.

La frecuencia de los genotipos en los controles para el polimorfismo TRAILR9 cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,1206$).

Las diferencias en la distribución de genotipos entre el grupo de las pacientes LSIL con VPH-AR con respecto a los controles son significativas ($p=0,0357$). Es el único grupo de pacientes que cumple esta condición. Sin embargo, al enfrentar pacientes agrupadas con presencia del alelo G (GG+GA) y homocigotas AA entre los grupos de LSIL y los controles el grado de significación baja ($p=0,06$), lo que no excluiría la influencia del alelo G ya que su presencia es minoritaria en comparación con la del alelo A. Esto podría suponer que el genotipo heterocigoto o incluso el alelo G podrían conferir cierto grado de protección frente al desarrollo de una lesión de bajo grado en pacientes infectadas por VPH de alto riesgo, pero probablemente no influiría en una futura progresión a HSIL, ya que no se encontró significación entre este grupo y el de LSIL ($p=0,3283$), así como entre el mismo y los controles ($p=0,1082$).

VI – DISCUSIÓN

VI - DISCUSIÓN

Los estudios epidemiológicos demuestran que la infección por VPH-AR es muy común pero solo unas pocas mujeres infectadas desarrollarán CCU invasivo. Los factores dependientes del huésped parecen ser cruciales en el desarrollo del mismo.

Los polimorfismos en genes relacionados con la respuesta inmunitaria parecen estar asociados con un mayor riesgo de susceptibilidad y progresión de la neoplasia cervical (144,145). Este tumor se caracteriza por una fase premaligna bien definida, que consta de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado, que facilitan el estudio de diferentes cofactores y marcadores inmunohistoquímicos posiblemente involucrados en su desarrollo (146–148). La transición de LSIL a HSIL es crucial, ya que aproximadamente el 20% de las LSIL progresa a HSIL (149)

Los Fc γ Rs como Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa están involucrados en el procesamiento de antígenos (ya sea antígenos extraños o autoantígenos) y los polimorfismos en sus genes se han relacionado con la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes e infecciosas (150–153). Estos receptores vinculan los sistemas inmunes humoral y celular a través de la internalización del complejo antígeno-anticuerpo. Algunas observaciones sugieren que la absorción de estos complejos a través del Fc γ R conduce a la maduración de células dendríticas y a la presentación cruzada de antígenos, lo que se traduce en una inmunidad frente al tumor (154,155). Ha sido demostrado que las SIL muestran alteraciones cuantitativas y funcionales en las CD (156–158). Por otro lado, se ha visto que las partículas similares al virus del VPH se unen al CMH humano de clase II positivo a través de la interacción con Fc γ RIIIa, y esto contribuye a la adquisición de inmunidad de células T (159).

Decidimos estudiar la asociación de los polimorfismos en los genes *FcGR2A* y *FcGR3A* en dos cohortes de mujeres, una con LSIL regresiva o estable y la otra con HSIL, con la hipótesis de que estos polimorfismos podrían promover diferentes

capacidades en las células dendríticas u otras células inmunitarias como las NK, para el reconocimiento de complejos anticuerpo-antígeno y el desarrollo de CCDA. Esta hipótesis podría explicar en cierta medida parte de las diferencias interindividuales observadas en la susceptibilidad genética al CCU. Debido a que aproximadamente el 80%-90% de las LSIL regresó espontáneamente en 2 años este es el período de seguimiento incluido en nuestra encuesta (149,160-162). Esta consideración no suele tenerse en cuenta en otros estudios, que comparan la distribución de genotipos entre LSIL y HSIL sin considerar que un porcentaje de LSIL progresará a HSIL (144,145). La inclusión de LSIL estable en el grupo I está basada en una posible reinfección. Un estudio de estos polimorfismos en controles sanos podría explicar su papel con respecto a la probabilidad de desarrollo de LSIL tras una infección por VPH. Nuestro trabajo se centró en la progresión de LSIL a HSIL, que es un paso más crítico para el desarrollo del cáncer de cuello uterino. La elección de estudiar los Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa y no otros Fc γ R se basó en la evidencia previa indirecta que sugiere que Fc γ RIIIa y no otros podría tener implicaciones en la progresión del cáncer cervical (163,164). El Fc γ RIIIa es en 95% homólogo al Fc γ RIIIa en su dominio extracelular y se une a ligandos similares (165). Sin embargo, se desconoce si estos polimorfismos también tienen un papel en la probabilidad de desarrollo de LSIL.

El H131R es el polimorfismo de *FcGR2A* más ampliamente estudiado por su relación con la susceptibilidad a la enfermedad y su contribución al riesgo de infección por VPH, aunque su contribución a la progresión de LSIL a HSIL aún está por determinar. Nuestro trabajo se realizó con una serie previamente descrita de pacientes con LSIL estable o en regresión y con HSIL. Se incluyó un grupo de control formado por mujeres sanas para el estudio de susceptibilidad a LSIL. La edad media para el grupo control fue mayor que en los casos. Por lo tanto, aunque estas diferencias en la edad fueron estadísticamente significativas, las posibilidades de que los controles desarrollaran la enfermedad fueron las mismas que las de los casos. En otro estudio previo en el que se analizó la presencia de VPH en muestras de cuello uterino de 458 mujeres de nuestra zona, se observó que los casos de LSIL tenían un 82,7% de positividad de VPH (166). Por lo tanto, esto apoyaría los argumentos acerca de que el VPH juega un papel importante en el desarrollo de LSIL. Sin embargo, no se puede suponer que nuestro trabajo estudie el efecto del polimorfismo en la susceptibilidad a la infección por VPH ya que las mujeres del

grupo control no fueron analizadas para VPH. Esto fue debido al gran número de controles necesarios y a los aspectos éticos de la toma de muestras citológicas.

En base a nuestros resultados se observa un porcentaje decreciente del genotipo HH entre los controles o el grupo I con respecto al grupo II (19,27%, 21,87% y 13,04%, respectivamente), siendo esta la mayor diferencia observada entre los datos a primera vista. Sin embargo, esto no se tradujo en la obtención de diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, el *FcGR2A* según nuestros datos no parece desempeñar un papel protector en el desarrollo de una HSIL como se ha demostrado para otras enfermedades infecciosas (142,167,168) o autoinmunes (150,168) en estudios previos de casos y controles. Cabe destacar que el alelo H en el *FcGR2A* y el alelo V en el *FcGR3A* codifican proteínas de alta afinidad, mientras que el alelo R en *FcGR2A* y F en *FcGR3A* codifican receptores de baja afinidad.

Cuando se analizó el polimorfismo V158F en el gen *FcGR3A*, no se observaron diferencias significativas entre los controles y los grupos de pacientes, lo que sugiere que V158F solo podría jugar un papel en la transición LSIL-HSIL y no en el desarrollo de LSIL.

El análisis genético se realizó utilizando células exfoliadas como material de partida como se realizó en otros estudios en los que los polimorfismos fueron detectados (144,145). No se encontraron diferencias sustanciales entre la distribución de genotipos en muestras citológicas normales con respecto a las muestras objeto de estudio ($p > 0,05$). La posibilidad de que los genotipos detectados pudieran estar influenciados por pérdidas somáticas alélicas en el epitelio cervical displásico parece bastante improbable. En primer lugar, las muestras citológicas utilizadas en este estudio comprendían células de todo el cuello uterino, incluyendo tanto células displásicas como células normales; y segundo, los experimentos de hibridación genómica comparativa han demostrado que tanto la totalidad como fragmentos del cromosoma 1, donde está presente el locus *FcGR3A*, no se han visto afectados por pérdidas en las SIL o el CCU (169). El gen *FcGR3A* no es susceptible de reordenamientos genéticos como los que ocurren en IgH y en los genes TCR durante la maduración de linfocitos de células B y T, respectivamente. Además, el Fc γ RIIIa no se expresa en tipos celulares afectados por reordenamientos cromosómicos. Por lo tanto, los genotipos detectados en este estudio sobre frotis

cervicales deberían reflejar aquellos de sus homólogos normales, incluyendo los de los sistemas inmunes humoral y celular (170).

La técnica de genotipado utilizada fue una PCR anidada y el análisis por RFLP debido a que, según la experiencia de nuestro grupo de investigación, las sondas prediseñadas TaqMan disponibles comercialmente no separan los grupos de genotipos correctamente.

Nuestros resultados indicaron que el genotipo FF se encuentra más a menudo en mujeres con HSIL que en aquellas con LSIL estable o regresiva (51.9% frente al 27.4%, respectivamente). La asociación entre portadoras de FF con el grupo HSIL fue estadísticamente significativa en comparación con los genotipos FV más VV combinados ($p=0,0033$) dando un $OR=2,856$ (IC 95%=1,4 -5,8). Cuando restringimos el análisis a mujeres positivas para VPH-AR se encontró una asociación aún más significativa ($p=0,0013$ y $OR 3,8$ [IC 95% 1,7-8,8]). Las razones de la considerable frecuencia encontrada de VPH-AR en el grupo I podrían ser que el genotipado de VPH fue realizado mediante amplificación por PCR y posterior hibridación, que puede aumentar la sensibilidad para la detección del VPH en comparación con otros procedimientos basados en PCR o hibridación por separado. Además, el seguimiento del VPH realizado en la misma paciente puede aumentar la posibilidad de encontrar un VPH-AR en al menos una de sus muestras.

Estos resultados sugieren que las portadoras FF son menos eficientes en la eliminación de la infección por VPH-AR, y por lo tanto esta infección persistente es capaz de inducir una HSIL en estas mujeres. En esta línea de razonamiento, una variación genética en el gen *FcGR3A* con implicaciones funcionales probadas, como el polimorfismo V158F (171,172), podría afectar a la cascada de efectos posteriores tras el reconocimiento del antígeno viral mediado por IgG, y de esta forma traducirse en una respuesta inmunitaria insuficiente (que implicaría o bien a las células NK o bien a las células dendríticas), a una infección persistente provocada por un fallo en el aclaramiento viral y, finalmente, al desarrollo de una HSIL.

Existen evidencias que sugieren que el VPH-AR induce una evasión inmune más eficiente que los genotipos de bajo riesgo (173,174). Es más, se ha demostrado que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 alteran la expresión de genes implicados en la resistencia del huésped a la infección (175). Por lo tanto, la combinación de

factores VPH-dependientes y de factores dependientes del huésped parecen favorecer la progresión a una HSIL. Varios estudios anteriores apoyan indirectamente esta teoría:

- A. La evidencia previa de relación entre estados inmunosupresores y aumento del riesgo de CCU (173,176).
- B. La asociación encontrada entre polimorfismos en genes relacionados con inmunidad y apoptosis y la susceptibilidad al CCU (144,145,177-179).
- C. El papel del Fc γ RIIIa en la inducción de ADCC y apoptosis y la asociación del polimorfismo V158F con enfermedades autoinmunes y susceptibilidad a infecciones virales (171,172,180). En la misma línea de nuestros resultados, Rekand y col. demostraron que el genotipo V/V 158 parece disminuir el riesgo de contraer poliomielitis aguda a través de una mejor eliminación de poliovirus (181).
- D. Los estudios funcionales de Wu y col., que han demostrado que el polimorfismo V158F altera la función del receptor. El genotipo V/V se unió más a IgG1 e IgG3 a pesar de los niveles idénticos de expresión del receptor. En respuesta al estímulo de IgG humana, la interacción de Fc γ RIIIa con células NK en homocigotos V/V (alta unión) condujo a un mayor nivel de la activación de las células NK, y a un desarrollo más rápido de la muerte celular inducida por apoptosis (182). No en vano, en nuestro estudio encontramos que el genotipo V/V está asociado con la regresión en mayor grado que con la progresión de la LSIL, lo que sugiere una inducción más eficiente de apoptosis de células infectadas por VPH en pacientes V/V que en F/F.
- E. Los experimentos realizados en ratones por Da Silva y col. demostraron que el Fc γ RIII expresado en células dendríticas juega un papel importante en la inducción de la inmunidad tanto de células T CD4⁺ como de células CD8⁺ contra partículas VPH similares a virus (163). Este hallazgo plantea la posibilidad de que el polimorfismo V158F podría estar asociado con la variación interindividual en el grado de protección contra el VPH tras la vacunación con partículas similares a virus tipo VPH16/VPH18,

especialmente en la protección cruzada con genotipos distintos de VPH16 y VPH18.

Dado que en nuestro trabajo anterior no se tuvo en cuenta ningún genotipo específico del VPH, decidimos estudiar la distribución del genotipo V158F y H131R en las mujeres del grupo I y del grupo II que solo estaban infectadas con el VPH16. A pesar de la pérdida del tamaño de la muestra debido a esta restricción, se observó una asociación significativa ($p = 0,0203$) para el genotipo FF y el grupo HSIL, como también se había observado para mujeres infectadas con VPH-AR. Es importante señalar que el VPH16 es el genotipo de VPH más oncogénico (183). Para el polimorfismo *FcGR2A* H131R, el 31,8 % del grupo I infectado por VPH16 eran portadores de HH, mientras que este porcentaje era del 13,3 % en el grupo II. Aunque sin alcanzar significación estadística, este hallazgo, y otros informados aquí, sugieren que los alelos de baja afinidad *FcGR2A/3A* podrían tener un mayor riesgo de desarrollar una HSIL, mientras que los alelos de alta afinidad ejercen un efecto protector. Sin embargo, serían necesarios estudios posteriores con un tamaño de muestra más grande y diferentes entornos de población. Los estudios futuros de asociación entre esta distribución de genotipos y otro cofactor involucrado en la carcinogénesis cervical podrían ser muy útiles para conocer el alcance de estos hallazgos.

En cuanto a los polimorfismos en genes que codifican para el receptor de *TRAIL*, existe evidencia, incluidos un par de metaanálisis, de que el polimorfismo A1322G (*rs2230229*) del *TRAILR1* está asociado con un riesgo de cáncer significativamente elevado para varios tipos de cáncer en diferentes modelos genéticos (184,185). Sin embargo, la afirmación no está exenta de cierta controversia, ya que un metaanálisis posterior informó que la asociación no existía de forma general, al considerar sólo aquellos estudios realizados con población caucásica (186). Entre los trabajos valorados en este metaanálisis hay que destacar, por las posibles similitudes con nuestra población estudiada, el de Martínez-Ferrandis et al. En el mismo no se encontraron diferencias en la distribución del polimorfismo A1322G, en la valoración del riesgo de cáncer de pecho de una serie de casos frente a controles de mujeres españolas (187). Nuestros datos se encontrarían en la línea de los obtenidos por este estudio, compartiendo incluso una distribución de genotipos similar y sugiriendo la ausencia de relación entre

este polimorfismo en el gen *TRAILR1* y el CCU en mujeres caucásicas. Un aspecto a resaltar es que entre los estudios que consideraban significativa la influencia del *rs2230229* se encontraba otro trabajo nacional vinculándolo a neoplasias hematológicas, como el linfoma de células del manto y la leucemia linfocítica crónica (188). Por el contrario, una publicación posterior de nuestro grupo de investigación descartó esta posibilidad al menos en distintos tipos de linfomas (189), aunque sí que se encontró asociación entre estas patologías y el polimorfismo *A716G (rs12488654)* en el ligando TRAIL.

El SNP *rs1248854* es un polimorfismo poco estudiado y que únicamente ha sido asociado con algún tipo de enfermedad maligna en el último estudio mencionado. Aunque se ha encontrado su relación con respecto a la susceptibilidad a padecer estas patologías hematológicas, no se ha encontrado, sin embargo, influencia en la respuesta a la terapia con rituximab en las mismas (190). Nuestros datos tampoco han aportado significación estadística para este polimorfismo en cuanto a susceptibilidad o riesgo de progresión del CCU.

A pesar de que los receptores de TRAIL y sus ligandos parecen estar involucrados en el desarrollo de la apoptosis tumoral de forma más eficiente, que cuando el proceso tiene como objetivo la muerte de células propias (191,192), los mecanismos de evasión tumorales podrían inactivar esta acción de forma que no se encontrase relación clínica en los estudios de casos y controles. Esta propiedad para eludir al sistema inmune, podría estar relacionada con el microambiente tumoral, de forma que podría ser dependiente del tipo de lesión, justificando de esta manera una mayor influencia de los polimorfismos de *TRAIL* en las neoplasias hematológicas. De ahí que nuestros resultados no sean significativos teniendo en cuenta que también están limitados a población caucásica. Además, no hemos encontrado bibliografía en el caso concreto del ligando TRAIL y su relación con el CCU, que permita contrastar los resultados.

Por otro lado, en cuanto a los polimorfismos en genes del sistema FAS/FASL, también relacionado con la apoptosis, no se ha encontrado una relación del polimorfismo *rs1800682* en el gen *FAS*, con el riesgo de cáncer cervical, según un metaanálisis que involucraba a 10 estudios. A pesar de la heterogeneidad de los mismos, se concluyó la desvinculación con el CCU, independientemente del modelo considerado o de la etnia estudiada (193). En otro tipo de cánceres y según

un extenso metaanálisis en población asiática, sólo se habría encontrado una relación clara con el carcinoma hepatocelular (194). En nuestro trabajo tampoco encontramos predisposición al CCU, lo que estaría en consonancia con la mayoría de la bibliografía, pero sí nos encontramos una ligera tendencia protectora por parte del genotipo homocigoto AA. Curiosamente, Zhang y colaboradores describieron un efecto similar, aunque significativo, del mismo genotipo en el carcinoma de orofaringe de células escamosas. Un tipo de cáncer que, como en el caso del CCU, está asociado en gran parte a la infección por VPH. De hecho, la relación era mayor cuando se consideraban aquellos pacientes infectados por el VPH 16. Estos autores encontraron el efecto protector en la susceptibilidad a recurrencias tras radioterapia, y proponían el uso del polimorfismo *FAS* A670G como posible biomarcador de las mismas (195).

Un nivel de asociación mayor es el que observamos para el genotipo CC en el SNP *rs763110* del promotor de *FASL* con respecto a la progresión a HSIL. Además, cuando el análisis se restringió a pacientes infectadas con VPH-AR esta relación fue más evidente, lo que sugiere un papel de este polimorfismo en el proceso de carcinogénesis cervical. No hay estudios previos sobre este polimorfismo en este paso particular de la misma y, de hecho, los únicos estudios publicados que analizan la distribución de genotipos del SNP *rs763110*, la comparan entre pacientes con carcinoma de cuello uterino ya establecido versus mujeres sanas (196,197). Una vez hecha esta salvedad hay que comentar que, recientemente se ha demostrado que el alelo T del SNP *rs763110* está asociado con el riesgo de cáncer de cuello uterino invasivo en población femenina china (196). Este artículo asocia el genotipo TT con una deficiencia en la afinidad de unión del complejo C/EBP β /OCT1 con la cromatina. En otras palabras, los portadores de este genotipo parecen ser menos eficientes en desencadenar el proceso de apoptosis, entendiéndose que el mismo induciría la muerte programada de las células tumorales. De hecho, Wu et al. ya habían confirmado que el polimorfismo en -844 es un elemento que se une específicamente a C/EBP y demostraron que los dos alelos de este elemento tienen diferentes afinidades por C/EBP. El genotipo 844C tenía dos veces la actividad basal del constructo 844T y la expresión basal del ligando de Fas en fibrocitos de sangre periférica también fue significativamente mayor en los donantes 844C que en los homocigotos 844T (198). En cambio, existe un mayor número de evidencias científicas, incluidos dos metaanálisis, que

relacionan el genotipo CC en *rs763110 FASL* con un mayor riesgo no sólo de cáncer de cuello uterino, sino también de una variedad de tipos de cáncer (197,199,200).

Basándonos en el concepto de inmunoprivilegio (201), postulamos que el papel de la inducción de la vía extrínseca de la apoptosis puede ser diferente dependiendo del paso considerado a lo largo del proceso cancerígeno cervical (202–205). De esta manera, mientras que un microambiente local de inmunotolerancia podría favorecer el desarrollo del cáncer cervical invasivo, en etapas tempranas, las células tumorales de diferentes orígenes podrían regular al alza FasL, induciendo la apoptosis de los linfocitos infiltrantes de tumor (LITs), favoreciendo la progresión de LSIL a HSIL (206–208). En este contexto aquellos portadores del alelo *rs763110 C*, que parece desencadenar apoptosis más eficientemente que el alelo T, podrían estar en un mayor riesgo de desarrollar HSIL a partir de una LSIL preexistente. En un trabajo anterior observamos que, de hecho, el alelo T estaba asociado con peor respuesta a la terapia con anticuerpos monoclonales contra linfocitos B CD20 positivos (209). Recientemente, otros autores han encontrado que los SNPs en *FAS/FASL* podrían servir como biomarcadores potenciales para predecir la respuesta a la quimioterapia adyuvante basada en platino en pacientes con cáncer gástrico (210).

Aunque nuestro estudio tiene una limitación de tamaño muestral creemos que tiene la ventaja de considerar que aproximadamente el 80-90% de las LSIL regresaron espontáneamente en dos años (211–213). Del mismo modo que cuando se analizó la evidencia sobre los polimorfismos en genes relacionados con la CCDA, esta consideración no se tuvo en cuenta en estudios del sistema *FAS/FASL*, que obviaron que un porcentaje de LSIL progresará a HSIL (214,215). También vale la pena mencionar que nuestro estudio se centró en los potenciales factores implicados en la progresión de LSIL a HSIL en lugar de la susceptibilidad a la infección por VPH (216). Ya que las pacientes inmunocomprometidas fueron excluidas de este estudio y, por lo tanto, sólo se tuvo en cuenta el genotipo del VPH junto con los genotipos *FAS/FASL*.

VII – CONCLUSIONES

VII - CONCLUSIONES

Los polimorfismos *FcGR2A* H131R y *FcGR3A* V158F no parecen desempeñar un papel en el desarrollo de LSIL.

El cambio H131R podría estar involucrado en la probabilidad de progresión de LSIL a HSIL, en mujeres infectadas con VPH16.

El polimorfismo V158F se asocia con un mayor riesgo de progresión en lesiones precancerosas del cuello uterino siendo esta asociación más relevante cuando se consideran solo aquellas pacientes infectadas con VPH-AR.

No se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre los polimorfismos estudiados en genes del receptor de *TRAIL*, su ligando ni en *FAS* con la aparición de LSIL o HSIL.

Los resultados demuestran, por primera vez, la asociación entre un polimorfismo en el gen *FASL* con la progresión de LSIL a HSIL siendo esta asociación más relevante cuando sólo se consideran mujeres infectadas con HPV-AR.

Este estudio destaca el interés de genotipar polimorfismos relacionados con el sistema inmune y el proceso apoptótico en la evaluación de riesgo en mujeres con LSIL infectadas con VPH-AR.

VIII- BIBLIOGRAFÍA

VIII – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb 1; 8(2): e180–90.
2. 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.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar 1; 55(2):74–108.
4. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015 Mar 14; 385(9972):977–1010.
5. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med*. 2018 Oct 1; 7(10):5217–36.
6. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug 21; 24 Suppl 3(SUPPL. 3).
7. Franco ELF. Epidemiology of anogenital warts and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1996; 23(3):597–623.
8. Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 1995; 76(10 Suppl):1888-1901.
9. Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res*. 1997; 71:339–41.
10. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 2000; 19(1–2):1–5.

11. Ryan DP, Compton CC, Mayer RJ. Carcinoma of the anal canal. *N Engl J Med*. 2000 Mar 16; 342(11): 792–800.
12. Nobbenhuis MAE, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EKJ, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet*. 1999 Jul 3; 354(9172): 20–5.
13. Ho GYF, 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.
14. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999; 180(5): 1415–23.
15. Ellerbrock T v., Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, Brudney K, et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA*. 2000 Feb 23; 283(8): 1031–7.
16. Franco EL, Schlecht NF, Saslow D. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J*. 2003; 9(5): 348–59.
17. Mateos Lindemann ML, Sánchez Calvo JM, Chacón de Antonio J, Sanz I, Diaz E, Rubio MD, et al. Prevalence and Distribution of High-Risk Genotypes of HPV in Women with Severe Cervical Lesions in Madrid, Spain: Importance of Detecting Genotype 16 and Other High-Risk Genotypes. *Adv Prev Med*. 2011; 2011: 1–4.
18. Safaeian M, Schiffman M, Gage J, Solomon D, Wheeler CM, Castle PE. Detection of precancerous cervical lesions is differential by human papillomavirus type. *Cancer Res*. 2009 Apr 15; 69(8): 3262–6.
19. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197(4): 346-355 -
20. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus

- acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *Journal of Infectious Diseases*. 2005 Jun 1; 191(11): 1808–16.
21. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJLM, Snijders P, Bosch FX, et al. Smoking and cervical cancer: Pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes and Control*. 2003 Nov; 14(9): 805–14.
 22. Grellier N, Quéro L. [Cervical cancer: particularities in HIV patients]. *Bull Cancer*. 2014 Nov 1; 101(11): 1040–7.
 23. Yang X, Siddique A, Khan AA, Wang Q, Malik A, Jan AT, et al. Chlamydia Trachomatis Infection: Their potential implication in the Etiology of Cervical Cancer. *J Cancer*. 2021; 12(16): 4891–900.
 24. Cao S, Gan Y, Dong X, Lu Z. Herpes simplex virus type 2 and the risk of cervical cancer: a meta-analysis of observational studies. *Arch Gynecol Obstet*. 2014 Dec 1; 290(6): 1059–66.
 25. Vranic S, Cyprian FS, Akhtar S, al Moustafa AE. The Role of Epstein-Barr Virus in Cervical Cancer: A Brief Update. *Front Oncol*. 2018 Apr 17; 8(APR).
 26. Appleby P, Beral V et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet*. 2007 Nov 10; 370(9599):1 609–21.
 27. Norenhag J, Du J, Olovsson M, Verstraelen H, Engstrand L, Brusselaers N. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. *BJOG*. 2020 Jan 1; 127(2): 171–80.
 28. Laronda MM, Unno K, Butler LM, Kurita T. The development of cervical and vaginal adenosis as a result of diethylstilbestrol exposure in utero. *Differentiation*. 2012 Oct; 84(3): 252–60.
 29. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K v., de Sanjosé S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med*. 2002 Apr 11; 346(15): 1105–12.
 30. Conesa-Zamora P, Ortiz-Reina S, Moya-Biosca J, Doménech-Peris A, Orantes-Casado F, Pérez-Guillermo M, et al. Genotype distribution of

- human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain. *BMC Infect Dis.* 2009 Aug 10;9.
31. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(5): 342–50.
 32. Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol.* 1987 Apr; 61(4): 962–71.
 33. Conesa-Zamora P. Role of Cell Cycle Biomarkers in Human Papillomavirus Related Uterine Lesions. *Curr Pharm Des.* 2013 Jan 28; 19(8): 1412–24.
 34. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006 May; 110(5): 525–41.
 35. Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, Ronnett B, Pizer E, Elko A, et al. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 1; 11(13): 4717–23.
 36. Liao S, Deng D, Hu X, Wang W, Li L, Li W, et al. HPV16/18 E5, a promising candidate for cervical cancer vaccines, affects SCPs, cell proliferation and cell cycle, and forms a potential network with E6 and E7. *Int J Mol Med.* 2013 Jan; 31(1): 120–8.
 37. Conesa-Zamora P. Role of Cell Cycle Biomarkers in Human Papillomavirus Related Uterine Lesions. *Curr Pharm Des.* 2013 Jan 28; 19(8): 1412–24.
 38. Peto J, Gilham C, Deacon J, Taylor C, Evans C, Binns W, et al. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. *Br J Cancer.* 2004 Aug 31; 91(5): 942–53.
 39. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999 Dec 1; 59(24):6132–6.
 40. AEPCC-Guía: Prevención secundaria del cáncer de cuello del útero, 2022. Conducta clínica ante resultados anormales de las pruebas de cribado. Coordinador: Torné A. Secretaria: del Pino M.

41. Tindle RW. Immunomanipulative strategies for the control of human papillomavirus associated cervical disease. *Immunol Res.* 1997; 16(4): 387–400.
42. Zhou J, Liu WJ, Peng SW, Sun XY, Frazer I. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J Virol.* 1999 Jun; 73(6): 4972–82.
43. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001 Apr; 2(4): 361–7.
44. Natale C, Giannini T, Lucchese A, Kanduc D. Computer-assisted analysis of molecular mimicry between human papillomavirus 16 E7 oncoprotein and human protein sequences. *Immunol Cell Biol.* 2000; 78(6): 580–5
45. Ronco L v., Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 1998 Jul 1; 12(13): 2061–72.
46. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 2001 May; 75(9): 4283–96.
47. Rincon-Orozco B, Halec G, Rosenberger S, Muschik D, Nindl I, Bachmann A, et al. Epigenetic silencing of interferon-kappa in human papillomavirus type 16-positive cells. *Cancer Res.* 2009 Nov 15; 69(22): 8718–25.
48. Barnard P, Payne E, McMillan NAJ. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology.* 2000 Nov 25; 277(2): 411–9.
49. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2000 Mar 10; 275(10): 6764–9.
50. 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 Mar 1; 178(5): 3186–97.

51. Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, et al. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *J Immunol.* 2001 Jul 1; 167(1): 497–504.
52. Kanodia S, Fahey L, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007 Feb 25; 7(1): 79–89.
53. Coleman N, Birley HDL, Renton AM, Hanna NF, Ryaik BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol.* 1994; 102(6): 768–74.
54. Kadish AS, Ho GYF, Burk RD, Wang Y, Romney SL, Ledwidge R, et al. Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Sep 3; 89(17): 1285–93.
55. Steele JC, Mann CH, Rookes S, Rollason T, Murphy D, Freeth MG, et al. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. *Br J Cancer.* 2005 Jul 25; 93(2): 248–59.
56. Hernández-Montes J, Rocha-Zavaleta L, Monroy-García A, Weiss-Steider B, Zaragoza-Ortega MDC, Cruz-Talonia F, et al. Peripheral blood lymphocytes from low-grade squamous intraepithelial lesions patients recognize vaccine antigens in the presence of activated dendritic cells, and produced high levels of CD8 + IFN γ + T cells and low levels of IL-2 when induced to proliferate. *Infect Agent Cancer.* 2012; 7(1).
57. Poppe WAJ, Drijkoningen M, Ide PS, Lauweryns JM, van Assche FA. Lymphocytes and dendritic cells in the normal uterine cervix. An immunohistochemical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998 Dec 1; 81(2): 277–82.
58. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* 2006 Mar 30; 24 Suppl 1(SUPPL. 1): S16.
59. Campo MS, Graham S v., Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology.* 2010 Nov; 407(1): 137–42.

60. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*. 2005 Jan 10; 113(2):276–83.
61. de Andrea M, Mondini M, Azzimonti B, Dell'Oste V, Germano S, Gaudino G, et al. Alpha- and betapapillomavirus E6/E7 genes differentially modulate pro-inflammatory gene expression. *Virus Res*. 2007 Mar; 124(1–2): 220–5.
62. Hawthorn RJS, Murdoch JB, McLean AB, MacKie RM. Langerhans' cells and subtypes of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia. *BMJ*. 1988; 297(6649): 643–6.
63. Jimenez-Flores R, Mendez-Cruz R, Ojeda-Ortiz J, Muñoz-Molina R, Balderas-Carrillo O, de La Luz Diaz-Soberanes M, et al. High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. *Immunology*. 2006 Feb; 117(2): 220–8.
64. Heller C, Weisser T, Mueller-Schickert A, Rufer E, Hoh A, Leonhardt RM, et al. Identification of key amino acid residues that determine the ability of high risk HPV16-E7 to dysregulate major histocompatibility complex class I expression. *J Biol Chem*. 2011 Apr 1; 286(13): 10983–97.
65. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999; 180(5): 1415–23.
66. Cornet I, Gheit T, Iannacone MR, Vignat J, Sylla BS, del Mistro A, et al. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer*. 2013 Jan 15; 108(1): 240–4.
67. Gheit T, Cornet I, Clifford GM, Iftner T, Munk C, Tommasino M, et al. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 Jul; 20(7):1315–21.
68. Ellis JRM, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf D v., Rowe M, et al. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med*. 1995; 1(5): 464–70.

69. Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, Duggan-Keen MF, Walboomers JMM, Stukart MJ, et al. HPV16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV16 e6 sequence variants. *J Cancer*. 1998; 78: 166–71.
70. Nicol AF, Fernandes ATG, Bonecini-Almeida MDG. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection -- review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(1): 1–12.
71. Warrino DE, Olson WC, Knapp WT, Scarrow MI, D'Ambrosio-Brennan LJ, Guido RS, et al. Disease-stage variance in functional CD4(+) T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus-16 E7 epitopes. *Clin Cancer Res*. 2004 May 15; 10(10): 3301–8.
72. Welters MJP, de Jong A, van den Eeden SJF, van der Hulst JM, Kwappenberg KMC, Hassane S, et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res*. 2003 Feb 1; 63(3): 636–41.
73. de Jong A, van Poelgeest MIE, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJM, et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*. 2004 Aug 1; 64(15): 5449–55.
74. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Bijl A, Verheijen RHM, Meijer CJLM, Scheper RJ, et al. Human papillomavirus type 16 E2-specific T-helper lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol*. 1999; 80 (Pt 9)(9): 2453–9.
75. Woo YL, van den Hende M, Sterling JC, Coleman N, Crawford RAF, Kwappenberg KMC, et al. A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. *Int J Cancer*. 2010 Jan 1; 126(1): 133–41.
76. Coleman N, Birley HDL, Renton AM, Hanna NF, Ryaik BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol*. 1994; 102(6): 768–74.

77. Piersma SJ, Welters MJP, van der Hulst JM, Kloth JN, Kwappenberg KMC, Trimbos BJ, et al. Human papilloma virus specific T cells infiltrating cervical cancer and draining lymph nodes show remarkably frequent use of HLA-DQ and -DP as a restriction element. *Int J Cancer*. 2008 Feb 1; 122(3): 486–94.
78. Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, Guerrini JS, Căpîlna M, Félix S, et al. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2006; 102(1): 22–31.
79. Luxton JC, Nath R, Derias N, Herbert A, Shepherd PS. Human papillomavirus type 16-specific T cell responses and their association with recurrence of cervical disease following treatment. *J Gen Virol*. 2003 May 1; 84(Pt 5):1 063–70.
80. de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JMM, Stukart MJ, Doekhie FS, Remmink AJ, et al. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res*. 1998 Apr 1; 58(8): 1700–6.
81. Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci J, Contois D, Lawler P, et al. Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res*. 1996 Sep 1; 56(17): 3967–74.
82. Bontkes HJ, de Gruijl TD, van den Muysenberg AJC, Verheijen RHM, Stukart MJ, Meijer CJLM, et al. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer*. 2000; 88: 92–8.
83. Nimako M, Fiander AN, Wilkinson GWG, Borysiewicz LK, Man S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res*. 1997 Nov 1; 57(21): 4855–61.
84. Nakagawa M, Stites DP, Farhat S, Sisler JR, Moss B, Kong F, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *J Infect Dis*. 1997; 175(4): 927–31.

85. Piersma SJ, Welters MJP, van der Burg SH. Tumor-specific regulatory T cells in cancer patients. *Hum Immunol.* 2008 Apr; 69(4-5): 241-9.
86. Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, Prins F, Durrant LG, Kenter GG, et al. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin Cancer Res.* 2008 Apr 1; 14(7): 2028-35.
87. de Vos Van Steenwijk PJ, Piersma SJ, Welters MJP, van der Hulst JM, Fleuren G, Hellebrekers BWJ, 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 Nov 15; 14(22): 7188-95.
88. Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, Dotor J, Lopez-Diaz de Cerio A, Melero I, et al. CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol.* 2003 Dec 1; 171(11): 5931-9.
89. Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurung E, et al. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol.* 2007 Nov; 150(2): 199-209.
90. Alcocer-González JM, Berumen J, Taméz-Guerra R, Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, et al. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol.* 2006; 19(3): 481-91.
91. Tirone NR, Peghini BC, Barcelos ACM, Murta EFC, Michelin MA. Local expression of interferon-alpha and interferon receptors in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Dec; 58(12): 2003-10.
92. Winkelstein W. Smoking and cervical cancer--current status: a review. *Am J Epidemiol.* 1990; 131(6): 945-57.
93. Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, Harris R, Baldwin S, Papenfuss MR, et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control.* 2002 Nov; 13(9): 839-46.

94. Nadais R da F, Campaner AB, Piato S, Longo Galvão MA, dos Santos RE, Aoki T. Langerhans' cells and smoking in intraepithelial neoplasia of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2006 Aug; 102(2): 356–60.
95. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K v., Walboomers JMM, 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 Mar 30; 359(9312): 1085–92.
96. Marks MA, Gravitt PE, Burk RD, Studentsov Y, Farzadegan H, Klein SL. Progesterone and 17beta-estradiol enhance regulatory responses to human papillomavirus type 16 virus-like particles in peripheral blood mononuclear cells from healthy women. *Clin Vaccine Immuno*. 2010 Apr; 17(4): 609–17.
97. Maciag PC, Villa LL. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32(7): 915–22.
98. Maciag PC, Schlecht NF, Souza PSA, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Nov 1; 9(11): 1183–91.
99. Krul EJT, Schipper RF, Schreuder GMT, Fleuren GJ, Kenter GGX, Melief CJM. HLA and susceptibility to cervical neoplasia. *Hum Immunol*. 1999 Apr; 60(4): 337–42.
100. Madeleine MM, Brumback B, Cushing-Haugen KL, Schwartz SM, Daling JR, Smith AG, et al. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: a population-based study. *J Infect Dis*. 2002 Dec 1; 186(11): 1565–74.
101. Koopman LA, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Human leukocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Oct 6; 91(19): 1669–77.
102. Einstein MH, Leanza S, Chiu LG, Schlecht NF, Goldberg GL, Steinberg BM, et al. Genetic variants in TAP are associated with high-grade cervical neoplasia. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb 1; 15(3): 1019–23.
103. Ivansson EL, Gustavsson IM, Magnusson JJ, Steiner LL, Magnusson PKE, Erlich HA, et al. Variants of chemokine receptor 2 and interleukin 4 receptor,

- but not interleukin 10 or Fas ligand, increase risk of cervical cancer. *Int J Cancer*. 2007 Dec 1; 121(11): 2451–7.
104. 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 Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2007 Aug 1; 16(8): 1626–32.
 105. Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL, et al. TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis*. 2005 Mar 15; 191(6): 969–76.
 106. Lai HC, Chang CC, Lin YW, Chen SF, Yu MH, Nieh S, et al. Genetic polymorphism of the interferon- γ gene in cervical carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2005 Feb 20; 113(5): 712–8.
 107. Pandey S, Mittal RD, Srivastava M, Srivastava K, Singh S, Srivastava S, et al. Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (-196 to -174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. *Gynecol Oncol*. 2009 Sep; 114(3): 501–5.
 108. Pandey S, Mittal B, Srivastava M, Singh S, Srivastava K, Lal P, et al. Evaluation of Toll-like receptors 3 (c.1377C/T) and 9 (G2848A) gene polymorphisms in cervical cancer susceptibility. *Mol Biol Rep*. 2011 Oct; 38(7):4715–21.
 109. Long EO, Rajagopalan S. HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors. *Semin Immunol*. 2000; 12(2): 101–8.
 110. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004 Aug 6; 305(5685): 872–4.
 111. Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*. 2005 Apr 4; 201(7): 1069–75.
 112. Vilchez JR, Torres-Moreno D, Martínez-Senac MM, Trujillo-Santos J, Conesa-Zamora P. Evaluation of the association of NKG2C copy number

- variations with susceptibility to human papillomavirus-induced cervical lesions. *Hum Immunol*. 2013 Oct;74(10): 1352–6.
113. Jumnainsong A, Jearanaikoon P, Khahmahpahte S, Wongsena W, Romphruk A v., 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 Aug; 153(2): 205–13.
 114. Roszak A, Lianeri M, Jagodziński PP. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with cervical carcinoma. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012 Aug 1; 16(8): 841–5.
 115. Su TH, Chang TY, Lee YJ, Chen CK, Liu HF, Chu CC, et al. CTLA-4 gene and susceptibility to human papillomavirus-16-associated cervical squamous cell carcinoma in Taiwanese women. *Carcinogenesis*. 2007 Jun; 28(6): 1237–40.
 116. Chen D, McKay JD, Clifford G, Gaborieau V, Chabrier A, Waterboer T, et al. Genome-wide association study of HPV seropositivity. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec; 20(23): 4714–23.
 117. Fridman WH, Bonnerot C, Daeron M, Amigorena S, Teillaud J -L, Sautes C. Structural bases of Fc gamma receptor functions. *Immunol Rev.*; 125(1): 49–76.
 118. Salmon JE, Pricop L. Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Rheum*. 2001 Apr 1; 44(4): 739–50.
 119. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*. 2008 Feb; 15(2): 251–62.
 120. Mellor JD, Brown MP, Irving HR, Zalcborg JR, Dobrovic A. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J Hematol Oncol*. 2013; 6(1):1.
 121. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4): 239–57.

122. Hengartner MO, Robert Horvitz H. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev*. 1994; 4(4): 581–6.
123. Rufini A, Melino G. Cell death pathology: the war against cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Oct 28; 414(3): 445–50.
124. Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*. 2014; 42 Suppl 3: S125–52.
125. Pundt N, Peters MA, Wunrau C, Strietholt S, Fehrmann C, Neugebauer K, et al. Susceptibility of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to FasL- and TRAIL-induced apoptosis is cell cycle-dependent. *Arthritis Res Ther*. 2009 Feb 5; 11(1).
126. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun 25; 43(6): 582–92.
127. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995; 267(5203): 1449–56.
128. Vermijlen D, Froelich CJ, Luo D, Suarez-Huerta N, Robaye B, Wisse E. Perforin and granzyme B induce apoptosis in FasL-resistant colon carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2001; 50(4): 212–7.
129. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995; 270(5239): 1189–92.
130. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol*. 2004 Jun 1; 26(2): 82–97.
131. Russo M, Mupo A, Spagnuolo C, Russo GL. Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2010 Sep; 80(5): 674–82.
132. Greil R, Egle A, Villunger A. On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model. *Leuk Lymphoma*. 1998 Jan 1; 31(5–6): 477–90.

133. Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Jun 1; 14(3-4): 337-48.
134. Martínez-Lorenzo MJ, Alava MA, Gamen S, Jin Kim K, Chuntharapai A, Piñeiro A, et al. Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur J Immunol.* 1998; 28(9): 2714-25.
135. Sedger LM, Shows DM, et al. IFN- γ Mediates a Novel Antiviral Activity Through Dynamic Modulation of TRAIL and TRAIL Receptor Expression. *J Immunol.* 1999 Jul 15; 163(2): 920-6.
136. Wiley SR, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, Sedger LM, Shows DM, et al. TRAIL Receptor Expression and Through Dynamic Modulation of TRAIL Mediates a Novel Antiviral Activity γ IFN. 2022
137. MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. Identification and Molecular Cloning of Two Novel Receptors for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry.* 1997 Oct 10; 272(41): 25417-20.
138. Tan SC, Ankathil R. Genetic susceptibility to cervical cancer: role of common polymorphisms in apoptosis-related genes. *Tumour Biol.* 2015 Aug 1; 36(9): 6633-44.
139. Solomon D, Davey D, Kurman R, Stoler MH, Wright TC, Moriarty A, et al. Results of Cervical Cytology The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Cervical Cytology Findings New Bethesda Terminology and Evidence-Based Management Guidelines for Cytological Abnormalities 2001 Consensus Guidelines for the Management of Women With Cervical Reprints/E-prints The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA.* 2002; 287(16): 2140.
140. Dong HK, Hee DJ, Jong GK, Lee JJ, Yang DH, Yeon HP, et al. FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2006 Oct 15; 108(8): 2720-5.
141. Conesa-Zamora P, Santaclara V, Gadea-Niñoles E, Ortiz-Reina S, Perez-Guillermo M. Association of polymorphism in FcGR3A gene and

- progression of low-grade precursor lesions of cervical carcinoma. *Hum Immunol*. 2010 Mar 1; 71(3): 314–7.
142. Endeman H, Cornips MCA, Grutters JC, van den Bosch JM, Ruven HJT, van Velzen-Blad H, et al. The Fc γ receptor IIA-R/R131 genotype is associated with severe sepsis in community-acquired pneumonia. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009 Jul; 16(7): 1087–90.
 143. Thabet MM, Huizinga TWJ, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen G, Bakker AM, Kurreeman FA, et al. Contribution of Fc γ receptor IIIA gene 158V/F polymorphism and copy number variation to the risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009 Nov; 68(11): 1775–80.
 144. Lai HC, Sytwu HK, Sun CA, Yu MH, Yu CP, Liu HS, et al. Single nucleotide polymorphism at Fas promoter is associated with cervical carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2003 Jan 10; 103(2): 221–5.
 145. Ueda M, Hung Y, Terai Y, Yamaguchi H, et al. Fas gene promoter- 670 polymorphism (A/G) is associated with cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2005 Jul; 98(1): 129-33
 146. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(5): 342–50.
 147. Conesa-Zamora P, Domenech-Peris A, et al. Immunohistochemical evaluation of ProEx C in human papillomavirus-induced lesions of the cervix. *J Clin Pathol*. 2009 Feb; 62(2): 159-62.
 148. Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Ortiz-Reina S, Sahuquillo-Frías L, Acosta-Ortega J, et al. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma: a tissue microarray study. *Am J Clin Pathol* 2009 Sep; 132(3): 378-90.
 149. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006 May; 110(5): 525–41.
 150. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JPA. The role of Fc γ RIIA and IIIA polymorphisms in autoimmune diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2004 Jun 1; 58(5): 286–91.

151. van der Pol WL, van de Winkel JGJ. IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics*. 1998; 48(3): 222–32.
152. Emonts M, Hazelzet JA, de Groot R, Hermans PWM. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis*. 2003 Sep 1; 3(9): 565–77.
153. Rekand T, Langeland N, Aarli JA, Vedeler CA. Fcγ3 receptor polymorphism as a risk factor for acute poliomyelitis. *J Infect Dis*. 2002 Nov 19; 186(12):1840–3.
154. Schuurhuis DH, van Montfoort N, Ioan-Facsinay A, Jiawan R, Camps M, Nouta J, et al. Immune Complex-Loaded Dendritic Cells Are Superior to Soluble Immune Complexes as Antitumor Vaccine. *The Journal of Immunology*. 2006 Apr 15; 176(8): 4573–80.
155. Rafiq K, Bergtold A, Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest*. 2002 Jul 1; 110(1): 71–9.
156. Guess JC, McCance DJ. Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3α production. *J Virol*. 2005 Dec 15; 79(23): 14852–62.
157. Jimenez-Flores R, Mendez-Cruz R, Ojeda-Ortiz J, Muñoz-Molina R, Balderas-Carrillo O, de La Luz Diaz-Soberanes M, et al. High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. *Immunology*. 2006 Feb; 117(2):220–8.
158. Caberg JH, Hubert P, Herman L, Herfs M, Roncarati P, Boniver J, et al. Increased migration of Langerhans cells in response to HPV16 E6 and E7 oncogene silencing: role of CCL20. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Jan; 58(1): 39–47.
159. da Silva DM, Fausch SC, Verbeek JS, Kast WM. Uptake of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells is mediated by Fcγ3 receptors and contributes to acquisition of T cell immunity. *J Immunol*. 2007 Jun 15; 178(12): 7587–97.

160. Ho GYF, 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.
161. Castellsagué X et al.;WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer. HPV and cervical cancer in the 2007 report. *Vaccine*. 2007; 25 Suppl 3.
162. Peto PJ, Gilham PC, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*. 2004 Jul 17; 364(9430): 249–56.
163. da Silva DM, Fausch SC, Verbeek JS, Kast WM. Uptake of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and contributes to acquisition of T cell immunity. *J Immunol*. 2007 Jun 15; 178(12): 7587–97.
164. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, et al. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1; 100(5): 1059–70.
165. Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 1991; 9: 457–92.
166. Conesa-Zamora P, Ortiz-Reina S, Moya-Biosca J, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Pérez-Guillermo M, et al. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain. *BMC Infect Dis*. 2009 Aug 10; 9:124.
167. Schuldt K, Esser C, Evans J, May J, Timmann C, Ehmen C, et al. FCGR2A functional genetic variant associated with susceptibility to severe malarial anaemia in Ghanaian children. *J Med Genet*. 2010; 47(7): 471–5.
168. Aksu K, Kitapcioglu G, Keser G, Berdeli A, Karabulut G, Kobak S, et al. FcγRIIa, IIIa and IIIb gene polymorphisms in Behçet's disease: do they have any clinical implications? *Clin Exp Rheumatol*. 2008 Jul 1; 26(4 Suppl 50): S77-83.
169. Wilting SM, Steenbergen RDM, Tijssen M, van Wieringen WN, Helmerhorst TJM, van Kemenade FJ, et al. Chromosomal signatures of a subset of high-

- grade premalignant cervical lesions closely resemble invasive carcinomas. *Cancer Res.* 2009 Jan 15; 69(2): 647–55.
170. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003 Dec; 17(12): 2257–317.
171. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JPA. The role of FcγRIIA and IIIA polymorphisms in autoimmune diseases. *Biomed Pharmacother.* 2004;58(5): 286–91.
172. Emonts M, Hazelzet JA, de Groot R, Hermans PWM. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis.* 2003 Sep 1; 3(9): 565–77.
173. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(1): 59–65.
174. Georgopoulos NT, Proffitt JL, Blair GE. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene.* 2000 Oct 5; 19(42): 4930–5.
175. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-κB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 2001 May; 75(9): 4283–96.
176. Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; (31): 35–40.
177. Zehbe I, Mytilineos J, Wikström I, Henriksen R, Edler L, Tommasino M. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. *Hum Immunol.* 2003 May 1; 64(5): 538–42.
178. Wang SS, Wheeler CM, Hildesheim A, Schiffman M, Herrero R, Bratti MC, et al. Human leukocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical

- neoplasia: results from a population-based study in Costa Rica. *J Infect Dis*. 2001; 184(10): 1310–4.
179. Ueda M, Toji E, Nunobiki O, Izuma S, Okamoto Y, Torii K, et al. Germline polymorphism of cancer susceptibility genes in gynecologic cancer. *Hum Cell*. 2008 Nov; 21(4): 95–104.
180. van der Pol WL, van de Winkel JGJ. IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics*. 1998; 48(3): 222–32.
181. Rekand T, Langeland N, Aarli JA, Vedeler CA. Fcγ receptor IIIA polymorphism as a risk factor for acute poliomyelitis. *J Infect Dis*. 2002 Dec 15; 186(12): 1840–3.
182. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, et al. A novel polymorphism of Fcγ receptor IIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1; 100(5): 1059–70.
183. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K v., et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003 Feb 6; 348(6): 518–27.
184. Chen B, Liu S, Wang XL, Xu W, Li Y, Zhao WH, et al. TRAIL-R1 polymorphisms and cancer susceptibility: an evidence-based meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009 Sep; 45(14): 2598–605.
185. Lu J, Qin Q, Zhan LL, Liu J, Zhu HC, Zhang C, et al. Association of four polymorphisms in the death receptor 4 gene with cancer risk: an updated meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014; 35(6): 5149–58.
186. Chen W, Tang WR, Zhang M, Chang K, Wei YL. Association of DR4 (TRAIL-R1) polymorphisms with cancer risk in Caucasians: an updated meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(6): 2889–92.
187. Martínez-Ferrandis JI, Rodríguez-López R, Milne RL, González E, Cebolla E, Chirivella I, et al. Polymorphisms in TRAIL receptor genes and risk of breast cancer in Spanish women. *Cancer Biomark*. 2007; 3(2): 89–93.
188. Fernández V, Jares P, Beà S, Salaverria I, Guino E, de Sanjosé S, et al. Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4

- and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms. *Haematologica*. 2004; 89(11): 1322–31.
189. Heredia-Galvez B, Ruiz-Cosano J, Torres-Moreno D, Español I, Morales-Lara MJ, Pérez-Ceballos E, et al. Association of polymorphisms in TRAIL1 and TRAILR1 genes with susceptibility to lymphomas. *Ann Hematol*. 2014 Feb; 93(2): 243–7.
190. Gutiérrez-Cívicos R, Hurtado AM, Torres-Moreno D, Sanchez-Blanco JJ, Español I, Consuegra-Sánchez L, et al. Rituximab response in follicular lymphoma is associated with the rs20575 polymorphism in TRAILR1 extrinsic apoptosis trigger. *Pharmacogenet Genomics*. 2017; 27(2): 70–7.
191. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*. 1999 Feb; 5(2): 157–63.
192. French LE, Tschopp J. The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med*. 1999 Feb; 5(2): 146–7.
193. Zhang Y, Tong S, Guan L, Na F, Zhao W, Wei L. CD95 rs1800682 polymorphism and cervical cancer risk: Evidence from a meta-analysis. *Tumor Biology*. 2014 Mar 1; 35(3): 1785–90.
194. Jin C, Jin C, Wu X, Gu Y, Yuan F, Ye Q, et al. CD95 rs1800682A/G Variant and Tumor Risk in Asians: Evidence from a Meta-Analysis of 36 Case-Control Studies Containing 22 438 Samples. *Med Sci Monit*. 2015 Feb 27; 21: 630.
195. Zhang F, Sturgis EM, Sun Y, Zhang Y, Wei Q, Zhang C, et al. Apoptotic variants as predictors of risk of oropharyngeal cancer recurrence after definitive radiotherapy. *Int J Cancer*. 2015 Nov 15; 137(10): 2454–61.
196. Wu S, Wang S, Fu Y, Tang W, Jin H, Meng Q, et al. A novel mechanism of rs763110 polymorphism contributing to cervical cancer risk by affecting the binding affinity of C/EBP β and OCT1 complex to chromatin. *Int J Cancer*. 2017 Feb 15; 140(4): 756–63.
197. Xu Y, He B, Li R, Pan Y, Gao T, Deng Q, et al. Association of the polymorphisms in the Fas/FasL promoter regions with cancer susceptibility:

- a systematic review and meta-analysis of 52 studies. *PLoS One*. 2014 Mar 5; 9(3).
198. Wu J, Metz C, Xu X, Abe R, Gibson AW, Edberg JC, et al. A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol*. 2003 Jan 1; 170(1): 132–8.
 199. Sun T, Zhou Y, Li H, Han X, Shi Y, Wang L, et al. FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J Exp Med*. 2005 Oct 3; 202(7): 967–74.
 200. Zhou L, Zhang G, Zhou X, Li J. The association between the SNP rs763110 and the risk of gynecological cancer: A meta-analysis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2015 Feb 1; 69: 208–13.
 201. Mellor AL, Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan; 8(1): 74–80.
 202. Conesa-Zamora P. Immune responses against virus and tumor in cervical carcinogenesis: treatment strategies for avoiding the HPV-induced immune escape. *Gynecol Oncol*. 2013 Nov; 131(2): 480–8.
 203. Strizova Z, Kuchar M, Capkova L, Komarc M, Skrivan J, Bartunkova J, et al. Fas-Fas Ligand Interplay in the Periphery of Salivary Gland Carcinomas as a New Checkpoint Predictor for Disease Severity and Immunotherapy Response. *Biomedicines*. 2021 Apr 1; 9(4).
 204. Griffith TS, Ferguson TA. The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today*. 1997; 18(5): 240–4.
 205. Gregory MS, Repp AC, Holhbaum AM, Saff RR, Marshak-Rothstein A, Ksander BR. Membrane Fas ligand activates innate immunity and terminates ocular immune privilege. *J Immunol*. 2002 Sep 1; 169(5): 2727–35.
 206. Zhu J, Petit PF, van den Eynde BJ. Apoptosis of tumor-infiltrating T lymphocytes: a new immune checkpoint mechanism. *Cancer Immunol Immunother*. 2019 May 1; 68(5): 835–47.

207. Villa-Morales M, Fernández-Piqueras J. Targeting the Fas/FasL signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Jan; 16(1):85–101.
208. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer expressing Fas ligand. *Journal of Experimental Medicine*. 1996 Sep 1; 184(3): 1075–82.
209. Gutiérrez-Cívicos R, Hurtado AM, Torres-Moreno D, Sanchez-Blanco JJ, Español I, Consuegra-Sánchez L, et al. A polymorphism in FASL is associated with rituximab response in follicular lymphoma patients. *Am J Hematol*. 2016 Jun 1; 91(6): E305–7.
210. Zhao T, Li W, Chen J, Qin W. Genomic variants in Fas-mediated apoptosis pathway predict a poor response to Platinum-based Chemotherapy for Chinese Gastric Cancer Patients. *J Cancer*. 2021 Jan 1; 12(3): 849–59.
211. Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Ortiz-Reina S, Sahuquillo-Frías L, Acosta-Ortega J, et al. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma: a tissue microarray study. *Am J Clin Pathol* 2009 Sep; 132(3): 378–90.
212. Ho GYF, 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.
213. Peto PJ, Gilham PC, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*. 2004 Jul 17; 364(9430):249–56.
214. Lai HC, Sytwu HK, Sun CA, Yu MH, Yu CP, Liu HS, et al. Single nucleotide polymorphism at Fas promoter is associated with cervical carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2003 Jan 10; 103(2): 221–5.
215. Ueda M, Hung YC, Terai Y, Yamaguchi H, Saito J, Nunobiki O, et al. Fas gene promoter -670 polymorphism (A/G) is associated with cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2005 Jul; 98(1): 129–33.
216. Cibula D, Pötter R, Planchamp F, Avall-Lundqvist E, Fischerova D, Haie Meder C, et al. The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology

Guidelines for the Management of Patients With Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2018 May 1; 28(4): 641–55.

