

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

“Genotipos de VPH en tejido cervical de pacientes mexicanas con lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado y carcinoma invasor”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Lucía Angélica Gómez López

Director de tesis

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

México, D.F. Agosto, 2015.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

Genotipos de VPH en tejido cervical de pacientes mexicanas con lesiones Intraepiteliales de bajo y alto grado y carcinoma invasor.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

BIO. EXP. LUCÍA ANGÉLICA GÓMEZ LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ELISA IRENE AZUARA LICEAGA

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. MAVIL LÓPEZ CASAMICHANA

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2015

*Mucho mejor atreverse a hacer cosas grandes,
a obtener triunfos gloriosos,
aun cuando matizados con fracasos,
que formar en las filas de aquellos pobres de espíritu
que no gozan mucho y no sufren mucho
porque viven en el crepúsculo gris
que no conoce la victoria ni la derrota.*

Theodore Roosevelt

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Profesora Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTORA

Dra. Mavil López Casamichana
Directora General de Laboratorios
División Científica

ASESORES

Dr. Israel López Reyes
Profesor Investigador de la Academia de Salud Comunitaria
Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Plantel Cuauhtémoc

Dra. Lilia López Cánovas
Asesora Académica del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES DE TESIS

Dra. Mavil López Casamichana
Directora General de Laboratorios
División Científica
SEGOB

Dr. Israel López Reyes
Profesor Investigador de la Academia de Salud Comunitaria
Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Plantel Cuauhtémoc

Dra. Laura Itzel Quintas Granados
Agencia de Comercialización de Conocimiento
CINVESTAV-IPN

Dra. Lilia López Cánovas
Asesora Académica del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Diagnostico de ADN del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad de la Ciudad de México, bajo la dirección de las Dras. Mavil López Casamichana y Elisa Irene Azuara Liceaga, bajo la asesoría del Dr. Israel López Reyes, Dra. Laura Itzel Quintas Granados y Dra. Lilia López Cánovas.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por su apoyo académico, así como también al CONACyT por la beca otorgada con No.259071

Agradezco al COMECyT por la beca otorgada para la culminación de la tesis, con No.14BTM0479

Este proyecto se llevó a cabo gracias al apoyo del proyecto CONACyT Ciencia Básica No.176983

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Mavil López Casamichana, por creer en mí, por darme la oportunidad de colaborar con su equipo de trabajo, y por el apoyo brindado más allá de lo académico, fue un placer colaborar y conocer a un gran ser humano.

Gracias a la Dra. Elisa Azuara Liceaga, porque ha sido parte imprescindible de este trabajo, agradezco su apoyo, su tiempo, su confianza y su paciencia, y por todas las facilidades brindadas para que yo pudiera llegar hasta aquí.

Gracias al Dr. Israel López Reyes, por brindarme su apoyo y su confianza, por creer en mí, por el entusiasmo y esfuerzo para llevar a cabo el presente proyecto, por brindarme la oportunidad de colaborar con usted y conocerlo.

Gracias a la Dra. Laura Itzel Quintas Granados, por demostrarme su interminable pasión por la ciencia, por su paciencia, por su apoyo y demostrar entusiasmo para llevar a cabo este proyecto.

Gracias a la Dra. Lilia López Cánovas por su disposición de apoyarme, y colaborar en el proyecto, por su tiempo y esfuerzo brindado durante este tiempo.

Agradezco la colaboración del Dr. Octavio Reyes, y su equipo de trabajo del Laboratorio 3, del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Juárez de México.

Gracias a mis compañeros de laboratorio: a Mariana, Carla, Ricardo y Alma, por sus sugerencias, al M. en C. Eduardo Carrillo Tapia por su participación y apoyo en el proyecto.

Gracias a mi novio Yonatan Ramírez Romero por su apoyo y comprensión, por estar conmigo en los momentos importantes.

Gracias a mis compañeras de generación: María Elena y Yolanda por ser parte de este aventura y hacerla más amena, por brindarme su amistad y apoyo.

Gracias a mis compañeros del posgrado: Alma, José Luis, Helios, David, Monserrat, Yebran, Jaquelin, Ali, Juan Carlos, Laura, Jorge.

Gracias a mis amigos: Edgar Ortiz, Mariana Carrillo, Mariana, Daniel Ortega, Nancy Palacios, Monserrat Pacheco, por brindarme su apoyo, por estar conmigo en todo momento, por apoyarme y creer en mí.

Gracias a Caty, Viviana y Lulú.

DEDICATORIAS

Este trabajo es un proyecto de vida que me permitió crecer de manera personal y profesional, que indudablemente me ha permitido conocer y descubrir mucho sobre mi persona, estoy agradecida primero con la vida por darme la paciencia y entereza para lograr mi objetivo y agradecida con Dios por permitirme llegar hasta aquí. Este gran esfuerzo y dedicación lo hice siempre pensando en quienes han sido partícipes en mi diario vivir:

Kyara Aarland, quien sin duda alguna ha sido el principal motor de este objetivo de vida, a la cual además de dedicarle este logro, le agradezco por ser parte vital en mi vida, por haber sido paciente, comprensiva, cooperativa, y hacerme todos los días inmensamente feliz. No hay palabras para describir que tengo la fortuna y la dicha de tener un ángel como ella a mi lado, quien me ha motivado a seguir mis sueños y continuar soñando. Kyara TE AMO, gracias por existir y estar conmigo durante todo este proceso.

Dominique López Loo, por ser una madre excepcional, por estar a mi lado en todo momento, por apoyarme, ayudarme y creer en mí. Mamá mucho de lo que soy ahora y he logrado es gracias a ti, gracias a tu temperamento, tu motivación, tu entusiasmo, tu apoyo, y tu manera de enseñarme a disfrutar de la vida, gracias por dedicarme tu tiempo, gracias por tu empeño por querer que tus hijas tengan y sean lo mejor.

Serena y Alejandra Gómez, mis hermosas hermanas, saben lo feliz que me hace tenerlas a mi lado, ustedes han sido mi ejemplo en muchos momentos de mi existencia, me han enseñado a ser perseverante, a confiar en mí, a tener fortaleza y a trabajar en equipo, no tengo palabras para agradecerles su apoyo, comprensión y demostrar el enorme cariño que por mí tienen, son muy importantes en mi vida, las amo hermosas y estoy orgullosa de ustedes, son mi ejemplo a seguir, y es un privilegio tenerlas a mi lado en todo momento, de verdad hermosas no me alcanzan las palabras ni el tiempo en vida para agradecerles lo que me han brindado.

Finalmente y no porque sean menos importantes, dedico este logro, a mis abuelas Porfiaría y Angelina Loo, indudablemente nada de esto sería posible sin ellas, gracias por entregarse en cuerpo y alma, por guiarme, educarme, por estar a mi lado en todo momento y creer en mí. Están siempre presentes.

Alejandro López Loo, gracias por el apoyo, por estar con nosotras, por cuidarme, por alentarme a seguir mis sueños, por la esperanza brindada, por el entusiasmo, el cariño y por ser parte de mi vida, mil gracias por ser como un hermano para mí, te quiero mucho tío.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE GRAFICAS	VII
RESUMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes Generales	1
1.1.1 Cáncer	1
1.1.2 Cáncer Cérvico-uterino (CaCu)	9
1.1.3 Virus de Papiloma Humano (VPH)	14
1.1.4 Clasificación taxonómica de VPH	14
1.1.5 Epidemiología del VPH	19
1.1.6 Estructura molecular del VPH	22
1.1.7 Integración del Virus de Papiloma Humano	25
1.1.8 Factores asociados al riesgo que predispone al desarrollo del CaCu y la infección con VPH	31
1.1.9 Respuesta inmune contra la infección por VPH y CaCu	34
1.1.10 Respuesta inmune frente a la infección por VPH	35
1.2 ANTECEDENTES DIRECTOS	49
1.2.1 Infección Múltiple de VPH	49
1.2.2 Expresión de oncoproteínas E6 en lesiones graves	53
1.2.3 Efecto de E6 sobre la proliferación celular	54
1.2.4 E6 como reguladora de la unión célula-célula y la polaridad celular	59
2. JUSTIFICACIÓN	61
3. HIPÓTESIS	61
4. OBJETIVOS	61
4.1 Objetivo General	61
4.2 Objetivo Particulares	61
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	62
6. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	62
7. METODOLOGÍA	64
7.1 Líneas celulares	64
7.2 Obtención de las biopsias de las pacientes	64

7.3 Extracción de ácidos nucleicos	65
7.4 Detección del ADN viral en las muestras	68
7.5 Genotipificación de VPH por microarreglos de baja densidad	70
7.6 RT-PCR para amplificar el oncogén E6 de VPH	77
8. RESULTADOS	78
8.1 Características de las pacientes incluidas en este estudio	78
8.2 Edad de las pacientes incluidas en este estudio	79
8.3 Cuantificación del ADN obtenido de las biopsias de pacientes	80
8.4 Determinación de la presencia de VPH en las biopsias de las pacientes	83
8.5 Genotipificación de los Virus del Papiloma Humano en las biopsias de las pacientes por medio de microarreglo de baja densidad	87
8.6 Análisis de la genotipificación	92
8.7 Evaluación de la asociación entre la presencia de más de un genotipo de VPH y el grado de neoplasia en el cérvix	96
8.8 Resultados de las biopsias sin lesión	104
8.9 Análisis de los resultados de los microarreglos de las biopsias sin lesión	106
8.10 Análisis de la expresión del oncogén E6 de VPH-16 en las biopsias	112
9. DISCUSIÓN	118
10. CONCLUSIONES	127
11. PERSPECTIVAS	128
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	Buffer RPE	Solución concentrada para el lavado de ARN unido a la membrana utilizando RNeasy
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico	Buffer TL	Buffer para el tratamiento de lavado
ADNsa	Enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis de ADN en componentes más pequeños	Buffer RW1	Solución para el lavado de ARN unido a la membrana
Akt / PKB	Vía de señalización celular que conduce a la supervivencia celular (bloqueo de la apoptosis)	CaCu	Cáncer Cérvico-uterino
$\alpha 6$-$\beta 4$	Integrina de las células epiteliales	CJ	Conjugado
ASCUS	Células escamosas atípicas de significancia indeterminada	CFRT	Gen que codifica una proteína que se encuentra en las membranas celulares de los tejidos animales que tienen una secreción exocrina
ARN	Ácido ribonucleico	CLART-HPV2	Producto de diagnóstico <i>in vitro</i> para la detección y genotipado de 35 tipos diferentes de Virus del Papiloma Humano (VPH)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	CMV	Citomegalovirus
ARNsa	Enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis de ARN en componentes más pequeños	COX2	Inhibidores de la ciclooxigenasa, son antiinflamatorios no esteroideos
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal	CS	Tiras CLAT Strip
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia	DC	Diluyente de conjugado
B-Raf	Proteína involucrada en el crecimiento de las células	EB	Buffer de elución

ECCA	Asociación Europea de CaCu	Genes E	Genes de expresión temprana de VPH
EZ-Vision	Tinte fluorescente que se intercala en el ADN y permite la visualización inmediata de ADN en geles de agarosa en un transiluminador UV estándar	Genes L	Genes de expresión tardía de VPH
E1	Proteína viral, de expresión temprana número 1	HeLa	Línea celular de carcinoma de cuello uterino con el genoma de VPH-18 integrado
E2	Proteína viral, de expresión temprana número 2	HIF1α	Factor inducible por hipoxia 1-alfa
E2F-1	El factor de transcripción proteína codificada en humanos por el gen <i>E2F1</i>	HRP	Peroxidasa de rábano
E4	Proteína viral, de expresión temprana número 4	IL-10	Interleucina 10
E5	Proteína viral, de expresión temprana número 5	IM	Infección múltiple
E6	Proteína viral, de expresión temprana número 6	LCR	Región larga de control del VPH
E7	Proteína viral, de expresión temprana número 7	LIEAG	Lesión intraepitelial de alto grado
E8	Proteína viral, de expresión temprana número 8	LIEBG	Lesión intraepitelial de bajo grado
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	L1	Proteína viral mayor que forma parte de la cápside del VPH
		L2	Proteína viral menor que forma parte de la cápside de VPH
		MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad tipo I
		MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad tipo II
		MgCl₂	Cloruro de magnesio

NIC I	Neoplasia Intraepitelial cervical de tipo 1	RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (técnica de biología molecular)
NIC II	Neoplasia Intraepitelial cervical de tipo 2		
NIC III	Neoplasia Intraepitelial cervical de tipo 3	SiHa	Línea celular de carcinoma de cuello uterino con el genoma de VPH-16 integrado
NF-kB	Factor nuclear que controla la transcripción del ADN		
PAI-1	Activador del Plasminógeno tipo 1	SCC	Carcinoma celular escamoso
PAI-2	Activador del Plasminógeno tipo 2	SH	Solución de Hibridación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (técnica de biología molecular)	STAT3	Factor codificado en humanos por el gen <i>STAT3</i>
PGE2	Prostaglandina llamada dinoprostona	TAMs	Macrófagos asociados a tumor
PI3-quinasa	Fosfoinositol quinasa o fosfoinositida-3-quinasa	Th	Linfocitos T auxiliares
pRb	Retinoblastoma, proteína supresora de tumores	u-PA	Receptor de uroquinasa
p53	Proteína 53, factor de transcripción nuclear	Vía RAF	Cadena de proteínas en la célula que comunican una señal de un receptor en la superficie de la célula al ADN en el núcleo de la célula
p97	Promotor mínimo para la transcripción de los genes de expresión temprana de VPH	VPH	Virus de Papiloma Humano
RE	Solución de revelado	VPH-AR	Virus de Papiloma Humano de alto riesgo
		VPH-BR	Virus de Papiloma Humano de bajo riesgo
		VPs	Virus de Papiloma

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Factores involucrados en el crecimiento tumoral y progresión al cáncer

Figura 1.2 Proceso inflamatorio inducido por dos vías: extrínseca e intrínseca

Figura 1.3 Tasa de mortalidad por cada 100,000 mujeres, a causa del CaCu

Figura 1.4 Carcinogénesis mediada por VPH de alto riesgo

Figura 1.5 Árbol Filogenético de Papillomavirus

Figura 1.6 Distribución de los genotipos de VPH asociados a CaCu en México y a nivel mundial

Figura 1.7 Estructura del Virus de VPH

Figura 1.8 Ciclo de vida de VPH, ligado al programa de diferenciación de la célula hospedera infectada

Figura 1.9 Patogenia de la infección por VPH

Figura 1.10 Cambios en el modelo de expresión que acompañan la progresión del CaCu

Figura 1.11 Mecanismos del VPH en la carcinogénesis

Figura 1.12 Respuesta inmune en la infección por VPH

Figura 1.13 Tipos de infección múltiple y probables efectos

Figura 1.14 Estructura de la proteína E6 de VPH-AR

Figura 1.15 Proliferación celular en células infectadas con VPH-AR

Figura 1.16 Blancos celulares de la oncoproteína E6 de VPHs de alto riesgo involucrados en la transformación celular

Figura 1.17 Proteínas celulares con las que interacciona la oncoproteína E6 de VPH-AR

Figura 5.1 Diagrama de flujo del diseño experimental

Figura 7.1 Equipo y Kit de Qiagen utilizados para extracción de ácidos nucleicos

Figura 7.2 Tipos virales de VPH detectados con el kit CLART HPV2 y lector CAR

Figura 7.3 Hibridación de las muestras de ADN en el microarreglo de baja densidad

Figura 7.4 Distribución de las sondas en el microarreglo de CLART2

Figura 7.5 Controles incluidos en el microarreglo

Figura 7.6 Validación de un resultado positivo

Figura 8.1 Gel representativo del ADN genómico obtenido de las muestras de las pacientes

Figura 8.2 Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes L1 y GAPDH

Figura 8.3 Determinación de VPH en las biopsias de pacientes

Figura 8.4 Genotipificación de pacientes diagnosticadas con CaCu

Figura 8.5 Genotipificación de pacientes diagnosticadas con LIEAG

Figura 8.6 Genotipificación de pacientes diagnosticadas con LIEBG

Figura 8.7 ARN total obtenido de las muestras de las biopsias de las pacientes

Figura 8.8 Estandarización de RT-PCR para evaluar la expresión del gen E6

Figura 8.9 Expresión de E6 en biopsias con diagnóstico de CaCu

Figura 8.10 Expresión de E6 en biopsias con diagnóstico de LIEAG

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Lesiones provocadas por virus de papiloma humano
Tabla 2	Clasificación epidemiológica de los VPH
Tabla 3	Distribución de los tipos de VPH en CaCu en México
Tabla 4	Funciones de los productos génicos del VPH
Tabla 5	Estudios realizados a nivel mundial sobre infección múltiple
Tabla 6	Genotipos de VPH y sitios de hibridación del oligonucleótido MY09/MY11
Tabla 7	Reacción para la detección de VPH empleando la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos MY09/MY11
Tabla 8	Esquema de amplificación por PCR punto final
Tabla 9	Oligonucleótidos empleados para la amplificación del oncogen E6, y el gen control
Tabla 10	Diagnóstico de las pacientes incluidas en este estudio
Tabla 11	Ejemplos de la cuantificación del ADN de las biopsias de las pacientes
Tabla 12	Relación entre el grado de la lesión y la coinfección
Tabla 13	Coinfecciones mixtas y simples encontradas en las biopsias con lesión
Tabla 14	VPHs encontrados con mayor frecuencia en las coinfecciones
Tabla 15	Probabilidad de tener CaCu cuando está presente VPH-16
Tabla 16	Probabilidad de tener LIEBG cuando está presente VPH-31
Tabla 17	Probabilidad de tener LIEBG cuando está presente VPH-51
Tabla 18	Coinfecciones mixtas encontradas en las biopsias de la zona sana del cérvix
Tabla 19	VPHs encontrados con mayor frecuencia en las coinfecciones de la zona sana del cérvix

ÍNDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1** Distribución de Biopsias por tipo de Lesión
- Gráfica 2** Edad de las pacientes incluidas en este estudio
- Gráfica 3** Porcentaje de muestras positivas y negativas a la infección con VPH
- Gráfica 4** Muestras positivas para VPH de acuerdo al grado de la lesión
- Gráfica 5** Tipos de VPH-BR encontrados en las biopsias con lesión
- Gráfica 6** Tipos de VPH-AR encontrados en las biopsias con lesión
- Gráfica 7** Porcentaje de VPH-AR, VPH-BR y VPH-Mixto en cada tipo de lesión
- Gráfica 8** Porcentaje de coinfección e infección simple
- Gráfica 9** Porcentaje de coinfección por grado de neoplasia en el cérvix
- Gráfica 10** Número de genotipos presentes en cada una de las pacientes por grupo de lesión
- Gráfica 11** Porcentaje de coinfección simple y mixta por grado de neoplasia en el cérvix
- Gráfica 12** Porcentaje de muestras positivas a VPH en la zona sin lesión del cérvix
- Gráfica 13** Muestras de la zona sana del cérvix positivas para VPH por grado de la lesión de las biopsias sin lesión
- Gráfica 14** VPHs encontrados en las biopsias de la zona sana del cérvix
- Gráfica 15** Prevalencia de VPH-AR en biopsias de la zona sana del cérvix
- Gráfica 16** Infección múltiple e infección simple en biopsias sin lesión
- Gráfica 17** Porcentaje de coinfección en la zona sana del cérvix de acuerdo al grado de neoplasia en el cérvix
- Gráfica 18** Número de genotipos presentes en cada tipo de lesión en las biopsias de la zona sana del cérvix

RESUMEN

El virus de papiloma humano (VPH) se clasifica en dos tipos de acuerdo a sus propiedades oncogénicas, el VPH de bajo riesgo (VPH-BR) y el VPH de alto riesgo (VPH-AR). La mayoría de las infecciones por VPH se controlan de forma natural a través del sistema inmune, sin embargo cuando la infección con VPH-AR es persistente, promueve el desarrollo del cáncer cervical (Brendle *et al*, 2014). Recientemente se ha dado importancia al fenómeno de coinfección con varios tipos de VPH (Chaturvedi *et al*, 2011). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar los genotipos de VPH que coinfectan las lesiones intraepiteliales de pacientes mexicanas. En este estudio se incluyeron 55 pacientes con lesiones cervicales diagnosticadas por colposcopia, de cada paciente se obtuvo dos biopsias: una de la lesión cervical y otra de un área adyacente no lesionada. La presencia de VPH se analizó por PCR utilizando oligonucleótidos MY09/MY11 que amplifican un fragmento del gen L1 (Hiroyuki *et al*, 1999). El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa y se genotipificó utilizando microarreglos de baja densidad (CLART VPH 2) para detectar 35 tipos de VPH diferentes tanto VPH-AR y VPH-BR. El 87% de las muestras con lesión fueron positivas a la infección por VPH, mientras que en las biopsias sin lesión aparente en la colposcopia se observó que el 80% fueron positivas lo que sugiere que incluso en la zona no lesionada el VPH está presente. Adicionalmente se observó que el 71% de los pacientes mostró coinfección con más de un genotipo de VPH. En las muestras sin lesión aparente de la misma paciente identificamos un 30% de coinfección. Finalmente se encontraron genotipos de VPH-AR (VPH16, VPH18 Y VPH31) Y VPH-BR (61,70, 84) en el área de la lesión, interesantemente, en la zona no lesionada, sólo se identificaron VPH-AR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades etiológicamente distintas entre sí, caracterizado por un crecimiento exacerbado de células anormales con capacidad de invadir los tejidos subyacentes y diseminarse a otros órganos (Salomón, *et al.* 2006). El desarrollo del cáncer se debe a distintos factores, se han propuesto diez y juntos constituyen un principio de organización que proporciona un marco lógico para la comprensión de la notable diversidad de las enfermedades neoplásicas (Hanahan y Weinberg, 2000). En la figura 1.1, podemos observar algunos de los factores involucrados en el crecimiento tumoral y la progresión al cáncer.



Figura 1.1. Factores involucrados en el crecimiento tumoral y progresión al cáncer (Tomada y modificada de Hanahan y Weinberg, 2000)

Uno de los principales eventos que ocurren en el cáncer es la capacidad de las células para mantener la proliferación crónica, a diferencia de las células que se encuentran en tejidos normales que controlan la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento que inducen la entrada y progresión del ciclo celular, asegurando así una homeostasis y por lo tanto el mantenimiento de la arquitectura normal de los tejidos y su función. Las señales que promueven la proliferación son transmitidas en gran parte por factores de crecimiento que se unen a los receptores de la superficie celular, que contienen típicamente dominios intracelulares de tirosina-cinasa. Esto promueve la emisión de indicadores de las vías de señalización intracelulares ramificadas que regulan la progresión a través de el ciclo celular, así como el crecimiento celular (es decir, el aumento del tamaño de la células); a menudo estas señales influyen en otras propiedades de las células, tales como la supervivencia y el metabolismo energético (Lemmon y Schlessinger, 2010). Por otra parte, se sabe relativamente poco acerca de los mecanismos que controlan la liberación de estas señales mitogénicas. Además, la biodisponibilidad de los factores de crecimiento está regulada por el secuestro en el espacio pericelular y la matriz extracelular, y por las acciones de una compleja red de proteasas, sulfatasas, y posiblemente otras enzimas que se liberan y activan, al parecer, en una forma altamente específica y localizada (Perona, 2006; Hynes y MacDonald, 2009; Witsch *et al*, 2010). Las células cancerosas pueden adquirir la capacidad para sostener la señalización proliferativa de diferentes maneras, una de ellas es que pueden producir su propio ligando al factor de crecimiento, al que pueden responder a través de la expresión de receptores afines, lo que resulta en una estimulación de la proliferación autocrina (Bhowmick *et al*, 2004; Cheng *et al*, 2008). La señalización del receptor también puede ser desregulada cuando los niveles de los receptores celulares en las células neoplásicas de incrementan (Hanahan y Weinberg, 2000).

En los últimos diez años se ha hecho un análisis del genoma de las células cancerosas, y se han observado mutaciones somáticas en ciertos tumores

humanos, estas mutaciones promueven la activación constitutiva de señalización de circuitos, provocada por receptores de factores de crecimiento activados. Debido a este análisis se ha observado que el 40% de los melanomas humanos contienen la activación de mutaciones que afectan la estructura de la proteína de B-Raf, provocando un daño en la señalización constitutiva a través de la actividad de la vía RAF de la proteína (MAP) quinasa (Davies y Samuels, 2010). Del mismo modo, las mutaciones en la subunidad catalítica de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3-quinasa), promueve la formación de isoformas que se han detectado en una matriz de tipos tumorales, las cuales sirven para la sobre activación de la PI3-cinasa de señalización de circuitos, incluyendo su traductor clave de señal Akt / PKB (Jiang y Liu, 2009; Yuan y Cantley, 2008).

La inflamación crónica es otro de los factores que promueven la patogénesis del cáncer, ya que la oncogénesis es un proceso que se desarrolla a través de múltiples mutaciones genéticas sucesivas e inestabilidad genómica que transforman una célula normal en neoplásica. En cada etapa las células transformadas adquieren nuevos atributos que permiten la progresión tumoral. De acuerdo a Hanhan y Weinberg, el desarrollo del cáncer se debe a un complejo proceso de la oncogénesis con cambios moleculares, bioquímicos y celulares, este proceso se puede resumir en diferentes alteraciones esenciales que adquieren las células tumorales, que a continuación se mencionan brevemente.

- 1) Autonomía, ya que las células tumorales se liberan de las señales que controlan el crecimiento celular que puede ser por sobreexpresión de sus propios receptores, como se describió anteriormente, o de la matriz extracelular.
- 2) Evitando la apoptosis, debido a las mutaciones del gen pro-apoptótico p53.
- 3) La inestabilidad a las señales que controlan el crecimiento celular, principalmente por la proteína pRB.

4) Capacidad replicativa ilimitada, por la presencia de la activación de la ADN telomerasa que mantiene la integridad de los telómeros de las células tumorales.

5) Angiogénesis sostenida, que permite el suministro permanente de sangre al tumor por activación de los factores inductores y represión de los inhibidores de la angiogénesis.

6) Invasión celular y metástasis, por las alteraciones provocadas en las proteínas relacionadas con la adhesión celular.

Estas alteraciones esenciales llevaron a Mantovani en el 2008, a proponer una séptima alteración, esta tiene que ver con el proceso inflamatorio, el cual propone que se puede desarrollar a través de dos vías: extrínseca e intrínseca.

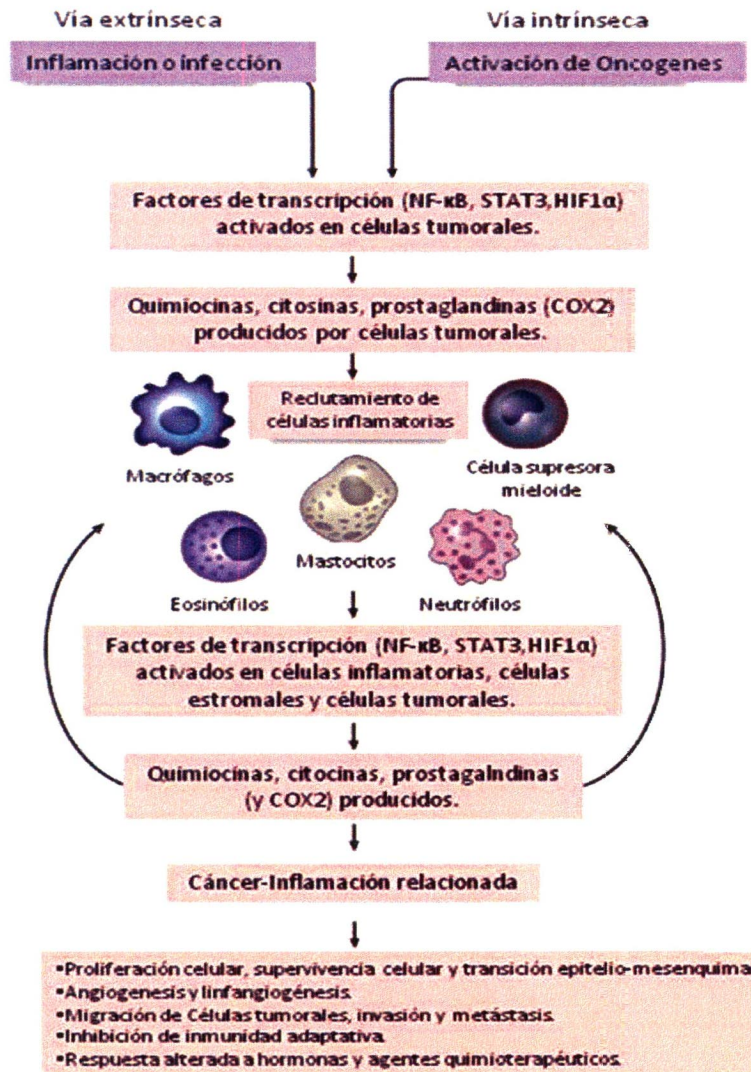


Figura 1.2 Proceso inflamatorio inducido por dos vías: extrínseca e intrínseca. (Tomada y modificada de Mantovani, 2008).

a) La vía extrínseca. Es promovida por ciertas condiciones inflamatorias infecciosas y no infecciosas (Schottenfeld, 2006). Algunos agentes infecciosos aumentan el riesgo de cáncer en localizaciones específicas, como el Virus de Papiloma Humano (VPH) en el cuello uterino. Las inflamaciones crónicas no infecciosas asociadas a cáncer se producen por diversos mecanismos.

- b) La vía intrínseca. Es alterada por alteraciones genéticas capaces de causar inflamación y neoplasia (como los oncogenes). La hipótesis surgió por la observación de las células y mediadores inflamatorios en el microambiente de tumores. En esta vía las células transformadas por alteraciones genéticas (como procesos de mutación, recombinación, amplificación de oncogenes o inactivación de genes supresores) estimulan la producción de mediadores inflamatorios y la formación de un microambiente inflamatorio en el tumor.

Como podemos observar en la figura 1.2, ambas vías convergen en una común, que activa factores de transcripción en las células tumorales como el NF- κ B (factor nuclear κ B), STAT3 (transductor de señal y activador de transcripción 3) y HIF1 α (factor inducible por hipoxia 1 α). Estos factores de transcripción coordinan la producción de mediadores de inflamación, citosinas y quimiocinas, así como ciclooxigenasa 2 (COX2) que a su vez genera prostaglandinas como la PGE2, que reclutan y activan leucocitos en particular de la línea mielomonocítica, las células TAMs (macrófagos asociados a tumor) y células reguladoras. Las citosinas activan los mismos factores de transcripción en las células inflamatorias, estromales y tumorales con más mediadores inflamatorios y la formación de un microambiente inflamatorio. Estos y otros oncogenes coordinan programas inflamatorios activados mediante eventos transcripcionales ligados a la angiogénesis y al reclutamiento de células de origen mielomonocítico (Mantovani, 2008).

Asimismo, se ha descrito que los factores proteolíticos del Sistema de Activación del Plasminógeno están asociados a la activación de la invasión o en procesos metastásicos. Esta es una de las características principales del desarrollo del cáncer, ya que en los pacientes con cáncer el incremento de estos factores proteolíticos está asociado con la progresión del tumor y con una corta supervivencia y/o tiempo sin enfermedad (Ramírez, 2005). Recientes descubrimientos en la biología del cáncer, con respecto a los factores proteolíticos del Sistema de Activación del Plasminógeno, en los cuales se ha observado que no sólo están

asociados con la regulación y control del cáncer establecido, ya que también se ha visto una asociación de estos con el pronóstico, por esta razón, varios investigadores han tratado de elucidar el mecanismo celular mediado por proteasas en la invasión y metástasis del tumor (López, 2005).

Durante la invasión y metástasis del tumor, ocurre un entrecruzamiento de las células tumorales, las células del hospedero y la matriz extracelular por unión e interacción en la membrana basal, la matriz extracelular y proteólisis local. La penetración de las células tumorales focaliza la actividad proteolítica en la superficie celular a través de receptores para la plasmina y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA). El receptor de las células tumorales para u-PA, denominado u-PAR, une u-PA liberados de las células tumorales cercanas, esta unión u-PA/u-PAR focaliza la acción proteolítica de la superficie de las células tumorales. El u-PA convierte al plasminógeno en plasmina, y ésta degrada proteínas de la matriz extracelular facilitando la proliferación de las células tumorales, así como la invasión y metástasis (Konecny, 2001).

La acción proteolítica del u-PA es controlada por sus inhibidores llamados Inhibidores del Activador del Plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y el tipo 2 (PAI-2) los cuales pueden unirse a la superficie de la célula asociado al complejo u-PAR/u-PA formando un complejo trimérico enzimáticamente inactivo receptor-proteasa-inhibidor el cual es internalizado por las células del tumor (Costantini, 1996). Al parecer la proteasa u-PA y el inhibidor PAI-1 están presentes en el tumor para lograr limitar la proteólisis mediada por el receptor de la u-Pa. La internalización y reciclaje de la u-PAR puede restaurar la actividad proteolítica asociada a la superficie celular. Otras proteasas conocidas como catepsinas y metaloproteasas se ha visto que están involucradas en la invasión y metástasis tumoral interactuando con el u-PA en una cascada (Andreasen, 1997).

Estudios clínicos han demostrado que en general los tumores elevan los niveles antígenicos de u-PA, u-PAR y/o PAI-, pero disminuyen los niveles de PAI-2, lo cual

conduce a la progresión de la enfermedad y a la metástasis del tumor. La determinación de los factores proteolíticos es de gran importancia en la clínica para definir pacientes de alto riesgo afectados con tumores sólidos malignos (Andreasen, 1997).

Fuertes evidencias han demostrado que la u-Pa, u-PAR y/o PAI-1 o PAI-2 son predictores de pobre pronóstico en pacientes con cáncer de ovario, endometrio, cuello uterino, vejiga o riñón. Kuhn y colaboradores en 1994 y Konecny y colaboradores en 2001 determinaron la existencia de un fuerte impacto pronóstico del u-PA y PAI-1 en pacientes con cáncer de ovario en estado avanzado, las pacientes con bajos niveles de u-PA y PAI-1 en su tumor primario tienen mucho mejor pronóstico (sobrevivida) que las pacientes con elevados niveles de estos factores (Konecny, 2001).

1.1.2 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO (CaCu)

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la primera neoplasia en países en vías de desarrollo. De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), desafortunadamente las muertes por neoplasias seguirán en aumento y alcanzarán los 12 millones de casos en el año 2015 (OMS, 2010).

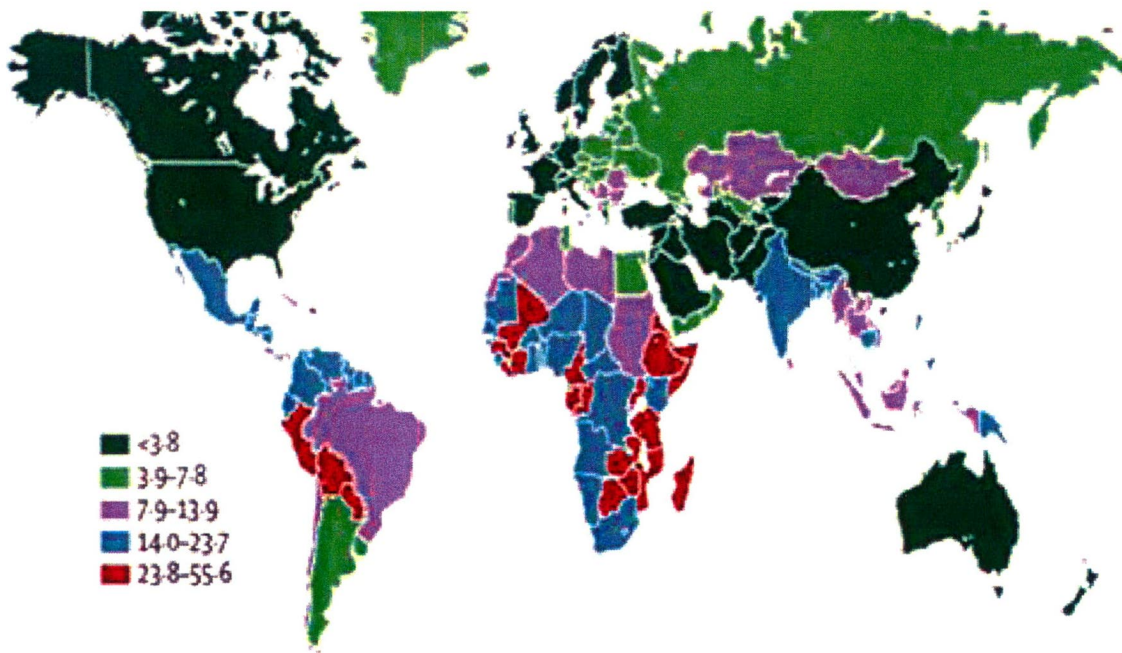


Figura 1.3. Tasa de mortalidad por cada 100,000 mujeres, a causa del CaCu. (Tomada y modificada www.thelancet.com).

En México, como en otras partes del mundo el CaCu es el segundo cáncer más frecuente y ocupa el segundo lugar en mortalidad sólo siendo superado por el Cáncer de Mama. El Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI) de México reportó que en 1998 murieron 4,545 mujeres y en el 2007 fallecieron 4,046 por esta causa. Por lo anteriormente expuesto, se puede concluir que la infección por VPH, sobre todo la que persiste y produce CaCu es un problema de Salud Pública y como señala Suarez E. “causa el mayor número de años de vida

potencialmente perdidos y también le produce altos costos a los sistemas de salud” (Franco-Cárdenas, 2009).

El CaCu solía ser la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres en Estados Unidos. Sin embargo, en los últimos 40 años, el número de casos de CaCu y las muertes relacionadas con este cáncer han disminuido significativamente. Esta disminución se debe en gran parte a que muchas mujeres están haciéndose pruebas de Papanicolaou periódicamente, lo que permite identificar células precancerosas en el cuello uterino antes de que se conviertan en cáncer (MMWR, 2012).

En el 2011 (el año más reciente sobre el que hay datos disponibles):

- 12,109 mujeres en los Estados Unidos recibieron un diagnóstico de CaCu.
- 4,092 mujeres en los Estados Unidos murieron por esta enfermedad.

Se estima que cada año se registran en Estados Unidos 11,967 casos nuevos de CaCu asociado al VPH. Más mujeres de raza negra e hispanas reciben diagnósticos en estadios avanzados de la enfermedad que las mujeres de otras razas o grupos étnicos, posiblemente debido a que tienen un acceso menor a las pruebas de Papanicolaou y a los tratamientos respectivos (MMWR, 2012).

El CaCu es uno de los más frecuentes en España ya que este supone el 13% de los cánceres en mujeres, con una incidencia en España de 7-13 de cada 100.000 mujeres por año. Más del 95% de casos de cáncer cérvico-uterino afecta al revestimiento del útero (endometrio) (Gonzalez 2014).

La ECCA (Asociación Europea de Cáncer Cervical) trabaja para lograr la reducción del CaCu en Europa promoviendo un diagnóstico oportuno sobre este tipo de cáncer y los medios por los cuales se puede prevenir. Apoyándose en la experiencia de investigadores, clínicos y organizaciones sanitarias públicas de toda Europa, la ECCA ha elaborado los siguientes folletos:

- CaCu
- Virus Papiloma Humano (VPH) y CaCu
- Seguimiento y Tratamiento de una Citología anormal

El CaCu es precedido por lesiones precursoras, las cuales se clasifican como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) con tres grados progresivos (NIC I, II y III) (Richart, 1973). Otra clasificación son las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) y de alto grado (LIEAG), donde LIEBG equivale a NIC I, mientras que NIC II y NIC III equivalen a las LIEAG (Salomón *et al.*, 2001). Estas clasificaciones se basan en las alteraciones morfológicas que presentan los epitelios endo y exocervical. Está establecido que la infección por VPH es causa necesaria para el desarrollo del CaCu, pero no es suficiente la presencia del virus (Walboormers, 1999). Desde que se presenta la infección por VPH hasta el desarrollo del CaCu pueden transcurrir entre 15 a 20 años. Los VPH son altamente transmisibles y la mayoría de los hombres y mujeres sexualmente activos adquirirán la infección durante su vida. Las infecciones genitales por el VPH son transmitidas principalmente por contacto sexual, pero no exclusivamente durante el coito. Mientras la mayoría de las infecciones son transitorias y benignas, la infección genital persistente con ciertos genotipos virales pueden conducir al desarrollo de lesiones precancerosas y de cáncer en la región anogenital (Woodman 2007).

Muchos virus que originan infecciones persistentes debido a su capacidad de modular o evadir la respuesta inmune, son caracterizados por una replicación viral continua a bajos o altos niveles (por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de la hepatitis B) o por periodos de reactivación de una infección latente seguida por intervalos libres de la enfermedad (por ejemplo, el virus del herpes simple). Esto puede conducir a una variedad de problemas crónicos incluyendo neoplasias, inmunosupresión, enfermedades autoinmunes y falla orgánica selectiva (Martinic, 2008).

Las mujeres son infectadas por alguno de estos virus poco tiempo después del inicio de la vida sexual activa, y la mayoría de las infecciones ocurren en mujeres menores de 25 años (Smith, 2008). Después de esa edad, la prevalencia disminuye rápidamente. En mujeres de edad media, las infecciones por VPH son transitorias, volviendo a observarse un incremento en las infecciones en mujeres de los 30 años en adelante (Bosco, 2007).

El CaCu está caracterizado por una fase pre-maligna bien definida, la cual puede ser detectada por examen citológico de células cervicales exfoliadas (prueba de Papanicolaou). Desde la implementación de la citología (Pap), la tasa del CaCu ha disminuido considerablemente (Nanda, 2000), y a pesar de que la mayoría de las mujeres que han fallecido por CaCu nunca se realizaron una prueba de Pap, muchas de ellas recibieron resultados negativos de su prueba. Esto se debe a que la sensibilidad de la citología es limitada por el error del muestreo, donde pocas células son colocadas en el frotis, agregándose el error de interpretación, donde pocas células anormales no son identificadas entre la multitud de células normales que también se encuentran en el frotis cervical bien tomado. El error de muestreo más común es la falta de células de la zona de transición cervical (Boulet, 2008). Otro problema asociado al Pap, se reporta como resultado ASCUS (del inglés "atypical squamous cells of undetermined significance" que significa: células atípicas escamosas de significado incierto), el cual es un hallazgo citológico sugestivo, pero no concluyente de lesiones escamosas intraepiteliales. Esto genera incertidumbre en el médico hacia la conducta a seguir. ASCUS permanece como una entidad que se reporta en 5-10% de las pruebas de Pap (Nanda, 2000).

En los últimos años, con la intensa investigación que se ha realizado sobre la patogénesis del CaCu, se ha logrado un gran progreso en la comprensión de esta enfermedad. La infección genital con VPH-AR es muy común y la mayoría de los individuos se curan de la infección con el tiempo, pero aproximadamente el 15% de las pacientes, no pueden eliminar el virus. La infección persistente con un virus

VPH- AR es el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer del tracto genital inferior (Mayrand, 2007).

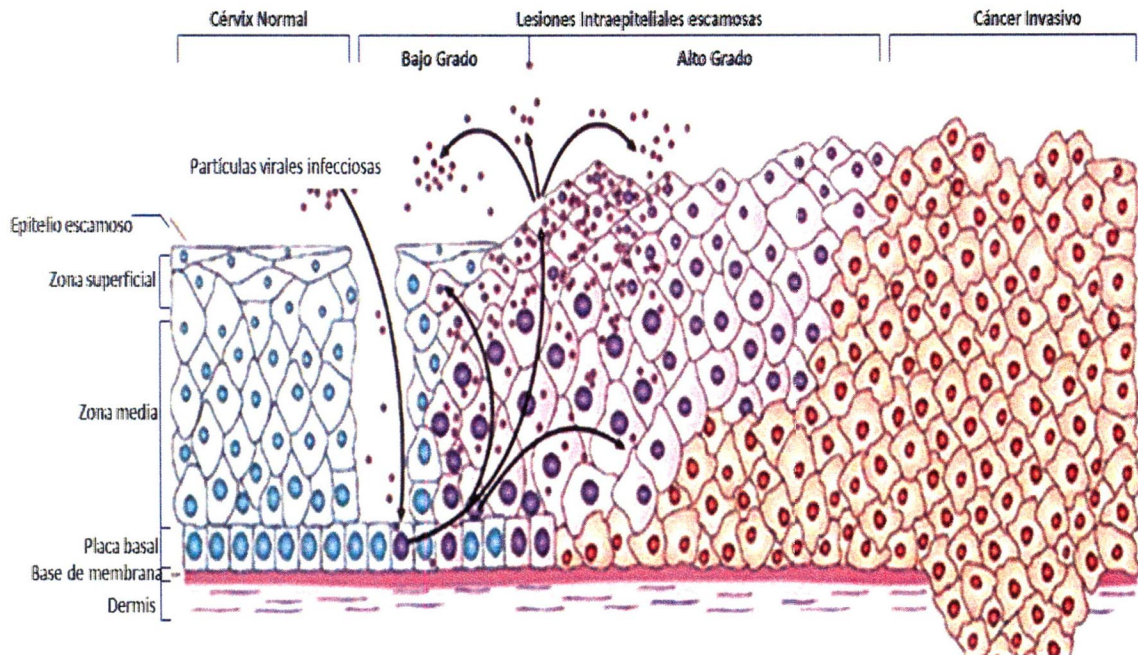


Figura 1.4. Carcinogénesis mediada por VPH de alto riesgo. (Tomada y modificada de Woodman *et al*, 2007).

El CaCu ocurre en dos formas predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinoma y al igual que los otros tipos de cáncer, es una enfermedad multifactorial en la que participan diferentes factores genéticos y ambientales, siendo la principal neoplasia asociada al VPH, ya que el 99% de los casos lo presentan (Walboomers, 1999). Los otros factores de riesgo asociados al desarrollo de esta neoplasia maligna son: promiscuidad, actividad sexual a temprana edad, historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente, verrugas genitales, pareja sexual con CaCu o cáncer de pene, persistencia y carga viral altas, coinfección con otros virus como el Herpes simple (HSV) tipo 2, Citomegalovirus (CMV) y Herpesvirus humano tipos 6 y 7 así como otros microorganismos patógenos como por ejemplo *Trichomonas vaginalis* (Negrini,

2001). Conjuntamente, diversos estudios han relacionado el uso prolongado de anticonceptivos orales con la alta positividad al ADN viral; y se sabe que la región larga de control (LCR por las siglas en inglés) en el genoma viral contiene elementos de respuesta a glucocorticoides inducibles por hormonas esteroides como la progesterona y la dexametasona favoreciendo con esto el establecimiento de los virus (Magnusson, *et al*, 2000). Por otra parte, la infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas de 18 a 30 años de edad, y después de los 30 años decrece la prevalencia. Mientras tanto, el CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer. Aunado a esto, la predisposición genética representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor, por lo que de cada individuo el genoma determina la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad (Magnusson, *et al*, 2000).

1.1.3 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)

1.1.4 Clasificación taxonómica de VPH

Inicialmente los virus del papiloma se incluyeron, junto con los poliomavirus, dentro de una misma familia, la familia *Papovaviridae*, debido a que ambos son virus con genomas de ADN circular de doble cadena, y con cápsidas icosaédricas sin envoltura (Bernard, 2005). Dado que posteriormente se ha visto que los dos grupos de virus tienen genomas de distinto tamaño, organizaciones genómicas completamente diferentes y poca similitud de secuencia, han sido reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus como familias separadas, *Papillomaviridae* y *Polyomaviridae* (Villiers *et al.*, 2004). La familia *Papillomaviridae* comprende una serie de virus específicos de hospedero, que han sido detectados en muchas especies animales, así como en humanos (Burd, 2003). Se han descrito más de 200 papilomavirus, identificándose alrededor de 100 tipos específicos de humanos (Villiers *et al*, 2004), de los cuales al menos 30 son capaces de infectar la mucosa genital. Los VPH se clasifican de acuerdo a las

diferencias de secuencia en el gen L1 que codifica la proteína mayoritaria de la cápside (L1). Se trata de un gen bien conservado entre todos los miembros de la familia *Papillomaviridae*. Así, se habla de género de VPH, cuando existe al menos un 60% de homología; de especie cuando existe entre 60 y 70%; de tipo entre 71 y 89%; de subtipo entre 90 y 98% y de variante cuando existe más de un 98% de homología en la secuencia del gen que codifica para la proteína L1.

Los VPHs se dividen en 16 géneros, denominados con una letra del alfabeto griego (Figura 1.5). Según esta clasificación, los VPHs se agrupan dentro de 5 clados: alfa, beta, gamma, mu y nu. Los tipos de VPH asociados con el cáncer cervical, denominados tipos de alto riesgo, pertenecen al género alfa-papilomavirus y se encuentran en las especies 5, 6, 7, 9 y 11 (Schiffman *et al.*, 2005). El VPH16 es el tipo que se encuentra con mayor frecuencia en los casos de CaCu, perteneciendo a la especie 9, mientras que el siguiente tipo más común, el VPH18, es un miembro de la especie 7. El VPH6, responsable de la mayoría de las verrugas genitales, pertenece a la especie 10.

ÁRBOL FILOGENÉTICO DE PAPILOMAVIRUS

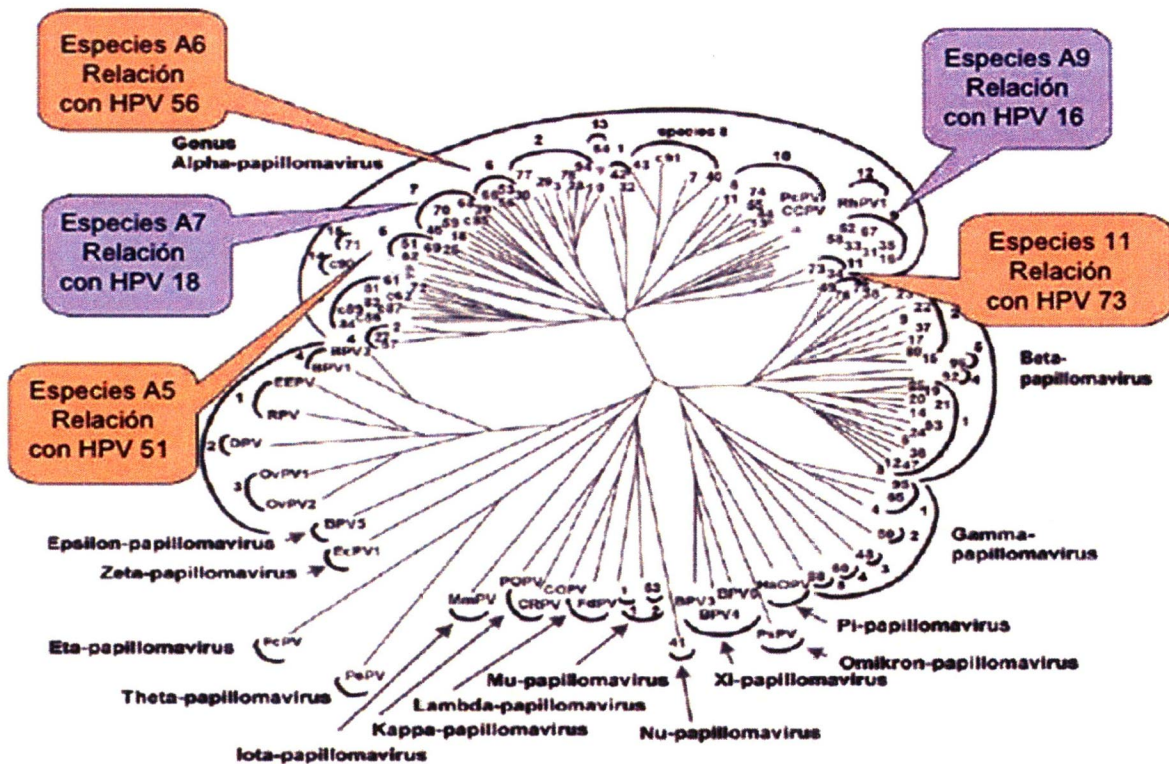


Figura 1.5 Árbol Filogenético de Papillomavirus. Los 16 géneros de la familia Papillomaviridae. (Tomada y modificada de Villiers *et al.*, 2004).

Debido a que la infección es transmitida principalmente por contacto sexual, otras neoplasias de la región genito-urinaria se han asociado también a VPH, tales como el cáncer de pene, ano, vulva y vagina, así como de cabeza y cuello, boca y orofaríngeo (Brown, 2007). Basado en el análisis de sus secuencias de ADN, se han identificado alrededor de 130 tipos virales de VPH, de los cuales la mayoría no causa ningún síntoma en la gran parte de la población. Entre 30 y 40 de estos tipos de virus de papiloma humano (VPH) se transmiten vía contacto sexual e infectan la región anogenital y pueden producir lesiones epiteliales malignas y benignas tales como papilomatosis laríngeas, verrugas genitales y cutáneas como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Lesiones provocadas por virus de papiloma humano.

Enfermedad	Tipo VPH
Verruga común	2, 7
Verruga plantar	1, 2, 4
Verruga cutánea chata	3, 10
Verruga genital anal	6, 11, 42, 43, 44, 55 y otros
Cáncer en regiones genito-urinarias (vulva, pene, vagina, ano)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51
Epidermodisplasia verruciforme	más de 15 tipos
Hiperplasia focal epitelial (oral)	13, 32
Papilomas orales	6, 7, 11, 16, 32

Tomado y modificado de Brown, 2007.

Epidemiológicamente, los VPH han sido clasificados en bajo y alto riesgo, de acuerdo a su asociación con lesiones premalignas y malignas (Tabla 1 y 2). Doce VPH mucosos han sido clasificados como tipos de bajo riesgo los cuales están asociados a estados asintomáticos o a lesiones benignas tales como cervicitis no específica, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado o verrugas genitales (condiloma acuminado). Actualmente se reconoce que prácticamente todos los cánceres cervicales, tanto de tipo escamoso como glandular, están causados por infecciones cervicales persistentes por alguno de los 18 tipos de VPH oncogénicos (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 73, 26, 53, 66) (Gravitt, *et al*, 2007).

Tabla 2. Clasificación epidemiológica de los VPH.

TIPO DE RIESGO	TIPOS DE VPH
ALTO RIESGO	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 73, 26, 53, 66.
BAJO RIESGO	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Tomado de Muñoz, 2003.

Los tipos de VPH-AR difieren en su capacidad carcinogénica, siendo VPH16 y VPH18 los de mayor importancia debido a que se han encontrado en el 70% de los casos de CaCu (Clifford, 2006). De estos el VPH18 se ha relacionado a mayor agresividad, ya que la sobrevivida de las pacientes es menor, respecto a VPH16 y otros tipos virales (Lai *et al.*, 2007). Aunque VPH16 y 18 son los de mayor frecuencia a nivel mundial, en México existen ciertas diferencias con respecto a la frecuencia de estos a nivel mundial. En la población mexicana la prevalencia de VPH16 es del 56.8%, mientras que a nivel mundial es del 54.4%, la prevalencia de VPH18 en la población mexicana es de 10.7% y a nivel mundial es de 16.5%. La prevalencia del VPH31 en la población mexicana ocupa el tercer lugar con el 7.7%, mientras que a nivel mundial ocupa el sexto lugar con el 3.6%, como se puede observar en la figura 1.6 la cual muestra un comparativo de la distribución de los tipos de VPH en CaCu a nivel mundial y en México.

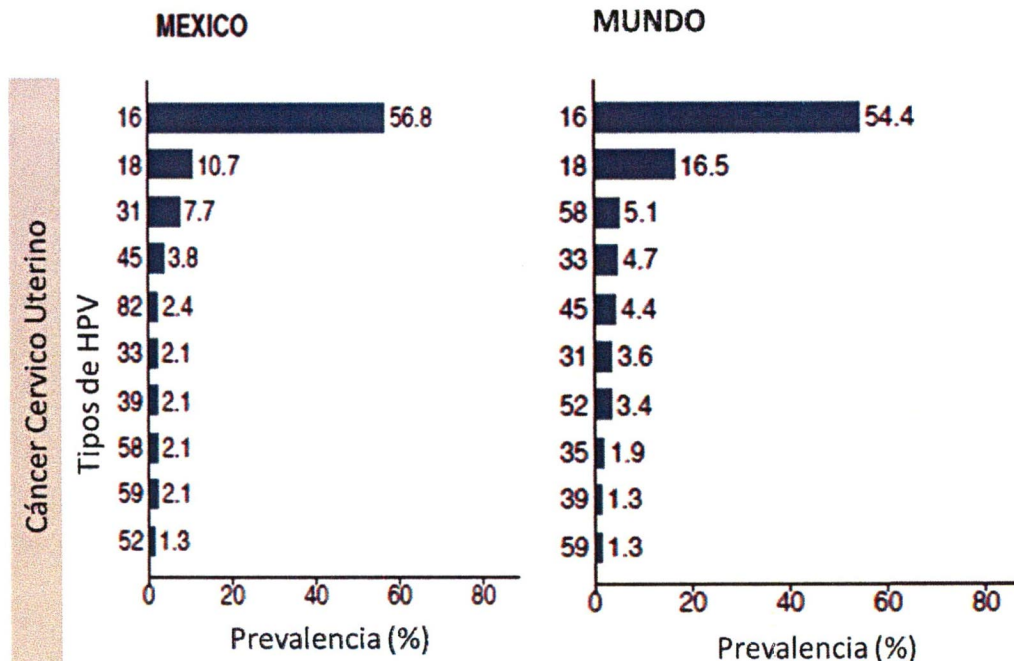


Figura 1.6. Distribución de los genotipos de VPH asociados a CaCu en México y a nivel mundial (Tomada y modificada de OMS, 2010)

Como se puede observar en la figura 1.6, existen ciertas diferencias en cuando a la frecuencia de VPH18, la cual es menor en México, así como una relativa alta frecuencia de VPH31 y 45, lo cual también depende de la región geográfica. Se ha mostrado que las pacientes con CaCu infectadas con VPH-AR 31, 35, 52 y 58 tienen una mayor sobrevida, respecto a las infectadas con VPH16 y/o 18 (Lai, 2007). Además de las diferencias clínicas de los VPH, también se han demostrado diferencias funcionales en los VPH-AR, ya que las proteínas E6 de estos tipos de VPH degradan con diferente eficiencia a proteínas tales como p53 (Hilles, 2006). Actualmente, la clasificación de los diferentes tipos virales se realiza por comparación de la secuencia nucleotídica del gen L1, una de las regiones más conservadas dentro del genoma viral. Un nuevo tipo viral se define cuando se identifica un nivel de variación mayor al 10% en la secuencia de L1 respecto a la secuencia de los tipos previamente clasificados, un subtipo entre el 10 y 2% y una variante menos del 2%. (Hans-Ulrich, 2005).

Los papilomavirus han cohabitado con la especie humana a lo largo de miles de años, sufriendo pocos cambios en su composición génica. El análisis de los genotipos de VPH resulta importante por distintas razones, dentro de éstas se encuentra que los VPH son tejido específicos y en general producen diferentes tipos de lesiones (Hans-Ulrich, 2005).

1.1.5 EPIDEMIOLOGÍA DEL VPH

Se especula que hace miles de años, cuando la especie humana evolucionó, los tipos de VPH ya existían con genomas muy parecidos a los de hoy en día. Las distancias genéticas entre los aislados virales evolucionaron en paralelo con los grupos étnicos humanos y con la dispersión de estos alrededor del mundo. Como consecuencia, ciertas variantes virales predominaron en grupos étnicos humanos definidos y aislados, como aquellos que colonizaron primero el continente americano hace unos 12 000 años.

En México los inmigrantes europeos se mezclaron con los nativos y hoy en día la población contiene las variantes virales específicas de cada grupo étnico. Todos los tipos virales hoy en día, tienen variantes genómicas y éstas difieren entre sí por 1-5% en su secuencia del ADN (Yamada, *et al.* 1997). Además de los factores de riesgo para la progresión a CaCu ya mencionados, las variantes virales intratipo podrían ser otro factor de riesgo importante, pues diversos estudios sugieren que estas difieren biológicamente en su potencial oncogénico (Xi, *et al.*, 1998).

Si bien se han clasificado 15 tipos de VPH como de alto grado, estos difieren en su capacidad carcinogénica, siendo VPH16 y VPH18 los de mayor importancia debido a que se han encontrado en el 70% de los casos de CaCu (Clifford, 2006). De estos el VPH18 se ha relacionado a mayor agresividad, ya que la supervivencia de las pacientes es menor, respecto a VPH16 y otros tipos virales (Lai *et al.*, 2007). Aunque VPH16 y 18 son los de mayor frecuencia a nivel mundial, existen ciertas diferencias en cuanto a frecuencia de otros tipos virales de acuerdo a la región geográfica. En nuestro país se han realizado algunos estudios enfocados a identificar los tipos virales (Tabla 3).

Tabla 3: Distribución de los tipos de VPH en CaCu en México

Estado de la República	Tipo de Virus del Papiloma	Tipo de lesión	N	Referencia
Morelos	102 positivas de alto riesgo con VPH:16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 y 68	Lesiones malignas genitales	274	Hernández Girón, 2005
San Luis Potosí	VPH tipo 16	CaCu	38	López-Revilla, 2009
Oaxaca	VPH tipo 6,11,16 y 18	Verruga genital anal	326	Secretaria de Salud,2009
Distrito Federal	VPH de tipo 16 y 18	CaCu	154	Adela Carrillo, M en C,2004
Distrito Federal	VPH de tipo 16	CaCu	181	Jaime Berumen, 2001.
Distrito Federal	VPH de tipo 16, 58 y 18	Lesiones de alto y bajo riesgo.	421	Piña-Sánchez, <i>et al</i> , 2006.
Yucatán	VPH 58	LIEBG y LIEAG	40	Gonzalez-Losa, <i>et al</i> , 2004.

El análisis de los genotipos de VPH resulta importante por distintas razones, dentro de éstas se encuentra el hecho de que los VPH son tejido específicos y que de manera general producen diferentes tipos de lesiones.

1.1.6 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VPH

Los virus del papiloma (VP) infectan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles (Hans-Ulrich, 2005).

El VPH es un virus relativamente pequeño de estructura icosaédrica, que no tiene envoltura lipídica y cuyo material genético es una molécula de ADN circular de longitud cercana a los 8000 pb. Su genoma puede dividirse en una región codificante con ocho genes que se transcriben en un ARNm policistrónico y una región no codificante. La región no codificante se conoce como LCR (del inglés Long Control Region) y tiene función reguladora ya que posee el sitio de origen de replicación, una región promotora (p97 en VPH16) y una secuencia intensificadora que controla la transcripción de los genes virales. Por su parte, la región codificante está dividida en dos regiones de expresión, temprana y tardía. Los primeros genes (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) están relacionados con la modulación de los procesos de transformación celular, replicación y transcripción viral. La región de expresión tardía contiene los genes L1 y L2 que codifican para las dos proteínas estructurales de la cápside (Figura 1.7).

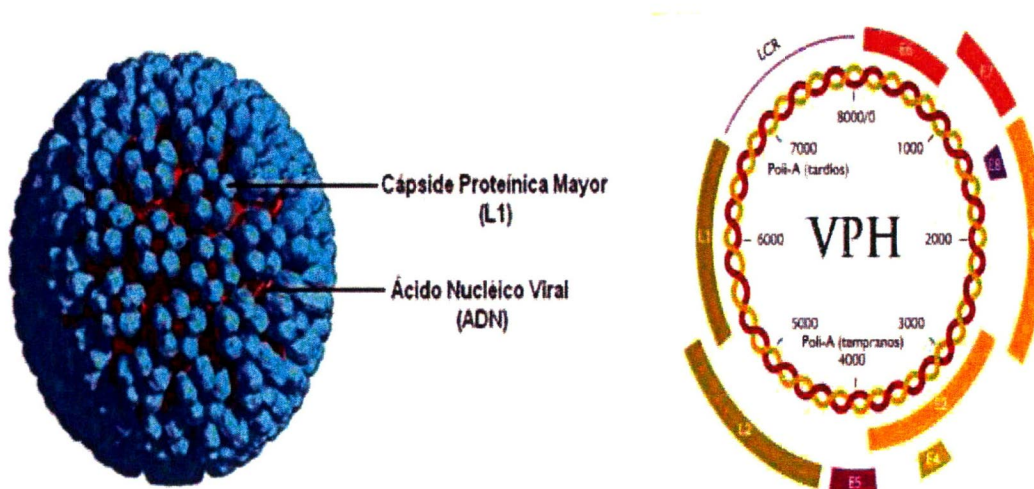


Figura 1.7. Estructura del Virus de VPH. A) Modelo tridimensional del VPH. B) Organización del genoma de VPH. (Fuente Taylor & Francis Books, 2004 (UK).

Tabla 4: Funciones de los productos génicos del VPH.

PROTEÍNAS VIRALES	FUNCIONES	TAMAÑO	Interacciones con proteínas celulares
TEMPRANAS			
E1	Replicación del ADN viral y mantenimiento episomal.	2000pb	Desconocida
E2	Transcripción viral y replicación, transformación.	1100pb	Proteína A, factor C, PCNA, factor IIA
E4	Se desconoce hasta el momento	260pb	Citoqueratinas
E5	Proteína transformante, inhibición de la degradación de EGFR	230-250pb	EGFR, ATPasa de H ⁺ , PDGF, p125
E6	Proteína transformante	450-500pb	E6-AP, E6-BP, p53
E7	Proteína transformante	300-320pb	p105RB, p107, p130, p300, AP-1, TBP, p33cdk2, ciclinaA
E8	Reprime la replicación viral y la transcripción	20kDa	Se une a E2 viral, formando E2 ^{E8}
TARDÍAS			
L1	Principales proteínas de la cápside	57kDa	Desconocida
L2	proteínas minoritaria de la cápside	43-53kDa	Desconocida

Tomada y modificada de Boulet G, 2007

El ciclo de vida del VPH está ligado al programa de diferenciación de la célula epitelial infectada, el queratinocito, pero la expresión de altos niveles de proteínas virales y el ensamblaje viral ocurre exclusivamente en los estratos superiores, es decir, en el estrato espinoso y en el epitelio granuloso del epitelio escamoso (Pett, 2006). Las células en la capa basal consisten en células troncales y células en tránsito que se están dividiendo continuamente y proveen un reservorio de células para las regiones suprabasales (Middleton, 2003). La infección de estas células por el VPH conduce a la activación de la expresión en cascada de los genes virales que provoca la producción de aproximadamente 20 a 100 copias extracromosómicas del ADN viral por célula. Este promedio de número de copias es establemente mantenido en las células basales indiferenciadas a través del curso de la infección (Middleton, 2003). La integración viral es más común que ocurra en las células que contienen este número de episomas. En los episomas, la expresión de genes virales es mínima y en particular, la expresión de los oncogenes E6 y E7 está bajo un control muy estricto de la LCR, y sus proteínas son discretamente detectables. Cuando el queratinocito infectado entra al compartimento de diferenciación, sale del ciclo celular, hay una regulación positiva de la expresión de los genes virales, ocurre la replicación del ADN viral y entonces el número de copias virales aumenta al menos a 1000 copias/célula, y se observa abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7 y de los genes tardíos (Figura 1.8) (Longworth, 2004). Las infecciones genitales por el VPH son transmitidas principalmente por contacto sexual, se considera que es a través de microabrasiones del epitelio que se expone a la infección viral a las células de la estrato basal (Alazawi, 2002).

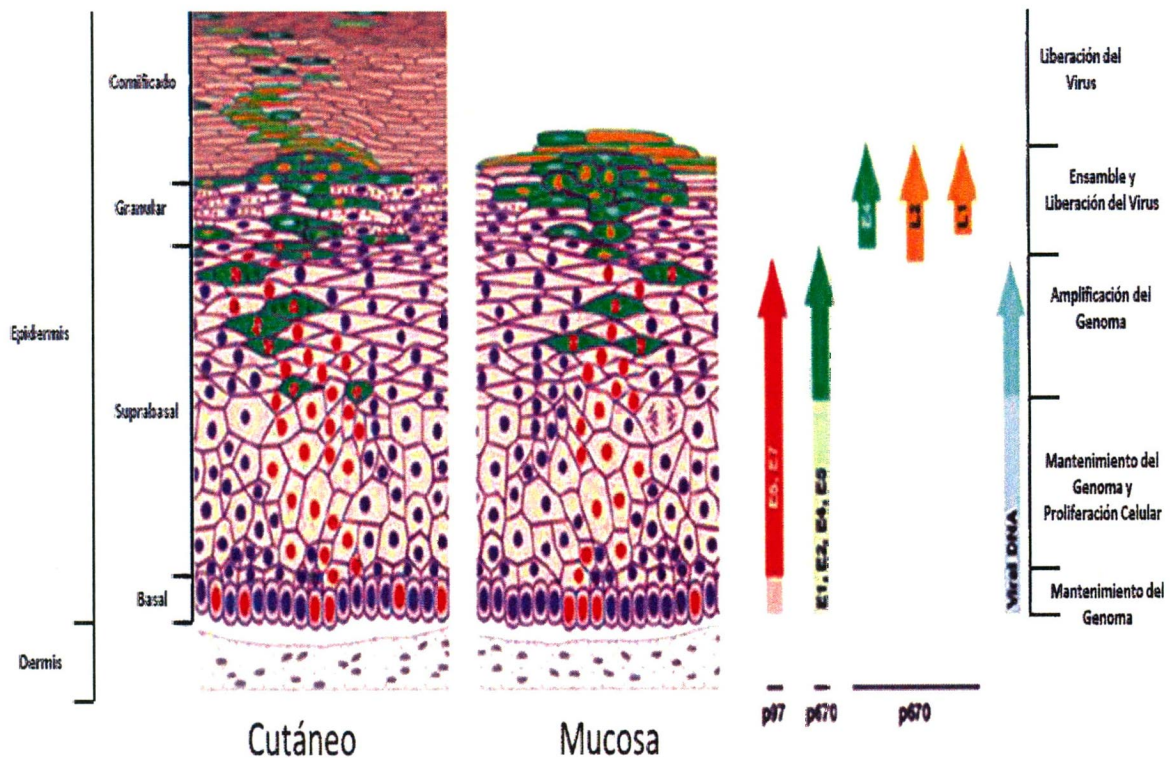


Figura 1.8. Ciclo de vida de VPH, ligado al programa de diferenciación de la célula huésped infectada. Los VPH infectan dos tipos de epitelios específicamente, el cutáneo y el de mucosas, en ambos epitelios infectados se puede detectar la presencia de las proteínas virales en diferentes estratos, la expresión de las proteínas virales va a depender del ciclo replicativo del virus (Tomada y modificada de Longworth, 2004).

1.1.7 INTEGRACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Los VPHs pueden encontrarse en el material cervical en forma de episomas, en formas integradas o en forma mixta lo cual quiere decir que contiene ambas. La integración del ADN viral usualmente está dada por una delección o alteración del gen viral regulador E2, de esta manera se mantiene un segmento variable que incluye a los oncogenes E6 y E7 y a la región LCR que se encuentra corriente arriba. La sobreexpresión de E2 por los factores de transcripción de la célula hospedera con el VPH-AR integrado, puede reprimir al promotor temprano del virus provocando una disminución drástica en la expresión de los genes E6 y E7.

Así, la integración del VPH-AR y la delección o alteración de E2 conduce al aumento de expresión de los oncogenes virales (Jeon, 1995). Las células que tienen integrado al VPH-AR adquieren una ventaja de crecimiento sobre las células que albergan episomas del VPH-AR (el estado natural del virus en infecciones productivas) y muestran un aumento de inestabilidad genómica (Jeon, 1959). La integración viral al genoma de la célula hospedera ocurre frecuentemente en la región de los genes E1 o E2 lo cual ocasiona ruptura del gen E2, que es un regulador negativo de la transcripción de los genes tempranos E6 y E7, lo cual provoca la expresión de los oncogenes E6 y E7. Los transcritos derivados del virus integrado son más estables que los derivados del ADN viral episomal, y la integración del VPH16 ha sido asociado con una ventaja de crecimiento selectiva en las células afectadas (Herdman, 2006). La prevalencia en células exfoliadas de cérvix o de tejido cervical de episomas o formas integradas del VPH o ambas, varía según el grado de severidad de la enfermedad, del tipo de VPH que se encuentre presente y del método utilizado para determinar el estado físico del virus (Evander, 1997). Se ha propuesto que la identificación de formas integradas del VPH podría ser un biomarcador muy útil para la enfermedad progresiva. Sin embargo, hay varios problemas con esta propuesta. Primero, la identificación del pequeño número de formas integradas sobre una base de formas episomales es un reto técnico cuando sólo están disponibles células exfoliadas para el análisis. Segundo, si los genomas integrados están transcripcionalmente silentes, o si se obtienen poco tiempo después de la integración, entonces su detección puede tener una utilidad pronóstica limitada (Bosch, 2002). Aunque las formas integradas se detectan en más del 40% de las mujeres con Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado, la transcripción activa de las formas integradas se ha reportado solamente en el 15% de las pacientes (Zur Hausen, 2002). La detección de transcritos derivados de virus integrados nos proporcionaría información pronóstica más útil. Sin embargo, se ha demostrado que en los queratinocitos cervicales a los cuales se integrará el virus, solamente puede haber transcritos después de que ocurra una disminución del número de episomas que

expresen E2 (Middleton, 2003). Esta pérdida del gen E2 en los episomas se asocia con la activación endógena de los genes antivirales aumentando la expresión de los oncogenes virales en las células que poseen las formas integradas (Bechtold, 2003). Una vez que el virus logra penetrar a la célula hospedera inicia la expresión de sus genes. Como ya se mencionó anteriormente los productos de los genes pueden ser divididos en tempranos (E) y tardíos (L), dependiendo del momento en que se expresan durante el ciclo de replicación viral. Las moléculas críticas son E6 y E7, las cuales inactivan funcionalmente los productos de dos genes supresores de tumores muy importantes, el gen p53 y Rb, respectivamente. Ambos oncogenes inducen la proliferación, immortalización y transformación maligna de las células infectadas (Jeon, 1995). (Figura 1.9).

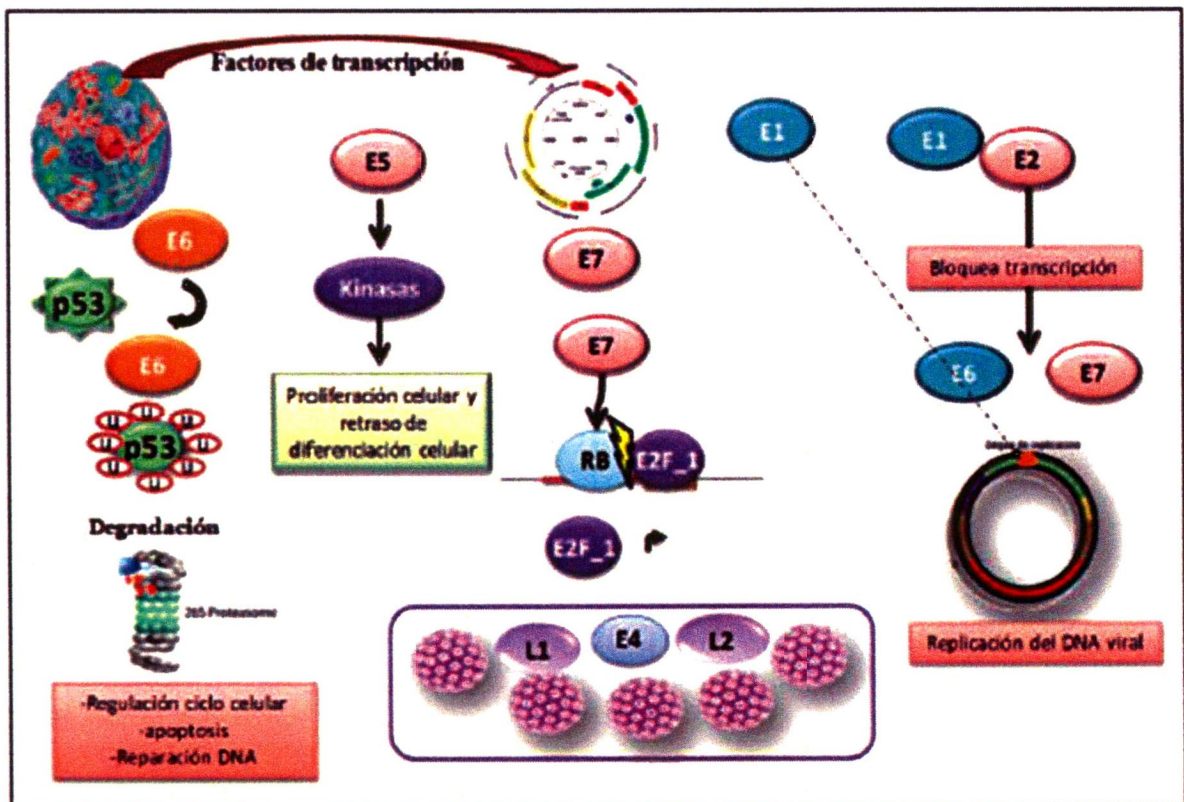


Figura 1.9. Patogenia de la infección por VPH. Acciones de las distintas proteínas codificadas por VPH. (Tomado de Ramón, 2013).

El genoma de VPH codifica una proteína para la replicación del ADN viral, la enzima E1 y además la proteína viral E2, fuera de ello, la replicación viral es totalmente dependiente de la maquinaria de síntesis del ADN celular. El problema para los virus es que las ADN polimerasas celulares y los factores de replicación sólo se producen en células con mitosis activa. Para resolver este problema, los virus codifican proteínas del ciclo de vida viral, que reactivan la síntesis de ADN celular en células diferenciadas, inhibiendo la apoptosis y retardando el programa de diferenciación del queratinocito infectado, creando un ambiente que es permisivo para la replicación del ADN viral (Wentzensen, 2004). Los detalles a fondo no son bien conocidos, pero los genes virales centrales para estas funciones son el E6 y el E7 (Moody, 2010). En esta estrategia de replicación el ADN viral se replica y el virus se ensambla en una célula que estaba destinada a morir por causas naturales; no hay citólisis inducida por el virus, no hay necrosis y de ahí que no induzca inflamación, lo cual dificulta la activación de las células dendríticas y del inicio de una respuesta inmune efectiva. Este virus no produce viremia, por lo que pasa desapercibido por el sistema inmune. Además, al igual que todos los ADN virales, tiene mecanismos para inhibir la síntesis de interferón por la célula hospedera. Estas estrategias virales generan infecciones crónicas por largos periodos de tiempo sin generar sintomatología en el hospedera (Pett, 2004). (Figura 1.10).

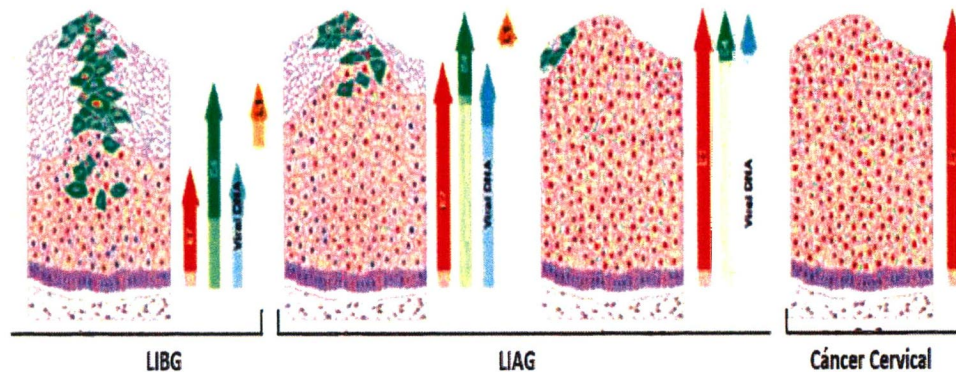


Figura 1.10. Cambios en el modelo de expresión que acompañan la progresión del cáncer cervical. (Tomada y modificada de Pett, 2004).

Las partículas infecciosas entran a las células basales o germinales a través de una abertura en el epitelio estratificado. Tal abertura puede ocurrir en condiciones donde la piel tenga alguna lesión o microtrauma. Para los VPH-AR como VPH 16, la formación de lesiones cervicales se facilita por la infección de células columnares que después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación. No se ha identificado un receptor de membrana definido para la entrada del virus, aunque el complejo integrina $\alpha 6 - \beta 4$ se ha propuesto como candidato. Además se ha visto que la entrada depende de la presencia de los proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana plasmática, que podrían ser el lugar de unión inicial previo al reconocimiento por el receptor (Hsieh, 1988). La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina (Pinto, 1999). El desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, lo que permitiría el transporte del ADN viral al núcleo de ésta (Brandsman, 1989).

Así entonces el mecanismo de acción de los VPH de alto riesgo en el desarrollo de la neoplasia cervical, se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales E6 y E7. Estas tienen la capacidad de immortalizar y transformar queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica. La expresión continua de estos genes, es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células del cérvix. Estudios del mecanismo molecular del proceso de transformación, han revelado un complejo patrón de interacciones de estas proteínas virales con reguladores celulares, involucrados en procesos biológicos como: apoptosis, proliferación y diferenciación celular (von Knebel, *et al.*, 2002). Se considera que el evento de integración del genoma del VPH al genoma de la célula hospedera es fundamental en la progresión a cáncer (Jayshree, *et al.*, 2009), debido a lo que hemos comentado de la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 por la pérdida de E2, proteína implicada en su regulación.

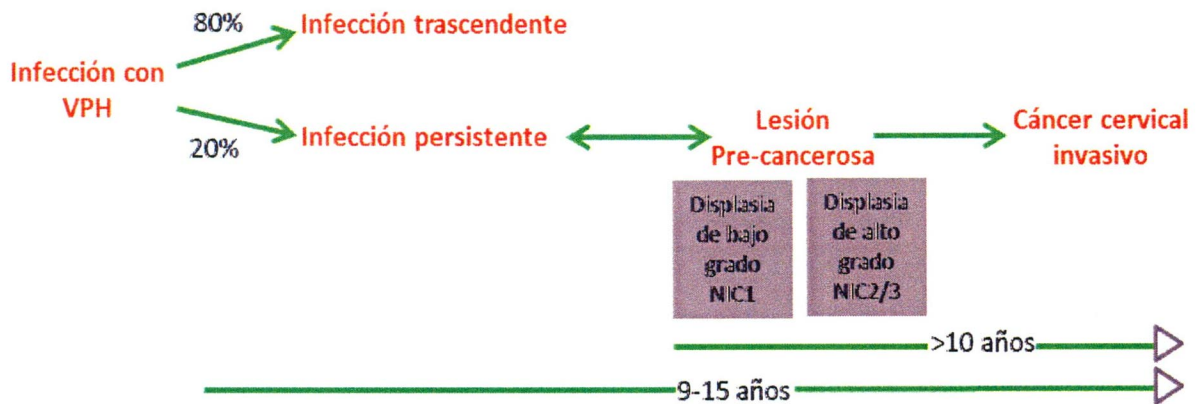


Figura 1.11. Mecanismos de VPH en la carcinogénesis. (Tomada y modificada Protocol, IARC,1997).

La figura 1.11 muestra de una manera esquemática algunos de los componentes principales de la transición de la infección por VPH a cáncer. Mientras que las infecciones subclínicas son en gran medida transitorias, la progresión está estrechamente relacionada con la persistencia del ADN viral. Este proceso se acompaña con frecuencia de un trastorno viral en las regiones E1/E2 y la integración en el ADN celular (Alberts *et al.*1994).

Numerosos estudios han abordado la estructura, el mecanismo de acción y el poder oncogénico de los diferentes tipos de VPH. Evidentemente, la influencia de un solo factor no transforma a una célula normal en una que prolifera sin restricción. Muchas evidencias indican que es necesario que sobre una célula sucedan de 3 a 7 eventos mutacionales independientes para que ocurra la transformación maligna (Alberts *et al.*1994). La infección por VPH parece ser la "causa fundamental" en la génesis del CaCu, sin embargo la contribución de otros factores de riesgo asociados a la etiología de los tumores en el cérvix no ha recibido la debida atención, teniendo en cuenta que sólo pocas mujeres infectadas con VPH desarrollan lesiones intraepiteliales de alto grado y carcinoma *in situ*. El CaCu continúa siendo, a nivel mundial la segunda causa de muerte por enfermedades malignas (Bosch *et al.*, 2002) por lo que el conocimiento exacto de

las bases moleculares de los factores de riesgo constituye un elemento esencial para lograr mayor entendimiento de la enfermedad.

1.1.8 FACTORES ASOCIADOS AL RIESGO QUE PREDISPONEN AL DESARROLLO DEL CaCu Y LA INFECCIÓN CON VPH

I. Relación de CaCu y Anticonceptivos orales

Ha sido reportado que el uso de anticonceptivos orales por más de 5 años es un cofactor que incrementa 4 veces el riesgo de padecer CaCu en mujeres portadoras de VPH (Bosch *et al.*, 2002). Otro hallazgo de las investigaciones epidemiológicas expone que tras un diagnóstico de displasia, en aquellas mujeres que consumen anticonceptivos orales, la progresión a carcinoma *in situ* es más rápida (Moreno *et al.*, 2002). Existen varios mecanismos por los cuales las hormonas sexuales (estrógeno y progesterona) pueden catalogarse como factores que favorecen los efectos celulares de la persistente infección por el VPH. Uno de ellos es que en ausencia de hormonas, el receptor para estas es inactivo y se localiza en el núcleo de la célula blanco como un gran complejo molecular asociado a muchas proteínas de choque térmico (Edward *et al.*, 2000).

Cuando la hormona se une a su receptor, se produce un cambio conformacional que provoca la dimerización del receptor, adquiriendo capacidad de unión a secuencias específicas de ADN (Edward *et al.*, 2000). Existen regiones de regulación de la transcripción del ADN viral que contienen elementos de reconocimiento a hormonas (Von Knebel, *et al.*, 1997) y que aumentan el nivel de expresión de 2 genes virales el E6 y el E7 (Bosch *et al.*, 2002).

Otro mecanismo descrito es la acción sobre determinados genes asociados a la regulación del ciclo celular y al programa de muerte celular. Estas hormonas inhiben la transactivación transcripcional mediada por p53 de genes involucrados en el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Edward *et al.*, 2000).

También los esteroides inhiben la efectiva respuesta inmunológica contra las lesiones inducidas por VPH, particularmente a través de la inhibición de la expresión del MHC I y II, moléculas encargadas del reconocimiento y presentación de péptidos virales (Von Knebel, y *et al.*, 1997).

II. Relación de CaCu y Tabaco

El tabaquismo se ha asociado con la presencia de carcinomas de célula escamosa, predominante en el CaCu, el de pulmón y el de laringe. Se ha propuesto la hipótesis de que los carcinógenos procedentes del consumo del tabaco (nicotina y cotina), al ser transportados por el sistema circulatorio y llegar al epitelio cervical, puedan iniciar o actuar como co-carcinógenos en las células ya afectadas por agentes transformantes posiblemente por transmisión venérea como el VPH (Edward *et al.*, 2000).

Otro mecanismo atribuido a este factor para explicar su efecto en el CaCu, es la inducción indirecta de inmunosupresión y la reducción de antioxidantes provenientes de la dieta.

Sin embargo, actualmente se le da una importancia moderada a este factor pero se acepta que, junto a otros, aumenta 3 veces el riesgo de padecer la enfermedad comparado con las mujeres no fumadoras (Acladious *et al.*, 2002) y se ha reportado que existe una fuerte relación dosis-riesgo (Deacon *et al.*, 2000).

III. Relación de CaCu, dieta y factores nutricionales

El estado nutricional puede influir en la progresión de la infección por VPH. El patrón de metilación del ADN del VPH *in vitro* se ha asociado con la actividad transcripcional viral pues la ARN polimerasa, enzima encargada de la transcripción, se une con menos afinidad al ADN metilado (Rawn, 2008). Se conoce que los genes metilados ("imprinting" genómico) son inactivos, mientras que los no metilados o hipometilados pueden ser transcritos para generar un producto proteico. La pérdida del "imprinting" en los fenómenos de

carcinogénesis podrían vincularse con factores fisiológicos, ambientales y dietéticos, que poseen la capacidad de metilar al ADN (Gómez *et al.*, 1998), así el folato, la vitamina B6, la vitamina B12 y la metionina pueden tener su mecanismo de acción en la prevención del CaCu a través de su papel en la metilación (Shannon *et al.*, 2002). De igual forma si hay bajo nivel de metilación también se pueden presentar enfermedades. Estudios recientes han mostrado que la metilación es un mecanismo de defensa entre virus y parásitos para evitar que logren dañar su ADN (Mark, 2012).

IV. Factores genéticos que favorecen el CaCu

Aunque el VPH es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCu, sólo pocas mujeres infectadas desarrollan la enfermedad. La susceptibilidad genética a la infección por el VPH parece ser importante para determinar el riesgo de la infección para el desarrollo del cáncer (Magnusson *et al.*, 2002). La habilidad de ciertos haplotipos de HLA es predisponente a aumentar la susceptibilidad a la iniciación y persistencia de la infección por VPH y, por consiguiente, al desarrollo de CaCu (Magnusson *et al.*, 2002).

V. Inmunosupresión

La respuesta inmune está considerada como un potente mecanismo de resistencia al desarrollo de tumores, desde la fase de iniciación hasta el crecimiento y progresión de los mismos (van Driel *et al.*, 1999). La infección viral es común en pacientes con supresión o defectos en el Sistema Inmune demostrado por linfopenia, con la relación linfocitos B/ linfocitos T, migración espontánea y quimiotaxis de neutrofilos disminuida (Rossen, 1996). Un ejemplo evidente ha sido demostrado en pacientes infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana las cuales muestran un incremento en la incidencia de lesiones intraepiteliales escamosas, debido al deterioro de las células y de los mecanismos de la respuesta inmune dirigidos contra la progresión de la enfermedad. Además, el comportamiento de los mecanismos efectores de la respuesta inmune en

pacientes con CaCu, varían según el estadio y el tipo de VPH que infecta (Jastreboff *et al.*, 2002).

1.1.9 RESPUESTA INMUNE CONTRA LA INFECCIÓN POR EL VPH Y CaCu

La regresión de las lesiones inducidas por VPH está acompañada de una reacción característica de hipersensibilidad retardada dependiente de linfocitos T auxiliares (Th) de acuerdo con lo publicado por la Agencia Internacional para Investigaciones sobre el Cáncer, 1997.

Se ha informado la existencia de un desbalance en el patrón de interleucinas producidas por las células T donde se afecta el patrón Th1 y se detecta disminución en los niveles de interferón gamma y un aumento de la interleucina 10 (IL-10), que corresponde con el patrón Th2. Estas alteraciones inducen trastornos en la secuencia de eventos necesarios para que la respuesta inmune, tanto humoral como celular, sea efectiva (Clerici *et al.*, 1998). Durante la invasión y metástasis del tumor, ocurre entrecruzamiento de las células tumorales, las células del hospedero y la matriz extracelular por unión e interacción con la membrana basal y la matriz extracelular y proteólisis local. La penetración de las células tumorales focaliza la actividad proteolítica en la superficie celular a través de receptores para la plasmina y el activador del Plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA). El receptor de las células tumorales para u-PA, denominado u-PAR, une u-PA liberados de las células tumorales cercanas, esta unión u-PA/u-PAR focaliza la acción proteolítica de la superficie de las células tumorales. La u-PA convierte al plasminógeno en plasmina, la plasmina degrada proteínas de la matriz extracelular facilitando la proliferación de las células del tumor, invasión y metástasis (Andreasen, 1997). La acción proteolítica del u-PA es controlada por sus inhibidores, el Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y el tipo 2 (PAI-2) los cuales pueden unirse a la superficie de la célula asociado al complejo u-PAR/u-PA formando un complejo trimérico enzimáticamente inactivo (receptor-

proteasa-inhibidor) el cual es internalizado por las células del tumor (Costantini, 1996).

Al parecer la proteasa u-PA y el inhibidor PAI-1 están presentes en el tumor para lograr limitar la proteólisis mediada por el receptor de u-PA. La internalización y reciclaje de u-PAR puede restaurar la actividad proteolítica asociada a la superficie celular. Otras proteasas conocidas como catepsinas y metaloproteasas se han visto involucradas en la invasión y metástasis tumoral interactuando con el u-PA en una cascada (Janicke, 1991). Estudios clínicos han demostrado que en general los tumores elevan los niveles antigénicos de u-PA, u-PAR y/o PAI-1, pero disminuye los niveles de PAI-2, esto está asociado a la severidad de la enfermedad y conduce a extensión y metástasis del tumor. La determinación de los factores proteolíticos son de importancia en la clínica para definir pacientes de alto riesgo afectados con tumores malignos (Andreasen, 1997).

1.1.10 RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN POR VPH

La infección producida por el virus del papiloma humano (VPH) representa un problema de salud importante en la población femenina mexicana. Los papilomavirus humanos oncogénicos (VPHs) representan el agente causal primario del CaCu y están íntimamente asociados con un subgrupo de cánceres vulvares, anales y penianos. Aunque se han identificado más de 200 de genotipos diferentes, se ha identificado como oncogénico el VPH tipo-16 (VPH 16) y está presente en más de 90% de los cánceres cervicales, se sabe que está íntimamente asociado con el desarrollo de lesiones precancerígenas denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC), así como con el CaCu. La respuesta inmune innata contra el VPH es la primera línea de defensa contra el virus, ésta incluye el reconocimiento a través de “receptores del reconocimiento de patrones” (RRP), específicamente los “Toll-like receptos” (TLRs) que inician vías de señalización para inducir la expresión de genes que codifican para moléculas involucradas en

la respuesta inflamatoria y en el cambio de clase de las inmunoglobulinas (Aragón *et al.*, 2010)

Uno de los eventos claves de la carcinogénesis es la integración del genoma del VPH en los cromosomas del hospedero. La integración del genoma de VPH frecuentemente ocurre cerca de sitios frágiles del genoma humano, (Thorland, 2003) pero no aparecen en “puntos calientes” para su integración y no se evidencia para la mutagénesis insercional (Ziegert, *et al.*, 2003). La expresión de los genes virales E6 y E7 es consistentemente mantenida, mientras otras porciones del ADN viral son deletados o su expresión está detenida (Baker, 1987). La pérdida de la expresión del represor transcripcional E2 de VPH es significativa y puede resultar en una desregulación de la expresión de E6 y E7. La expresión de los genes de alto riesgo E6 y E7 en queratinocitos primarios humanos facilita su immortalización. La proteína E7 de alto riesgo interactúa con pRB (retinoblastoma) más eficientemente que E7 codificada por VPH de bajo riesgo. E7 de alto riesgo tiene la única capacidad de desestabilizar el “bolsillo” de las proteínas a través del mecanismo dependiente de los proteasomas que es crítico para la transformación celular (Aragón *et al.*, 2010).

La proteína E6 interfiere con el sistema inmune para evitar el reconocimiento de células infectadas y con esto facilitar la supervivencia del virus y evitar su eliminación. E6 interactúa con el factor regulador de interferón (IRF-3) (Medzhitov, *et al.*, 1997). Cuando las células infectadas son detectadas por el sistema inmune, el IRF-3 induce su progresión a apoptosis, cuando E6 se une al IRF-3, evita su activación y su capacidad para inducir la muerte celular.

Por otro lado, se ha reportado que la oncoproteína E6 es capaz de inhibir la transcripción de genes que codifican para receptores involucrados en la transducción de señales inducidas por el reconocimiento de patógenos como son los TLR (Fearon *et al.*, 1996). Estas interacciones de E6 con las diferentes proteínas del sistema inmune, dan como resultado en una inhibición de la

apoptosis y una persistencia del virus en la célula hospedera, aspecto importante en la tumorigénesis celular.

El sistema inmune ha sido tradicionalmente dividido en un componente innato y adaptativo, cada uno con diferentes funciones. El componente adaptativo está organizado en dos clases de células especializadas, linfocitos B y linfocitos T. En general, la respuesta inmune en las mucosas a la infección comienza con las células de la epidermis, específicamente los queratinocitos, que secretan señales de alarma, las cuales actúan sobre células del sistema inmune y también sobre las células infectadas. Estas señales de alarma son las quimiocinas, citocinas, moléculas de adhesión y proteasas, las primeras, dirigen la migración de monocitos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, natural killers (NK), células dendríticas (CDs) y células endoteliales, mientras que los interferones (IFNs) inhiben la replicación viral dentro de las células infectadas (Aragón *et al.*, 2010).

Sólo un pequeño porcentaje de mujeres infectadas desarrolla CaCu. Se requieren de eventos adicionales para la progresión, tales como la integración viral y otras mutaciones que reflejan la inestabilidad genómica originada por la expresión de E6 y E7. El sistema inmune es capaz de limitar la enfermedad a través de la eliminación de lesiones preexistentes como se evidencia a través de la mayoría las infecciones de VPH-16 y la elevada incidencia de cánceres relacionados a VPH en individuos inmunocomprometidos. Las numerosas estrategias de señuelo empleadas por el virus para escapar de la vigilancia del sistema inmune son importantes para la persistencia viral y progresión del cáncer. Sólo la mitad de los pacientes con CaCu generan inmunoglobulina G (IgG) cápside específica. Los anticuerpos neutralizantes son mediadores críticos de la inmunidad a los retos microbianos. Éstos pueden ser rápidamente generados a través de mecanismos células Th CD4+ independientes o más despacio como la respuesta inmune adaptativa. El reconocimiento innato de los “patrones moleculares asociados al patógeno” (PAMPs) se da vía célula presentadora de antígeno (CPA) a través de las CDs, expresando moléculas coestimuladoras y secretando citocinas. Estas

señales provenientes de la CDs pueden dirigir la polarización de las células CD4+ vírgenes Th tipo 1 y tipo 2 hacia el fenotipo Th1 o Th2 (Kapsenberg *et al.*, 2003).

Las células Th1 producen interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que dirigen a las células B a producir IgG2 antígeno-específica, mientras las células Th2 expresan interleucina-4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 9 (IL-9) e interleucina 13 (IL-13) para promover el cambio de clase de IgG1 e IgE. El factor estimulante de los linfocitos B, miembro de la superfamilia del TNF y un “ligando de la inducción de la proliferación” (conocido como APRIL), expresados por monocitos y CDs también regulan el “cambio de clase de las inmunoglobulinas” (abreviado como CSR) (Kapsenberg *et al.*, 2003).

El interferón α (IFN- α) induce la expresión de moléculas coestimuladoras sobre la superficie de CDs (Kapsenberg *et al.*, 2003). Sin embargo, en la ausencia de las células T CD4+, ciertos antígenos inducen células B antígeno-específicas, a esta respuesta se le denomina “inmunidad humoral independiente de las células Th. Esta respuesta la proporciona el hospedero con la especificidad del sistema inmune adaptativo y la rapidez de la inmunidad innata, estableciendo una producción rápida de anticuerpos neutralizantes. Varios virus, como el virus de la estomatitis vesicular poliomavirus y rotavirus han mostrado ser independientes de las células Th en la generación de anticuerpos neutralizantes.

Rongcun Yang *et al.*, demostraron la importancia del ensamblaje de la cápside y el reconocimiento inmune de múltiples mutaciones en los otros residuos estructurales altamente conservados presentes dentro de la secuencia de la partícula L1 de VPH-16 L1, proveniente de un subgrupo de carcinoma cervical y de NIC de alto grado, identificaron varios mutantes VPH-19 L1 transportando genes que codifican proteínas que no activan la respuesta inmune innata y adaptativa dependiente de VLP, organizada a través de las CDs. Esto puede representar evasión del reconocimiento inmune innato durante la carcinogénesis del CaCu (Rongcun Yang *et al.*, .)

Las células B B1 localizadas en la zona marginal se consideran protagonistas de una función importante en la respuesta humoral independientes de las células Th. Recientemente se ha sugerido que los TLRs protagonizan una función en los eventos de señalización en las células B1 y la respuesta inmune independiente de las células T. La estructura génica, altamente ordenada, bien empaquetada de la proteína VPH-16 L1 VLP induce tanto altos títulos de anticuerpos protectores y una potente respuesta inmune mediada por células. Se sabe que IL-12 e IFN- γ promueven la polarización Th1, mientras IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y el factor de crecimiento de granulocitos (G-CSF) están asociadas con la respuesta Th2 (Neurath, *et al.*,2002). Estudios recientes han demostrado que las proteínas de VPH-16 se unen a las CDs y estimulan su maduración, incluyendo la sobrerregulación de complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II), CD80, CD86, y CD40 y la producción de citocinas. Rougcn Yang *et al.*, demostraron a través de un análisis de expresión génica global que VPH-16 VLPs activan diferentes subgrupos de CDs esplénicas para producir respuestas polarizadas, además encontraron que las CDs, CD4+CD11C+ sobrerregulan la transcripción de IFN- α y citocinas relacionadas a Th2; además de quimiocinas, mientras el IFN- γ y las citosinas Th1 y las quimiocinas son producidas por las CDsCD8+CD11C+ en respuesta a VPH-16 VLPs. IFN- α pero no IFN- γ aumentan la señalización mediada por la producción de Ac VLP-específica y particularmente el cambio de clase de IgG2a. La producción de tal respuesta opuesta a un único Ag sugiere un linaje de CD especializada la cual predetermina la polarización. Esta respuesta a través de CDs especializadas es crucial para el control de patógenos invasores antes de la inmunidad adaptativa. Dos genes en los VPH de alto riesgo están asociados con el potencial para transformar las células infectadas. La expresión de E6 está inversamente correlacionada con la expresión de interleucina-18 (IL-18), una citocina proinflamatoria similar a IL-1 que induce la producción de IFN- γ . E6 y E7 desrregulan la expresión de IL-8, un quimoatrayente para las células T. También

suprimen la expresión de la quimiocina llamada proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Huang, *et al.*, 2002).

Así, E6 y E7 contribuyen al escape de propiedades antivirales y antiproliferativas, del TNF- α e IFN- α a través de efectos estimuladores de crecimiento, e interaccionan con componentes de las vías de señalización del IFN (Scott, *et al.*, 2001). Posterior a la infección, las quimiocinas secretadas por la epidermis inician la respuesta inmune adaptativa a través del reclutamiento de CD8. La principal proteína de la cápside del virus, L1, se autoensambla para formar una partícula parecida al virus llamada "cápsides vacías" (VLPs) que son morfológica e inmunologicamente muy parecidos a los viriones nativos, pero carecen del genoma viral oncogénico. Los VLPs presentan un alto ordenamiento y una estructura muy empaquetada que generan altos títulos de anticuerpos protectores y además la respuesta inmune celular. La vacunación con VPH-16 L1 VLPs induce la respuesta inmune humoral vía Th1, que protege a la mujer de la adquisición de la infección por VPH-16 y la neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Además, la inmunogenicidad de los antígenos propios o poco extraños esta aumentada, a través de la fusión con VLPs (Chackerian, *et al.*, 2002).

Las células de Langerhans (CLs) son las CD8 que residen en la epidermis además de las CLs inmaduras, eficientes para la presentación de antígenos, monitorizando el microambiente epidérmico para el daño e infección. Las CLs maduran a través de la regulación diferencial de marcadores de superficie hacia áreas de células T del organismo, como los vasos linfáticos de la dermis u órganos linfoides periféricos. Aunque se ha demostrado que las CLs se mantienen en la piel por largos periodos de tiempo, los precursores de las CL se reclutan bajo condiciones de pérdida local de CLs como ocurre durante la inflamación (Guess, *et al.*, 2005).

La respuesta inmune innata es la responsable del primer contacto con partículas extrañas. Las células Th1 promueven respuestas proinflamatorias que activan a los macrófagos y proporcionan apoyo a las células T citotóxicas CD8+. En

contraste, las células Th2 proporcionan ayuda para la producción de anticuerpos por las células B y secretan ciertas citocinas, tales como la interleucina 10 (IL-10), que antagonizan la respuesta Th1. Los receptores del sistema inmune innato que son codificados en la línea germinal. Están expresados en varias células efectoras del sistema inmune innato, de manera más importante sobre macrófagos, células dendríticas y células B. La expresión de los “receptores de reconocimiento de patrón” (PRR) no es clonal para los receptores presentes en un solo tipo de células (p.e. macrófagos). Desde que se identificaron los PRR, las células efectoras son estimuladas para llevar a cabo sus funciones efectoras inmediatamente después que han proliferado. Estructuralmente los PRR, pertenecen a varias familias de proteínas, dominios de repetición ricos en leucina y dominios de proteínas de receptor “scavenger”, están involucrados en el reconocimiento (Guess, *et al.*, 2005). De acuerdo a Guess, y colaboradores en el 2005, existen tres clases de PRRs de acuerdo a su funcionalidad:

- 1) PRR secretorios; los cuales funcionan como opsoninas a través de la unión de la pared celular microbiana y marcándolos para el reconocimiento del sistema del complemento y la fagocitosis.
- 2) PRR endocíticos; estos son receptores que median la presentación y liberación de los patógenos hacia los lisosomas, donde son destruidos. Las proteínas derivadas de los patógenos pueden ser entonces procesadas y el péptido resultante puede ser presentado por las moléculas del MHC en la superficie de los macrófagos.
- 3) PRR de señalización; los cuales inducen la expresión de una variedad de genes de la respuesta inmune, incluyendo las citocinas inflamatorias. Las CPAs y especialmente las DCs emplean PRRs en la detección de agentes infecciosos, incluyendo la familia Toll. Los receptores recientemente identificados de la familia Toll, tienen la función principal de la inducción de la respuesta inmune e inflamatoria.

La respuesta inmune mediada por linfocitos T hacia los antígenos del VPH, está restringida por el complejo principal de histocompatibilidad. De ahí que ciertos fenotipos de HLA correlacionen con una respuesta inmune efectiva contra el VPH. Ya que el complejo mayor de histocompatibilidad juega un papel importante en erradicación viral, así como en la vigilancia inmune contra ciertas neoplasias, alguna asociación entre HLA y cáncer cervical o lesiones precancerosas, podría significar una relativa inhabilidad de erradicar la infección, o una relativa inhabilidad de proveer vigilancia inmune contra el tejido displásico. La expresión de las moléculas de HLA se ve alterada de muchas maneras en células cervicales cancerosas. Se han reportado además diferencias en las frecuencias de algunos alelos de HLA de clase II en pacientes con NIC II y III que no portaban infección por VPH. Varios alelos y haplotipos HLA de clase II han sido descritos asociados a susceptibilidad a cáncer cervical e infección por VPH. Sin embargo, los reportes de asociaciones entre polimorfismos de HLA y carcinoma cervical han sido controversiales (Guess, *et al.*, 2005). En muchos casos estos estudios se centran solamente en la detección de VPH-16 (Guess, *et al.*, 2005).

En algunos casos una mayor prevalencia de un alelo en particular está asociada a estar o no infectado más que a un estadio histológico. Lo cual tienen mucho sentido si pensamos que mujeres portando el alelo en cuestión son incapaces de montar una respuesta inmune

Aspecto inmunológico de la infección por papilomavirus humano apropiada contra el virus, lo que las predispone al desarrollo de cáncer cervical. Por otro lado el no hallar una asociación estadísticamente significativa entre un alelo previamente reportado, puede deberse tan solo a una baja prevalencia de éste en la muestra poblacional estudiada.

Las moléculas de HLA de clase II influyen en la respuesta inmune a epítopes específicos del virus. Un alelo en particular, que se encuentre en mayor proporción en sujetos infectados significa que otorga susceptibilidad para dicha infección. La

mayoría de los estudios que reportan asociaciones de neoplasia cervical con alelos del complejo de histocompatibilidad, han sido realizados en población caucásica europea. Los reportes provenientes de Latino-américa han sido hechos mayormente en población mestiza, que por llevar aún consigo una serie de alelos caucásicos dan resultados acordes con aquellos de mujeres europeas. Sin embargo en países andinos la situación puede ser un tanto diferente. En el vecino país de Bolivia, donde la carga indígena andina de la población es importante, he reportado recientemente la asociación de un alelo de HLA de clase II (HLA-DRB1*1602) con infección por VPH. Este es un alelo típico Amerindio, infrecuente en otras poblaciones, incluso en Mestizos. Existen muchos indicios de que el fondo genético confiere susceptibilidad a la infección por determinados genotipos. Ya que el sistema inmune está genéticamente determinado, es importante investigar si determinados grupos étnicos son en realidad más susceptibles. De hecho se ha observado ya variación entre grupos étnicos, de cofactores de la infección por VPH, tales como el uso de anticonceptivos orales, o fumar. Se ha observado además que mujeres hispánicas en los EEUU, en comparación con mujeres no hispánicas, tienen un riesgo mayor de desarrollar displasia cervical. La identificación de grupos susceptibles a la infección, ayudará en el diseño de vacunas efectivas contra el virus para las poblaciones que más lo necesitan. El cáncer cervical debe verse como una enfermedad prevenible. El desarrollo de una vacuna efectiva contra el VPH podrá prevenir las condiciones pre-malignas y malignas asociadas con esta infección (Aragón *et al.*, 2010).

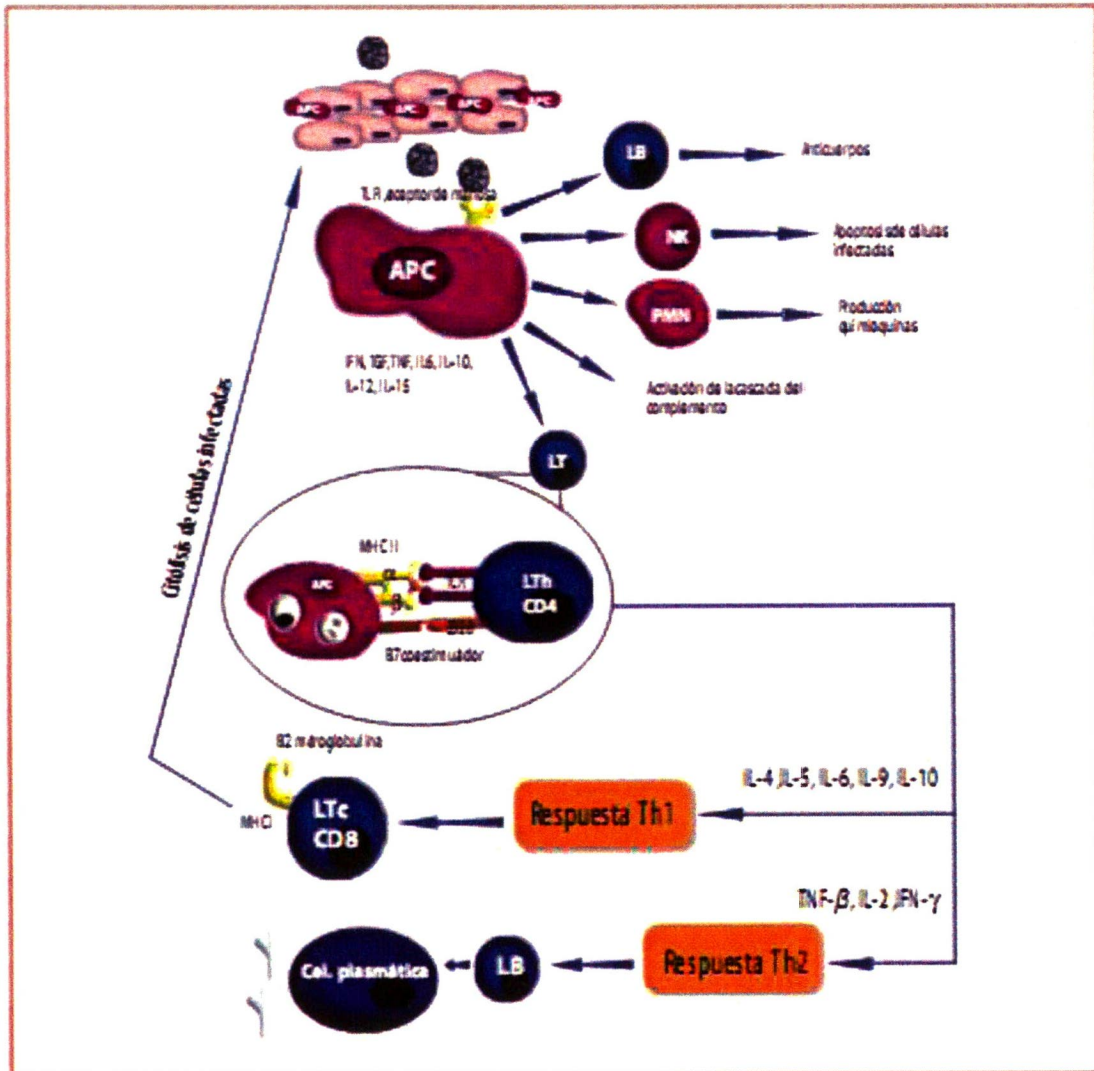


Figura 1.12. Respuesta inmune en la infección por VPH (Rincón, et al. 2007)

Aun cuando en personas jóvenes la infección por VPH es muy frecuente, la mayoría de las mujeres infectadas resuelven la infección espontáneamente (alrededor del 90%), persistiendo solo en una pequeña fracción de la mujer (Aragón *et al.*, 2010). Es este grupo de acarreadoras crónicas de VPH de alto riesgo quienes presentan un riesgo incrementado de desarrollar lesiones del tracto anogenital. Algunos determinantes que han sido asociados a la progresión de las lesiones son: tipo viral y variaciones intra-tipo de VPHs de alto riesgo, integración

del genoma viral al celular y probablemente carga viral. Otros factores adicionales incluyen la alta paridad, tabaquismo y dieta pobre en vitaminas y minerales. Muchos tipos de VPH inducen solamente lesiones productivas y no se asocian a cáncer humano. En dichas lesiones, la expresión de los productos de los genes virales se encuentra cuidadosamente regulada, de modo que las proteínas virales se expresan en momentos definidos y en cantidades controladas a medida que la célula infectada migra hacia la superficie epitelial. Los eventos que dan lugar a la producción de partículas virales en las capas superiores del epitelio, parecen ser comunes tanto en virus de alto como de bajo riesgo oncogénico. De esta manera, el cáncer es una consecuencia poco frecuente de la infección por VPH y los eventos iniciales que conducen a la transformación maligna por virus oncogénicos no están del todo esclarecidos. Una posibilidad es que la zona de transformación del cérvix es un sitio del epitelio donde los VPH de alto riesgo no logran regular apropiadamente su ciclo productivo; por lo tanto, la variación tanto en el nivel de expresión de las proteínas virales, como del momento en que esta expresión ocurre, puede repercutir en el desarrollo de cánceres en estos sitios (Huang, *et al.*, 2002).

Después de una infección natural solo la mitad de las mujeres desarrollan anticuerpos contra VPH detectables, los cuales probablemente no son protectores. Los VPH infectan el epitelio cervical sin entrar en la circulación, por lo que las partículas no se exponen eficazmente al sistema inmune. Como resultado, la vigilancia inmunológica típica, que involucra el tráfico de células especializadas desde el sitio de la infección hasta órganos linfoides secundarios, se encuentra limitada o abatida. Aunado a esto, una vez dentro de la célula, la partícula del papilomavirus puede utilizar múltiples mecanismos para abatir la respuesta inmune que es necesaria para la eliminación de la infección (Aragón *et al.*, 2010).

Los papilomavirus humanos también pueden alojarse de forma latente en las células epiteliales, evadiendo detección por el sistema inmune y permitiendo una reactivación futura. Actualmente, solo hay evidencias indirectas de las infecciones

latentes de VPH en humanos, pero se especula que aun cuando el VPH no pueda ser detectado en una muestra en un momento dado, permanece la posibilidad de que el virus se encuentre en forma latente. La reactivación de infecciones latentes de VPH se ha reportado en pacientes inmunocomprometidos (Huang, *et al.*, 2002). La historia natural del cáncer cérvico uterino implica la progresión gradual de una serie de etapas secuenciales en que las células del cérvix presentan ciertas anormalidades histológicas conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical, NIC I (displasia leve), NIC II (displasia moderada), NIC III (displasia severa/carcinoma in situ) y finalmente un cáncer invasor. La etiopatogenia de esta enfermedad se ha investigado detalladamente gracias al avance de la biología celular, molecular e inmunología. Estos avances han permitido conocer el papel del virus del papiloma humano en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino.

La infección por el virus de papiloma humano se puede clasificar en: primero una infección latente, que se caracteriza por la presencia de VPH en las células o tejidos que son aparentemente normales y sin ninguna manifestación de enfermedad. Sin embargo el virus está ahí y en ocasiones puede ser detectado por técnicas específicas como Hibridación in situ o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente la infección subclínica se manifiesta por cambios microscópicos en el epitelio cervical (coilocitos, displasias) detectados en las citologías o cortes histológicos de los tejidos afectados. La presencia de VPH en este punto se puede verificar mediante el uso de un colposcopio que evidencia cambios de coloración en el cuello uterino después de aplicar una solución de ácido acético; estos cambios se asocian a la infección con VPH y una posible lesión premaligna. Finalmente la infección clínica se manifiesta por la aparición de tumores visibles y es en esta etapa donde podemos encontrar gran cantidad de tejido positivo para VPH. Estos virus se encuentran viables y con capacidad de infectar otros tejidos. Sin embargo, no siempre la enfermedad se manifiesta durante esta última etapa ya que varios casos llegan a permanecer en periodo de latencia o subclínico, tiempo durante el cual se puede adquirir un estado de

resistencia o regresión de las lesiones, o bien de progresión hacia un cáncer invasor (Huang, *et al.*, 2002).

Numerosos estudios han demostrado que la infección persistente con VPH parece ser de suma importancia en el desarrollo y avance de lesiones precancerosas a cáncer invasor, y que este proceso puede tomar de 1-10 años. Aun no existe un consenso en la definición precisa de una infección persistente por VPH; sin embargo la asociación con neoplasia intraepitelial cervical es más fuerte para una persistencia de 12 meses, que para una de 6 meses, aunque esta relación puede variar dependiendo del tipo viral (Cervantes, 2003). Algunos datos sugieren que el VPH16 persiste en promedio mucho más tiempo infectando el epitelio en comparación con otros tipos de VPH, de tal manera que aquellas lesiones que presentan VPH16 podrían progresar a un cáncer más rápidamente que aquellas que no presentan VPH o tienen otro tipo viral. De igual manera se reporta que las infecciones con papilomavirus oncogénicos persisten por más tiempo que los no oncogénicos. Se ha demostrado que la infección con VPHs oncogénicos tiene un promedio de duración aproximada de 8 meses, mientras que la duración con VPHs no oncogénicos se estima en 4 meses (Cervantes, 2003).

Actualmente se ha desarrollado la primera generación de vacunas profilácticas contra VPH, que incluye a la vacuna bivalente (contra VPH16 y 18) y la tetravalente (contra VPH16, 18, 6 y 11). Estas vacunas han mostrado una reducción significativa en el desarrollo de lesiones del cérvix, vagina, vulva y región anogenital (Williamson, *et al.*, 2005). Sin embargo, para determinar su eficacia en la incidencia y mortalidad por cáncer cérvico-uterino, se requiere de un seguimiento a largo plazo.

Diversos estudios de la historia natural del cáncer cérvico uterino pretenden definir los factores de riesgo y marcadores que de alguna forma indiquen el comportamiento de una lesión premaligna. Los hallazgos al respecto repercutirán

en un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno de las lesiones precursoras de cáncer cérvico uterino (Williamson, *et al.*, 2005).

1.2 ANTECEDENTES DIRECTOS

1.2.1 Infecciones Múltiples de VPH

La infección múltiple (IM) ha sido mencionada como un factor común en mujeres jóvenes y se explica por resistencia inmunológica, permitiendo que una infección por VPH persista (Ho *et al.*, 1995), y provocando además, mayor susceptibilidad a una reinfección (Ho, *et al.*, 1995 y Bosch *et al.*, 2002). Asimismo, se ha visto que de las pacientes infectadas con VPH de alto riesgo, aquellas con infecciones múltiples son las que tienen mayor probabilidad de evolucionar hacia displasias severas, especialmente si están asociadas a otros factores de riesgo como la edad, tabaquismo y persistencia de la infección (Atlanta, 2004). Se ha señalado que en las infecciones múltiples con VPH de bajo y alto riesgo oncogénico, es posible que ambos tipos virales se potencien, ocurriendo la duplicación de las cargas virales, o un efecto sinérgico en la oncogénesis del virus de alto riesgo (Graterol, *et al.*, 2006). También se ha propuesto que las infecciones múltiples pudieran reflejar una mayor tolerancia inmunológica a la infección por VPH, con la acumulación subsecuente de infecciones diferentes, pudiendo, a su vez, representar un marcador de persistencia de la infección, lo cual han destacado algunos investigadores como un posible factor de riesgo de progresión de la lesión (Moscicki, *et al.*, 2001).

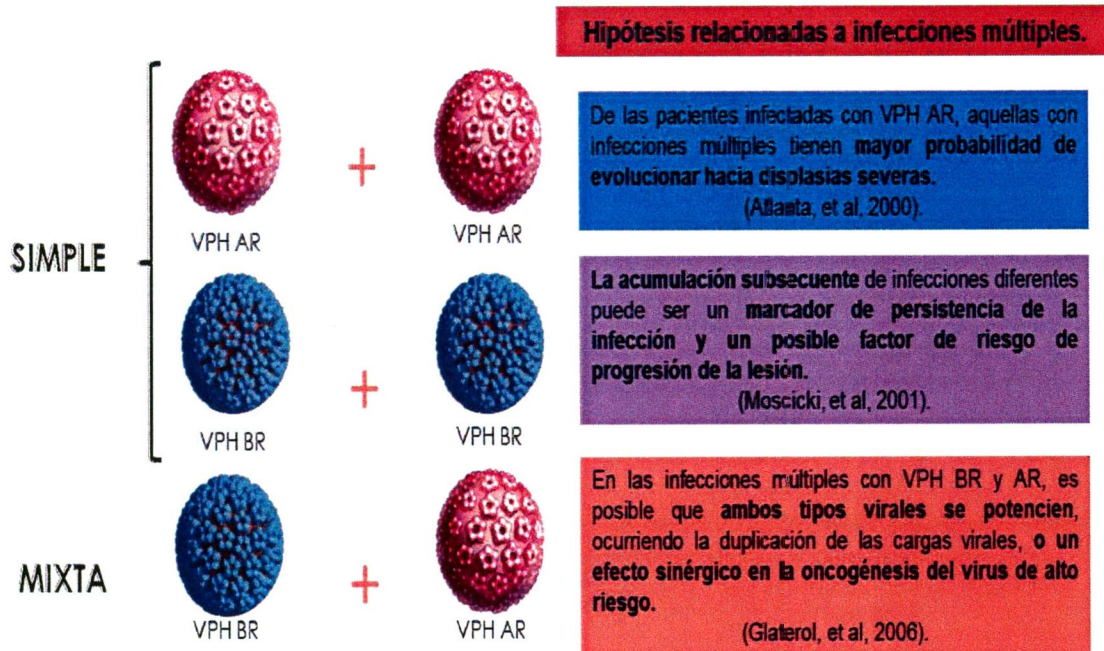


Figura 1.13. Tipos de infección múltiple y probables efectos.

Contrario a lo anterior, otros reportes señalan que para los casos con IM no hay un mayor riesgo de desarrollar neoplasias cervicales intraepiteliales (NCI) respecto a las mujeres infectadas con un solo genotipo viral (Woodman *et al.*, 2001; Sotlar, *et al.*, 2004).

Algunos otros estudios han arrojado estadísticas interesantes para IM. Un trabajo que se realizó en Costa Rica, utilizando 2,478 mujeres positivas para VPH, reveló que el 43.2% de ellas estaba infectada con múltiples tipos de VPH; siendo ésta más frecuente en las mujeres jóvenes (Anil Chaturvedi, *et al.*, 2010). Un estudio realizado con mujeres japonesas asoció la infección múltiple por VPH con LIEBG, LIEAG y CaCu en un 95% de las muestras analizadas; aunque la prevalencia disminuyó con el grado de las lesiones (Sasagawa *et al.*, 2001).

La proporción de tipos múltiples en una muestra dada varía en los diferentes estudios realizados, particularmente en relación con el método de detección de VPH utilizado. Los datos sugieren que las poblaciones con alto riesgo de CaCu y con infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tienden a ser más

propensos a infecciones con varios tipos de VPH que las poblaciones que no pertenecen a estos grupos. Sin embargo, en todos los estudios de carcinoma invasivo, el riesgo vinculado a múltiples tipos de VPH no varía significativamente del riesgo asociado a los tipos del VPH individuales (Bosch *et al.*, 2002).

En la tabla 5 se muestran algunos de los estudios que se han hecho en relación con infección múltiple en el mundo, aunque en este momento son muy pocos los estudios que se han hecho en relación a este tema, éste está siendo de gran interés en diversas poblaciones por los resultados obtenidos.

Tabla 5: Estudios realizados a nivel mundial sobre infección múltiple

POBLACIÓN	TIPO DE VPH Considerados	TIPO DE LESIÓN	% coinfección (Total/Positivas)	Hallazgo	REFERENCIA
Japón	10 Tipos de alto y bajo riesgo	LIEBG,LIEAG y CaCu	36.6% (366/ 134)	VPH-16 Y 18 en LIEAG y CaCu.	Sasagawa, <i>et al</i> , 2001
Chile	13 Tipos de alto y bajo riesgo	LIEBG,LIEAG y CaCu	96.3% (55/53)	VPH-31 en coinfección.	Aedo, <i>et al</i> , 2007.
Brasil, USA y México	6 Tipos de alto y bajo riesgo	No clasificado.	25.6% (1160/298)	VPH-16,51 Y 59 más frecuentes.	Akemi, <i>et al</i> , 2008.
Guinea	35 tipos de alto y bajo riesgo	LIEBG,LIEAG y CaCu	78.8% (2362/1863)	VPH-58 en coinfección.	García, <i>et al</i> , 2009,
España	35 tipos de alto y bajo riesgo	LIEBG,LIEAG y ASCUS	22% (2362/520)	Infección con VPH-16 y 18 no fue la más frecuente.	Gómez-Roman, <i>et al</i> , 2009
Costa Rica	25 tipos de alto y bajo riesgo.	LIEBG y LIEAG	43.1% (2478/1070)	La coinfección se asocia con el riesgo de una lesión grave.	Anil K, <i>et al</i> , 2010,
Grecia	35 tipos de alto y bajo riesgo	LIEBG y LIEAG	50.8% (1173/597)	VPH-16 Y 18 se encontró en el 50% de las muestras.	Spathis, <i>et al</i> , 2012.
México	19 tipos de alto y bajo riesgo	LIEBG,LIEAG, CaCu ASCUS, y Sanas.	11.7% (85/10)	Prevalencia de VPH-16 Y 18 del 43% y 42% respectivamente	López Rivera, <i>et al</i> , 2012.
Barcelona	25 tipos de alto y bajo riesgo	LIEBG,LIEAG y ASCUS	73% (1007/736)	Infección con VPH-16 y 18 fue la más frecuente.	Mazarico, <i>et al</i> , 2012
México	34 tipos de alto y bajo riesgo	LIEBG,LIEAG Y CaCu	55.6% (931/518)	La coinfección con VPH-68 y VPH-16 aumenta el riesgo de LIEAG Y CaCu.	Carrillo-García, <i>et al</i> , 2014

Como podemos ver en la tabla 5, son muy pocos los estudios realizados para buscar más de un tipo de VPH en una paciente con cáncer cervical o alguna lesión preinvasora ya sea de alto o de bajo grado. La mayoría de ellos están enfocados en la búsqueda de más de un tipo de VPH en muestras de pacientes femeninas, el único estudio que se ha hecho con población masculina es el de *Akemi et al., 2008*, y que además es el único que ha considerado abordar a la población mexicana en relación a la infección múltiple por VPH. Asimismo, ningún estudio ha incluido población femenina mexicana para el estudio de infección múltiple por VPH.

1.2.2 EXPRESIÓN DE ONCOPROTEÍNAS E6 EN LESIONES GRAVES

El perfil de expresión del ARNm de las oncoproteínas del VPH (E6 Y E7) es una de las principales diferencias en los virus. Se ha informado que los VPH-BR tienen una baja expresión del ARNm de E6 Y E7, mientras que grandes cantidades de estos ARNm se expresan en infecciones con VPH-AR (*Evans et al, 2014*). La expresión continua de las oncoproteínas, E6 y E7 de VPH-AR, es necesario para la transformación de células normales en células displásicas (*Doorbar, 2006*). Conocer la función de las oncoproteínas virales, la forma en cómo se regulan estas a nivel transcripcional y postraducciona, así como su participación en el ciclo viral y celular, nos ayuda a tener una visión más amplia de la biología del VPH, de la relación de éste con su célula huésped y de su influencia en el desarrollo de lesiones cervicales, que eventualmente pueden progresar a cáncer invasor (*López Saavedra, et al., 2006*).

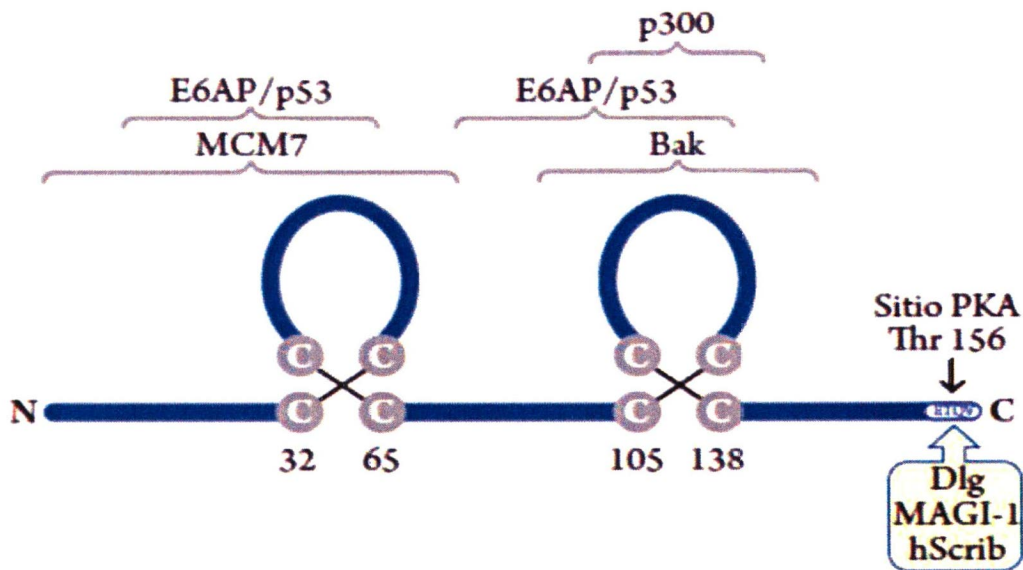


Figura 1.14. Estructura de la proteína E6 del VPH-AR. Las dos estructuras esenciales en la actividad de E6: sus dos dedos de zinc, como estructuras fundamentales para la interacción de la proteína con un gran número de blancos celulares y el carboxilo terminal, el cual contiene el sitio de unión a proteínas con dominios PDZ (De la Cruz y Lizano, 2004).

1.2.3 EFECTO DE E6 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La oncoproteína E6 de VPH-AR puede activar una ribonucleoproteína con función enzimática, la telomerasa, importante para el mantenimiento de las estructuras teloméricas contenidas al final de los cromosomas. La actividad la subunidad catalítica de la transcriptasa reversa de la telomerasa (hTERT), se presenta en más del 90% de las células inmortalizadas y cancerosas, pero está ausente en las células somáticas normales (Kiyono, *et al.*, 1998). La pérdida de la actividad de la telomerasa en células normales, produce una erosión progresiva del ADN telomérico al final de los cromosomas, debido a una replicación incompleta del ADN. Finalmente, este fenómeno provoca inestabilidad cromosómica y la senescencia. El acortamiento de los telómeros sirve como un "reloj mitótico" el cual es responsable de la regulación del ciclo de vida normal de la célula (Xu, *et al.*, 2008). La contribución de E6 en la pérdida de la organización epitelial y

diferenciación celular es muy importante en control del crecimiento y la proliferación en células normales y la pérdida de esta, en células infectadas por los VPHs de alto riesgo, favorece la duplicación del genoma viral. La oncoproteína E6 de VPH-AR, se une e inactiva varias proteínas involucradas en preservar la estructura epitelial (Lopez, *et al.*, 2000).

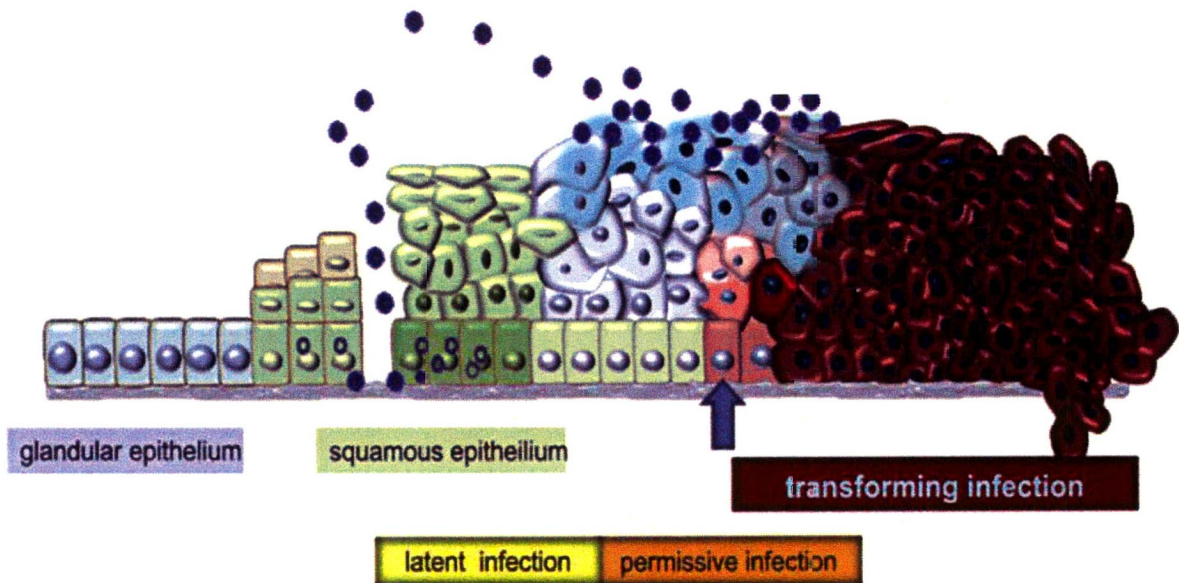


Figura 1.15. Proliferación celular en células infectadas con VPH-AR. La infección de las células basales con VPH-AR, la cual se produce a través de micro-abrasiones en el epitelio cervical puede dar lugar a infecciones latentes y posteriormente permisivas. La fase de transformación es asociado con la sobreexpresión E6 y E7 (Magnus von Knebel Deobervitz, *et al.*, 2012)

La oncoproteína E6, es capaz de inducir la transcripción y la activación de hTERT, por un mecanismo que aunque aún no ha sido completamente dilucidado, se ha propuesto esta mediado por la degradación de NEX1-91 (represor del promotor de hTERT), la cual es inducida por E6 al unirse con la proteína E6AP (Gewin, *et al.*, 2004) (Figura 1.16). La proteína E6, puede asociarse con el producto del gen supresor de tumores p53 y marcarlo para su degradación. El análisis de tumores humanos ha revelado que p53 es de los genes comúnmente mutados. Las

condiciones de estrés celular como radiación UV, hipoxia o infecciones virales incrementan la cantidad de p53, por estabilización post-transcripcional, produciendo un bloqueo celular en la fase G1. Este bloqueo, permite a la célula reparar el daño al ADN antes de que el ciclo celular continúe (Chakrabarti, *et al.*, 2003). La proteína p53, es un factor transcripcional que estimula la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y apoptosis, por ejemplo, es inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas (p21) (Munger, *et al.*, 2002). E6 se une a p53 y la conduce a su degradación a través de la vía de la ubiquitina. En este proceso, también participa la proteína celular asociada a E6 (E6-AP), que actúa como una ubiquitín ligasa (Werness, *et al.*, 1990). Las mutantes de E6-AP incapaces de unirse a E6 no pueden interactuar con p53 y las proteínas mutantes de p53 que no se unen a E6, no son susceptibles a la degradación inducida por E6-AP, señalando que E6 es requerida para mediar la interacción p53/E6-AP. E6 al unirse a p53 también puede producir su retención en el citoplasma, bloqueando su translocación hacia el núcleo y por tanto inhibiendo su función, independiente del proceso de degradación (Chakrabarti, *et al.*, 2003). La interacción de E6-p53 es importante para la progresión del ciclo celular. El gen p14, un producto alternativo de p16, es un supresor de tumores que induce el paro celular a través de p53, causando una elevación en los niveles de p21 y finalmente el paro en las fases G1 o G2. A diferencia de las células normales, en fibroblastos que expresan E6, pueden omitir el paro en el ciclo celular y continuar la proliferación a pesar de los altos niveles de p14. El análisis del mecanismo de E6 para abolir esta señal de paro celular, ha revelado que se trata de una ruta dependiente de p53 en la que existe un mecanismo de represión de los promotores de la ciclina B y cdc2. La oncoproteína E6, también ha sido implicada en la prevención de apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de p53. Esta proteína, es capaz de unirse a Bak (un miembro pro apoptótico de la familia Bcl-2) a través de un mecanismo independiente de p53 y degradándolo muy probablemente por su reclutamiento, por medio de la proteína E6-AP vía ubiquitinación. Estudios bioquímicos, han revelado que Bak puede unirse a E6-AP en ausencia de E6, a

diferencia de p53 (Thomas, *et al.*, 1998). Otro mecanismo por el cual la oncoproteína E6, podría estar regulando la apoptosis es a través de su unión con la proteína pro-apoptótica c-myc (Chakrabarti, *et al.*, 2003), a la cual marca para su degradación induciendo un aumento en la proliferación de las células infectadas. La proteína E6, también puede ejercer su efecto en apoptosis mediante la regulación negativa de la transcripción de otras proteínas pro-apoptóticas como la survivina (Borbely, *et al.*, 2006). La proteína E6 se puede unir a componentes de la maquinaria apoptótica de las células infectadas, como la molécula adaptadora FADD (Fas que contiene un dominio de muerte citosólico) y la pro-caspasa 8. Específicamente, E6 se une a los dominios de muerte DEDs de ambas proteínas y media su degradación, lo que evita que estas proteínas participen en la transmisión de la señal apoptótica (Filippova, *et al.*, 2004).

E6 en la Regulación de la Transcripción Viral y Celular La oncoproteína E6 es capaz de regular positiva y negativamente la transcripción de genes celulares y virales. E6 interactúa con la proteína CBP, la cual puede activar la transcripción al menos por dos mecanismos: la acetilación de histonas y proteínas no histonas y por la inducción de la unión de factores de transcripción a componentes de la maquinaria de transcripción basal. La unión de E6 a CBP, puede evitar ambos mecanismos. Cuando E6 se une a CBP, puede prevenir la acetilación de p53 mediada por CBP, reduciendo su afinidad por sitios de unión a ADN (Munger, *et al.*, 2002). Por otro lado, E6 tiene la capacidad de interactuar con el complejo CBP/p300, provocando un bloqueo en sus actividades. CBP/p300 activa la transcripción dependiente de CREB, por medio del reclutamiento de la ARN helicasa A, un componente del complejo de la ARN polimerasa II, con un promotor con un sitio de unión a CREB. E6 compite por este sitio de unión con la ARN helicasa A, previniendo así su activación. La represión de la maquinaria transcripcional, afecta a una gran variedad de genes, especialmente a aquellos envueltos en la diferenciación celular y en la producción de citocinas involucradas en la señalización de la respuesta inmune (Filippova, *et al.*, 2004). La oncoproteína E6 se puede unir e inhibir la acción de otros coactivadores transcripcionales como hDAD3, que es crítico para

reclutar a las acetilasas de histonas, involucradas en la expresión de genes supresores de tumor. La acción de E6 al unirse a hDAD3 podría inhibir la expresión de estos supresores de tumor (Munger, *et al.*, 2002). La proteína E6, al igual que muchos oncogenes, aumenta la actividad del promotor del gen de VEGF y por tanto, su transcripción. VEGF es uno de los inductores más importantes en la angiogénesis: un proceso esencial para el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos un pre-requisito fundamental para la expansión progresiva de los tumores (Borbely, *et al.*, 2006). El efecto estimulante de E6 sobre el promotor de VEGF puede tener un efecto positivo en la actividad de otros factores de transcripción como Sp-1. E6 también puede contribuir incrementado la señal de VEGF por interferir con la degradación mediada por la ubiquitinación del factor inducible de hipoxia 1alfa (HIF-1 α): un factor de transcripción involucrado en la activación del promotor de VEGF en respuesta a hipoxia (López, *et al.*, 2000).

Además E6 tiene la capacidad de interactuar y evitar la función de proteínas que se unen a calcio, ERC-55 o E6-BP (López, *et al.*, 2000), lo cual evita que las células epiteliales sufran una diferenciación terminal. La unión de E6 a este grupo de proteínas en su conjunto, reduce la habilidad de las células infectadas para adherirse a la matriz extracelular, desarrollar una morfología normal, incrementar su capacidad duplicativa y por lo tanto su transformación. La proteína E6 interfiere con el sistema inmune para evitar el reconocimiento de células infectadas y con esto facilitar la supervivencia del virus y evita su eliminación. E6 interactúa con el factor regulador de interferón (IRF-3) (Hasan, *et al.*, 2007). Cuando las células infectadas son detectadas por el sistema inmune, el IRF-3 induce su progresión a apoptosis, cuando E6 se une al IRF-3, evita su activación y su capacidad para inducir la muerte celular. Por otro lado, se ha reportado que la oncoproteína E6 es capaz de inhibir la transcripción de genes que codifican para receptores involucrados en la transducción de señales inducidas por el reconocimiento de patógenos como son los TLR (receptores toll-like) (Hasan, *et al.*, 2007). Estas interacciones de E6 con las diferentes proteínas del sistema inmune, dan como

resultado en una inhibición de la apoptosis y una persistencia del virus en la célula huésped, aspecto importante en la tumorigénesis celular.

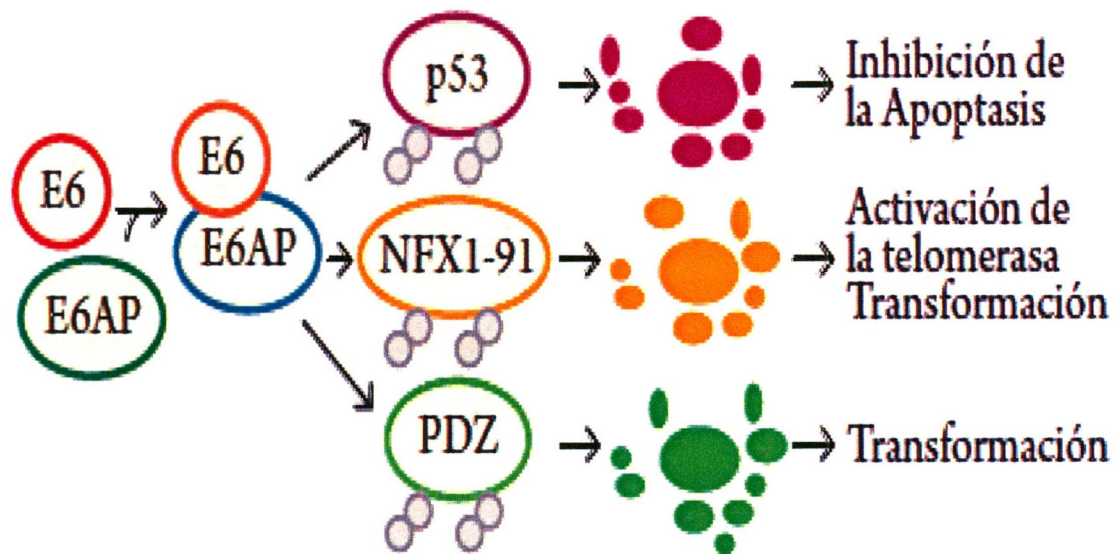


Figura 1.16. Blancos celulares de la oncoproteína E6 de VPHs de alto riesgo involucrados en la transformación celular. La formación del complejo E6-E6AP facilita degradación mediada por la ubiquitinación de las proteínas con dominios de unión PDZ, p53 y NFX1-9 (Lizano, *et al.*, 2009).

1.2.4 E6 COMO REGULADORA DE LA UNIÓN CÉLULA-CÉLULA Y LA POLARIDAD CELULAR

El potencial oncogénico de los VPHs de alto riesgo, ha sido vinculado a la capacidad de la oncoproteína E6 para unirse a proteínas que controlan la adhesión, la polaridad y la proliferación celular; un ejemplo de esto es la capacidad que posee E6 de los VPHs de alto riesgo para unirse e inducir la degradación de proteínas de la familia MAGUK (guanilato kinasas asociadas a la membrana) (Hasan, *et al.*, 2007). Estas son proteínas andamio, que están localizadas en las regiones de contacto célula-célula como los sitios de unión entre células epiteliales. Se ha demostrado que estas proteínas son fundamentales para mantener la adhesión y polaridad celular, así como la estructura del citoesqueleto, aspectos fundamentales en el control de la proliferación celular, la pérdida de

estas características celulares puede contribuir al establecimiento de un proceso de carcinogénesis (Munger, *et al.*, 2002). Se ha visto también la interacción de E6 con paxilina, la cual es una proteína que forma parte de las uniones de adhesión focal, participa en la organización de las fibras de actina y en la organización del citoesqueleto. La unión de E6 a esta proteína induce la pérdida de la integración epitelial, lo cual contribuye a la transformación viral (Degenhardt, *et al.*, 2001). La realización de ensayos que detectan el ARNm del oncogén E6 podría tener el potencial de detectar infecciones con VPH clínicamente relevantes. (Cuschieri, Safaeian, 2007). En la imagen se resumen, las interacciones de la oncoproteína E6 con proteínas celulares, y las consecuencias de estas interacciones en la proliferación celular el cual es uno de los eventos principales para el desarrollo de neoplasias graves.

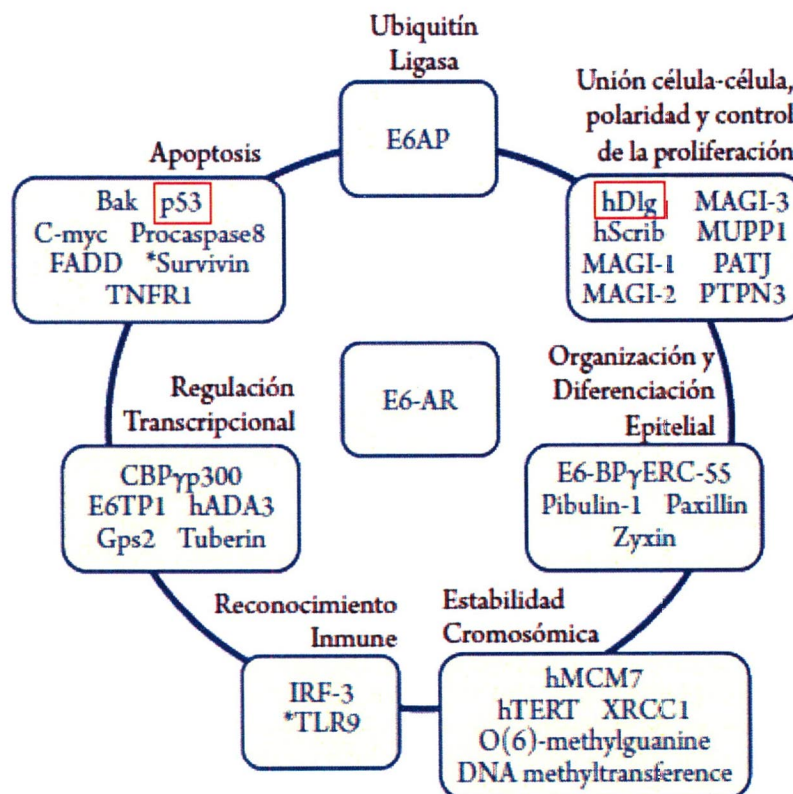


Figura 1.17. Proteínas celulares con las que interacciona la oncoproteína E6 de VPH-AR (Lizano *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

El CaCu es la segunda neoplasia más frecuente en mujeres en México, cuyo principal factor de riesgo es la infección con VPH de alto riesgo.

Recientemente se ha comenzado a dar importancia a la coexistencia de más de un tipo de VPH como posible potenciador de la carcinogénesis. Es por ello que la identificación de los diversos genotipos de VPH y la detección de infecciones múltiples, podría poseer valor predictivo para el diagnóstico de CaCu.

3. HIPÓTESIS

Existe asociación entre la presencia de más de un genotipo de VPH y la severidad de la lesión en el cérvix.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Conocer la asociación entre la infección con más de un genotipo del VPH y la severidad de la lesión del cérvix de pacientes mexicanas.

4.2. PARTICULARES

- 1) Determinar la presencia y el genotipo del VPH en muestras de cérvix con diferentes grados de lesiones intraepiteliales.
- 2) Evaluar la asociación entre la presencia de más de un genotipo de VPH y el grado de la lesión en el cérvix.
- 3) Evaluar la asociación entre los niveles de expresión del oncogén E6 y el grado de la lesión en el cérvix.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL:

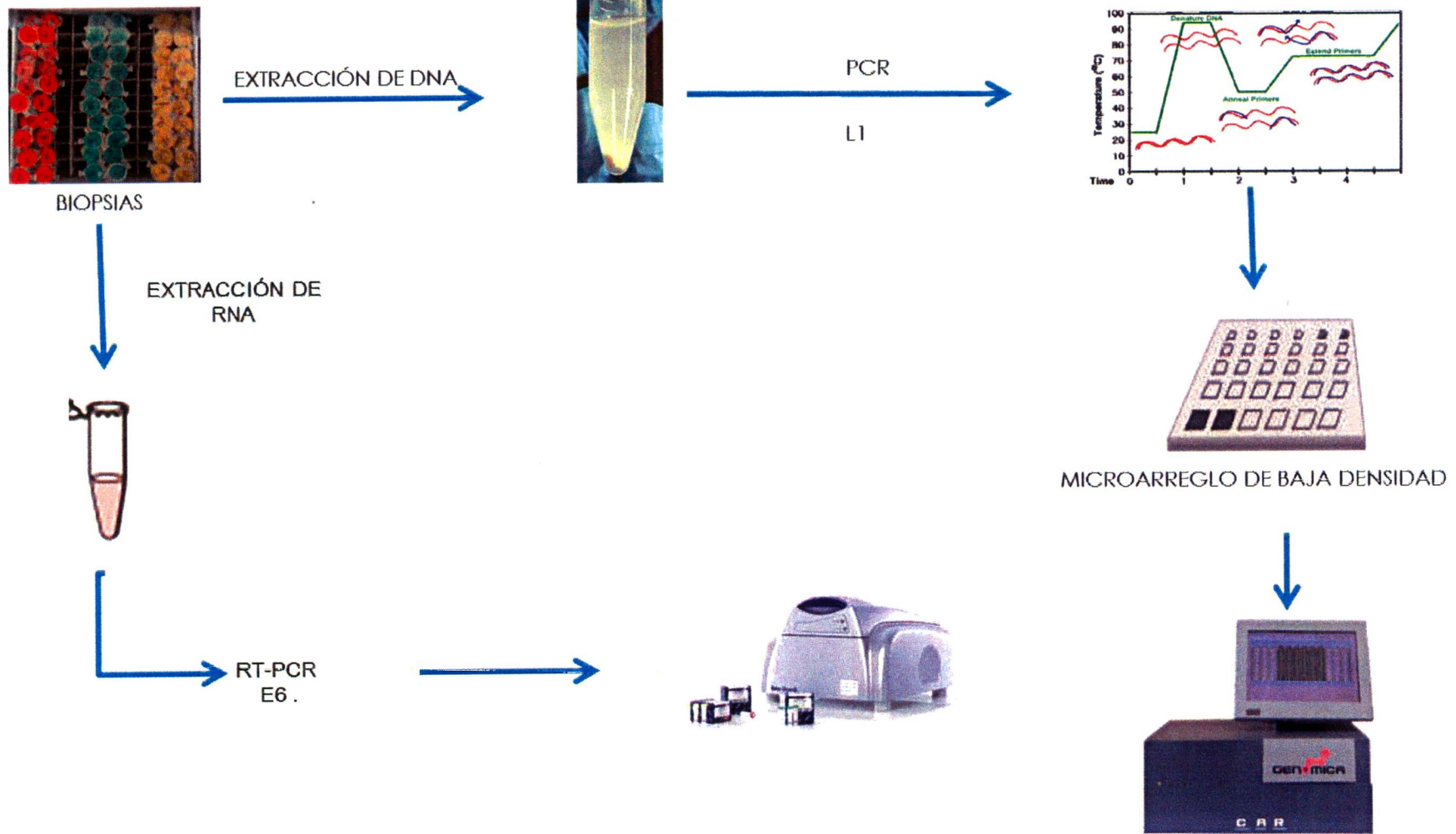
Se presenta un diseño del tipo de análisis multivariado, tratándose de un estudio de tipo exploratorio, observacional, experimental y longitudinal. Las muestras obtenidas para la realización de este estudio fueron de pacientes que asistieron a su consulta en el hospital del IMSS de la Raza, en el 2012, y del Hospital Juárez de México (HJM), en el 2014.

Las técnicas moleculares se realizaron con ácidos nucleicos (ADN y ARN) extraídos del propio material biopsico para asegurar que la relación entre lesión histológica y tipos de VPH aislados son causa y no una mera coexistencia temporal.

6. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes que asistieron a su estudio colposcópico de rutina y de muestreo de citología cervical dieron su consentimiento para la toma y almacenamiento de sus muestras. Para el estudio actual no escrito y se obtuvo el consentimiento informado.

Las muestras procesadas fueron biopsias cervicales tomadas de 55 pacientes, que asistieron a su consulta colposcópica en el Hospital Juárez de México, y el Centro Médico Nacional La Raza de la Ciudad de México. A 25 de estas pacientes se le tomaron dos biopsias, una de la región donde se localizaba la lesión y otra en una región del cérvix de la misma paciente que no presentaba lesión alguna. Las muestras con lesión fueron clasificadas en el hospital por patología en Cáncer cervico uterino (CaCu), Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG), Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) y Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), considerando la proporción del espesor epitelial que presenta células maduras diferenciadas.



5.1. Diagrama de flujo del diseño experimental

7. METODOLOGÍA:

7.1 Líneas Celulares:

Se trabajó con dos líneas celulares para la estandarización de los procedimientos experimentales y como controles positivos a la infección con VPH. Una línea celular HeLa, la cual contiene la presencia viral de VPH-18, fue cultivada en medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium con cambios de medio cada 48 horas, durante una semana antes de ser cosechadas, proporcionada por la Dra. Elizabeth Álvarez, y la línea celular SiHa, la cual contiene la presencia viral de VPH-16, proporcionada por el Dr. Jorge Fernández del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). De ambas líneas celulares se extrajo ADN y ARN con el kit AllPrep (QIAGEN) y la extracción de ARN se realizó con el kit SV Total ARN Isolation System (Promega) de acuerdo al protocolo incluido en el kit.

7.2 Obtención de las biopsias de las pacientes

Las muestras procesadas fueron biopsias cervicales tomadas a 55 pacientes, que asistieron a su consulta colposcópica en el Hospital Juárez de México, y el Centro Médico Nacional La Raza de la Ciudad de México. A 25 de estas pacientes se le tomaron dos biopsias, una de la región donde se localizaba la lesión y otra en una región del cérvix de la misma paciente que no presentaba lesión alguna. Las muestras con lesión fueron clasificadas en el hospital de acuerdo a las patologías existentes tales como Cáncer Cérvico-uterino (CaCu), Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG), Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) y Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), para ello fue consideranda la proporción del espesor epitelial que presenta células maduras diferenciadas.

Todas las muestras obtenidas del Hospital de la Raza (un total de 50 biopsias) fueron colocadas en medio Tissue Tek (Sakura Finetek), y almacenadas a -80°C para ser criopreservadas. Las biopsias obtenidas del Hospital Juárez de México (un total de 30 biopsias) fueron obtenidas en bloques de parafina para ser

preservadas. Se tomó registro de datos epidemiológicos como: la historia familiar, la historia clínica, edad, último estudio realizado, sin o con histerectomía, presencia de miomatosis uterina, hábitos, etc, para todos y cada uno de lo que se registró.

7.3 Extracción del ácidos nucleicos

El ADN total de las 55 biopsias se obtuvo a partir del tejido con el Kit ADN / ARN AllPrep (Qiagen) para extracción simultánea de ácidos nucleicos. El procedimiento integra la tecnología patentada por QIAGEN para la unión selectiva del ADN de doble cadena con la tecnología de RNeasy bien establecida. La purificación eficaz del ADN de alta calidad y el ARN están garantizadas, sin la necesidad de RNasa adicional y la digestión con ADNasa.

Las muestras biológicas se lisaron y se homogenizaron en un Buffer de Lisis que contiene guanidina-isotiocianato-altamente desnaturizante, que inactiva inmediatamente ADNsas y RNAsas para asegurar el aislamiento de ADN y ARN intacto. El lisado se hace pasar a través de una columna de centrifugación de ADN AllPrep. Esta columna, en combinación con el Buffer de alta salinidad, logra la unión del ADN genómico selectiva y eficientemente. La columna se lava, y luego se eluye el ADN. El material genómico purificado con el procedimiento de ADN / ARN AllPrep tiene una longitud media de 15-30 kb dependiendo de las condiciones de homogenización.

El etanol se añade al flujo a través de la columna de centrifugación de ADN AllPrep para proporcionar condiciones de unión apropiadas para el ARN, la muestra se aplicó luego a una columna de centrifugación MinElute RNeasy, donde el total de ARN se une a la membrana y los contaminantes se lavan de manera eficiente. El ARN de alta calidad se eluye en agua libre de RNasa.

Con el procedimiento de ADN / ARN AllPrep, todas las moléculas de ARN de más de 200 nucleótidos son purificadas. El procedimiento proporciona un

enriquecimiento de ARNm, ya que la mayoría de ARN <200 nucleótidos (tales como 5.8S rARN, 5S rARN y tARN, que en conjunto constituyen el 15-20% del total de ARN) se excluyen de forma selectiva.

La biopsia se colocó en un tubo falcón de 15mL, al cual se le colocaron previamente 350µL de buffer RLT (para hacer la lisis celular), y 5µL de ARN carrier (para obtener una mejor recuperación del ARN total). Una vez que el tejido se encontraba dentro de la solución se procedió a la homogenización, realizando la disrupción con el equipo Tissue Ruptor (Qiagen), el cual ayuda a la homogenización de las muestras en presencia del buffer de lisis. Cuando el tejido se encontró completamente homogenizado en la solución se procedió a la extracción del ADN y del ARN.

Primeramente se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm en una centrifuga 5804R, con un rotor de tubos eppendorf de 1.5 mL y se transfirió a una columna de ADN (color morado) de colección de 2mL y nuevamente se centrifugo durante 30 segundos a 10000rpm. La elusión se almaceno a 4°C mientras se realizó la extracción del ADN. Posteriormente se adicionaron a la columna 500µL de buffer AW1, para lavar, y centrifugar 15 segundos a 10000rpm, después de esto se adicionaron 500µL de buffer AW2 y se centrifugo por dos minutos a 14000rpm. Finalmente la columna se colocó un nuevo tubo colector de 1.5 mL y se adiciono 50 µL de buffer EB (previamente calentado a 70°C), se incubo a temperatura ambiente durante dos minutos y se centrifugo por un minuto a 10000 rpm para eluir el ADN. Se repitió este último pasó para eluir el ADN 3 veces.

Para la extracción del ARN, se utilizó la elusión almacenada a 4°C que anteriormente se mencionó, ésta se transfirió a una columna de ARN (columna rosa del kit) y se centrifugó durante 15 segundos a 10000rpm, posteriormente se le adicionaron 700 µL de buffer RW1 (para lavar la columna), y se centrifugó durante 15 segundos a 10000rpm, se descartó el eluido, después se le adicionaron a la columna 500 µL de buffer RPE y se centrifugo durante 15

segundos a 10000rpm, se le adicionó 500 μ L de etanol al 80% y se centrifugó durante 2 minutos a 10000rpm, finalmente se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección de 1.5mL y se le adicionaron a la columna 14 μ L de agua libre de ARNsa directamente en el centro de la membrana para eluir el ARN. La siguiente figura 2.2 muestra el diagrama de flujo:

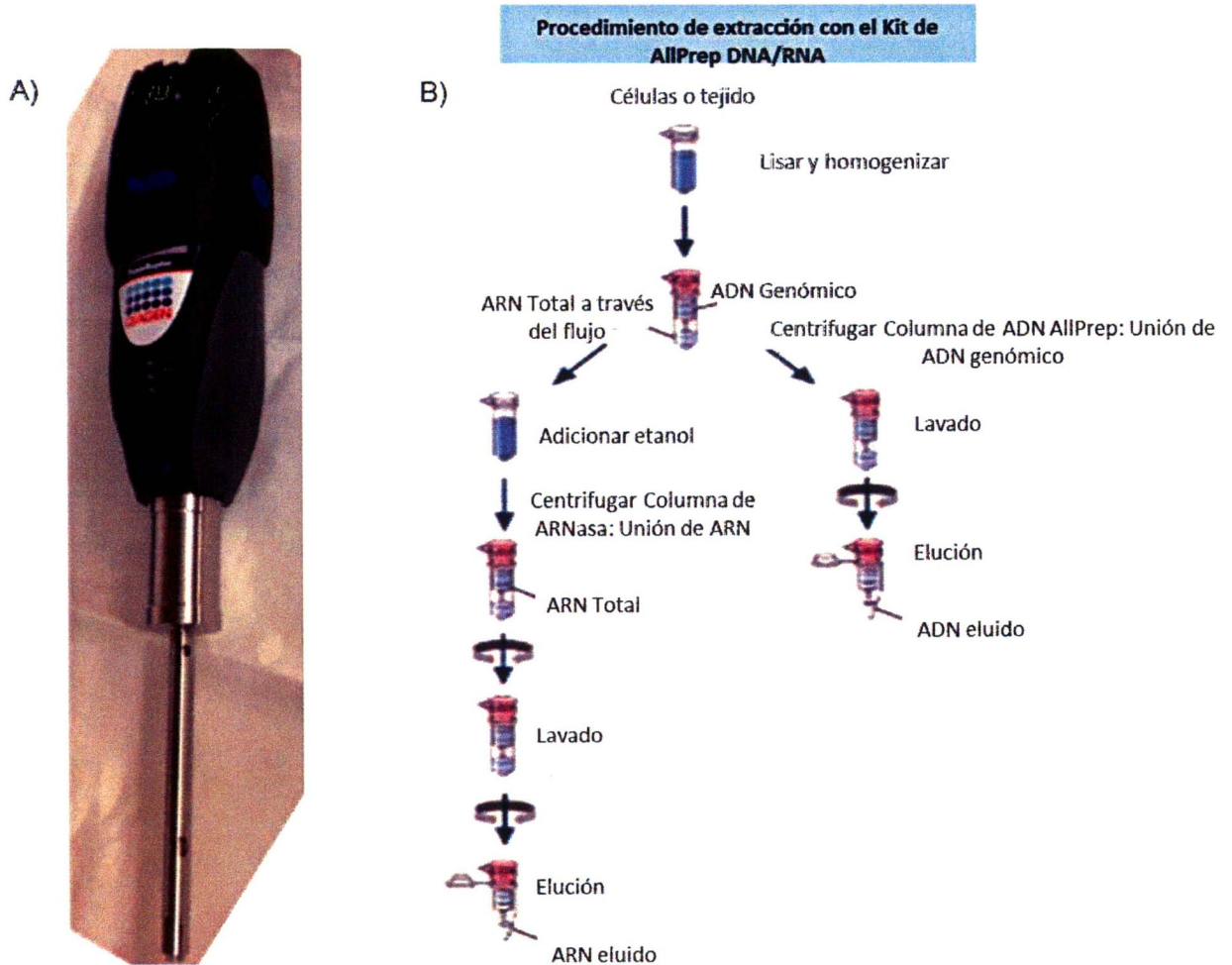


Figura 7.1 Equipo y Kit de Qiagen utilizados para extracción de ácidos nucleicos. La imagen A) muestra el equipo de Tissue-Ruptor utilizado para hacer la disrupción del tejido, La imagen B) el resume el protocolo para la extracción del ADN y ARN.

7.4 Detección del ADN viral en las muestras

El ADN total se usó como molde para detectar la presencia de ADN viral mediante amplificación por PCR usando cebadores específicos. Se utilizó un par de iniciadores consenso externos para los diferentes tipos virales MY09/MY11 y que van dirigidos a la región L1 del VPH que amplifican un fragmento de 450 pb.

La identificación de tipos virales se basa, en el análisis de la secuencia del gen L1 de VPH, el cual se sabe que es un genotipo viral si la secuencia nucleotídica del gen L1 difiere por poco más del 10%, si las diferencias de la secuencia del gen es del 2%-10% definen a un subtipo viral y finalmente si la diferencia es menor al 2% se define a una variante viral (López-Saavedra, *et al.*, 2006).

En este trabajo se utilizaron los oligonucleótidos MY09/MY11 (Yoshikawa Hiroyuki, *et al.*, 1999), que amplifican un fragmento de 450 pb del gen L1 del VPH. El gen L1 es el más conservado del genoma viral y por lo tanto ha sido usado ampliamente utilizado para determinar la presencia del virus en la muestras. En la tabla 6 se muestran los genotipos virales que se pueden detectan con estos oligonucleótidos así como el sitio del genoma viral en donde hibridan. Los oligonucleótido MY09 5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3' y MY11 3'GCMCAGGGWCATAAYAATGG5' detecta a los siguientes tipos virales:

Tabla 6. Genotipos de VPH y sitios de hibridación del oligonucleótido MY09/MY11

Genotipo de VPH detectado con MY09	Sitio de hibridación	Genotipo de VPH detectado con MY11	Sitio de hibridación
VPH 6	5761-5784	VPH 6	5984-6003
VPH 11	5743-5766	VPH 11	5966-5986
VPH 16	5609-5632	VPH 16	5841-5861
VPH 18	5585-5608	VPH 18	5817-5836
VPH 31	5524-5547	VPH 31	5524-5547
VPH 33	5566-5589	VPH 33	5801-5820

Se muestra algunos de los genotipos de VPH detectados con los oligonucleótidos, los probables sitios de unión del oligonucleótido MY09 y MY11.

Tabla 7: Reacción para la detección de VPH empleando la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos “MY09/MY11”

Reactivo	Concentración
Buffer 10x	1x
Mg ²⁺ 150mM	1.5 mM
dNTPs 2.5mM	0.25 mM
Oligo MY09	200 ng
Oligo MY11	200 ng
Taq polimerasa	2.5 U
ADN	500 ng
Volumen final	25 µl

Condiciones de amplificación para la PCR

94°C	10 min.	1 ciclo
94°C	1 min	} 35 ciclos
46°C	130s	
72°C	2 min	
72°C	10 min.	Extensión
4°C		

7.5 Genotipificación de VPH por microarreglos de baja densidad

Para la tipificación se empleó el kit de diagnóstico CLART PAPILOMAVIRUS HUMANO 2 (CLART HPV2) el cual detecta 35 tipos VPH empleando PCR multiplex para posteriormente visualizar los resultados mediante arreglos de baja densidad. La hibridación en cada sonda del arreglo se realiza por triplicado para cada genotipo. El análisis de los microarreglos se realiza de forma totalmente automatizada con el software SAICLART (figura 7.2).

A)



B)

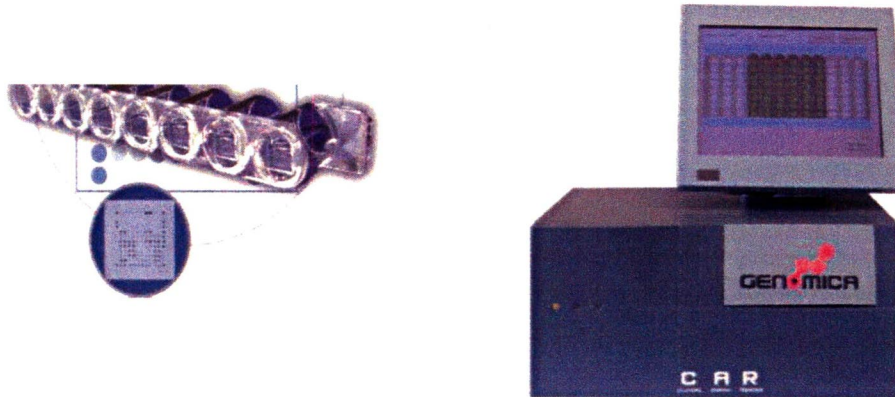


Figura 7.2 Tipos virales de VPH detectados con el Kit CLART HPV2 y Lector CAR (Clinical Array Reader). A) Muestra los genotipos de VPH detectados con el kit, la imagen B) Lector CAR en el cual es visualizado el genotipo de VPH detectado en la muestra.

Este proceso experimental se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del microarreglo en las que se produce la hibridación de los productos amplificados con las sondas específicas. Durante la PCR, los productos amplificados se marcan con biotina. Después de la amplificación, estos productos se hibridan con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del microarreglo, tras lo que se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato o-dianisidina, que precipita sobre las zonas del microarreglo en las que ocurre la hibridación (Figura 7.3).

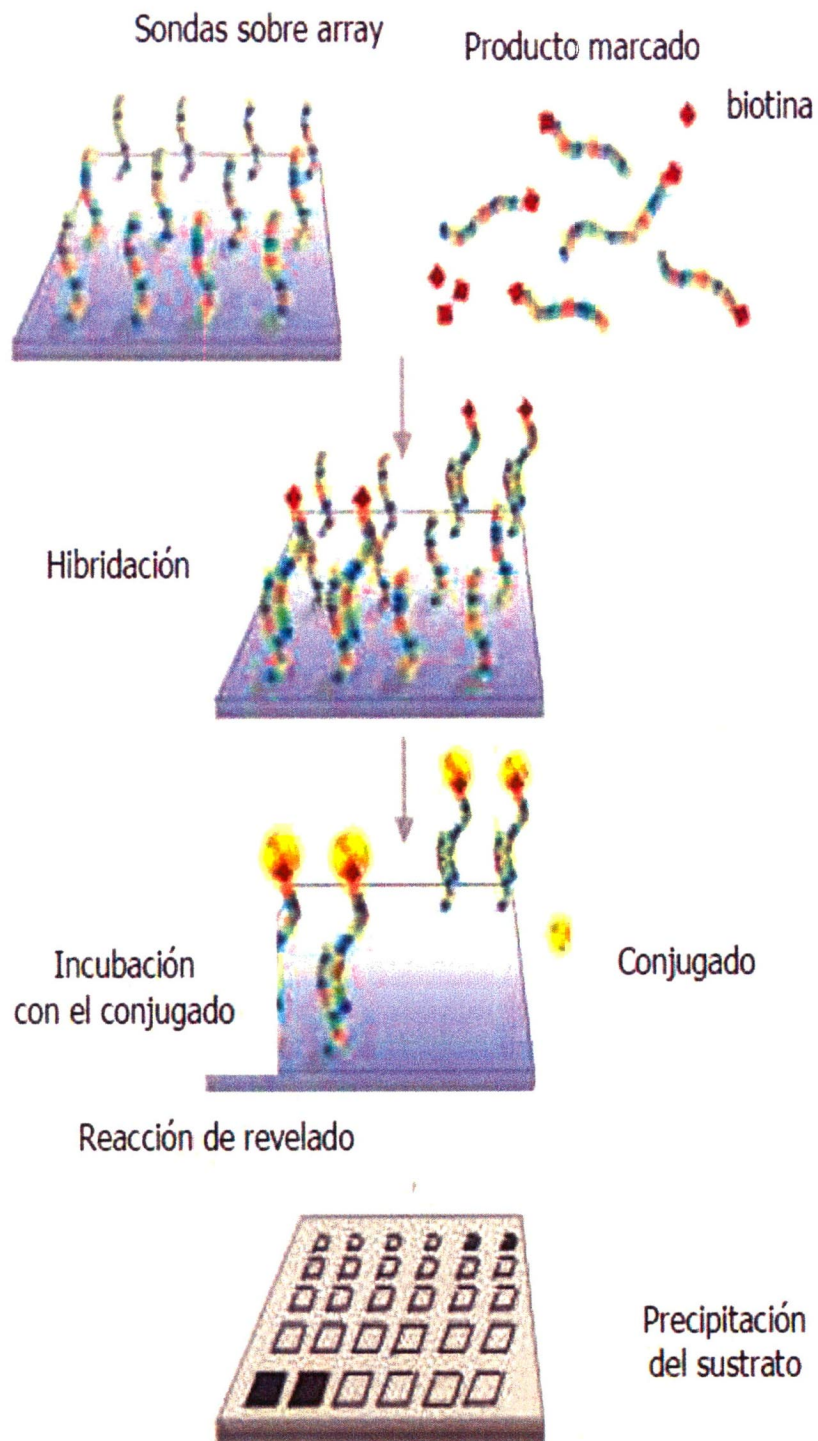


Figura 7.3 Hibridación de las muestras de ADN en el microarreglo de baja densidad. Se muestra el esquema del proceso de hibridación y visualización en el microarreglo de CLART2.

R	70	71	72	73	81	82	83	84	85	6	11	R
51	52	53	54	56	58	59	61	62	66	68		
R	18	26	31	33	35	39	40	42	43	44	45	
	81	82	83	84	6	11	39	CI	DNA	6	11	16
54	56	58	59	61	62	66	68	70	71	72	73	
31	33	35	39	40	42	43	44	45	51	52	53	
82	83	84	85	89	CI	DNA	6	11	16	18	26	
56	58	59	61	62	66	68	70	71	72	73	81	
	39	40	42	6	11	44	45	51	52	53	54	
R	CI	DNA	6	11	16	18	26	31	33	35	R	

Figura 7.4 Distribución de las sondas en el microarreglo de CLART 2. Se muestra la disposición de los 35 genotipos de VPH en el microarreglo, cada uno está por triplicado y así mismo se muestran los controles.

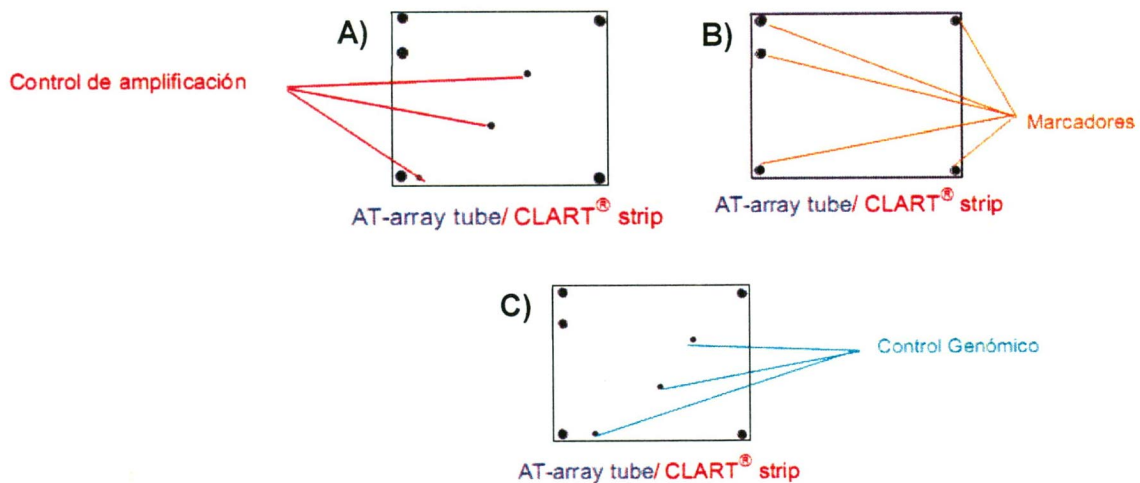


Figura 7.5 Controles incluidos en el microarreglo. A) Control de amplificación, que me permite distinguir entre los casos de inhibición de la reacción de PCR y aquéllos en los que no se encontró ADN en la muestra. B) Control de eficiencia, los cuales son marcadores de biotina que validan la eficacia de los reactivos incluidos en el kit. C) Control de genómico, el cual Informa de la presencia de ADN de la paciente en la muestra, valida la eficacia del proceso de extracción y la presencia de muestra en el test.

Se realizó una amplificación de ADN, se añadió 5µL de ADN de cada una de las pacientes en un tubo reacción del kit de CLART-HPV2 para cada muestra, se resuspendió varias veces con la micropipeta, y se colocaron los tubos en hielo. Se programó el termociclador con los siguientes ciclos de temperatura.

Tabla 8. Esquema de amplificación de PCR punto final.

1 ciclo	95°C 5 minutos
	94°C 30 segundos
40 ciclos	55°C 60 segundos
	72°C 90 segundos
1 ciclo	72°C 8 minutos
	20°C hasta la recogida de tubos (opcional).

Se inició el programa y se colocaron los tubos de reacción en el termociclador cuando el bloque sobrepasó los 90°C. De este modo se disminuyó las posibles amplificaciones inespecíficas debidas a incubación por debajo de la temperatura de hibridación.

Cada tubo de reacción contiene un par de oligonucleótidos que amplifica un fragmento del gen CFRT humano. Este es el control de extracción de ADN genómico o control de ADN del paciente, un par de oligonucleótidos que amplifica un plásmido modificado que se usa como control de amplificación de PCR (estos dos controles internos ayudan a eliminar los falsos negativos) y oligonucleótidos específicos de VPH. Durante la PCR, los productos amplificados se marcan con biotina.

Posteriormente se procedió a realizar el proceso de visualización, el cual consistió en lo siguiente: Se encendió el termobloque a 65°C, media hora antes de iniciar la

incubación. Las muestras amplificadas anteriormente se desnaturalizaron durante 10 minutos a 95°C. Se preparó el buffer de lavado (TL), por cada tira de 8 pocillos se mezcló 1mL de TL en 9mL de agua destilada, por lo tanto, mezcle 6mL de TL en 54mL de agua destilada. Se pre-lavaron las tiras CS (Tiras CLART Strip) agregando 200µL de TL diluido, se pipeteo cada pocillo varias veces y se desechó la solución. Se añadieron 100µL de solución de hibridación (SH) a cada pocillo del CS, ésta estuvo a temperatura ambiente antes de utilizarse, una vez desnaturalizados los productos de PCR, se añadieron 5µL de producto de PCR desnaturalizado a cada pocillo, se resuspendió varias veces para que se mezclara con la solución de hibridación. Se incubo la tira cubierta con una tapa, en el termomixer de placa, durante 1 hora a 65°C agitando a 550rpm.

Las sondas inmovilizadas sobre la superficie, capturan los productos amplificados complementarios marcados con biotina. A través de la biotina, se une el conjugado, en este caso es estreptavidina-peroxidasa-HRP (peroxidasa de rábano). El sustrato o-dianisidina por la acción de la HRP, produce un precipitado sobre la zona en la que se produce la hibridación de los productos con las sondas específicas.

Tras esta incubación, se sacó la placa y se desechó la solución de hibridación con pipeta, se programó el termomixer de placa a 30°C y en movimiento para su utilización posterior. Se añadieron 200µL de TL diluido, y se pipeteo cada pocillo 5 veces, se desechó la solución TL con pipeta y se repitió una vez más este lavado. Se preparó la solución conjugado (DC), se mezcló 1mL del diluyente de conjugado (DC) con 7.5µL de conjugado (CJ) por cada tira de ocho pocillos, por lo tanto, mezcle 6mL de DC en 45µL de CJ. Una vez desechada la solución TL diluida, sin dejar seco el array, se añadió a cada pocillo 100µL de solución CJ diluida. Se incubo 15 minutos exactos en el termomixer de placa a 30°C, agitando a 550rpm. Tras esta incubación, se sacó la placa y se desechó la solución rápidamente con pipeta y se dejó programado el termomixer de placa a 25°C y en movimiento para

su utilización posterior. Se lavaron los pocillos con 200µL de TL diluido, resuspendiendo 5 veces con la pipeta y se desechó la solución con la pipeta, este lavado se repitió dos veces más. Se añadieron 100µL de Solución de Revelado (RE), en cada uno de los pocillos y se incubó a 25°C en el termomixer de placa durante 10 minutos sin agitación. Se desechó la solución RE completamente con pipeta, procurando no tocar el array y dejar completamente seco el pocillo. Finalmente se procedió a leer el array en el CAR, se colocó un adaptador especial sobre la bandeja del CAR y posteriormente se colocó la placa para tomar las imágenes de todos los pocillos y ser analizados automáticamente.

La sensibilidad de este kit va del 80% al 100% dependiendo del número de copias virales.

La especificidad de este kit es del 100%, ya que no hay detección inespecífica de otros virus patógenos habituales de muestras cervicovaginales, como son los herpesvirus.

Interpretación de Resultados:

MUESTRA	POSITIVO para algún genotipo	CONTROL GENÓMICO	CONTROL DE AMPLIFICACIÓN	INTERPRETACIÓN
√	√	√	√	POSITIVO

Éste se considera un **RESULTADO VÁLIDO**

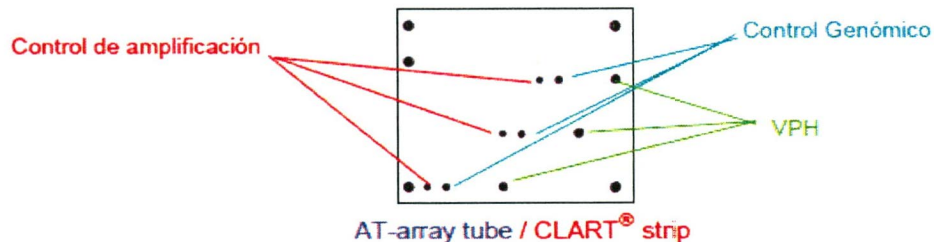


Figura 7.6 Validación de un resultado positivo. Para determinar un resultado positivo se requiere de la visualización de los tres controles del microarreglo A) Control de amplificación (rojo), B) Control Genómico (azul) y C) Controles de Biotina. Además de la amplificación del tipo viral por triplicado (verde).

7.6 RT-PCR para amplificar el oncogén E6 de VPH

Para cumplir con el tercer objetivo del proyecto, se midió la expresión del ARNm del oncogén de VPH E6, que nos permitió saber en qué etapa del desarrollo de la infección se encuentra el VPH, además de indicarnos sus niveles de expresión. Esto se realizó utilizando oligonucleótidos específicos para E6 de VPH16, que amplifican un fragmento de 120pb, como control interno se utilizó GAPDH que amplifica un fragmento de 140pb (Tabla 9).

Tabla 9: Oligonucleótidos para la amplificación del oncogén E6, y el control GAPDH.

GEN	OLIGONUCLEÓTIDO SENTIDO	OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO	AMPLICON
E6 VPH16	TCAAAAGCCACTGTGTCCTGA	CGTGTTCTTGATGATCTGCAA	120pb
GAPDH	AGGTGACACTATAGAATAACCGTCAAGGC	GTACGACTCACTATAGGGATGGTGGTGA	140pb

Los resultados de esta tercera parte experimental nos ayudaron a determinar el valor medio de copias de ARNm de E6 de VPH16 por cada tipo de lesión. Se realizó el cálculo de las cantidades medias de genotipos virales en cada tipo de lesión, para poder estimar la relación entre la expresión del ARNm de E6 y el tipo de lesión. Así como estimar la relación entre la cantidad media de genotipos virales y la expresión del ARNm de E6. Se estimó la relación entre la cantidad media de genotipos virales, la expresión del ARNm de E6 y el tipo de lesión y la modulación que ejerce el genotipo específico sobre la expresión del ARNm E6.

8 Resultados

8.1 Características de las pacientes incluidas en este estudio.

Diagnóstico Colposcópico y Patológico: En este trabajo se estudió un total de 55 pacientes, de las cuales se obtuvieron 80 biopsias: 55 biopsias que provenían de una zona donde se diagnosticó una lesión mediante colposcopia y 25 biopsias de una zona que no mostraba lesión en el cérvix, la cual solo se obtuvo de algunas de las pacientes incluidas en el estudio.

A las pacientes se les realizó el diagnóstico colposcópico por el personal médico que tomó las muestras, y el diagnóstico histológico en los Departamentos de Patología de los Hospitales La Raza y Juárez. Las biopsias se clasificaron por el tipo de lesión de acuerdo a la nomenclatura histopatológica de Bethesda (en su versión 2001) en lesiones LIEBG, LIEAG y CaCu. Cuando estas lesiones no se pudieron clasificar en alguno de los tipos anteriores se denominaron ASCUS (Tabla 10). El tipo de lesión más frecuentemente encontrado fue la de bajo grado (LIEBG, 45%), mientras que sólo el 15% de las biopsias de las zonas lesionadas no pudieron clasificarse en un tipo de lesión definida (Gráfica 1).

Tabla 10. Diagnóstico de las Pacientes incluidas en este estudio.

Diagnóstico	Zona con lesión	Zona sin lesión
	No. Biopsias	No. Biopsias
CaCu	11	9
LIEAG	11	10
LIEBG	25	6
ASCUS	8	0
TOTAL	55	25

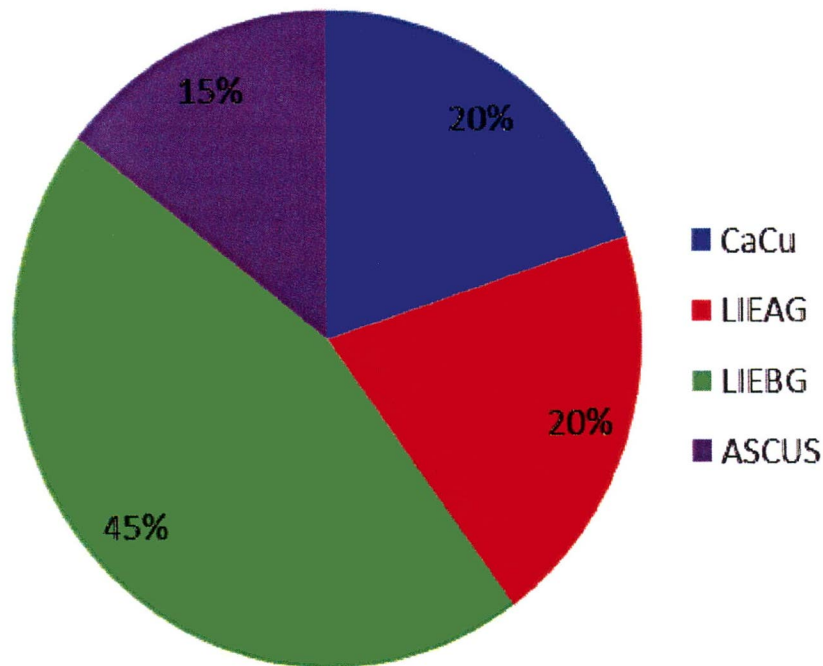
Total de las pacientes incluidas en este estudio, las biopsias de las zonas con lesión y las muestras obtenidas de la zona sana que corresponden a cada paciente de acuerdo al grado de la lesión.

*CaCu= Cáncer cervico-uterino

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

*ASCUS= Celulas escamosas atípicas de significancia indeterminada



Gráfica 1. Distribución de las biopsias por lesión. Distribución de las biopsias analizadas en este estudio por lesión, clasificadas de acuerdo a la nomenclatura histopatológica de Bethesda.

*CaCu= Cáncer cérvico-uterino

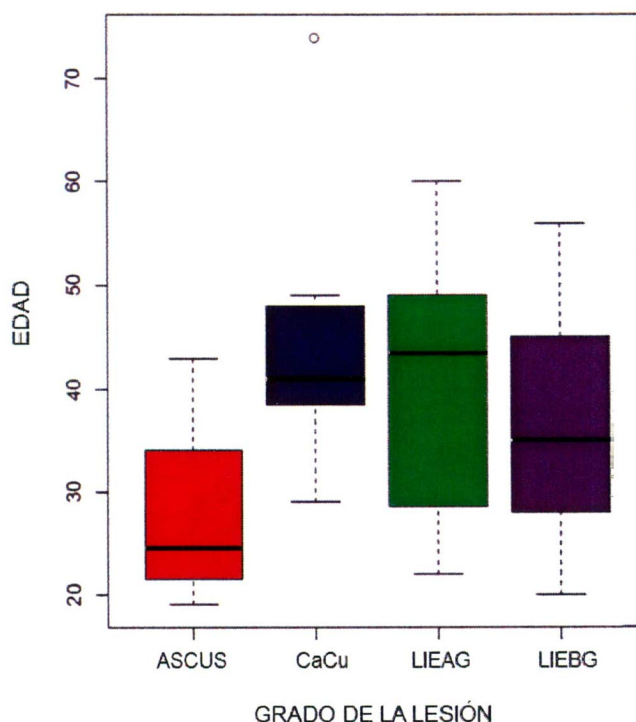
*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

*ASCUS= Células escamosas atípicas de significancia indeterminada

8.2 Edad de las pacientes incluidas en este estudio

La edad de las pacientes incluidas en este estudio se obtuvo de su historia clínica. La edad promedio fue de 38.3 ± 1.5 años (media \pm error estándar de la media). No se encontraron diferencias en la edad de las pacientes por grupo de lesiones ($H=7.04$; $gl: 3,55$; $p=0.071$), con lo cual nuestros grupos de estudios son homogéneos en relación al factor de riesgo edad (Gráfica 2).



Grafica 2: Edad de las pacientes incluidas en este estudio. Diagrama de caja y bigote, basado en cuartiles, mediante el cual se visualiza la mediana de la edad de las pacientes en cada uno de los grupos definidos por grado de lesión. Este diagrama se realizó con el programa estadístico NCSS.

*CaCu= Cáncer cérvico-uterino

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

*ASCUS= Células escamosas atípicas de significancia indeterminada

8.3 Cuantificación del ADN obtenido de las biopsias de pacientes.

De las 80 biopsias obtenidas de las pacientes incluidas en este estudio se extrajo el ADN para realizar la detección y la tipificación del VPH. Una vez obtenido el ADN de cada una de las muestras se cuantificó midiendo su absorbancia (A) a 260 nm mediante espectrofotometría. Más del 90% de las muestras de ADN obtenidas poseían un índice de pureza A (260/280) mayor a 1.8 y concentraciones en un rango de 10 a 9,100 ng de ADN por μ l, como se muestra en los ejemplos de la Tabla 11.

Tabla 11. Cuantificación del ADN de las biopsias de las pacientes

Biopsia con Lesión	Absorbancia (A_{260}/A_{280})	Conc. ng/ μ L	Biopsia sin Lesión	Absorbancia (A_{260}/A_{280})	Conc. ng/ μ L
Muestras de pacientes con LIEBG					
1LB	2.19	10,0	1SB	1.87	49,3
2LB	1.68	2,800	2SB	1.94	2,200
3LB	1.96	25,8	3SB	2.02	6,600
4LB	1.97	1,300	4SB	1.97	4,200
5LB	2.34	500	5SB	1.96	3,600
6LB	2.22	300	6SB	2.14	1,600
7LB	2.04	1,200	7SB	4.06	27,1
8LB	1.84	16,0	8SB	2.96	600
9LB	2.00	3,000	9SB	3.18	9,100
10LB	2.40	13,3	10SB	1.87	6,800
Muestras de pacientes con LIEBG					
1LA	1.90	2,200	1SA	1.68	2,200
2LA	1.88	43,5	2SA	1.96	14,5
3LA	1.78	22,5	3SA	1.97	3,900
4LA	2.76	8,600	4SA	1.97	26,5
5LA	1.20	1,300	5SA	2.34	400
6LA	2.04	1,500	6SA	2.22	400

7LA	1.85	400	7SA	1.84	400
8LA	1.84	1,200	8SA	2.00	13,0
9LA	2.25	6,600	9SA	2.04	2,600
10LA	2.19	33,5	10SA	1.94	600
Muestras de pacientes con CaCu					
1LC	1.68	1,500	1SC	1.68	8,00
2LC	1.96	2,000	2SC	1.90	6,500
3LC	1.97	2,200	3SC	1.88	2,400
4LC	1.97	1,500	4SC	1.78	6,600
5LC	1.20	800	5SC	1.85	17,5
6LC	2.04	33,7	6SC	1.84	3,400
7LC	1.85	1,300	7SC	2.25	4,200
8LC	1.84	16,0	8SC	2.19	1,300
9LC	2.25	2,700	9SC	1.97	1,900
10LC	1.84	1,500	10SC	1.96	1,200

En el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa del ADN de las biopsias se observó una sola banda sin barrido lo cual sugirió que el ADN estaba íntegro y era de alto peso molecular y por tanto óptimo para la realización del estudio (Figura 8.1).

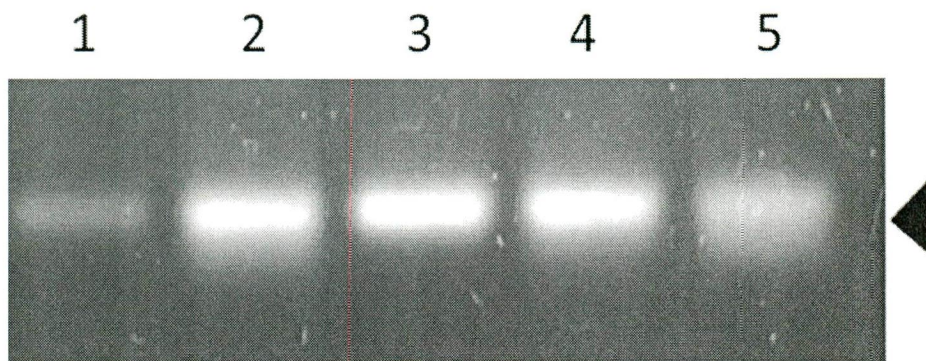


Figura 8.1 Perfil electroforético del ADN genómico obtenido de muestras representativas incluidas en este estudio. Gel de agarosa al 2%, representativo de todas las muestras analizadas, Carriles 1-5 ADNg obtenido de las biopsias de distintas pacientes. Se cargaron 3 μ L del ADN total extraído mezclado con 2 μ L de buffer de carga EZ-Vision. La flecha indica el ADNg de alto peso molecular.

8.4 Determinación de la presencia de VPH en las biopsias de las pacientes.

Para determinar la presencia viral se realizó una amplificación de un fragmento de 450 pb del gen L1 el cual está conservado en los diferentes genotipos de VPH. Para estandarizar las condiciones de amplificación por PCR del gen L1 se utilizó ADN extraído de la línea celular HeLa, la cual tiene integrado en su genoma al virus de VPH del tipo 18, también se incluyó el ADN genómico obtenido de una biopsia de una paciente que no tenía lesión (control negativo). Ambas amplificaciones se hicieron por duplicado y utilizando dos concentraciones de ADN genómico (50 y 100 ng). Para la estandarización de la PCR con oligonucleótidos MY09/MY11 se realizaron varias pruebas con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (cloruro de magnesio), entre 0.6mM a 2.5mM, determinando como la concentración más favorable 0.9mM de $MgCl_2$. Las condiciones de amplificación también fueron analizadas, determinando 94°C (1min-30seg) para la desnaturalización, 94°C (15seg), 55°C (45seg), 72°C (30seg), 30 ciclos, Así mismo también se amplificó un fragmento de 140pb del gen constitutivo GAPDH como control positivo interno, el cual se pudo observar en la amplificación del ADN de HeLa y de la biopsia sin lesión. La concentración del ADN genómico obtenido

de biopsias depende del tamaño de las muestras, en biopsias con muy poco material la concentración obtenida tiende a ser baja, como fue el caso de algunas muestras analizadas. La estandarización de la técnica de PCR permitió determinar la concentración mínima para detectar la presencia viral en las biopsias de las pacientes. De este ensayo se determinó que 50 ng era suficiente para amplificar el genoma viral por lo que esta fue la concentración que seleccionamos para trabajar con el ADN de las biopsias de pacientes (Figura 8.2).

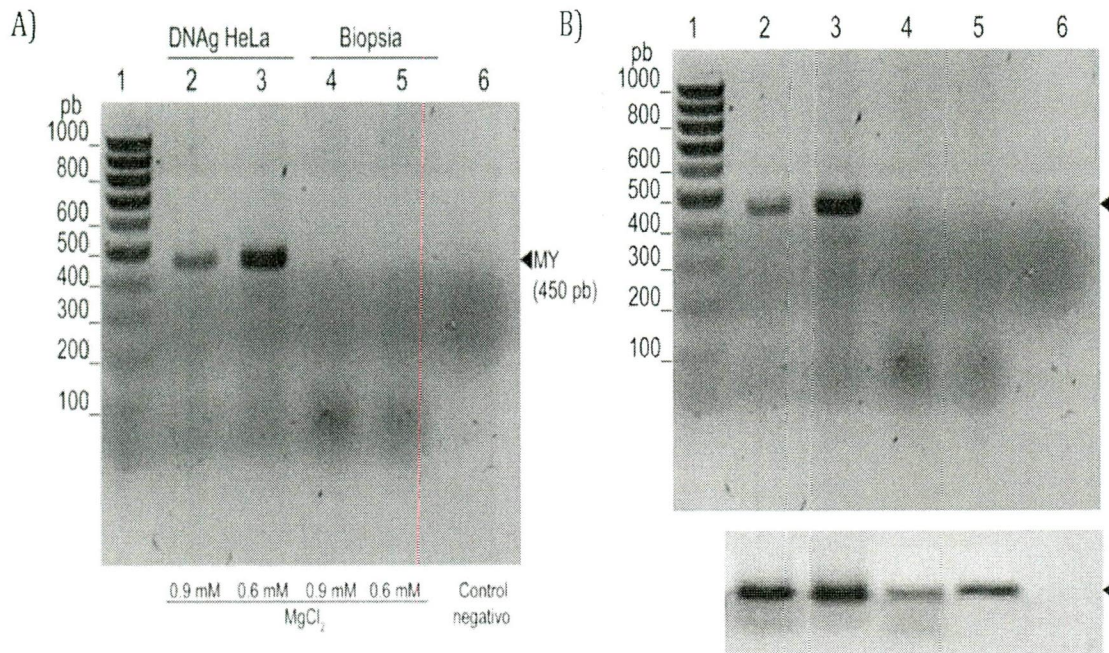


Figura 8.2 Perfil electroforético de las condiciones de estandarización de los genes L1 y GAPDH. A) Estandarización de PCR con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (0.9mM y 0.6mM), en cultivo celular HeLa y control negativo. B) Se amplificó un fragmento de 450pb la región L1 de VPH. Carril 1: marcador de talla molecular, carriles 2 y 3 amplificación a partir de 50 y 100 ng de ADN de células Hela, respectivamente, carriles 4 y 5 ADN de una biopsia sin lesión, carril 6 control negativo de la PCR. En la parte inferior del gel se muestra la amplificación del fragmento de 140 pb del gen GAPDH.

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación del gen L1 se procedió a determinar la presencia del ADN viral en las biopsias obtenidas de los pacientes.

El resultado de la amplificación se resolvió en geles de agarosa por medio de electroforesis -y se visualizó en un transiluminador de UV, considerándose como positivo la presencia de la banda de 450pb y como control negativo de la PCR una reacción donde se reemplazó el ADN por agua des-ionizada. En la figura 8.3 se muestra un gel representativo de todas las muestras analizadas en el que se observa que 9 de las biopsias fueron positivas (carriles 1-4, 6-9 y 11) y 2 negativas (carriles 5 y 10), el carril 12 corresponde al control negativo de PCR, en el cual podemos observar que no hay amplificación, tal y como es de esperar.

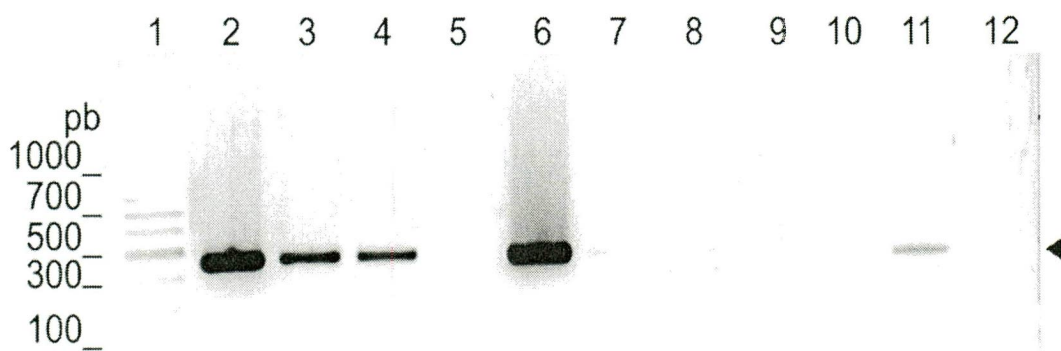
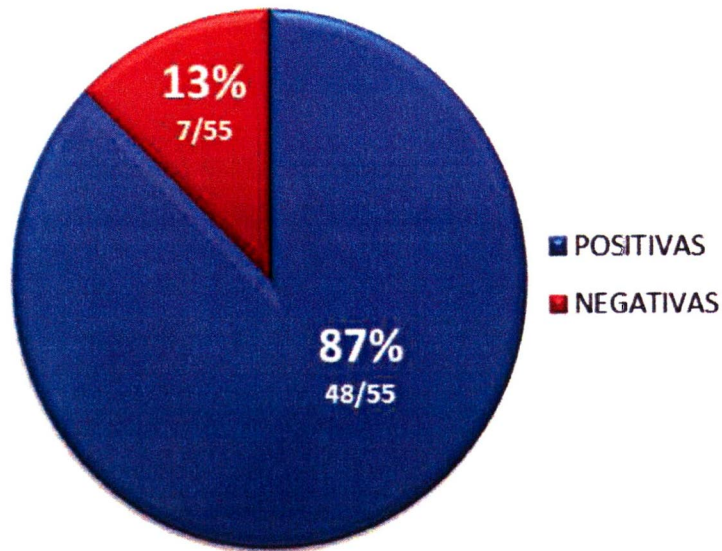
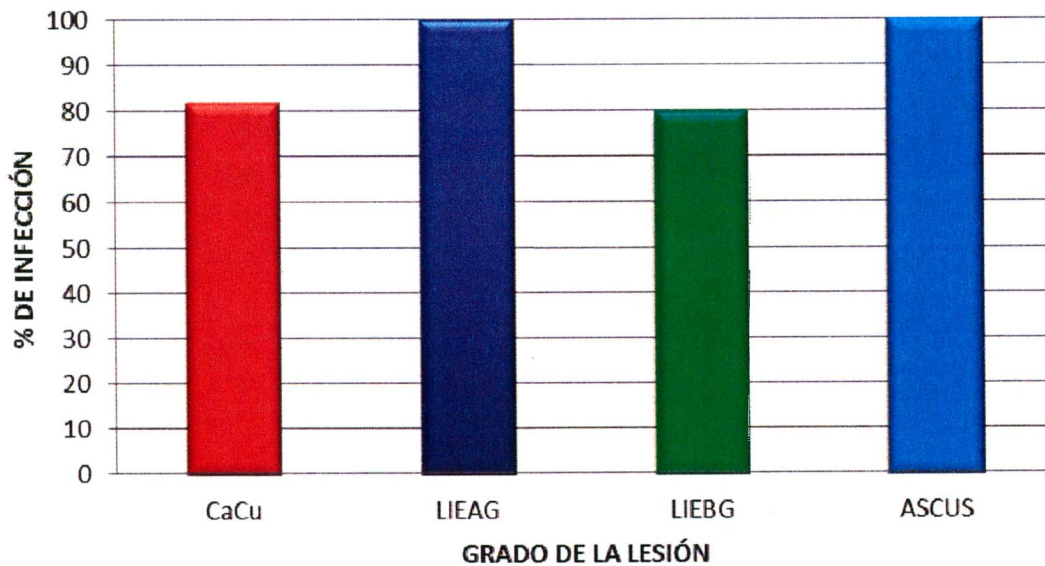


Figura 8.3 Perfil electroforético para la detección de VPH en las biopsias de pacientes. Gel de agarosa al 2%, teñido con EZ-vision. Carriles 1-11 biopsias de pacientes, carril 12 control negativo. La flecha indica el fragmento de 450 pb del gen L1.

De las 55 biopsias obtenidas de la región con lesión en el cérvix, se observó que el 87% (48/55) de las pacientes incluidas en este estudio fueron positivas para la infección con VPH (Gráfica 3). Sin embargo, cuando se distribuyeron las biopsias infectadas por tipo de lesión en todos los grupos el porcentaje de infección fue igual o mayor a 80 (Gráfica 4) y se encontró que no existía correlación entre estas variables ($\chi^2_{(0.05,3)} = 4.26$, $p=0.235$). Este resultado nos sugirió que conocer solamente si hay infección o no con VPH no nos permitiría predecir el tipo de lesión que podría padecer la paciente.



Gráfica 3. Porcentaje de biopsias positivas y negativas a la infección con VPH. La gráfica muestra el porcentaje de muestras positivas y negativas para VPH.



Gráfica 4. Muestras positivas para VPH por grado de la lesión. Porcentaje de la población de estudio positivas para VPH de acuerdo al grado de lesión determinada por el estudio colposcópico.

*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

*ASCUS= Células escamosas atípicas de significancia indeterminada

8.5 Genotipificación de los virus de VPH en las biopsias de las pacientes.

Para la genotipificación del VPH, se utilizó el microarreglo de baja densidad CLART HPV2 que permite detectar simultáneamente la presencia de 35 genotipos de virus VPH, los cuales incluyen el 6, 11, 40, 42, 44, 54, 58, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 84, 89 y 91 considerados de bajo riesgo oncogénico y los genotipos: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 83 y 85 de alto riesgo oncogénico. Una de las ventajas de la utilización de este microarreglo es que permite determinar la presencia de coinfección en las biopsias de las pacientes.

Los resultados obtenidos nos permitieron observar que en la mayoría de las pacientes con diagnóstico de CaCu la presencia de VPH16 es alta, ya que este genotipo viral se encuentra presente tanto en biopsias con lesión como en la biopsia de la región sin lesión de la mayoría de estas pacientes. Sin embargo, observamos que en algunos casos no se detectó la presencia de algún tipo de VPH en la zona de la lesión, lo cual podría estar relacionado a que la paciente podría estar infectada con un genotipo de VPH que no está presente en el microarreglo. Un ejemplo de esto, se visualiza en la figura 8.4, en la cual podemos observar que en la zona de la lesión de la paciente A no se detecta ningún tipo de VPH, pero interesantemente en su biopsia sin lesión visible al estudio colposcópico (A2), detectamos la presencia de VPH16. Un caso contrario es la paciente B, en la cual se detectó VPH16 en la biopsia con lesión, mientras que en la biopsia sin lesión (B2) no se detectó ningún genotipo viral.

En la figura 8.5, observamos la genotipificación de VPH de las pacientes diagnosticadas con LIEAG, en las cuales se detectaron diversos tipos de VPH. En este grupo en particular se pudo visualizar la presencia de coinfección con diferentes genotipos de VPH, un ejemplo de ello son los resultados de la genotipificación de las biopsias de las pacientes J, K, N, Ñ, O, P, Q, en las que la mayoría de las coinfecciones están presentes con dos genotipos de VPH, pero

interesantemente observamos que en la paciente K, en su biopsia sin lesión (K2), se detectaron cuatro genotipos diferentes de VPH-AR (16, 68, 39 y 59), mientras que en su biopsia con lesión sólo se observa VPH16. Otro ejemplo de la presencia de coinfección en nuestra población de estudio es la paciente J en la cual se detecta infección con VPH16 en la zona con lesión y en la zona sin lesión se detecta coinfección con VPH16 y VPH58.

Finalmente, la genotipificación de las pacientes diagnosticadas con LIEBG, se presentan en la figura 8.6., que abarca un grupo representativo de pacientes diagnosticadas con LIEBG. Se presentan seis pacientes en las cuales no se detectó la presencia de algún genotipo viral presente en el microarreglo, a excepción de la paciente V, en la cual se detectó VPH16 en la biopsia sin lesión (V2), curiosamente en la biopsia con lesión de esta misma paciente no se detectó ningún genotipo de VPH.

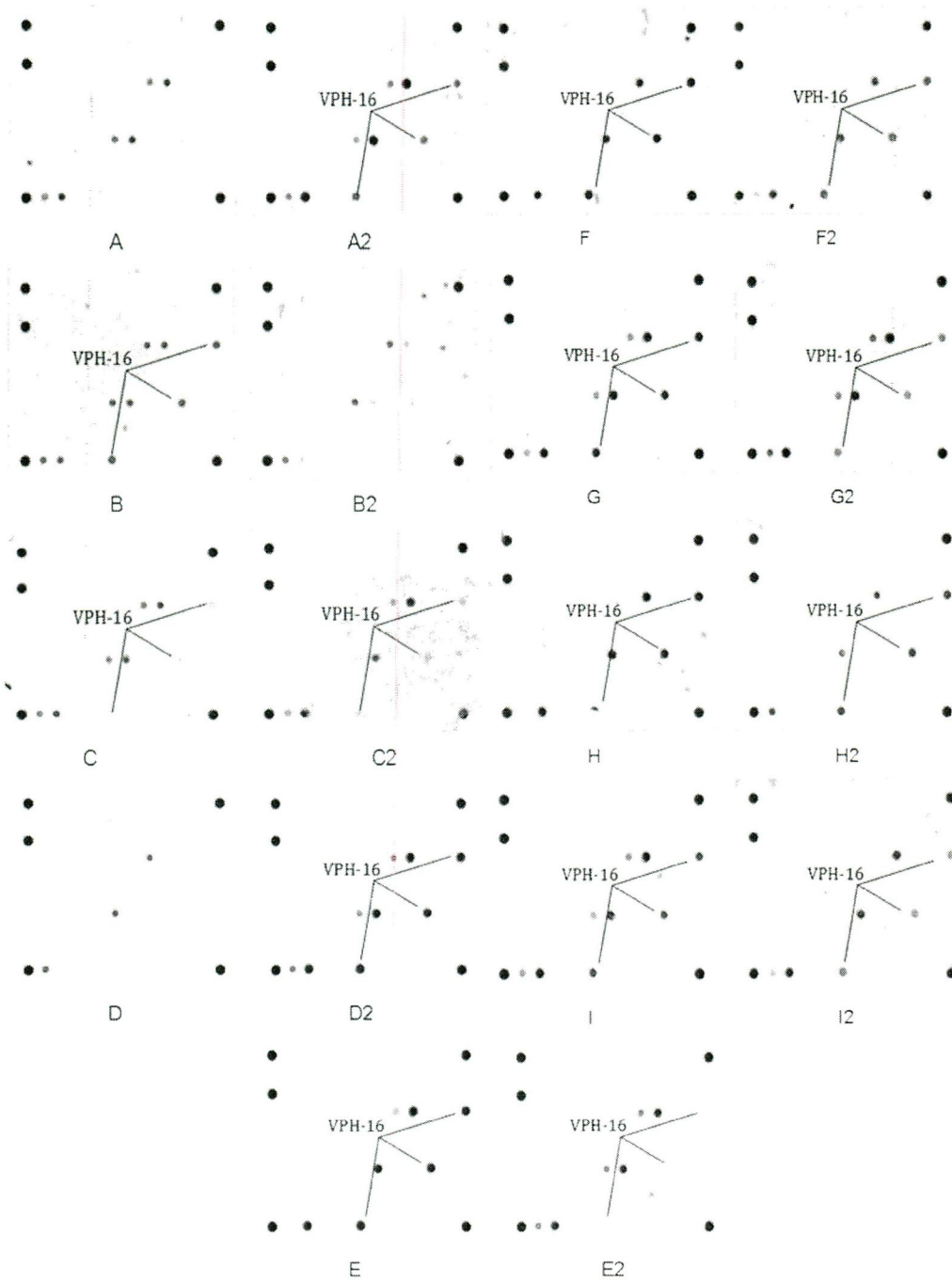


Figura 8.4 Genotipificación de pacientes diagnosticadas con CaCu. Microarreglos de nueve pacientes diagnosticadas con CaCu, las letras A, B, C, D, E, F, G, H, I corresponden a las nueve pacientes y el número 2 se refiere a la biopsia de la misma paciente de una zona sin lesión. Las flechas señalan el tipo viral identificado, el cual está por triplicado.

*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

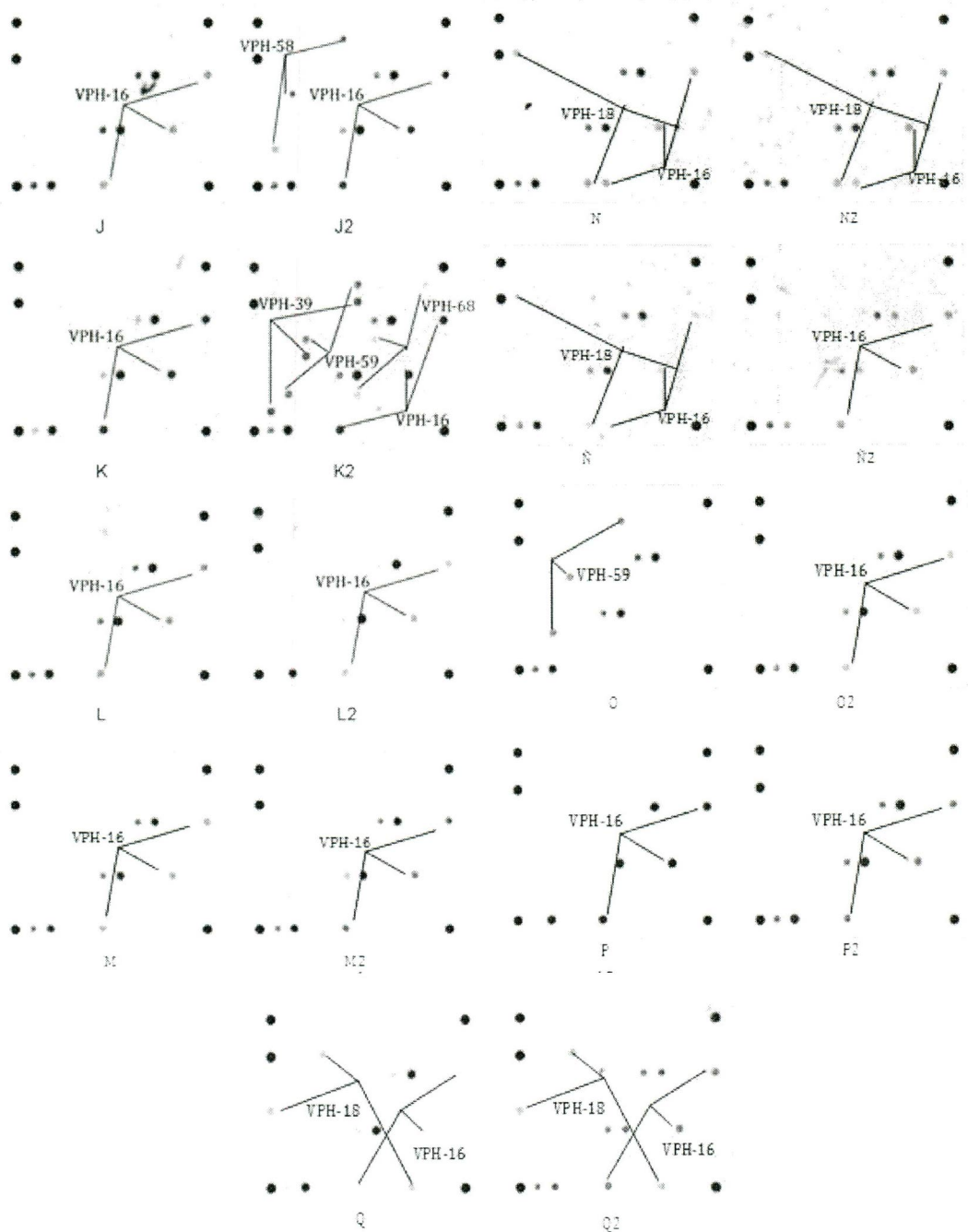


Figura 8.5 Genotipificación de pacientes diagnosticadas con LIEAG. Microarreglos de nueve pacientes diagnosticadas con LIEAG, las letras J, K, L, M, N, Ñ, O, P, Q corresponden a las nueve pacientes y el número 2 se refiere a la biopsia de la misma paciente de una zona sin lesión. Las flechas señalan el tipo viral identificado, el cual está por triplicado.

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

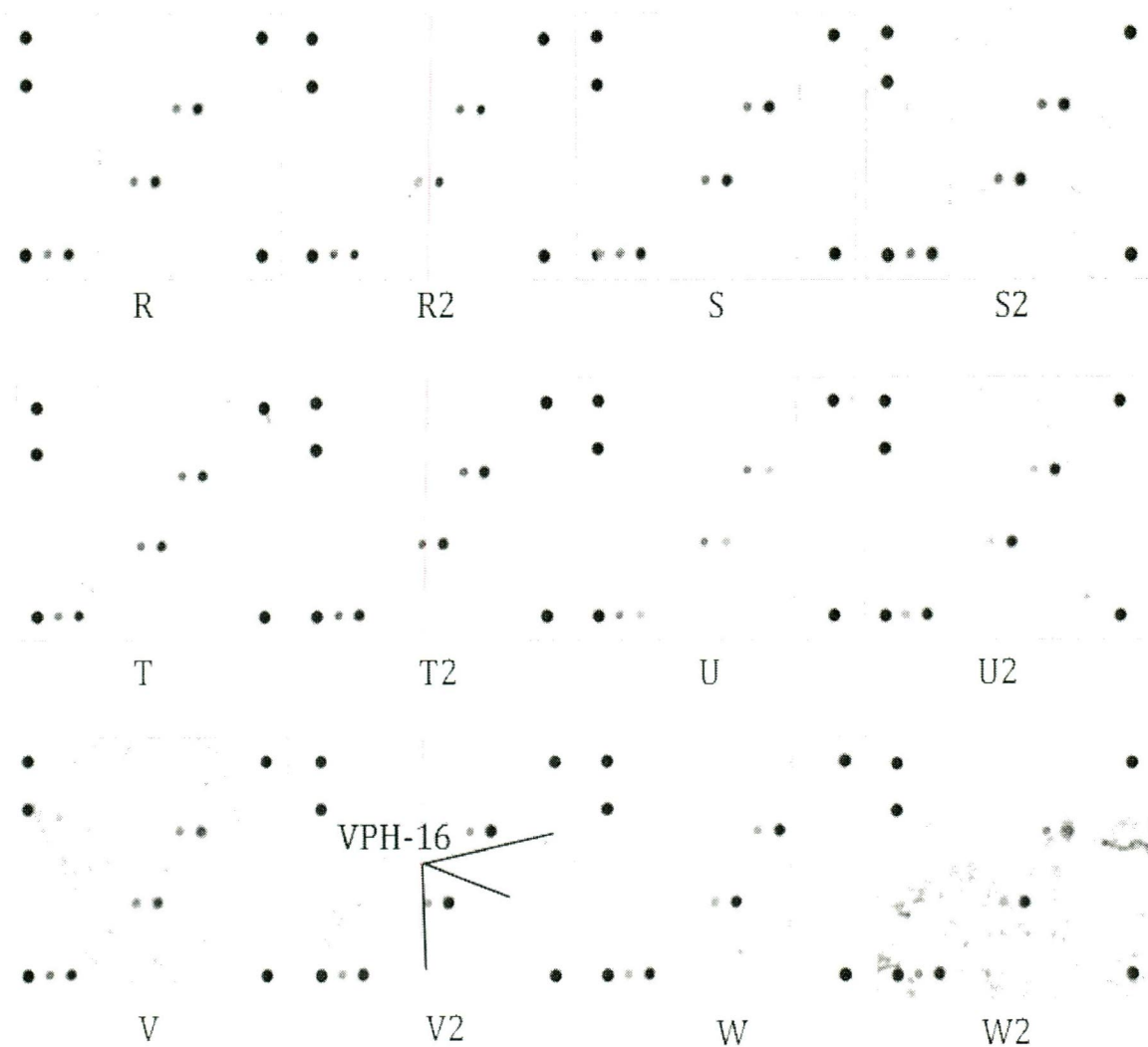
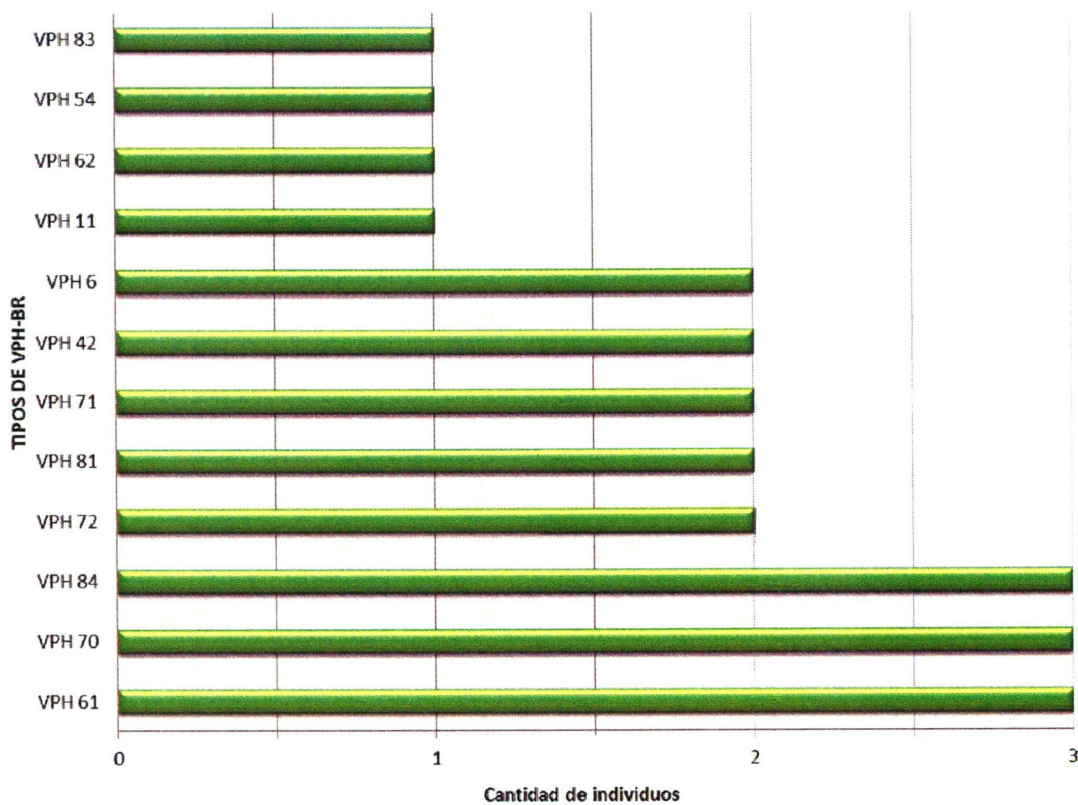


Figura 8.6 Genotipificación de pacientes diagnosticadas con LIEBG. Microarreglos de seis pacientes diagnosticadas con LIEBG, las letras R, S, T, U, V, W corresponden a las seis pacientes y el número 2 se refiere a la biopsia de la misma paciente de una zona sin lesión. Las flechas señalan el tipo viral identificado, el cual está por triplicado.

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

8.6 Análisis de la Genotipificación

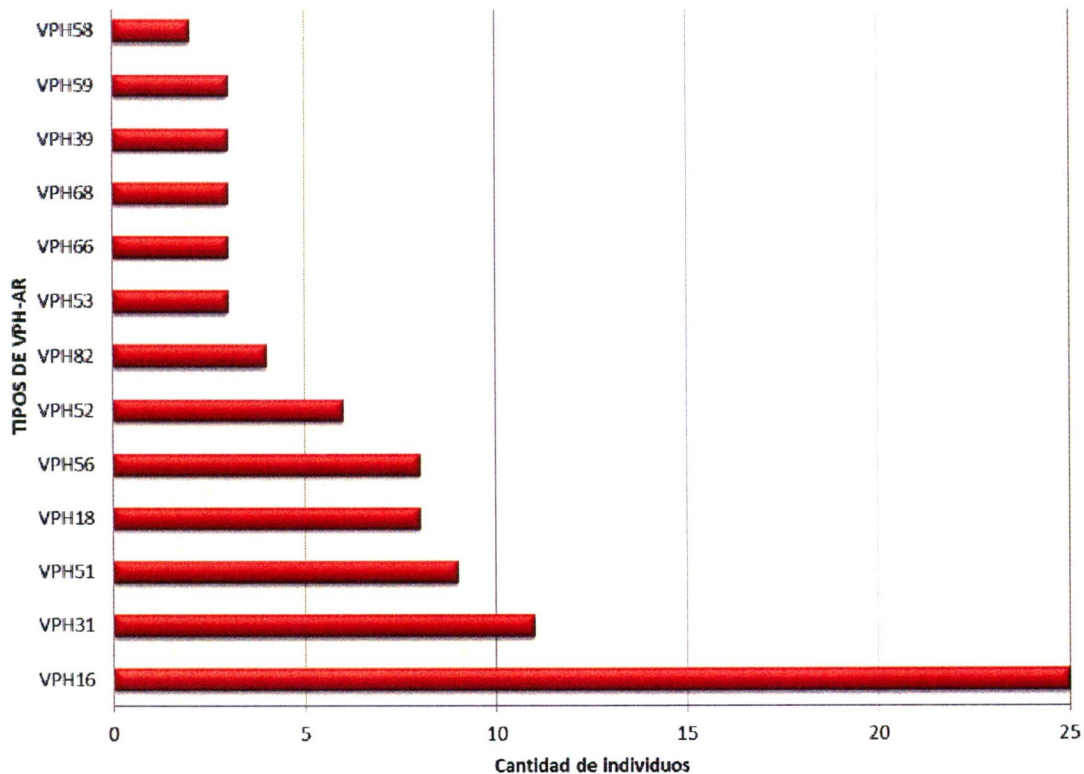
Los datos obtenidos de la genotipificación se analizaron para determinar cuáles eran los genotipos de VPH más frecuentemente encontrados en las biopsias estudiadas. Las biopsias analizadas tienen 25 tipos de VPH diferentes de los cuales 12 genotipos corresponden a VPH-BR (BR: bajo riesgo), entre ellos encontramos con mayor frecuencia VPH61, 70 y 84, presentes en el 6.3% (3/48) de las pacientes (Gráfica 5). En la Gráfica 6, se muestran los 13 genotipos de VPH-AR (AR: alto riesgo) encontrados en nuestra población. Observamos que los VPH-AR con mayor frecuencia son VPH16, presente en el 52% (25/48) de las biopsias genotipificadas, VPH31 presente en el 22.9% (11/48) de las biopsias y VPH51 presente en el 18.8% (9/48) de las biopsias.



Gráfica 5: Tipos de VPH-BR encontrados en las biopsias con lesión. Frecuencia de los genotipos de VPH-BR.

*VPH-BR= Virus de Papiloma de Bajo Riesgo

Es importante señalar que en estos resultados de Genotipificación de VPH-BR, los VPH11 y VPH6 se encontraron en una frecuencia menor (3.6%) comparado a lo reportado en la literatura (Alejo, *et al.* 2004). Ya que se ha observado en diversos estudios que este tipo de genotipos tienen una mayor prevalencia en lesiones intraepiteliales leves como LIEBG y ASCUS.

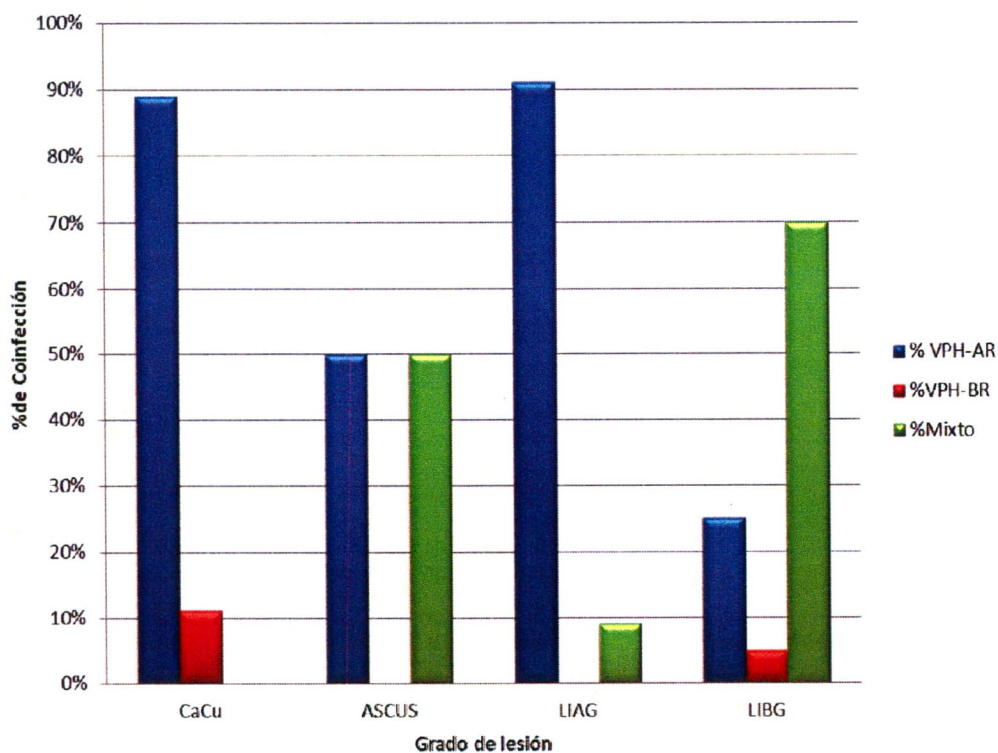


Gráfica 6: Tipos de VPH-AR encontrados en las biopsias con lesión. Frecuencia de los genotipos de VPH-AR.

*VPH-AR= Virus de Papiloma de Alto Riesgo

Posteriormente, analizamos la distribución del poder oncogénico de los VPHs encontrados en nuestra población en cada uno de nuestros grupos de estudio. Se encontró que el 64.6% (31/48) de las pacientes infectadas poseía más de un tipo viral con diferente poder oncogénico, es decir estaban infectadas con VPH de alto y bajo riesgo, mientras que el resto (17/48) sólo estaba infectada por VPH de alto riesgo. Al analizar la presencia de VPH de AR y BR por grupos de lesiones

encontramos que la mayoría de las lesiones de CaCu (88.8 %, 8/9) y de LIEAG (90.9%, 10/11), que son las dos lesiones más severas, presentaban coinfecciones por VPH-AR. Sin embargo las LIEBG tenían el porcentaje menos elevado de infección por VPH-AR (25%, 5/20), mientras que en la mayoría de ellas se encontraron VPHs de alto y bajo riesgo (70%, 14/20) (Gráfica 7). La mitad de las lesiones indeterminadas (ASCUS) presentaron coinfecciones con VPH-AR y la otra mitad con VPH-AR/BR (Gráfica 7). Las coinfecciones por VPH-BR fueron en todos los tipos de lesiones menor o igual al 11% (Gráfica 7). A partir de estos resultados se pudo determinar la correlación entre el poder oncogénico del VPH y la aparición de un tipo u otro de lesión ($\chi^2_{(0.05,6)} = 20.5, p=0.002$), lo cual sugiere que es posible predecir el tipo de lesión que se encontraría a partir del conocimiento del poder oncogénico (AR, BR, mixto) del VPH.



Gráfica 7: Porcentaje de VPH-BR, VPH-AR y VPH-Mixto en cada tipo de lesión. Prevalencia de los genotipos de VPH-BR (barras rojas), VPH-AR (barras azules), VPH-AR/BR (mixto, barras verdes) encontrados en la población de estudio.

*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

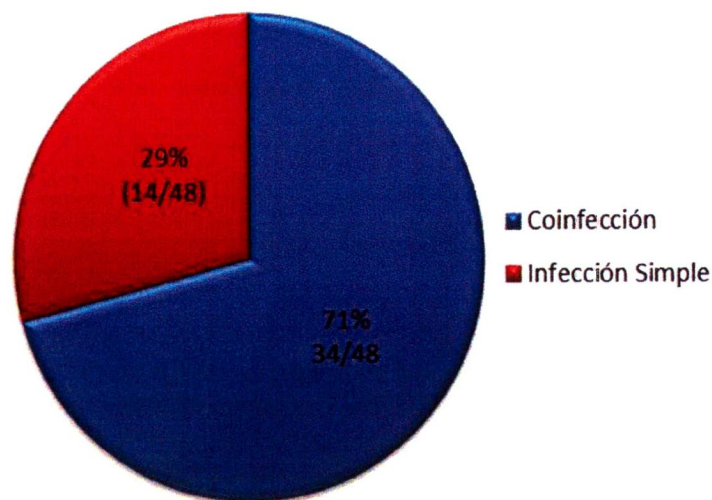
*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

*ASCUS= Células escamosas atípicas de significancia indeterminada

*VPH-BR= Virus de Papiloma de Bajo Riesgo

*VPH-AR= Virus de Papiloma de Alto Riesgo

Estos resultados resaltan la importancia de la detección y genotipificación de VPH en pacientes diagnosticadas con algún tipo de lesión pre-invasora e invasora, y la existencia de coinfecciones con VPH. En nuestro estudio, observamos que de las 48 muestras positivas a la presencia viral, y que además fueron genotipificadas con el microarreglo, 34 de las biopsias estudiadas fueron positivas para más de un genotipo de VPH (coinfección o múltiple) esto corresponde al 71% de la población de estudio, mientras que 14 de las biopsias fueron positivas con un solo genotipo viral (Infección Simple) las cuales corresponden al 29% de la población de estudio (Gráfica 8). Por otra parte también encontramos dependencia entre el tipo de infección (múltiple o simple) y el tipo de la lesión ($\chi^2_{(0.05,3)} = 23.04, p=0.000$).



Gráfica 8: Porcentaje de coinfección e infección simple. Porcentaje de la población de estudio que dio positivo para más de un tipo de VPH y el porcentaje de la población de estudio que dio positivo para un solo tipo de VPH.

8.7 Evaluación de la asociación entre la presencia de más de un genotipo de VPH y el grado de neoplasia en el cérvix

Hasta ahora hemos observado con nuestros resultados que la presencia de genotipos de VPH es necesaria para el desarrollo de algún tipo de lesión cervical, además de que hemos detectado un alto porcentaje de coinfecciones en la población de nuestro estudio. Aunado a esto recientemente se ha sugerido que la coexistencia de más de un genotipo de VPH en mujeres, podría ser coadyuvador y/o potenciador de la carcinogénesis. Es por ello que realizamos un análisis estadístico de la relación entre el grado de la lesión y la coinfección en la población de estudio. El estadístico utilizado se denomina Odds Ratio (OR), este es un cálculo estadístico para determinar la probabilidad de que un evento ocurra debido a la presencia de un factor, en este caso nosotros analizamos la probabilidad de que el desarrollo de una lesión se deba a una infección múltiple o a una infección simple.

La fórmula para calcular este estadístico OR y la su probabilidad son las siguientes:

$$OR = \frac{a.d}{b.c} \quad \%Prob. = \frac{OR}{OR + 1}$$

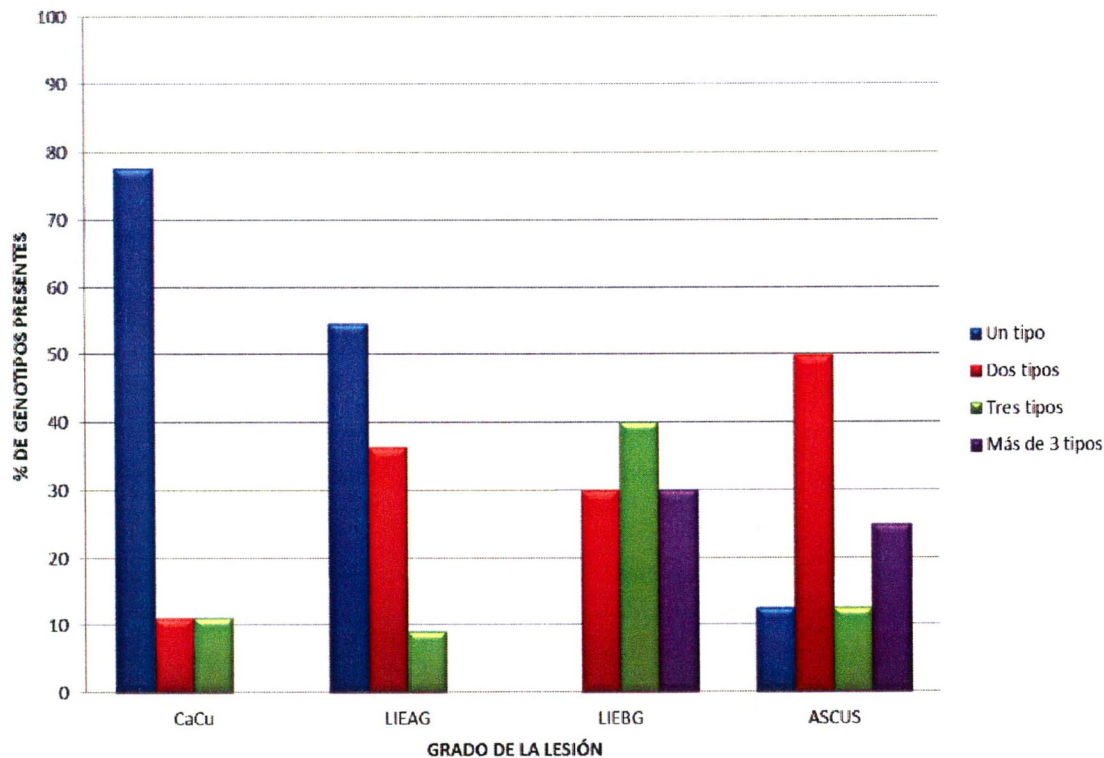
Interesantemente los datos obtenidos con este análisis estadístico, que se muestran en la tabla 13, nos permitieron observar que la probabilidad de tener una LIEBG es del 97.6% cuando está presente la coinfección con VPH, esta estimación es alta comparada con la probabilidad de desarrollar una displasia severa como LIEAG y CaCu, dada la presencia de coinfección, donde la probabilidad es menor del 18.6% y 5.8% respectivamente.

Tabla 12: Relación entre el grado de lesión y la coinfección

CaCu	Infección Simple	Coinfección	OR=0.0625	PROBABILIDAD
Lesión	7	2	CI95% (0.0106-0.3675)	5.8%
Otra Lesión	7	32	Z=3.067 P=0.0022	
LIEAG	Infección Simple	Coinfección	OR=0.2299	18.6%
Lesión	6	5	CI95% (0.0555-0.9527)	
Otra Lesión	8	29	Z=2.027 P = 0.0427	
LIEBG	Infección Simple	Coinfección	OR=41.0000	97.6%
Lesión	0	20	CI95% (2.2597-743.9164)	
Otra Lesión	14	14	Z=2.511 P = 0.0120	
ASCUS	Infección Simple	Coinfección	OR=3.5000	-----
Lesión	1	7	CI95% (0.3884-31.5421)	
Otra Lesión	13	26	Z=1.117 P = 0.2641	

Datos obtenidos con el programa estadístico MedCalc

También se realizó un análisis de los genotipos presentes en las pacientes de acuerdo al número de genotipos identificados y el grado de lesión diagnosticado. Los resultados se muestran en la Gráfica 9, donde se observa que en el 78 y 55 % de las pacientes con lesiones CaCu y LIEAG, respectivamente hay un solo un genotipo viral. En el caso de las lesiones leves, LIEBG y ASCUS, estas presentaron un porcentaje igual o mayor al 40% de coinfecciones con VPH. Específicamente en las biopsias LIEBG no hubo infecciones simples con VPH, todas presentaron una coinfección y el 40% de éstas tenían tres tipos de VPH diferentes. En el caso de ASCUS el 50% de las biopsias presentaba una coinfección con dos tipos de VPH diferentes.



Gráfica 9: Número de genotipos presentes en cada una de las pacientes por grupo de lesión.

La gráfica muestra la evaluación de la asociación entre la presencia de más de un genotipo de VPH y el grado de neoplasia en el cérvix.

*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

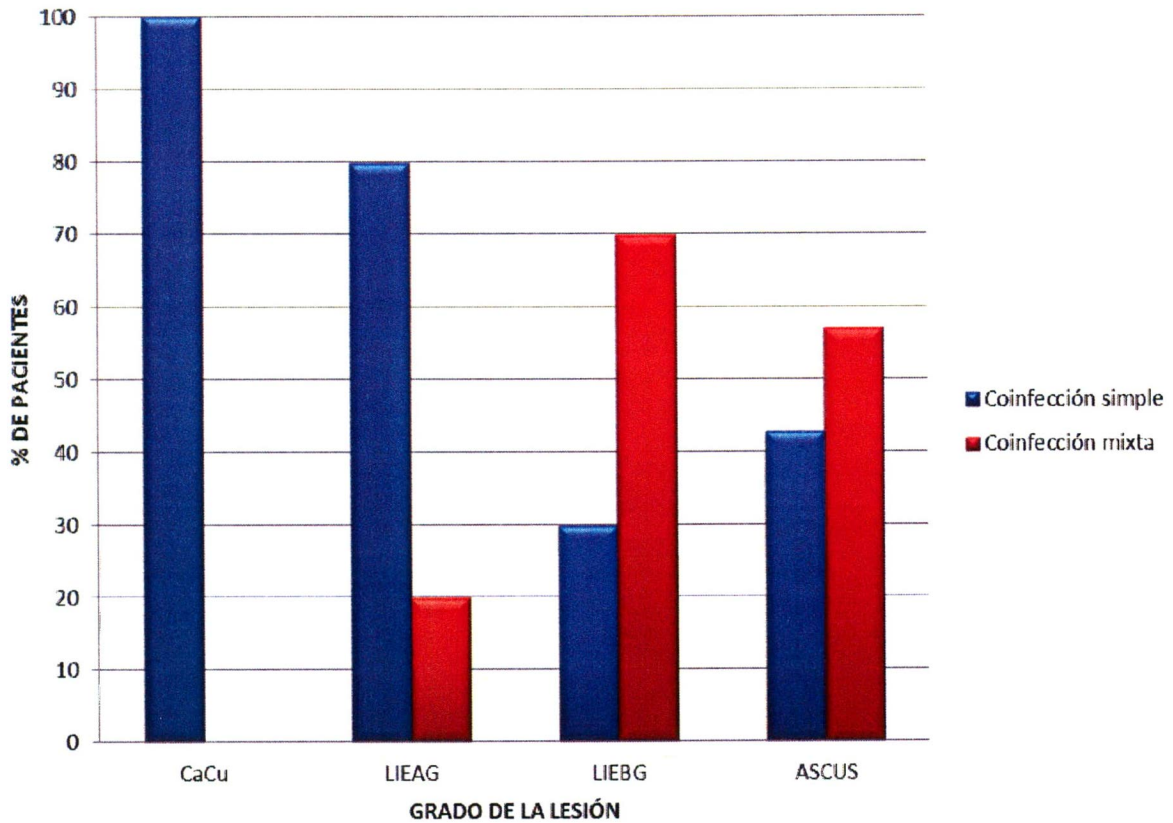
*ASCUS= Células escamosas atípicas de significancia indeterminada

Posteriormente, se calculó el porcentaje de pacientes positivas para una coinfección simple y/o una coinfección mixta de acuerdo al grado de la lesión. Derivado de este análisis se hallaron un total de 33 combinaciones diferentes de los genotipos de VPH, de las cuales 19 combinaciones son de coinfecciones mixtas, y 14 combinaciones corresponden a coinfecciones simples (Gráfica 10). De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar que el 71% de la población de estudio tiene coinfección con VPH y el 29% tiene una infección simple. Sin embargo, no se encontró correlación entre el tipo de coinfección y el grado de la lesión ($\chi^2_{(0.05,3)} = 6.77, p=0.08$).

Posteriormente se calculó el porcentaje de pacientes positivas para una coinfección simple y/o una coinfección mixta de acuerdo al grado de la lesión. Derivado de este análisis se encontraron un total de 33 combinaciones diferentes de los genotipos de VPH, de las cuales 19 combinaciones son de coinfecciones mixtas, y 14 combinaciones corresponden a coinfecciones simples (gráfica 10). De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar que el 71% de la población de estudio tienen coinfección con VPH y el 29% tiene una infección simple. Sin embargo, no se encontró correlación entre el tipo de coinfección y el grado de la lesión ($\chi^2_{(0.05,3)} = 6.77, p=0.08$).

Tabla 13: Coinfecciones mixtas y simples encontradas en las biopsias.

Coinfección Mixta	Cantidad de muestras	Coinfección Simple	Cantidad de muestras
16, 70	1	16 , 18	2
16 , 71	1	16 , 39	1
39, 61	1	16 , 31	1
39 , 81	1	66 , 68	1
18, 11	1	72 , 84	1
31, 42	1	70 ,71	1
59, 42	1	39, 51, 58	1
52, 54	1	16, 31 , 51	1
51, 61	1	16, 51 , 82	1
31, 56, 70	1	51,68,82	1
31, 56, 84	1	18, 52 y 56	1
51, 82 , 84	1	31, 52 ,56	1
31, 53 , 72	1	16,52,53,56	1
16, 31, 51, 62	1	16, 31, 66 , 68	1
16, 31, 51 , 83	1		
18, 52 , 56, 6	1		
18, 52, 56 , 61	1		
18,53,58,81	1		
16, 18, 31, 56, 66, 6	1		



Gráfica 10: Porcentaje de coinfección simple y mixta por grado de neoplasia en el cérvix.

*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

*ASCUS= Células escamosas atípicas de significancia indeterminada

Aun cuando no fue posible determinar una combinación con mayor frecuencia de VPH en específico, decidimos buscar cuales eran los VPHs encontrados con mayor frecuencia en las coinfecciones observándose cuatro tipos de VPH con una mayor frecuencia de los cuales el tipo VPH16 se encontraba en el 36.3% de las combinaciones de coinfección encontradas en esta población de estudio. De igual modo el VPH31 en el 33.3%, el VPH51 en el 24.2% y el VPH18 en el 21.2% En la Tabla 15 podemos ver la cantidad de combinaciones diferentes en las que se encontraban cada uno de estos VPH, así como el porcentaje correspondiente. Ello nos permite observar que VPH16 es el de mayor frecuencia en la población al igual que VPH31. Es importante señalar que VPH16 se encontró solo en lesiones

graves como CaCu y LIEAG, y en un porcentaje alto en coinfecciones, a diferencia de VPH31, que solo se encontraba en biopsias donde se detectó coinfección, en ninguna de nuestras biopsias observamos la presencia de VPH31 únicamente, este genotipo viral siempre estuvo coexistiendo con otros genotipos de VPH en las distintas pacientes donde fue detectado.

Tabla 14: VPHs encontrados con mayor frecuencia en las coinfecciones.

Tipo viral	Cantidad de combinaciones	Porcentaje
VPH-16	12	36.3%
VPH-31	11	33.3%
VPH-51	8	24.2%
VPH-18	7	21.2%

Luego de determinar los genotipos con mayor prevalencia en la población, realizamos un análisis estadístico OR, para establecer la probabilidad de tener algún tipo de lesión cuando está presente uno de los tipos de VPH encontrados con mayor frecuencia en las coinfecciones: Los datos se presentan en las siguientes tablas y se muestran por cada tipo VPH con mayor frecuencia en nuestra población (VPH16; VPH31 y VPH51). (Tablas 16, 17 y 18 respectivamente). Los siguientes estadísticos nos proporcionan información sobre la probabilidad de desarrollar una lesión cuando alguna paciente está infectada con unos de los tipos de VPH-AR encontrados más frecuentemente en este estudio. Observamos que la probabilidad de llegar a desarrollar un CaCu es 10 veces mayor si está presente la infección con VPH16 (OR = 10.4, p=0.034, Tabla 16). Cuando la paciente tiene VPH-31 tiene una probabilidad de 5 veces mayor de desarrollar una LIEBG (OR = 5.6, p=0.024, Tabla 16), y en las pacientes infectadas con VPH-51 es 7 veces más probable que desarrollen una LIEBG (OR = 7, p=0.025, Tabla 16). Es decir estos resultados sugieren que la infección por

VPH-16 es un factor de riesgo para desarrollar CaCu, mientras que la infección por VPH31 y 51 constituyen factores de riesgo para desarrollar LIEBG.

Tabla 15: Probabilidad de presentar CaCu cuando está presente VPH16.

CaCu	FREC.	VPH16	VPH-OTROS	OR=10.3529	PROB.
Lesión		8	1	CI95%	
	89.9%			(1.1784-90.9562)	91%
Otra		17	22	Z=2.108	
Lesión				P=0.0350	

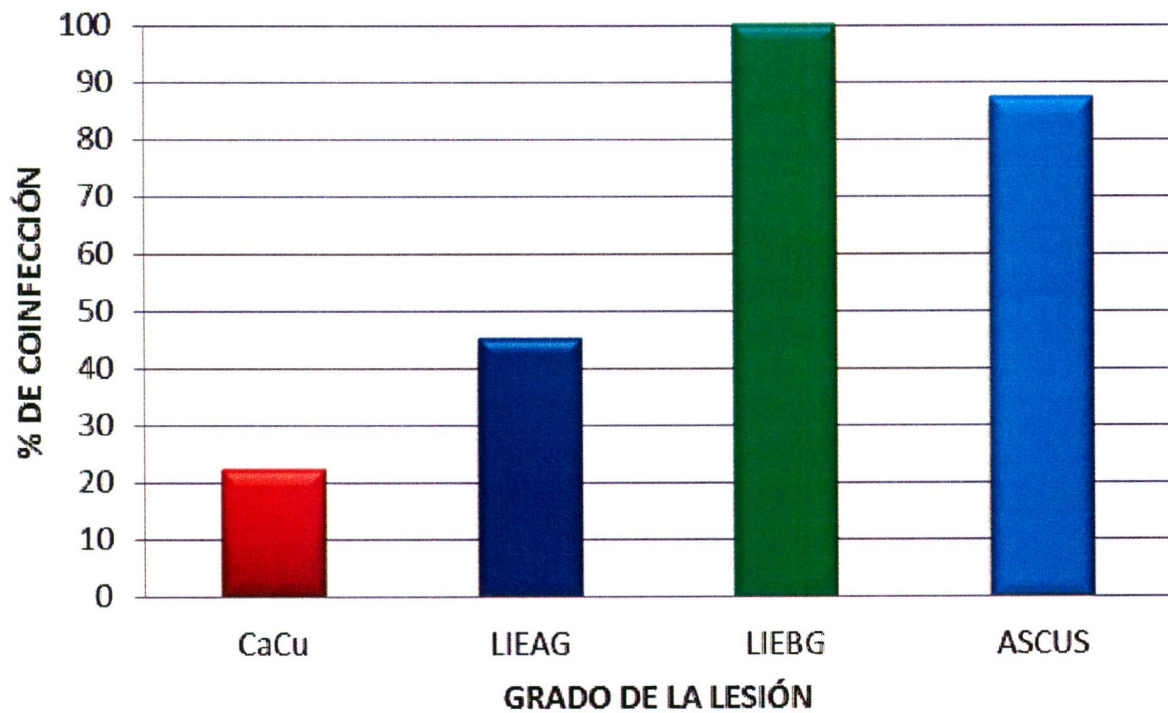
Tabla 16: Probabilidad de presentar LIEBG cuando está presente VPH-31.

LIEBG	FREC.	VPH31	VPH-OTROS	OR=5.5556	PROB.
Lesión		8	12	CI95%	
	40%			(1.2460-24.7700)	85%
Otra		3	25	Z=2.248	
Lesión				P=0.0245	

Tabla 17: Probabilidad de presentar LIEBG cuando está presente VPH-51.

LIEBG	FREC.	VPH51	VPH-OTROS	OR=7.0000	PROB.
Lesión		7	13	CI95%	
	35%			(1.2702-38.5756)	88%
Otra		2	26	Z=2.235	
Lesión				P=0.0254	

Con respecto a los otros genotipos de VPH encontrados en nuestro estudio, ninguno aumenta de forma significativa la probabilidad de desarrollar algún tipo de lesión intraepitelial leve, grave o CaCu.



Gráfica 11: Porcentaje de coinfección por grado de neoplasia en el cérvix.

*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

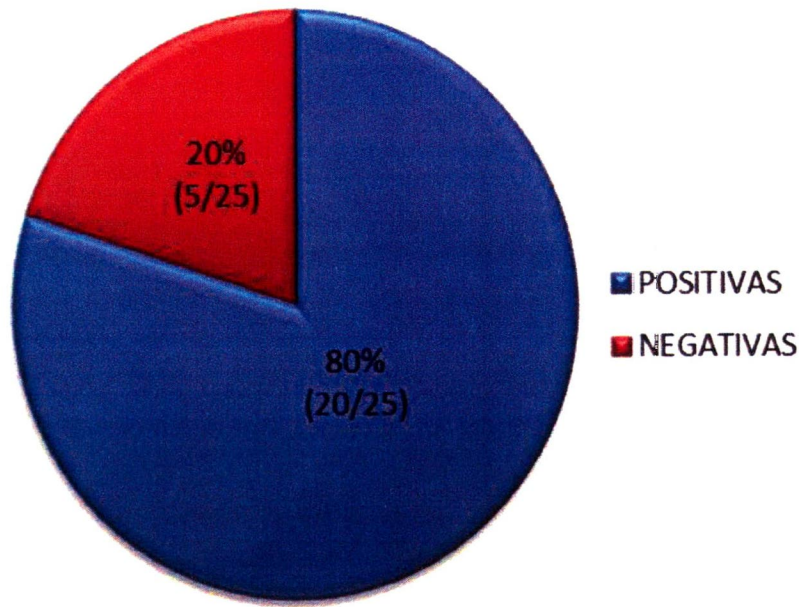
*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

*ASCUS= Células escamosas atípicas de significancia indeterminada

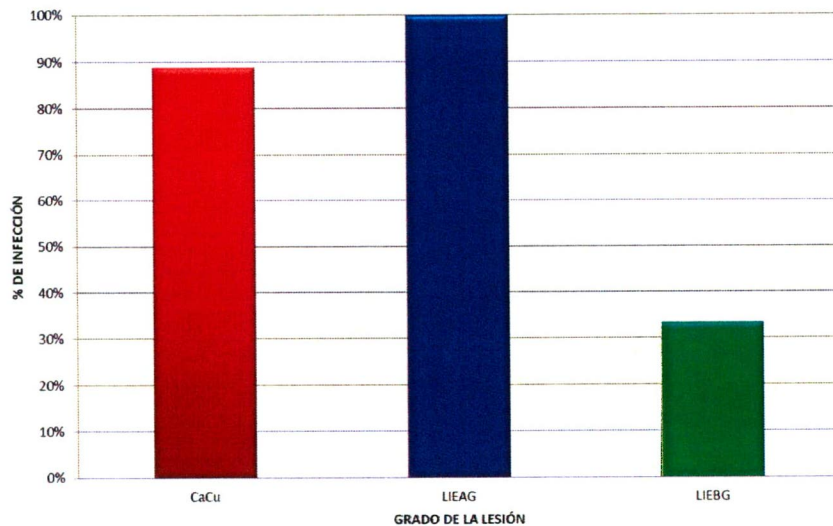
8.8 Resultados de las biopsias sin lesión

Con respecto a las biopsias de la zona del cérvix, de las 25 biopsias sin lesión analizadas, observamos que el 80% (20/25) de las muestras fueron positivas para VPH, y el 20% (5/25) fueron negativas para VPH, como se muestra en la gráfica 12. Como podemos ver el porcentaje de biopsias sin lesión positivas para VPH es muy similar al porcentaje de biopsias con lesión positivas a VPH, es decir; tanto en la zona con la lesión como en la zona sin lesión del cérvix el porcentaje de positividad a la presencia viral es alta. Los resultados de las pacientes positivas para VPH en la zona sin lesión en el cérvix se muestran en gráfica 12.

Posteriormente se determinó el porcentaje de infección con VPH en cada uno de los distintos grados de lesión, de aquellas pacientes a las cuales se les pudo tomar una biopsia de la zona sana del cérvix. Observamos que de las 9 pacientes diagnosticadas con CaCu 8 (89%) fueron positivas para VPH, de las 10 pacientes diagnosticadas como LIEAG, el 10 (100%) fueron positivas para VPH, de las 6 biopsias diagnosticadas con LIEBG, 2 (32%) fueron positivas para VPH. El porcentaje de las pacientes positivas para la infección con VPH se observada en los tres diferentes grupos de diagnóstico, se presenta en la siguiente gráfica. (Gráfica 13)



Grafica 12. Porcentaje de muestras positivas a VPH en la zona sin lesión en el cérvix.
 Porcentaje de muestras positivas y negativas para VPH. 80% de las muestras (20/25) fueron positivas para VPH y el 20% de las muestras (5/25) fueron negativas para VPH.



Grafica 13: Muestras positivas para VPH por grado de la lesión de las biopsias sin lesión.
 Porcentaje de la población de estudio positivas para VPH de acuerdo al grado de lesión determinada por el estudio colposcópico.

*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

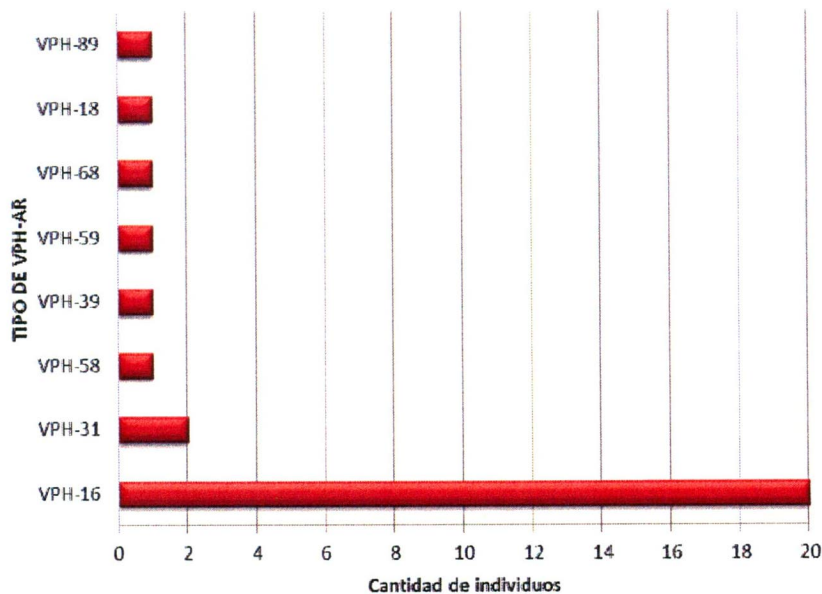
*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

Estos datos son interesantes debido a que en estudios de rutina, cuando no se ve daño en el cérvix, no se aplica un tratamiento a la paciente ya que no hay evidencia de algún daño, sin embargo es importante señalar que, aún cuando no se ve lesión alguna en el cérvix es recomendable hacer estudios de detección y tipificación de VPH para poder dar un tratamiento oportuno a la paciente antes de que se desarrolle la lesión.

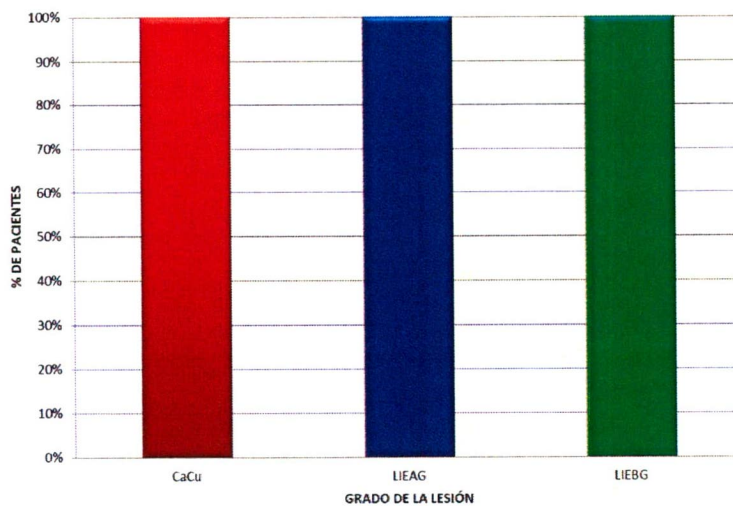
8.9 Análisis de resultados de microarreglos de las biopsias sin lesión.

Posteriormente, después de detectar la presencia viral, se realizó la Genotipificación de los VPHs presentes en las biopsias sin lesión, en las cuales observamos la presencia de 8 genotipos de VPH, interesantemente es importante señalar que todos estos genotipos eran de AR. En la gráfica 14, observamos los distintos genotipos encontrados en estas biopsias así como su frecuencia en la población de estudio. Nuevamente podemos observar que VPH-16 tiene una mayor frecuencia al encontrarse en el 100% de las pacientes infectadas con VPH, el VPH31 se encuentra en el 10% de este grupo de biopsias y finalmente VPH58 está presente en el 5% de las biopsias sin lesión.



Gráfica 14: VPH encontrados en las biopsias sin lesión. Prevalencia de los genotipos de VPH-Alto Riesgo encontrados en la población de estudio.

Como se puede observar en las biopsias correspondientes a la zona del cérvix sin lesión no se encontraron VPH-BR, por el contrario en todas sólo detectamos VPH-AR, estos datos se visualizan en la Gráfica 15.



Gráfica 15: Prevalencia de VPH-AR en biopsias sin lesión.

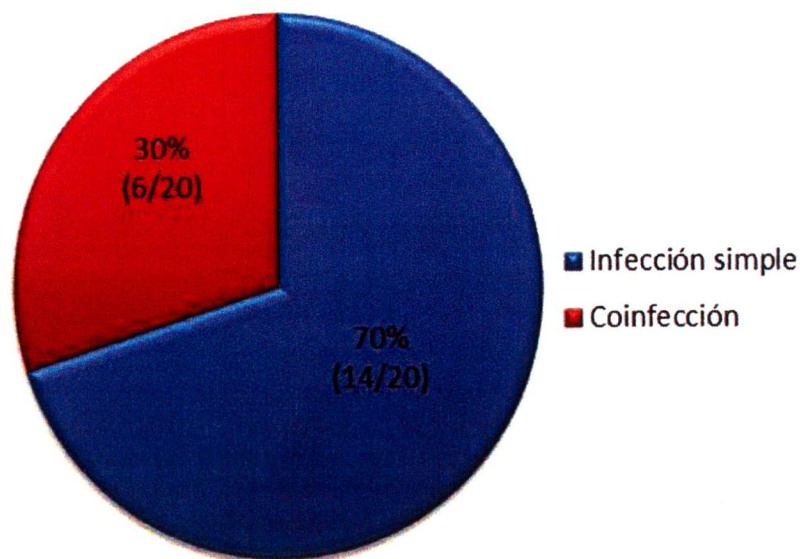
*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

Es importante resaltar que en la zona sana del cérvix sólo encontramos la presencia de VPH-AR, ya que si bien no había lesión visible al estudio colposcópico en el momento en el que se tomó la biopsia, la probabilidad de que se desarrolle una lesión en la paciente es muy alta ya que de acuerdo a lo reportado en la literatura los VPH-AR tienen la facilidad de que sus oncoproteínas como lo es E6 y E7, interactúen con sus blancos específicos, y por ende se lleve a cabo la inestabilidad y la transformación celular, promoviendo de esta manera el desarrollo de neoplasias intraepiteliales, que de no ser atendidas oportunamente pueden llevar a displasias graves como lo es LIEAG o un CaCu (Gravitt, *et al.* 2007).

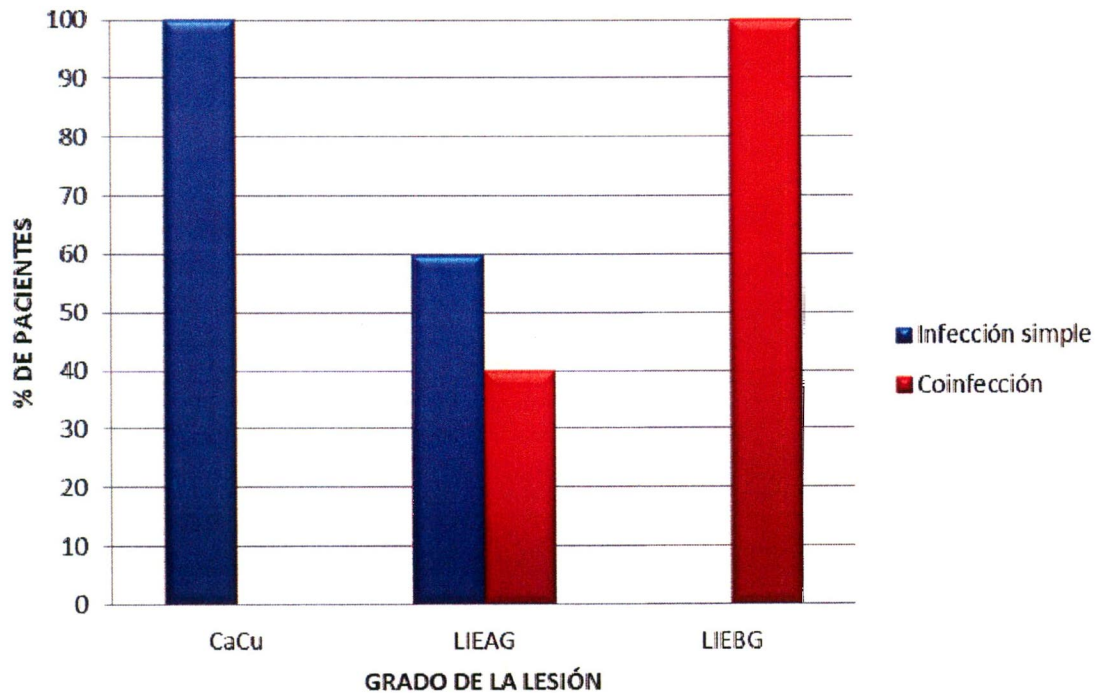
Las 20 biopsias sin lesión en las que se detectó la presencia de VPH, se genotipificaron por medio del microarreglo, y al analizarlas observamos que el 70% de estas pacientes presentaban una infección simple en la zona sana del cérvix, mientras que en el 30% de estas biopsias se pudo determinar la presencia de coinfecciones. El porcentaje de pacientes que presentaban una infección simple y una coinfección en la zona sana del cérvix, se muestra en la Gráfica 16.



Gráfica 16: Infección múltiple e infección simple en biopsias sin lesión. Porcentaje de la población de estudio que dio positivo para más de un tipo de VPH y el porcentaje de la población de estudio que dio positivo para un tipo de VPH.

Como podemos ver, el porcentaje de coinfección en las muestras sin lesión es inverso al porcentaje de coinfecciones presentes en las biopsias con lesión al igual que el porcentaje de infecciones simples en las biopsias con lesión. Sin embargo es interesante resaltar que en la mayoría de las pacientes diagnosticadas con CaCu y de las cuales se logró obtener la biopsia de la zona sana, encontramos que en ambas biopsias de estas pacientes la infección con VPH era con el mismo genotipo (VPH16) al igual que en las pacientes diagnosticadas con LIEAG.

Realizamos el análisis de infecciones simples y coinfecciones presentes en las biopsias sanas de cada tipo de lesión, en las cuales observamos nuevamente un alto porcentaje de coinfecciones en LIEBG. El 100% de las pacientes con LIEBG en su zona sana también presentaban coinfección, mientras que en las pacientes diagnosticadas con CaCu también observamos la presencia de un solo genotipo viral, presentado una infección simple. El porcentaje de infecciones simples (infección con un solo genotipo de VPH) y de coinfecciones (infecciones con más de un tipo de VPH) de acuerdo al grado de lesión en las biopsias sin lesión se muestra en la Gráfica 17.



Grafica 17: Porcentaje de coinfección por grado de neoplasia en el cérvix.

*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

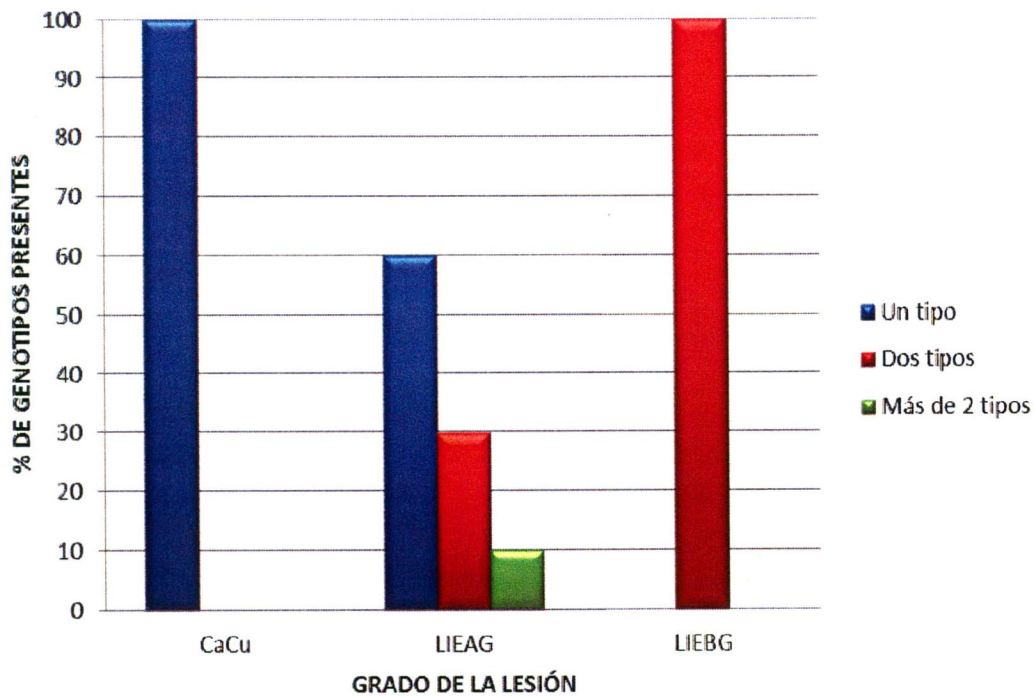
*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

Después de genotipificar cada una de las biopsias de la zona del cérvix sin lesión, se realizó el análisis de los genotipos presentes en estas biopsias, donde se observó el número de genotipos presentes en cada una de las pacientes clasificadas de acuerdo al grado de lesión diagnosticado. Los resultados se muestran en la gráfica 18.

En el grupo de pacientes con un grado de lesión severa, es decir, en CaCu y LIEAG se puede observar que en el 100% y el 60% respectivamente, sólo se encontró un genotipo viral, por el contrario en las LIEBG se encontró un 100% de coinfecciones con VPH (Gráfico 11). Distinguimos que, en el caso de las LIEBG no hubo infecciones simples con VPH, todas presentaban una coinfección donde se observan dos tipos de VPH diferentes infectando su zona sin lesión. Posteriormente, después de analizar el número de genotipos presentes en cada

una de las biopsias con lesión, se hizo el análisis de los genotipos presentes en cada una de las biopsias.



Gráfica 18: Número de genotipos presentes en cada tipo de lesión en las biopsias sin lesión. Evaluación de la asociación entre la presencia de más de un genotipo de VPH y el grado de neoplasia en el cérvix.

*CaCu= Cáncer Cérvico-uterino

*LIEAG= Lesión intraepitelial de alto grado

*LIEBG= Lesión intraepitelial de bajo grado

De acuerdo con lo anterior, observamos que la presencia de coinfecciones en lesiones severas no es tan alta en comparación con las lesiones leves. Posteriormente, después de analizar el número de genotipos presentes en cada una de las biopsias con lesión, se hizo énfasis en los genotipos que estaban presentes en cada una de las biopsias.

Tabla 18: Coinfecciones mixtas encontradas en las biopsias sin lesión.

Tipo(s) de VPH	Cantidad de muestras
16 y 58	1
16 y 18	1
16 y 31	2
16 y 89	1
16,39,59 y 68	1

Observamos en las combinaciones encontradas en las coinfecciones de las biopsias sin lesión, que VPH16 estaba presente en todos los casos, el porcentaje de los genotipos presente en estas biopsias se muestra en la tabla 19.

Tabla 19: VPHs encontrados con mayor frecuencia en las coinfecciones.

Tipo viral	Cantidad de combinaciones	Porcentaje
VPH-16	5	100%
VPH-18	1	10%
VPH-31	1	10%

8.10 Análisis de la expresión del oncogén E6 de VPH16 en las biopsias.

Se ha descrito que los niveles de expresión de los genes E6 y E7 es una de las principales diferencias entre los VPH-AR y BR, ya que existe una mayor expresión de estos oncogenes en las infecciones con VPH-AR (Evans *et al*, 2014). Las oncoproteínas, E6 y E7 de VPH-AR, son necesarias para la transformación de células epiteliales normales en células displásicas (Doorbar J, 2006). Es por ello que en este trabajo nos planteamos determinar la expresión del gen de E6 y analizar si encontrábamos una correlación entre su nivel de expresión y la coinfección. Para ello obtuvimos el ARN total de las biopsias de las pacientes

incluidas en este estudio. Éste se cuantificó midiendo la absorbancia mediante espectrofotometría y se analizó su integridad en un gel de agarosa. Las concentraciones obtenidas variaron de 10ng a 100ng, estas variaciones en concentración estuvieron relacionadas al tamaño de las biopsias. En la figura 8.7 se muestra un gel representativo de los ARN totales obtenidos donde se observa la presencia de las dos bandas que corresponden a las subunidades del ARN ribosomal 28S y 18S. Idealmente se espera una relación 2 a 1 de ARN 28S con respecto a 18S, sin embargo solo se pudo observar en algunas muestras (carriles 4, 6 y 9), esto probablemente debido al tiempo de almacenamiento de las biopsias posterior a la toma de muestra.

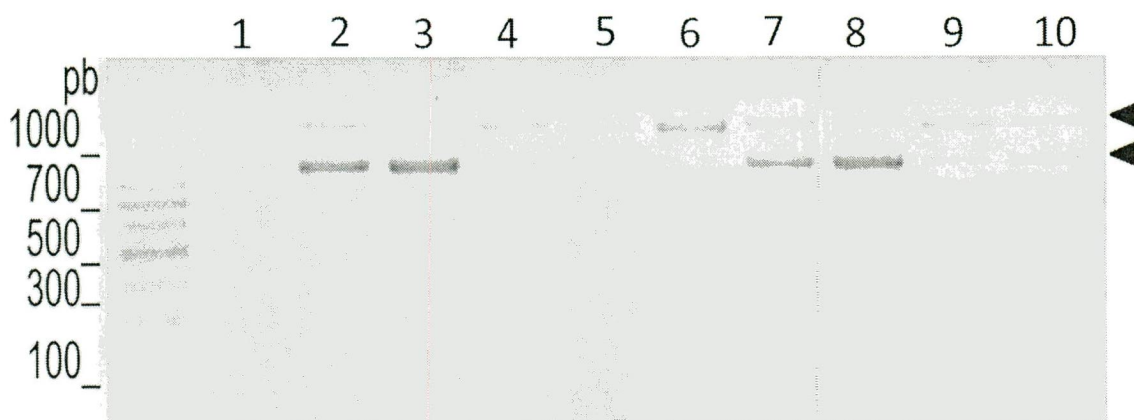


Figura 8.7 Perfil electroforético del ARN total obtenido de las muestras de las biopsias de los pacientes. Gel de agarosa al 1.5%, representativo. Se cargaron 6 μ L de ARN total por carril mezclado con 3 μ L de buffer de carga con EZ-Vision. Las flechas indican las subunidades 28S y 18S del ARNr.

Para evaluar la asociación entre los niveles de expresión del oncogén E6 y la coinfección, realizamos una RT-PCR semi-cuantitativa con oligonucleótidos que amplificaron una región de aproximadamente 120 pb del gen E6. Debido a que el genotipo de VPH más frecuente en las biopsias fue el VPH16, sólo determinamos la expresión del gen E6 de este genotipo viral. Para ello fue necesario estandarizar las condiciones de amplificación de E6 y es por eso que utilizamos la línea celular SiHa, la cual tiene integrado en su genoma al VPH16. En la figura 8.8 se muestra

el ensayo de RT-PCR, donde se observa el amplificado de 120 pb del gen E6 a partir de 100 ng de RNA (carriles 1-3). También se incluyeron los controles de RT-PCR -, en el cual no se observa ningún amplicón lo que indica que nuestras muestras no tuvieron contaminación de ADNg total (carriles 4-6). Finalmente, se incluyeron los controles de PCR - en los cuales tampoco se obtuvieron amplificaciones, como se esperaba. Los resultados obtenidos de esta estandarización muestran que a partir de 100 ng de RNA es posible determinar la expresión del gen E6.

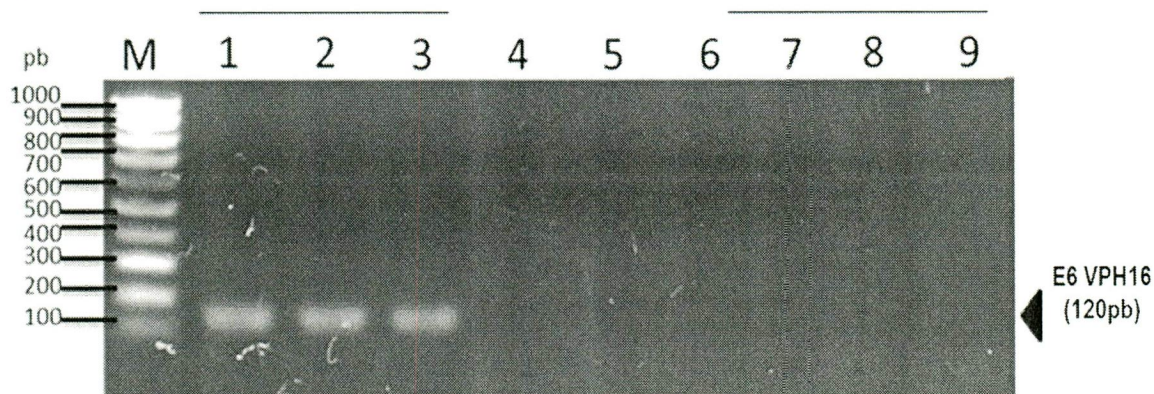


Figura 8.8: Perfil electroforético de la estandarización de la RT-PCR para evaluar la expresión del gen E6. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se puede observar la amplificación del fragmento de E6 de aproximadamente 120pb, con sus respectivos controles. En los carriles 1-3 observamos la amplificación del fragmento de E6 de VPH16, en la línea celular SiHa, en el carril 4-6 es la RT negativa, y en los carriles 7-8 observamos el control negativo de la RT-PCR.

Una vez estandarizadas las condiciones de la RT-PCR procedimos a evaluar los niveles de expresión del oncogén E6 en las biopsias de las pacientes diagnosticadas con CaCu. La RT-PCR se llevó a cabo con oligonucleótidos para amplificar al oncogén E6 de VPH16, como control positivo se utilizó la línea celular de SiHa, también se incluyó la amplificación de un fragmento de 140pb del gen GAPDH como control interno. Una vez que se obtuvo el fragmento de E6 y GAPDH de 120 pb y 140 pb, respectivamente, se cuantificaron las bandas por

densitometría utilizando el software FLASH3000G. Para calcular los niveles de expresión de las muestras de CaCu se normalizaron los datos obtenidos con respecto a la expresión del amplificado del gen E6 de SiHa, tomando en cuenta que la expresión del gen en la línea celular es del 100%. Interesantemente, todas las biopsias diagnosticadas con CaCu expresan la oncoproteína E6 de VPH16, alrededor del 45-50% de expresión en comparación con SiHa. Sin embargo, cabe mencionar que en la paciente 4LC se observa una expresión del oncogén E6 alta en comparación con las otras muestras (140% en comparación con SiHa), y en el caso de esta paciente sus resultados de genotipificación mostraron una infección simple con VPH16 al igual que en su zona sana. Estos resultados los podemos visualizar en la Figura 8.9 B.

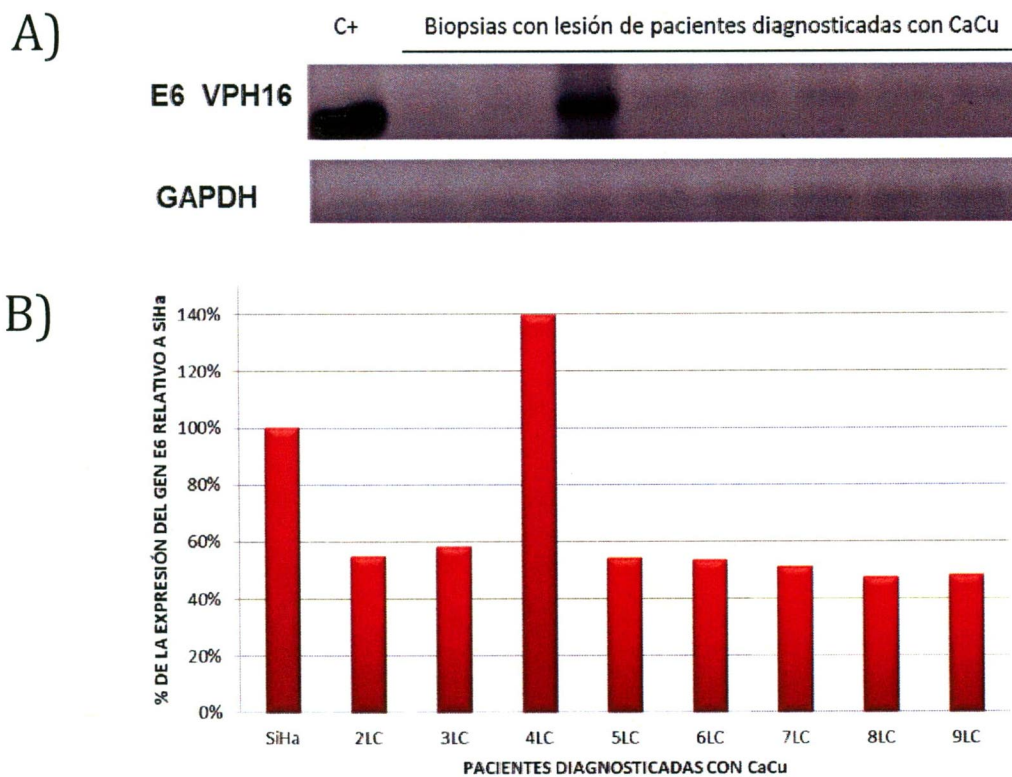
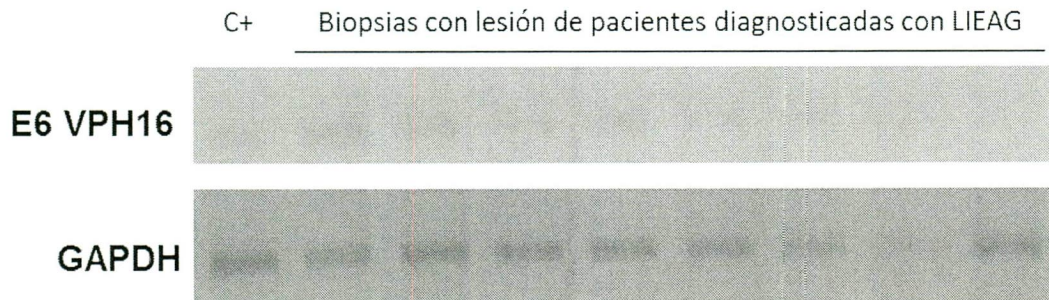


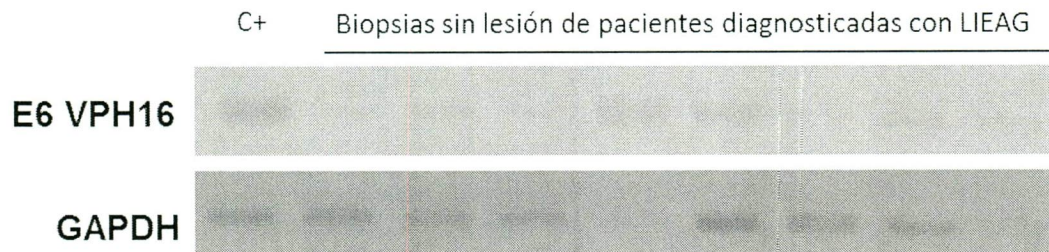
Figura 8.9. Perfil electroforético para determinar la Expresión de E6 en biopsias con diagnóstico de CaCu. A) Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el cual se observa la amplificación del fragmento de E6 de 120pb y el gen constitutivo GAPDH 140pb. B) Análisis densitométrico de la expresión del oncogén E6.

Posteriormente se analizó la expresión del gen E6 en las pacientes diagnosticadas con LIEAG y su respectiva biopsia de la región del cérvix sin lesión, y que fueron positivas para VPH-16. Es interesante observar que en estas biopsias la expresión del oncogén E6 es mayor comparada con las lesiones diagnosticadas con CaCu (60-140%). Además es evidente, que la expresión del oncogén E6 es más alta en las biopsias de la región sin lesión aparente de estas pacientes (90-250%), lo cual está relacionado a que la alta expresión de los oncogenes de VPH-AR (E6 y E7), está involucrada en la carcinogénesis del CaCu (Figura 8.10).

A)



B)



C)

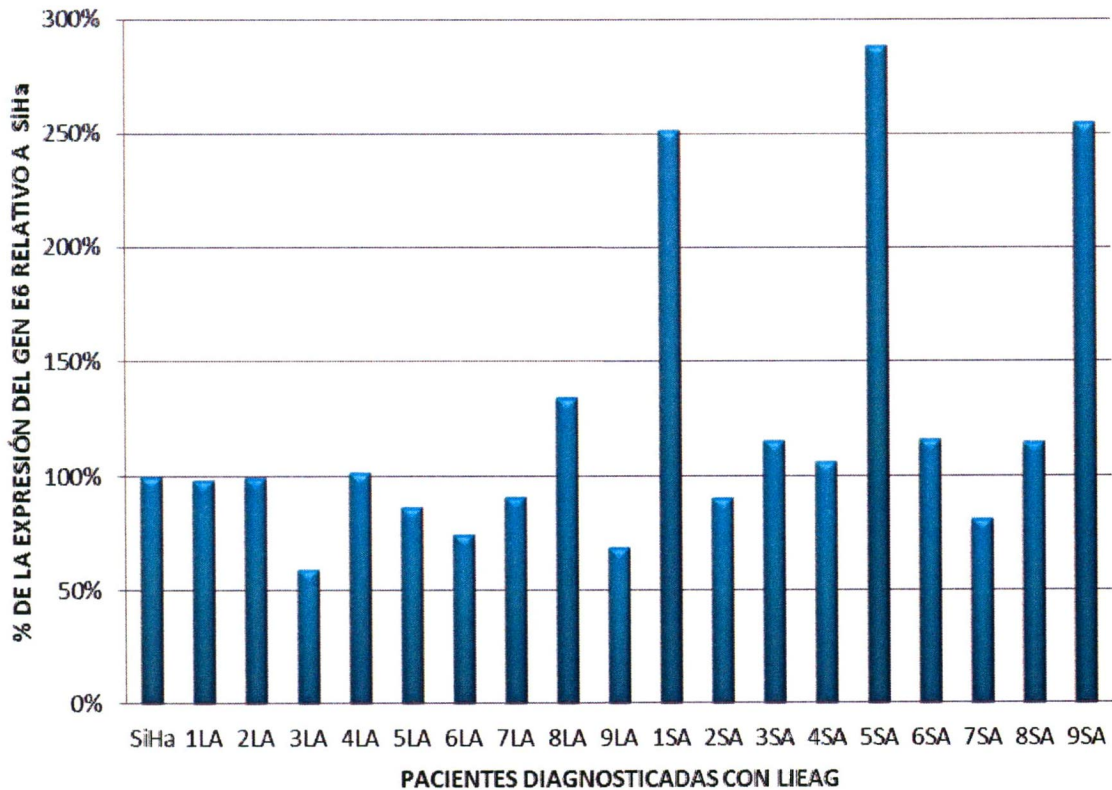


Figura 8.10 Perfil electroforético para determinar la expresión de E6 en biopsias con diagnóstico de LIAG. A) Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el cual se observa la amplificación del fragmento de E6 de 120pb y el gen constitutivo GAPDH 140pb de las biopsias con lesión correspondientes a este grupo de pacientes. B) Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el cual se observa la amplificación del fragmento de E6 de 120pb y el gen constitutivo GAPDH 140pb de las biopsias sin lesión correspondientes a este grupo de pacientes. C) Análisis densitométrico de la expresión del oncogén E6.

9. DISCUSIÓN

La mayoría de los tipos de cáncer, entre ellos el CaCu, son causados por la acumulación de múltiples alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores, los cuales juegan un papel importante en el control del ciclo celular. En el caso del CaCu la infección con VPH-AR es un factor determinante en el desarrollo de la lesión. A diferencia de las células que se encuentran en tejidos normales en las que se controlan la producción y liberación de señales que inducen la entrada al ciclo celular y su progresión en las células de CaCu infectadas por VPH se induce la proliferación celular crónica por desregulación del ciclo celular.

En este estudio pudimos constatar que el diagnóstico del tipo de lesión cervical asociada a VPH se está realizando a edades tempranas (38.3 ± 1.5 años). No obstante todas las pacientes involucradas poseían lesiones de diferente grado hasta CaCu. Estos resultados están acordes a lo reportado por GLOBOCAN en México, en la que la edad promedio en la que se presenta una neoplasia cervical es de 39 años (Ferlay et al., 2013). Si analizamos los datos obtenidos por grupos de lesiones, observamos que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la edad de las pacientes incluidas en este estudio ($p=0.071$). Esto nos brinda evidencias de que la edad de las pacientes no es el factor que determina el desarrollo de un tipo u otro de lesión. En la literatura se ha descrito que el desarrollo de una lesión cervical se da en el tiempo de 9 meses-3 años (Winer et al., 2010). Al observar la edad media de las pacientes incluidas en este estudio se podría pensar que la prevalencia encontrada podría estar asociada al inicio temprano de la actividad sexual y la promiscuidad de las pacientes. Sin embargo en este trabajo no contamos con el dato de inicio de la vida sexual de cada paciente.

En el presente estudio encontramos que la tasa de detección de VPH en las muestras es del 87%. En la literatura se ha reportado tasas de hasta el 98% (Melo A, et al., 2005) y la prevalencia mundial de la infección por VPH en mujeres es del

65% (Lazcano-Ponce, *et al.*, 2001). La disparidad con nuestros resultados podría explicarse por el pequeño tamaño de nuestra muestra (n=80). Por otra parte, el porcentaje de negatividad (13%) de nuestras muestras pudiera estar relacionado con la escasa cantidad de material amplificado, insuficiente para generar un patrón de bandas analizable o con el tipo de PCR utilizado (PCR simple con iniciadores MY09/MY11). No podemos descartar que los casos negativos de nuestro estudio pudieran corresponder a aquellos en los que la carga viral en la muestra se encuentra en el límite de la sensibilidad de la técnica. Otros estudios han concluido que el uso de una PCR anidada, usando los iniciadores MY09/MY11 y GP5+/GP6+, puede aumentar considerablemente su sensibilidad de 10 a 100 veces, en comparación con la PCR simple que emplea únicamente los iniciadores MY09/MY11 (Evander, *et al.*, 1992). Un estudio multicéntrico realizado en España y Colombia, utilizó los iniciadores MY09/MY11 e identificó ADN viral en 75% de los casos; el resto de las muestras las reanalizaron usando el sistema GP5+/GP6+ y obtuvieron un incremento de 20% en el rango de detección del ADN viral (Sotlar, *et al.*, 2004).

Nuestros resultados mostraron que hay una incidencia de infección mayor o igual al 80% en todas las pacientes, independientemente del tipo de lesión diagnosticada. Por consiguiente, se encontró una ausencia de correlación entre la presencia de la infección y el tipo de lesión ($p=0.235$). Estos datos nos sugieren, que aunque la presencia de la infección determina el desarrollo de lesiones cervicales, no es suficiente conocer que la infección está presente para predecir el tipo de lesión que podrían desarrollar las pacientes. En concordancia con lo reportado en la literatura, estos resultados nos sugieren que deben estar implicados otros factores en el desarrollo de un tipo u otro de lesión como por ejemplo el tipo viral y la presencia de uno o más tipos virales (Edward, *et al.*, 2000).

Por las razones anteriores genotificamos, las muestras en las que se encontró presencia viral (n=48). La distribución de los genotipos encontrados en nuestro

estudio es semejante a lo reportado en México (López Rivera, *et al.*, 2012). En nuestro estudio se observó que VPH16 es el genotipo con mayor frecuencia. Este resultado es consistente con lo ya publicado en la literatura por Lazcano-Ponce *et al.*, 2001 y Serrano, *et al.*, 2003, que realizaron su estudio en el estado de Morelos y también coinciden con lo observado en México por Busto, A. y Muñoz L, los cuales mediante estudios inmunohistoquímicos de las proteínas virales e hibridación "*in situ*", detectaron el VPH16 como genotipo dominante en las muestras estudiadas.

Otros tipos virales como VPH31, VPH51, y VPH18 han sido encontrados como los más frecuentes en diferentes estados de la república. No obstante, es un hecho conocido la existencia de diferencias geográficas en cuanto a la frecuencia de los VPHs. Liaw y *et al.*, 1997 fueron los primeros en reportar que los VPH52 y 58 eran los tipos más prevalentes en LIEAG y carcinoma en China (Sasagawa *et al.*, 2001). En Asia, los VPH58 y 52 son más comunes que VPH43, 31 y 33 (Liaw, *et al.*, 1997) Bayo y colaboradores, en Mali, África, describió a VPH51 y 73 en biopsias frescas de carcinoma como nuevos genotipos frecuentes de VPH, aparte del VPH16 y 18 (Liaw *et al.*, 1997). Sasagawa y colaboradores, observaron los genotipos de VPH11, 39, 42, 44, 53, 54 y 59 exclusivamente en LIEBG y no encontraron los tipos 39, 53 y 59 que son considerados de AR en LIEAG y carcinoma invasor (Vernon, *et al.*, 2000). No obstante debe señalarse que nosotros utilizamos un microarreglo de baja densidad con 35 genotipos virales que son los de mayor prevalencia, pero no hay que descartar que las muestras pudieran estar presentando otros tipos virales no detectables con este microarreglo. No obstante, la utilización en este trabajo de la técnica de CLART-HPV para la detección de genotipos de VPH en biopsias cervicales fue exitosa ya que permitió identificar en nuestros pacientes los genotipos virales considerados epidemiológicamente más importantes.

La frecuencia de la infección con determinados genotipos virales varía en dependencia del tipo de lesión (Bosch, *et al.*, 2007) En nuestro estudio también se

observó este mismo tipo de dependencia. Por ejemplo el genotipo más frecuente en las LIEBG es VPH31 (40%) seguido por el 51 (%) los cuales constituyen factores de riesgo para desarrollar este tipo de lesión (OR=5.6 y OR=7, $p \leq 0.05$, respectivamente). Otro ejemplo, es el VPH16 el cual es el genotipo de mayor frecuencia en pacientes diagnosticadas con CaCu, aumentando la probabilidad de padecer este tipo de lesión en 10.4 veces ($p \leq 0.05$). Estos resultados son interesantes ya que nos permite predecir el tipo de la lesión que pudiera desarrollar el individuo a partir del conocimiento del genotipo viral con el que está infectado.

En nuestro estudio la presencia de los genotipos de VPH6 y 11 los cuales son de bajo riesgo y han sido asociados a condilomas acuminados y verrugas orales se encontraron con una baja frecuencia. En nuestras muestras se detectaron simultáneamente VPH de alto y bajo riesgo, en particular los VPH-BR no se encontraron solos, es decir siempre se encontraron acompañados de genotipos de VPH-AR.

En nuestro estudio se observó una frecuencia de coinfección del 71%, lo cual está acorde con lo reportado por otros autores. Por ejemplo, García, *et al*, reportaron en el 2009 en Guinea un porcentaje de coinfección del 78.8%. Otro estudio realizado en mujeres japonesas asoció la infección múltiple por VPH con LIEBG, LIEAG y CaCu en un 95% de las muestras analizadas; aunque la prevalencia disminuyó con el grado de las lesiones (Sasagawa *et al.*, 2001).

Se ha sugerido que existe un sinergismo entre los genotipos de VPH coinfectando, o tal vez como proponen Woodman y colaboradores, diferentes tipos de VPH compiten para colonizar el epitelio cervical y la prevalencia de los genotipos. Un ejemplo encontrado en nuestra población, fue una paciente con diagnóstico colposcópico de LIEAG en la cual logramos detectar seis genotipos de VPH, (VPH16, VPH18, VPH31, VPH56, VPH66 y VPH6) de los cuales cinco tienen un poder oncogénico de AR y uno un poder oncogénico de BR, en este caso es

probable que la presencia de este virus de bajo riesgo, experimente una asociación con los de alto riesgo y ello conlleve a la duplicación de las cargas virales o tengan un efecto sinérgico en la oncogénesis del virus de AR, de acuerdo a lo reportado en la literatura por Graterol en el 2006.

En este estudio se encontró que la presencia de coinfección estaba correlacionada con el tipo de lesión ($p=0.000$), lo cual apoya los resultados de la literatura en los que se les ha concedido valor a la tipificación y detección de infecciones múltiples con VPH en muestras clínicas con el objetivo de buscar marcadores de células anormales del cuello uterino (Anil *et al.* 2011)

Es importante señalar que los estudios de coinfección en México son muy pocos hasta la fecha, sin embargo recientemente Aguilar-Lemarroy *et al.*, en el 2015, reportaron presencia de coinfección en sus muestras diagnosticadas con NIC1 y NIC3 un porcentaje de coinfección del 58.2% y 60% respectivamente, mientras que en CaCu la incidencia de la coinfección disminuye presentándose solo en el 26.4%. Nosotros encontramos un porcentaje de coinfección más alto en LIEBG (100%) y ASCUS (88%) y al igual que el reporte de Aguilar-Lemarroy *et al.*, en el 2015, la presencia de coinfección disminuyó en LIEAG y CaCu (22% y 45% respectivamente).

La presencia de coinfección aumentó en mayor cuantía la probabilidad de tener una LIEBG, (OR=41, $p=0.02$) que poseer LIEAG (OR=18.6, $p\leq 0.05$) o CaCu (OR=5.6, $p\leq 0.05$). Este resultado sustenta la hipótesis de Mosciki *et al.* en el 2001, el cual establece que la acumulación subsecuente de infecciones diferentes puede ser un marcador de persistencia de la infección y un posible factor de riesgo de progresión de la lesión. La infección con múltiples tipos de VPH cancerígenos es muy común, especialmente entre las mujeres más jóvenes. Los efectos de la infección simultánea con múltiples tipos de VPH en los cambios citológicos y el riesgo de lesiones precancerosas y el cáncer no se conocen bien. En general, se supone que cada genotipo VPH actúa de forma independiente y, por lo tanto, debe

contribuir de manera independiente al riesgo de cambios citológicos y pre-cáncerosos. Para apoyar esta idea se ha demostrado que las lesiones cervicales histológicas individuales son causadas generalmente por un solo genotipo, aunque varios tipos están presentes en la muestra de la citología (Bosch, *et al.*, 2002).

Bajo este supuesto, podríamos esperar que la infección con múltiples tipos de VPHs produce efectos aditivos sobre el riesgo de poseer citologías anormales y lesiones pre-cancerosas del cuello uterino. Otro factor clave en el desarrollo de lesiones cervicales es la presencia de coinfecciones simples o mixtas. En nuestro estudio observamos una alta frecuencia de infecciones mixtas (VPH-AR+VPH-BR) en LIEBG y ASCUS (70% y 65% respectivamente), y en lesiones graves como LIEAG y CaCu la frecuencia de coinfecciones simples (VPH-AR+VPH-AR) son más altas (100% y 80% respectivamente).

Es importante señalar que en el 36% de las coinfecciones observadas VPH16 estaba presente, lo cual coincide con López Rivera, *et al.*, en el 2012, quienes reportan que este genotipo viral está presente en el 43% de su población coinfectada. Otro de los datos de importancia es el VPH31, el cual en nuestro estudio sólo lo encontramos en coinfecciones al igual que Aedo, *et al.*, en el 2007.

Con respecto a los resultados de la zona sana, se halló una prevalencia de infección semejante a la encontrada en las biopsias con lesión (80%). De igual forma la presencia de coinfección fue elevada (70%) en las zonas sanas de las pacientes; esto sugiere que esta zona pudiera desarrollar algún tipo de lesión con el paso de tiempo sobre todo si se considera que la prevalencia de VPH-AR es del 100%, en particular VPH16. Teniendo en consideración los datos mencionados y los resultados obtenidos en este trabajo (VPH16/CaCu, OR=10.4, $p \leq 0.05$) podríamos decir que todas las pacientes a las que se les analizó regiones sanas de su cérvix tienen un 91% de probabilidad de desarrollar CaCu. Cabe mencionar que estos datos no son comparables con otros estudios reportados en la literatura ya que la mayoría de los estudios sólo genotifican las VPH encontrados en

pacientes con alguna lesión intraepitelial y en controles sin lesiones. Sin embargo, es importante señalar que los resultados obtenidos resaltan la importancia de los estudios de identificación viral y genotipificación aun cuando la paciente no muestre algún tipo de lesión cervical en la colposcopia, ya que ayudaría al diagnóstico oportuno e imposición de un tratamiento adecuado para prevenir el desarrollo de lesiones intraepiteliales y CaCu.

En los últimos años diversos estudios epidemiológicos han advertido la presencia de infecciones simples y coinfecciones en los grupos de controles. Un ejemplo de lo anterior es el estudio de Aguilar-Lemarro *et al.*, en el 2015, en el cual reportan que el 68.8% de sus controles presentan una infección con VPH16 y un alto porcentaje de coinfecciones con VPHs. Lo anterior resalta la importancia de implementar mejores métodos de detección viral y ampliar los protocolos de identificación y genotipificación de VPH aun cuando las pacientes no exhiban una lesión cervical.

Los resultados del presente estudio demuestran que, además del VPH16 que es el de mayor prevalencia a nivel mundial, se debe prestar atención a otros genotipos, que aunque de menor frecuencia pudieran tener importancia epidemiológica local. La alta frecuencia de VPH de alto riesgo oncogénico, en lesiones de alto y bajo grado surge como buena explicación para las altas incidencias de CaCu en nuestra región. Conocer la frecuencia y distribución de los genotipos virales de VPH puede contribuir a medir la efectividad de una eventual vacuna en nuestra población y ayudar a racionalizar los recursos de nuestro programa nacional de detección de CaCu.

La expresión de genes virales de VPH durante una infección inicial sigue un patrón característico que está estrictamente relacionado con la etapa de diferenciación de las células epiteliales cervicales del huésped (Longworth, *et al.*, 2004), lo cual permite una alta expresión de oncogenes así como la replicación viral sólo en las células diferenciadas de las capas de células superficiales e intermedias del cérvix

(von KnebelDoeberitz M. 2009). Si se pierde el control de la expresión de los genes virales en las células basales, los oncogenes virales E6 y E7 se expresan fuertemente en las células basales y parabasales competentes (Münger, *et al.*, 2004). Se cree que los genes E6 y E7 de VPH desempeñan papeles importantes en el desarrollo de lesiones intraepiteliales, ya que se ha demostrado que E6 promueve la degradación de p53 a través de su interacción con E6AP, una ubiquitinligasa, mientras que E7 se une a la proteína retinoblastoma (PRB) e interrumpe su formación de complejos con el factor de transcripción E2F (Narisawa-Saito, *et al.*, 2007). Mientras que la prueba de detección de ADN del VPH es una de las alternativas establecidas para la citología, es poco probable que sea la estrategia óptima para determinar la presencia de la infección con VPH. Probablemente, la detección de los oncogenes virales E6 / E7 de los tipos de VPH cancerígenos podría servir como un mejor factor de evaluación del riesgo para el desarrollo de lesiones intraepiteliales y CaCu, que sólo la detección de ADN viral (Kotaniemi-Talonen, *et al.*, 2008) ya que la expresión del ARNm de E6 y E7 de VPH aporta una medida de la actividad transcripcional, lo cual proporcionaría un mejor valor pronóstico de la prueba (Liverani, *et al.*, 2012).

Basado en las consideraciones anteriores en nuestro estudio realizamos RT-PCR, para determinar la expresión del ARNm de E6 de las pacientes infectadas con VPH16. Debido a la cantidad y calidad de las biopsias que poseíamos no fue posible la extracción de ARN de todas las muestras incluidas en este estudio. Sin embargo, se logró trabajar con biopsias diagnosticadas con LIEAG y CaCu que además eran las que presentaban una mayor prevalencia de infección con VPH16. Observamos que la expresión del oncogén de VPH16 en las lesiones de la mayoría de las pacientes diagnosticadas con CaCu (8/9) era un 45-50% de la encontrada en la línea celular SiHa. Sin embargo, en las biopsias de las pacientes diagnosticadas con LIEAG se observó una expresión de 2.5 mayor ($\leq 100\%$) del oncogén E6 en las biopsias sanas de estas pacientes. Estos resultados nos confirman que la expresión del oncogén E6 de los VPH-AR es un evento

importante para el desarrollo de la lesión intraepitelial, como se ha reportado en la literatura y que podría utilizarse como predictor de la aparición de la lesión.

10. CONCLUSIONES

- El 87% de las pacientes con lesiones del cérvix poseen infección con VPH siendo los tipos 16, 31, 51 y 58 los más frecuentes.
- La prevalencia de la coinfección por VPH en el cérvix es del 71% y está inversamente relacionada con la severidad de la lesión, siendo la LIEBG la más probable.
- La coinfección del cérvix con más de un tipo de VPH y el poder oncogénico del virus son factores correlacionados con el tipo de lesión cervical, por lo que la determinación de estos factores puede ser utilizada como predictor del grado de la lesión.
- El genotipo viral detectado en lesiones del cérvix es un factor de riesgo para desarrollar un tipo de lesión determinado, en particular el VPH16 incrementa la probabilidad de desarrollar CaCu, mientras que VPH31 y 51 LIEBG.
- La detección de VPH en las zonas sanas de cérvix lesionados pudiera utilizarse como predictora del desarrollo de lesión dado que la prevalencia de infección en estas regiones es de 80%, siendo el genotipo 16 el más frecuentemente encontrado y siempre coinfectando con otros tipos virales.
- La expresión del transcrito del gen E6 de VPH16 es más elevada en las zonas sanas del cérvix de pacientes con LIEAG que en las lesiones de CaCu, por lo que pudiera utilizarse la prueba como predictor del desarrollo de la lesión.

11. PERSPECTIVAS

- Realizar un estudio con un mayor número de muestras.
- Hacer un seguimiento de las pacientes durante un periodo de tiempo.
- Hacer un análisis de la relación de coinfección y la expresión de ARNm de los oncogenes E6 y E7.
- Hacer análisis de las variantes de VPH que se encuentran coinfectando.

12. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Acladious NN, Sutton C, Mandal D, Hopkins R, Zaklama M, Kitchner H. Persistent human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer*. 2002;98(3):435-9.

Anil K. Chaturvedi, Hormuzd A. Katki, Allan Hildesheim, Ana Cecilia Rodriguez, Wim Quint, Mark Schiffman, Leen-Jan Van Doorn, Carolina Porras, Sholom Wacholder, Paula Gonzalez, Mark E. Sherman, and Rolando Herrero for the CVT Group, 2011: Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. Division of Cancer Epidemiology and Genetics, *The Journal of Infectious Diseases*; 203:910–20.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Cancer. In: Molecular Biology of the Cells. 3ed.* NY and London: Garland Publishing;1994.p.1255.

Alejo M, Sardá M, Verdaguer M, Sanjosé S, Autonell J. Evolución de las lesiones escamosas de bajo grado del cérvix uterino. *Rev Esp Patol*. 2004;37:395-400.

Baker T.S., Newcomb W.W., Olson N.H., Cowser L.M., Carl Olson C., Brown J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.*, 60: 1445-1456.

Brandsman JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*.1989;115:621–5.

Berumen Jaime, Rosa M. Ordoñez, Eduardo Lazcano, Jorge Salmeron, Silvia C. Galvan, Ruth A. Estrada, Elsa Yunes, Alejandro Garcia-Carranca, Guillermo Gonzalez-Lira, Angeles Madrigal-de la Capa (2003), Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case–Control Study, *Journal of the National Cancer*

Boulet G, Horvath CA, Berghmans S, Bogers J. Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:810-7. Mayrand M, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1579-88.

Bosch Fx, Lorincz A, Munoz N, Meijer Cj, Shah Kv. The causal relation between human papilloma virus and cervical. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.

Bosch F.X., Manos M.M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A.M., Peto J., Schiffman M.H., Moreno V., Kurman R., Shah, (1995). Prevalence of human papillomavirus in

cervical cancer: a worldwide perspective. International and biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J. Ntl. Cancer Inst.*, 87:796-802.

Bosch FX, de Sanjose S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 2007;23:213-27.

Brown, David. "More American Women Have HPV Than Previously Thought" *San Francisco Chronicle*, 28 de febrero 2007. Publicado originalmente en el

Cuschieri K, Wentzensen N ARNm el virus del papiloma Humano y la detección p16 como biomarcadores para el diagnóstico mejorada de la neoplasia de cuello de útero . *del Cáncer Epidemiol Biomarcadores Anterior* . 2,008 mil; 17 (10): doi desde 2.536 hasta 45: 10.1158 / 1055-9965.EPI-desde 08 hasta 0.306

Clerici Mario; Gene M Shearer; Enrico Clerici. Cytoquine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: Time to consider the Th1/Th2 Paradigm. *J Nat Cancer Ins.* 1998 18(4):261-263.

Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylos C, et al. Sexual behaviour and smoking as determinats of cervical HI infection and of CIN3 among tose infected: a case-control study nested within the Machester cohort. *Br J Cancer.* 2000;83(11):1565-72.

Doorbar J *Biología molecular de la infección por el virus del papiloma humano y el cáncer cervical .ciencia clínica.* 2006; 110 (5): 525-41

E.L.Franco (1996). *Epidemiology of anogenital warts and cancer.* *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.*, 23:597-623.

E.Adam, Berkova Z, Daxnerova Z, 2000: Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182: 257-264

Edward SP, Pondichery G, Satyaswaroop and Rodique M. Hormonal interaction in gynecologic malignancies. In: Hoskins WJ, Pérez, CA. Young RC. *Principles and Practice of Ginecologic Oncology.* 3era ed.Lippincott: Williams and Wilkins; 3ed. 2000.p.199-224.

Evander M, Edlund K, Boden E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R et al. Comparison of a onestep and a two-step polymerase chain degenerate general primers in a population-based study of human papilloma virus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 987-92.

Franco-Cárdenas T. El virus del Papiloma Humano y su importancia en Pediatría. *Paediatr Mex* 2009;2(2):85-110.

Gómez DE, Alonso DF. *Introducción a la Oncología Molecular*. Argentina: Editora ECSA; 1998.

Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A et al.: High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer* 2007, 121: 2787-2793

Hans-Ulrich Bernard, The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses, Department of Molecular Biology and Biochemistry, 114 Sprague Hall, University of California, Irvine, USA, *Journal of Clinical Virology* 32S (2005) S1–S6.

Ho Gy, Burk Rd, Klein S, Kadish As, Chang Cj, Palan P Et Al. Persistent genital human papilloma virus infection as a risk persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1365-71.

Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 1993;67:6413–23.

Hsieh CY, Lee S-C, Huang S-C. Presence and expression of human papillomavirus types 16 and 18 DNA sequences in cervical carcinomas. *Asia-Oceania J Obstet Gynaecol* 1988;14:87–95

Jayshree RS, Sreenivas A, Tessy M, Krishna S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *J Med Res*. 2009; 13 :286-295

Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J*. 2002;78:225-228.

Kiyono T, Foster SA, Koop JI, et al. Both Rb and p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998; 396: 84-88

Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah Kv, Alonso P Et Al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cytology. *Int J Cancer* 2001; 91: 412-20.

Liaw KL, Hsing AW, Schiffman MH, You SL, Zhang T, Burk R et al. Human papilloma virus types 52 and 58 are prevalent in cervical Chinese women. *Int J Cancer* 1997; 73: 775-6.

López Saavedra Alejandro y Marcela Lizano Soberón, Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. UNAM - INCan. *Cancerología* 1 (2006) : 31-55

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F, Cáncer-related inflammation, *Nature* 2008; 454:436-444.

Magnusson PKE, Lichtenstein P, Gyllenstein UB, 2000: Heritability of cervical tumors. *Int. J. Cancer*, 88: 698-701

Magnusson PK, Gyllenstein UB. Cervical cancer risk: is there a genetic component?. *Mol Med Today*. 2000;6(4):145-8.

Martinic M, von Herrath, MG. Novel strategies to eliminate persistent viral infections. *Trends Immunol* 2008;29:116-24.

Melo A, Montenegro S, Hooper T, Capurro I, Roa Jc, Roa I. Human papilloma virus (HPV) typing in preneoplastic and lesions of the uterine cervix in the IX region-Chile. *Rev Méd Chile* 2003; 131:1382-90.

Melo A, Montenegro S, Roa I, Capurro I, Roa Jc. Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (HPV) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. *Rev Méd Chile* 2005;133: 639-44.

Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi M. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the LARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359:1085-92.

Muñoz N., Bosch X., de Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K.V., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M. (2003). Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl J. Med.*, 348:518-527.

Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000;132:810-9.

Nazzari O, Suárez E, Larraguibel R, Rojas L, Bronde A. Lesiones preinvasoras de cuello uterino: una visión actual. *Rev Med Chile*. 2006; 71:341-348.

Negrini BP, Schiffman MH, Kurgan RJ. 2001: Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Res*. 50 (15): 4670-5

Rincon, Olga L; Pareja, Luis René; Jaramillo, Sergio Y Aristizabal, Beatriz H. Virus Del Papiloma Humano, Respuesta Inmune Y Cáncer De Cuello Uterino: Una Relación Compleja. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2007, Vol.58, N.3, Pp. 202-212. ISSN 0034-7434.

Pinto AP, Signorello LB, Crum CP, et al. Squamous cell carcinoma of the vulva in Brazil: prognostic importance of host and viral variables. Gynecol Oncol 1999;14:61-7.

Rossen K, Madsen H, Grunnet N. Epidemodysplasia verruciformis, human papilloma virus infection, genital epithelial neoplasia and possible immunodeficiency. Ugeskr Laeger. 1996; 158(7):923-4.

Safaeian M, Salomón D, Wacholder S, Schiffman M, Castillo P Riesgo de lesiones precancerosas y el seguimiento de las estrategias de manejo para las mujeres con células escamosas humanos-papilomavirus negativo atípicas de significado indeterminado . Obstet Gynecol . 2007; 109 (6): 1325-1331

Sasagawa T, Walid Basha, Hiroshi Yamazaki, and Masaki Inoue. High-Risk and Multiple Human Papillomavirus Infections Associated with Cervical Abnormalities in Japanese Women. Department of Obstetrics and Gynecology, Vol. 10, 45-52, January 2001.

Serrano MI CM, Medina O, Melgarejo D, Bravo MM. Tipificación del virus papiloma humano mediante secuencia directa en mujeres con citología normal. Revista Colombiana de Cancerología 2003; 7: 18-24.

Shannon J, Thomas DB, Ray RM, Kestin M, Koetsawang A, Chitnarong K, et al. Dietary risk factors for invasive and in situ cervical carcinoma in Bangkok, Thailand. Cancer Causes Control. 2002;13(8):691-9.

Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N Et Al. Detection and typing of human papilloma virus by e6 nested. J Clin Microbiol 2004; 42: 3176-84.

Smith J, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. J Adolesc Health 2008;43:S5-25.

Susana Aedo A1, Angélica Melo A1, Patricia García1,Pablo Guzmán G1, Italo Capurro V2, Juan Carlos Roa S1. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP.

Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. Temuco, Chile. Rev Méd Chile 2007; 135: 167-173.

Taylor & Francis Group, Human papillomavirus and cervical cancer. 2004 The European Consortium for Cervical Cancer education. The Health's Professional's HPV HAND-BOO.

Touzé A., Mahé D., El Mehdaoui S., Dupuy C., Combita-Rojas A.L., Bousarghin L., Sizaret P.Y., Coursaget P. (2000). The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. FEMS Microbiol. Lett., 189:121-127.

Van Driel WJ, Kenter GG, Fleuren GJ, Melief CJM, Trimbos BJ. Immunotherapeutic strategies for cervical squamous carcinoma. Current Therapeutic Issues in Gynecologic Cancer. 1999;13(1):259-271.

Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. Eur J Cancer 2002; 38: 2229-2242

Von Knebel DM, Spitkovsky D, Ridder R. Interactions between steroid hormones and viral oncogenes in the pathogenesis of cervical cancer. Verh Dtsch Ges Pathol. 1997;81:233-9.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al (1999). "Human Papillomavirus Is A Necessary Cause Of Invasive Cervical Cancer Worldwide", Department of Pathology, University Hospital Vrije Universiteit, De Boelelaan 1117, 1081 HV, Amsterdam, The Netherlands. Journal Of Pathology. J. Pathol. 189: 12-19.

Woodman CB, Collins S, Winter H, ET AL. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. Lancet 2001; 357:1831-6.

Woodman C, Collins, SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer 2007;7:11-20.

Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, Koutsky LA, Galloway DA, 1998: Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. Cancer Res. 58, 3839-3844

Washington Post .Calleja-Macias IE, Mina Kalantari AB, Huh J, 2004: Genomic diversity of human papillomavirus- 16, 18, 31 and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African and Native American variants. Virology 319. 315-323

Xu M, Luo W, Elzi DJ, et al. NFX1 interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress hTERT transcription in keratinocytes. *Mol Cell Biol* 2008;28: 4819-4828

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, 1997: Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J. Virol.* 71, 2463-2472

Yoshikawa Hiroyuki, Tawana Takash, Kitagawa Kyoko, Mizuno Masahico, Hiroshi Yoshikura and Iwamoto Aikichi. Detection and typing of multiple genital Human Papillomaviruses by DNA Amplification with consensus primers.(1991). *J. Cancer res.*82, 524-531.

Zur Hausen H, 1996: Papillomavirus infections– a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1288: 55–78

Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:690–98

Coordinación de Certificación y Registro

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno