

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I+D ASOCIADA AL CNB-CSIC**

**PATRONES DE INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA Y DE EXPRESIÓN
TISULAR DE QUIMIOQUINAS, FACTOR DE CRECIMIENTO
ENDOTELIAL VASCULAR Y MEDIADORES DEL METABOLISMO
OXIDATIVO EN LESIONES INFLAMATORIAS Y NEOPLÁSICAS DEL
CERVIX**

**TESIS DOCTORAL
YENDDY NAYGHIT CARRERO CASTILLO**

ALCALÁ DE HENARES, 2012

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
UNIDAD I+D ASOCIADA AL CNB-CSIC
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**PATRONES DE INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA Y DE EXPRESIÓN
TISULAR DE QUIMIOQUINAS, FACTOR DEL CRECIMIENTO
ENDOTELIAL VASCULAR Y MEDIADORES DEL METABOLISMO
OXIDATIVO EN LESIONES INFLAMATORIAS Y NEOPLÁSICAS DEL
CERVIX**

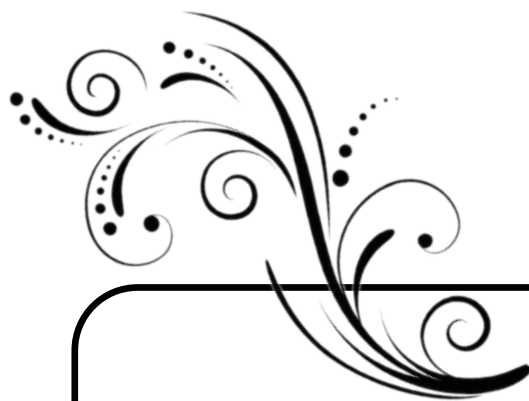
TESIS DOCTORAL

Yenddy Nayghit Carrero Castillo

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto
Catedrático de Medicina
Universidad de Alcalá

Jesús Alberto Mosquera Sulbarán
Catedrático de Inmunología
Universidad de Zulia



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento:

- A Dios Todopoderoso, por guiar mis pasos a lo largo de mi vida
- A mi madre, amiga y pilar fundamental en mi vida, quien con su amor, paciencia y sabios consejos me permitió culminar otra etapa de mi vida profesional
- A mi Hermano, quien llena de alegría mi vida
- A mi familia, quienes con su amor, admiración y apoyo me hacen bonita la vida.
- A mi querida Universidad del Zulia Institución donde inicie mi vida profesional, cuna de mi saber y responsable de mi formación a quien deseo dedicarle mis logros profesionales, los cuales permitirán formar mejores profesionales compartiendo mi saber.
- A La Universidad de Alcalá, España por permitirme participar en el programa de Doctorados en conjunto facilitándome cumplir una meta más en mi formación profesional.
- Mi agradecimiento al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y Tecnología por contribuir a la realización este estudio

- Al Dr. **Jesús Mosquera**, tutor, maestro, jefe sentimental y amigo incondicional, gracias, por sus enseñanzas, cariño, tiempo, paciencia y valiosos aportes científicos, por estar siempre dispuesto a orientarme y en la realización de este trabajo.
- Al Profesor Dr. **Melchor Álvarez de Mon**, a quien le doy mi agradecimiento por el apoyo obtenido para el logro de esta importante meta.
- **A Dra. Diana Callejas**, Profesora, Jefa y amiga con quien he compartido desde el inicio de este largo camino, Gracias por ser mi apoyo y ejemplo a seguir, y enseñarme que el alumno puede superar al profesor.
- **Al Personal del LRRV** quienes de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de mi tesis, con su apoyo, palabras de aliento y días de trabajo, quiero extender mi agradecimiento especialmente a **Raimy, María Elena, Alin y Ángela** por ser mis amigas incondicionales
- **Al Dr. Freddy Alaña, Dra. Elizabeth Acuña, Dra. Chiquinquirá Silva**, médicos del proyecto, amigos y personas claves en el desarrollo de mi investigación, quienes que hicieron posible la obtención de las muestras necesarias para asegurar la calidad del trabajo científico
- Al personal del **Instituto de Investigaciones clínicas Dr. Américo Negrette** por su cariño y colaboración
- A todos mil gracias!



DEDICATORIA

In memoriam de Cándida Blanco, mi ángel en el cielo

*A mi madre, mi familia y a todas las personas que amo y que son
una estrella en mi vida*

Los quiero

*Los hombres de ciencia nacen con muchas preguntas pero no
mueren sin encontrar grandes respuestas*

Y. Carrero



ÍNDICE

INDICE

	Págs.
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	
SUMMARY	
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Cáncer	1
I.2 Cáncer de Cuello Uterino (CaCu)	5
I.3 Lesiones Preinvasivas de Cuello Uterino	7
I.3.1 Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)	7
I.4 Historia	9
I.5 Epidemiología	11
I.6 Factores de riesgo asociados al cáncer cervicouterino	13
I.6.1 Edad de la primera relación sexual	14
I.6.2 Numero de Compañeros Sexuales	14
I.6.3 Anticonceptivos orales	14
I.6.4 Plasma Seminal	15
I.6.5 Condición Socioeconómica y Social	17
I.6.6 Tabaco	17
I.6.7 Dieta y Factores	18
I.6.8 Factor Genético	19
I.6.9 Inmunosupresión	19
I.6.10 Infecciones de transmisión sexual	20
I.7 Virus del Papiloma Humano (VPH)	22
I.7.1 Proteínas Virales	23
I.7.1.1 Genes E1	23
I.7.1.2 Genes E2 4y E	23
I.7.2 Oncoproteinas Virales.	24
I.7.2.1 Oncoproteína E6	24
I.7.2.2 Oncoproteína E7	26
I.7.3 Insercion Mutacional	26
I.8 Clasificación Genómica del VPH	28
I.9 Diagnóstico de lesiones de Cuello Uterino y VPH	30

I.9.1 Métodos Diagnósticos Convencionales	31
I.9.1.1 Test de Papanicolau	31
I.9.1.2 Colposcopia	32
I.9.2 Métodos Diagnósticos Específicos	33
I.9.2.1 Southern blot	33
I.9.2.2 Hibridación Puntual	33
I.9.2.3 Hibridación Invertida	33
I.9.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
I.9.2.5 PCR Multiplex	35
I.9.2.6 Sistema de Captura Híbrida	35
I.10 Virus de Papiloma Humano y Cáncer Cervical	36
I.10.1 Interacción entre la oncoproteínas E6 y la proteína p53	37
I.10.2 Interacción entre E7 y pRb	38
I.10.3 Cooperación entre E6 y E7 en la transformación maligna	39
I.10.4 Rol de la integración viral en la transformación maligna	39
I.11 Respuesta Inmunitaria en Cuello Uterino	41
I.11.1 Respuesta Inmunitaria Celular	41
I.11.2 Respuesta Inmunitaria Humoral	43
I.12 Inflamación y cáncer	44
I.13 Inflamación e Infiltración leucocitaria	46
I.14 Citocinas y su participación en la respuesta inmunitaria e inflamatoria de Cuello Uterino.	55
I.14.1 Interleucina 2 (IL-2)	61
I.14.2 Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 12 (IL-12)	63
I.14.3 Interferón (IFN)	65
I.14.4 Interleucina 4 (IL-4)	66
I.14.5 Interleucina 6 (IL-6)	66
I.14.6 Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	66
I.14.7 Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF - β 1)	67
I.14.8 Factor Estimulador de Colonias Granulocito-Macrófago (GM-CSF)	69
I.15 Quimioquinas	71
I.15.1 Proteína 1 Quimioatrayente de Monocitos (MCP-1)	73
I.15.2 Interleucina 8 (IL-8)	75

I.15.3 Proteína Inflamatoria de Macrófago α (MIP1 α)	76
I.16 Quimioquinas e Inflamación	77
I.17 Quimioquinas y Crecimiento Tumoral	78
I.18 Quimioquinas e Infiltración Leucocitaria	80
I.19 Carcinogénesis y daño celular	81
I.19.1 Radicales Libres y daño celular	82
I.20 Angiogénesis y Desarrollo Tumoral	91
I.20.1 Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)	94
I.21 Invasión y Metástasis	96
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	98
II.1 Objetivo General	101
II.2 Objetivos Específicos	101
III. MATERIALES Y MÉTODOS	102
III.1 Diseño del estudio	103
III.1.1 Tipo de diseño	103
III.1.2 Periodo de estudio	103
III.1.3 Área de estudio	103
III.1.4 Selección y procedencia de la población	104
III.1.5 Población de estudio	104
III.1.6 Criterios de Inclusión	104
III.1.7 Criterios de Exclusión	105
III.1.8 Criterios Bioéticos	105
III.1.9 Toma de Muestra	106
III.1.9.1 Toma de Muestra para el estudio Histológico y Determinación de quimiocinas y Factor de Crecimiento Endotelial Vascular	106
III.1.9.2 Estudio Histológico	106
III.1.9.3 Estudio Inmuno-histológico	106
III.1.9.4 Oxido Nítrico	107
III.1.9.5 Toma de muestra para la determinación de VPH	107
III.1.10 Procesamiento de las Muestras	107

III.1.10.1 Determinación de Interleucina (IL-8), Proteína Quimiotáctica de Monocitos (MCP1), Proteína Inflamatoria de Macrófago 1 α (MIP1 α), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), e Infiltración Leucocitaria por Inmunohistoquímica	107
III.1.10.2 Identificación de Anión Superoxido en tejido	109
III.1.10.3 Determinación de Proteínas y Oxido Nítrico	111
III.1.10.4 Detección y Tipificación del VPH	117
III.1.10.4.1 Extracción del ADN.	117
III.1.10.4.2 Reacción de Amplificación del ADN	118
III.1.10.4.3 Visualización del Producto amplificado	119
III.1.10.4.4 Tipificación del VPH	120
III.2 Análisis Estadístico	121
III.3 Búsqueda Bibliográfica	122
IV. RESULTADOS	123
IV.1 Infiltración Leucocitaria: Determinación de Linfocitos(CD3), neutrofilos (RIIB/CD16) y macrófagos en tejido de cuello uterino de pacientes con lesiones pre malignas y maligna del cuello uterino, controles y tejido inflamatorio	124
IV.2 Expresión de MIP-1 α , MCP1, IL8 y VEGF en tejido de cuello uterino de pacientes con lesiones pre malignas y maligna del cuello uterino y controles.	128
I.V.3 Determinación de anión superoxido en tejido de cuello uterino de pacientes con lesiones pre malignas y malignas del cuello uterino y controles	143
IV.4 Determinación de oxido nítrico en tejido de cuello uterino de pacientes con lesiones pre malignas y malignas del cuello uterino y controles	145
I.V.5 Determinación genómica de VPH	146
V. DISCUSIÓN	151
VI. CONCLUSIONES	165
VII. BIBLIOGRAFÍAS	168
VIII. ANEXOS	186
IX. PUBLICACIONES	193

INDICE DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Pérdida del control del crecimiento Normal de la Célula	2
Figura 2 Acción antitumoral, Antígenos tumorales, Escape tumoral	3
Figura 3. Mecanismo de Acción de los Oncogenes y Genes Supresores de Tumores	4
Figura 4 Carcinoma y Zona de transición	7
Figura 5 Clasificación de las lesiones preinvasivas de cuello uterino de acuerdo a las alteraciones producidas en el epitelio cervical	9
Figura 6 Factores de Riesgo asociados al Cáncer de Cuello Uterino	21
Figura 7 Organización del Genoma de VPH	23
Figura 8 Dinámica de la infección por VPH en Cuello Uterino	27
Figura 9 Mecanismo Oncogénico del Virus del Papiloma Humano (VPH)	40
Figura 10 Las alteraciones en los patrones de expresión y producción de citoquinas	46
Figura 11 Proceso Inflamatorio	47
Figura 12 Proceso de infiltración leucocitaria y la expresión de citocinas	49
Figura 13 Organización de tejido normal y carcinoma invasivo	78
Figura 14 Síntesis de Oxido Nítrico	87
Figura 15 Inflamación y Stress Oxidativo	90
Figura 16 Hipoxia, Infiltración Celular y expresión de Factores Angiogenicos	94
Figura 17 Fundamento Reacción de Briggs	109
Figura 18. Fundamento Método Lowry	112
Figura 19. Fundamento Reacción de Griess	114
Figura 20 Fórmula para el cálculo de concentración de oxido nítrico.	117
Figura 21. Número de células CD3, RIIB/CD16 y macrófagos positivos en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y controles en epitelio y estroma	126
Figura 22 Número de células CD3, RIIB/CD16 y macrófagos en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC), controles y tejidos de pacientes con procesos inflamatorios en epitelio y estroma.	127
Figura 23 Expresión de células positivas para CD3, MCP-1 e IL-8 en	131

epitelio y estroma de biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC).	
Figura 24 Expresión del número total de células CD3, MCP-1, IL-8, CD3/MCP-1 y CD3/IL-8 en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC)	132
Figura 25 Inmunofluorescencia de la doble tinción anti CD3 y anti-quimiocina en biopsias de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical.	133
Figura 26 Expresión del número total de la infiltración por macrófagos (MΦ), MΦ /MCP-1 y MΦ /IL-8 en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y carcinoma cervical (CC)	134
Figura 27 Expresión del número total de células MIP-1, CD3/MIP-1 y macrófagos (MΦ)/ MIP-1 en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC)	135
Figura 28 Porcentaje de células mononucleares/quimiocinas durante la neoplasia intraepitelial cervical.	136
Figura 29 Expresión de MCP-1, IL-8, MIP-1 en epitelio y estroma distribuidos en tejidos inflamatorios, lesión y control	137
Figura 30 Expresión del VEGF en epitelio y estroma cervical de acuerdo al tipo de lesión y controles	138
Figura 31 Expresión de VEGF en epitelio y estroma cervical entre el grupo inflamatorio, lesión y controles	139
Figura 32 Coexpresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y marcadores de leucocitos en la neoplasia intraepitelial cervical (NIC)	140
Figura 33 Doble marcaje para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y CD3 en tejido de cuello uterino de un paciente con NIC III	141
Figura 34 Total de células / número pacientes del grupo control y pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC)	142
Figura 35 Células anión superóxido en epitelio y estroma cervical	143
Figura 36 Coloración de Briggs para anión Superóxido en tejido de paciente con NIC II	144
Figura 37 Número de células O ₂ ⁻ en epitelio y estroma	145
Figura 38 Concentración de Nitrito-Nitrato/mg de proteínas en pacientes con lesiones preinvasivas, procesos inflamatorios y control	146
Figura 39 Pacientes VPH positivos de acuerdo al grado de lesión (NIC)	148

y pacientes con inflamación

Figura 40 Expresión de células CD3 en epitelio y estroma de acuerdo a la infección por VPH 149

Figura 41 Expresión de células Quimiocinas: MCP1 (A), IL-8 (B) y MIP(C) en epitelio y estroma de acuerdo a la infección por VPH 149

Figura 42 Expresión de VEGF en epitelio y estroma de acuerdo a la infección por VPH 150

Figura 43 Expresión de células O₂ en epitelio y estroma de acuerdo a la infección por VPH 150

ÍNDICE DE TABLAS

	Págs
Tabla 1. Clasificación del VPH de acuerdo a las manifestaciones clínicas y riesgo según The International Agency for Research on Cancer (IARC).	30
Tabla 2 Principales oxidantes y mecanismo de acción de genotoxicidad	57
Tabla 3 Clasificación y nomenclatura de las citocinas	83
Tabla 4. Mezcla de reacción PCR.	119
Tabla 5 Virus de Papiloma Humano en pacientes con lesiones premalignas de cuello uterino, inflamación y controles	147
Tabla 6 Genotipos de VPH en pacientes con lesiones premalignas de cuello uterino, inflamación y controles.	148



ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

VPH:	Virus del Papiloma Humano.
NIC:	Neoplasia Intraepitelial Cervical.
CaCu:	Cáncer de Cuello Uterino.
VEFG	Factor de crecimiento endotelial vascular
MCP-1:	Proteína quimiotáctica de monocitos
MIP1α:	Proteína inflamatoria de macrófagos
NO	Oxido Nítrico
iNOS	Oxido nítrico sintetasa inducible
O-	Anion superoxido
F(ab)'₂:	Molécula compuesta por dos subunidades Fab y la región de la bisagra, con enlaces disulfuro intercadena H.
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína.
NaCl:	Cloruro de sodio.
PBS:	Buffer fosfato salino.
pRB	Proteína retinoblastoma
E6-AP	Proteína asociada a E6
H1	Cinasa de la histona H1
p53	Proteína supresora de tumores
CD4⁺:	Receptor del complejo mayor de histocompatibilidad clase II.
CD8⁺:	Receptor del complejo mayor de histocompatibilidad clase I.
NK:	Células asesinas naturales.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
TBE:	Tris borato.



SUMMARY

Carrero C, Yenddy N. **PATTERNS OF LEUKOCYTE INFILTRATION AND TISSUE EXPRESSION OF CHEMOKINES, VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND MEDIATORS OF OXIDATIVE METABOLISM IN INFLAMMATORY AND NEOPLASTIC CÉRVIX.** Tesis Doctoral. Universidad Alcalá de Henares.2012.

Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is an epithelial lesion that could become an invasive carcinoma in a sequential manner. There are several factors that may modulate the switch from epithelial to extra epithelial neoplasia. Factors such as: increased oxidative metabolism, inflammatory events (leukocyte infiltration, chemokine production) and angiogenesis factor as vascular endothelial growth factor (VEGF) could have a role in CIN progression. Several studies have performed in order to determine the role of those factors in cervical neoplasia in relationship with the in situ or systemic productions. This arise the need to study those factor in situ and their relationship with the evolution of CIN. In the present study, the expressions of leukocyte infiltration, chemokines (MCP-1, IL-8 y MIP-1), VEGF, superoxide anion (O_2^-) and the production of nitric oxide (NO) were analyzed in biopsies from patients with CIN, cervix inflammation and healthy controls. Since, there is a relationship between human papilloma virus (HPV) infection and CIN; the expression of those factors in CIN will be studied according to the HPV status. Fifty five biopsies from CIN patients with different CIN grades, 7 from patients with inflammatory cervix alterations and 7 from healthy individuals were analyzed. Expressions of VEGF, chemokines and leukocyte infiltration were analyzed by indirect immunofluorescence using appropriate monoclonal and polyclonal antibodies. The expression of O_2^- was determined by histochemical procedures and NO production by ELISA. HPV infection and virus typification were determined by PCR and chemiluminescence, respectively. Increased CD3 positive cells (lymphocytes) infiltration was found in CIN related to lesion grades. Monocyte/macrophage ($M\Phi$) and neutrophil infiltrations were no significant increased. This pattern was also observed in samples from patients with inflammatory lesions. Regarding to chemokines, increased expressions of MCP-1 and IL-8 were found in CIN, no related to lesion grades. MIP-1 remained at inflammatory and control values. CD3/MCP-1 or CD3/IL-8 coexpressions were found increased in CIN, but no related to lesion grades. $M\Phi$ /chemokine or neutrophil/chemokine expressions in CIN remained similar to others groups. There was no association to the grade of CIN when chemokine expressions were

represented as number of positive cells, but, there was association when represented as percentage of positive cells. In this regard, CD3/MCP-1 and M Φ /MCP-1 expressions decreased with the CIN evolution, however, CD3/IL-8 and M Φ /IL-8 expressions increased. Expressions of MCP-1, IL-8 and MIP-1 were found increased in patients with inflammatory lesions. Epithelial and stroma VEGF expressions were increased in CIN patients related to the CIN evolution. This factor was also increased in patients with cervix inflammatory lesions. Coexpressions of CD3/VEGF and M Φ /VEGF were found increased in CIN related to CIN evolution. This pattern was also found when total number of positive cells/number of patient analysis was performed. Expression of O₂⁻ was found increased in CIN related to CIN evolution; however, NO production remained similar to other groups. Expression of O₂⁻ and NO production were found no increased in biopsies from patients with inflammatory lesions. Low percentage of HPV infection (17.39%) was found in CIN patients. The higher percentage was found in patients with CIN III (60%). High risk virus infection was found in patients with CIN II and CIN III. Values from studied parameters in epithelium or stroma were not affected by HPV infection. In conclusion, the *in situ* expressions of studied factors and their relationship with CIN evolution, suggest that lymphocyte infiltration, increased expressions of chemokines, VEGF and oxidative stress could be important factors in the evolution of CIN with further cervical carcinoma. Further studies are needed to determine the evolution of those factors from CIN to cervical carcinoma.

Key words: cytokines, growth factors, intraepithelial neoplasia, uterine cervix, HPV



I.- INTRODUCCIÓN

I.1 CÁNCER

El cáncer se define como un grupo amplio y heterogéneo de enfermedades cuyo factor común es un desequilibrio que se produce en la relación proliferación/muerte celular a favor de la acumulación de células, provocado por mecanismos genéticos o epigenéticos. Las alteraciones genéticas pueden ser congénitas, adquiridas o ambas, y son producidas por mutaciones de etiología multifactorial en cualquier célula susceptible del organismo, alterando en un inicio el funcionamiento normal de algunos genes involucrados en la proliferación celular, apoptosis, envejecimiento celular y reparación del ADN y, posteriormente, otros genes relacionados con los procesos de angiogénesis, invasión, motilidad, adhesión y metastización, entre otros, cuya expresión cuantitativa y cualitativa confiere a dicha célula características fenotípicas y biológicas de malignidad que se traducen morfológica y evolutivamente por crecimiento y diseminación en sus diferentes modalidades y en grado variable según particularidades biológicas del tumor, anatómicas de su localización y generales del huésped. Estas lesiones genéticas producen la enfermedad cancerosa responsable de la aparición de uno o más tumores con evolución y pronóstico variables que, según las estadísticas, resulta incontrolable y mortal en la mayoría de los casos. **(Ferbeyre L y col 2005)**

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación anormal de células neoplásicas, en donde existe un crecimiento exacerbado de células transformadas, que proliferan de manera anormal y descontrolada dentro del organismo como consecuencia de una serie de alteraciones somáticas del ADN, que culmina en la proliferación celular desmedida, en cuestión comprende cambios en la secuencia del ácido nucleico que son el resultado de errores aleatorios de replicas,

exposición a carcinógenos (como la radiación), o diferencias de los procesos de reparación del ADN. (**Kasper D, 2005, Monzón G, 2011**)

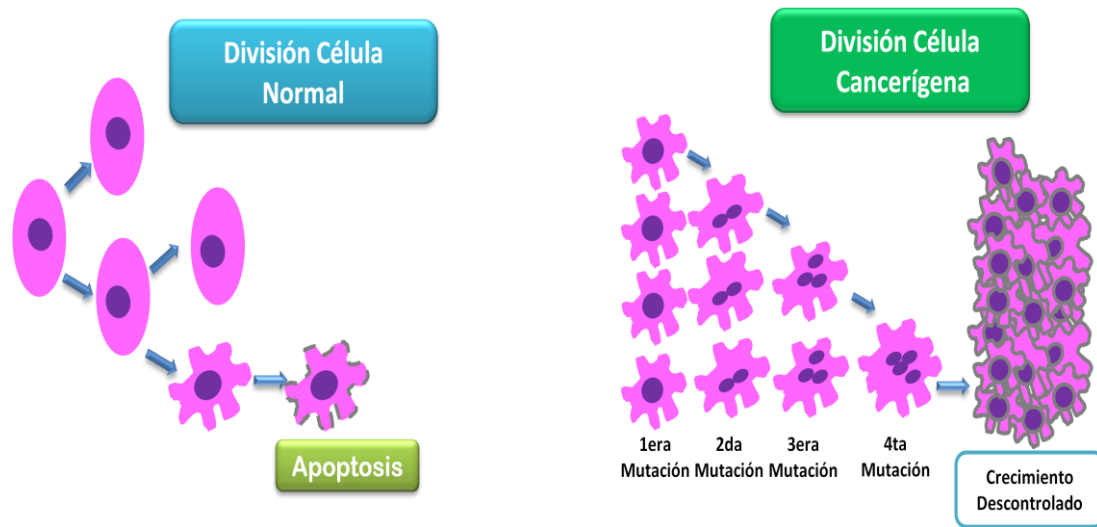


Figura 1 Pérdida del control del crecimiento Normal de la Célula. Carrero, Y 2012

El control de las diferentes funciones celulares está dado por los genes codificados en el ADN, por lo tanto algunas alteraciones en genes que codifican para las proteínas involucradas en el ciclo de proliferación celular pueden inducir una cascada de eventos que llevan a la producción del fenotipo cancerígeno. La transformación maligna requiere que ocurran alteraciones en genes específicos que controlan la proliferación celular, la apoptosis y el mantenimiento de la integridad del ADN en la misma célula. Las mutaciones tienen la posibilidad de aparecer de manera esporádica o de heredarse, pueden ser sustituciones de bases, adiciones, deleciones o cambios epigenéticos (**Monzón G, 2011**)

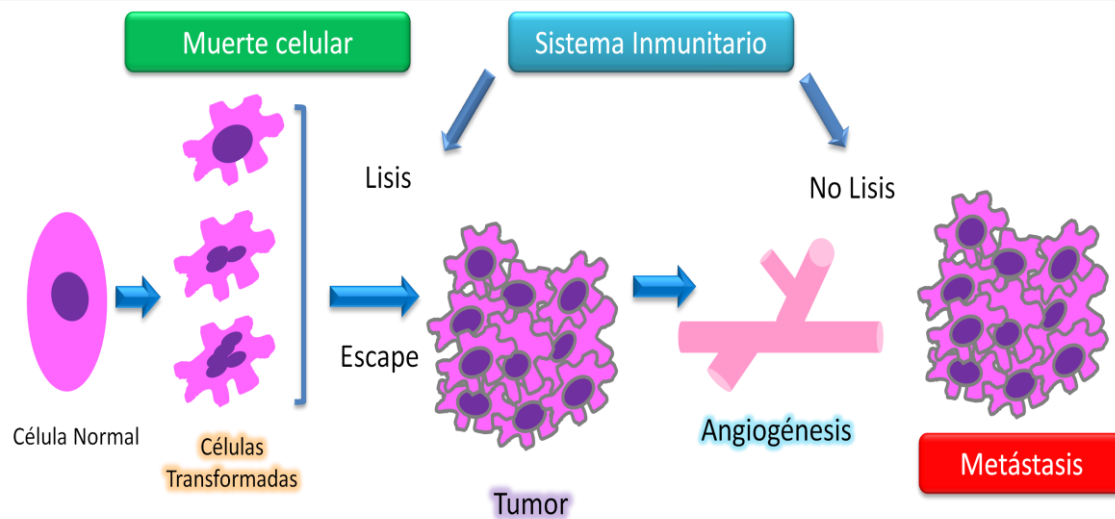


Figura 2 El sistema inmunitario es capaz de reconocer células transformadas y lisarlas. Cuando la respuesta es ineficiente ocurre el escape tumoral en donde las células proliferan de manera descontrolada produciendo un tumor primario el cual aumenta de tamaño, se irriga y produce metástasis. Carrero Y, 2012 Ramírez, Pera y Pena. Malignización, Acción antitumoral, Antígenos tumorales, Escape tumoral, Diagnostico inmune, Inmunoterapia, Inmunología Tumoral Capítulo 24. Disponible www.vi.cv.com

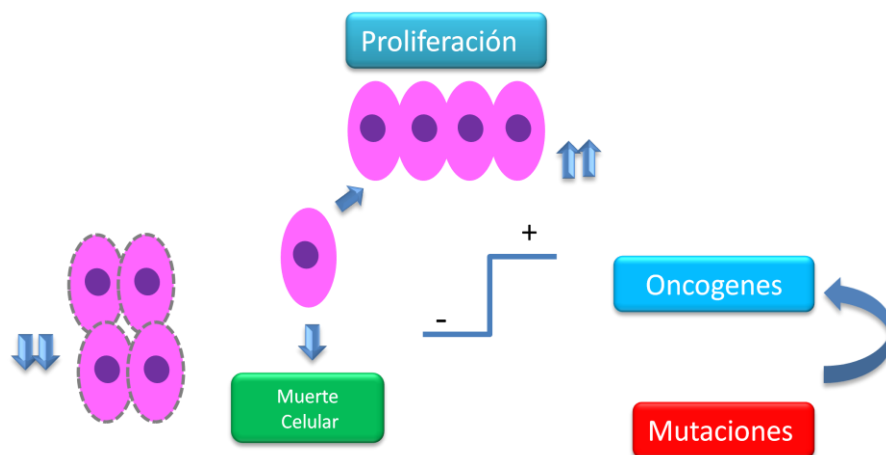
El descubrimiento en 1953 de la estructura del ADN y la transmisión de alteraciones relacionadas con la carcinogénesis, definitivamente implican cambios en el ADN. En las últimas cuatro décadas, se ha dado a conocer información suficiente que sustenta la hipótesis, de que el cáncer es causado por alteraciones en genes específicos (**Simpson AJG, 1977**).

Las células de los organismos se diferencian y proliferan siguiendo un programa genético que está regulado por estímulos extracelulares. Alteraciones en este sistema de regulación constituyen la base genética del cáncer, que se entiende como una acumulación de mutaciones que afectan a las células somáticas durante la vida de un organismo y hacen que estas proliferen de forma incontrolada.

Estos genes han sido identificados como pertenecientes a dos clases fundamentales: Los oncogenes, que son genes anormales o activados que proceden

de la mutación o activación de un gen normal llamado protooncogén y son los responsables de la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer, y los genes supresores de tumores (Tumor Supresor Genes, TSG), los cuales son genes que reducen la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena. Los TSG se encuentran en las células normales e inhiben la proliferación celular excesiva. Una mutación o una dilección de un gen supresor tumoral, aumentará la probabilidad de que se produzca un tumor. De tal manera que un gen supresor tumoral alterado, es similar a un oncogén. **(Simpson AJG, 1977).**

A.- Oncogenes:



B.- Genes Supresores de Tumores

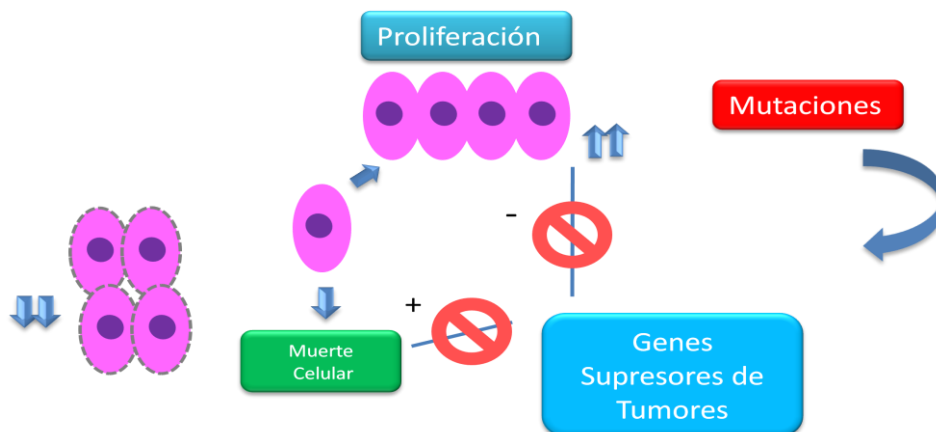


Figura 3 Mecanismo de Acción de los Oncogenes y Genes Supresores de Tumores. Carrero 2012.

Actualmente es reconocido y aceptado, que el cáncer surge como resultado de una secuencia múltiple de eventos genéticos, los cuales ocurren en poblaciones de células pluripotenciales, reconocidas con el nombre de “Stem Cells”; o células madre. Se conoce que la replicación del ADN, ocurre con una increíble fidelidad en la copia de sus cadenas, donde muy raramente ocurren errores (**Simpson AJG, 1977**).

Debido a que la replicación del ADN conlleva pequeñas tasas de error, pueden ocurrir alteraciones en los genes relacionados con el desarrollo del cáncer, incrementándose el riesgo de que una determinada célula, pueda transformarse en tumoral y eventualmente desarrollarse hasta formar el cáncer (**Simpson AJG, 1977**).

Teniendo en cuenta que la replicación del ADN no se lleva a cabo en un 100% de fidelidad y que el cáncer es ocasionado por múltiples alteraciones en el ADN; esto implica que cualquier individuo o persona que viva una larga vida, desarrollará cáncer de un tipo u otro, ya que los errores en la replicación del ADN, ocurren constantemente y se acumulan con el tiempo. Sin embargo, estos errores son eventos extraordinariamente raros y una posibilidad de que múltiples eventos ocurran simultáneamente en una misma célula es poco frecuente en la vida de una persona (**Simpson AJG, 1977**), Sin embargo los diferentes tipos de cáncer difieren no solo por su localización sino por los factores de riesgo y conductas propias del individuo que pueden condicionar o favorecer el desarrollo del cáncer

I.2 CANCER DE CUELLO UTERINO (CaCu)

La mujer desde su vida intrauterina presenta constantes modificaciones del epitelio cervico-vaginal el cual está conformado por epitelio escamoso y epitelio

cilíndrico o columnar; el sitio de unión de estos epitelios es conocido como unión escamo-columnar o escamo-cilíndrica. Es en esta unión y en la zona de transformación donde presumiblemente actúan los agentes con potencial carcinogénico dando origen a la metaplasia atípica, lesiones intraepiteliales cervicales y carcinomas invasivos **(Martínez y col, 2004)** Esta zona de transformación cambia gradualmente según la edad, avanzando cada vez más hacia el endocérnix y durante la edad reproductiva esta zona es distal al orificio cervical, la metaplasia, por otra parte, es tan común que se considera un proceso fisiológico normal **(Lázaro J, Pardo A, 1998)**

El cáncer cervical se desarrolla en la unión escamocolumnar, es decir, el área del cuello uterino en donde las células escamosas del revestimiento vaginal y la porción externa del cuello se unen con las células columnares que tapizan el canal endocervical **(Oho S, 1999)** El CaCu puede originarse bien en el epitelio plano estratificado (escamoso) de la exocervix, o bien en el epitelio glandular del endocérnix **(Bravo J y col, 2006)** Con la edad, los cambios en el pH vaginal desencadenan un proceso de metaplasma escamoso en el que las células escamosas comienzan a cubrir las células columnares, lo cual produce un área denominada zona de transformación **(Melter M y col, 2000)**

El cáncer invasivo de cuello uterino por lo general esta precedido de una historia de diez a veinte años de cambios celulares pre invasivos q varían desde la displasia leve hasta el carcinoma in situ. **(González M y col, 1992)** y corresponde al estadio final de un espectro continuo de alteraciones epiteliales (lesiones preinvasivas), en las que un estadio da lugar al siguiente de manera imperceptible.

No todas las mujeres que presentan las lesiones precursoras desarrollan la forma invasora de esta enfermedad. **(Dazulrosado K y col, 2004)**

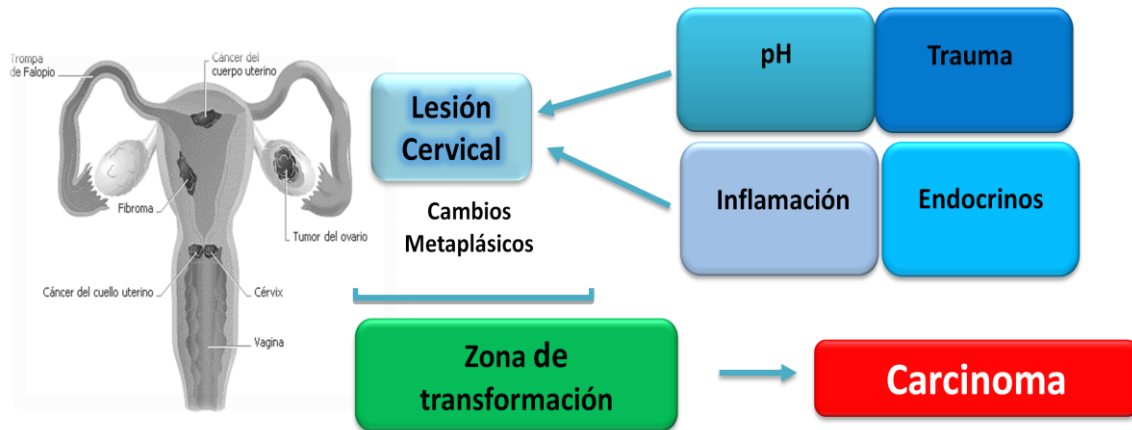


Figura 4 Los cambios en el pH vaginal, procesos inflamatorios persistentes, infecciones y cambios hormonales desencadenan un proceso en el que las células escamosas comienzan a cubrir las células columnares, lo cual produce un área denominada zona de transformación. Carrero Y, 2011

I.3 LESIONES PREINASIVAS DE CUELLO UTERINO

I.3.1 Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)

La Neoplasia intraepitelial cervical (NIC), se define como un espectro de epitelios escamosos anormales con alteraciones en las estructuraciones y maduración, con buena diferenciación (Displasia leve) o ausencia total de diferenciación situados en la superficie o relleno de glándulas pero sin invasión (carcinoma in situ). **(Hargundey S, 1998)**

Los diferentes sistemas de clasificación citológica en relación al cáncer de células escamosas cervicales; han evolucionado desde los años cincuenta utilizando el término de displasia en tres grupos: leve, moderada y severa; según el grado de afectación de la capa epitelial por las células atípicas. Con el pasar de los años se

observó una correlación directa entre progresión y el grado histológico, que conllevaron al término de Neoplasia Intraepitelial cervical (NIC) para 1968 y se dividió en los grados I, II y III; NIC I correspondía a la displasia leve, NIC II a la displasia moderada y NIC III a la displasia grave y al Carcinoma in situ (**Verdessi A y col, 2006**)

Posteriormente, se reconocieron alteraciones anatomopatológicas como la atipia coilocítica o condilomatosa asociada con la infección por virus del papiloma humano y para 1990, se propone la terminología histopatológica basada en dos grados: NIC de bajo grado, que comprende las anomalías compatibles con atipia coilocítica y las lesiones NIC I, y NIC de alto grado que comprende NIC II, NIC III y cáncer in situ.

Richard, (1960) clasificó la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) en tres grados: con una buena maduración, mínimas anomalías nucleares y pocas mitosis se identifica el NIC I, donde las células indiferenciadas se encuentran en las capas epiteliales más profundas (tercio inferior). Pueden verse cambios citopáticos debidos a la infección por el VPH en todo el espesor del epitelio. Ahora, el **NIC II**, se caracteriza por cambios celulares displásicos restringidos sobre todo a la mitad o los dos tercios inferiores del epitelio, con anomalías nucleares más marcadas que en la NIC I, y el NIC III, caracterizado por pérdida de la diferenciación y la estratificación, o existir solo en dos terceras partes al grosor total del epitelio, con abundantes mitosis. Las anomalías nucleares aparecen en todo el espesor del epitelio.

Posteriormente se introduce el concepto de lesión Intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG), y lesión Intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG),

basándose en datos citológicos, según la clasificación o sistema Bethesda el término alto grado incluye el NIC II y NIC III de la clasificación de Richard, y el termino bajo grado el NIC I y las alteraciones celulares producidas por papiloma virus (PVH).
(Verdessi A y col, 2006)

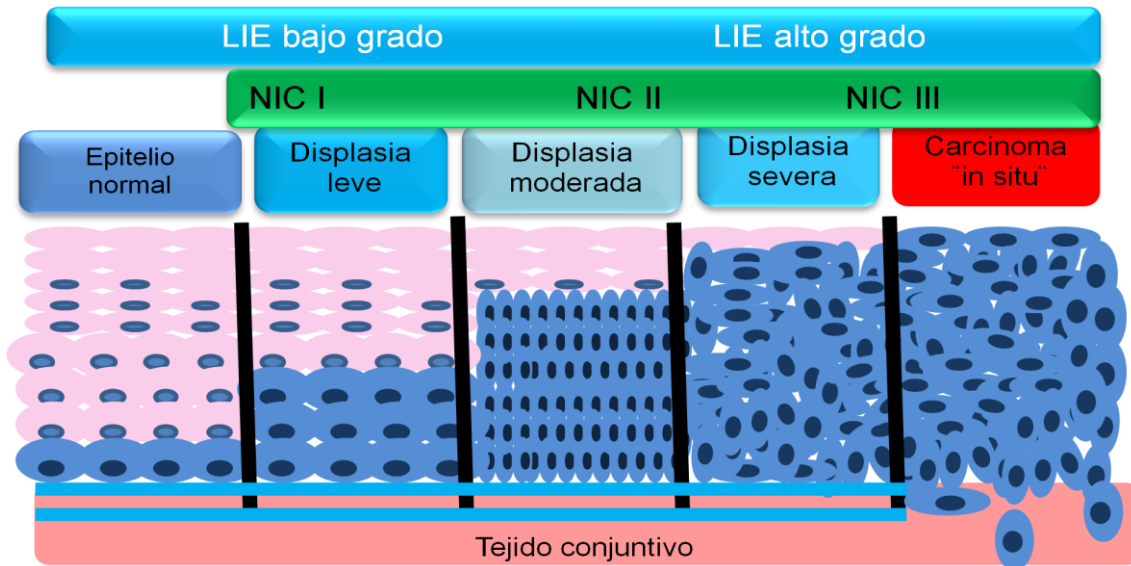


Figura 5 Clasificación de las lesiones preinvasivas de cuello uterino de acuerdo a las alteraciones producidas en el epitelio cervical. Carrero Y 2012

I.4.- HISTORIA

El cáncer del cuello uterino ha despertado un gran interés desde hace mucho tiempo, en la ciudad italiana de Verona en 1842, haciendo un estudio sobre las muertes por cáncer, el profesor Doménico Rigoni-Stern detectó una curiosa diferencia entre las monjas y las mujeres casadas de la localidad. Mientras las primeras tenían mayores tasas de cáncer de mama, las veronesas desposadas sufrían con más frecuencia el de cuello uterino. A finales del siglo XIX se describieron cánceres superficiales y asintomáticos durante largo tiempo. A comienzos del siglo XX se comunicó la presencia de áreas de carcinoma superficial carcinomatoso, sin embargo el término más aceptado fue el de carcinoma in situ propuesto por Rubia y descrito en 1910, aunque erróneamente se atribuye a

Broders. De ahí se pensaba que el cáncer no aparece espontáneamente si no que por el contrario tiene una historia natural por lo cual había que estudiarlo detalladamente, es cuando a Hinselmann se le encarga dicho estudio. Se necesitó para ello un aparato de aumento y es la razón del invento del colposcopio en el año de 1925. Para entonces se pudieron distinguir dos tipos de lesiones pre malignas denominadas: atípica simple y atípica elevada, posteriormente las lesiones pre malignas han recibido muchas denominaciones como epitelio con atípica simple, elevada atípica no cancerosa, epitelio anormal, hiperplasia de células basales y anaplastia, hiperplasia de células espinosas y anaplastia. En 1930, otro curioso hecho llamó la atención del doctor Richard Shope, de la Universidad de Rockefeller (EEUU) en una visita al campo con un amigo cazador, Shope oyó hablar por primera vez de las liebres con cuernos (jackalope, en inglés), una rareza que le puso sobre la pista de la relación de este cáncer con un virus. Las astas que adornaban la cabeza de algunas liebres eran en realidad enormes verrugas causadas por un virus, tal y como pudo comprobar Shope después de molerlas, filtrarlas en una vajilla de porcelana y obtener minúsculas partículas con las que infectó a otros ejemplares sanos. Estas liebres sanas también desarrollaron la protuberancia en su cabeza tras el contagio y el experimento apuntaló la teoría vírica. Una idea que no se volvió a retomar sino hasta la década de los setenta cuando el Dr. Harold Zur Hausen inicio su investigación a partir de los estudios con liebres, logrando aislar dos cepas del papiloma virus humano, de las que hoy se sabe que están implicadas en el 70% de los tumores de cuello del útero.

En 1961, en el primer congreso internacional sobre citología exfoliativa celebrado en Viena, un grupo de expertos propuso el empleo de los términos displasia y carcinoma in situ, que pronto desplazaron a los demás. El cáncer del

cérvix tiene una historia natural que inicia con la lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, pasa por las de alto grado, posteriormente llega al cáncer micro invasor y al invasor propiamente dicho y por último la muerte (**Villiers EML, 1981, Zur Hausen H, 1982, Zur Hausen H, 1996, Zur Hausen H, 1999**).

I.5 EPIDEMIOLOGIA

El cáncer de cuello uterino representa una causa frecuente de morbimortalidad en mujeres en edad reproductiva, es el segundo en frecuencia en la mujer en todo el mundo con una incidencia global estimada de 480.000 nuevos casos cada año y una mortalidad aproximada de 280.000 muertes anuales, la mayoría de los casos (alrededor del 80%) ocurre actualmente en los países en desarrollo, las tasas de este tipo de cáncer, antes de la introducción del cribado, en la mayor parte de Europa, América del Norte y Japón, eran muy similares a las que se ven actualmente en los países en vías de desarrollo. Sin embargo, todavía, el cáncer de cuello uterino es el segundo en frecuencia en las mujeres entre 15 y 49 años en Europa, después del cáncer de mama, siendo el más frecuente en mujeres de 15 a 29 años y apareciendo en el 34% de los nuevos casos en mujeres menores de 45 años. En el continente americano se estimó una incidencia y mortalidad de 92.136 y 37.640 casos, de los cuales el 83,9% y 81,2% corresponderían a América Latina y el Caribe respectivamente (**Parkin D, Bray F 2006; Merle L 2004**)

Al analizar las tasas de mortalidad por Cáncer de Cuello Uterino en diferentes países, se observó que la variación de la mortalidad es notable con tasas que llegan a ser ocho veces más altas en los países de “alto riesgo” en Latinoamérica, el sudeste Asiático y África, respecto con algunas naciones de Europa, Japón y Australia. Así mismo, cuando se comparan las tasas de mortalidad ajustadas de

Canadá y Estados Unidos de América (EUA), con las de los países de América Latina (Colombia, Venezuela, Brasil, México, Perú Costa Rica), es evidente que dichas tasas de muerte son más altas en estos últimos años. En Venezuela, el Cáncer de Cérvix se considera la primera causa de muerte por patología oncológica, detectándose 3.000 casos nuevos de cáncer de cuello uterino en mujeres en edades comprendidas entre 25 y 64 años. Las estadísticas oficiales reportan que para el año 2007, murieron 1571 mujeres por Cáncer de Cuello Uterino. La incidencia de la enfermedad es de 3720 mujeres/año. Los estados que presentaron una mayor tasa de mortalidad para ese mismo año son: Apure (31,03), Delta Amacuro (22,66), Cojedes (22,19) y Amazonas (21,18) **(MPPS, 2009)**

Tras una importante mejoría en la supervivencia en la primera mitad del siglo XX, no se ha apreciado un progreso importante en este sentido en los últimos años. Las tasas de supervivencia por este tipo de cáncer no han mostrado variación cuando los datos se comparan por estadios lo que evidencia que se dispone de tratamientos adecuados y equivalentes. Parece pues paradójico que, si se han establecido poblaciones, esto no redunde en una mejoría de la supervivencia. Esto se debe fundamentalmente a que se mantiene una proporción de mujeres a las que se les diagnostica el tumor en estadios tardíos debido a que, o bien son mujeres a las que es difícil llegar en los programas de cribado, o bien porque han sido sometidas a un screening inadecuado o no se han sometido a screening en absoluto. A pesar de que, hasta el momento actual, la principal estrategia en la prevención del cáncer de cérvix ha sido la implementación de los programas de cribado mediante la utilización de la citología exfoliativa (test de Papanicolaou), ésta tiene una baja sensibilidad. **(Falcón Vizcaíno 2007)**

I.6 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CÁNCER DE CUELLO UTERINO

La causa de la aparición del cáncer de cuello uterino ha sido objeto de estudio por más de 150 años. La etiología es aún desconocida, aunque se asocia a varios factores de riesgo. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres que han comenzado la actividad sexual precozmente, con embarazos a temprana edad **(Taylor, 2000; González y col, 2000; Murthy y col, 2000)**. La vida sexual activa incrementa la frecuencia de la enfermedad de forma importante, principalmente en aquellas mujeres que la inician antes de los 12 años **(Sawaya y col, 2001)**. La promiscuidad, sin ser sinónimo de cáncer de cérvix, parece ser el factor de riesgo de mayor importancia. Aunque numerosos factores han sido sugeridos para explicar la relación entre el riesgo de padecer la enfermedad y los diversos elementos asociados con las relaciones sexuales, la transmisión de agentes infecciosos (Papiloma Virus, Trichomonas, Gardnerella, Herpes virus tipo II y Chlamydia) continúa como uno de los más importantes. **(Sayedel-Ahl y col, 2002; Mikamo y col, 1999; Mori y col, 2001)**

Estudios epidemiológicos han demostrado que la mayor parte de los tipos de cáncer en los humanos se origina en forma secundaria al impacto de diversos factores y muy particularmente el cáncer cervical. En los últimos años y con mayor frecuencia este cáncer se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, teniendo como factores etiopatogénicos y predisponentes: la edad precoz en el comienzo de relaciones sexuales, paridad elevada, infecciones vaginales y la producción de radicales libres, entre otros, todos ellos considerados cofactores en la génesis del cáncer cervical **(Simpson AJG, 1977)**.

I.6.1 Edad De La Primera Relación Sexual. El inicio temprano de las relaciones implica la aparición de múltiples compañeros sexuales. Se ha demostrado que en la adolescencia los tejidos cervicouterinos son más susceptibles a la acción de los carcinógenos, y de hecho, si existe un agente infeccioso relacionado, el tiempo de exposición a este será mucho mayor. El riesgo de lesión intraepitelial cuando el primer coito se tiene a los 17 años o menos es 2,4 veces mayor que cuando este se tiene a los 21 años (**Bosch F X, 1995**).

I.6.2 Número De Compañeros Sexuales. Existe una relación directamente proporcional entre el riesgo de lesión intraepitelial y el número de parejas sexuales. Esta exposición se ha relacionado básicamente con la probabilidad de exposición al VPH (**Bosch FX, 2002, Apgar BS, 1999**). Las mujeres solteras, viudas o separadas tienen más riesgo de infectarse por VPH dado que tienen más compañeros sexuales, sean permanentes u ocasionales (**Hart KW, 2001**). Torrejón en sus estudios ha demostrado la presencia de VPH cervical o vulvar en un 17-21% de las mujeres con una pareja sexual y en 69-83% de las mujeres con 5 o más parejas sexuales (**Torrejón R, 2002**).

I.6.3 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 cáncer de cérvix en mujeres portadoras de VPH (**Skegg DC, 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 V y col, 2002**) Así mismo, al comparar el uso de anticonceptivos contra los métodos de barreras, se ha observado que este último brinda cierta protección contra el cáncer de cérvix por reducir la exposición a

agentes infecciosos, específicamente la combinación de diafragma y crema espermicida, esta última constituida por agentes con acción antiviral. (**Hilleman MR, 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 *shock* térmico. 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 SP y col, 2000**) Existen regiones de regulación de la transcripción del ADN viral que contienen elementos de reconocimiento a hormonas⁷ y que aumentan el nivel de expresión de dos genes virales el E6 y el E7. (**Von Knebel DM y col, 1997**)

Otro mecanismo descrito es su 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. (**Von Knebel DM y col, 1997**)

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 DM y col, 1997**)

I.6.4 Plasma seminal El diagnóstico de neoplasia cervical no es sinónimo de promiscuidad femenina porque muchas mujeres que sólo han tenido una pareja

sexual desarrollan la enfermedad, por lo que es interesante considerar la influencia del hombre en la génesis del cáncer uterino. La probabilidad de que las mujeres sean portadoras del VPH y el riesgo de padecer de cáncer de cérvix se ha relacionado con la presencia de ADN viral en el pene o la uretra de su pareja sexual **(Bosch F X, 2002)**. Además las mujeres tienen un riesgo tres veces superior de padecer la enfermedad si su compañero ha tenido previas esposas que han desarrollado la enfermedad **(Benedet JL y col, 2002)**.

Seguido al contacto sexual, los espermatozoides penetran rápidamente a través del canal endocervical. Gran número de ellos se depositan en los pliegues mucosales de las criptas cervicales, y es alta la concentración de éstos cerca de la unión escamocolumnar, donde precisamente se desarrollan el mayor número de neoplasias. En este sentido, se han realizado estudios sobre la constitución del plasma seminal. El plasma seminal constituye el 90 % del líquido eyaculable y contiene, dentro de sus componentes inmunosupresores que afectan las funciones de diferentes células del sistema inmune (SI), y que incluyen linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK), macrófagos, anticuerpos del sistema de complemento. Experimentalmente se ha comprobado que existe una fracción de alto peso molecular responsable de la inhibición de linfocitos T entre las que se encuentran la proteína plasmática asociada a la gestación y la proteína placentaria, ambas con propiedades inmunosupresoras, aún a bajas concentraciones. **(Hilleman MR 2002)**

El plasma seminal desempeña un importante papel fisiológico inmunosupresor que es determinante para la fertilización. El tracto cérvico-uterino normalmente produce leucocitosis en respuesta a los espermatozoides pero el plasma seminal los protege de la destrucción poscoital por parte de las células del

SI. Sin embargo, sólo en presencia de carcinógenos este efecto puede constituir un cofactor que acelera o contribuye al desarrollo de neoplasias. Es por ello que se considera importante en la génesis del cáncer de cuello. **(Edward SP y col 2000)**

I.6.5 Condición Socioeconómica Y Cultural. Existen datos controversiales respecto a la asociación entre CaCu y condición económica, social o educativa. Se acepta que las mujeres de más bajo nivel social, cultural y educativo, así como las inmigrantes extranjeras tienen mayor incidencia de CaCu, pero existen estudios que muestran a las universitarias como las que más lo padecen **(Hasenyager C, 1999)**. Existe la interrogante si esta condición está relacionada con una mayor exposición al VPH o la dificultad para acceder a los servicios de detección oportuna **(Fernández ME, 1998, Lorant V, 2002)**. Benia y Tellecha, en Uruguay, informaron que más del 60% de las mujeres de 20 a 30 años no acuden a los servicios de tamizaje más por temor y trabas administrativas que a tener que vivir en condiciones que las expone más al virus **(Benia W, Tellecha G, 2000)**.

I.6.6 Tabaco El tabaquismo se ha asociado con la presencia de carcinomas de células escamosas, predominante en el cáncer cérvico uterino, 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 carcinógenos en las células ya afectadas por agentes transformantes posiblemente por transmisión sexual como el VPH y el Herpes virus tipo II. **(Edward SP y col 2000)**

Otro mecanismo atribuido a este factor para explicar su efecto en el cáncer de cérvix, 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 (**Aclaudious NN y col, 2002**) y se ha reportado que existe una fuerte relación dosis-respuesta. (**Deacon JM y col, 2000**)

I.6.7 Dieta y factores El estado nutricional puede influir en la progresión de la infección por VPH. El patrón de metilación del ADN VPH *in Vitro* se ha asociado con la actividad transcripcional viral pues la RNA polimerasa, enzima encargada de la transcripción, se une con menos afinidad al ADN metilado.

Se conoce que los genes metilados ("impriming" genómico) son inactivos, mientras que los metilados o hipometilados pueden ser transcritos para generar un producto proteico. La pérdida del "impriming" en los fenómenos de carcinogénesis podrían vincularse con factores fisiológicos, ambientales y dietéticos, que poseen la capacidad de metilar al ADN (**Gómez DE, 1998**), así el folato, la vitamina B₆, la vitamina B₁₂ y la metionina pueden tener su mecanismo de acción en la prevención del cáncer de cuello uterino a través de su papel en la metilación. (**Sedjo RL, 2002, Shannon J, 2002**).

Se ha comprobado que durante el embarazo ocurre una cierta depresión de los niveles de folato lo cual se ha relacionado con el aumento de riesgo de aparición de la enfermedad en multíparas. La ingestión de comidas ricas en vitamina A y, particularmente, en retinol se asoció con la reducción del riesgo de padecer traumas de desgarro del epitelio que pueden producirse durante el parto, y por sus propiedades antioxidantes está asociado con la afección en análisis.

Algunos estudios científicos consideran que una dieta baja en antioxidantes, ácido fólico y vitamina C favorece la persistencia de la infección por VPH y la evolución de las lesiones de NIC I a NIC II, III y cáncer cervicouterino pero no son concluyentes (**León G, Bosques O, 2005**).

1.6.8 Factor genético Aunque el VPH es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cérvix, sólo pocas mujeres infectadas desarrollan la enfermedad. La susceptibilidad genética a la infección por el VPH parece ser importante en determinar el riesgo individual de desarrollo viral del cáncer. (**Magnusson PK y col, 2000**) 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 tumores malignos en el cuello uterino. (**Van Driel WJ y col, 1999**)

1.6.9 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 WJ y col, 1999**). La infección viral es común en pacientes con supresión/defecto en el SI demostrado por linfopenia, con la relación linfocitos B/ linfocitos T, migración espontánea y quimiotaxis de neutrofilos disminuida. (**Roseen K y col, 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 contra la progresión de la enfermedad. Además, el comportamiento de los mecanismos efectores de la respuesta inmune en enfermedad. (**Jastreboff AM y col, 2002**) Además, el comportamiento de los

mecanismos efectores de la respuesta inmune en pacientes con lesiones del cuello uterino, varían según el estadio y el tipo de VPH que infecta. La regresión de las lesiones inducidas por VPH están acompañadas de una reacción característica de hipersensibilidad retardada dependiente de linfocitos T auxiliares (Th).

Se ha informado la existencia de un desbalance en el patrón de citocinas 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 se 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 M y col, 1998).**

I.6.10 Infecciones de Transmisión Sexual. Se ha demostrado la asociación de cáncer de cuello uterino con enfermedades de transmisión sexual. En un estudio realizado en tres países se encontró asociación entre infección por VPH y *Chlamydia trachomatis* en Colombia y España, pero no en Brasil **(Muñoz N, 1996)**; mientras que otros estudios han asociado la infección del serotipo G de esta bacteria con el virus **(Anttila T, 2001)**. Adicionalmente, la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) facilita el desarrollo de la neoplasia, con un aumento del riesgo de cáncer entre las infectadas por el VIH de hasta 3,2 veces el riesgo de las mujeres sin VIH **(Mandelblatt JS, 1999)**.

Con el desarrollo de técnicas en biología molecular para detectar la presencia de ADN del VPH en muestras citológicas durante la década de los ochenta, se pudo establecer el papel del VPH de alto riesgo en la etiología del CaCu. Posteriormente, estudios epidemiológicos multicéntricos conducidos en la década de los noventa, permitieron demostrar la asociación causal entre infecciones con VPH y el desarrollo

de CaCu. Con la evidencia científica acumulada, hoy en día, la infección con VPH ha sido propuesta como la primera causa necesaria para el desarrollo de CaCu. Sin embargo, no todas las mujeres infectadas con VPH desarrollan cáncer invasor, existiendo esta infección con frecuencia en mujeres sanas. Por lo tanto, otros cofactores deben ser necesarios para la progresión de la carcinogénesis en el cuello uterino. **(Ciaran BJ, 2007)**

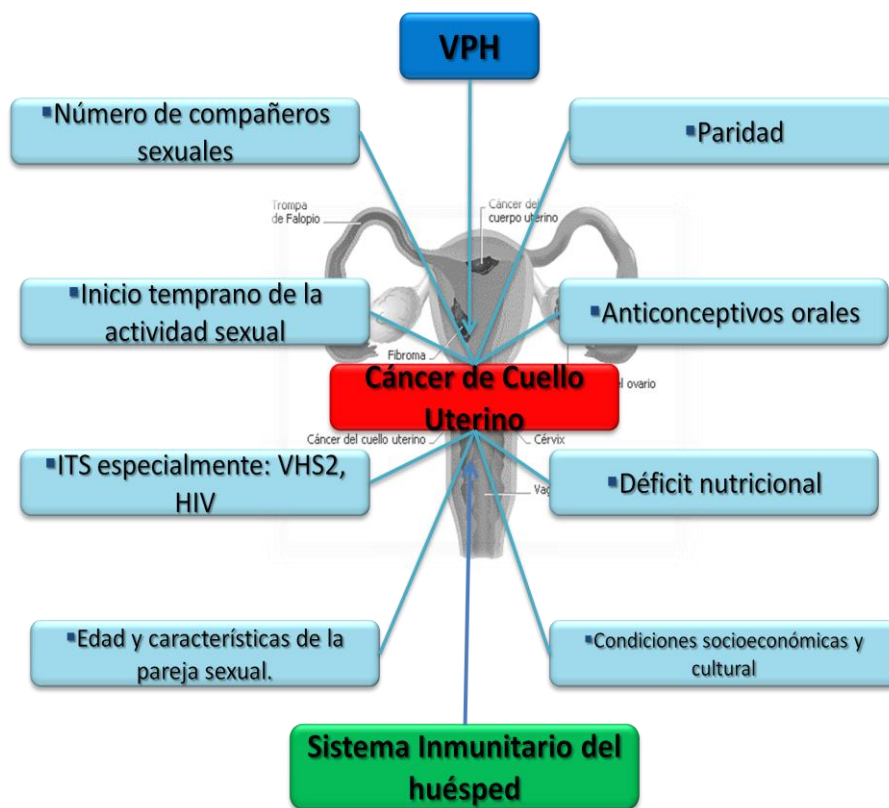


Figura 6 El cáncer de Cuello Uterino se relaciona con algunos factores del medio ambiente y estilo de vida, además de la asociación entre las formas invasivas del cáncer cervicouterino y algunos virus especialmente el Virus del Papiloma Humano (VPH) como uno de los principales agentes responsables de la etiología de esta enfermedad y defectos del sistema inmunitario del huésped. Carrero Y, 2012

I.7 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)

El VPH es un miembro del género A de la familia *Papovaviridae*, es un virus sin cubierta que mide de 50 a 55 nanómetros (nm) de diámetro, presentando cápsides icosaédricas constituidas por 72 capsómeros, su genoma es un ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de doble hélice, con un peso molecular aproximado de 5×10^6 Daltons, correspondiente a 8.000 pares de bases. (**Braunwalder y col, 1999**)

El genoma viral está organizado y dispuesto en bloques separados que consisten en regiones de lectura abierta (ORFs, open reading frame). Estas regiones han sido designadas como tempranas (E) que codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2) y transformación celular (E6 y E7), o tardías (L) que codifican proteínas de la cápside (L1 y L2); además poseen una región denominada región reguladora ascendente (URR) ó región larga de control (LCR), que contiene secuencias de control para la replicación y expresión genética del VPH. (**Callejas D, 1997; Rivera R y col, 2002; Crum C, 1998**)

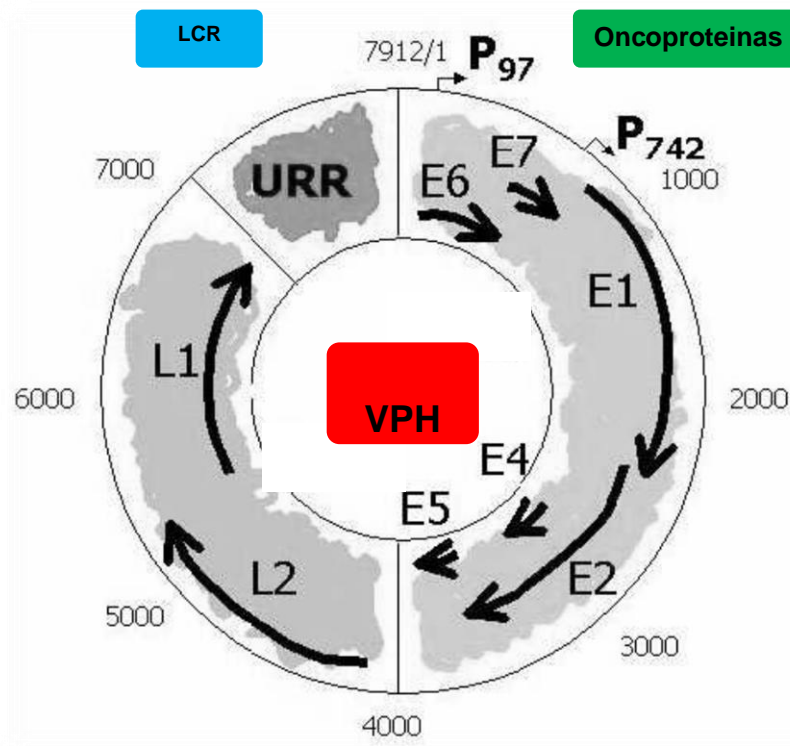


Figura 7 Organización del Genoma del VPH.

I.7.1 PROTEINAS VIRALES

I.7.1.1 GENES E1 Y E2

Los genes E1 y E2 codifican proteínas que regulan, activando o reprimiendo, la transcripción vírica mediante fijación a proteínas celulares. La proteína transmembranosa E5 se fija a la membrana plasmática, así como a las membranas del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico, y modula la actividad del factor de crecimiento epitelial (EGF). (*Morrison F, 1994*)

1.7.1.2 GEN E4

La proteína E4 interactúa con los filamentos de la citoqueratina de la célula hospedadora destruyéndolos, pudiendo provocar la muerte celular. El VPH como

virus que es no forma vida independiente requiere de la célula huésped para su replicación penetrando por endocitosis y ubicándose en el citoplasma, interrumpiendo la síntesis de proteínas de la célula (**Stein J, 1991; Pascale H y col, 1999**)

I.7.2 ONCOPROTEINAS VIRALES

El VPH al penetrar a la célula a través de la membrana plasmática por endocitosis, se ubica en el citoplasma interrumpiendo la síntesis de proteínas de las células infectadas, siendo capaz de utilizar macromoléculas y energías del hospedador, y en el núcleo de las células se une a genes supresores como p53 y Rb (inserción mutacional) a través de las proteínas E6 y E7, induciendo cambios transformacionales de tipo neoplásico en la célula infectada capaz de dar inicio a una lesión intraepitelial y origina posteriormente un proceso neoplásico (**Muñoz M y col, 1999; Burkhardt A, 1999**). A pesar de que este bien establecido que las oncoproteínas E6 y E7 codificadas por el virus están involucradas en la transformación celular, la infección por VPH, no es suficiente por si sola para desarrollar un cáncer. (**Kuper H y col, 2000**).

I.7.2.1 ONCOPROTEINA E6

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica para una proteína de 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. La proteína tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante. E6 se expresa muy tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el

ambiente celular, como el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP (coactivadores de p53), e incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa. La acción clave de E6 de los VPH de alto riesgo es inhibir la función de P53, proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina (**Hengstermann A y col, 2001; Mantovani F y col, 2001**) Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP). Esta proteína reemplaza a Mdm2, que en células normales no infectadas es quien degrada a P53. Este cambio reduce dramáticamente la vida media de P53 (desde 3 horas hasta 20 minutos) y el nivel de proteína en las células de CaCu a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. La mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo (E6 – BR) no se unen a P53 o lo hacen débilmente y no lo degradan. E6 también puede retener a P53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación (**Mantovani F y col, 1999**). En consecuencia E6 inhibe la capacidad de P53 para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco. E6 puede superar la apoptosis dependiente e independiente de P53. Así mismo se ha observado que E6 interactúa con Bak, una proteína proapoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación. El incremento de P53, que se daría por la proliferación inducida por el VPH, así como la consecuente inducción de apoptosis, probablemente mataría a una célula infectada por VPH antes de que la replicación de este ocurriera. Por tanto la modulación de los niveles de P53 por parte de E6 es importante para una infección productiva. (**Krajewski S y col, 1996**)

I.7.2.2 ONCOPROTEINA E7

El gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica para una proteína de aproximadamente 100 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa. E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F. La familia pRB controla la replicación celular (**Boyer SN y col, 1996**) La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular. E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27. (Inhibidores de cinasas) Como resultado de la liberación de E2F se expresa ciclina E, importante para el progreso de la fase S. Estas interacciones inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la estabilización de P53 que normalmente contrarrestaría esta replicación celular, anormalmente estimulada, mediante el incremento de la apoptosis. Sin embargo la proteína E6 – AR degrada a P53 y por tanto bloquea esta respuesta celular. (**Munger K y col, 2001**)

I.7.3 INSERCIÓN MUTACIONAL

El VPH al penetrar a la célula a través de la membrana plasmática por endocitosis, se ubica en el citoplasma interrumpiendo la síntesis de proteínas de las células infectadas, siendo capaz de utilizar macromoléculas y energía del hospedador, y en el núcleo de las células se une a genes supresores como p53 y Rb (inserción mutacional) a través de las proteínas E6 y E7, induciendo cambios

transformacionales de tipo neoplásico en la célula infectada capaz de dar inicio a una lesión intraepitelial y origina posteriormente un proceso neoplásico (**Lizano M, 2009**).

En la patogénesis del cáncer del cuello uterino, la infección por VPH de alto riesgo condiciona la pérdida de las funciones de algunas vías de regulación celular. Las oncoproteínas VPH-E6 y VPH-E7 forman complejos e inactivan funcionalmente a las proteínas p53 (encargada de la reparación del ADN y la inducción de apoptosis cuando fallan los mecanismos de reparación) y Rb (proteína supresora de tumor), respectivamente. Como consecuencia, y al igual que en otras malignidades no asociadas a la infección por VPH, las señales de transducción reguladas por estas proteínas son afectadas lo que contribuye a la inestabilidad genómica. (**Pillai MR y col, 1998; Padovan P y col, 2000**)

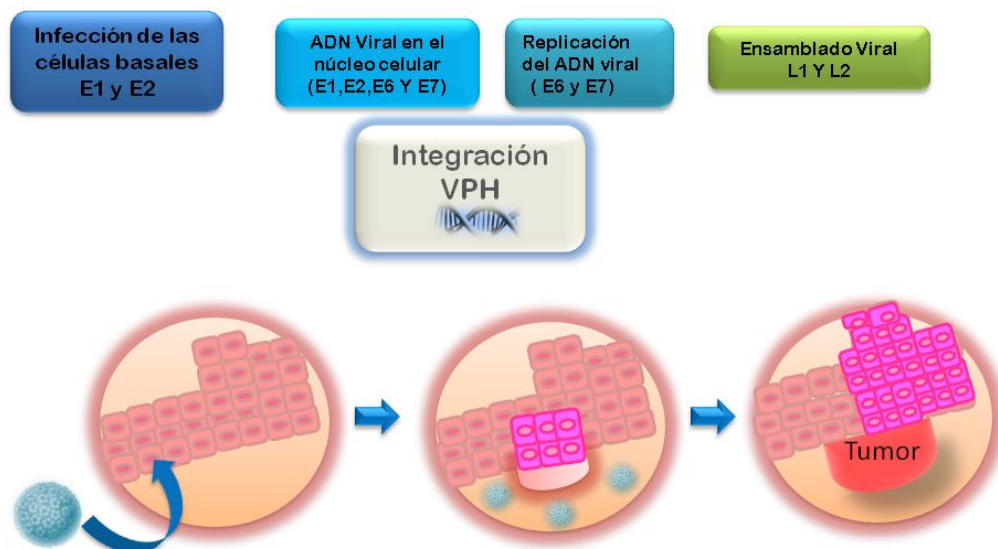


Figura 8 Dinámica de la infección por VPH en Cuello Uterino. Carrero Y 2012

I.8 CLASIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)

El virus de papiloma humano se divide en dos grandes grupos dependiendo de los tipos de lesiones cancerígenas que provocan: alto y bajo riesgo. Se denomina VPH de bajo riesgo (BR) a aquellos genotipos cuyo riesgo de provocar cáncer es bajo, dentro de este grupo se encuentran: 6, 11, 40, 42, 53, 54 y 57. **(Shirley E, 1999; Torrejón R, 2002)** Los tipos de VPH de bajo riesgo pueden causar cambios leves en el cuello del útero de una mujer. No son perjudiciales y desaparecen con el tiempo. Sin embargo pueden presentarse verrugas genitales conocidas como condilomas acuminado, originadas de ciertos tipos como el VPH6 y el VPH11. Estas verrugas pueden aparecer varias semanas después del contacto sexual con una persona que esté infectada con VPH, o es posible que se tarden varios meses o años en aparecer; o, tal vez, que nunca aparezcan.

El segundo grupo de tipos de VPH genital se conoce como de alto riesgo (AR) son los que se encuentran con mayor frecuencia asociados en los casos de cáncer de cuello uterino e incluyen el VPH 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58. De estos tipos el VPH 16 y el 18 son, sin duda, los más importantes dado que se encuentran con más frecuencia vinculados al cáncer cervicouterino. Sólo la infección persistente de VPH de alto riesgo (aquella que no desaparece durante años) aumenta el riesgo de Cáncer de cuello uterino. **(Stoler M, 2006; Torrejón R, 2002)**

Los tipos de alto riesgo causan formaciones que son generalmente planas y casi invisibles, comparadas con las verrugas causadas por los VPH6 y VPH11. Es importante notar, que la mayoría de las infecciones de virus del Papiloma humano desaparecen por sí solas y no causan Cáncer. **(Stoler M, 2006; Correnti M y col,**

1997; Giannini SL y col, 1998) Sin embargo los tipos 16, 18, 31, 33 y 35 pueden provocar alteraciones celulares en la vagina y el cuello uterino asociados a lesiones premalignas y cancerosas en la mujer **(Morrison F, 1994)**

Observaciones clínicas han permitido establecer un importante papel del VPH en el origen de las lesiones preinvasivas de cuello uterino **(Satos S y col, 1998)**. Se ha podido demostrar que este virus es el agente desencadenante de más del 95% de los cánceres cervicales y de las lesiones cervicales de alto grado. Estudios internacionales sobre cáncer cervical invasivo han establecido que el 92,9% de los tumores analizados contenían ADN de VPH y que probablemente menos del 5% del total, realmente carecían de ADN vírico. Por lo tanto, la infección por VPH representa el paso previo que precede al desarrollo de una neoplasia intraepitelial cervical (NIC) **(Lacruz C y col, 2003; Holowaty P y col, 1999)**, Sin embargo, en un pequeño grupo de mujeres, el virus no desaparece, y la infección se hace persistente. Esto puede llevar al desarrollo de NIC y su progresión de NIC I a NIC III, y luego a carcinoma invasor. El tiempo de evolución de NIC I a carcinoma invasor es variable y depende del tipo de cepa infectante, la inmunidad del huésped y la carga viral, generalmente es de 10 a 20 años. **(Giannini SL y col, 1998; López A y col 2002)**

Cuando la mujer es sexualmente activa, aumenta el riesgo de infección con VPH-AR. En 80 % de las mujeres infectadas, la infección es transitoria, no se desarrolla NIC, y el virus desaparece en 6 a 8 meses. Una respuesta de anticuerpos neutralizadores contra el VPH-Alto Riesgo parece proteger a estas mujeres del desarrollo de NIC. En el otro 20 % de las mujeres infectadas con VPH-Alto Riesgo,

se desarrolla NIC; pero en la mayoría de éstas, el virus y la lesión también desaparecen (**Lopez A y col, 2002**)

TIPOS DE VIRUS	MANIFESTACIONES CLINICAS
VPH:1	Verruga plantar
VPH:2	Verruga vulgar o comun
VPH: 5- 8	Epidermodisplasia verruciforme
CLASIFICACION DEL RIESGO	
VPH:6,11,40,42,53,54,66	Bajo Riesgo
VPH: 16,18,31,33,35,39	Alto Riesgo
45,51,52,56,58,59,67,69	

Tabla 1 Clasificación del VPH de acuerdo a las manifestaciones clínicas y riesgo según The International Agency for Research on Cancer (IARC). 2005

I.9 DIAGNOSTICO DE LESIONES DE CUELLO UTERINO Y VPH

El diagnóstico virológico para la identificación del VPH en lesiones de pacientes o en muestras biológicas durante el pesquizaje clínico rutinario se dificulta al carecer de pruebas serológicas, y a la dificultad de crecimiento del virus en cultivos celulares. El hallazgo clínico de verrugas o lesión colposcópica visualizadas por cambios citológicos o histopatológicos, virtualmente son las herramientas empleadas en el diagnóstico de la infección por VPH al igual que el empleo de la estudios moleculares. (**Velásquez-Cruz AD y col, 2002**)

I.9.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS CONVENCIONALES

I.9.1.1 TEST PAPANICOLAOU

La prueba de Papanicolaou fue descrita desde hace más de 50 años, por el Dr. Papanicolaou, teniendo éxito en la disminución de la incidencia de cáncer cervicouterino, a pesar de tener una sensibilidad del 50 al 60%, si se obtienen tres muestras negativas consecutivas existe una probabilidad menor del 1% de la paciente presente una anomalía cervical (**González E , 2003**).

Históricamente la prueba de elección para el diagnóstico de lesiones preinvasivas ha sido la citología cervical, considerado un método efectivo para reducir la morbilidad y la mortalidad por este tipo de cáncer. Recientemente, la Organización Mundial de la Salud, ha evaluado como herramientas útiles además de la citología de Papanicolau, la citología líquida y la detección del Virus del Papiloma Humano (VPH) (**Martínez F, 2004**).

El diagnóstico citológico identifica la lesión (preneoplásica o neoplásica), que es lo que interesa fundamentalmente al médico clínico para la aplicación terapéutica. A su vez, este estudio citomorfológico sigue siendo el método más rápido y económico para identificar la presencia de VPH en el tracto genital femenino, pero los falsos negativos son relativamente frecuentes, de ahí que en los casos sospechosos, o incluso en los casos NIC positivos sea recomendable la aplicación de técnicas complementarias biomoleculares que permiten la identificación del virus y su genotipo. Es cierto que la mayoría de estas infecciones víricas regresan espontáneamente, pero las ventajas de la biotecnología está bien contrastada, ya que resulta un excelente complemento del examen del frotis en pacientes de

riesgo, reduciendo drásticamente los falsos negativos, modifica el seguimiento en casos de ASCUS y NIC I (LSIL), pues en los VPH negativos es sólo necesario el seguimiento, mientras en los VPH positivos, queda indicada la colposcopia; por último, se presenta como un buen control de tratamientos, facilitando el diagnóstico precoz de recidivas. **(Carreras R, 1997).**

I.9.1.2 COLPOSCOPIA

Fue introducida en 1925 por Hinselman, consiste en la exploración del tracto genital inferior empleando un equipo con distintos aumentos, sin preparación y luego de la aplicación de ácido acético al 5% que permite identificar y delimitar una posible lesión en el cuello uterino, la cual será posteriormente estudiada histológicamente a través de una biopsia.

El examen se puede realizar en cualquier momento del ciclo, fuera del periodo menstrual siendo el momento óptimo durante la fase estrogénica cuando el moco cervical es abundante y acuoso y facilita el examen endocervical.

Las principales indicaciones para realizar colposcopia son:

- Cuello uterino de aspecto sospechoso
- Citología que reporte NIC 1, NIC 2 y NIC 3
- NIC 1 con más de 12 a 18 meses en la citología
- Calidad insatisfactoria persistente en la citología
- Infección por virus de Papiloma Humano
- Acetopositividad en la inspección visual con ácido acético
- Resultados positivos en la inspección visual con solución yodo- yodurada de lugol **(Torné A, 2006).**

I.9.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS ESPECÍFICOS

En la actualidad se disponen de métodos con una sensibilidad y especificidad superiores a las técnicas histológicas clásicas, técnicas inmunohistoquímicas para detección del antígeno y la detección de las partículas víricas por microscopía electrónica (ME) que han sido utilizadas en la detección de la infección viral y que carecen de sensibilidad en la detección de infecciones subclínicas y latentes. **(Martínez J, 2010).**

I.9.2.1 Southern blot: Consiste en la extracción del ADN de muestras en fresco después de la digestión de proteínas y del ARN. El ADN extraído se cliva con un grupo de enzimas de restricción apropiada y se separa con electroforesis en gel de agarosa y posteriormente este gel se transfiere a una membrana para su hibridación con una sonda específica **(Tatti S, 2008).**

I.9.2.2 Hibridación Puntual: Llamado “dot blotting” consiste en no digerir todo el ADN extraído de la célula con enzimas de restricción sino exponerlo por separado sobre un gel y realizar el método de Southern blot sobre una membrana para luego realizar hibridación y detección. Este método es más rápido se pueden evaluar muchas muestras, no necesita enzimas de restricción ni transferencia. Actualmente confirma resultados de PCR. **(García J y col, 2003)**

I.9.2.3 Hibridación Invertida: Consiste en la transferencia a un filtro de ADN de VPH liberado por el plasmado intermedio de una enzima de restricción en su exposición a una sonda de 500 ng de ADN celular radiomarcado. Todas las secuencias de VPH presentes en el ADN celular se hibridarán con el tipo de VPH

complementario presente en la sonda. Existe también la hibridación “sándwich” e in situ entre otras. (**García J y col, 2003**)

I.9.2.4 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR): Es un método in Vitro que permite amplificar las secuencias de ADN específicas más de un millón de veces en unas pocas horas por medio de una reacción enzimática dirigida por un cebador. La síntesis de PCR consiste: el ADN de doble cadena buscado se desnaturaliza para permitir que los cebadores lo hibriden. Estos se unen a las secuencias de ADN complementarias en forma específica. El resultado de PCR es el aumento exponencial del ADN buscado en función de la cantidad de ciclos realizados (un ciclo consiste en la desnaturalización del ADN; fijación del cebador y la extensión del cebador). Si se dispone de la cantidad suficiente de ADN genómico amplificado el diagnóstico puede observarse sobre el gel después de la electroforesis y tinción con bromuro de etidio. (**Villegas V. y col. 2009**)

La mezcla de la reacción consta de una pequeña muestra de ADN que se utiliza como molde a partir de un tejido fresco o en parafina, en adición se necesitan oligonucleótidos que son los que actúan como cebadores, ADN polimerasa termoestable que se utiliza como sustrato para copiar las cadenas nuevas a partir del molde y un amortiguador que se encarga de estabilizar la reacción.

El primer ciclo de la reacción, conocido como desnaturalización, consiste en separar las cadenas de ADN a una temperatura de 94 a 96 °C, aplicada durante pocos minutos. Posteriormente se produce el anillamiento hibridación de los cebadores con las secuencias complementarias de ADN, los cebadores sintéticos

delimitan el sitio que se busca amplificar y se anillan a temperaturas que oscilan entre 50 y 65 °C.

El último ciclo o de extensión permite al ADN polimerasa sintetizar las nuevas cadenas y a medida que avanza el proceso se logra amplificar el segmento unas 10^7 veces (*Villegas V y col, 2009*).

I.9.2.5 PCR Multiplex: Emplea dos o más pares de cebadores en único tubo con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. Por lo tanto, consiste en combinar en una reacción única todos pares de cebadores de los sistemas que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes. Sus ventajas es obtener la información de varios loci en una sola reacción, menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos, rápida construcción de base de datos (*Villegas V y col. 2009*).

I.9.2.6 Sistema de Captura Híbrida II: Se basa en el principio de hibridación en solución. Utiliza sondas de ARN que se unen o hibridan al ADN buscado. Se incluyen dos sondas: sonda B que incluye el panel de los 13 tipos de VPH alto riesgo 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 y 68; y el panel A que abarca los tipos de bajo riesgo 6,11,42,43 y 44. Este método es un inmunoensayo ligado a enzimas y asociado con una reacción de fosfatasa alcalina no radiactiva con compuestos quimioluminiscentes colocados en microplacas. Las muestras se clasifican como positivas si el registro de unidad de luz relativa obtenido con el luminómetro es igual o mayor que la media de los valores de los controles positivos realizados

para el análisis. El fabricante recomienda un umbral positivo de 1 pg/ml (alrededor de 5.000 copias) para la detección del VPH (**García J y col, 2003**).

Estos estudios hoy en día nos permiten identificar a las portadoras de los tipos de VPH de alto riesgo u oncogénicos para decidir si la paciente mantiene un tratamiento conservador, ya que este no siempre erradica el virus y de acuerdo a los conocimientos actuales las pacientes mayores de 30 años con infección persistente podrían correr mayor riesgo de cáncer de cuello uterino en comparación con pacientes que presentan infección fluctuante o involutiva.

I.10 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y CANCER CERVICAL

El VPH penetra a la capa basal del epitelio exocervical e inicia la replicación viral en las células espinosas y el ensamble de los viriones se lleva a cabo en los estratos superiores, cuando las células se han diferenciado. Finalmente en las células escamosas, los viriones son expulsados y pueden iniciar un nuevo ciclo de infección, una vez dentro de la célula el genoma del VPH puede tomar tres vías:

1. El ADN viral es mantenido intranuclearmente pero extracromosómico con lo cual la replicación se lleva a cabo de manera sincrónica con la duplicación celular, dando lugar a una infección latente.
2. Conversión de una forma latente en una infectante por replicación de virus completos desarrollando lesiones intraepiteliales de bajo grado y acuminadas.

3. Integración con el genoma celular e inicio del proceso oncológico (cáncer). (**Erazo J, 2007**)

Los dos productos genéticos necesarios para transformar e inmortalizar las células epiteliales humanas son los originados de los genes E6 y E7 del VPH. Las evidencias que soportan el papel causal de estos oncogenes en el desarrollo de tumores son las siguientes: los oncogenes E6/E7 se expresan en forma constante en células cancerosas; los mecanismos que regulan la expresión de E6/E7 están ausentes en las células cancerosas; E6/E7 son capaces de inmortalizar células y promover la inestabilidad del genoma de la célula huésped; el bloqueo de la función de los genes E6-E7 lleva a la re-versión del fenotipo maligno de las células cancerosas. Estas oncoproteínas se unen e interactúan respectivamente con las proteínas celulares p53 y pRb que son proteínas reguladoras del ciclo celular. (**Shah KV y col, 1989**)

I.10.1 Interacción entre la oncoproteínas E6 y la proteína p53: p53 es un factor de transcripción celular, es decir, un factor que controla la expresión de genes específicos. Actúa como un guardián del ciclo celular preservando la fidelidad de la replicación del ADN. Las mutaciones de p51 son la anomalía genética más comúnmente encontrada, en los tumores humanos. Si el ADN celular es dañado, los niveles de p53 aumentan y se produce una detención del ciclo celular en G1, permitiendo su reparación. Además, p53 induce apoptosis en células con daño irreparable del ADN. La oncoproteína E6 del VPH de alto riesgo se une a p53 a través de una proteína llamada E6-AP, necesaria para la formación del complejo E6-p53. La formación de este complejo, a través de la activación del mecanismo proteolítico de la ubiquitina, produce la degradación de p53. (**Iluibregtse JM y col,**

1995) La oncoproteína E6 del VPH de bajo riesgo, no inactiva a p53 porque sólo se une a su extremo C-terminal y esta interacción no produce la degradación de p53. **(Majewski S y col, 1997)** La de-gradación de p53 impide una adecuada reparación del ADN, lo cual lleva a inestabilidad del genoma, mutaciones, alteraciones cromosómicas y formación de tumores. **(Androphy EJ y col, 1994; Perry ME y col, 1993; Zur Hausen H, 1994; Schcffner M y col, 1994; Zur Hausen H, 1996).**

I.10.2 Interacción entre E7 y pRb: La proteína del retinoblastoma (pRb) es una fosfoproteína cuya función es regular la entrada de la célula al ciclo de división celular. Durante el ciclo celular la pRb experimenta ciclos de fosforilación y defosforilación. La forma no fosforilada es la forma activa que suprime la división celular. Durante la fase tardía de la mitosis, la PRb es defosforilada, se une al factor de transcripción E2F, lo secuestra e impide que este factor transcriba los genes necesarios para que la célula entre a la fase S del ciclo celular, de modo que la célula se detiene en la fase G1 del ciclo celular (fase de reposo). Durante la fase S, G2 y la mitosis temprana, la pRB es fosforilada por enzimas quinasas ciclino-dependientes y pasa a su forma inactiva, permitiendo la labor del factor de transcripción

La oncoproteína E7 se une a pRb en el mismo sitio de unión que el factor de transcripción E2F desplazando a este último de modo que queda libre para activar la replicación y transcripción del ADN. La inactivación funcional de, pRB, permite la progresión de la célula a la fase S del ciclo celular (fase de replicación del ADN). La oncoproteína E7 de los VPH de bajo riesgo interactúa con la pRb con menor afinidad y eficacia. **(Androphy EJ, 1994; Zur Hausen H, 1994; Hollingsworth RE y col, 1994; Huibregtse JM y col, 1994)**

I.10.3 Cooperación entre E6 y E7 en la transformación maligna: Los estudios experimentales demuestran que es necesaria la acción cooperadora y la expresión continúa de los genes E6 y E7 para la inmortalización celular. Se ha especulado que E7 produciría las mutaciones y E6 impediría la reparación de estas mutaciones mediante la degradación de p53. **(Zur Hausen H, 1994)**

En los VPH de alto riesgo, la expresión de E6 y E7 es controlada por factores celulares del huésped (genes), capaces de restringir la transcripción de VPH en células normales. Estos genes reguladores podrían ser el blanco principal de eventos mutagénicos. Los VPH de bajo riesgo, aunque estimulan la proliferación celular, son aparentemente incapaces de inducir mutaciones y la progresión tumoral dependería más de factores externos no bien conocidos. La conversión maligna con estos tipos de VPH es rara y cuando ocurre se producen carcinomas verrugosos, localmente invasivos, pero sin potencial metastásico. **(Zur Hausen H, 1994)**

I.10.4 Rol de la integración viral en la transformación maligna: El ADN integrado se define como la unión covalente del ADN viral al ADN cromosomal. En contraste, el ADN episomal es un ADN circular libre en el núcleo capaz de replicarse y producir viriones. La integración del ADN del VPH, se observa principalmente en carcinomas invasivos. Las lesiones premalignas por lo general presentan ADN episomal. En infección por VPH 16 y 18 ocurre integración del ADN, no así en infecciones por VPH de bajo riesgo 6 y 11. **(Zur Hausen H, 1994; Schffner M y col, 1994)**. El sitio de integración del VPH en el genoma del huésped parece ser un fenómeno aleatorio. En algunos casos, la integración del genoma del VPH ocurre en la vecindad de oncogenes conocidos tales como el c-myc (situado en el cromosoma 8).

Una hipótesis atractiva es que la integración del genoma viral en la vecindad de un oncogén, proporcionaría un ambiente propicio para la proliferación celular y progresión de una lesión preneoplásica a cáncer. Existe especificidad sobre el sitio en el cual se rompe el genoma viral para integrarse al genoma celular. La integración por lo general ocurre en la región E1 - E2 del genoma. Las proteínas E1 y E2 actúan primordialmente reprimiendo la actividad del promotor que permite la transcripción de los oncogenes E6 y E7. En los cánceres cervicales VPH positivo con integración del ADN, E1 y E2 dejan de expresarse y sólo E6 y E7 se siguen expresando. (Schcfner M y col, 1994)

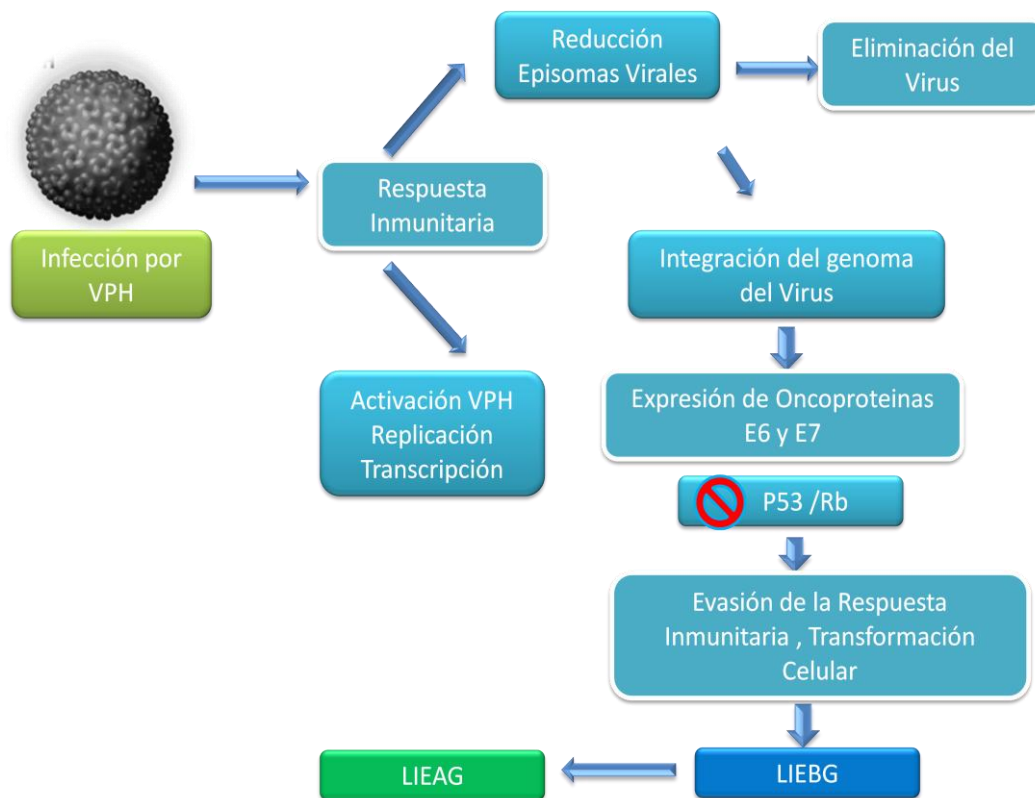


Figura 9 Mecanismo Oncogénico del Virus del Papiloma Humano (VPH) Carrero Y, 2012.

I.11 RESPUESTA INMUNITARIA EN CUELLO UTERINO

La respuesta inmunitaria está considerada como un mecanismo efector en la resistencia a los tumores y está relacionada desde la fase de iniciación hasta el crecimiento y progresión de éstos. **(Janeway CH y col, 2001)** Importantes evidencias sugieren que el sistema participa en la eliminación de las células malignas que aparecen en el huésped, probablemente, como resultado de mutaciones espontáneas, exposición a carcinógenos del medio ambiente y activación viral. Además, tiene una crucial implicación en la progresión de tumores ya establecidos, son más agresivos, generalmente, en aquellos pacientes que sufren inmunodepresión. Numerosos reportes establecen que en la respuesta del huésped a la infección intervienen tanto los componentes celulares como humorales del sistema inmune **(Borstoff J y col, 1993)**

I.11.1 RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR

La respuesta inmunitaria celular local detectada en estas lesiones se caracteriza por un moderado infiltrado y una invertida y disminuida relación Th/Tc (CD4/CD8), con capacidad de proliferación disminuida. **(Ghim SJ y col, 2001; Satin AD y col, 2001)** Actualmente se ha detectado un desbalance en el patrón de interleuquinas Th1/Th2, dado por un aumento en las interleuquinas (IL) tipo II (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, supresoras de la respuesta inmune celular) y una concomitante reducción en las interleuquinas tipo I (IL-2, INF-g) en muestras VPH+26. Diversos estudios muestran un incremento en la concentración de IL-10 y una disminución del IFN-g, tanto al nivel transcripcional como proteico. **(Tartour E y col, 1998)** Estas alteraciones traen como consecuencia una pérdida del control sobre determinados

genes del VPH 16 y VPH 18 y una desregulación en los mecanismos de presentación antigénica, la expresión de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) se muestra reducida o ausente. **(Clerici M, 1998; Wang SS, 2002)** En esta entidad existe una ausencia parcial o total de células de Langerhans, consideradas como las presentadoras de antígenos fundamentales en la respuesta inmune contra el tumor. **(Hachisuga T y col, 2002)**

El infiltrado inflamatorio tumoral relacionado con el carcinoma cervical está formado por linfocitos, macrófagos y eosinófilos, estos últimos ocupan el 40 % del infiltrado. Ciertas interleuquinas como la IL5, e indirectamente la IL4, tienen efecto en la quimiotaxis de los eosinófilos. Además de la producción de interleuquinas por las células tumorales, los linfocitos T y los macrófagos producen estas interleuquinas lo que induce a pensar que el infiltrado de eosinófilos refleja una respuesta Th2. **(Fridman WH y col, 1998; Willimien J y col 1999)** El IFN-g y la IL-2, propios del patrón Th1, son esenciales en la respuesta antitumoral. La IL-2 es el elemento fundamental en la cascada de interleuquinas liberadas durante la respuesta inmune. Aunque muchos linfocitos la producen, son los Th las células productoras por excelencia, en este sentido, la reducción de las células CD4 es significativo, de lo cual resulta una disminución de la respuesta citotóxica. **(Hildesheim A y col, 1997)**

El reconocimiento antigénico de las células con capacidad citotóxica está mediado por receptores. En los linfocitos T este receptor recibe el nombre de "TCR", el cual está formado por un heterodímero de cadenas ab/dg y por 4 cadenas (e, d, g, e), que en su conjunto son reconocidos como "CD3". Estos receptores se encuentran asociados, a su vez, con 2 cadenas "zetas", que son las responsables de la transmisión de las señales de activación al interior de la célula. Estas cadenas

zetas también se encuentran presentes en el receptor para antígenos de las células asesinas naturales (NK). **(Janeway CH y col, 2001)** Recientes estudios moleculares han evidenciado una disminuida expresión del dímero formado por la cadena zeta, tanto de linfocitos T como células NK, lo que contribuye a la ineficiencia de los mecanismos efectores del infiltrado linfocitario presente en las lesiones de esta localización. Estos procesos son regulados por factores locales derivados de las células tumorales. Al existir un desbalance de interleuquinas en el microambiente de estas lesiones, pueden detectarse ciertas afectaciones al nivel transcripcional. **(De Gruijl TD y col, 1999)** El infiltrado linfocitario presente en las lesiones de cuello uterino refleja una respuesta inmune ineficiente. Aunque se acepta generalmente que los linfocitos T desempeñan una función principal en la inmunidad específica contra el tumor, existen evidencias que las células asesinas naturales (NK) proporcionan una resistencia temprana contra las infecciones virales, el crecimiento de tumores y de metástasis. **(Whiteside TL y col, 1994)** Los estudios en pacientes con cáncer de cérvix muestran que las funciones NK están deterioradas en todos los estadios y que, una vez infectadas las células por el VPH, se vuelven resistentes a la lisis por las NK. **(Sheu BC y col, 1994)**

I.11.2 RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL

En cuanto a la respuesta humoral, ha sido encontrada variabilidad en los títulos de anticuerpos, independientemente de los altos valores de inmunocomplejos circulantes, sobre todo en aquellas pacientes en estadios más avanzados. En estadios tempranos de la enfermedad, se muestran altos niveles de IgG contra las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH, como resultado de mayor estimulación antigénica, con una relación IgG1/IgG2 disminuida, reflejo del desbalance Th1/Th2. **(Matsumoto K y col, 1999)** En los tumores avanzados, los títulos más elevados son

los de IgA e IgM, que disminuyen proporcionalmente mientras avanza la enfermedad, quizás por el deterioro del sistema inmune. (**Bocha-Zavaleta L y col, 1997; Baay MF y col 1997**)

I.12 INFLAMACION Y CANCER

Desde el siglo XIX, se ha establecido, con base en distintas observaciones, una relación estrecha entre el cáncer y la inflamación esto debido a que la inflamación, como parte de la reacción inmunitaria innata contra microorganismos puede dañar el DNA, inducir proliferación celular y modular la apoptosis, mecanismos importantes en la aparición y progresión del proceso tumoral, regulados por citocinas y quimiocinas (**Pananá y col., 2009**).

La inflamación es un proceso fisiológico encaminado a la eliminación de patógenos dañinos y a la restauración de la estructura y funciones tisulares. Es un proceso multifactorial desencadenado por infecciones bacterianas, víricas entre otros factores (**Tracey, 2002**).

Las infecciones no solamente causan necrosis y muerte celular sino que inducen directamente a las células hospederas a una división apresurada. En muchas circunstancias esta influencia directa de los agentes infecciosos en la proliferación celular, depende de las deficiencias del sistema inmune en el hospedero. Varias investigaciones han demostrado que los huéspedes inmunocomprometidos, quienes sufren una mayor incidencia de cáncer (**Penn I, 1988**). Varias infecciones también han demostrado que la pérdida de la habilidad del sistema inmunológico por reconocer antígenos superficiales de tipo humoral

expresados en las células transformadas, es un factor permisivo y favorable a la carcinogénesis. Se sabe también que varios agentes virales y también varios agentes químicos causan inmunosupresión. La destrucción del sistema de vigilancia inmunológica es al parecer el mecanismo más efectivo para explicar, la forma como estos agentes son capaces de inducir malignidad. (**Schwartz RN, 1975**)

La respuesta inmunitaria en el cuello uterino es de marcada relevancia no solo por su significado como mecanismo de defensa anti-infeccioso sino por su implicación en la reproducción por su impacto en la fisiología del epitelio cervical y en la tolerancia a los espermatozoides. Se ha planteado que las anomalías en la regulación del compartimento linfocitario T con especial énfasis en el equilibrio entre las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17 puedan participar en la patogenia del paso de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) a cáncer extraepitelial. La producción in situ de citocinas reviste mayor importancia que la sistémica y puede determinar diferentes efectos. Así encontramos que de acuerdo al perfil de citocinas es posible obtener efectos proinflamatorios, inflamatorios y quimiotácticos. (**Giannini SL y col, 1998**)

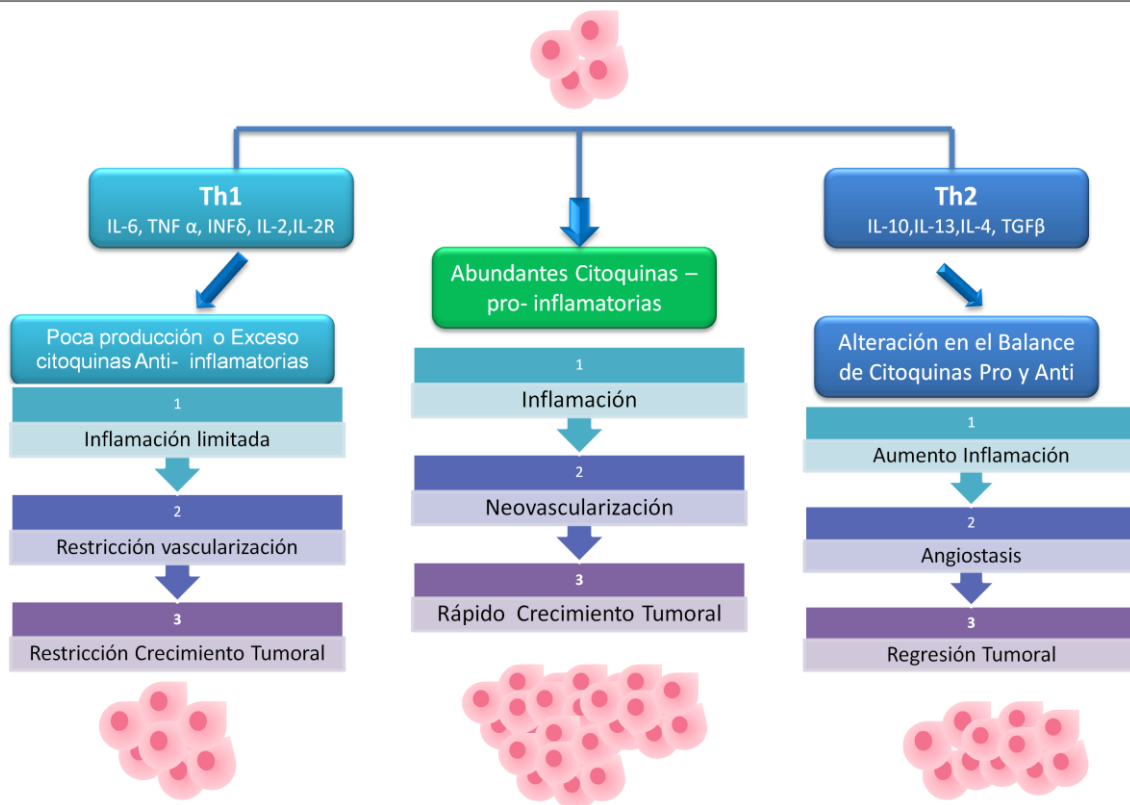


Figura 10 Las alteraciones en los patrones de expresión y producción de citoquinas Th1 y Th2 se implican en la progresión de la displasia y en el desarrollo del tumor. El sistema inmunitario posee la capacidad de reconocer a las células que expresan antígenos relacionados con agentes infecciosos o implicados en el proceso de transformación neoplásica

I.13 INFLAMACIÓN E INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA:

La relación funcional entre inflamación y cáncer no es nueva. En 1863, Virchow planteó que el cáncer tiene su origen en los sitios de inflamación crónica, basado en la hipótesis de que algunas clases de moléculas irritantes en el sitio de lesión son causa de inflamación aumentando la proliferación celular. Aunque no está claro que solo la proliferación de células sea causa de cáncer, al mantenerse dicha proliferación en un ambiente rico en células inflamatorias, factores de crecimiento, actividad estromal, y agentes que promueven daños en el ADN, se puede potenciar el riesgo neoplásico. (*Devorak H, 1986*)

Hoy en día está claramente establecido que la proliferación celular por sí sola no constituye la causa principal para la aparición del cáncer. Sin embargo, la proliferación celular sostenida en un ambiente rico en células inflamatorias, factores de crecimiento, activación del estroma y de los agentes que promueven el daño al ADN, ciertamente potencian o elevan el riesgo de originar la aparición de las neoplasias.

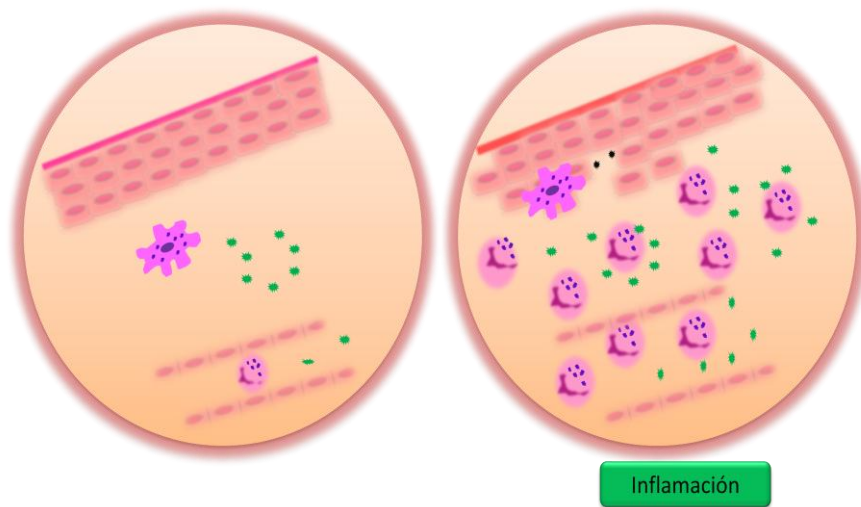


Figura 11 El proceso inflamatorio se inicia tras una infección o injuria en el tejido, se produce migración de leucocitos, activación de células y expresión de mediadores químicos. Carrero Y, 2012.

El proceso inflamatorio puede cursar como una reacción aguda o como una condición crónica, y esto está determinado por la persistencia o eliminación del factor desencadenante. Si este factor deja de actuar la inflamación puede resolverse con la remoción del exudado y de los detritos celulares que son fagocitados por macrófagos, restituyéndose la normalidad en la zona afectada: **(Espinosa J, 2006)**

La migración de leucocitos desde el torrente circulatorio hasta un tejido determinado es un proceso muy regulado en el que participan de forma orquestada

muchas proteínas: selectinas, integrinas, moléculas de adhesión, quimiocinas, citoquinas, metaloproteasas, entre otras (**Pello y col., 2006**).

Durante la lesión del tejido asociado a una herida, la célula se esfuerza en proliferar mientras que el tejido se regenera; la proliferación e inflamación disminuyen una vez que el agente que lo provocó es controlado o la reparación del daño se completa. Por el contrario, las células en proliferación que tienen un daño sostenido del ADN que genera mutaciones o cambios genéticos (células iniciadas) continúan proliferando en el microambiente rico en células inflamatorias, factores de crecimiento, aparición de oncogenes e inhibición de factores supresores del tumor que estimulan su proliferación aberrante y desarrollan un tumor en estas células (**Croce, 2008**).

Si persiste el estímulo agresor, se transforma el proceso en una condición crónica. Los focos de inflamación crónica contienen mayor número de macrófagos m1 y 2 y linfocitos y menos leucocitos neutrófilos que los de inflamación aguda y generalmente se comprueba activación y proliferación de fibroblastos que sintetizan colágeno, sino se resuelve la inflamación crónica pueden producirse lesiones que van desde NIC I a NIC III y posteriormente generar un carcinoma invasivo.

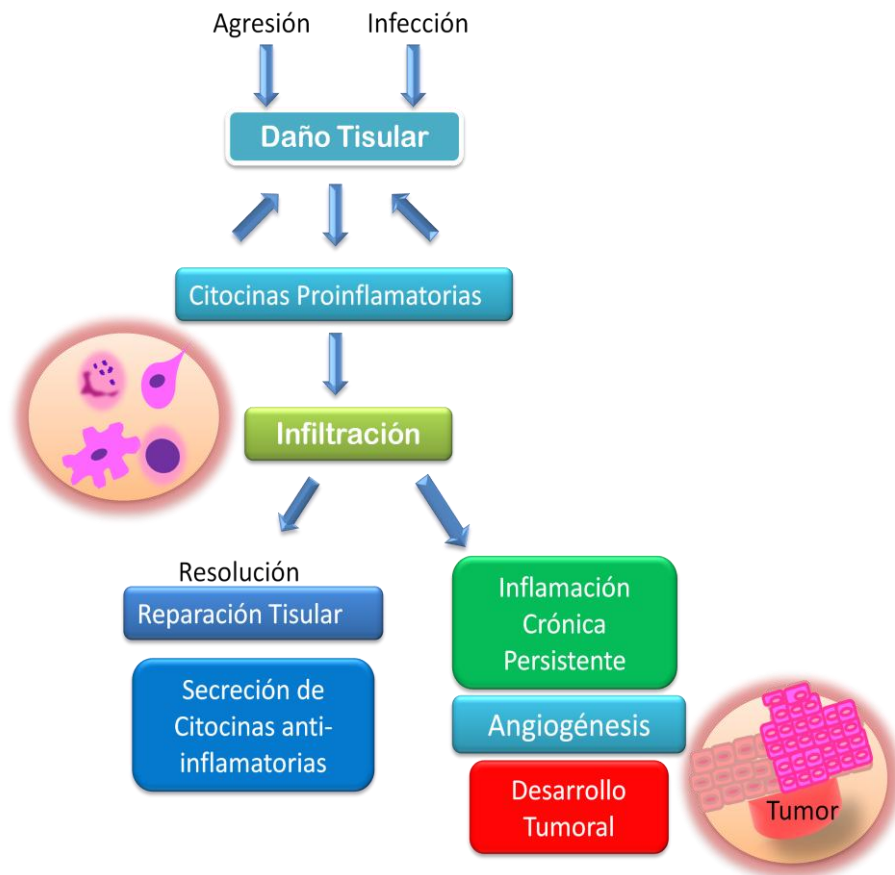


Figura 12 Ante un daño tisular se inicia el proceso de infiltración leucocitaria y la expresión de citocinas, las cuales modularán o instalarán un proceso inflamatorio persistente. En el predominio de uno u otro efecto de esta acción ambivalente del sistema inmunitario inflamatorio existen diversos factores hasta la actualidad no bien caracterizados. Pero es claro que la producción de citoquinas, factores de crecimiento y la inducción de angiogénesis por las células inmunitarias pueden favorecer la progresión tumoral. Carrero Y, 2012

En una descripción general, la inflamación resulta de la interacción de componentes plasmáticos y celulares que originan cambios del flujo sanguíneo local, movilización de leucocitos, activación de células del tejido conectivo y formación de una serie de sustancias de diverso origen y estructura molecular que actúan como mensajeros moduladores (mediadores químicos de la inflamación). **(Cohen SM y col, 1991)**

En cuanto a las manifestaciones vasculares, dos son los principales cambios observables: cambios del calibre de los vasos y del flujo sanguíneo y cambios de la permeabilidad de los vasos. Puede observarse una vasoconstricción transitoria breve, seguida de dilatación mantenida de las arteriolas que producen marcado aumento del flujo sanguíneo (hiperemia). Al aumentar la presión de perfusión, aumenta la cantidad de líquido que sale de los capilares, produciendo un edema localizado. **(Cohen SM y col, 1991)**

Normalmente la pared endotelial de los capilares y vénulas forma una barrera semipermeable que permite el libre movimiento de agua y de moléculas pequeñas disueltas en ellas, pero restringe el paso de macromoléculas como las proteínas plasmáticas (ultrafiltración), cuando a la vasodilatación e hiperemia se agrega este cambio a la permeabilidad se está frente a la transición desde una respuesta fisiológica a una patológica, y el líquido rico en proteínas que filtra no se reconoce como trasudado sino que se denomina exudado. **(Cohen SM y col, 1991)**

Se produce ultrafiltración a través de las zonas de unión intercelulares, la permeabilidad puede aumentar cuando el agente agresor produce lesión directa de la pared vascular. En tal caso la lesión puede afectar indiscriminadamente a todo tipo de vasos (arteriolas, capilares, vénulas), esta es una respuesta activa al efecto de mensajeros químicos específicos que actúan sobre estas células. **(Cohen SM y col, 1991)**

En la circulación normal los leucocitos, como los eritrocitos, circulan suspendidos en el plasma sanguíneo en un flujo laminar central, sin contacto directo con la superficie endotelial de los vasos, la dilatación local de las vénulas

postcapilares y el aumento de la filtración capilar disminuyen la velocidad de la circulación y producen un flujo turbulento. Esto induce la marginación de los leucocitos que se desplazan arrastrados por la circulación “rodando” sobre el endotelio, este proceso suele denominarse “rolling” favorecido por la presencia en la superficie de la membrana citoplasmática de los leucocitos y de las células endoteliales de proteínas llamadas selectinas que producen una débil adhesión frenando la velocidad del rolling de los leucocitos. **(Cohen SM y col, 1991)**

Si en este rodar a lo largo de la pared vascular, los receptores de los leucocitos captan la señal de una sustancia quimiotáctica, se activan induciendo un aumento de la afinidad de otro tipo de proteínas de adhesión de los leucocitos llamadas integrinas, que se fijan firmemente a los ligandos del endotelio deteniendo el desplazamiento de los leucocitos, en este momento los vasos dan una imagen de estar tapizados por una capa de leucocitos adheridos lo que se ha designado “pavimentación leucocitaria” de los vasos. **(Cohen SM y col, 1991)**

Los factores quimiotácticos son moléculas solubles que, difundiendo pasivamente desde su sitio de producción, activan la adhesividad de las integrinas, estimulan la motricidad de los leucocitos e inducen su migración, orientada en el sentido de la gradiente creciente de concentración de las moléculas quimiotácticas. **(Cohen SM y col, 1991)**

Una vez adosados a la superficie endotelial, siguiendo las señales direccionales proporcionadas por los factores quimiotácticos y usando las integrinas para su fijación y tracción, los leucocitos se desplazan y atraviesan la pared de los capilares y vénulas postcapilares, extendiendo pseudópodos a través de las uniones

intercelulares del endotelio vascular (diapédesis). Finalmente cruzan la membrana basal ingresando al intersticio y concentrándose en esa zona (infiltración leucocitaria). **(Cohen SM y col, 1991)**

La infiltración del linfocito está a menudo presente en las lesiones cervicales, reflejando posiblemente una inmunorespuesta en curso (pero ineficaz) al tumor, los linfocitos B son los linfocitos predominantes que infiltran en las lesiones cervicales pre-malignas, se encargan de la inmunorespuesta del anfitrión a la infección activa del papilomavirus (VPH). Aunque las células B se detectan con menor frecuencia en tumores cervicales, sigue habiendo un número elevado de células terminales identificadas en plasma que expresan la inmunoglobulina tumor-específica (Ig). La especificidad del antígeno y la significación funcional de la respuesta del anticuerpo a los tumores cervicales es desconocida. **(O' Brien PM y col, 2001)**

Las células tumorales producen varias citocinas y quimiocinas que atraen una diversa población de leucocitos, por ejemplo neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, linfocitos, y otras células los cuales son capaces de producir una variedad de citocinas, mediadores citotóxicos incluyendo especies reactivas del oxígeno, serina y cisteína proteasas, MMPs, agentes perforantes de membranas, mediadores solubles de células asesinas, factor de necrosis tumoral-alfa, interleucinas e interferones

El número y tipo de leucocitos presentes en la infiltración se relaciona con las citocinas producidas por las células del tumor y por las estromales localizadas en el sitio del tumor. En tumores de mama, cervicales, y pancreáticos, así como sarcomas y gliomas se producen citocinas que son mediadores importantes de

macrófagos e infiltración de linfocitos en cáncer ovárico. (**Balkwill, F y col, 2001; Bottazzi, B y col, 2003**) Las citocinas son importantes para la infiltración de las células de T CD8+ y macrófagos (**Negus RPM y col, 1997**)

Los neutrófilos son las primeras células en llegar a los sitios de infección, donde pueden expresar quimiocinas y proteasas que pueden alternadamente reclutar las células inmunes no específicas y específicas. Los neutrófilos pueden también liberar los gránulos tóxicos contra las células vecinas, sugiriendo también su potencial actividad anti-tumoral. Sin embargo, se ha demostrado en varios modelos del trasplante de neoplasia que los neutrófilos asociados al tumor pueden estimular la angiogénesis vía la producción de factores proangiogénicos, incluyendo VEGF, IL-8, y ciertas proteasas tales como MMPs y elastasas, así como también pueden facilitar la metástasis. (**Halliwel B y col, 2003**)

Los monocitos/macrófagos son los principales componentes de los infiltrados inflamatorios en tumores en este entorno, suelen desplegar un fenotipo M2, con propiedades pro-tumorales que promueven la angiogénesis, el remodelado de la matriz y la supresión de la inmunidad adaptativa. Los macrófagos asociados a tumores (TAM, del inglés tumor-associated macrophages) se originan a partir de monocitos circulantes. Su reclutamiento y supervivencia *in situ* está propiciada por la producción de citocinas y quimiocinas que interactúan con sus receptores (**Balkwill y Mantovani, 2001**).

Los linfocitos también pertenecen a la población de leucocitos que se encuentran en el cáncer. Los linfocitos T activados pueden contribuir a la patogenia de la enfermedad neoplásica por liberación de proteasas, factores angiogénicos, y

quimiocinas de la clase CC y CXC. La infiltración de linfocitos a menudo está presente en las lesiones cervicales, reflejando posiblemente una respuesta activa pero ineficaz contra el tumor (**Balkwill, 2011**).

La infiltración leucocitaria como consecuencia de la producción de estas citocinas, puede modular la diseminación del cáncer, bien sea promoviéndolo (daño oxidativo del ADN) o bien sea inhibiéndolo (Natural Killer, Linfocitos T Citotóxicos). Estas células infiltrantes y las células intrínsecas del cuello pueden ser el origen de un metabolismo oxidativo aumentado, que puede modular el crecimiento tumoral. (**Negus RPM y col, 1997**)

El infiltrado inflamatorio tumoral relacionado con el carcinoma cervical está formado por linfocitos, macrófagos y eosinófilos, estos últimos ocupan el 40 % del infiltrado. Ciertas interleuquinas como la IL5, e indirectamente la IL4, tienen efecto en la quimiotaxis de los eosinófilos. Además de la producción de interleuquinas por las células tumorales, los linfocitos T y los macrófagos producen estas interleuquinas lo que induce a pensar que el infiltrado de eosinófilos refleja una respuesta Th2. (**Negus RPM y col, 1997**)

Es evidente que las células inflamatorias tienen potencial efecto en el desarrollo del tumor. En los procesos neoplásicos tempranos, estas células son promotores de tumores produciendo un aumento del crecimiento tumoral, facilitando la inestabilidad genómica y promoviendo la angiogénesis

1.14 CITOCINAS Y SU PARTICIPACION EN LA RESPUESTA INMUNITARIA E INFLAMATORIA EN CUELLO UTERINO

La respuesta inmunitaria e inflamatoria o el crecimiento y diferenciación de diversos tipos celulares, están mediados por sustancias proteicas producidas por diversos tipos de células que constituyen el grupo de las citoquinas, las cuales se caracterizan por actuar sobre diversos tejidos y producir múltiples efectos biológicos (**Abbas A, 2000, Aguzzi , 2005, Gosain, 2005**).

Las Citoquinas son moléculas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 KDa, constituidas por 120-180 aminoácidos con funciones muy variadas pero que predominan aquellas orientadas a regular los distintos componentes celulares de la respuesta inmunitaria. Aunque en general están producidas por leucocitos, determinadas citoquinas pueden también ser secretadas por otros muchos tipos celulares.

La expresión de la mayoría de las citoquinas está estrictamente regulada. En general, no se detecta una producción constitutiva significativa de estas moléculas, siendo necesaria la activación celular para que se produzcan citoquinas en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos. La mayoría de las citoquinas son secretadas al espacio extracelular, muchas de ellas en forma glicosilada que incrementa su estabilidad y solubilidad (**Abbas A, 2000**). Las quimiocinas se producen tanto por las células estromales (fibroblastos, células endoteliales y leucocitos infiltrantes) y por el propio tumor. En el microambiente tumoral las quimiocinas son reguladores esenciales de los niveles de tumor e infiltración de leucocitos. La expresión de las quimiocinas, por lo tanto, es una

ventaja potencial de las células tumorales y puede dotarlos de mayor capacidad para proliferar y diseminarse (**Allavena y col, 2005**).

El equilibrio en la producción de citocinas en cualquier tumor es crítico y se relaciona con el tipo y grado inflamatorio; la producción abundante de citocinas pro-inflamatorias puede conducir a un nivel de inflamación que estimule la angiogénesis favoreciendo el crecimiento neoplásico. Así mismo, los altos niveles de monocitos y/o la infiltración del neutrófilos, en respuesta a un equilibrio alterado de las citocinas anti-inflamatorias se pueden asociar con la regresión de la citotoxicidad y la angiogénesis del tumor. (**Coussen L, 2002**)

Las citocinas producidas por las células tumorales son generalmente angiogénicas. La angiogénesis promueve el crecimiento y la supervivencia del tumor e influencia la migración de la célula y la metástasis del cáncer. La infiltración de leucocitos circulantes al tumor es facilitada obviamente por actividad angiogénica, pero puede ocurrir también la extravasación y la migración en el tejido fino circundante. (**Balkwill F, 2003; Balkwill F, 2004**)

Las citoquinas ejercen un efecto autocrino cuando se unen a receptores presentes en la propia célula productora. También pueden tener un efecto paracrino, actuando sobre diferentes tipos celulares que se encuentran en su vecindad. En algunos casos pueden liberarse a la circulación sanguínea o linfática, ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos, actuando así como las hormonas, de forma endocrina.

Dos importantes características funcionales de las citoquinas son su pleiotropismo, de tal manera que una misma citoquina es capaz de ejercer efectos

biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares, y su redundancia, es decir, que varias citocinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular (**Aguzzi, 2005, Hunter C, 2005**).

Una consecuencia de estas propiedades es que, en ausencia de una determinada citoquina, sus funciones pueden ser reemplazadas total o parcialmente por otras. Muchas de estas características biológicas de las citoquinas se pueden explicar por la estructura y amplia distribución celular de sus receptores (**Hunter C, 2005**).

Las acciones de las citoquinas se engloban dentro de un sistema o red funcional, donde el efecto de una molécula está estrechamente regulado, positiva o negativamente, por otras moléculas del sistema. Así, la secreción de una citoquina puede estar inducida, potenciada o inhibida por otra citoquina que, a su vez, puede incrementar o inhibir la expresión de sus receptores (**Hunter C, 2005**).

Citoquinas	Nomenclatura
Factores transformadores de la diferenciación celular	EGF,PDGF,FGF ácido y básico, NGF,NT3,BDNF,CNTF,TGF alfa y beta,OSM y HGF
Interleucinas	IL1,IL2,IL3,IL4,IL5,IL6,IL7,IL8,IL9,IL10,IL11,IL12-23
Factores Estimuladores de colonias	GM-CSF,G-CSF,M-CSF, SCF, EPO,LIF
Factores de Necrosis Tumoral	TNF alfa y beta
Interferones	IFNs alfa, gamma,beta
Quimioquinas	IP10,ELR,SDF1,IL8,GRO alfa y beta, NAP-2,MIG, ENA-78,GCP-2
	MIP1alfa y beta, RANTES, CPP1,2,3,4

Tabla 2 Clasificación y nomenclatura de las citocinas

La respuesta inmunitaria del hospedador ante la infección por VPH ha sido poco estudiada. Las células Natural Killer (NK) y macrófagos están presentes en la mayoría de lesiones, sin embargo células de cáncer cervical y líneas celulares VPH positivas son resistentes a las NK. **(Moss RB y col, 2004)** El inicio de la inmunidad específica está mediada por una combinación de mecanismos humorales y celulares; En la respuesta celular ocurre la activación de los linfocitos T (colaboradores CD4+ y citotóxicos CD8+) a través de las CPA, que provocan su diferenciación **(Torres J, 1996)**. Los linfocitos TCD4+, se han clasificado en dos subtipos denominados Th1 y Th2, los cuales pueden ser diferenciados a través de un panel de expresión de mediadores solubles como son las citocinas. Así, las células Th1 expresan IFN- γ , IL-2 y TNF- α , mientras que las células Th2 expresan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 responsables del control de la inmunidad humoral o producción de anticuerpos. Según indica el denominado paradigma Th1/Th2, las citocinas participan además como un mecanismo de regulación, interactuando entre sí, de manera que el IFN- γ inhibe la proliferación de células Th2 y la IL-10 inhibe la proliferación de células Th1. La hipótesis predice que una respuesta dominante de tipo Th1 o Th2 conlleva a una adecuada respuesta del organismo a determinados agentes externos, igualmente en ocasiones, un desequilibrio en el balance entre Th1 y Th2 favorece el desarrollo o mantenimiento de algunas enfermedades. **(Torres J, 1996; Cannistra S y col, 1996)**

Las células Treg y las células Th17 representan dos estirpes CD4+ adicionales identificadas, mientras que Th9 y Th22 son un subconjunto de células que han sido descritas más recientemente. Se ha establecido que las citocinas producidas por el perfil Treg actúan como supresoras de la respuesta inmunitaria y diversos trabajos describen las células T reguladoras como potentes inhibidores de

la respuesta inmunitaria antitumoral y que están asociadas con un mal pronóstico para muchos tipos de cáncer. (**Josefowicz S y col, 2009; Park H y col, 2007; Veldhoeny M y col, 2008; Trifari S y col, 2009**)

Los linfocitos TCD8+ participan en la respuesta inmunitaria mediada por células y tienen como función reconocer antígenos citosólicos sintetizados endógenamente asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I en cualquier célula nucleada. La total diferenciación de los linfocitos TCD8+ requiere la producción de citocinas por células TCD4+ y/o la expresión de moléculas coestimuladoras. (**Morrison M, 1994; Abbas A y col, 1999**)

Ante la presencia viral se activan mecanismos de respuesta inmunitaria provocando la activación de los linfocitos T (CD4+ y CD8+) a través de las células presentadoras de antígenos, esta activación induce a una diferenciación de estos linfocitos hacia una respuesta celular tipo Th1 secretando IL-2, TNF- e IFN- que determinan una respuesta inmunitaria celular o tipo Th2 que secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, controlando la inmunidad humoral o producción de anticuerpos. (**Zinkernagel RM, 1996**) Estas citocinas actúan como señales intercelulares, capaces de regular la respuesta inflamatoria .Es importante señalar que un agente viral es capaz de provocar la generación de un perfil individual de secreción de citocinas mientras que otros pueden ser insensibles al control mediado por las mismas. (**Zinkernagel RM, 1996; Alcami A y col, 2000**)

Diversos estudios realizados en mujeres con VPH demostraron la expresión de RNAm en la mucosa cervical de citocinas involucradas en la regulación de la inmunidad mediada por células. Así mismo se ha evidenciado un patrón de

secreción tipo Th1 a través de la expresión de IFN- e IL-2, lo que demuestra que la respuesta Th1 está asociada con la presencia del VPH en tejido cervical. **(Abbas A y col, 1999)** Contrariamente, los estudios del Scott demostraron que la progresión a cáncer estaba asociada a una respuesta inmunoregulatoria tipo Th2 donde el estudio de biopsias cervicales por técnicas de inmunohistoquímica detectaron la expresión de IL-4 e IL-6, demostrando la presencia significativamente elevada de IL-4 en lesiones premalignas (LIE) de alto grado. **(Scott M y col, 1999)** Estudios en los cuales se analizó el RNAm de células productoras de IL-4 en biopsias de cuello uterino de pacientes, que abarcaron el espectro de, citología normal a cáncer invasor asociado a infección por VPH, encontraron que la proporción de tejidos que expresaron el RNAm de IL-4 aumentó con el grado de la lesión. La probabilidad que se detecte el RNAm de esta citocina in situ se encontró significativamente asociada a la aparición de cáncer cervical **(Fernández G y col, 2000)**

Varios argumentos sugieren que dentro de las citocinas tipo Th2 que juegan un papel importante en la génesis del cáncer cervical y sus lesiones precursoras, se encuentra la IL-6. En tal sentido Moela y col, estudiaron la expresión del RNAm de esta citocina en muestras citológicamente normales de pacientes con LIE de bajo, LIE de alto grado y con CaCu. Se encontró en todas las muestras con lesión premaligna o CaCu asociado a algún genotipo de VPH, la expresión local de IL-6 asociada al grado de lesión. **(Moela E y col, 2000)** Estos resultados apoyan la hipótesis de que IL-6 puede tener un papel importante en la evolución de una lesión premaligna a maligna ante la infección por VPH. Otros estudios han asociado niveles elevados de IL-6 con severidad de lesiones a nivel de cuello uterino, asociado a VPH-16. Para ello Tjong y col estudiaron el nivel de IL-6 en suero y en lavados cervicovaginales de pacientes sin lesiones y con lesiones premalignas y malignas

por el método de ELISA. Se encontraron niveles de IL-6 significativamente elevados a nivel local de las pacientes con carcinoma de cuello uterino comparado con las pacientes con NIC y controles; lo que sugiere un aumento progresivo del nivel de IL-6 a medida que evolucionan las lesiones de cuello uterino hacia la malignidad. **(Tjong MY y col, 2001)** Estudios han demostrado que los linfocitos T específicos de VPH en el microambiente cervical, juegan un papel importante en la historia natural de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Se demostró a través de estudios inmunohistoquímicos que el TNF- se expresa constitutivamente en los queratinocitos basales de cérvix normales, pero no en las muestras de NIC de bajo y alto grado, en las cuales se sobre expresa dicha citocina, caso contrario ocurre en los pacientes infectados por VPH. Esto parece corresponderse con una relación entre las citocinas estudiadas y la evolución de las lesiones en cérvix. **(Mott P, 1996).**

Para obtener un mejor entendimiento del rol de las citocinas en el desarrollo de las neoplasias cervicales Tjong y col, en el año 2001, analizaron la presencia de IL-12, IL-10 y TNF- en lavados cervicovaginales de pacientes con NIC, cáncer cervical y pacientes sanas. Para ello se estudió el RNA mensajero de dichas citocinas y factores de crecimiento en exudado de cuello uterino, encontrándose niveles significativos elevados en pacientes con cáncer cervical en comparación con las que presentaron NIC y los controles. **(Tjong MY y col, 2001)**

I.14.1 INTERLEUCINA 2 (IL-2)

La IL-2, es una glicoproteína que induce la proliferación de los linfocitos T de manera autocrina y favorece la expansión clonal de las células que han sido impactadas por el antígeno. Conduce a las células de la fase G1 a la fase de síntesis

(S), permitiendo la producción de IL-2 y la expresión sobre la membrana celular del receptor específico. También actúa de manera paracrina, ejerciendo su acción sobre células vecinas. Es producida por los linfocitos Th1 (CD4+) y en menor cantidad por las células CD8+, NK y macrófagos (**Mott P, 1996**). Las acciones de la IL-2 se ejercen sobre los linfocitos T, como principal factor de crecimiento autocrino, lo cual conduce a una expansión de la respuesta inmunitaria cuya magnitud puede ser estimada por determinación de sus niveles. También posee actividad para inducir la síntesis de IFN- γ y linfoquinas y es capaz de programarlos hacia la apoptosis. Actúa como factor de crecimiento y diferenciación para las células NK, linfocitos B, puede activar a los macrófagos y neutrófilos. Sobre los linfocitos B estimula la síntesis y secreción de anticuerpos pero no induce cambios en el isotipo secretado. Las células NK, son estimuladas cuando existen altos niveles de IL-2 capaces de unirse a receptores de tipo I, lo que induce la producción de IFN- γ y potencia la acción citolítica de estas células generando las llamadas células LAK (lymphokine activated killer cells) (**Mott P, 1996**). La acción de la IL-2 sobre las células T está mediada por la unión a proteínas receptoras de IL-2, hay dos proteínas de superficie en las células T que se unen a la IL-2, la primera IL-2 es un polipéptido que aparece tras la activación de las células T, la unión de la IL-2 a las células que expresan únicamente IL-2 no produce ninguna respuesta biológica detectable, la segunda proteína ligadora de la IL-2 es la IL-2R β , la afinidad de la unión de la IL-2 a este receptor es mayor que al IL-2. IL-2R se expresa de manera coordinada con un péptido llamado cadena común (γ) y forma un complejo llamado IL-2R γ (**Filella X y col, 1999**). Ha sido descrito que los niveles de IL-2 y su receptor, en procesos tumorales pueden encontrarse elevados. Al aumentar la IL-2, se eleva el número de linfocitos, células NK, LAK y aumenta el nivel de TNF- α sérico. Análisis de resultados de estudios clínicos realizados por Ung y col, revelan que existe una asociación positiva entre el

receptor de IL-2 y la neoplasia cervical en paciente con lesiones preneoplásicas **(Ung A y col, 1999)**.

1.14.2 INTERLEUCINA 10 (IL-10) E INTERLEUCINA12 (IL12)

La IL-10 es producida por los linfocitos Th2, los timocitos fetales activados, macrófagos, linfocitos B normales y los queratinocitos. La IL-10 posee acciones pleiotrópicas, tiene efecto inmunosupresor y en otros casos estimulador. Tiene acción reguladora de la actividad de los linfocitos Th1, inhibiendo la producción de INF e IL-2, sin embargo en la actualidad se estima que la activación sería un efecto indirecto, dado que la activación primaria se ejercería sobre los macrófagos previniendo la producción de IL-12. La IL-10 puede regular la expresión de moléculas del MHC clase II y es un potente inmunosupresor de la actividad de los macrófagos. Sobre estas células es capaz de suprimir la producción de PGE2 (prostaglandina E2), citocinas proinflamatorias (TNF, IL-1, IL-6, IL-12) y de moléculas de adhesión (ICAM-1 y B7). También favorece la expresión de CD64, hecho que permite un aumento en la actividad de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) ejercida por los macrófagos. Dado que la IL-10 favorece la proliferación de los linfocitos B y la secreción de IgA, IgG1 e IgG3 tendría fundamental importancia en el desarrollo de la respuesta inmunitaria humoral **(Filella X y col, 1999)**. Estudios realizados por Mota y col, evaluaron la detección de IL-10 encontrándose ausente en el epitelio normal, pero se expresó en lesiones de bajo y alto grado. **(Al-Saleh W y col, 1998)**. Los estudios de Al-saleh demostraron que la progresión a cáncer estaba asociada a una respuesta inmunoregulatoria tipo Th2 **(Al-Saleh W y col, 1998)**. Apoyando lo descrito por este autor, existen resultados de diversos estudios que avalan la hipótesis una secreción preferencial de citocinas de tipo Th2 que modulan

negativamente la respuesta inmunitaria celular, y favorece así el desarrollo del tumor (**Atila L y col, 1996; Al-Saleh W y col, 1998**).

La IL-10 es ampliamente conocida como una citocina inmunoreguladora en virtud de su capacidad para inhibir la presentación antigénica dependiente de macrófago, proliferación de células T y el patrón de células Th1. Sin embargo hay un estudio que ha cambiado la percepción de la IL-10 sólo como citocina inmunosupresora. Como parte de una investigación en la cual se estudió la potenciación de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ ante la presencia del VPH en células tumorales, se encontró que la IL-10 era capaz de incrementar la producción de citocinas Th1 e incrementar el potencial citotóxico de las células T CD8+ ante la presencia del VPH (**Satin P y col, 2000**). Un estudio determinó el perfil de citocinas en secreciones del tracto genital de adolescentes femeninas infectadas con el VIH, VPH y otros patógenos transmitidos por vía sexual, y evidenció que en pacientes VIH-positivas los niveles de IL-10 e IL-12 se encontraron elevados, en comparación con las VIH-negativas, mientras que la concentración de IL-12 no varió significativamente. La coinfección de VIH y VPH llevó a un aumento de IL-10; mientras que la coinfección de VIH con VPH u otros microorganismos de transmisión sexual llevó a un incremento de los niveles de IL-12. Se pudo evidenciar la influencia que tiene la infección por VIH con otros patógenos, ya que influyen en la concentración local de algunas citocinas inmunoreguladoras (**Crowley-Nowic P y col, 2000**).

Para obtener un mejor entendimiento del papel de las citocinas en el desarrollo de las neoplasias cervicales, estudios previos analizaron la presencia de IL-12, IL-10 y TNF- en lavados cervicovaginales de pacientes con NIC, CaCu y

pacientes sanas, encontrándose niveles significativamente elevados de IL-10 en pacientes con cáncer cervical al compararlos con las que presentaron diferentes grados de NIC y tejido sano (**Giannini, S y col, 1998**). Se ha observado que la presencia de IL-10 se incrementa en paralelo con la severidad de la displasia con un máximo nivel en lesiones intraepiteliales escamosa de alto grado (**Giannini, S y col, 1998**).

1.14.3 INTERFERON (IFN)

La familia de los interferones agrupa una serie de citoquinas con actividad antiviral secretadas por las células en respuesta a diferentes estímulos, potencian la respuesta Th1 y fueron las primeras citoquinas usadas terapéuticamente. Se agrupan en dos grandes categorías en función de su secuencia de proteínas, población productora y uso de receptores: interferones tipo I que incluye IFN β , IFN ω , IFN α , IFN ϵ , interferones tipo II que únicamente incluye el IFN γ y de tipo III el IFN λ con tres isoformas (**Aguzzi A, 2005, Smith P L, 2005**).

El IFN- producido por leucocitos tiene efecto antiproliferativo sobre células in vitro, eleva el potencial lítico de las células NK y aumenta la expresión de MHC clase I. El IFN- activa macrófagos y células NK, regula positivamente la expresión de moléculas MHC clase I, lo que ayudaría a estimularla inmunidad antitumoral (**Alcami A y col, 2000**).

1.14.4 INTERLEUCINA 4 (IL4)

La IL-4 es una glicoproteína producida por los linfocitos T colaboradores (Th2), células cebadas y las células del estroma de la médula ósea. La IL-4 se caracteriza porque promueve la multiplicación de linfocitos B en reposo y forma parte, lo mismo que la IL-5 e IL-6 de las citocinas del patrón Th2. La IL-4 actúa sobre actividades biológicas de los macrófagos y pueden inhibir la producción de TNF- α . Así mismo antagoniza la activación de los macrófagos por el IFN γ . Cuando esta citocina se añade a cultivos de LT activados, deprime la síntesis de IL-2 y de IFN γ (*Motta F y col, 1999*).

1.14.5 INTERLEUCINA 6 (IL6)

La IL-6 fue conocida inicialmente como el Factor que estimula la diferenciación de los linfocitos B para que inicien la producción de inmunoglobulinas (BCDF). Para que la IL-6 estimule la diferenciación de los LB se necesita que otras citocinas IL-2, -4 y -5 hayan estimulado previamente su multiplicación. Esta citocina ha sido asociada con el crecimiento de tumores y es el principal regulador de los genes que codifican para la síntesis de las proteínas en fase aguda. De este modo la IL-6 participa en la inducción de las reacciones inflamatorias que se necesitan para controlar las infecciones (*Motta y col, 1999*).

1.14.6 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

El TNF es una citocina pro-inflamatoria que comparte muchas de las actividades biológicas con la IL-1 e IL-6. Esta citocina a pesar de no ser producida

por linfocitos T (CD4+ o CD8+) sino por los macrófagos principalmente, actúa como un modulador de las respuestas de los linfocitos T y B. El TNF se ha visto vinculado a procesos inflamatorios de tipo premalignos y malignos. Esta citocina constituye la principal respuesta ante una agresión por endotoxinas bacterianas y es responsable de todas las alteraciones bioquímicas y los síntomas que expresan los pacientes con shock endotóxico, lo cual significa que tiene un espectro muy amplio de actividades biológicas. En líneas generales el TNF actúa como modulador de las respuestas de los linfocitos T y B. (**Motta y col, 1999**)

Los linfocitos TCD8+ participan en la respuesta inmunitaria mediada por células y tienen como función reconocer antígenos citosólicos sintetizados endógenamente asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I en cualquier célula nucleada. La diferenciación total de los linfocitos TCD8+ requiere la producción de citocinas por células TCD4+ y/o la expresión de moléculas coestimuladoras (**Filella X y col, 1999; Abbas A y col, 1999**). En la mayoría de los casos, el control local de la infección por VPH se realiza por la eficiente respuesta del sistema inmunitario. Sin embargo, en las lesiones de alto grado, y de carcinoma in situ e invasor, tienen lugar diversas alteraciones en los sistemas de presentación antigénica celular, así como falla en el sistema de respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+, que impide la regresión o el control de estas lesiones (**Torres J, 1996**).

I.14.7 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA 1 (TGF - β 1)

Es una proteína homodimérica de aproximadamente unos 28 Kd, la cual debe ser activada por proteasas extracelulares. Tanto las células T activadas por el

antígeno como los fagocitos mononucleares activados por lipopolisacáridos (LPS) secretan un TGF-1 biológicamente activo. Esta molécula es reconocida por su capacidad de inhibir proliferación celular en la fase G1 del ciclo celular. Esta inhibición es realizada mediante la inducción de inhibidores de cinasa dependientes de ciclinas como p27, que evita la formación de las proteínas Rb a factores de transcripción como E2F, necesarias para la progresión a la fase de síntesis de ADN. **(Zinkernagel, R, 1996).**

El TGF se caracteriza por su papel antagónico en muchas de las respuestas de los linfocitos, inhibe la proliferación de las células T frente a mitógenos policlonales, inhibe la maduración de los CTL y macrófagos, actúa sobre leucocitos polimorfonucleares y células endoteliales, contrarrestando de nuevo los efectos de las citoquinas proinflamatorias, en este sentido es una anticitoquina y puede actuar como señal de interrupción de las respuestas inmunitaria e inflamatoria **(Zinkernagel, R, 1996)**. El TGF no tiene una acción completamente intrínseca, sino que sirve como un mecanismo para el acoplamiento de las células a su entorno, de tal manera que las células tienen la capacidad para responder apropiadamente a los cambios en su medio ambiente o cambios en su estado de diferenciación. Esto significa que la multifuncionalidad del TGF está acompañada por un aumento de su expresión por la activación de sus receptores, por su vía de traducción de señales que induce y por la regulación del ciclo celular, todo esto puede aumentar o inhibir las actividades de las diferentes poblaciones celulares. Estudios demostraron en modelos murinos tanto *in vitro* como *in vivo*, la estimulación de la IL-10 por parte del TGF -1, un incremento en la respuesta Th2 y una disminución del tipo Th1, estas evidencias apoyan la idea de que los tumores son capaces de producir TGF -1 y, en

consecuencia inducir el desarrollo de mecanismo de escape de la vigilancia inmunitaria (***Peralta-Zaragoza O y col, 2001***)

I.14.8 FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS GRANULOCITO MACRÓFAGO (GM-CSF)

El GM-CSF es producido por linfocitos T activados y por otras células como fibroblastos, células endoteliales y monocitos. Es un polipéptido con varios posibles lugares de glicosilación. Induce la proliferación de los progenitores de granulocitos y macrófagos, produciéndose en respuesta a estímulos específicos en situaciones que requieren una elevada producción de éstas células. También puede actuar sobre granulocitos y macrófagos maduros. El GM-CSF, también promueve la proliferación de células madres que aún no se han diferenciado en células sanguíneas (plaquetas y progenitores de hematíes), reemplazando a la IL-3. Por otro lado el GM-CSF activa leucocitos maduros, imita algunas de las reacciones del IFN- como activador de macrófagos aunque es menos potente. El GM-CSF es capaz de inducir la síntesis y liberación de citoquinas, como la IL-1 y TNF- por monocitos. Puede estimular la proliferación de un número de líneas de células tumorales que incluyen el sarcoma osteogénico, carcinomas y adenocarcinoma. Su incremento ha sido reportado en pacientes con cáncer de pulmón y en la leucemia mieloide aguda. Su mecanismo de acción probablemente sea a nivel local, en los sitios donde es secretado, de este modo el GM-CSF producido por las células T y macrófagos puede intervenir principalmente en la activación de leucocitos maduros en los lugares donde se lleva a cabo la respuesta inmunitaria inflamatoria. Por ser un mediador se ha asociado a la angiogénesis inducida por macrófagos. La mayoría de los factores angiogénicos y citoquinas son producidos por macrófagos, los cuales incluyen factores de

crecimiento derivado de las plaquetas, y entre ellos el factor GM-CSF (**Bussoolino F, 1989, Pascale H, 1999, Pascale H, 2004**).

Dentro de la extensa familia de citocinas conocidas existe un grupo de pequeñas moléculas de estructura sencilla que poseen la capacidad de inducir la migración selectiva de distintos tipos de células inmunitarias, por lo que se han recibido el nombre de quimiocinas. Esta habilidad quimiotáctica fue descubierta por primera vez al identificar que ciertas citocinas eran capaces de inducir la migración direccional de los leucocitos bajo la influencia de una serie de estímulos. Una vez secretadas las quimiocinas se unen a las proteínas de la matriz extracelular del tejido donde se han sintetizado, permaneciendo mayoritariamente inmovilizadas y sin pasar al torrente sanguíneo, acumulándose y creando un gradiente de concentración que indica la dirección de la migración al lugar donde la célula es requerida, posteriormente se comprobó que también participaban en la migración y reclutamiento de otros tipos celulares, incluyendo las tumorales. (**García J, 2006**)

Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* como las células malignas neoplásicas expresan de forma específicas uno o más receptores de quimiocinas que responde a un gradiente de concentración de sus respectivos ligandos, movilizandole la célula tumoral hacia órganos específicos e iniciando la migración metastásica del tumor; cada vez son más los tumores en donde se ha logrado establecer esta relación entre la expresión quimiocinas/receptor y la movilización de las células malignas hacia los lugares metastásicos preferidos. (**García J, 2006**)

I.15 QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas son un conjunto de citoquinas de bajo peso molecular (8-11 kD) con función quimiotáctica producidas por varios tipos celulares (monocitos, macrófagos, linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales). Son potentes quimioatrayente de los leucocitos y sus funciones proinflamatorias son independiente de la respuesta inmune adaptativa (**Barbieri y col, 2009**).

El sistema de quimioquinas ha evolucionado con los vertebrados y hay cerca de 50 genes humanos que codifican los ligandos de quimioquinas, con más de 20 genes humanos correspondientes receptores de quimioquinas. Su acción se lleva a cabo a través de la interacción con sus receptores específicos, un subgrupo de receptores de transmembrana acoplados a la proteína G, son producidas por una gran variedad de células en respuesta a estímulos exógenos o endógenos (**Balkwill F, 2011**).

Las quimioquinas se dividen en cuatro subgrupo diferentes, CXC, CC, CX3C o C, dependiendo de la posición del residuo de cisteína conservado, y el receptor de la nomenclatura sigue esencialmente el de las quimiocinas, es decir, las quimiocinas CC se unen a los receptores de quimiocinas CC, CXC ligandos se unen a CXC receptores (**Balkwill F, 2011**).

El subgrupo CC (caracterizados estructuralmente por cuatro cisteínas) cuenta con 28 miembros, llamados CCL1-28 que se unen por lo menos a 10 receptores (CCR1-10). Las quimioquinas CC atraen monocitos, células T, células dendríticas, eosinófilos y basófilos. Las quimiocinas CC son representativas

de CCL2 (también llamada proteína quimiotáctica de monocitos, MCP-1), CCL3 y CCL4 (proteína inflamatoria de macrófagos MIP-1 α y MIP-1 β), CCL5 (RANTES) y CCL11 (eotaxina) (**Barbieri y col., 2009**).

El CXC (grupo en el que un aminoácido está presente entre las dos primeras cisteínas), incluye 21 ligandos (CXCL1-21) en su mayoría codificados en el cromosoma 4 humano. Las quimiocinas CXC son capaces de vincular al menos a 7 receptores (CXCR1-7) y mediar en la quimiotaxis de neutrófilos (**Barbieri y col., 2009**).

Las quimioquinas CX3C (tres aminoácidos entre las dos primeras cisteínas) son hasta la fecha representadas por un solo péptido, a saber CX3CL1/fractalkine, que está codificada en el cromosoma 16 humano, se une al receptor CX3CR1 y regula el tráfico a adhesión de células T (**Zlotnik A y col, 2000**).

El grupo C de quimioquinas (que contiene sólo dos cisteínas) consta de dos moléculas (XCL) es decir, XCL1/lymphotactin y XCL2/SCM-1 β , tanto vinculantes como el receptor de XCR1. Linfotactina, codificado en el cromosoma 1 humano, atrae a los linfocitos, pero no a los monocitos o neutrófilos (**Barbieri y col., 2009**).

Otra clasificación, aunque menos estricta, es la que divide las quimioquinas en dos subgrupos funcionales; las inflamatorias y las homeostáticas (**Zlotnik A y col, 2000**). Según Sallusto y colaboradores, las quimioquinas inflamatorias promueven la infiltración de leucocitos a los sitios de inflamación y su expresión es inducible, principalmente, por citocinas proinflamatorias. Mientras que las quimiocinas

homeostáticas se expresan constitutivamente y regulan la migración dirigida de los leucocitos en los procesos de la hematopoyesis y desarrollo de los órganos linfoides.

(Sallusto F y col, 2000)

En relación a los tumores, se ha visto que son las quimioquinas inflamatorias las que se encuentran más frecuentemente producidas por las células tumorales **(Zlotnik A y col., 2000)**.

Algunos estudios encontraron que las quimioquinas controlan una variedad de actividades biológicas, tales como producción y deposición del colágeno, activación de las enzimas que digieren la matriz, estimulación de células en crecimiento, la inhibición de la apoptosis y la promoción de la neoangiogénesis. **(Allavena P y col, 2005)**.

Se ha encontrado que un grupo de quimioquinas como la MCP-1 actúa de forma selectiva sobre poblaciones de monocitos, macrófagos, linfocitos T y basófilos, mediante unión a receptores específicos. Se piensa que la capacidad de MCP-1 de activar la quimiotaxis sobre estos tipos celulares está relacionada con la inflamación crónica, por otro lado el RANTES, IL-8 parecen desempeñar papeles importantes en la mediación de procesos inmunitarios e inflamatorios en distintas localizaciones. **(Balentien E y col, 1991)**

I.15.1 PROTEINA-1 QUIMIOATRAYENTE DE MONOCITOS (MCP-1)

Conocida como MCAF (“monocyte chemotactic and activating factor”) o CCL2 es el miembro mejor estudiado de la subfamilia β o quimioquinas CC. Tras su

clonación y secuenciación se apreció una gran homología con el gen JE del ratón que resultó ser el homólogo del MCP-1 humano. Existe un solo gen que codifica para una proteína monomérica de 76 aa, secretada en dos formas de 9 y 13 kDa, ambas con idéntica actividad in vitro. MCP-1 actúa de forma selectiva sobre poblaciones de monocitos, macrófagos, linfocitos T y basófilos, mediante unión a receptores específicos. Se piensa que la capacidad de MCP-1 de activar la quimiotaxis sobre estos tipos celulares está relacionada con la inflamación crónica.

(Domínguez F, 2003)

Estudios utilizando un modelo de ratón por Muller y col sugieren que el patrón de metástasis en el cáncer de mama es producido en parte por las interacciones específicas entre la quimiocina CXCR4 y su ligando SDF-1/CXCL12; la actividad metástasis de las células de este tipo de cáncer a los órganos blanco (médula ósea, hígado, pulmón y los ganglios linfáticos) puede ser neutralizada por anticuerpos anti-CXCR4. La participación de CXCR4 en las metástasis no solo se limita al cáncer de mama, ya que también se expresa en diferentes líneas celulares tumorales (linfomas, carcinoma de próstata, leucemia mieloide crónica, entre otros). **(Muller A, 2001)**

De igual forma un estudio reciente se investigó como el MCP-1 es el mediador de la inflamación sistémica de la hipoxia alveolar. Los experimentos demostraron como la hipoxia alveolar (respiración del O₂ del 10%, en 60 minutos) produjo un aumento rápido (5min) en la concentración del plasma MCP-1 de ratas intactas conscientes, pero no en los alveolos de ratas macrófago-agotadas, de igual forma la degranulación ocurrió en ratas intactas hipóxicas, pero no en las ratas macrófago agotadas. Pudiendo determinar que MCP-1 es un agente dominante en la iniciación de la inflamación sistémica de la hipoxia alveolar. **(Abroun S, 2008)**

La presencia de la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 o CCL2) ha sido demostrada en diversas patologías tanto de naturaleza no maligna (arteriosclerosis, artritis reumatoide, nefropatía diabética, nefropatía lúpica, enfermedad intersticial pulmonar, y encefalomiелitis experimental autoinmune), como malignas (esófago, páncreas, mama, y ovario), donde su expresión se relaciona directamente con el grado de infiltración de macrófagos y con la severidad de la enfermedad. **(Tesch G, 2008; Barbado J y col, 2009; Monti P y col, 2003; Harti D y col, 2005; Klaes R y col, 2001)**

La proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 o CCL2) es esencial para el reclutamiento de monocitos, tiene actividad angiogénica y causa también proliferación de las células musculares lisas, su receptor es conocido como CCR2. MCP-1 también puede ser quimioatrayente para linfocitos T, basófilos, células NK, y células progenitoras. **(Tesch G, 2008; Barbado J y col, 2009)**

I.15.2 INTERLEUCINA 8 (IL-8)

Su función principal es la atracción de neutrófilos y se produce en monocitos, linfocitos T, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y neutrófilos. Su estructura es de 72 aminoácidos y existe una variante de 77 aminoácidos denominada IL8 endotelial debido a que se sintetiza en estas células y su función específica es atraer neutrófilos que se fijan al endotelio para el inicio de la diapédesis. Además puede atraer linfocitos T, queratinocitos, basófilos, y posee actividad angiogénica. **(Shaun L, 1999; Coussens L, 2002)**

Algunas células tumorales no solo regulan la expresión de citocinas que contribuyen con el reclutamiento de células inflamatorias, sino que también usan estos factores para promover el crecimiento y progresión, algunas de estas citocinas son CXCL1, CXCL2, CXCL3 e IL-8/CXCL8. **(Cousens L, 2002)**

La IL-8 inicialmente fue descubierta como un factor quimiotáctico de leucocitos, pero recientemente se descubrió que contribuye con la progresión del cáncer, posee funciones mitogénicas y angiogénicas. Ha sido detectado en varios tejidos de cáncer humano y su expresión está regulada por varios factores del microambiente tumoral como la hipoxia, acidosis y óxido nítrico. **(Xie K, 2001)**

I.15.3 PROTEÍNA INFLAMATORIA DE MACRÓFAGO 1 α (MIP1 α)

La proteína inflamatoria de macrófago 1 α (MIP-1 α) (CCL3), es una proteína inflamatoria que actúan sobre macrófagos expresadas en tejidos inflamados por células residentes e inflamatorias en respuesta a citocinas proinflamatorias o al contacto con agentes patogénicos. Esta proteína pertenece al grupo CC, el cual se caracteriza por su función proinflamatoria y por producir sus efectos a través de combinaciones diversas de cinco receptores diferentes, localizados en las células T activada, células dendríticas inmaduras y otro tipo de células mononucleares. Esta familia de quimiocinas promueve la inflamación crónica y respuesta inmune adquirida **(Lezama P, 2006)**.

MIP- 1 α es una proteína quimiostática para monocitos, neutrófilos y células T CD8 **(Jiménez V y col, 2007)**, posee una mayor afinidad por los receptores CCR1, CCR3 y CCR5. Se ha demostrado que se expresa en las células de Langerhans y,

que atrae tanto a los CD4 en reposo y activados y células CD8 in vitro, lo que sugiere un posible papel en el reclutamiento de células inmunes (**Mohamadzadeh y col, 1996**).

Es un mediador importante de reclutamiento de leucocitos y la activación en una variedad de estados inflamatorios, incluida la infección. También tiene la propiedad de ser un inhibidor de la proliferación de células madre hematopoyéticas. Otros blancos celulares de MIP-1 α son las células dendríticas, células NK, basófilos (débilmente), y eosinófilos (**Zeng X y col, 2003**).

I.16 QUIMIOQUINAS E INFLAMACIÓN

Las quimioquinas o citocinas quimiotácticas, son pequeñas proteínas ligadas a la heparina, que direccionan el movimiento de los leucocitos circulantes hacia los sitios de inflamación o lesión, por lo cual son consideradas citocinas proinflamatorias. Estas son producidas en el transcurso de la respuesta inmunitaria o inflamatoria y sirve para movilizar las defensas del organismo, destacando las subfamilias C, CC, CXC, y CX3C. En su mayoría pueden ser secretados por macrófagos activados, aunque con estimulación adecuada también por otras células hematopoyéticas. Una infección o daño tisular induce la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión que causan a su vez la migración y acumulación de leucocitos y monocitos en el foco inflamatorio (**Lezama P, 2006**).

Una vez que los leucocitos penetran a los tejidos, las quimioquinas estimulan la migración de las células hacia un gradiente de concentración de quimiocinas crecientes. Estas interacciones determinan la entrada y acumulación de los

leucocitos en el sitio extravascular de la infección para controlar y detener la infección, pero en determinadas ocasiones también puede actuar como factores patogénicos ya que las quimiocinas también pueden ser secretadas por las mismas células cancerígenas a nivel del foco primario y secundario en este caso actúa de forma autocrina/ paracrina participando directamente en la proliferación tumoral como factores de crecimiento y de forma indirecta potenciando la angiogénesis tumoral.

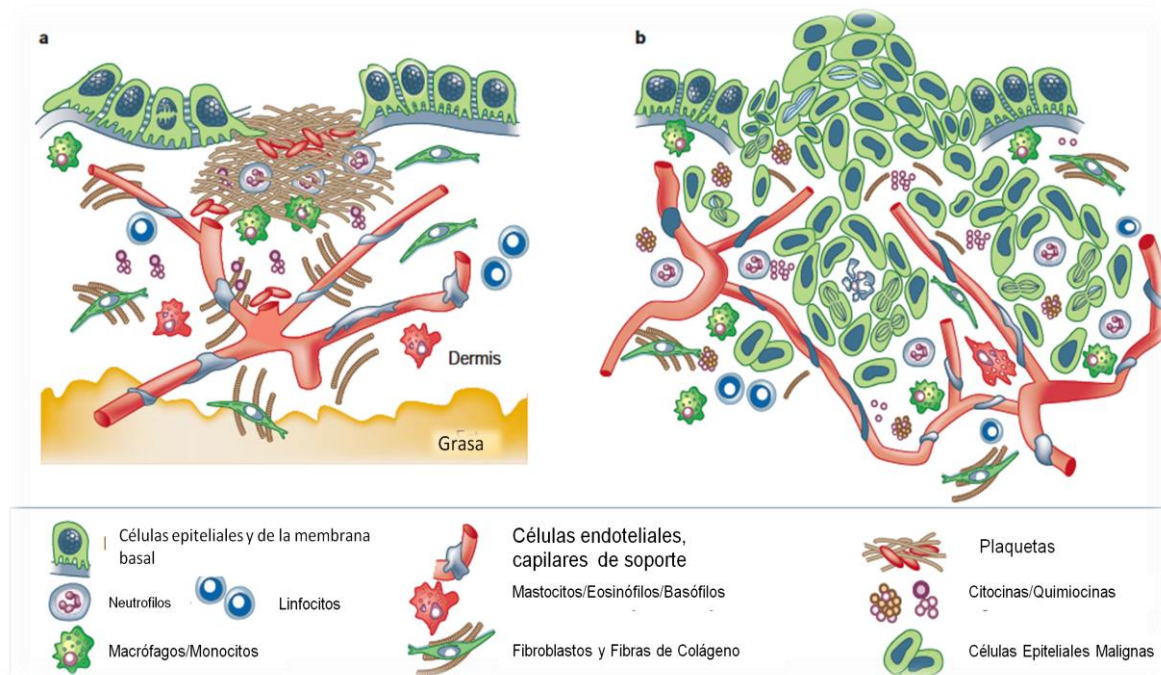


Figura 13 a.- Tejido normal el cual está altamente organizado b.-Carcinoma Invasivo, se pierde la organización. En la neoplasia asociada a la angiogénesis y linfangiogenesis se produce un caos en la organización de vasos linfáticos y sanguíneos, donde las células neoplásicas interactúan con otros tipos de células y modifican la matriz extracelular. Coussens L, 2002.

I.17 QUIMIOQUINAS Y CRECIMIENTO TUMORAL

Desde su descubrimiento, el campo de las quimiocinas fue fuertemente relacionado con la biología del cáncer. Esta conexión se ilustra por la identificación

de proteína quimiotáctica de monocitos-1 (CCL2), en sobrenadantes de cultivo de líneas celulares tumorales (**Bottazzi B, 1983**). Milliken y colaboradores, en 2002, mediante el análisis del líquido ascítico de cáncer de ovario y células ascitis identificaron la expresión de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL22, en conjunto con sus receptores (a saber, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, y CCR8), a nivel de ARNm y proteína. Sin embargo, aún no se ha aclarado completamente una correlación definida entre este patrón de expresión y los recuentos de células totales en la ascitis o la etapa de la enfermedad. (**Milliken D y col, 2002**)

El papel de las quimioquinas en la biología tumoral ha sido estudiado fuertemente en la última década y se ha analizado la regulación en la atracción de leucocitos en el tumor para la promoción de la supervivencia, proliferación y difusión de la célula tumoral (**Allavena P y col, 2005**).

Las principales funciones biológicas derivadas de la interacción ligando-receptor durante el desarrollo tumoral que han sido descritas son:

- Control de la migración selectiva de células tumorales
- Control del crecimiento y proliferación tumoral
- Control de la infiltración leucocitaria tumoral
- Regulación de la angiogénesis
- Estimulación de la adhesión e invasión tumoral
- Manipulación de la respuesta inmune tumoral. (**Balkwill F, 2003**).

I.18. QUIMIOQUINAS E INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA

En el microambiente tumoral las quimioquinas son reguladores esenciales de los niveles de infiltración de leucocitos en el tumor. La capacidad de las quimioquinas para mejorar la motilidad de los leucocitos, células endoteliales, y células tumorales es un factor clave para determinar el establecimiento y progresión del cáncer (**Zlotnik A, 2006**). La expresión de las quimioquinas, por lo tanto, es una ventaja potencial de las células tumorales y puede dotarlos de mayor capacidad para proliferar y diseminarse (**Allavena P y col, 2005**).

Esta habilidad quimiostática fue descubierta por primera vez al identificar que ciertas quimioquinas eran capaces de inducir la migración direccional de los leucocitos bajo la influencia de una serie de estímulos proinflamatorios (**Butcher, 2000**). Son varios los estudios que han logrado relacionar la presencia de una extensa red de quimioquinas en el microambiente tumoral producida por las células neoplásicas y estromales con la atracción de linfocitos T que poseen receptores de quimioquinas (**Levinson y col, 2004**).

Algunos estudios evidenciaron que la presencia de macrófagos y linfocitos en tumores sólidos está relacionada a la producción de quimioquinas por el tumor y su microambiente, como las quimioquinas CC en el cáncer de mama y cervix (**Negus R y col, 1997**).

Las quimioquinas CXC atraen neutrófilos y linfocitos, mientras que las quimioquinas pertenecientes a la familia CC atraen principalmente monocitos, pero también pueden atraer a los linfocitos, basófilos y eosinófilos y las familias CX3C y C

actúan sobre monocitos / linfocitos y linfocitos, respectivamente (**Allavena P y col, 2005**).

Quimioquinas como CCL2, CCL3, CCL4 y CCL5 se han observado aumentadas en diversos tumores epiteliales y su expresión se correlaciona con mayor infiltración de células inflamatorias, que dependiendo de su tipo e intensidad de producción atraen linfocitos o macrófagos de manera diferente (**Fushimi T y col, 2000**). Varios estudios han indicado que CCL2 de la subfamilia CC, es el principal responsable para el reclutamiento de monocitos en el sitio del tumor (**Gazzaniga S y col, 2006**).

Koizumi y colaboradores indicaron que las quimioquinas CCL9, CCL2, CCL3, y CCL5 inducen la invasión de células cancerosas a través de metaloproteinasas de la matriz producidos por la infiltración de IMC y TAM en el tejido canceroso. (**Koizumi K y col, 2007**)

I.19 CARCINOGENESIS Y DAÑO CELULAR:

Se ha demostrado que los errores en la replicación ocurren por una variedad de mecanismos, diferentes a los propios procesos endógenos que ocurren en las células. Dentro de los tipos y mecanismos bioquímicos de la carcinogénesis implicados en el daño del ADN tenemos:

- 1.- Daño oxidativo
- 2.- Depuración y depiriminación
- 3.- Alquilación inapropiada
- 4.- Interacción del óxido nítrico con el ADN

5.- Formación exocíclica aductiva

6.- Defectos en la reparación de las bases mal apareadas (**Cohen SM, 1977**)

I.19.1 RADICALES LIBRES Y DAÑO CELULAR

Se ha descrito que una lesión celular puede iniciarse durante la reoxigenación debido al aumento de radicales libres del oxígeno por parte de las células parenquimatosas, las células endoteliales y los leucocitos infiltrantes (**Kuper H y col, 2000**). Se pueden producir aniones superóxido en el tejido reperfundido como resultado de una reducción incompleta del oxígeno por las mitocondrias lesionadas o bien debido a la acción de oxidasas procedentes de los leucocitos, células endoteliales o células parenquimatosas. Los mecanismos de defensa antioxidantes también pueden estar comprometidos por la isquemia, favoreciendo la acumulación de radicales libres. El papel de estos aniones en algunas patologías del aparato reproductor femenino está siendo estudiado. Se conoce que pueden afectar una gran variedad de funciones del aparato reproductor femenino y en grandes concentraciones, pueden desencadenar procesos patológicos. Una lesión celular puede iniciarse durante la reoxigenación debido al aumento de radicales libres del oxígeno por parte de las células parenquimatosas, las células endoteliales y los leucocitos infiltrantes (**Larsen WJ, 1993**).

Las especies de radicales libres son inestables y altamente reactivas, llegan a ser estables adquiriendo electrones de los ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, carbohidratos o cualquier molécula próxima causando una serie de reacciones en cadena dando por resultado el daño celular (**Amaya H y col, 1997**). Se conocen dos

tipos importantes de especies de radicales libres: especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies del nitrógeno (RNOS.).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) causan un extenso daño oxidativo a las bases y al azúcar (desoxirribosa) del ADN. De la acción de estas sustancias se obtienen modificaciones del ADN.

Desde el punto de vista genotóxico especies reactivas del nitrógeno revisten gran importancia, ya que su genotoxicidad ha sido plenamente demostrada. Las sustancias RNOS, tienen por lo general la propiedad de deaminar las bases del ADN, que contiene grupos aminoexocíclicos (**Zimmermann FK, 1977; Victorin K, 1994**)

Sustancia o Compuesto químico	Mecanismo de acción
Superóxido (O ₂ ·-)	Causa transiciones de citosina a timina
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂ ·-)	Causa transiciones dobles CC (citosina) a TT (timina)
Radical oxidrilo (OH·-)	Causa transiciones dobles CC (citosina) a TT (timina)
Ácido hipocloroso (HOCl)	Causa transversión G - T guanina timina
Oxígeno simple	Causa transversión G - T guanina timina

Tabla 3 Principales oxidantes y mecanismo de acción de genotoxicidad

Los radicales libres de oxígeno más importantes son el anión Superóxido (O₂·-), el agua oxigenada (H₂O₂·-), el oxidrilo (OH·-) y las especies del nitrógeno (NO). El más frecuente es el anión superóxido que es extremadamente peligroso porque destruye el óxido nítrico provocando la hipertensión. El primero que hablo de radicales libres fue el doctor Hartman, premio Nobel en 1995, la biología de los

radicales libres es una rama relativamente nueva que se ocupa de las interacciones entre materias vivientes y radicales libres, el efecto de los radicales libres es similar al de las radiaciones, porque el efecto de estas se debe a un 80% a los radicales libres. **(Valdez J y col, 1994)**

Se pueden producir aniones superóxido (O_2^-) en el tejido reperfundido como resultado de una reducción incompleta del oxígeno por las mitocondrias lesionadas o bien debido a la acción de oxidasas procedentes de los leucocitos, células endoteliales o células parenquimatosas **(Rak J y col, 1996)** Los mecanismos de defensa antioxidantes también pueden estar comprometidos por la isquemia, favoreciendo la acumulación de radicales libres. Las moléculas de O_2^- , formadas durante el proceso respiratorio y liberadas dentro de los fagolisosomas o liberadas al medio extracelular, pueden reaccionar con el H_2 para formar peróxido; H_2O_2 , sustancia mucho más oxidante que el O_2^- y a su vez capaz de reaccionar con el óxido nítrico (NO.). Estas sustancias fuertemente oxidantes, pueden reaccionar con metales de transición, tales como, el hierro férrico (Fe^{3+++}) y el cobre bivalente cuproso (Cu^{2++}), los cuales pueden estar ligados al ADN. Si estos metales son oxidados se forman radicales ferrilos y perferrilos, los cuales son capaces de producir daños extensos al ADN de las células de mamíferos. **(Simic MG, 1994)**

Las especies reactivas del oxígeno pueden incrementar todavía más la transición de permeabilidad mitocondrial, que impide la generación de energía por parte de la mitocondria y la recuperación del ATP celular, causando muerte celular. **(Day Y. y col, 2005; Hanahan, 1996)** La lesión isquémica se acompaña de la producción de citocinas y el aumento en la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células parenquimatosas y endoteliales hipóxicas. Estos agentes dan lugar al reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares circulantes hacia el tejido

reperfundido; la inflamación subsiguiente produce una lesión adicional. **(Valdez J y col, 2000)**

Un importante mecanismo de lesión a la membrana es la lesión inducida por radicales libres, en particular por especies de oxígeno activado. Contribuye a procesos tan variados como la lesión química y por radiación, la toxicidad por oxígeno y otros gases, el envejecimiento celular, la muerte microbiana por células fagocíticas, la lesión inflamatoria, la destrucción tumoral por macrófagos y otros. **(Giatroman A y col, 1998; Campbell SC y col, 1998)**

Los radicales libres son especies químicas que tienen un único electrón no apareado en una órbita externa. En ese estado, el radical es extremadamente reactivo e inestable y reacciona con sustancias químicas inorgánicas u orgánicas (lípidos, carbohidratos, proteínas) en especial con moléculas claves de la membrana y con ácidos nucleicos. Además los radicales libres inician reacciones autocatalíticas, por lo que las moléculas con las que reaccionan se convierten ellas mismas en radicales libres para propagar la cadena de lesión.

Las células han desarrollado múltiples mecanismos para eliminar los radicales libres y de esta manera minimizar la lesión. Los radicales libres son inestables de manera inherente y habitualmente desaparecen de forma espontánea. Por ejemplo el superóxido es inestable y desaparece espontáneamente en oxígeno y peróxido de hidrógeno en presencia de agua. No obstante, existen diversos sistemas enzimáticos y no enzimáticos que contribuyen a la inactivación de las reacciones de radicales libres, entre ellos se encuentran: antioxidantes y enzimas como la catalasa y glutatión peroxidasa. **(Amaya H y col, 1997)**

Los tres tipos principales de ROS son: anión superóxido, peróxido de hidrógeno y oxidrilo. El superóxido se forma cuando los electrones se escapan de la cadena de transporte del electrón. La dismutación del superóxido da lugar a la formación del peróxido de hidrógeno. El ion del oxidrilo es altamente reactivo y puede modificar las purinas y pirimidinas dando como resultado el daño del ADN. **(Johson DA y col, 1998)**

ROS ha estado implicado en más de 100 enfermedades. Tienen un papel fisiológico y patológico en la zona reproductiva femenina. Numerosos estudios en humanos y animales han demostrado la presencia del ROS en la zona reproductiva femenina: ovario, trompas de Falopio y embriones, además está implicado en la modulación de numerosas funciones reproductivas y fisiológicas tales como maduración del oocito, esteroidogénesis y lúteolisis. **(Tanaka H y col, 2005; Lefer AM, 1993)**

Los radicales libres tienen una semivida muy breve ya que es bloqueado por la superóxido dismutasa o SOD que acelera 10 mil veces la velocidad con la que el O₂ se transforma en H₂O₂.

Existen dos formas de SOD: la celular a base de cobre y zinc y la nuclear a base de manganeso, y el óxido nítrico (NO) un gas incoloro escasamente soluble en agua con un electrón no apareado en su capa de valencia externa, lo que lo convierte en una molécula paramagnética con naturaleza de radical libre que participa en procesos fisiológicos y patológicos. **(Muller WA, 2002)**

En la síntesis del NO una molécula de L-arginina es transportada al interior de la célula endotelial por un transportador específico, generándose una molécula de L-citrulina y una molécula de NO, todo esto es catalizado por la enzima sintasa del NO. (Coleman JW, 2001)

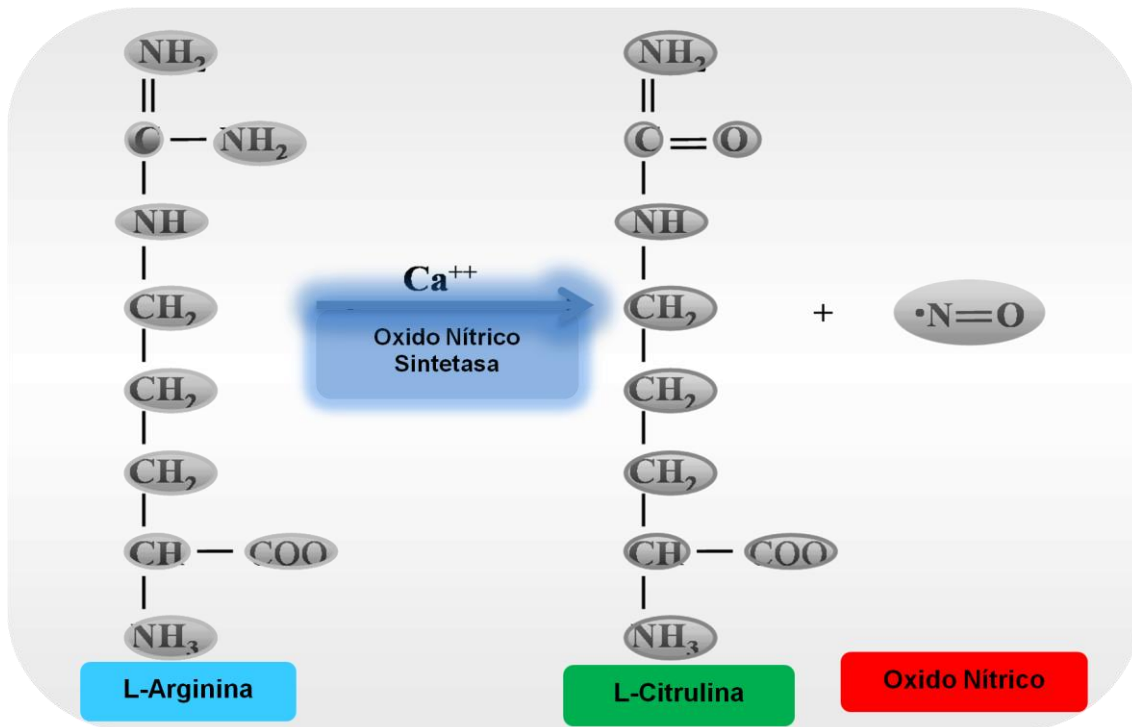


Figura 14 Síntesis de Oxido Nítrico. Carrero Y, 2012

Para la síntesis del NO además del sustrato L-arginina, se requiere de la presencia de carmodulina y cuatro cofactores: mononucleotido de flavina (FMN), dinucleotido de Flavina adenina (FAD), tetrahydrobiopterina (THB) y dinucleotido fosfato de nicotinamida adenina (NADPH), esta reacción puede ser inhibida por derivados estructurales de la L-arginina, como la N-monometil-L-arginina (L-NMMA) y metilester de N-nitro-L-arginina (L-NAME) entre otros. (Lamontagne D y col, 1992)

El óxido nítrico es producido en las células por tres isoformas de la óxido nítrico sintasa:

1. Dos isoformas constitutivas (cNOS) ambas dependientes de calcio: la isoforma endotelial (eNOS), también conocida como tipo III (NOS3) y la isoforma neuronal (nNOS), también denominada tipo I (NOS1). Dichas isoformas median la producción de NO en cantidades bajas y fisiológicas, para actuar como señalizador molecular.

2. Una forma inducible (iNOS), independiente de calcio, también denominada de tipo II (NOS2), cuya expresión puede ser inducida en diferentes tipos de células, tales como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso y endotelio; dicha inducción se produce como respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como: el interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Esta isoforma cataliza la producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares.

Las tres isoformas de la NOS contienen un dominio carboxi-terminal homólogo al citocromo P450, con una flavina como grupo prostético, y un dominio amino terminal con un grupo heme como grupo prostético. Estos dominios terminales están conectados por un tercer dominio, que es a fin a calmodulina. **(Lamontagne D y col, 1992)**

La unión de la calmodulina a la NOS parece ser el "interruptor molecular" que permite el flujo de electrones desde el dominio reductasa hacia el grupo heme, permitiendo la transformación del O₂ y L-arginina en NO y L-citrulina. Las isoformas constitutivas NOS1 (nNOS) y en la NOS3 (eNOS) se encuentran inactivas hasta que aumenta el calcio intracelular. Por ejemplo, en las células endoteliales, la ACh, la bradiquinina, el ADP o el estrés de roce son capaces de iniciar la señal que

incrementa el calcio celular, el cual regula la unión de calmodulina a su dominio, iniciando la síntesis de NO. Cuando la calmodulina se une a la enzima, los electrones donados por el NADPH fluyen desde el dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa y son aceptados por el citocromo C y otros aceptores de electrones. **(Lamontagne D y col, 1992)**

En contraste, en la isoforma inducible (NOS2, o independiente de calcio), la calmodulina permanece fuertemente unida, aún a bajas concentraciones de calcio, actuando esencialmente como una subunidad más. En este caso, los electrones donados por el NADPH son transportados por el FAD y por FMN hacia el grupo heme. En estas condiciones, la iNOS cataliza la producción de una mezcla de aniones superóxido (O₂⁻) y de NO en altas cantidades, produciendo peroxinitritos (ONOO⁻), con capacidad para producir citotoxicidad. En ausencia de THB, la NOS genera H₂O₂, O₂⁻ y NO. **(Lamontagne D y col, 1992)**

Debido a su naturaleza gaseosa el NO tiene propiedades diferentes a cualquier otro neurotransmisor, esta entidad química no puede ser almacenada en el interior de vesículas para ser posteriormente exocitadas, en consecuencia cuando una célula produce NO, este escapa a través de una membrana celular difundiendo a las proximidades. Esa misma propiedad al atravesar las membranas permite al NO afectar a otras celular sin necesidad de receptores de otras superficies. **(Lamontagne D y col, 1992)**. El NO debido a que tiene una vida media de segundos, es capaz de combinarse con rapidez a otros radicales libres una vez liberado y ejerce sus efectos, se descompone para producir dos metabolitos estables, los radicales de nitrato y nitrito en una reacción catalizada con metales de transición, incluyendo al hierro. **(Lamontagne D y col, 1992)**

La reacción con los radicales libres tienden a perpetuarse hasta el infinito, en ausencia de antioxidantes, hoy en día los radicales libres no se consideran solamente los responsables del enranciamiento de las grasas sino que se consideran origen de la inflamación y la cardiopatía isquémica. Es útil recordar que una dieta hipercalórica aumenta la producción de radicales libres, mientras que una dieta hipocalórica la reduce. **(Muller WA, 2002)**

El desequilibrio entre la producción de radicales libres y la defensa antioxidante conducen al estrés oxidativo que se acompaña de una gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos que pueden llevar a insuficiencia funcional y muerte celular (apoptosis). **(Pérez R, 2004)**

Entre estos cambios bioquímicos y fisiológicos se encuentran: el aumento de la producción de enzimas que cataliza la biotransformación de radicales libres, el aumento de citocinas especialmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), todos considerados factores angiogénicos, ya que tienen la capacidad de estimular la angiogénesis intratumoral. **(Pérez R, 2004)**

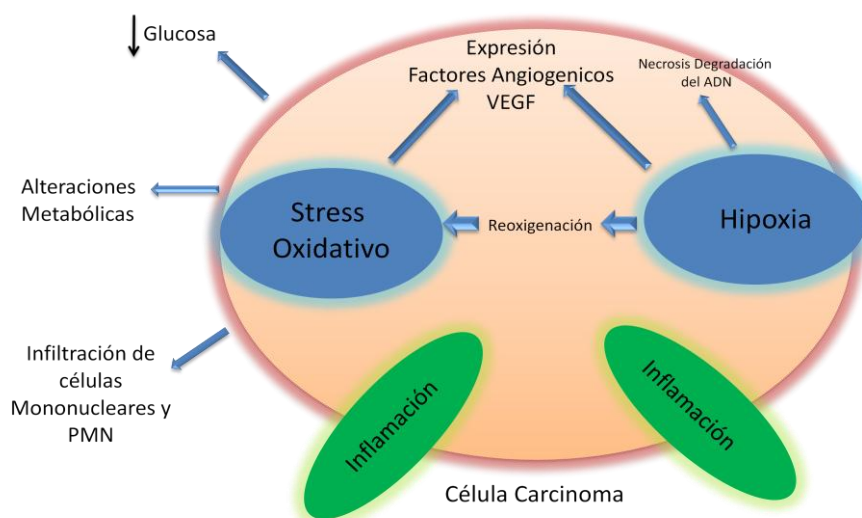


Figura 15 La inflamación crónica persistente, Aumento del Stress oxidativo y la hipoxia estimulan la expresión de factores angiogénicos que permiten la irrigación y crecimiento del tumor. Carrero Y, 2006.

I.20 ANGIOGENESIS Y DESARROLLO TUMORAL

La angiogénesis es un proceso importante y esencial para la inflamación crónica y la fibrosis, para el crecimiento tumoral y para la formación de una circulación colateral, se han realizado muchos trabajos dirigidos a descubrir los mecanismos que regulan la formación de nuevos vasos sanguíneos. **(Folkman J y col, 1996)**

El término angiogénesis, significa literalmente formación de nuevos vasos sanguíneos, durante este proceso se distinguen la vasculogénesis que ocurre para establecer el patrón vascular del adulto y la formación de nuevos capilares a partir de otros ya existentes. Cuando se ha completado el crecimiento vascular, la angiogénesis se convierte en un proceso patológico que acompaña y favorece enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. **(Sánchez Y, 2001)**

La angiogénesis ocurre como un proceso fisiológico en el endometrio, durante el ciclo reproductivo de la mujer fértil, en el ovario, durante el crecimiento de la red capilar folicular y en la formación de la placenta. Es fundamental para la actividad reproductiva y la reparación de los tejidos. **(Larsen WJ, 1993; Barillari G y col, 1998)**

La velocidad del crecimiento tumoral depende de otros factores además de la cinética celular, donde el más importante es la irrigación. Los tumores no pueden crecer más de 1 a 2 mm de diámetro o grosor, salvo que estén vascularizados. Es probable de que la zona de 1 a 2 mm. represente la distancia máxima de difusión del oxígeno y los elementos nutritivos a partir de los vasos sanguíneos. Más allá de estos límites el tumor no puede seguir creciendo sin

recibir vascularización, ya que la hipoxia provocaría apoptosis a través de la activación de p53 (**Rak J, 1996**). Dai y cols encontraron que la expresión del VEGF en tumores cervicales con un diámetro mayor a los 4 mm fue del 72,7% mientras que en los tumores que presentaban un menor diámetro se expresó el 51,7%. (**Dai Y. y col, 2005**)

La neovascularización tiene un efecto doble en el crecimiento tumoral. Por una parte aporta elementos nutritivos y oxígeno y por otra parte las células endoteliales recién formadas estimulan el crecimiento de las células tumorales adyacentes mediante la secreción de ciertos polipéptidos, como factores de crecimiento de tipo insulínico, PDGF, GM-CSF e IL-1. (**Rak J, 1996**).

La angiogénesis no solo es necesaria para mantener el crecimiento del tumor, sino también para que este pueda metastatizar. Sin acceso a la vascularización, las células tumorales no pueden viajar a otras localizaciones (**Barillari G y col, 1998**)

Estudios recientes sugieren que las células tumorales no solo producen factores angiogénicos sino que también inducen moléculas antiangiogénicas, de esta forma el crecimiento del tumor está controlado por un equilibrio entre los factores estimulantes e inhibidores de la angiogénesis (**Barillari G y col, 1998**)

Datos experimentales y clínicos indican que cuando inician su crecimiento, los tumores humanos no inducen angiogénesis. Persisten in situ durante meses o años hasta desarrollar irrigación y en un momento determinado, probablemente a causa de la acumulación de mutaciones, algunas células de este pequeño tumor cambian a un fenotipo angiogénico. La base molecular de este cambio angiogénico no se conoce por completo pero podría implicar un aumento de la

producción de factores angiogénicos o una pérdida de los inhibidores de la angiogénesis (**Hanahan D y col, 1996**)

Existen muchos factores de crecimiento que poseen poder angiogénico, la mayoría de las pruebas indican que el VEGF y las angiopoyetinas son las que desempeñan un papel especial en la vasculogénesis y la angiogénesis. Estos factores son secretados por muchas células mesenquimatosas y del estroma pero sus receptores están en gran parte circunscritos al endotelio y contribuyen al desarrollo de los vasos durante la angiogénesis.

Aproximadamente 12 proteínas angiogénicas son reconocidas en la actualidad. Las más comúnmente identificadas en los tumores son el factor de crecimiento básico de fibroblastos (BFGF) y VEGF (**Barillari G y col, 1998; Giatromanolaki A y col 1998**)

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) posee 2 variedades ácidas y básicas, ambas pueden por estimulación paracrina incrementar la síntesis de factores angiogénicos por los macrófagos del tejido conectivo o estimulan la proliferación de las células endoteliales (**Campbell SC y col 1998; A Kaya B y col, 2005**) El FGF al igual que otros factores de crecimiento tumoral, al aumentar el índice de actividad mitótica, facilitan la proliferación de las células tumorales y endoteliales vasculares en las áreas más vascularizadas del tumor. (**A Kaya B y col, 2005**)

El proceso de angiogénesis es determinado por el balance entre factores estimuladores e inhibidores, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), constituye uno de los factores proangiogénicos esenciales en el control de la angiogénesis tumoral. Este factor ha sido estudiado en la progresión de diversos

tumores malignos, como el tumor maligno del tracto gastrointestinal en el cual no se conoce bien la asociación entre el VEGF y la proliferación celular, así mismo se expresa abundantemente en tumores de origen epitelial y asociado con otros estados clínicos como isquemia del miocardio, derrame pleural y enfermedades retinianas, en las cuales su elevación es estimulada por la isquemia tisular. En los tejidos neoplásicos su síntesis es promovida por las propias células tumorales **(Campbell SC y col 1998; A Kaya B y col, 2005; Zetter BR, 1998; Obermair A y col, 1998; Johson DA y col, 1998)**

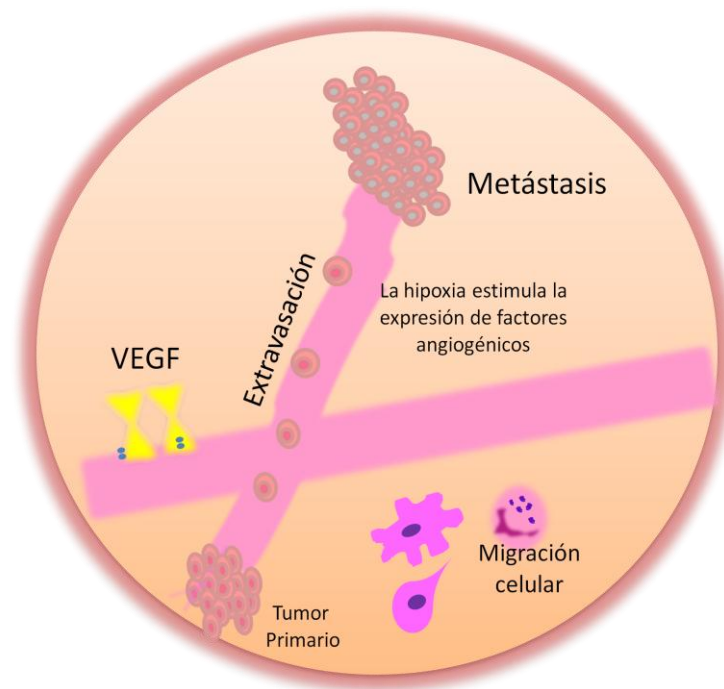


Figura 16 La hipoxia y la infiltración celular estimulan la expresión de factores angiogénicos. La angiogénesis no solo es necesaria para mantener el crecimiento del tumor, sino también para que este pueda hacer metástasis. Sin acceso a la vascularización, las células tumorales no pueden viajar a otras localizaciones. Carrero y col, 2006.

I.20.1 FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

El VEGF es una glicoproteína homodimérica de 34-46 kDa producida por varios tipos de células en respuesta a diversos estímulos. Actúa sobre las células

endoteliales vasculares uniéndose a receptores transmembrana específicos. El VEGF tiene cuatro actividades biológicas principales que contribuyen todas ellas a la inducción de la angiogénesis y que han sido estudiadas exhaustivamente, dentro de estas se pueden mencionar: crecimiento y proliferación de células endoteliales vasculares, migración de células endoteliales vasculares, supervivencia de células endoteliales inmaduras mediante la prevención de la apoptosis y aumento de la permeabilidad vascular de los capilares. **(Gombos Z y col, 2005)**

Algunos estudios encontraron que el VEGF se encuentra implicado en la regulación del proceso de angiogénesis y la proliferación celular del tumor maligno del tracto gastrointestinal, así mismo Wang y cols sugirieron que una sobre expresión del VEGF es esencial para la microangiogénesis del carcinoma de células escamosas de laringe. **(Wang Z y col, 2004)**

Los vasos sanguíneos son un componente importante del estroma tumoral y por lo tanto la angiogénesis es un factor predictivo del pronóstico en muchas neoplasias humanas, por lo que se considera existe una correlación importante entre el número y la densidad de los vasos sanguíneos con los estados metastásicos, tamaño del tumor, tipo histológico y por consiguiente grado de malignidad tumoral **(Lantieri LA y col, 1998)**

Vázquez y col observaron un incremento en la expresión del VEGF durante la progresión del cáncer cervical cuando detectaron en el citoplasma de las células tumorales así como en las células epiteliales normales y pre-malignas de cuello uterino la expresión del VEGF y encontraron que la proteína se expresó en 84% de las muestras con cérvix normal, en 91% de las lesiones intraepiteliales de bajo grado y en 97% de los carcinomas cervicales **(Vázquez K y col, 2005)**, así

mismo los hallazgos de Gombos y cols sugieren que el VEGF juega un rol importante en la angiogénesis, ellos examinaron la densidad de los vasos linfáticos peritumorales y lo correlacionaron con la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células escamosas de carcinoma de cuello uterino y encontraron una diferencia significativa cuando lo compararon con cuello uterino sano (**Gombos Z y col, 2005**). Así mismo Mitsunashi y cols encontraron diferencias significativas al comparar la concentración sérica del VEGF en pacientes con carcinoma cervical con respecto al grupo control de mujeres sanas. (**Mitsunashi A y col, 2005**)

La expresión del VEGF es estimulada por algunas citocinas y factores de crecimiento ($TGF\beta$, PDGF, $TGF\alpha$) y especialmente por la hipoxia celular la cual se ha asociado con la angiogénesis desde hace mucho tiempo (**Dvorak HF, 1995**)

La hipoxia en los tejidos estimula la producción de sustancias angiogénicas como el VEGF y la eritropoyetina. Algunos estudios han demostrado que la eritropoyetina promueve la angiogénesis cuando se une a su receptor en células endoteliales de cuello uterino, igualmente se han correlacionado células escamosas de cáncer de cérvix con hipoxia y abundante vascularización, encontrándose que el VEGF expresado en epitelio hiperplásico promueve la angiogénesis en células escamosas de carcinoma de cuello uterino (**Tanaka H y col, 2005**)

I.21 INVASION Y METASTASIS

La última capacidad que debe adquirir la célula tumoral es la de salir del sitio de origen, migrar y establecerse en otros sitios para generar un nuevo tumor. El neo primario tiene una población de células heterogéneas con distintas alteraciones

genéticas que permiten superar la inhibición del crecimiento dado por uniones intercelulares, diseminarse y colonizar órganos distantes. En el tumor primario las uniones intercelulares son reducidas debido a la pérdida de cadherina E55, proteína importante para el mantenimiento de la unión entre células. La adquisición de alteraciones en el gen que codifica esta proteína es un punto clave para transición de la célula epitelial a fenotipo mesenquimal, lo que la capacita para desanclarse e invadir el vaso sanguíneo y hacer metástasis. Por último para que las células tumorales puedan escapar de una masa primaria, entren en los vasos sanguíneos o linfáticos y produzcan un crecimiento secundario en un sitio distante, deben cumplirse los siguientes pasos: expansión clonal y angiogénesis, invasión y adhesión a la membrana basal, diseminación hacia la matriz extracelular, extravasación, interacción con células linfoides del huésped, depósito metastásico, angiogénesis y crecimiento. **(Hess KR, 1996)**



II.- HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer de cuello uterino (CaCu) es un problema de salud pública mundial, se descubren aproximadamente 15 mil nuevos casos anualmente y de 4 a 5 mil de éstos constituyen la causa de muerte en las pacientes. Lo cual ubica al CaCU como el segundo tipo de cáncer en las mujeres, el 15% de las neoplasias, después del cáncer de mama. Supone la primera causa de mortalidad por cáncer ginecológico. Desafortunadamente, la mayor incidencia y mortalidad de esta enfermedad, se presenta en los países en vías de desarrollo donde los programas de detección precoz no han sido exitosos

Estudios epidemiológicos han demostrado que la mayor parte de los tipos de cáncer en los humanos se origina en forma secundaria al impacto de factores cancerígenos. En particular el cáncer cervical, se ha descrito en los últimos años que se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, teniendo como factores predisponentes y etiopatogénicos: la edad precoz en el comienzo de relaciones sexuales, paridad elevada, infecciones vaginales (VPH y VHS2), y la producción de radicales libres, entre otros todos considerados cofactores en la génesis del cáncer cervical.

Así mismo, observaciones clínicas han permitido establecer un importante papel del VPH en el origen de las lesiones preinvasivas de cuello uterino. Se ha podido demostrar que este virus es el agente desencadenante de más del 95% de los cánceres cervicales y de las lesiones cervicales de alto grado. Está bien establecido que las oncoproteínas E6 y E7 codificadas por el virus están involucradas en la transformación celular y que la infección por sí misma no es

suficiente para desarrollar un cáncer. Existen factores ambientales y propios del huésped involucrados en los procesos de transformación celular. Por lo que en este contexto, se ha planteado que una respuesta inmunitaria anormal con alteración en los procesos de regulación pudieran ser los responsables de la mayoría de las lesiones neoplásicas a nivel del cuello uterino. Se ha destacado la participación de ciertas citocinas que actúan como señales intracelulares y que regulan la respuesta inflamatoria, las cuales son secretadas después de una estimulación antigénica.

Es importante señalar que el proceso de transformación celular a nivel de cérvix se asocia con un proceso inflamatorio el cual desempeña un papel importante durante la progresión tumoral. La evidencia clínica sugiere un efecto dual de las células inflamatorias, ya sea en la producción de mediadores e inhibidores de la infiltración leucocitaria y/o daño vascular y de células residentes tisulares, así como la estimulación a la expresión de factores de crecimiento y aumento del estrés oxidativo, por lo que el estudio de esta cascada de eventos podría proporcionar un mejor entendimiento de los procesos de malignización en cuello uterino. La respuesta inmunitaria humoral y celular es clave y de no resolverse la condición, el proceso inflamatorio se hace persistente, lo que facilita la transformación celular y futura malignización del tumor.

De acuerdo con estos planteamientos nos propusimos investigar en cuello uterino la respuesta inmunitaria local asociada a la infección por el VPH y transformación displásica. Análisis de la posible asociación de patrones y de expresión de citocinas expresadas en el sitio de la lesión epitelial displásica en sus diferentes estadios. Se analizará comparativamente el patrón de infiltración celular leucocitaria y de producción de citoquinas en mujeres con cervicitis sin evidencia de lesión displásica si como mujeres sanas.

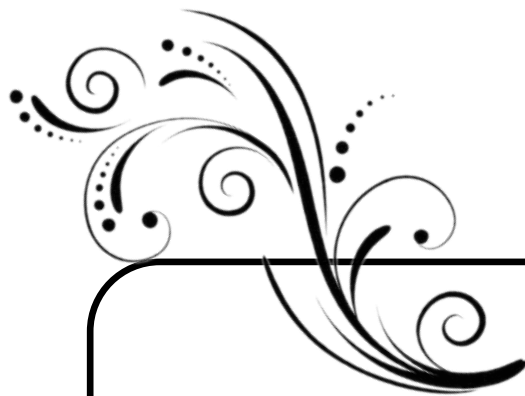
Objetivo General

Establecer los patrones de infiltración de células del sistema inmunitario-inflamatorio, de expresión de quimiocinas implicadas en su regulación, de su estado metabólico y capacidad de secretar VEGF en tejido de cuello uterino en diferentes fases de malignización y en estados inflamatorios sin alteración neoplásica del fenotipo celular.

Objetivos Específicos

En muestras de tejido cervical de mujeres con diferentes grados de displasias o inflamación sin evidencia de transformación neoplásica, así como un grupo control normal se estudiarán los siguientes parámetros:

- 1.- Determinar la expresión de CCL3/MIP1 α , CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 y VEGF
- 2.- Detectar la Infiltración de leucocitos (monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos)
- 3.- Determinar células productoras de anión superóxido y Óxido Nítrico (NO)
- 4.- Determinar la infección por VPH mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y genotipificación por Captura de Híbridos (HC2)
- 5.- Estudiar la significación clínica e histológica de los hallazgos con los diferentes estadios de la neoplasia o lesión inflamatoria cervical y la presencia o ausencia de VPH.



**III.-MATERIALES Y
MÉTODOS**

III.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

III.1.1 TIPO DE DISEÑO.

El presente estudio fue de tipo descriptivo, prospectivo, inferencial, transversal y translacional.

III.1.2 PERIODO DE ESTUDIO.

Esta investigación fue realizada durante el periodo comprendido entre el año 2006 al 2011.

III.1.3 ÁREA DE ESTUDIO.

Este estudio cubre el área de la inmunopatología del cáncer del cuello uterino. El estudio para la detección del ADN del VPH utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e Híbrido de Captura (HCII), fue realizado en las instalaciones del Laboratorio Regional de Referencia Viroológica en la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. El Estudio histopatológico se realizó en la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina y el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Policlínica Maracaibo; el estudio de producción de anión superóxido y la determinación inmunohistoquímica de las citoquinas y factores de crecimiento estudiados fue realizado en conjunto con la Sección de Inmunología y Biología Celular del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” y el Laboratorio Regional de Referencia Viroológica.

III.1.4 SELECCIÓN Y PROCEDENCIA DE LA POBLACIÓN.

Durante el periodo comprendido entre enero del 2006 y Marzo del 2010 se estudió una población de 480 mujeres que asistieron a diversas jornadas de pesquisa de cáncer de cuello uterino y VPH realizadas en los ambulatorios San Jacinto (ASJ), Los Olivos (AO), Servicios Médicos de LUZ (SMO), Hospital Noriega Trigo (NT), Ambulatorio La Victoria (AV), hospital Adolfo Pons (AP), Salud Maracaibo (SM) Consulta privada (POO) y anexo Femenino de la Cárcel Nacional de Sabaneta (AF) estado Zulia-Venezuela, de las cuales se encontraron 55 pacientes que presentaron lesiones pre-invasivas a nivel del cuello uterino (45 NICI, 5 NICII, 5 NICIII). Además como se seleccionaron 7 mujeres que presentaban procesos inflamatorios (endocervicitis crónica e inflamatorio severo) y 7 mujeres sin lesiones visibles de cuello uterino, las cuales representaron los controles sanos.

III.1.5 POBLACIÓN EN ESTUDIO

Las características de las mujeres incluidas en este estudio se relacionan con los criterios de inclusión y exclusión seleccionados.

III.1.6 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- 1) Alteración colposcópica con evidencia histológica de displasia en el epitelio cervical (para el grupo con Neoplasia Intraepitelial)
- 2) Alteración colposcópica sin evidencia histológica de displasia en el epitelio cervical (para el grupo enfermedad inflamatoria)
- 3) Ser o haber sido sexualmente activas.
- 4) Cualquier raza e historia de paridad.
- 5) Edad mayor de 16 y no haber tenido la menopausia

III.1.7 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1) Mujeres embarazadas
- 2) Normalidad del epitelio cervical (Solo controles sanos)
- 3) Infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
- 4) Tratamiento hormonal o anti-inflamatorio o anti-infeccioso local y/o sistémico por patología genital en los tres meses previos.
- 5) Tratamiento previo por infección con VPH.
- 6) Padecer enfermedades autoinmunes.
- 7) Padecer insuficiencia renal, hepática, cardíaca y/o respiratoria grave.
- 8) Tratamiento con fármacos inmunosupresores o antineoplásicos. Las mujeres controles se caracterizaban por ser sexualmente activas y presentar un estado de salud normal y sin evidencia de alteraciones en la colposcopia.

III.1.8 CRITERIOS BIOÉTICOS

A todas las pacientes se les realizó una historia clínica y exploración física previo al consentimiento informado para participar en el proyecto, por medio de la cual se obtuvieron datos sociodemográficos, clínicos y ginecológicos.

Se tomaron en cuenta las pautas establecidas por la Asociación Médica Mundial (AMM) a través de la promulgación de la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, así mismo el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia y Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) aprobó el presente protocolo propuesto por el Laboratorio Regional de

Referencia Viroológica y la Cátedra de Gineco-obstetricia. (Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela)

III.1.9 TOMA DE MUESTRA

III.1.9.1 TOMA DE MUESTRA PARA EL ESTUDIO HISTOQUIMICO Y LA DETERMINACION DE INFILTRACION LEUCOCITARIA, QUIMIOKINAS Y FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR

El examen físico ginecológico fue realizado por el médico gineco-obstetra el cual incluyó inspección de genitales externos y colocación del espejo para visualizar el cuello uterino. Aquellas pacientes a las cuales se les detectó alguna atipia celular previa visualización colposcópica, se realizaron 3 biopsias:

III.9.1.2 PARA EL ESTUDIO HISTOLÓGICO

Utilizando una pinza de Schumacher para biopsia uterina, se tomó un fragmento de tejido de la alteración tisular, colocándolo en formalina al 10%, e incluyéndolo en parafina para la realización de cortes de 6µ los cuales fueron teñidos posteriormente con hematoxilina– eosina para identificar cambio y realizar el diagnóstico histopatológico.

III.9.1.3 PARA EL ESTUDIO INMUNO-HISTOLÓGICO

Otro fragmento de tejido se utilizó para la determinación de MIP1, MCP1, VEGF, infiltración leucocitaria y anión superóxido por técnicas inmunohistológicas e histoquímicas. Estos fragmentos fueron incluidos en el componente OCT (Tissue Tek; Miles Inc Diagnostic, Kankakee, IL, USA) congelados con hielo seco y acetona para ser almacenados a -70° C hasta su procesamiento. De igual forma fueron

tratados los tejidos tomados a la población control.

III.9.1.4 PARA LA DETERMINACION DE OXIDO NITRICO

Se tomó un tercer fragmento al fresco para la determinación de óxido nítrico y proteínas, el cual se colocó en un tubo eppendorf sin ningún aditivo y fue almacenado a -20° C hasta su procesamiento. De igual forma fueron tratados los tejidos tomados a la población control.

III.9.1.5 TOMA DE MUESTRA PARA EL DIAGNOSTICO DE VPH

Para el diagnóstico molecular del VPH se tomó una muestra de la zona de transición escamocolumnar, en los pacientes como en los controles utilizando para ello una torunda de alginato la cual fue colocada en un tubo estéril para ser posteriormente trasladado al Laboratorio Regional de Referencia Viroológica. Estas se guardaron a -20° C hasta su procesamiento.

III.1.10 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

III.1.10.1 DETERMINACIÓN INMUNOHISTOLOGICA DE LA INTERLEUCINA (IL8), LA PROTEINA QUIMIOTACTICA DE MONOCITOS (MCP1), LA PROTEÍNA INFLAMATORIA DE MACRÓFAGO 1 α (MIP1 α), EL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) Y LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARA

En este estudio se incluyeron dobles tinciones para evidenciar infiltración leucocitaria y la expresión de Interleucina 8 (IL-8), Proteína Quimiotáctica de

Monocitos (MCP1), Proteína Inflamatoria de Macrófago 1 α (MIP1 α), Factor de Crecimiento Endotelial Vascolar (VEGF) en biopsias de cuello uterino.

De las biopsias congeladas se realizaron doce cortes de 4 μ por cada tejido utilizando un criostato (*Shandon®*, *Pittsburg, Pennsylvania, USA*). Posteriormente se fijaron en acetona fría durante 5 minutos y se lavaron por 2 minutos con Buffer fosfato salino pH 7.2 (PBS). Se incubaron durante una hora con el anticuerpo monoclonal primario correspondiente: anti RIII/C16 b humano para neutrófilos, Anti CD3 humano para linfocitos y Anti macrophage para macrófagos humanos (R&D systems) previa dilución de los mismos 1:100. Posteriormente los cortes se lavaron con PBS pH 7.2. La localización del primer anticuerpo se determinó con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón marcado con FITC (Rat anti Mouse F(ab')₂ FITC Accurate Chemicals) el cual se incubó por una hora y se lavó con PBS transcurrido el tiempo de incubación.

Seguidamente se realizó una segunda tinción para evidenciar la expresión de IL8 (Biotinylated anti human CXCL8/IL8), MCP-1 (Biotinylated anti human CCL2/MCP1), Proteína Inflamatoria de Macrófago 1 α (MIP1 α) usando un anticuerpo biotilado anti human CCL3/MIP-1 α y del Factor de Crecimiento Endotelial Vascolar. (Biotinylated anti human VEGF antibody) todos obtenidos de R&D systems. Se realizó incubación por una hora, se lavó con PBS y se les agregó Streptavidina marcada con Ficoeritrina. Después de media hora de incubación se lavó con PBS. Culminado el procedimiento se le agregó p-fenilenediamina (PPD) en solución de glicerol-PBS para evitar la pérdida de fluorescencia y se le colocó una lamina cubre objeto sellando los bordes. Las muestras se observaron en un microscopio con sistema de epifluorescencia (Axioskop, Zeiss, Alemania). Se contaron

número de células por campos de 400 X El control negativo estará representado por un anticuerpo monoclonal del mismo isotipo contra un antígeno no relevante en el tejido a estudiar en lugar del anticuerpo primario.

III.1.10.2 IDENTIFICACIÓN DEL ANIÓN SUPÉROXIDO EN TEJIDO.

Se hicieron cortes de tejido de 10 μ y se fijaron con acetona fría, para la identificación del anión superóxido. La determinación tisular del anión superóxido se realizó de acuerdo al método de Briggs & Cols (**Briggs y cols.1996, Briggs y cols 2004**)

Fundamento del método para determinar anión superóxido (Briggs y Cols).

Se basa en la oxidación de la diaminobencidina y del manganeso (Mn^{++}), en presencia de NADPH oxidasa para catalizar la conversión de anion superóxido en peróxido de hidrogeno y manganeso (Mn^{+++}), el anion superóxido intracelular se hace evidente al formarse un precipitado de color negro.

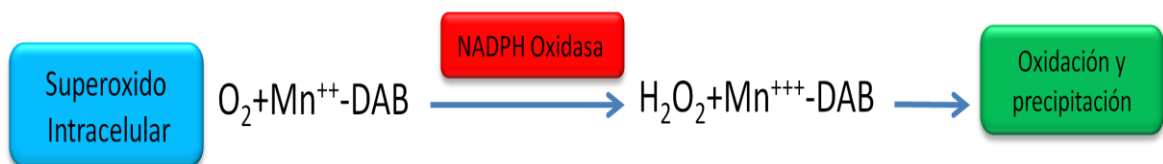


Figura 17 Fundamento de la reacción de Briggs. Carrero y cols, 2012

Para lo cual se preparo una disolución de diaminobencidina (DAB) 75.76mg en 2ml de agua destilada, luego se preparo el Buffer Tris Base 0.05M al mezclar 4.17ml de acido clorhídrico (HCl) 2N llevar a 50 ml con agua destilada y 7.18ml de Tris llevar a 25ml con agua destilada, mezclar y llevar a 125ml con agua destilada,

diluir 1:10 para obtener una concentración de 0.05M. Posteriormente se preparo la solución de reacción donde se mezclan todos los reactivos preparados previamente, además, del cloruro de níquel (NiCl_2) al 8%, azida sódica (NaN_3) al 10% y Cloruro de manganeso (MnCl_2) 0.5M, y por último se preparo el control negativo que lleva todos los reactivos a excepción del cloruro de manganeso a pH 7.6.

Procedimiento experimental.

1. Para la identificación del anión superóxido se hicieron cortes de 10 u de biopsias de cuello uterino.
2. Dejar secar a temperatura ambiente.
3. Luego, neutralizar con azida sódica (NaN_3) al 0,1% por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Posteriormente sumergir los cortes en la solución de reacción.(proteger de la luz)
5. .Después incubar a 37°C por 1 hora.
6. Transcurrida la hora lavar con buffer fosfato salino (PBS).
7. Fijar con buffer formalina al 10% por 10 minutos.
8. Lavar con buffer fosfato salino (PBS).
9. Contratatinción con verde de metilo por 30 minutos.
10. Lavar 3 veces con agua de chorro o agua destilada.
11. Dejar escurrir y secar bien.
12. Luego montar con Permout.
13. Contar el número de células por campo de 400X en varios campos y sacar el promedio.

III.1.10.3 DETERMINACION DE PROTEINAS Y OXIDO NITRICO

La determinación de proteínas y óxido nítrico se realizó a partir de biopsias de cuello uterino sin ningún aditivo las cuales se homogenizaron y procesaron siguiendo el protocolo a continuación descrito:

1. Descongelar la muestra y colocarla en el fondo de un tubo Eppendorf de 1,5cc.
2. Agregarle 0,5cc de buffer fosfato salino (PBS) frío a Ph 7,4.
3. Homogenizar.
4. Centrifugar en centrifuga para Eppendorf por 20 minutos a toda velocidad.
5. Tomar el sobrenadante y colocarlo en otro tubo Eppendorf, de allí se tomaron 2 alícuotas: una para determinación de proteínas y otra para óxido nítrico.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY

Fundamento

Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. En el cual se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la solución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas:

1. Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídico. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a

participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

2. La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso

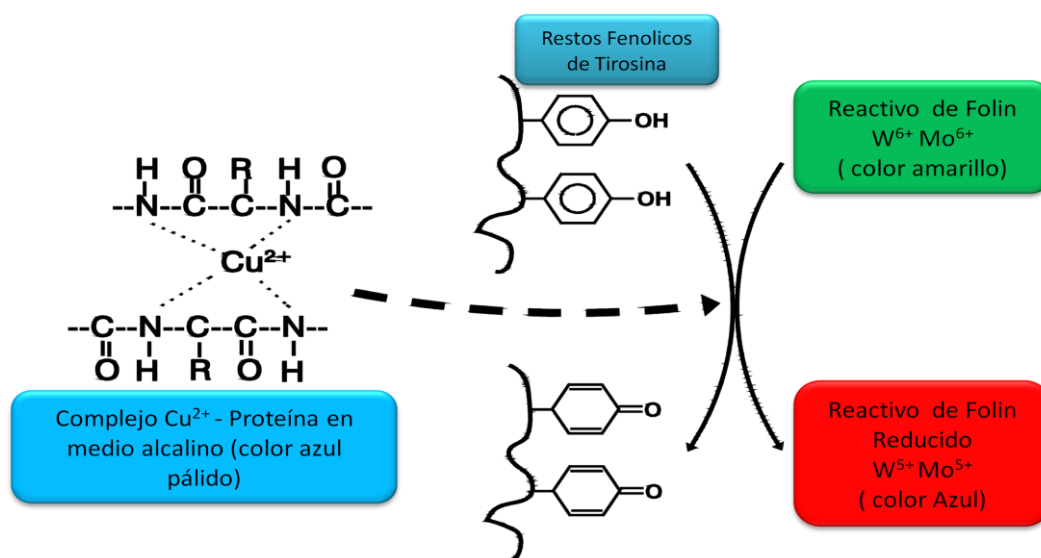


Figura 18 Fundamento Método Lowry. Carrero Y, 2012

Preparación de Reactivos:

- Estándar de Albúmina 1mg/ml.

Solución A:

- Solución (X): Mezclar 0.5grs de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{SO}_4\text{Cu}_5\text{H}_2\text{O}$) al 0.5%, con 1gr de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) al 1%, llevar a 100ml con agua destilada.

- Solución (Y): Mezclar 10grs de carbonato de sodio (CO_3Na_2), al 2% con 2grs de hidróxido de sodio (NaOH), 0.1N, llevar a 500ml con agua destilada.

Posteriormente mezclar (X+Y) en relación 1:50 .Las soluciones deben prepararse 15 minutos antes de agregarlas y mezclarlas inmediatamente, así mismo es importante señalar que esta solución no debe tener más de un mes de preparada.

Solución B:

- Mezclar el folin en una relación 1:1 con agua destilada. Debe prepararse 45 minutos antes de agregar, agitar inmediatamente.

Preparación de la Curva Estándar:

Procedimiento:

1. Numerar del 1 al 8 tubos de plástico de 10 ml .
2. Pipetear las cantidades de agua, solución patrón de albúmina (1mg/ml), solución A y solución B señaladas en la tabla.
3. Marcar 2 tubos blancos (B), y agregar 200ul de agua destilada, 1ul de solución A y 100 de solución B a ambos.
4. El resto de los tubos se le agregan diferentes cantidades de agua y albúmina sin variar los volúmenes de solución A y solución B.
5. Leer la absorbancia en el colorímetro a 570nm, posteriormente multiplicar las absorbancias por el factor de dilución respectivo.
6. Representar las absorbancias de los tubos estándares frente a los mg de proteínas previamente calculados y determinar la concentración de proteínas en las

muestras al interpolar sus absorbancias con las concentraciones de los estándares expresando el resultado en mg/ml.

Seguidamente se procedió a la determinación de óxido nítrico utilizando el "Kit" Bioassay Systems QuantiChrom Nitric Oxide Assay (DINO-250), para la valoración de óxido nítrico en suero y tejido de cuello uterino. Este "kit" se basa en la medición del óxido nítrico producido a nivel endógeno, mediante reducción de nitrato a nitrito usando el método de Griess. (**Griess, 1879**) Se aplica para la determinación de óxido nítrico en plasma, suero, orina, tejido, células y alimentos. Así como, para la investigación de drogas o en farmacología para conocer los efectos de las drogas en el metabolismo del NO.

FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN DE GRIESS.

El fundamento del método se basa en que en un medio a pH fisiológico, 2 moléculas de NO reaccionan con 1 molécula de O_2 , generando 1 molécula de nitrito y 1 molécula de nitrato. Cada molécula de nitrito presente en la muestra reacciona con una amina y se produce su diazotización. El producto se acopla para producir un azocromógeno de color púrpura que posee un pico de absorbancia de 540 nm .

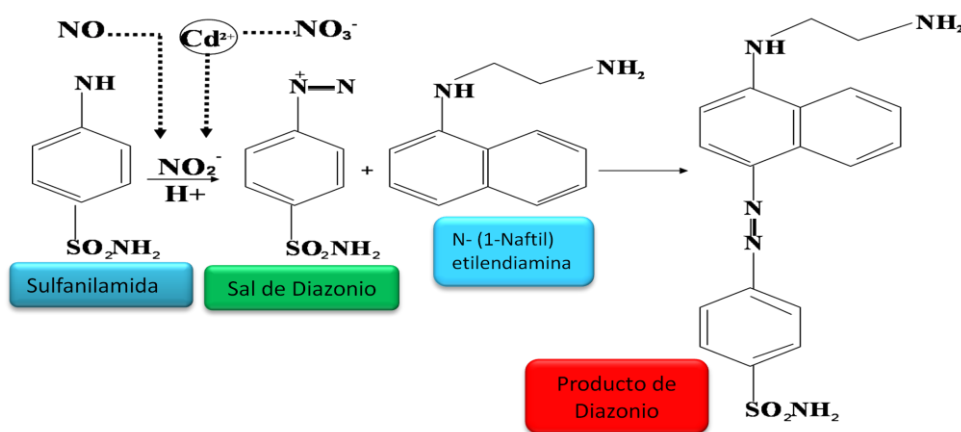


Figura 19 Fundamento Reacción de Griess. Carrero Y, 2012

Preparación de los reactivos.

Los reactivos requeridos se prepararon siguiendo las instrucciones de Quantichrom Nitric Oxide Assay Kit (DINO-250), para la determinación de los metabolitos Nitrato/Nitrito.

1. Se preparo una disolución de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) 20x
2. Luego se preparo una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) 30x a 1x llevando 367ul de NaOH a 10.633 ul con agua destilada,
3. Consecutivamente se preparo el buffer de activación mezclando 25ml 3x en 50ml de agua destilada,
4. La pre-mezcla para los estándares, se preparo al mezclar 30ul del estándar de nitrito (1.0mM), llevar a 600ul con agua destilada.

Desproteínización:

La desproteínización es requerida para suero, plasma y otras muestras proteínicas.

Añadir a las proteínas del sobrenadante 80 ul de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) y centrifugar por 5 minutos a 1400 rpm.

Luego, transferir el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 120 ul de hidróxido de sodio (NaOH), si ocurre de nuevo precipitación transferir 210 ul de sobrenadante y agregar 70 ul de buffer glicina. Si la solución permanece clara en estos pasos no se requiere desproteínización, transferir directamente 210 ul de muestra y 70 ul de buffer glicina.

Activación del cadmio (Cd) :

La cantidad de gránulos de cadmio usado es de tres por muestra. Los gránulos de Cd se transfieren a un tubo centrífuga de 50 ml y se lavan tres veces con agua. Luego se remueve el residuo de agua con una pipeta.

Posteriormente, se agregan 200 ul de buffer de activación diluido a los gránulos y se incuban 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo se lavan tres veces con agua, el cadmio activado debe ser usado dentro de 20 minutos. Pasado dicho tiempo se lavan con HCl 0,1 N por 5 minutos, luego se lavan tres veces con agua destilada y para reactivar se utiliza el mismo procedimiento de activación.

Una vez incubadas las muestras por 15 min. a temperatura ambiente con los gránulos de cadmio, se transfieren por duplicado, 100 ul de las muestras a una placa de microtitulación de 96 pozos. Seguidamente se agregan 50 ul del reactivo A y 50 ul del reactivo B incubándose por 5 min. a temperatura ambiente . Las densidades ópticas se determinaron a 540 nm mediante el equipo Micro Elisa Organon Tecnica Microwell System Modelo 530 y los resultados se expresaron en Umol/ L.

Cálculos:

Las concentraciones de oxido nítrico se obtienen al restar la densidad óptica del blanco a la densidad óptica de la muestra dividido por el "slope" que se determina

por regresión lineal de los estándares y multiplicado por el factor de dilución. La concentración de NO de las muestras es calculado de la siguiente manera:

$$\text{NO} = \frac{\text{OD sample} - \text{OD blank}}{\text{Slope}} \times n \text{ (}\mu\text{M)}$$

Donde:

OD sample: Densidad óptica de la muestra.

OD blank: Densidad óptica del blanco.

n: Factor de dilución.

Figura 20. Fórmula para el cálculo de concentración de oxido nítrico. Quantichrom Nitric Oxide Assay Kit

III.1.10.4 DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VPH MEDIANTE IDENTIFICACIÓN

GEONÓMICA:

III.1.10.4.1 EXTRACCIÓN DEL ADN.

Para la extracción del ADN viral se utilizó el "kit" VPH Promega. DNA Purification (Promega BioSystems.USA) mediante el siguiente procedimiento: se añadió 1,5 ml de solución salina fisiológica al hisopo donde se encuentra la muestra y se mezcló en el vórtex por 1 min, el contenido se trasvasó a un tubo Eppendorf de 1,5 ml limpio y estéril y se centrifugó durante 10 min en una microcentrifuga a 14.000 rpm. Se incluyó con cada serie de muestras un control negativo, constituido por 1 ml de buffer salino y se procesó igual que el resto de las muestras. Luego se descartó

el sobrenadante con una pipeta dejando aproximadamente 40 ul de pellet y se le agregó a cada tubo 600 ul de solución de lisis y 12 ul de proteinasa k, se mezcló e incubó en baño de maría a 56 °C por 3 horas.

Finalizada esta incubación se le agregó a cada tubo 3 ul de una solución de ARNasa, mezclando 25 veces por inversión e incubando durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se le agregó a cada tubo 200 ul de solución de precipitación de proteínas y se mezcló por 20 segundos en vórtex hasta homogenizar el contenido, colocándolos posteriormente en hielo por 5 min, y luego se centrifugó cada tubo por 3 min a 14000 rpm. Seguido de esto se transfirió el sobrenadante a tubos limpios y se le agregó 600 ul de isopropanol como agente precipitante, mezclando cada tubo 50 veces por inversión y centrifugándolos por un minuto a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante por inversión, y se le agregó 600 ul de etanol al 70% mezclándolos por inversión y centrifugándolos por un minuto a 14000 rpm. Nuevamente se descartó el sobrenadante por inversión y se dejó secar el pellet por 15 minutos a temperatura ambiente y luego unos minutos en estufa a 37 °C. Una vez que los tubos estuvieron completamente secos se les agregó 100 ul de solución de hidratación o agua de PCR, se dejaron los tubos a temperatura ambiente toda la noche y luego se guardaron a -20 °C hasta su procesamiento.

III.1.10.4.2.- REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DEL ADN

En esta etapa se utilizó la técnica de PCR donde se amplificó un fragmento de unos 450 pb dentro de la región L1 del marco abierto de lectura (ORF) del virus del VPH.

Para la reacción de PCR se incubaron 10 ul de ADN con los siguientes reactivos:

MEZCLA DE REACCIÓN	CANTIDAD
Dntp' s (100 mM)	0.4 ul
Primer MY09	1.0 ul
Primer MY011	1.0 ul
Beta – Globina	0.8 ul
Buffer 10X	6.25 ul
Mgcl ₂ (50mM)	6.0 ul
Taq. Polimerasa (5 U/ul	0.5 ul
H ₂ O	24.85 ul

Tabla 4 Mezcla de Reacción PCR. Protocolo L.R.R.V, 2006

Una vez obtenida la mezcla final se colocaron los tubos en el termociclador (Gene amp PCR systems 2400 de Applied biosystems) donde se llevo a cabo la PCR en 40 ciclos programados de la siguiente manera:

- 1.- Etapa inicial de desnaturalización: 94 °C x 2 minutos, seguida de 40 ciclos
- 2.- Etapa de desnaturalización: 94 °C x 1 minuto.
- 3.- Etapa de anillamiento: 55 °C x 1.5 minutos.
- 4.- Etapa de extensión: 72 °C x 2 minutos.
- 5.- Etapa de extensión final: 72 °C x 10 minutos.

II.1.10.4.3 VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.

Una vez amplificado el material extraído se procedió a tomar 10 ul del mismo y se mezclaron con 2 µl de solución de carga conformada por azul de bromotimol. Este procedimiento se realizó sobre la superficie de un papel parafinado y luego fue cargado en un gel de agarosa al 2 % el cual fue teñido

con bromuro de etidio que presentaba una concentración de 10mg/ml se utilizaron (0,6 µL), se usó el marcador de peso molecular Weight Marker VIII (Boehringer Mannheim) (0,5 µL), la corrida se realizó con el buffer Tris-Borato-Edta (TBE1X), utilizando un equipo de electroforesis Power PAC 3000 de BioR, se programó el regulador de voltaje a 100 voltios, 500 amperes con un tiempo de 60 min.

El revelado se realizó al colocar el gel en el Trans-iluminador (modelo UVTM-25) mediante luz ultra-violeta (U.V). Los geles fueron fotografiados para determinar la presencia de infección por VPH. Se observó solo una banda correspondiente al control interno de 1200 pares de bases (pb) en los casos negativos, en los casos positivos al VPH, además de la banda del control interno se observó otra banda de 450 pb correspondiente al ADN del virus, y la ausencia de bandas en las muestras inhibidas.

III.1.10.4.4 TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Se utilizó la prueba, DNA test de Captura de Híbrido 2 (DIGENE). Es una prueba in vitro de hibridación de ácido nucleico con amplificación de señal que utiliza la detección cualitativa por quimioluminiscencia de 18 tipos de ADN del VPH. Las muestras que contienen el ADN objetivo se hibrida con un cóctel de sonda de ARN específico para VPH. Los híbridos ADN: ARN resultantes se capturan en la superficie de un pocillo de microplaca cubierto con anticuerpos específicos para híbridos ADN: ARN. Los híbridos inmovilizados se hacen reaccionar con anticuerpos conjugados de fosfatasa alcalina específicos para híbridos ADN: ARN, y se detectan con un sustrato quimioluminiscente. Varias moléculas de fosfatasa alcalina se conjugan con cada anticuerpo. Varios anticuerpos conjugados se unen a cada

híbrido capturado y el resultado es una amplificación considerable de señal. A medida que el sustrato se divide por la acción de la fosfatasa alcalina, la luz se emite y se mide como unidades de luz relativa en un luminómetro. La intensidad de luz emitida denota la presencia o ausencia del ADN objetivo en la muestra.

Una medida de unidades de luz relativa igual o mayor al valor de corte (CO) indica la presencia de las secuencias de ADN de VPH en la muestra. Una medida de unidades de luz relativa menor al valor de corte indica la ausencia de las secuencias específicas del ADN de VPH o niveles de ADN de VPH por debajo del límite de detección del ensayo.

Esta prueba puede identificar entre dos grupos de ADN de VPH: los tipos de VPH de bajo riesgo 6/ 11/42/ 43/ 44; y los tipos de VPH con riesgo intermedio/ alto 16/ 18/ 31/ 33/ 35/ 39/ 45/ 51/ 52/ 56/ 58/ 59/ 68, pero no determina el tipo de VPH específico presente.

III.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el programa Prisma de la compañía Graphpad para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos luego del procesamiento de las muestras. Se contó el número células positivas por campo de 400X de biopsias de cuello uterino (15 campos aprox). Las células positivas se contaron tanto en el estroma como en el epitelio y se obtuvo el promedio de células observadas por campo. Los resultados se presentan como promedio \pm 1 desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando el promedio de células positivas para anión Superóxido, quimiocinas, VEGF y células infiltrantes entre los grupos de sujetos

estudiados (casos vs. controles). Los análisis comparativos se realizaron usando ANOVA más post test de Bonferroni o la T de “strudent” no pareada, de acuerdo a los grupos analizar. Se consideran significativos los valores de $p < 0.05$

III.3. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.

La principal fuente de información ha sido la base de datos *Medline*, accesible en la siguiente dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>. Se trata de la base más completa, fiable y rigurosa de que se dispone en biomedicina, de gran cobertura y bien estructurada. La búsqueda se realizó mediante la introducción de palabras claves en inglés, seleccionando los artículos de las revistas de mayor impacto dentro del tema que nos ocupa. En algunos casos se realizó introduciendo el nombre del primer autor firmante de artículos de gran impacto relacionados con el tema en estudio, revisando sus publicaciones hasta la actualidad.



IV.- RESULTADOS

IV.1 INFILTRACION LEUCOCITARIA: DETERMINACION DE LINFOCITOS (CD3), NEUTROFILOS (RIIB/CD16) Y MACROFAGOS EN TEJIDO DE CUELLO UTERINO DE PACIENTES CON NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DEL CUELLO UTERINO, CONTROLES Y TEJIDO INFLAMATORIO

El estudio Inmunohistológico permitió evidenciar la infiltración de linfocitos (CD3), neutrófilos (RIIB/CD16b) y macrófagos tanto en epitelio como en el estroma del tejido uterino relacionado con el tipo de lesión que presentaban las pacientes.

La figura 21 muestra el número de células CD3, RIIB/CD16 y macrófagos positivos en epitelio y estroma de pacientes con lesiones intraepiteliales y controles. Es importante señalar que el número de linfocitos se incremento a medida que avanzaba el grado de lesión (A y B), encontrándose diferencia significativa ($p < 0.001$) entre NIC III con respecto al grupo control y NIC I tanto en epitelio como en estroma cervical. Las figuras C y D muestran el número de neutrófilos (RIIB/C16b) tanto en epitelio como estroma cervical. A nivel del epitelio el grupo control (0.57 ± 0.53), NIC I (0.65 ± 0.61), NICII (1.25 ± 0.5) y NICIII (0.16 ± 0.40), sin diferencias significativas y a nivel de estroma no se observaron células positivas en los grados de lesión NIC II y NICIII. El número de macrófagos distribuidos tanto en epitelio como estroma cervical de acuerdo al grado de lesión se observan en las figuras E y F, en ambos casos el número de células en los diferentes tipos de lesión no fue estadísticamente significativo.

De igual forma se comparo en epitelio y estroma cervical el número de células CD3, RIIB/CD16 y macrófagos positivos en los pacientes controles, inflamatorios y

con lesión (Figura 22). El número de CD3 en epitelio mostró una diferencia significativa ($p < 0.0106$) al comparar el grupo de pacientes con inflamación (16.49 ± 5.14) vs Control (6.85 ± 6.79). Los pacientes con lesión preinvasiva (16.49 ± 10.99) no mostraron diferencia significativa con los otros grupos (A). A nivel de estroma no se encontró diferencia significativa entre el grupo de pacientes con inflamación (11.57 ± 8.82) con respecto al grupo control (4.71 ± 1.89) y el grupo con lesión intraepitelial (15.81 ± 12.56) (B). El número de neutrófilos tanto en epitelio como en estroma cervical (Figuras C y D) en pacientes con inflamación vs. Control y pacientes con lesión, no mostró diferencias significativas en el número de células positivas para RIIIB/CD16b en cada uno de estos grupos

En los pacientes con inflamación el número de macrófagos en epitelio cervical (2.07 ± 1.4) no presentó diferencias significativas en relación a los pacientes con lesión intraepitelial (1.81 ± 1.21) y el grupo control (1.87 ± 1.06) (E). De igual forma en el estroma cervical el grupo inflamatorio (2.35 ± 2.1) vs. (2.2 ± 1.19) y (1.57 ± 0.97) de los grupos con lesión y control respectivamente no presentó significancia estadística. (F)

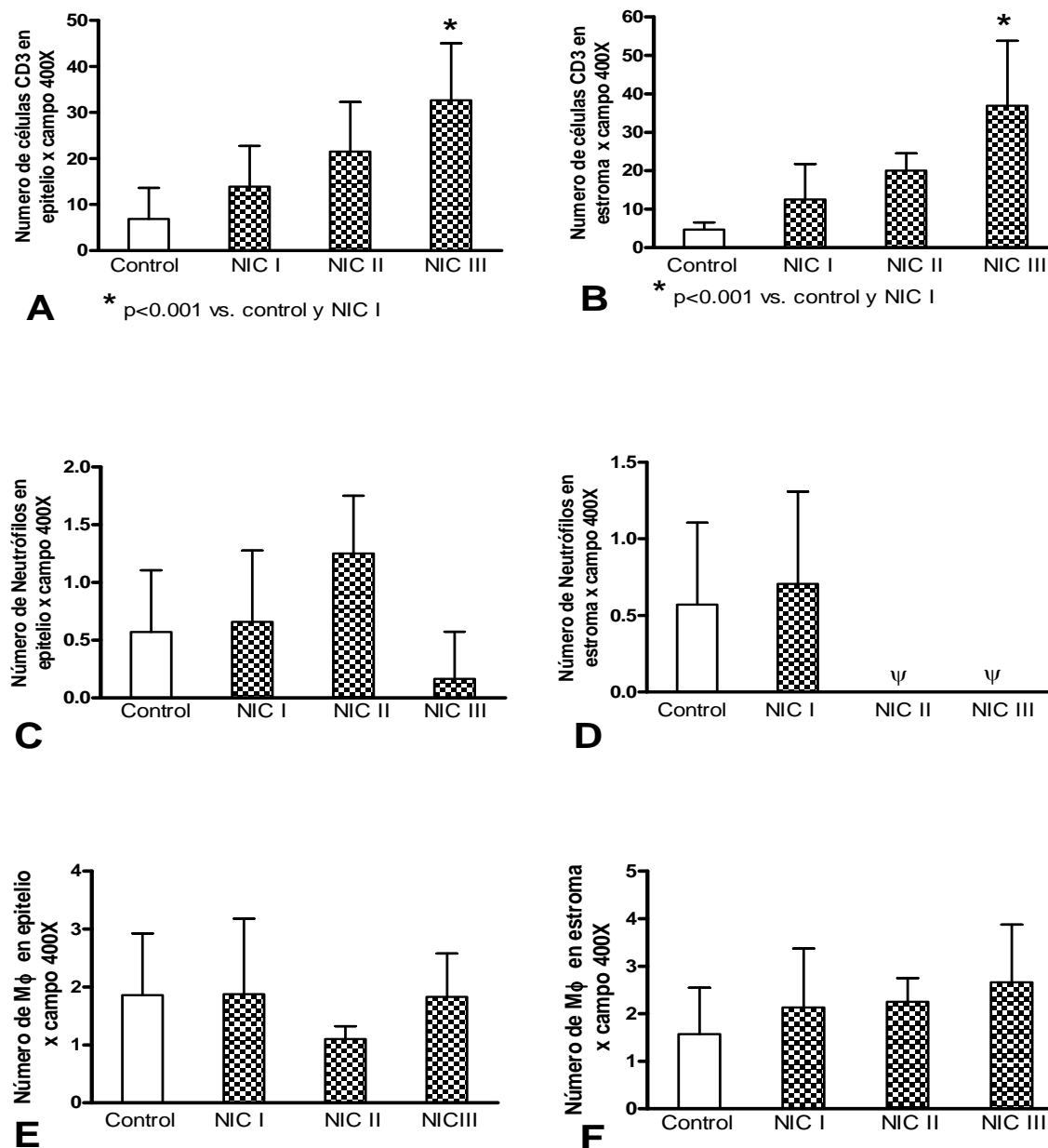


Figura 21. Número de células positivas para CD3, RIIB/CD16 y macrófagos en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y controles en epitelio y estroma. Se observa incremento progresivo de células CD3 positivas a medida que aumenta el grado de lesión intraepitelial (A y B). Los neutrófilos en epitelio no mostraron diferencia significativa al comparar los grupos (C). En estroma no se encontraron células positivas en las pacientes con NIC II y NIC III (D). En epitelio y estroma el número de macrófagos en los diferentes tipos de lesión y controles no fue estadísticamente significativo. (E y F)

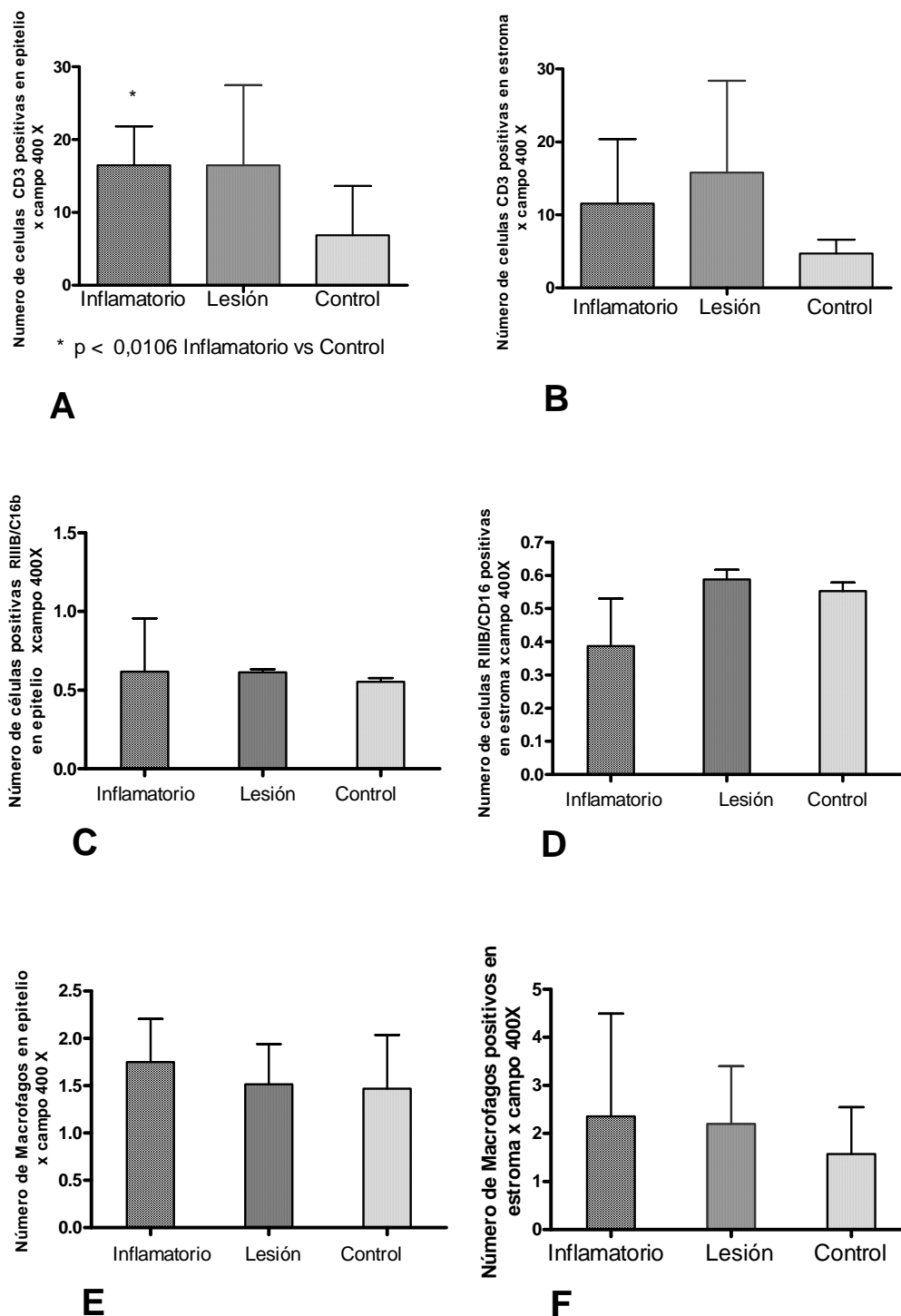


Figura 22. Número de células CD3, RIIIB/CD16 y macrófagos en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC), controles y tejidos de pacientes con procesos inflamatorios en epitelio y estroma. Se observó diferencia significativa en epitelio ($p < 0.0106$) al comparar el grupo de tejidos inflamatorios vs control (A). En estroma el número de células CD3 positivas tanto en el grupo lesión como en los controles e inflamatorio no mostró significancia estadística (B). El número de células RIIIB/CD16 en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical, controles y pacientes con procesos inflamatorios, no mostró diferencia significativa cuando se compararon los grupos tanto en epitelio (C) como en estroma (D). Los macrófagos no mostraron significancia ni en epitelio (E) como en estroma (F)

IV.2 EXPRESIÓN DE MIP-1 α , MCP1, IL8 Y VEGF EN TEJIDO DE CUELLO UTERINO DE PACIENTES CON LESION INTRAEPITELIAL DEL CUELLO UTERINO Y CONTROLES.

La figura 23 muestra un incremento en la expresión de CD3 tanto en epitelio como en estroma en relación con la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical. Se encontró una diferencia significativa $p < 0,01$ NIC III vs control y NIC I (A y D). Los valores de la expresión de MCP-1 e IL-8 se encontraron aumentados y no se asociaron con la progresión de las neoplasias en epitelio y estroma. (B, C, E y F) Cuando se analizó la coexpresión de quimiocinas y el tipo de leucocitos se encontró incrementado el número de CD3/MCP-1 y CD3/IL-8 en los NIC (Figura 24 C y E). Se encontró un bajo número de células CD3 que expresaran MCP-1 o IL-8 en los controles (Figura 24). El porcentaje de CD3/MCP-1 se redujo en la neoplasia intraepitelial cervical, mientras que CD3/IL-8 aumentó en las neoplasias intraepitelial cervical (Figura 24). La figura 25 muestra la inmunofluorescencia de la coexpresión de CD3/quimiocinas. La figura 26 muestra que no hubo un aumento significativo de los macrófagos expresando MCP-1 o IL-8 en los NICs. La quimiocina MIP-1 se expresó de manera similar tanto en las lesiones intraepiteliales como en los controles y no se observó un aumento significativo de leucocitos expresando MIP-1. (Figura 27). La figura 28 muestra el porcentaje de células mononucleares/quimiocinas durante la neoplasia intraepitelial cervical. El porcentaje de células CD3/MCP1 y macrófago/MCP1 se observaron disminuidas durante la evolución de los NICs (A), sin embargo la expresión de CD3/IL-8 se incrementó durante las neoplasias. (B). La expresión de MCP-1, IL-8 y MIP-1 en epitelio y estroma distribuidos en tejidos inflamatorios, lesión intraepitelial y control se muestra en la figura 29. La expresión de MCP1 tanto en epitelio (A) como en estroma (B)

mostro diferencia significativa entre el grupo control vs inflamatorio y lesión intraepitelial. La IL-8 en epitelio (C) no mostro significancia, mientras que en estroma (D) se encontró diferencias entre el grupo inflamatorio y lesión intraepitelial. La expresión de MIP-1 se mostro significativamente aumentada en epitelio (E) y estroma (F) de los pacientes con inflamación.

La figura 30 muestra la expresión del VEGF en epitelio cervical de acuerdo al tipo de lesión y en el control (A). Se encontró diferencias significativas ($p < 0.001$) entre NIC I y el grupo control, ($p < 0.001$) y entre NICII y NICIII ($p < 0.001$) con respecto a NICI y el control. El número de células que expresaron VEGF se incremento a medida que aumentaba el grado de lesión. La expresión del VEGF en estroma (B) se comporto de manera similar que en epitelio con aumento de acuerdo al grado lesión, sin embargo en el grupo control ninguna célula expreso el factor.

Cuando se analizo la expresión de VEGF en epitelio cervical entre el grupo inflamatorio vs. pacientes con lesión no resulto significativo, a diferencia del grupo control vs el grupo inflamatorio con una diferencia significativa $p < 0.04$ (Figura 31 A). La figura 31B muestra la expresión del VEGF en estroma cervical, el cual fue significativo cuando se estudio el grupo inflamatorio vs. pacientes con lesión ($p < 0.0105$), no se incluyo el análisis con respecto al grupo control ya que ningún paciente expreso VEGF.

La Figura 32 muestra la coexpresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y marcadores de leucocitos en la neoplasia intraepitelial cervical. Se observa aumento en el número de células CD3/VEGF (A y B). Los macrófagos ($M\phi$) / VEGF se observaron aumentados en el epitelio y el estroma de las muestras

cervicales (C y D). Sólo un bajo número de células CD3/VEG positivas se encontró en el epitelio del grupo control. Tanto en epitelio como en estroma los linfocitos como los macrófagos expresando VEGF aumentaron en relación a la evolución del NIC. La figura 33 muestra al microscopio en campo de inmunofluorescencia la coexpresión de CD3 con VEGF.

El total de células para marcadores leucocitarios y VEGF en relación al número de pacientes y a los controles se muestran en la Figura 34 donde se observa un aumento gradual de acuerdo a la evolución de la enfermedad del total de células VEGF, células CD3/VEGF, macrófagos (M ϕ) / VEGF, y las células no-CD3 o M ϕ / VEGF positivo en el epitelio (A) y en el estroma (B)

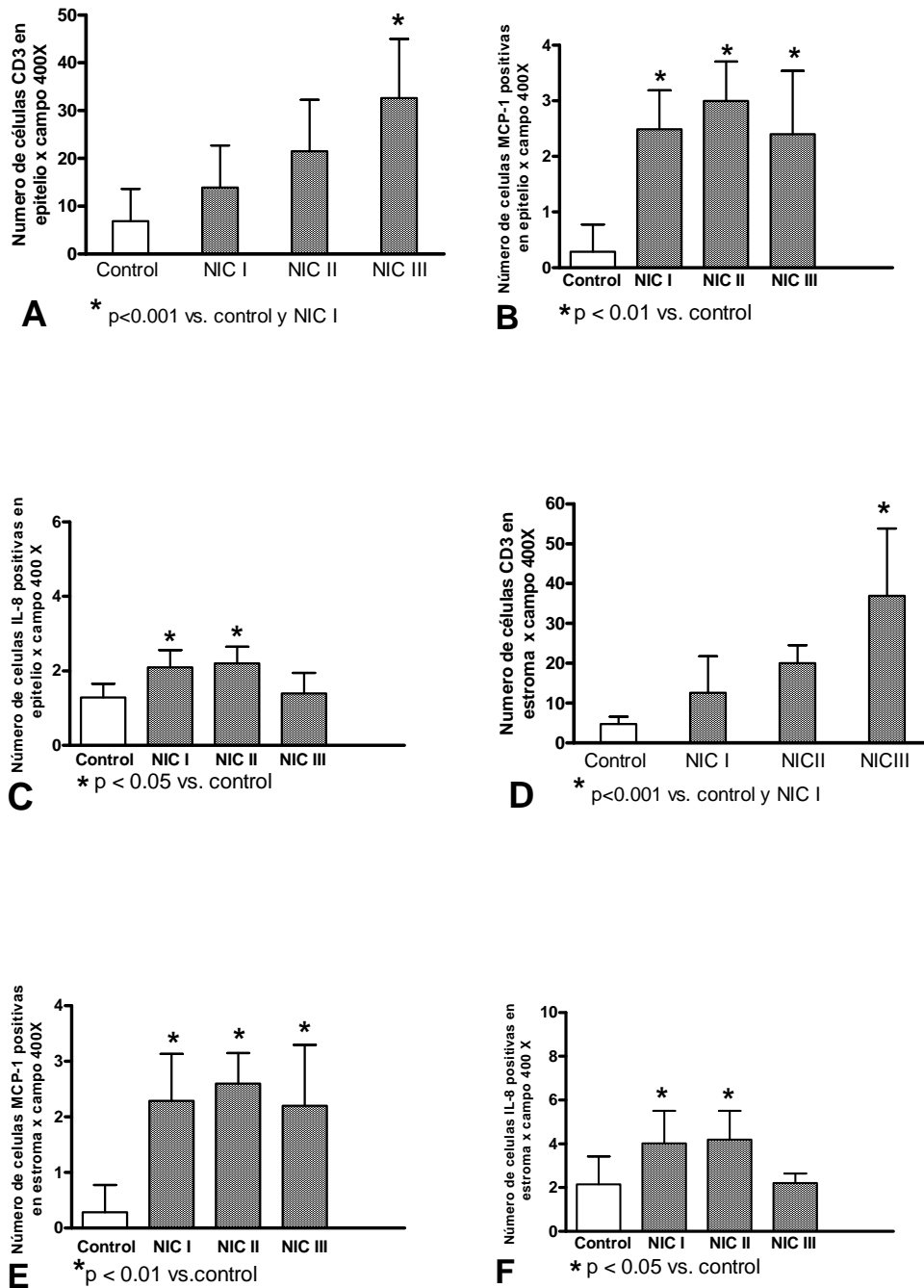


Figura 23 Expresión de células positivas para CD3, MCP-1 e IL-8 en epitelio y estroma de biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Se observa incremento progresivo de células CD3 positivas (A y D). Se aprecia incremento de MCP-1 en los NIC (B y E). La expresión de IL-8 se observó aumentada tanto en NIC I como NIC II (C y F).

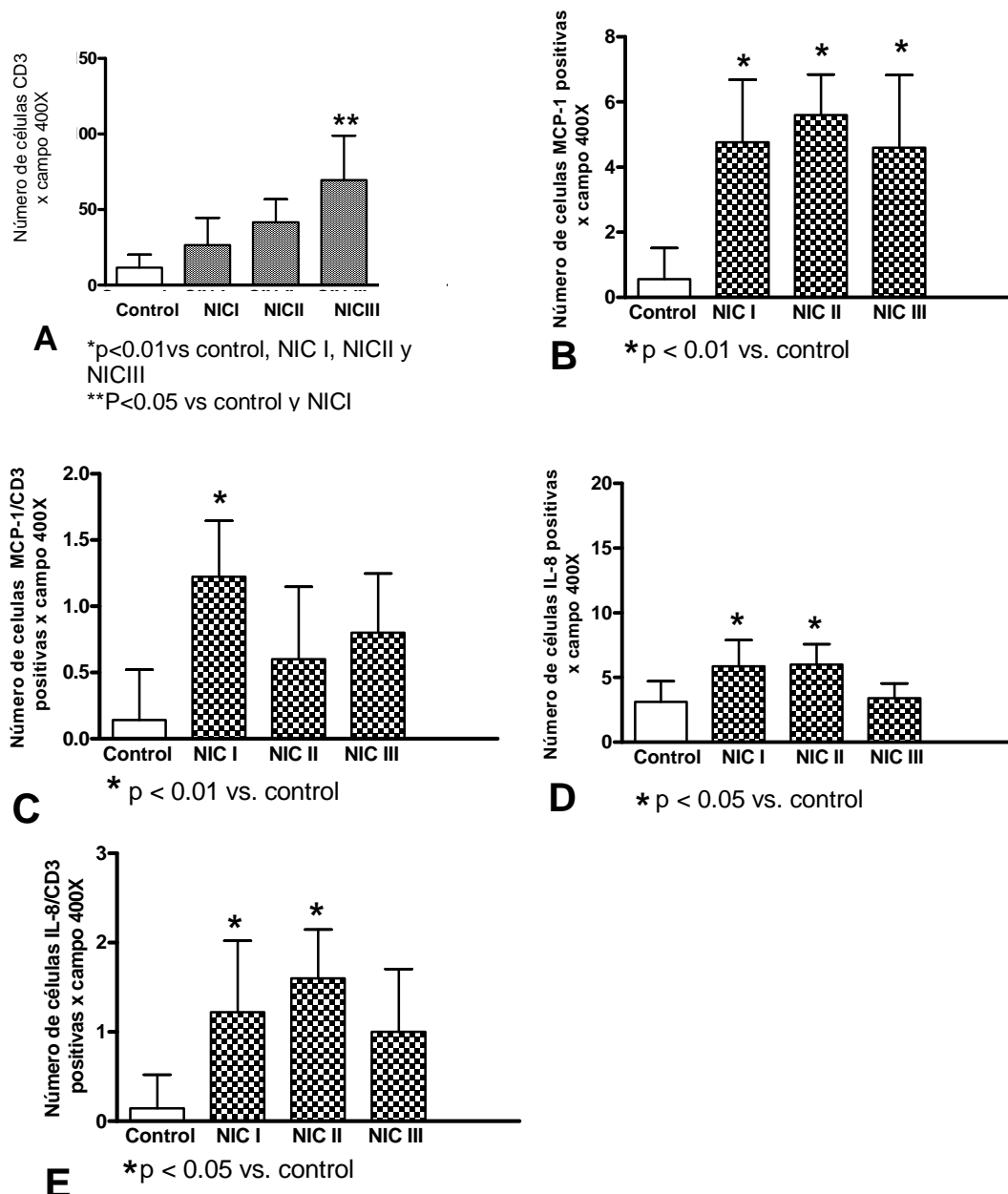


Figura 24. Expresión del número total de células CD3, MCP-1, IL-8, CD3/MCP-1 y CD3/IL-8 en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Se observa incremento progresivo de células CD3 positivas (A). Las células MCP-1 incrementaron en los NICs (B) y solo se encontraron incrementadas las células CD3/MCP-1 en NIC I (C). Se apreció incremento en células positivas para IL-8 en NIC I, II (D), encontrándose incremento de células CD3/IL-8 en los mismos estadios (E).

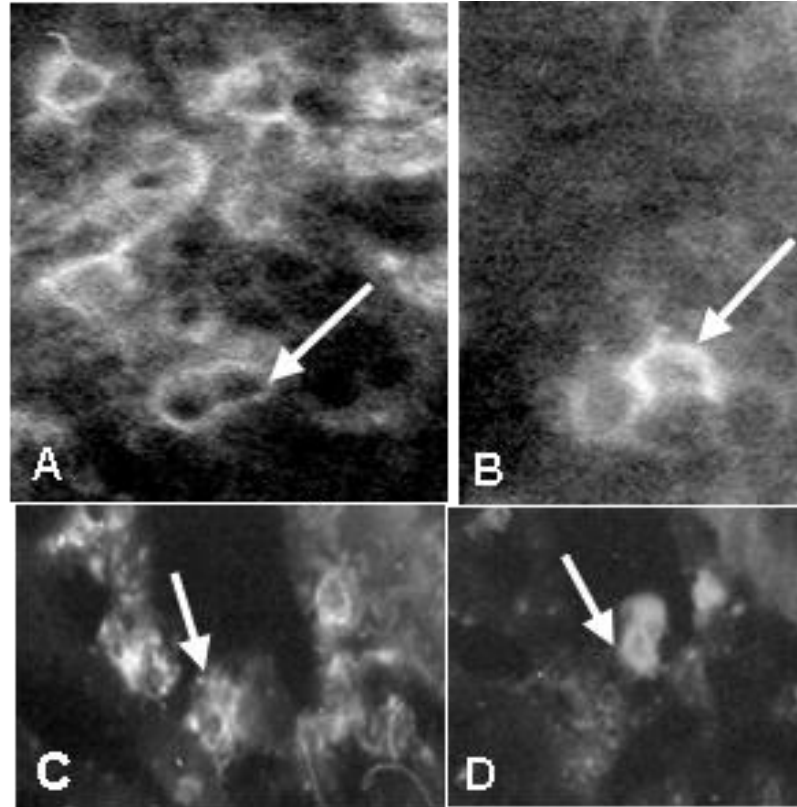


Figura 25 Inmunofluorescencia de la doble tinción anti CD3 y anti-quimiocina en biopsias de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical. La flecha en A indica células positivas para CD3 que a su vez son positivas para MCP-1 en B (flecha). La flecha en C indica célula positiva para CD3 que a su vez es positiva para IL-8 en D (flecha). Aumento original 400X.

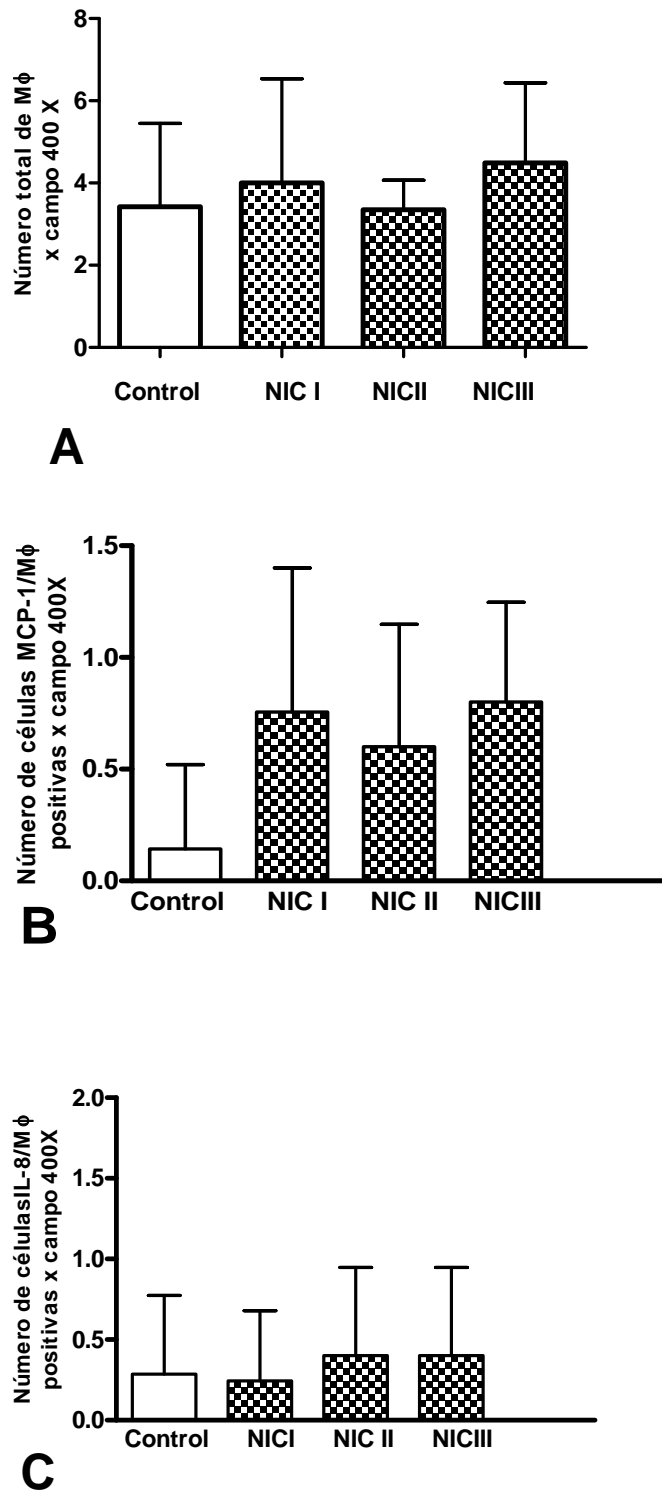


Figura 26 Expresión del número total de la infiltración por macrófagos (M ϕ), M ϕ /MCP-1 y M ϕ /IL-8 en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC). En general el número de células con fenotipo de macrófago expresando MIP-1 no fue significativo en los estadios estudiados (B y C).

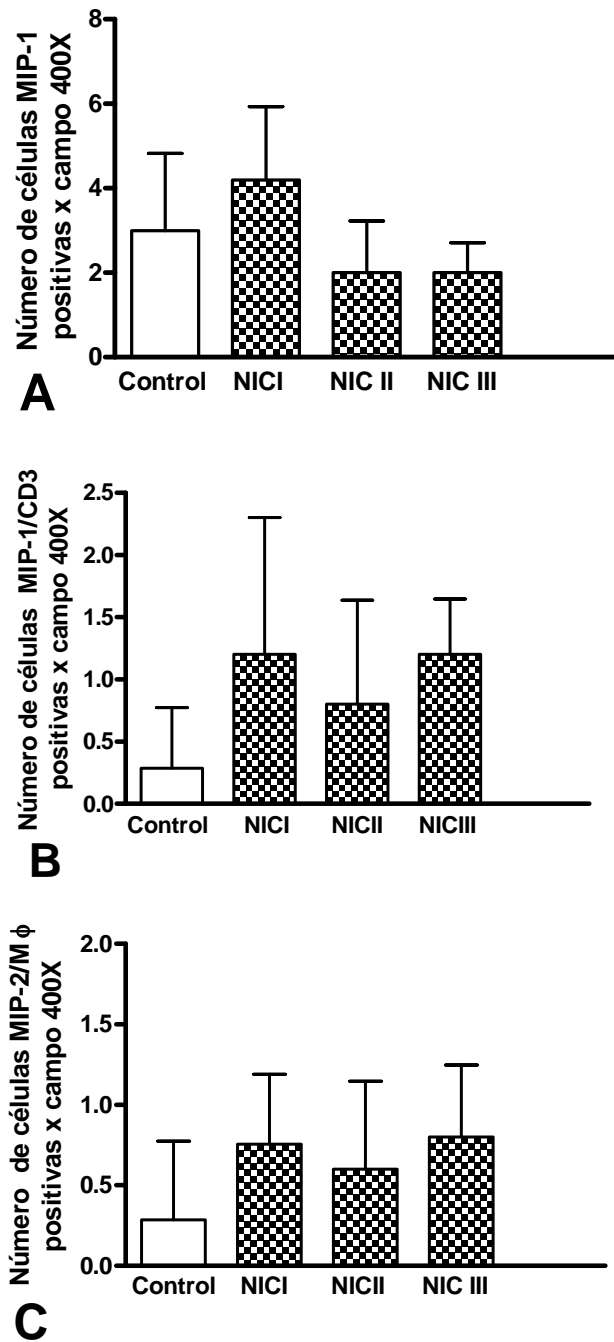


Figura 27. Expresión del número total de células MIP-1, CD3/MIP-1 y macrófagos (M Φ)/MIP-1 en biopsias con neoplasia intraepitelial cervical (NIC). No se encontró aumento significativo de la expresión de MIP-1 en ninguno de los estadios estudiados.

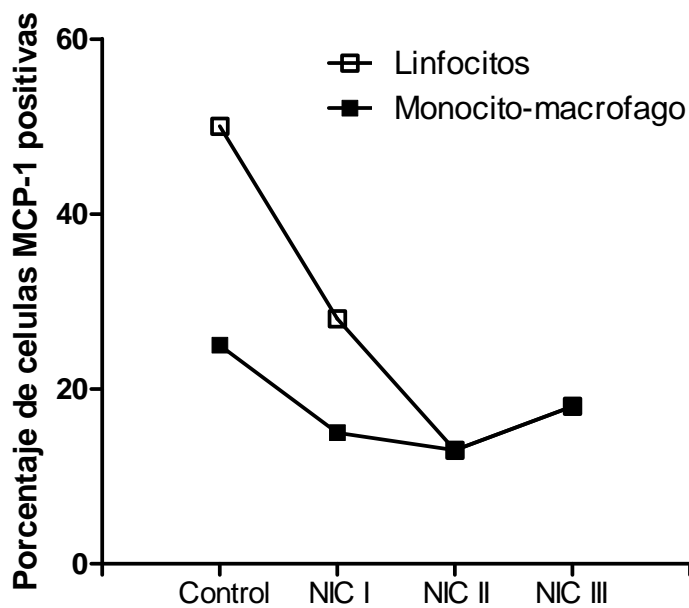
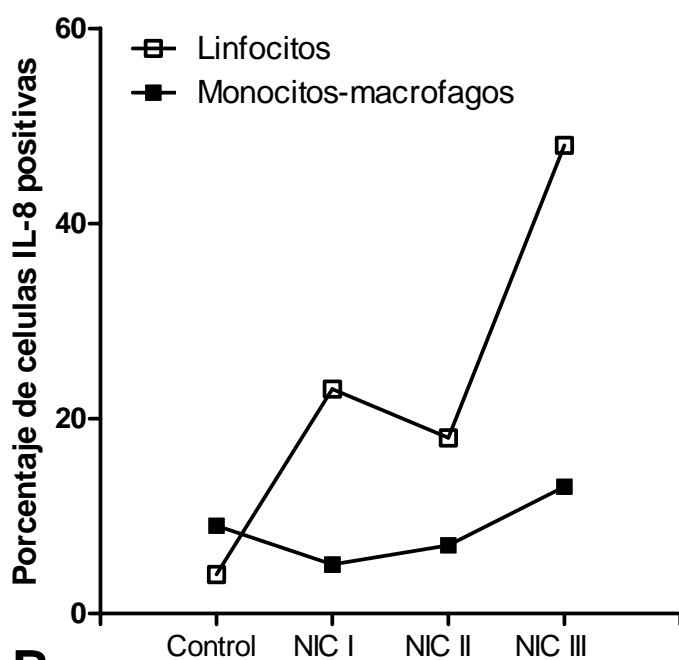
**A****B**

Figura 28 Porcentaje de células mononucleares/quimiocinas durante la neoplasia intraepitelial cervical. El porcentaje de células CD3/MCP1 y macrófago/MCP1 se observaron disminuidas durante los NICs (A), sin embargo el CD3/IL-8 se incrementó durante las neoplasias. (B)

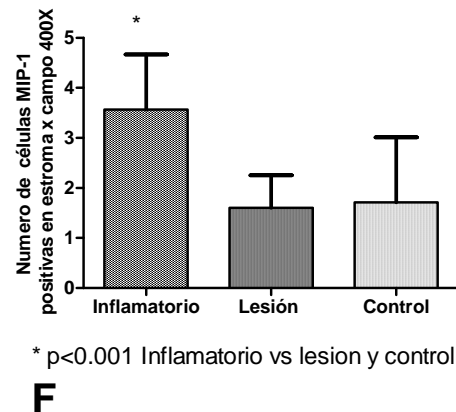
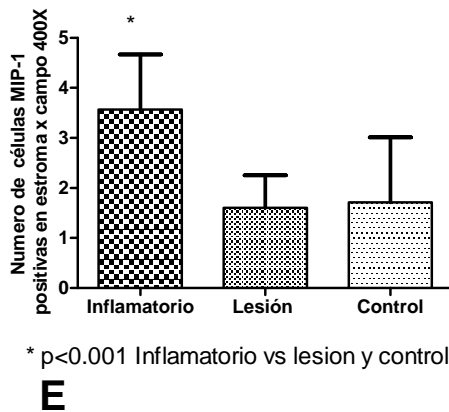
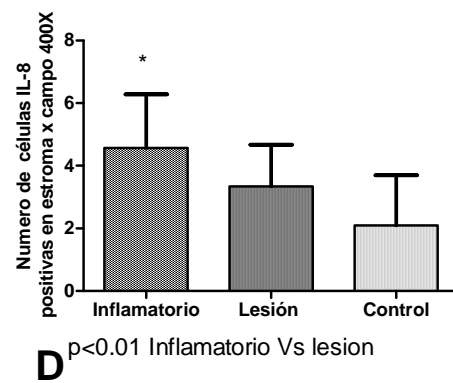
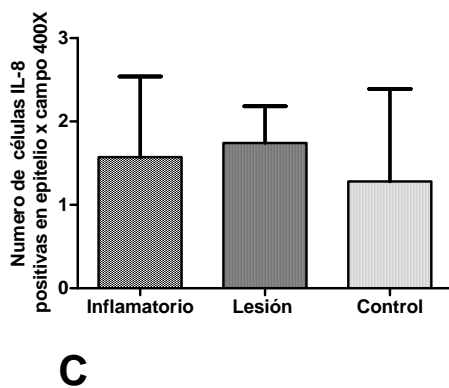
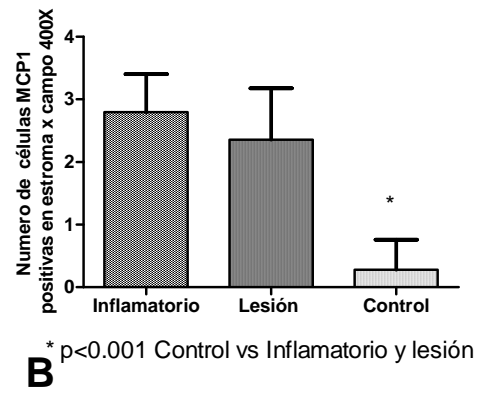
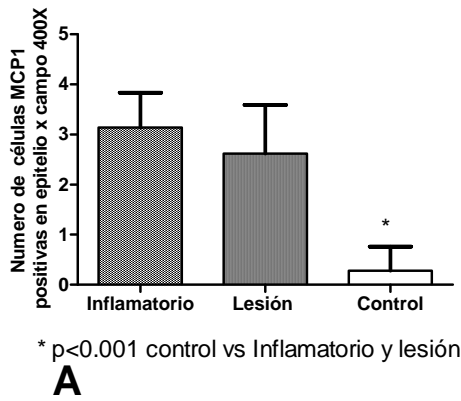


Figura 29 Expresión de MCP-1, IL-8, MIP-1 en epitelio y estroma distribuidos en tejidos inflamatorios, lesión intraepitelial y control. La expresión de MCP1 tanto en epitelio (A) como en estroma (B) mostro diferencia significativa entre el grupo control vs inflamatorio y lesión intraepitelial. La IL-8 en epitelio (C) no mostro significancia, mientras que en estroma (D) se encontró diferencias entre el grupo inflamatorio y lesión. La expresión de MIP-1 mostro aumento significativo en epitelio (E) y estroma (F) de los pacientes con lesión inflamatoria.

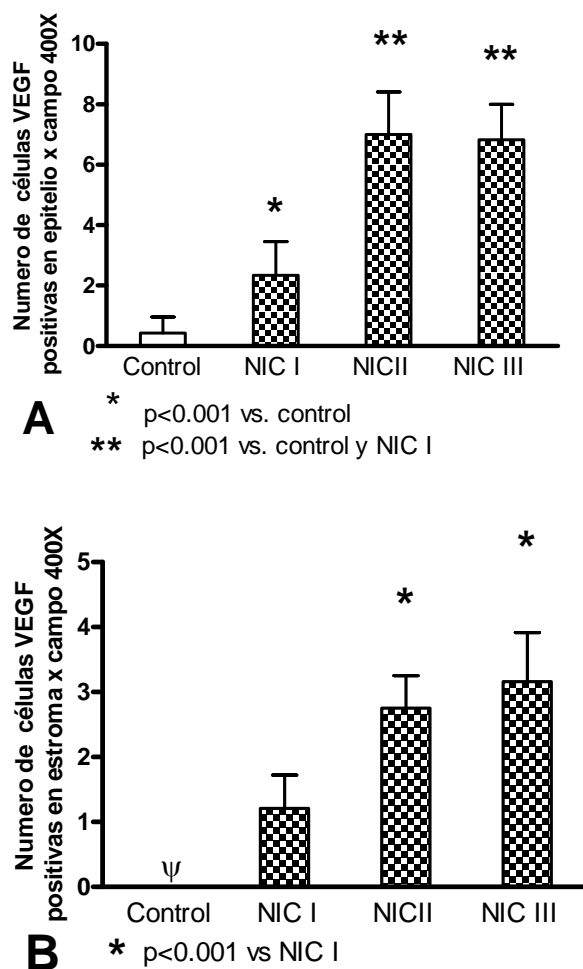


Figura 30 Expresión del VEGF en epitelio y estroma cervical de acuerdo al tipo de lesión y en controles. Se encontró diferencias significativas en epitelio (A) entre NIC I vs el grupo control, ($p<0.001$), NICII y NICIII con respecto al grupo NICI y control ($p<0.001$). El número de células que expresaron VEGF se incremento a medida que aumentaba el grado de lesión. La expresión del VEGF en estroma (B) se comporto de manera similar que en epitelio con aumento de acuerdo al grado lesión, sin embargo en el grupo control ninguna célula expreso el factor.

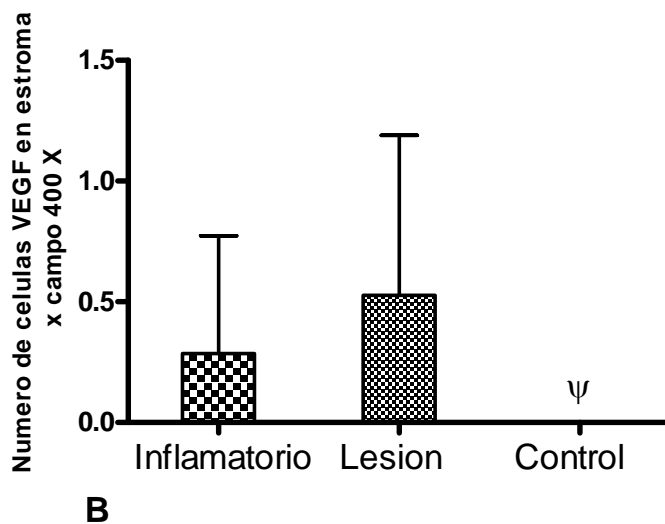
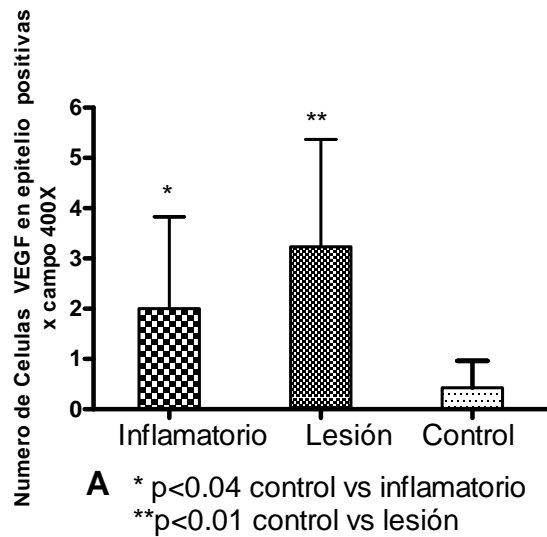


Figura 31 Expresión de VEGF en epitelio y estroma cervical entre el grupo inflamatorio, lesión intraepitelial y controles. Se observa diferencia entre grupo control vs el grupo inflamatorio con una diferencia significativa de $p < 0.04$ y entre el grupo control vs lesión ($p < 0.01$) (A). La figura B muestra la expresión del VEGF en estroma cervical, la cual fue significativa cuando se comparó el grupo inflamatorio vs. pacientes con lesión intraepitelial ($p < 0.0105$).

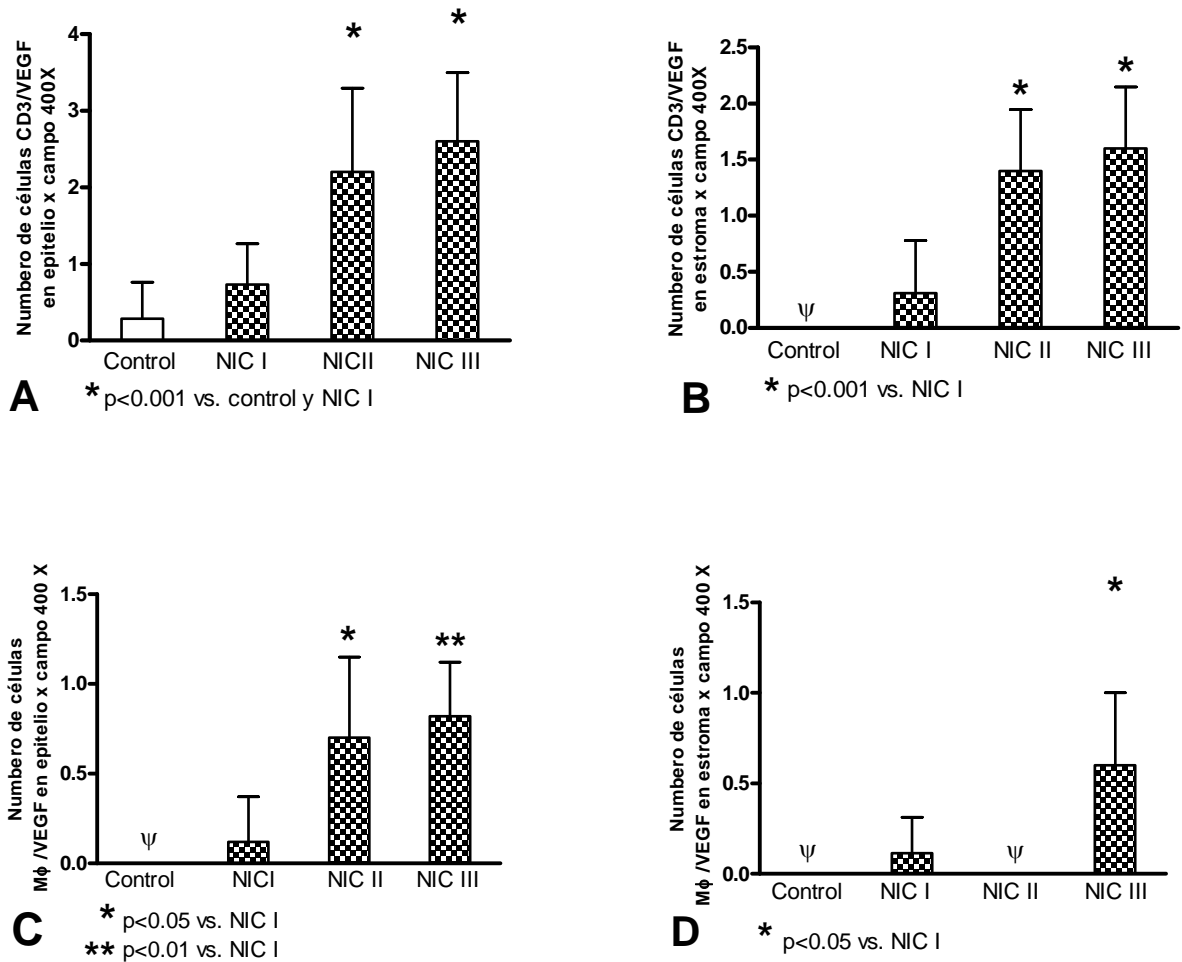


Figura 32 Coexpresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y marcadores de leucocitos en la neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Se observa aumento en el número de células CD3/VEGF (A y B). Los macrófagos (Mφ) / VEGF se observaron aumentados en el epitelio y el estroma de las muestras cervicales (C y D). Sólo un bajo número de células CD3/VEG positivas se encontró en el epitelio del grupo control. Tanto en epitelio como en estroma los linfocitos como los macrófagos expresando VEGF aumentaron en relación a la evolución del NIC.

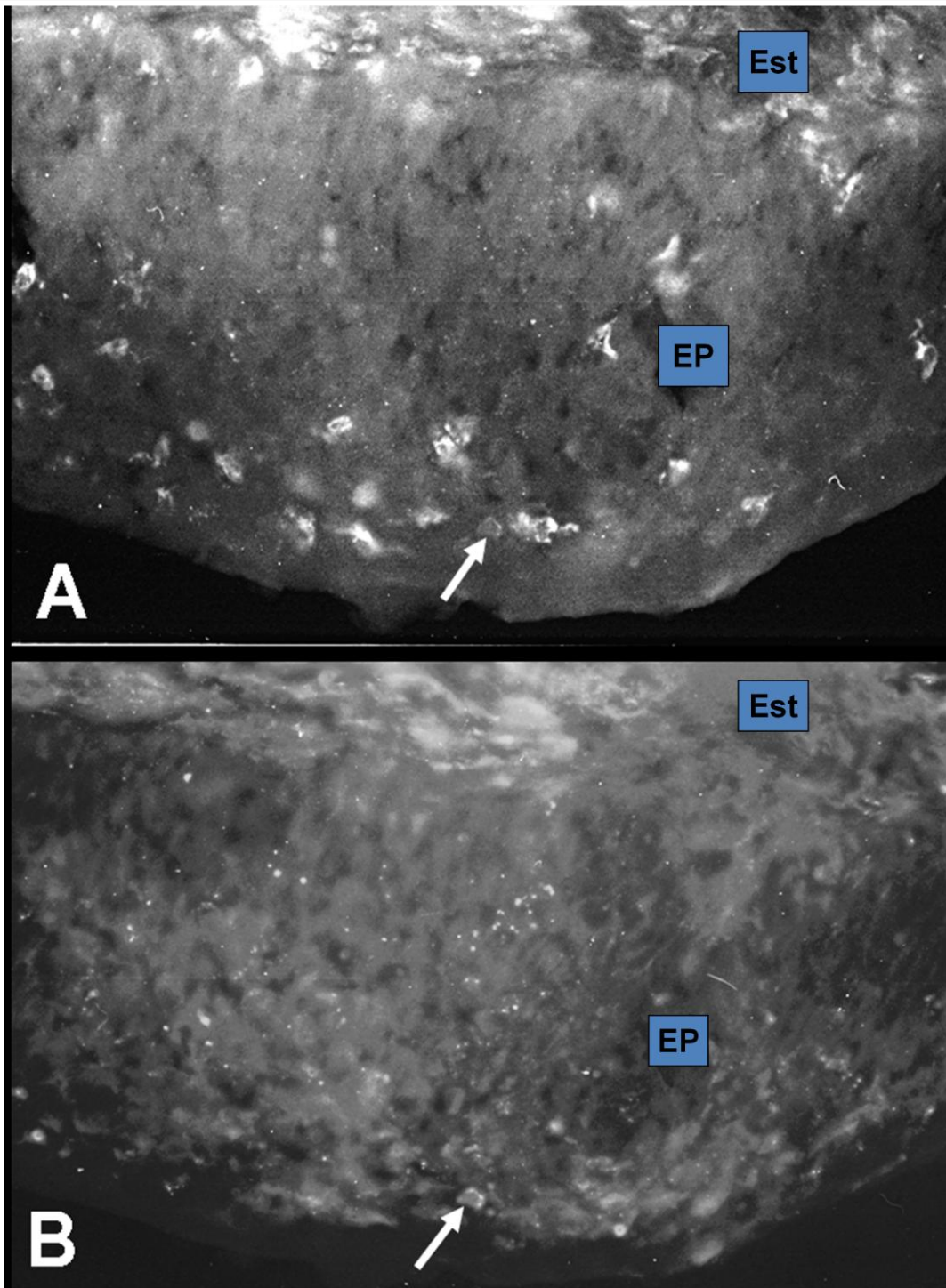


Figura 33. Doble marcaje para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y CD3 en tejido de cuello uterino de un paciente con NIC III. Se muestra una célula CD3-positiva en el panel A (flecha), la cual también fue positiva para el VEGF en el Panel B (flecha). Ep:Epitelio Est:Estroma

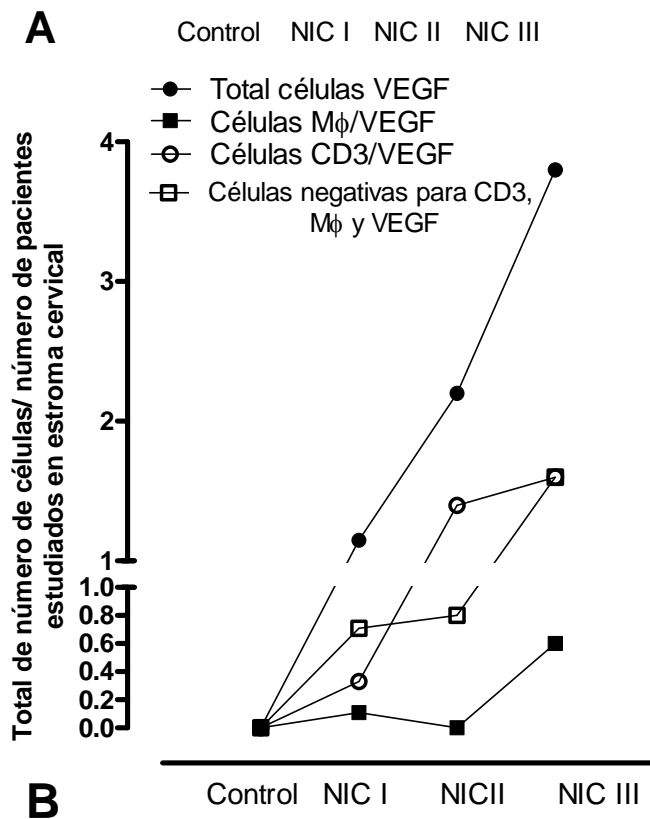
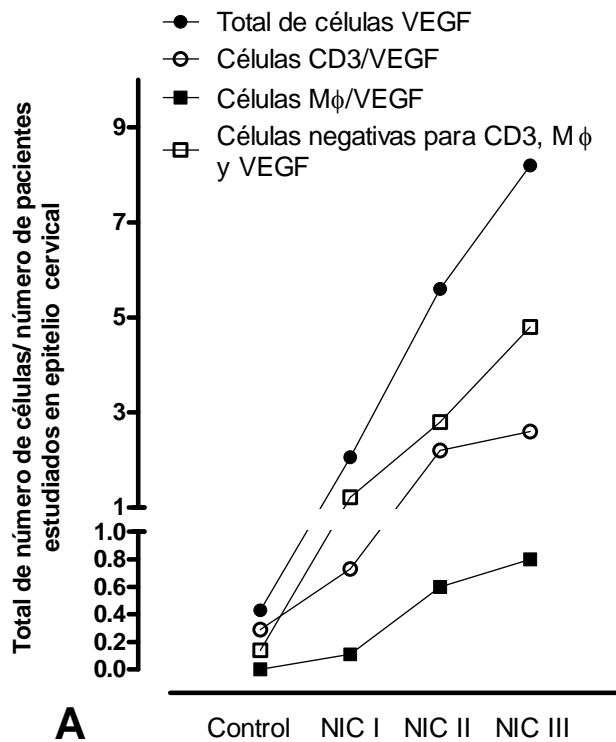


Figura 34. Total de células / número pacientes del grupo control y pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) Se observa un aumento del total de células VEGF, CD3/VEGF, macrófagos (M ϕ) / VEGF, y las células no-CD3 o M ϕ / VEGF positivas en el epitelio (A) y en el estroma (B) en relación con la evolución de la enfermedad

IV.3 DETERMINACION DE LA EXPRESIÓN DE ANION SUPEROXIDO ENTEJIDO DE CUELLO UTERINO DE PACIENTES CON LESION INTRAEPITELIAL DEL CUELLO UTERINO y CONTROLES

Al total de pacientes incluidas en el estudio se les determino la expresión tisular del anión superoxido (O_2^-) (Figura 35). Las figuras A y B muestran el número de células anión superoxido positivas en el epitelio y estroma cervical, cabe destacar que el número de células aumento conforme aumentaba el grado de lesión, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.001$) entre NICIII vs. el grupo control y NIC I tanto en epitelio como en estroma y diferencias ($p < 0.001$) entre NICII y el grupo control en estroma cervical. La figura 36 muestra la imagen microscópica de la reacción para determinar anión superoxido. No se encontró diferencia significativa cuando se comparo el grupo inflamatorio vs. La lesión intraepitelial y el control en epitelio y estroma cervical (Figura 37)

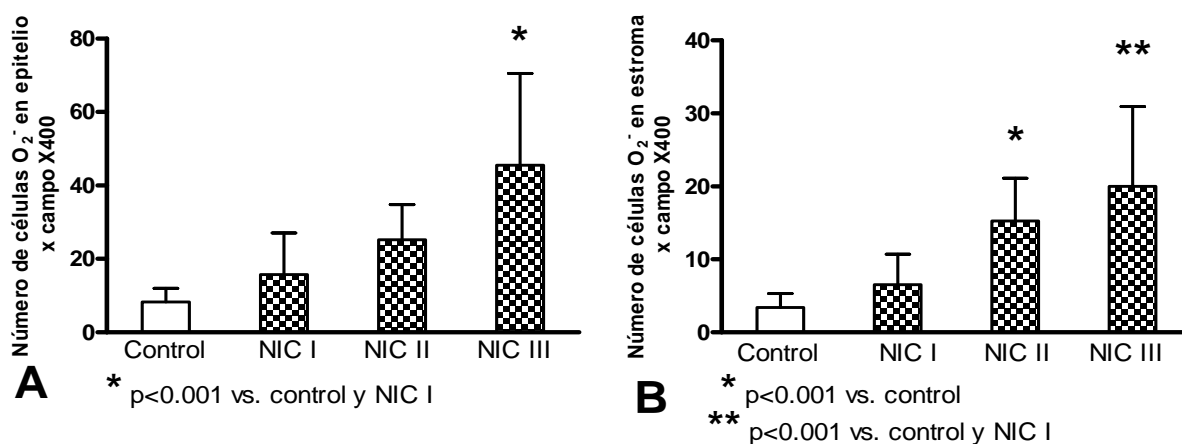


Figura 35 Células anión superoxido positivas en epitelio y estroma cervical. El número de células aumento conforme aumentaba el grado de lesión.

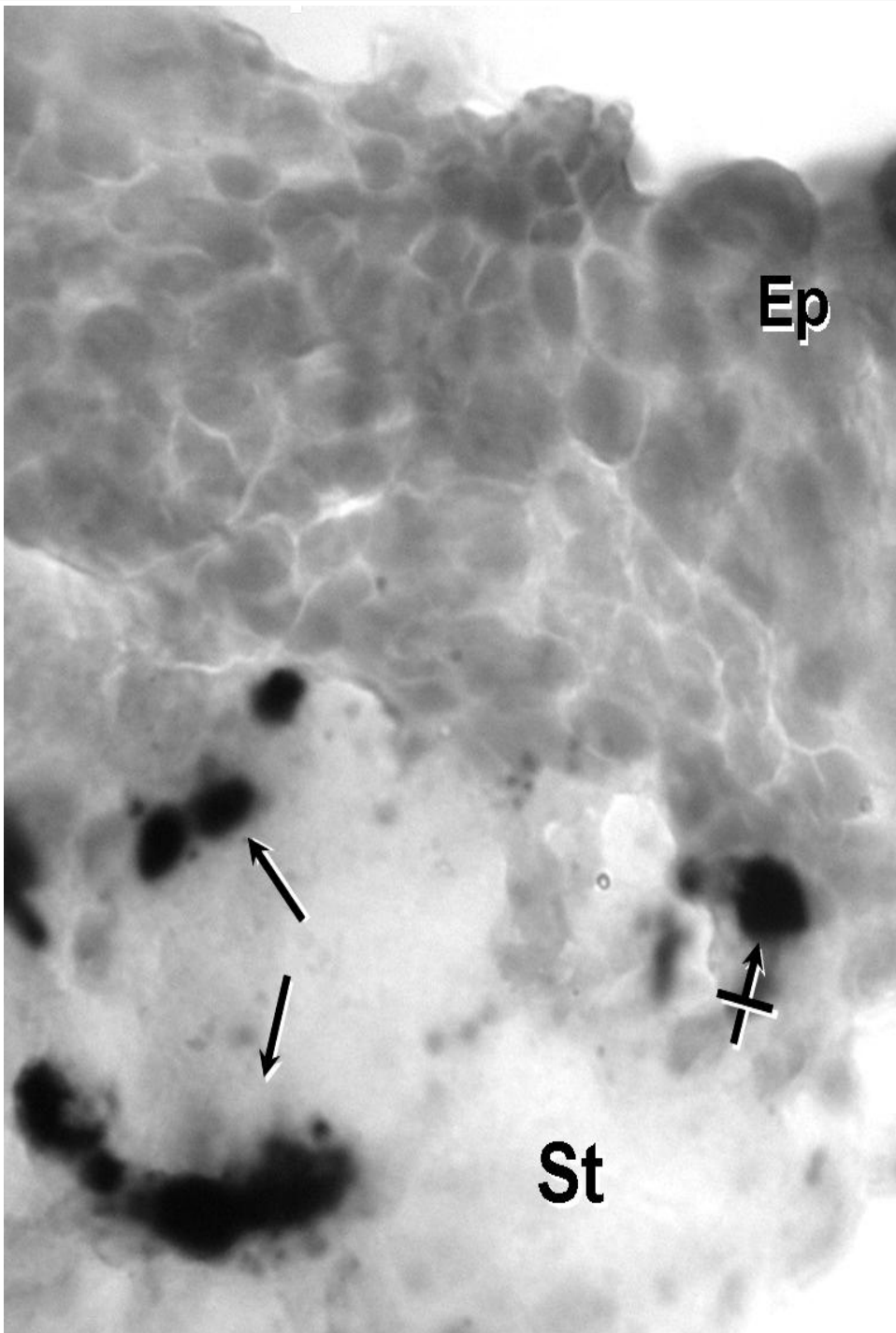


Figura 36 Expresión de anión superóxido en tejido cervical de un paciente con NIC II. La flecha en cruz señala célula positiva en epitelio (EP) y las flechas simples célula en estroma (St).

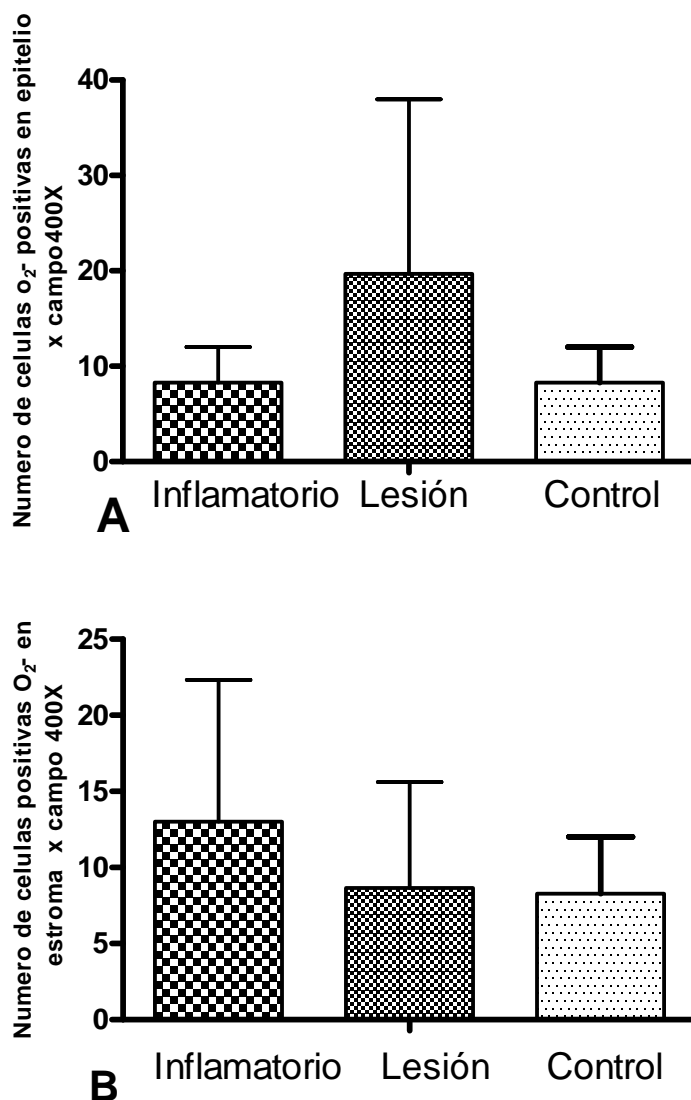


Figura 37 Número de células O₂⁻ en epitelio (A) y estroma (B) en tejido de cuello uterino de pacientes con inflamación, lesión intraepitelial y control.

IV.4 DETERMINACION DE OXIDO NITRICO EN TEJIDO DE CUELLO UTERINO DE PACIENTES CON LESION DEL CUELLO UTERINO y CONTROLES

La figura 38 muestra la concentración de nitrito/nitratos/ mg de proteínas en los diferentes espectros de lesión donde no se observaron diferencias significativas (A). No se apreció diferencia significativa al comparar los valores entre los pacientes con inflamación, con lesión intraepitelial y los controles (B).

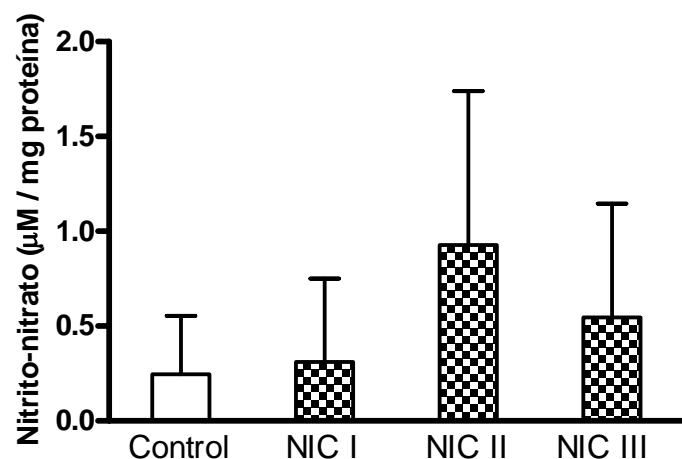
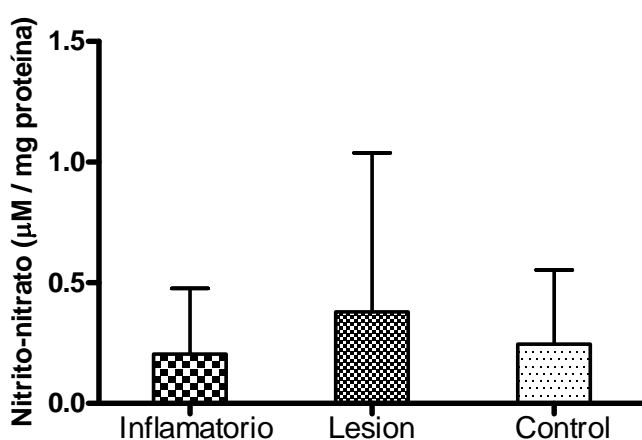
**A****B**

Figura 38 Concentración de Nitrito-Nitrato/mg de proteínas en pacientes con lesiones preinvasivas, procesos inflamatorios y control. No se observó diferencias significativas en la concentración de NO en los diferentes NICs (A). No se apreció diferencia significativa al comparar los valores entre los pacientes con inflamación, con lesión intraepitelial y los controles (B).

IV.5 DETERMINACION GENOMICA DE VPH

Del total de pacientes incluidas en el estudio 12 (17.39%) resultaron positivas para infección por VPH, los resultados obtenidos a través del análisis de las biopsias indicaron que el mayor porcentaje de infección por este virus se manifestó en las pacientes con un grado de lesión tipo NIC III 3/5 (60%) observándose una diferencia significativa ($p < 0,004$) con respecto a NIC I. (Tabla 5, Figura 39).

De las 12 muestras positivas por PCR, se genotipificaron 10 (83.3%) por híbrido de captura resultando un 60% de genotipos de alto riesgo oncogénico, es importante señalar que los genotipos de alto riesgo se encontraron en pacientes con lesiones tipo NIC II Y NICIII, mientras que en las pacientes NIC I e inflamatorio prevalecieron los genotipos de bajo riesgo. (Tabla 6)

La figura 40 muestra la expresión de CD3 en epitelio y estroma de acuerdo a la positividad o negatividad para la infección por VPH. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos VPH+ en epitelio (16 ± 12) y estroma (18 ± 8) y VPH -en epitelio (15 ± 12) y estroma (17 ± 11). De la misma forma el patrón de expresión de quimioquinas, VEGF y O_2^- no mostro significancia estadística cuando se compraron los grupos VPH positivos y negativos tanto en epitelio como en estroma. (Figura 41- 43)

	Controles	Inflamatorio	NIC I	NIC II	NIC III	Total
VPH Neg.	7	6	39	3	2	57
VPH post	0	1	6	2	3	12
Total	7	7	45	5	5	69

Tabla 5 Infección por el virus de papiloma humano en pacientes con lesiones intraepiteliales de cuello uterino, inflamación y controles

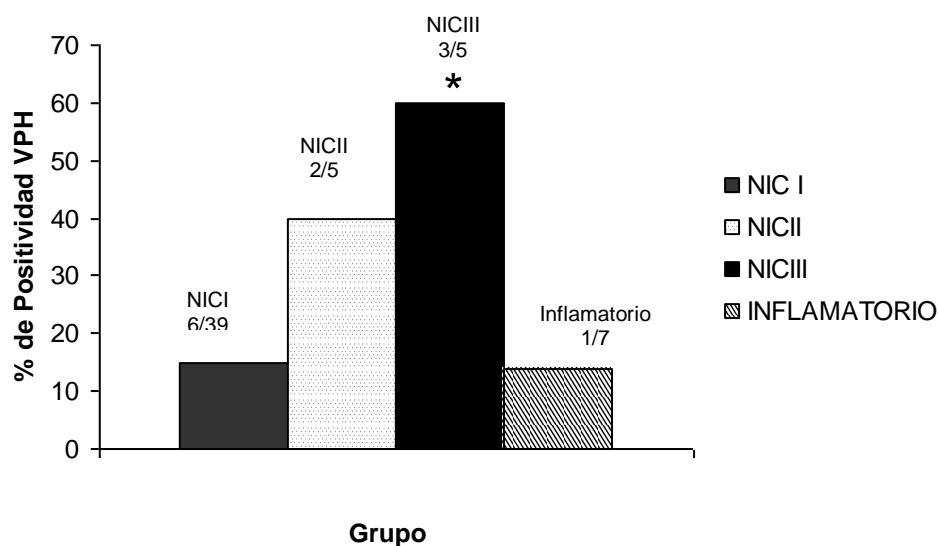


Figura 39 Pacientes VPH positivos de acuerdo al grado de lesión (NIC) y pacientes con inflamación. Diferencia significativa ($p < 0,04$) cuando se comparó el grupo de NIC III vs. NIC I. Los demás grupos sin diferencia significativa. Los controles no fueron positivos para VPH.

	Controles	Pacientes
VPH/Total de pacientes	0/7	12/69
Tipificación/Total VPH	0	10/12.
Tipos de VPH		Inflamatorio (n=1: Bajo Riesgo) NIC I (n=4: 3 Bajo riesgo, 1: Alto riesgo) NIC II (n=2: Alto riesgo) NIC III (n=3: Alto Riesgo)

Tabla 6 Genotipos de VPH en pacientes con lesiones intraepiteliales de cuello uterino, inflamación y controles.

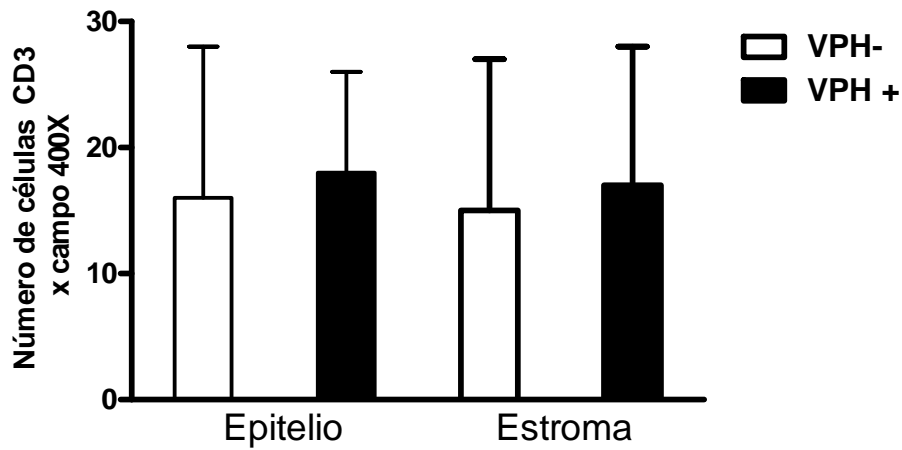


Figura 40 Expresión de células CD3 en epitelio y estroma de acuerdo a la infección por VPH. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos positivos y negativos.

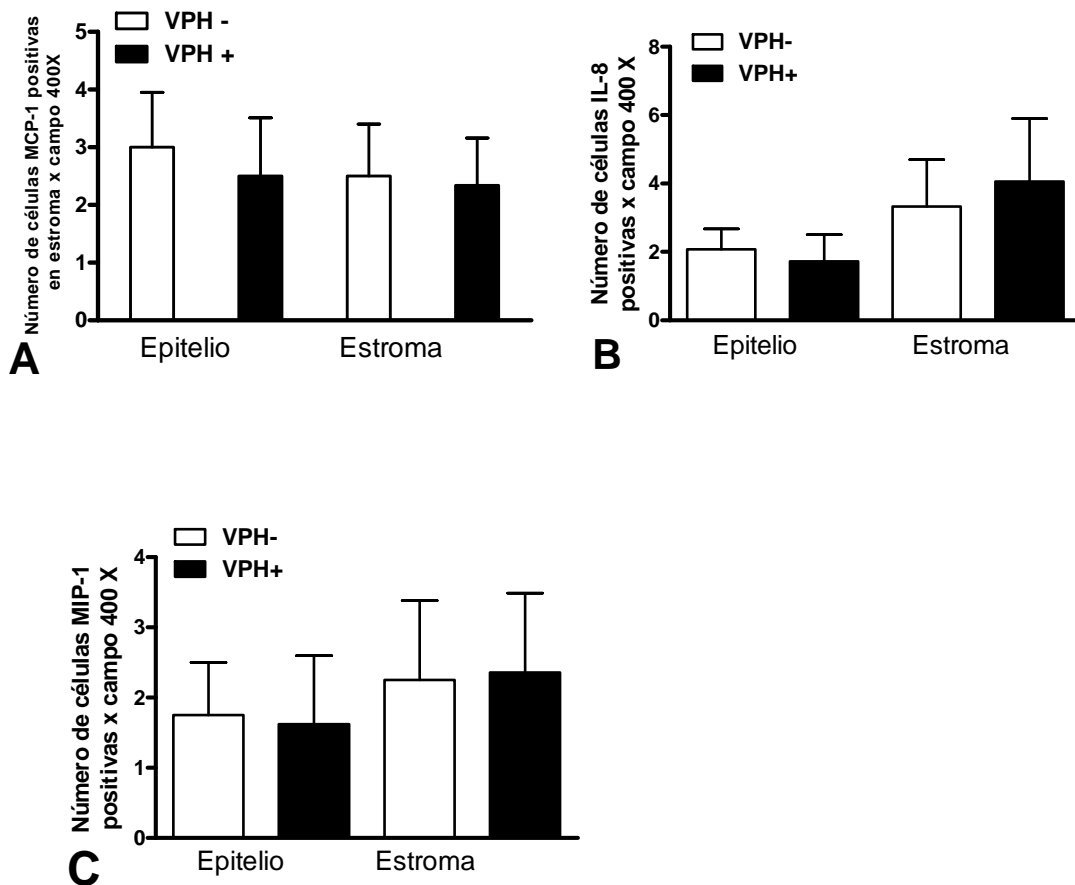


Figura 41 Células expresando quimioquinas: MCP-1 (A), IL-8 (B) y MIP-1(C) en epitelio y estroma de acuerdo a la infección por VPH. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos positivos y negativos.

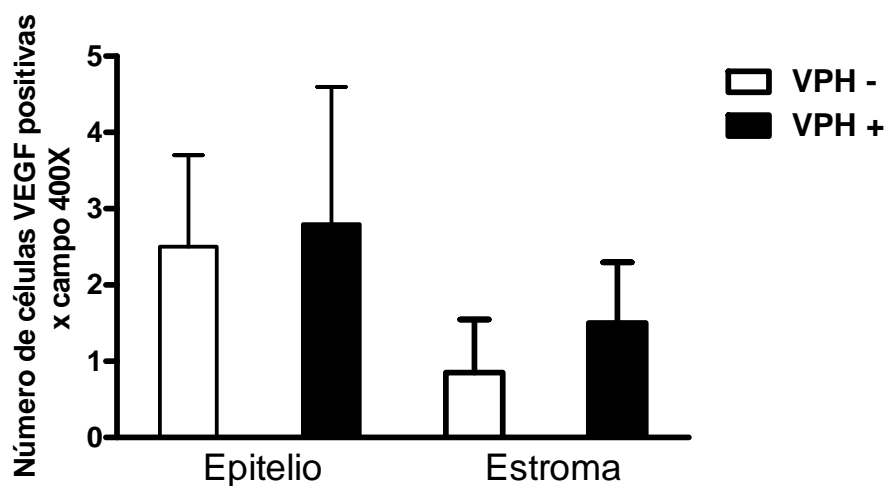


Figura 42 Expresión de VEGF en epitelio y estroma de acuerdo a la infección por VPH. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos positivos y negativos.

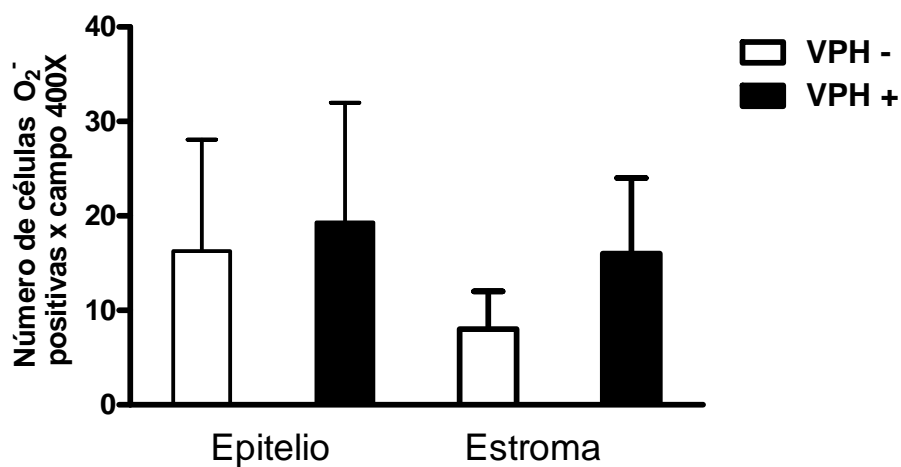


Figura 43 Expresión de células O₂ en epitelio y estroma de acuerdo a la infección por VPH. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos positivos y negativos.



V.- DISCUSIÓN

El Cáncer de cuello uterino representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo. Numerosas evidencias sugieren que la respuesta inmunitaria mediada por células es esencial para controlar tanto la infección por VPH como las neoplasias relacionadas con el virus (**Heintzelman D, 2000**). Así mismo se han involucrado otros factores como la producción de citocinas por las células tumorales, las cuales son generalmente angiogénicas.

La angiogénesis promueve el crecimiento y la supervivencia del tumor e influencia la migración de la célula y la metástasis del cáncer. El papel de la citocinas es la atracción de células inmunitarias al sitio del tumor. La migración de leucocitos circulantes al tumor es facilitada obviamente por dicha actividad angiogénica, pero puede ocurrir también la extravasación y la migración en el tejido fino circundante. La infiltración leucocitaria como consecuencia de la producción de estas citocinas, puede modular la diseminación del cáncer, bien sea promoviéndolo (daño oxidativo del ADN) o bien sea inhibiéndolo (Natural Killer, Linfocitos T Citotóxicos) (**Hashisuga T, 2001; Castle P 2004**). Estas células infiltrantes y las células intrínsecas del cuello pueden ser el origen de un metabolismo oxidativo aumentado, que puede modular el crecimiento tumoral (**Regus NP, 1997**)

Para comprender el proceso de malignización deben tomarse en cuenta numerosos factores que ocurren de manera conjunta y en una secuencia de eventos a lo largo del proceso inflamatorio y una vez que se inicia el proceso de transformación celular a nivel de cuello uterino tales como el infiltrado de leucocitos el cual está asociado al stress oxidativo y que se relaciona con la producción de factores proangiogénicos.

En el presente estudio se demostró un aumento en la infiltración de linfocitos (CD3) en muestras cervicales de pacientes con diferentes grados de neoplasia y pacientes con inflamación cuando se compararon con el control. La presencia de las células CD3 positivas pareciera estar asociada a la severidad de las lesiones cervicales sugiriendo que pudiesen tener un papel en la evolución de las displasias. No se observaron diferencias significativas en el número de neutrófilos y macrófagos infiltrantes en pacientes con diferentes grados de neoplasia y pacientes con inflamación cuando se compararon con el control a pesar que los pacientes con procesos inflamatorios mostraron un ligero incremento en el número de células. Fernández y col indican que los neutrófilos circulantes poseen actividad antitumoral y juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria. Mediadores solubles circulantes se incrementan por las células tumorales como el óxido nítrico (NO) el cual interfiere en la capacidad migratoria de los neutrófilos (**Fernández y col, 2007**), por otra parte Heintzelman y col señalan en su estudio que la distribución de neutrófilos en biopsias cervicales es del 25 al 40% del infiltrado en pacientes con inflamación. (**Heintzelman D, 2000**).

Coussens en el 2002 refiere que los macrófagos potencian el proceso neoplásico y que junto a los neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T activados contribuyen a la malignización al igual que las proteasas, quimiocinas y factores proangiogénicos (**Coussen L y 2002**), otros estudios como los de León y cols señalan que el infiltrado inflamatorio tumoral relacionado con el carcinoma cervical está formado por linfocitos, macrófagos y eosinófilos. (**Leon y cols, 2004**)

Un papel causal se atribuyó recientemente a la inflamación en el desarrollo de enfermedades malignas. Los diferentes mediadores inflamatorios que están involucrados en estas enfermedades incluyen células, citocinas y quimiocinas.

Es por ello que muchos investigadores han estudiado la participación y el papel de MCP-1, IL-8 y MIP en las mismas (**Soria G, 2002; Tjong 1999; Nguyen 2005; Markowska 2007; Tavares-Murta 2008; Takayuki 2000, Pellegrino, 2002**). En este sentido, se evaluaron muestras de exocervix del tejido cervical abarcando todos los espectros desde tejido normal a lesión intraepitelial de alto grado para determinar la expresión de las quimiocinas. Un incremento en la expresión de MCP-1 e IL-8 se observó en el NIC I y fueron mínimamente expresadas por los tejidos normales, pero altamente expresado por las células en los tejidos patológicos, lo que indica que la expresión de MCP-1 e IL-8 aumenta en el curso de la transformación maligna y sugiere que las dos quimiocinas juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer de cuello uterino y / o progresión. Nuestros resultados difieren de estudios anteriores donde se observó la falta de expresión de MCP-1 en el NIC y el carcinoma invasor de cuello uterino, lo que sugiere que la desregulación de la expresión del gen MCP-1 puede representar un paso importante en la carcinogénesis vinculada al VPH, lo que permite el escape de células positivas de la respuesta inmune local (**Kleine-Lowinski K 1999, Kleine-Lowinski K 2003; Riethdorf S 1998**). El 50% de los pacientes con NIC (II y III) fueron positivos para infección por VPH, lo que sugiere que la MCP-1 no estaba relacionada con la respuesta inmune local para la eliminación de células infectadas con VPH. En este contexto, la expresión de MCP-1 no fue acompañada por la infiltración, ni aumento de monocitos / macrófagos. La expresión de MCP-1 encontrada en este estudio podría estar relacionada con la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical. Las quimiocinas podrían tener un papel como promotores o supresores tumorales, dependiendo del contexto. Un ejemplo de esto es la MCP-1, una quimioquina que atrae y activa las células mononucleares (**Daly, 2003; Mukaida 1998**). En algunos lugares, se estimula la actividad antitumoral, sin embargo, las células tumorales

secretan MCP-1 lo que sugiere que tiene efectos promotores de crecimiento (**Zijlmans 2006; Conti 2004**). El incremento en la expresión de MCP-1 en varios tipos de cáncer se ha relacionado con la progresión del tumor, presumiblemente mediante la promoción de la angiogénesis y la producción de factores de crecimiento (**Koide 2004; Ueno 2000; Amann 1998; Conti 2004; Takayuki, 2000**). Un incremento en la expresión de IL-8 se encuentra en la Neoplasia cervical, lo que sugiere que esta quimiocina juega un rol en la progresión tumoral, el aumento de la producción local de IL-8 en NIC y el carcinoma de cuello uterino se han informado anteriormente (**Tavares-Murta 2008; Tjong 1999; Broker 2005**)

Además de la actividad quimiotáctica, tanto la IL-8 como MCP-1 puede tener un papel importante en el crecimiento del tumor de cuello uterino y cáncer a través de la angiogénesis (**Cheng 2011; Jiro Fujimoto 2000; Koide 2004; Ueno, 2000**). En este sentido, se encontró aumento de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en el NIC (**Carrero 2009**). Además, una correlación significativa entre los recuentos de microvasos y de IL-8 en el cáncer de cuello uterino también ha sido reportado (**Jiro Fujimoto 2000**). Puesto que las expresiones de MCP-1 e IL-8 se observaron en el NIC en este estudio, la presencia de las citocinas en los diferentes grados de NIC, podrían estar involucrados en la angiogénesis.

La proteína Inflamatoria de macrófagos-1 α se identifico por primera vez en base a su propiedades proinflamatorias (**Wolpe, 1988**). En consecuencia, la desregulación de MIP-1 se asocia con la susceptibilidad a la infección y alteración de las enfermedades humanas (**Maurer, 2004**). Hallazgos anteriores han sugerido un papel de MIP-1 en la propagación de las células tumorales a los ganglios linfáticos y en la defensa del huésped contra el tumor, en el carcinoma oral de

células escamosas (**Silva, 2007**). Sin embargo, en este estudio los valores de la expresión de MIP-1 α no resultaron significativos, lo que sugiere la falta de participación de esta quimiocina en las neoplasias del cuello uterino.

La infiltración de leucocitos mononucleares se observó aumentada y relacionada con el grado de NIC. Estos leucocitos representan probablemente las células CD8 +, ya que se ha reportado una mayor cantidad de las células CD8 + en el estroma del cáncer cervical en comparación con diferentes grados de NIC (**Bedoya 2012**). Los linfocitos se incrementaron tanto en el epitelio como en el estroma de los tejidos patológicos, sin embargo, la infiltración de monocitos-macrófagos se mantuvo similar a los tejidos sanos. Las expresiones de quimiocinas estudiadas no estaban relacionadas con la infiltración de leucocitos, sin embargo, la infiltración de linfocitos posiblemente se debió a la acción de quimiocinas en el tejido tumoral. De hecho, MCP-1 e IL-8 son capaces de inducir la quimiotaxis de los linfocitos (**Daly, 2003; Mukaida 1998**). MCP-1 se ha detectado acompañada de alta expresión de CD40 y CD40 ligando en células de carcinoma cervical, lo que sugiere que son atraídas células T en el tejido tumoral, a través de interacciones CD40L-CD40 durante la expresión de MCP-1 (**Altenburg 1999**). Un aumento en el número de CD3 del cuello uterino se ha asociado a la regresión espontánea de la NIC (**Kojima 2011**). Además de la actividad quimiotáctica de monocitos, MCP-1 atrae células T de memoria, y en conjunto, estos mecanismos podrían estar relacionados con aumento del número de células CD3 positivos en el NIC. Por otra parte, MCP-1 podría alterar el patrón inmunológico en los tejidos patológicos, en este sentido existe evidencia reciente en ratones modificados genéticamente, que indican que la MCP-1 tiene efectos sobre las células T helper, estimulando la polarización Th2 (**Daly,2003**).

Como un resultado esperado, el aumento de expresión de MCP-1 no fue acompañada por el aumento de la infiltración de monocitos y macrófagos, no se tiene ninguna explicación para este hallazgo, sin embargo, resultados similares han sido reportados previamente en varias situaciones. En este contexto, la falta de infiltración de monocitos y macrófagos puede ser detectada en áreas de tejido alrededor de las lesiones NIC, a pesar de que MCP-1 se encontró altamente expresado (**Kleine-Lowinski 1999**). Nuestros resultados mostraron en las lesiones aumentó la expresión de MCP-1, sin la infiltración de monocitos significativa, lo que sugiere una posible pérdida de gradiente quimiotáctico por la sobreproducción de quimiocinas de las células de los tejidos y / o monocitos y macrófagos. Además, la falta de la migración de leucocitos a los tejidos que expresan MCP-1 se ha informado en el tejido adiposo, en la resistencia sistémica a la insulina, la edad y condición de hipoxia en un modelo transgénico, la falta de respuesta de los monocitos a producción local de MCP-1 (**Shallo H et al 2003; Kirk 2008; Negus, 1998; Rutledge, 1995**).

Desde entonces, los leucocitos mononucleares fueron positivos para la expresión de MCP-1 e IL-8 por lo que se podría esperar un posible papel de estas células en la producción total de quimiocinas en el tejido. A pesar de que se observó un aumento del número de MCP-1/CD3, el porcentaje de estas células se redujo durante el NIC, lo que sugiere que un mayor porcentaje de células productoras de quimiocinas no estaban relacionadas con los leucocitos mononucleares. Se observó un patrón diferente en la expresión de IL-8/CD3, el porcentaje de estas células se incrementó durante NIC, lo que sugiere una producción activa de IL-8 por la infiltración de linfocitos en la lesión

Mediante la doble tinción por inmunohistoquímica se pudo evidenciar el número y tipo de células que expresaron VEGF, encontrándose diferencias significativas en el número de linfocitos que expresaron el factor y menor proporción el número de macrófagos, manteniéndose el patrón de expresión aumentado en pacientes con NICIII. Coussens indica que el reclutamiento de macrófagos en el sitio de la lesión está asociado con la angiogénesis y que en conjunción con un desbalance entre los factores proangiogénicos y la expresión del factor por otras células infiltrantes juegan un papel importante en la formación de nuevos vasos sanguíneos y una posterior metástasis. **(Coussens L, 2002)**

La incidencia de la infección por VPH en este estudio fue baja. Este porcentaje coincide con otros estudios que informan 5% y 20% de la población en general con el ADN del VPH detectable en muestras de cuello uterino **(Critchlow 1995)** y que, en la mayoría de los casos, la infección por VPH es transitoria y puede o no estar asociada con NIC **(von Knebel Doeberitz 1990; Bedoya, 2012)**. La baja incidencia observada en los pacientes de nuestra población también está de acuerdo con otros estudios en el país, que han informado de una incidencia de 9,9% a 12,5% en la población occidental de Venezuela **(Muñoz 2003; Mendoza 2000)**. Sin embargo, la mayor frecuencia de alto riesgo de infección por VPH se observó en pacientes con NIC II y NIC III (50%), lo que sugiere una asociación de esta infección con estadios avanzados de la evolución de la NIC. La producción de quimiocinas tuvo valores similares en los pacientes positivos de VPH-negativas y VPH+, lo que sugiere que la infección por el virus no era responsable de los hallazgos observados en el curso de las lesiones premalignas del útero. Sin embargo, la asociación de la infección por VPH y la producción de quimioquinas in vitro se ha informado **(de Kleine-Lowinski, 2003; Riethdorf, 1998)**, en este sentido, disminución de la expresión de MCP-1

después de la infección de VPH en las células epiteliales del cuello uterino y la epidermis (**Kleine-Lowinski, 2003**) y carcinoma de cuello uterino (**Riethdorf, 1998**) ha sido encontrado.

La expresión del VEGF se ha relacionado con el grado de neoplasia intraepitelial cervical, así como también con la infección por Virus de Papiloma Humano, Branca en su estudio concluye que la expresión del VEGF es un marcador importante en la carcinogénesis cervical, mostrando un aumento de acuerdo al grado de lesión y relacionado con los genotipos de alto riesgo de VPH, estudios acerca de la inducción del VEGF en células VPH+ demostraron que este evento es independiente del lazo autocrino EGFR-TGF α . Además, en experimentos de transfección se demostró por primera vez que la oncoproteína E6 (VPH-16) activa el promotor del gen del VEGF independientemente de su efecto inhibitor sobre p53. En nuestro estudio un 17.39% del total de pacientes resultaron positivas a infección por VPH con un predominio de genotipos de alto riesgo en las pacientes con NIC II y III, aunque no fue significativa la positividad de VPH con los parámetros observados, especialmente VEGF se evidencio un leve incremento en las pacientes infectadas. (**Branca F y col, 2005**)

Al determinar anión superóxido en muestras de biopsias de cuello uterino, observamos que a medida que progresaba el grado de lesión cervical en las pacientes se incrementaba el número de células anión superóxido positivas tanto en epitelio como en estroma. Ramos Gisela y Cols en el 2004 ⁽¹⁵⁸⁾, encontraron en todas las biopsias, independiente del grado de lesión el mismo patrón que indica la presencia de anión superóxido, el cual es indicativo de estrés oxidativo local, esto

sugiere que aun en ausencia de estrés oxidativo sistémico en el epitelio cervical se está generando Eros.

En base a los resultados obtenidos se puede inferir que las células anión superóxido positivas tanto en epitelio como estroma en pacientes con diferentes grados de lesión, tenían un estrés oxidativo aumentado al ser comparadas con los controles. De igual forma Navarro y Cols (2005), Ahmed Aydin y Cols (2006), Muzib Hassanal Rasheed y Cols (2007), A. Katsabeki. Katsafli y Cols (2007), y Syed Sultan Beevi y Cols (2006), demostraron un incremento del estrés oxidativo en diferentes canceres como: cáncer de colon y recto, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cáncer cervical, al comparar el grupo de pacientes con inflamación vs. grupo con lesión y el control se encontraron diferencias significativas en el número de células anión superóxido tanto en pacientes con inflamación como con lesión con respecto a los controles. Poka y col en el 2000 quienes señalan que los granulocitos en pacientes con cáncer ginecológico inducen la producción de anion superóxido a medida que aumenta el estadio de la enfermedad.

Las células presentes en el infiltrado se han vinculado con el aumento del stress oxidativo especialmente el oxido nítrico y el anión supéroxido, estudios demuestran que los neutrofilos presentes en pacientes con cáncer ginecológico influyen directamente en la producción de anión superóxido y que junto con el NO actúan directamente en la capacidad de adherencia de los leucocitos.

El papel del oxido nítrico en la biología del cáncer no es conocido ampliamente, diversos estudios señalan que es importante en los procesos de neovascularización esenciales en el desarrollo de tumores sólidos y en el

establecimiento de metástasis, se ha vinculado con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) factor esencial en la angiogénesis y desarrollo tumoral tal como lo reporta Rank y cols en el 2002 quienes señalaron que el VEGF induce la proliferación celular por la vía del NO.

Diversos investigadores han estudiado la presencia de la enzima oxido nítrico sintetasa en tumores ginecológicos y de mama, encontrándose una correlación positiva entre su actividad y el grado de diferenciación tumoral, así mismo la existencia de altas concentraciones de oxido nítrico (NO) en lavados broncoalveolares de pacientes con cáncer pulmonar. **(Pedraza, D y col, 2002)** el aumento de iNOs en pacientes con carcinoma escamoso bucal y pacientes con cáncer de pulmón en quienes se ha encontrado un metabolismo oxidativo aumentado al compararlos con un grupo sano, de igual forma el NO juega un papel importante en las patologías inflamatorias del tracto gastrointestinal. Balestera y cols en 1999 señalan que existe una relación entre el stress oxidativo y el daño celular por radicales libres y el cáncer de cuello uterino

La relación entre las cifras de nitritos (NO₂⁻)/nitratos (NO₃⁻) y los niveles de óxido nítrico en sangre se han descrito en diferentes **estudios (Kelm M y col, 1999; Mackenzie IM y col, 2001)** Dichos substratos serían metabolitos estables del NO susceptibles de ser detectados en la sangre y se elevarían en los casos de sepsis o inflamación al igual que sucede con el óxido nítrico. **(Kafte J y col, 1997)**

Así mismo se incluyo un grupo de pacientes que presentaban diversos procesos inflamatorios a nivel de cuello, dicho grupo se comparo tanto con los controles como los pacientes con lesiones preinvasivas (NIC I, II,III), a pesar de que

los hallazgos no fueron estadísticamente significativos, es notable que en los pacientes con procesos inflamatorios existen mayores concentraciones de NO al compararlos con el grupo control y los pacientes con lesión. Esto puede explicarse ya que dentro de los procesos involucrados en la denominada cascada inflamatoria, relacionada con el síndrome de respuesta sistémica a la inflamación (SRSI), en los fenómenos de infección, daño y sepsis, también se ha implicado al óxido nítrico. La infección provocaría un daño endotelial que originaría la formación de óxido nítrico y sus derivados (nitritos y nitratos) que causarían vasodilatación, además es reconocido desde hace mucho tiempo que la inflamación crónica fue considerada como un factor de riesgo para varios cánceres en el humano, planteando la hipótesis de que el NO y sus derivados producidos en cantidad abundante en tejidos inflamados, son capaces de causar daño directo e indirecto al material genético **(Kelm M, 2002)**. Beevi y cols establecen que la inflamación crónica a nivel cervical producida por virus o bacterias, especialmente el VPH es uno de los factores predominantes en la etiopatogénesis del cáncer cervical. La inflamación crónica resulta de la activación del sistema monocito/macrófago produciendo niveles elevados de ROS, igualmente existen evidencias de un prominente infiltrado de células en biopsias cervicales de pacientes con cáncer, sin embargo no existe una correlación entre los niveles de ROS y el grado de inflamación. Así mismo demostraron en su estudio que las concentraciones de NO se incrementaron en la circulación en pacientes con cáncer cervical, demostrando el rol crítico del NO y sus derivados en la patogénesis del cáncer cervical. Un incremento en los productos del NO pueden atribuirse a la generación excesiva de NO, probablemente debido a una regulación positiva de iNOS por citocinas proinflamatorias producidas durante la interacción de macrófagos con células tumorales.

Por otra parte, Smita K. Naidu y Cols (2007) realizaron un estudio en el cual determinaron la concentración de MDA y NO en pacientes en estadios I,II,III y IV de Cáncer cervical encontrando significancia estadística cuando se comparo con el grupo control, estableciendo que a medida que avanzaba el cáncer mayor era la concentración de NO, cabe destacar que cuando se comparo el grupo control con los pacientes en estadio I la diferencia no fue muy marcada, hecho similar a nuestro estudio

Recientemente se ha propuesto que el NO juega un rol critico en la patogénesis del tumor, angiogénesis y metástasis. Lo cual es avalado por Cavallo y Col en el 2007, señalando que la sintetasa del NO y las ciclooxigenasas están asociadas al crecimiento y progresión de tumores malignos, actuando como mediadores de la inflamación, inductores de angiogénesis y promotores en la proliferación del cáncer.

Estudios realizados por Sibylle Loibl y Cols (2004), Elsa Rada y Cols (2003), Valmore J. Bermudez Pirela y Cols (2000), Taborda M. José (2000), demostraron niveles incrementados de nitritos / nitratos en muestras de suero y tejidos en pacientes con diversas patologías. En el estudio se determinaron los niveles de NO en tejido, los resultados demuestran un incremento en las concentraciones de NO de las pacientes a medida que aumentaba el grado de lesión sin embargo en las pacientes NICIII se observó un descenso, esto quizás pueda deberse al número reducido de pacientes con NIC III presentes en el estudio, cabe destacar la importancia de la determinación in situ puesto que un aumento de NO en suero no puede atribuirse a la lesión a nivel de cuello sino que por el contrario puede deberse a un proceso inflamatorio u otra patología que aumente el NO a nivel sistémico. Se encontró un ligero aumento de NO en pacientes controles esto puede deberse a que

el estrés oxidativo desempeña un papel en los procesos fisiológicos múltiples del aparato reproductivo de la mujer. La implicación del NO en la regulación de la función endometrial y ovárica, la etiopatogénesis de la endometriosis, y del mantenimiento de la quietud uterina, así como la iniciación de trabajo y maduración de la cervix en el parto se discute. Además el NO es un neurotransmisor vasoactivo que se encuentra en cantidad abundante en las terminaciones nerviosas del plexo vaginal. **(Maeda T, Mas M, 2007)**

Alteraciones en el sistema ROS y el metabolismo oxidativo aumentado inducen la producción de sustancias angiogénicas, especialmente el VEGF el cual puede activarse por la vía del NOS. Tanaka y col señalan que la hipoxia y el metabolismo oxidativo aumentado en células de carcinoma de cuello uterino se correlaciona con una abundante vascularidad, ya que el VEGF se expresa a nivel de epitelio promoviendo la angiogénesis. Soufla y col en su estudio indican que la expresión VEGF se correlaciona con la transformación maligna a nivel de cuello, dicho factor se expreso en mayor cantidad en pacientes con un grado de lesión avanzado, resultados similares al presente estudio en donde se encontraron diferencias significativas cuando se estudio la expresión de VEGF en pacientes con lesiones preinvasivas, inflamatorias y controles, observándose una mayor expresión en pacientes con NICIII. Se ha descrito que la expresión autocrina del VEGF y la activación de su receptor pueden ser importantes en el inicio del cáncer de cervix pues se ha identificado en carcinomas cervicales y en más de 50% de NICIII. **(Van Trappen S, 2003)**



VI.- CONCLUSIONES

En nuestro trabajo de investigación sobre el patrón de infiltración leucocitaria de epitelio y estroma uterino y de la expresión tisular de quimioquinas, factor de crecimiento endotelial vascular y metabolitos oxidativos en pacientes con displasia epitelial , con cervicitis sin alteración displásica y controles sanos se concluye que:

1.- La progresión en el grado de displasia epitelial se asocia a una mayor y selectiva infiltración de linfocitos sin modificaciones en la estirpe monocitaria y la reducción de los polimorfonucleares

2.- La progresión en el grado de displasia epitelial se asocia a una modificación funcional de los linfocitos T infiltrantes con disminución de la producción de MCP1, aumento de IL-8, que por el contrario se mantiene estable en la población monocitaria que es minoritaria. Sin embargo, la producción de MIP por los linfocitos T no varía entre los diferentes estadios evolutivos de la enfermedad.

3.- La progresión en el grado de displasia de las células epiteliales se asocia a un incremento en la producción de VEGF por los linfocitos T y monocitos infiltrantes del tejido así como por células epiteliales y estromales.

4.- La producción de anión superóxido en el epitelio y estroma cervical aumenta con el mayor grado de displasia epitelial, sin modificación del NO en estas.

5.- Las mujeres con cervicitis sin evidencia de displasia epitelial presentan un infiltrado leucocitario de predominio de linfocitos T activados con expresión de

citocinas. La presencia de VPH no determino un patrón funcional específico de alteración en el infiltrado leucocitario cervical.

Por lo tanto, la displasia epitelial uterina se asocia a una marcada alteración del sistema inmunitario a nivel local cuyas características se asocian al grado de malignidad.



VII.- BIBLIOGRAFÍA

1. A Kaya, B Poyraz, G Celik, A Ciledag, BE Gulbay, H Savas I Savas. El factor de crecimiento endotelial vascular en los derrames pleurales benignos y malignos **Arch Bronconeumol** . 2005;41: 376 – 379.
2. Abroun, S. Chemokines in homeostasis and cancers. **Yakteh Medical Journal BMC Cancer**. 2008;10(3): 155-156.
3. Acladiou 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.
4. Aguzzi A, Heikenwalder M Prions. Cytokines and chemokines: a meeting in lymphoid organs. **Immunity** 2005; 22: 145-54.
5. Al- Saleh, W.; Giannini S.L.; Jacobs, N.; Moutschew, M.; Doyen, J.; Boniver, J. Delvenne, P. Correlation Of T-Helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix. **J pathol**. 1998; 184(3):283-290.
6. Alcamí A, Urich K. Viral Mechanisms of Immune evasion. **Rev Imm Today**. 2000: Vol.21(9):447
7. Alcamí, Antonio and Urich, Koszinowski. Viral Mechanisms Of Immune Evasión. **Rev Imm Today**. 2000; 21(9).447.
8. Alejandro López y Marcela Lizano. Cáncer cervicouterino y VPH: la historia que no termina. Unidad de investigación biomédica en cáncer UNAM. Sub dirección de investigación básica, instituto de cancerología mexico DF. 2002: 4 (4) pág. 176-187
9. Allavena, P., Marchesi, F., Mantovani A. 2005. The Role of Chemokines and their Receptors in Tumor Progression and Invasion: Potential New Targets of Biological Therapy. **Reviews Current Cancer Therapy**.1(1):81-92
10. Allavena, P., Marchesi, F., Mantovani A. The Role of Chemokines and their Receptors in Tumor Progression and Invasion: Potential New Targets of Biological Therapy. **Reviews Current Cancer Therapy**.2005;1(1):81-92
11. Allavena, P., Marchesi, F., Mantovani A. The Role of Chemokines and their Receptors in Tumor Progression and Invasion: Potential New Targets of Biological Therapy. **Reviews Current Cancer Therapy**. 2005;1(1):81-92
12. Amaya H, Tanigawa N, Luc C, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis, survival and thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression in human colorectal cancer. **Cancer Lett** 1997;119(2):227-35.
13. Androphy EJ: Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Oncogenesis. **J Invest Dermatol** 1994; 103 (2):248-56

14. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk of development of cervical squamous cell carcinoma. **JAMA** 2001; 285:47-51.
15. Apgar BS, Brotzman G. HPV testing in the evaluation of the minimally abnormal Papanicolaou smear. **Am Fam Physician** 1999; 59:2794-801.
16. Atilla L, Reid R.: 1996. Clínicas de Ginecología Obstétrica. Temas Actuales. VPH. Parte I. **Mc GRAW-Hill. Interamericana**. Vol. 3
17. Baay MF, Duk JM, Groenier KH, Burger MP, de Bruijn HW, Hollema H et al. Relation between HPV-16 serology and clinico-pathological data in cervical carcinoma patients: prognostic value of anti E6 and /or anti E7 antibodies. **Cancer Immunol Immunother** 1997;44 (4):211-13.
18. Balentine N, E; Mufson, B. E; Shattuck, R. L; Derynck, R. & Richmond, A. Effects of MGSA/GRO alpha on melanocyte transformation. **Oncogene**. 1991; 6, 1115–1124.
19. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**. 2001. 357(9255):539-45.
20. Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. **Nat. Rev. Cancer**. 2004; 4:540-550.
21. Balkwill, F. Chemokine biology in cancer. **Sem. Immunol**. 2003;15: 49-55.
22. Barbado, J; Vega, L; Gonzalez, R; Jimeno, A; Ortiz, R; Bermejo, J. MCP-1 in urine as biomarker of renal lupus in absence of cytokines, interferon- γ and growth factors. **Reumatol Clin**. 2010; 6(6):296-8
23. Barillari G, Albonici L, Franzese O, Modesti A, Liberati F, Barillari P. The basic residues of placenta growth factor type 2 retrieve sequestered angiogenic factors into a soluble form: implications for tumor angiogenesis. **Am Pathol**. 1998; 152(5):1161-6.
24. Benedet JL, Cabero-Roura L. Strategies for the modification of risk factors in gynecological cancers. **Eur J Gynecol Oncol**. 2002; 23(1):5-10.
25. Benia W, Tellecha G. Estudio de los factores de riesgo para cáncer de mama y cuello uterino en mujeres usuarias de tres policlínicas barriales de Montevideo: 1997. **Rev Med Uruguay** 2000; 16:101-16.
26. Bocha-Zavaleta L, Jordan D, Pepper S, Corbitt G, Clarke F, Maitland NJ et al. Differences in serological IgA response to recombinant baculovirus-derived human papillomavirus E2 protein in the natural history of cervical neoplasia. **Br J Cancer** 1997;75(8):1144-50.
27. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJL, Shah KV. The causal relation between human papilloma virus and cervical cancer. **J Clin Pathol** 2002; 55:244-65.
28. Bosch FX, Manos MM, Muñoz M, Sherman M, Jansen AM, Peto J. Prevalence of human papilloma virus in cervical cancer a

- worldwide perspective. Study Group. **J Natl Cancer Inst. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC)** 1995; 87:796-802.
29. Bottazzi, B, Polentarutti, N, Acero, R, Balsari, A, Boraschi, D, Ghezzi, P. Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. **Science** .1983: 220: 210-212.
30. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papillomavirus 16 induces degradation of the retinoblastoma protein through the ubiquitinproteosome pathway. **Cancer Res.**1996: 56: 4620 – 4
31. Braunwalal E, Isselbacher K, Petersdor R., Wilson J., Martin J., Fauci A.1999. Principio de Medicina Interna. Tomo Iy II. (11^o ed) México: **Interamericana Mc Graw-Hill**. 2585.
32. Brostoff J, Scadding GK, Male DK, Roitt IM. Cancer. En: **Immunologie Clinique**. France: **De Boeck Université Bruxelles**;1993:281-91
33. Burkhardt A, Willingham M, Gay C. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. **Virology** .1989.170, 334–339
34. Bussoolino F, Wang JM, Delfilippi P, Turrini F, Edgell CJ. Granulocyte- and Granulocyte-Macrophage- Colony Stimulating Factors Induce Human Endothelial Cells Migrate and Proliferate. **Nature** 1989; 337: 471-3.
35. Callejas D. Prevalencia de genotipos del virus de papiloma humano diagnosticados en el Laboratorio Regional de Referencias Viroológicas. Instituto de Investigaciones Clínicas. Maracaibo, Edo Zulia. 1993-1997
36. Campbell SC, Volpert OV, Ivanovich M, Bouck NP. Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. **Cancer Res.** 1998: 58(6):1298-304
37. Cannistra, S y Niloff, J. Cancer of the uterine cervix. **The new Engl J Med** 1996.1030-38
38. Carreras R, Fernandez I, Fuste P, Alameda F, Castellanos E. Valoración de los factores de riesgo en la neoplasia intraepitelial cervical. **Act Ginecol** 1997; 54: 76-80.
39. Ciaran B. J, Woodman, Stuart I, Collins & Lawrence S. Young. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues **Nature Reviews Cancer** 2007; 7: 11-22.
40. Clerici M, Gene MS; Clerici E. Cytoquine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: Time to consider the Th1/Th2 Paradigm. **J Nat Cancer Inst** 1998 Feb 18;90 (4).
41. 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.
42. Cohen SM, Ellwein LB. Genetic error, cell proliferation and carcinogenesis. **Cancer Res.**1991: Volumen 6943 – 6505

43. Cohen SM. The role of cell proliferation in neoplasia. In: Bowden GT. Chemical carcinogenesis and anticarcinogenesis, vol. 12 of Comprehensive Toxicology. Pergamon Press. **Elsevier**, Amsterdam, 1977: 401-24.
44. Coleman, J. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int. Immunopharmacol.** 2001:Vol 1: 1397-1406
45. Correnti, M; Uribe, M; Cavazza, M. Detección de virus papiloma humano (VPH) mediante biología molecular y su asociación con neoplasia cervical uterina. **Rev Venez Oncol** .1997; 9: pag 76-83.
46. Coussens, LM. Inflammation and cancer. **Nature.** 2002 Dec 19-26;420(6917):860
47. Crowley-Nowick, P.A; Ellenberg, JH; Vermun, SH; Douglas, S.D; Holland, C.A, Moscicki, AB. Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and other sexually transmitted pathogens. **J. Infect. Dis.** 2000. 181(3):939-45.
48. Crum, C; Nuevo, G. Genital papillomaviruses and related. **Pathol.**1998. 184(3): 283-290.
49. Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. **Gynecol Oncol.** 2005: Apr;97(1):96-103
50. Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. **Gynecol Oncol.** 2005; Apr;97(1):96-103
51. De Gruijl TD, Bontkes HJ, Peccatori F, Gallee MP, Helmerhorst TJ, Verheijen RHH et al. Expression of CD3-zeta on T-cell in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and negative pelvic lymph nodes. **Br J Cancer** 1999; 79 (7-8):1127-32.
52. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylos C, et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HI infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. **Br J Cancer.** 2000; 83(11):1565-72.
53. Domínguez H Francisco. Implicación de las quimoquinas IL-8, MCP-1, RANTES, los receptores CXCR1, CXCR4, CCR2, CCR5 y el factor IGF1-Rp1 en la interfase materno – embrionaria. Universidad de Valencia. 2003
54. Dr Jairo Bravo, Maria Elena Victoria. **Acta científica estudiantil**, sociedad científica de estudiantes de medicina UCV. Ciclo celular y carcinogenesis. 2006. Pag 176-185
55. Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N.Engl. J. Med.**1986: 315:1650–1659
56. Edward SP, Pondichery G, Satyaswaroop and Rodique M. Hormonal interaction in gynecologic malignancies. In: Hoskins WJ, Pérez, CA. Young RC. **Principles and Practice of**

- Gynecologic Oncology**. 3era ed. Lippincott: Williams and Wilkins; 3ed. 2000.p.199-224.
57. Erazo J. Manual de Patología Cervical. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Cauca. 2007. pp. 77
58. Espinosa, Jorge S. Inflamación. 2006. Disponible: <http://boletin.informatica.udp.cl/esteban.araneda/archivos/NFLAMACION.doc>
59. Falcón Vizcaino O. Simposio. La infección por el virus del papiloma humano. El virus del papiloma humano (VPH) Causa necesaria para el cáncer de cérvix. Hospital Universitario Materno Infantil de Canarias. Las Palmas de Gran Canaria. 2007
60. Fernández ME, Tortolero-Luna G, Gold RS. Mammography and Pap test screening among low-income foreign-born Hispanic women in the USA. **Cad Saúde Pública** 1998; 14:133-4.
61. Fernández, Tilapa G.; Zamudio-López N.; Cruz-Valdez A.; Antonio-Vejar V.; Lladés-Aguiar B. RNAm de IL-4 en lesiones premalignas y Cáncer Cervical asociados a Infección por VPH. **Rev FASPYN** .2000 N°2-2000.
62. Filella, X; Zarco, M. Cytokines: from the laboratory to clinical practice. **Med. Clin.** 1999; 113:56-57
63. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: What is its molecular basis? **Cell** 1996;87:1153-1555
64. Fridman WH, Tartour E. Macrophage and Lymphocyte produced Th1 and Th2 cytoquines in the tumour microenvironment. **Res Immunol** 1998;149(7-8):651-3.
65. Fushimi T, Kojima A, Moore M, Crystal R. Macrophage inflammatory protein 3a transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth. **J Clin Invest**. 2000; 105:1383–1393.
66. Garcia, J. Estudio de la expresión inmunohistoquímica de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 en el melanoma maligno de uvea y su asociación con otros factores clínicos-patológicos conocidos. Barcelona, España. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Barcelona. 2006
67. García, J.; Vilaplana, E.; López, M.; Meisels, A. y Vilaplana, E. ASCUS en citología cervicovaginal de rastreo y captura híbrida II ¿Una quimera en nuestro medio? **Revista Española Patológica**. 2003; vol 36, n.º 1: 59-64.
68. Gazzaniga, S., Bravo, A., Mordoh, J., Wainstok, R. Monocyte chemoattractant protein correlates with angiogenesis in metastatic melanoma. **Acta bioquím. clín. latinoam.** 2006; 40(4):463-467
69. Ghim SJ, Sundberg J, Delgado G, Jensen AB. The pathogenesis of advanced cervical cancer provides the basis for an empirical therapeutic vaccine. **Exp Mol Pathol** 2001 Dec;71(3):181-5.
70. Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Bonivier J, Delvenne P. Cytokine expression in squamous intraepithelial

- lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. **Clin Exp Immunol** 1998; 113: 183.
71. Giannini, S.L; Al-Saled, W; Piron, H; Jacobs, N; Doyen, J; Boniver, J & Delvenne, P. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. **Clin. Exp. Immunol.** 1998; 113:183-189.
72. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S, Kaklamanis L, Barbatis K, O'Byrne. Focal expression of thymidine phosphorylase associates with CD 31 positive lymphocytic aggregation and local neo-angiogenesis in non-small cell lung cancer. **Anticancer Res** .1998;18(1A):71-76
73. Gómez DE, Alonso DF. Introducción a la Oncología Molecular. Argentina: **Editora ECSA**; 1998.
74. González Merlo J, González Bosquet, Biete Sola A. **Ginecología Oncológica**. 3 ed. España: Méndez Editores; 2000:141.
75. González, E. Ginecología. (8va edición). Publicado por **Elsevier**. España. 2003. 752 pp
76. Griess, P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." **Chem. Ber.** 1879; **12**, 426–8.
77. H. Park, Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, C. Dong. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol.** 2005; 6:pp. 1133–1141
78. Hachisuga T, Fukuda K, Kawarabayashi T. Local immune response in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Obstet Invest** 2001; 52 (1):3-8.
79. Halliwell, B. Gutteridge, J.M. Free. Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, **Oxford. Am J Epidemiology**. 2003; 158(9): 852-860.
80. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**. 1996; 86:353-358.
81. Hargundey S. Hacia una etiopatogenia integral y prevención del cáncer del cérvix. **Rev. esp. Obst Ginecol**. 1988: Volumen 47: 359 – 364
82. Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Fiander AN, Brown T, Borysiewicz LK. Novel method for detection, typing and quantification of human papilloma viruses in clinical samples. **J Clin Microbiol** 2001; 39:3204-12.
83. Harti, D; Griese, M; Nicolai, T; Zissel, G; Prell, C; Reinhardt, D; Schendel, D; Krauss-Etschmann, S. A role for MCP-1. **BMC Cancer**. 2001; 2:37-40.
84. Hasenyager C. Knowledge of cervical cancer screening among women attending a university health center. **J Am Coll Health** 1999; 47:221-4.
85. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A. Complete switch

- from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. **Proc. Natl Acad Sci USA**.2001. 98: 1218–23
- 86.Hildesheim A, Schiffman MH, Tsukui T, Swanson CA, Lucci J, Scott DR et al. Immune activation in cervical neoplasia: cross-sectional association between plasma soluble interleukin 2 receptor levels and disease. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1997; 6(10):807-13.
- 87.Hilleman MR. Overview of vaccinology with special reference to papilloma vaccines. **J Clin Virol**. 2000; 19(1-2):79-90.
- 88.Hollingsworth RE, Hensey CE, Lee Wen-Hwa: Retinoblastoma protein and the cell cycle. **Current Opinion in Genetics and Development** 1993; 3: 55-62.4.
- 89.Holowaty P, Miller AB, Rohan T. Natural dysplasia of the uterine cervix. **J. Natl. Cancer Inst.** 1999: 91: 252-258
- 90.Huibregtse JM, Scheffner M. Mechanisms of tumor supressor protein inactivation by the human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. **Semin Virol** 1994; 5: 357-67
- 91.Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. **Nat Rev Immunol** 2005; 7: 521-31.
- 92.Huibregtse JM, Schcffner M. Beaudenon S, et al. A family of proteins structurally and funcionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. **Proc Nat.] Acad Sci USA** 1995:1; 92: 2563-7.
- 93.Janeway CH, Travers P, Walport M, Capra JD. Manipulation of the immune response. Signaling through lymphocyte receptor. En: **Immunobiology.The immune system in heath and disease**.2001: 550-60.
- 94.Janeway CH, Travers P, Walport M, Capra JD. Signaling through lymphocyte receptor. 5 ed. En: **Immunobiology.The immune system in heath and disease**. E.U.: **Garland Publishing**. 2001:171-91.
- 95.Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepitelial neoplasia and malignancy. **Postgrad Med J**. 2002;78:225-228.
- 96.Jiménez, V., Martínez, E. Enfermedad ósea en mieloma múltiple: biología y tratamiento. **Med Int**. 2007; 23:126-32.
- 97.Johson DA, Yannuzzi IA, Shakin JL, Lightman DA.Lacquer craks following laser treatment of choroidal neovascularization in pathological myopia. **Retina** 1997: 18(2):118-24.
- 98.Karla, R. Dzul-rosado, Puerto-Solis, M; Gonzalez, M. Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. Yucatán, México. **Rev Biomed**.2004: 15:233-241
- 99.Kasper D, Braunwals E. Fauci A, Stephen H, Longo D, Larry J. Harrinson. Principios de Medicina Interna. **Editora Interamericana McGraw-Hill** 16a Ed. Mexico

100. Klaes, R; Friedrich, T; Spitkovsky, D; Ridder, R; Rudy, W; Petry, U; Dallenbach-Hellweg, G; Schmidt, D; Von Knebel M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uterine. **Int J Cancer**. 2001; 92(2):276-284.
101. Koizumi, K., Hojo, S., Akashi, T., Yasumoto, K., Saiki, I. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. **Cancer Scienc**. 2007; 98(11):1652–1658.
102. Krajewski S, Krajewska M, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-2 expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. **Cancer Res**. 1996; 56, 2849 – 2855
103. Kuper, H., Adami, H. O. & Trichopoulos, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. **J. Intern. Med**. 2000; 248:171–183.
104. Kuper, H., Adami, H. O. & Trichopoulos, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. **J. Intern. Med**. 2000; 248:171–183
105. L. Ferbeyre Binelfa, J. C. Salinas García Bases genéticas y moleculares del cáncer / 2a. parte. **Gamo** .2005. Vol. 4 Núm. 3, May-Jun 2005
106. Lacruz, C; Di Martino, B; Alvarez. Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano (HPV) en las lesiones escamosas del cervix uterino. **Rev Esp Pat**. 2003; 36(1)
107. Lamontagne D, Pohl U, Busse R. Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. **Cir Res**. 1992; Vol 70: 106-12.
108. Larsen WJ. Human embryology. England: Churchill Livingstone, 1993:167-204.
109. Lázaro J, Muniesa J. y Pardo A. Citología Exfoliativa Cervicovaginal (Método de Papanicolaou). Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Obispo Polanco de Truel. **Boletín Oncológico**. 1998. 8:46-54.
110. Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 1993;33:71.
111. León G, Bosques O. Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. **Rev Cubana Obstet Ginecol** 2005;31(1).40-8.
112. Lezama, P. Role of chemokines and its receptors in inflammation. **Rev. Med. Vallejana**. 2006; 3(2):133-139.
113. Lisa MG, Shaun RMC. Chemokines: extracellular messengers for all occasions. **BioEssays**. 1999; 21:17-28.
114. Lorant V, Boland B, Humblet P, Deliege D. Equity in prevention and healthcare. **J. Epidemiol. Community Health** 2002; 56:510-6.

115. M. González Barón, A Ordóñez, J Feliu, P Zamora. **Oncología clínica** primera edición. 1992. Vol. 1
116. M. Veldhoen, C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmbj, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, B. Stockinger. Transforming growth factor – β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9 producing subset. **Nat Immunol.** 2008; 9: pp. 1341–13
117. Magnusson PK, Gyllensten UB. Cervical cancer risk: is there a genetic component?. **Mol Med Today.** 2000;6(4):145-8.
118. Majewski S, Jablonska S: Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa **Am Acad Dermatol** 1997; 36: 659-85
119. Mandelblatt JS, Kanetsky P, Eggert L, Gold K. Is HIV infection a cofactor for cervical squamous cell neoplasia? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1999; 8:97-106.
120. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. **Oncogene.** 2001; 20:7874–87
121. Mantovani F, Banks L. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical cancer derived cell lines. **Oncogene** .1999; 18, 3309–3315
122. Margni, R. Inmunología e Inmunoquímica. **Medica Panamericana.** Quinta edición. Buenos Aires. 1996. 231-256.
123. Martínez F. Epidemiología del Cáncer de Cuello Uterino. Monografías 2004. Disponible: <http://www.monografias.com/epidemiologiadelcancerdecuellouterino.html>
124. Martínez J. Diagnóstico microbiológico de infecciones de transmisión sexual. Parte II. ITS Virales. **Rev Chil Infect** 2010; 27: 60-64.
125. Martínez M, Francisco Javier. Epidemiología del Cáncer de Cuello Uterino. Monografías. 2004. Disponible: <http://www.mografias.com/epidemilogiadecuellouterino.html>
126. Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Nakagawa S, Kawana K, Nozawa S et al. Balance of IgG subclasses toward human papilloma type 16 (HPV 16) L1-capsid is a possible predictor for the regression of HPV16-positive cervical intraepithelial neoplasia. **Biochem Biophys Res Commun.** 1999 apr;29:258.
127. Melter M, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. **Blood** .1996 pag 3801–3808.
128. Merle, L. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. Disponible: <http://www.paho.org>
129. Mikamo H, Sato Y, Hayasaki Y, Kawazoe K, Izumi Ito K, Yamada Y et al. Intravaginal bacterial flora in patients with uterine cervical

- cancer. High incidence of detection of Gardnerella vaginalis. **J Infect Chemother** 1999 Jun;5 (2):82-5.
130. Milliken, D., Scotton, C., Raju, S., Balkwill, F., Wilson, J. Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites. **Clinical Cancer Research**. 2002; 8(4):1108–1114.
131. Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2009). Anuario de Mortalidad 2008. Dirección General de Epidemiología y Dirección de Información y Estadísticas de Salud. Caracas, Venezuela. [Documento en línea]. Disponible en: http://www.msds.gov.ve/msds/direcciones_msds/Epidemiologia/Estadistica/Archivos/Anuarios.htm
132. Moela-Barrientos E.; Fernández, Tilapa G.; Domínguez-Arrebillaga s.; Llades Aguiar B; Madrid, Marina V. Mensaje De IL-6 En Lesiones Precursoras y Cáncer Del Cervix Uterino Infectado Con Virus Del Papiloma Humano. **Revista FASPYN-Especial Genética**. 2000
133. Molina L. Embarazo en Adolescentes. Fundación Escuela de Gerencia Social. **Ministerio del Poder Popular para la Planificación y Desarrollo**. Caracas. 200. pp 6
134. Monti, P; Leone, B; Marchesi, F; Balsano, G; Zerbi, A; Scaltrini, F; Pasquali, C; Calori, g; Pessi, F; Sperti, C; Di carlo, V; Allavena, P; Piemonti I. The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: Regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. **Can Research**. 2003;63:7451-746
135. 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.
136. Mori M, Sagae S. Recent progress in epidemiologic research of uterine cancer. To Kagaku **Ryoho** 2001 Feb; 28(2):174-8.
137. Morrison F. Natural History of Cervical Infection with Human Papillomaviruses. **Clin. Inf. Dis**. 1994.18: 80-172.
138. Moss RB. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. **Expert Opin Biol Ther** .2004;4:1887-96
139. Mota F, Rayment S, Chong A, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus-related premalignant cervical epithelium. **Clin Exp Immunol**. 1999;116:33-40
140. Mott P. Papillomaviruses in Human Cancer. *C cer*. 1996: Pág. 1692.
141. Muller, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**. 2001; 410:50–56.
142. Muller, W.A .Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Lab. Invest**. 2002:Vol 82: 521-533

143. Munger K, Basile JR, Duensing S. Actividades biológicas y blancos moleculares de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano. **Oncogen**.2001; 20: 7888–98
144. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N. Engl. J. Med**.2003. 348 (6): 518–27
145. Muñoz N, Kato I, Bosch FX, Eluf-Neto J, de San Jose S, Ascunce N. Risk factor for HPV detection in middle-age women. **Sex Transm Dis** 1996; 23:504-10.
146. Murthy NS, Mathew A. Risk factors for pre-cancerous lesions of the cervix.**Eur J Cancer Prev** 2000 Feb;9 (1):5-14.
147. Negus, R., Stamp, G., Hadley, J., Balkwill, F. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. **Am J Pathol**.1997; 150(5):1723-34
148. O' Brien PM, Tsirimonaki E, Coomber DW, Millan DW, Davis JA, Campo MS. Immunoglobulin genes expressed by B-lymphocytes infiltrating cervical carcinomas show evidence of antigen-driven selection. **Cancer. Immunol.Immunother**.2001:Dec 50 (10):523-32.
149. Obermair A, Wanner C, Bilgi S, Speiser P, Kaider A, Renthaller A. Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: correlation of microvessel density with survival. **Am J Obstet Gynecol**.1998; 178(2):314-9.
150. Oscar Peralta-Zaragoza, A. Lagunas-Martinez, Vicente Madrid-Marina. Factor de crecimiento beta-1: estructura, Función y mecanismos de regulación en cáncer. **Salud Pública de Mexico**.2001; 43 (4): 340-351.
151. Padovan P, Salmaso R, Marchetti M, Pavovan R. Prognostic value of bcl-2, p53 and Ki-67 in invasive squamous carcinoma of the uterine cervix. **Eur J Gynaecol Oncol** 2000; 21(3): 267-72.
152. Pananá, E., Camorlinga, M., Maldonado, C. Infección, inflamación y cáncer gástrico. **Salud Pública Mex**.2009. 51:427-433.
153. Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. **Vaccine** .2006; 24 (Suppl. 3):S11-25.
154. Pascale H., y col. Colonization of in Vitro-Formed Cervical Human Papillomavirus-Associated (Pre)Neoplastic Lesions with Dendritic Cells. **American Journal of Patology**.1999 154: 775-784.
155. Pello, J., Rodríguez, L., Martínez, M. Modulación del tráfico leucocitario: Papel de las quimiocinas y de los opioides. **Rev. Inmulog**. 2006: 25(1):39-49.
156. Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. **Ann Rev Me** 1988; 39: 63-73.
157. Pérez R, Lage A. Los factores de crecimiento y sus relaciones con la transformación maligna. **Interf y Biotecn** 1986; 13 (3):179-209

158. Perry ME, Levine A Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. **Current. Opinion in Genetics and Development** 1993, 3: 50-54.
159. Pillai RM, Lakshmi S, Sreekala S, Devi Ganga T, Jayaprakash PG, Rajalakshmi TN et al. High risk Human Papillomavirus infection and E6protein expression in lesions of the Uterine Cervix. **Pathobology** 1998;66:240-6.
160. Rak , J Filmus , R S Kerbel . Reciprocal paracrine interactions between tumor cells endothelial cells: the "angogenesis progression" hypothesis. **Eur J Cancer**.1996;32: 2438-2450.
161. Rivera, R; Agilera, J; Larraín, A. Epidemiología del virus papiloma humano. **Rev. Chil. Obstet Ginecol**. 2002.67(6):501-06
162. Robbins, Cotran, Kumar, Collins.. Patología Estructural y Funcional. **Interamericana Mc Graw Hill**.1999. 6ta edición. Págs 278-346
163. 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.
164. S. Trifari, C.D. Kaplan, E.H. Tran, N.K. Crellin, H. Spits. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T_H-17, T_H-1 and T_H-2 cells. **Nat Immunol**.2009;10: pp. 864–871
165. S.Z. Josefowicz, A. Rudensky. **Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. Immunity**. 2009;30 :pp. 616–625
166. Sallusto, F., Mackay, C., Lanzavecchia, A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. **Annu Rev Immunol**. 2000; . 18:593-620.
167. Sanchez, Y. Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral. **Rev Cubana Invest Biomed**. 2001; 20(3):223-30
168. Santin AD, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Cannon M, Parham GP et al. Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type1 cytoquine expressors and DR+ T cells compared with Lymphocytes from tumor drainig lymph nodes and peripheral blood in patients with cáncer of the uterine cervix. **Gynecol Oncol** 2001 Jun;81(3):424-32.
169. Satin, P; Alessandro, D; Hermonat, A; Ravagri, S; Bellone, S. and Pecorelli, J. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in humanpapillomavirus-epecific CD8+ cytotoxic T mymphocytes. **Journal of Virology**. 2000. p.4729-4737
170. Satos S, Maruta J, Ito K, Kono R, Yajima A, Sasaki, K. Pronostic features of cervical dysplasia, associated with specific types of HPV DNA and cytologic features characteristic of HPV infection in dysplasia. **Acta cytol**.1998
171. Sawaya GF, Harper C, Balistren E, Boggess J, Darney P. Cervical neoplasia risk in

- women provided hormonal contraception without a Papsmear. **Contraception** 2001 Feb;63 (2):57-60.
172. Sayedel-Ahl SA, el Wakil HS, Kamel NM, Mahmot MS. A preliminary study on the relationship between *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer in Egyptian women. **J Egypt Soc Parasitol** 2002 Apr;32 (1):167-78.
173. Schcffner M, Romanczuk II, Munger K, et al: Functions of Human Papillomavirus Proteins. **Curr Top Microbio] Immunol** 1994; 185: 83-97
174. Schwartz RN. Another look at the immunological surveillance. **New Engl Jour Med** 1975; 293: 181-4.
175. Scott, Mark; Stites, Daniel; Moscicki, Anna. Th1 Cytokine Patterns In Cervical Human Papillomavirus Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory immunology**. 1999: p.751-755.
176. Sedjo RL, Roe DJ, Abrahamsen M, Harris RB, Craft N, Baldwin S, et al. Vitamin A, carotenoids and risk of persistent oncogenic human papilloma infection. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2002; 11(9):876-84.
177. Shah KV, Gissman L: Experimental evidence on oncogenicity of papillomavirus. In: Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Eds: Muñoz N, Bosch FX, Jensen OM. **International Agency for Research on Cancer Lyon** 1989. Cap. 5: 105-111.
178. Sheu BC, Lin RH, Ho HN, Huang SC. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. **Hum Immunol** 1997 Aug-Sep; 56 (1-2):39-48.
179. Shirley E. Oho. Libro enfermería oncologica. Tercera edicion volumen 1 cáncer ginecologico.1999. pág. 999
180. Simic MG. DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. **Cancer Res** 1994; 54: 1918s- 1923s.
181. Simpson AJG. The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis. **Adv Cancer Res** 1977; 71:209-40.
182. Skegg DC. Oral contraceptives, parity and cervical cancer. **Lancet.** 2002; 359:1080-1.
183. Stein J. 1991. Medicina Interna. Tomo II .**Salvat Editores S.A.** 3^{era} Edición. 1545
184. Stoler. Mark. La prueba de detección del VPH. Si no ha sido validada clínicamente es peligrosa. **HPV Today.**2009 N° 09.
185. Tanaka H, Yasuda Y, Musha T, Ueda K, Nakamura Y. Hypoxia correlates with angiogenesis in cervical cancers. **Int J Clin Oncol.**2005: 10(1):2.
186. Tartour E, Gey A, Sastre-Garau X, Lombard Surin I, Mosseri V, Fridman WH. Prognostic Value of Intratumoral Interferon Gamma Messenger RNA Expression in Invasive

- Cervical Carcinomas. **J Nat Cancer Inst** 1998 Feb 18;90 (4).
187. Tatti S Colposcopia y Patologías del Tracto Genital Inferior. En la era de la vacunación. **Editorial Médica Panamericana**. Argentina, 2008.95-107; 121-136.
188. Taylor Wharton, Guillermo Tortoleto- Luna. **Cancer Medicine. American Cancer Society**. 5 ed. 2000. Section 31.Cap 112.
189. Tesch, G. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. **Am J Renal Physiol**.2008; 294: 697-701.
190. Tjong, MY; Van der Vange;, Schegget JS; Burger, MP Tjong; Ten Kate, FW. Cytokine in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. **Cytokine**. 2001 14:357-6015-21 de Octubre. Monterrey, Nuevo León, México. Edición Especial. N° 2-2000
191. Torné, A.Zona de transformación anormal. Cambios menores y mayores. Presentado en XVIII Congreso de la AEPCC - GRANADA. Sección de Ginecología Oncológica. ICGON.2006. Hospital Clínico. Barcelona
192. Torrejón, R. Factores de Riesgo de Cáncer Uterino. Estrategias de Prevención. **Salud Total de la Mujer**: 2002; 4:23-31.
193. Torres, J.1996. Manejo de la citología cervical anormal en el Hospital Universitario del Valle: Curso de Patología del Tracto Genital Inferior. HUV: 1996; 43-44.
194. Ung, A; Kramer, T.R; Schiffman, M; Herrero, M; Bratti, M.C; Buró, R.D; Swanson, C.A; Sherman, M.E. Soluble interleukin-2 receptor and cervical neoplasia: result from a population based case-control study in Costa Rica. **Cáncer epidem. Biomarkes prev**. 1999.Mar, 8:3,249-253.
195. Valdez Rodríguez, Jorge Luís y Cue Brugueras, Manuel. El estrés oxidativo y los antioxidantes. **Infomed Cuba**.2000
196. 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.
197. Velásquez-Cruz AD, Barboza-Cerda MC y col. Expresión de IL-10 y TGF- β 1 en lesiones premaligna y malignas en Cervix Uterino. **Revista FASPYN**. México edición especial.2002. N° 2. 14-25
198. Verdessi, A; Peran, F; Espinoza R. Prevalencia de displasia de cuello uterino en pacientes portadoras de virus de papiloma humano. **Ciencia e investigación médica estudiantil latinoamericana**. 2002. Chile. Vol 11. Numero 002
199. Victorin K. Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. **Mutation Res** 1994; 317: 43-55
200. Villegas V. y Col. Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. Colombia Médica. Universidad del Valle,

- Facultad de Salud.**2009: vol. 40 (3): 347-62
201. Villiers E M L, Zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. **J Virol** 1981; 40:932-935.
202. 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.
203. Wang SS, Hildesheim A, Gao X, Schiffman M, Herrero R, Bratti MC et al. Human leukocyte antigen class I alleles and cervical neoplasia no heterozygote advantage. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2002 Apr;11 (4):419-20.
204. Whiteside TL, Herberman RB. Role of human natural killer cells in health and disease. **Clin. Diagn Lab Immunol** 1994;4:102-14.
205. Willemien J, van Driel, Petry Kievit-Tyson, Lambert CJM, van den Broek, Aeilko H et al. Presence of an Eosinophilic infiltrate in cervical squamous carcinoma results from a type 2 immune response. **Gynecologic Oncology** 1999;74:188-95
206. Xie, k interleukin 8 and human cancer biology .**Cytokine growth factor rev.** 2001; 12(4)375-91
207. Zeng, X., Moore, T., Newstead, M., Alcoceba, R., Tsai, W., Standiford, T. Intrapulmonary Expression of Macrophage Inflammatory Protein 1 α (CCL3) Induces Neutrophil and NK Cell Accumulation and Stimulates Innate Immunity in Murine Bacterial Pneumonia **Infect. Immun.** 2003; 71(3):1306-1315
208. Zetter BR.. Angiogenesis and tumor metastasis. **Annu Rev Med** 1998; 49:407-24.
209. Zimmermann FK. Genetic effects of nitrous acid. **Mutation Res** 1977; 39: 127-48.
210. Zinkernagel, R.M. Immunology Taught By Viruses. **Science.** 1996; 271: 173-178.
211. Zinkernagel, R.M. Immunology taught by viruses. **Science.**1996:271:173-178
212. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity.**2000; 12:12 –127
213. Zlotnik, A. Chemokines and cáncer. **Int. J. Cáncer.** 2006; 119:2026–2029.
214. Zur Hausen H. Human genital cancer, synergism between two virus infections and/or synergism between a virus infection and initiating events? **Lancet II.** 1982; 1370-1372
215. Zur Hausen H. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta** 1996; 1288:55-78.
216. Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. **Proc Assoc Am Physicians** 1999;111:581-587.
217. Zur Hausen H: Molecular Pathogenesis of Cancer of the Cervix and Its Causation by Specific Human Papillomavirus, Types. **Current Topics in Microbiology and Immunology** 1994; 186:131-52.

218. Zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary Papillomavirus research. **J Cancer Res Clin Oncol** 1996; 122: 3-13.



VIII.-ANEXOS

HISTORIA CLÍNICA

Fecha: _____

Centro Asistencial: _____

Nombre: _____

Edad: _____

Fecha de Nacimiento: _____

Lugar de Nacimiento: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Estado Civil: Soltera: ___ Casada: ___ Divorciada: ___ Concubina: ___ Viuda: ___

Ocupación: _____

ANTECEDENTES PERSONALES:

Menarquía: _____

Ciclos Menstruales: _____

Embarazos: Sí _____ No _____ N° _____ Partos: _____ Abortos: _____

Cesáreas _____ Embarazos Ectópicos _____ Edad del Primer Parto _____

Menopausia (Edad): _____

Edad de la Primera Relación Sexual: _____ N° de Compañeros Sexuales: _____

N° de Relaciones Sexuales:

Diarias: _____ Semanales: _____ Mensuales: _____ Ocasionales: _____

METODO ANTICONCEPTIVO ACTUAL:

ACO: _____ DIU: _____ Preservativos: _____ Óvulos: _____

Crema: _____ Duchas Vaginales: _____ Inyectables: E/P _____

USO DE DUCHAS VAGINALES:

Si: _____ No: _____

Frecuencia:

Diarias: _____ Semanales: _____ Mensuales: _____ Ocasionales: _____

Sustancia: _____ ¿Desde que edad la usa? _____

TIPOS DE RELACIÓN SEXUAL:

Hábitos Sexuales:

- **Genital:**_____
- **Orogenital:**_____
- **Anal:**_____

HÁBITOS TABAQUICOS:

FUMO: Sí: _____ No: _____ ¿Cuánto tiempo? _____

¿Cuándo lo dejó? _____

¿Cuántos cigarrillos fumaba? _____

FUMA: Sí: ___ No: ___ ¿Desde cuándo fuma? ___ ¿Cuántos cigarrillos fuma?

HÁBITOS ALCOHÓLICOS:

Si: _____ **No:** _____

Diario: _____ **Semanal:** _____ **Ocasional:** _____ **Cantidad:**

Tiempo: _____

HÁBITOS CAFEICOS:

Si: _____ **No:** _____

1 taza diaria: _____ **2 - 4:** _____ **+4:** _____ **Ocasional:** _____ **Tiempo:** _____

ANTECEDENTES DE OTRAS INFECCIONES DE TRANSMISION SEXUAL

(FECHA DE SU DIAGNÓSTICO)

Si: _____ **No:** _____

Sífilis: _____ **Gonorrea:** _____ **Linfogranuloma Venéreo:** _____

Chancro _____ **Blando:** _____ **Chlamydia:** _____ **Herpes**

Genital: _____

Tricomonas: _____

Tratadas: **Si:** _____ **No:** _____ **Control Actual:** _____

Ultima citología Vaginal: _____

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS:

Si: _____ **No:** _____ **Cual?:** _____

Desde cuándo sufre la patología?: _____

INGESTION DE MEDICAMENTOS:

Si: _____ **No:** _____ **¿Cuál?:** _____ **¿Desde cuándo lo toma?:** _____

FLUJO VAGINAL:

Si: _____ No: _____

Desde cuando: _____

Tipo de Flujo: _____

Cantidad:

Escasa: _____ Moderada: _____ Abundante: _____

EXAMEN FÍSICO:

GINECOLÓGICO:

- Vulva: _____
- Vagina: _____
- Cuello : _____
- Citología: : _____
- Colposcopia: : _____
- Biopsia: _____

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN
Proyecto Misión Ciencias LUZPROLAB N° 2007001088
CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNITARIA- INFLAMATORIA EN EL CUELLO
UTERINO EN PACIENTES CON DISPLASIAS DE CERVIX.

PRIMERA PARTE: INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO

1- PROPÓSITO:

El Virus del Papiloma Humano (VPH) representa hoy en día la primera causa de infección por transmisión sexual de origen viral en nuestra población. El **cáncer de cuello uterino** está íntimamente relacionado con la infección previa por VPH y es el cáncer que ocupa el primer lugar en frecuencia en Venezuela. Queremos determinar la frecuencia de la infección por VPH y hacer prevención precoz del cáncer de cuello uterino en las pacientes infectadas.

Es por ello que se propone realizar un estudio clínico durante un período de 3 años en mujeres que acudan a la consulta de Ginecología de diferentes centros de salud de la ciudad de Maracaibo Estado Zulia, Venezuela para **establecer el diagnóstico y la frecuencia de la infección genital por VPH** (detección del ADN del virus) por los métodos moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**) para establecer diagnóstico de infección genital por este virus); de acuerdo a la disponibilidad de reactivos y consumibles en el país y sin compromiso definitivo de reporte de resultados en todos los casos y para todas las pruebas, así como también la determinación de citoquinas y factores de crecimiento en muestras de biopsias de las pacientes bajo estudio.

El examen ginecológico y la toma de muestras para la detección de VPH se harán en las consultas de ginecología. Las muestras serán enviadas para su procesamiento al Laboratorio Regional de Referencia Viroológica y Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina Universidad del Zulia. Los resultados de los exámenes serán manejados con confidencialidad y en caso de que se demuestre infección(es), los médicos investigadores responsables del estudio, Drs: Diana Callejas, Freddy Alaña, José Nuñez (microbiólogos, profesores de la Facultad de Medicina) ofrecerán a las pacientes opciones de tratamiento apropiado que será responsabilidad de los ginecólogos del presente proyecto que forman parte de este estudio.

2- DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO:

Historia Clínica

En la primera visita al Servicio de Ginecología respectivo, se realizará una encuesta médica con formato de historia clínica para recolectar datos personales, familiares, epidemiológicos y clínicos (anexo). La información contenida en esta historia clínica sólo será manejada por los investigadores responsables para ser usada exclusivamente en esta investigación. Luego se procederá al examen ginecológico que incluye la **toma de muestras** de cuello uterino y la **colposcopia** (la colposcopia es un método clínico de ayuda diagnóstica para evaluar con lentes de amplificación, el cuello uterino de pacientes con citologías anormales).

Toma de Muestras

Cuello uterino (hisopados exocervicales y endocervicales)

Las muestras serán tomadas con: espátula de Ayre, aplicadores de algodón o *citobrush* por el ginecólogo en el momento la evaluación de la paciente y orientada a la detección de VPH mediante las técnicas de biología molecular llámese PCR y para el estudio citológico con la coloración de Papanicolaou. Esta toma de muestras no implica riesgo alguno para la paciente.

Biopsias

Sólo cuando el caso lo amerite, y en caso de una lesión previa visualización colposcópica, el ginecólogo tomará una biopsia del cuello uterino previo consentimiento de la paciente. Las citologías y biopsias serán procesadas en el Dpto. de Anatomía Patológica de la Universidad del Zulia y los resultados serán enviados de vuelta al Servicio de Ginecología respectivo.

NOTA: las muestras de biopsia de cuello uterino serán utilizadas para investigar el perfil de expresión de citoquinas y factores de crecimiento en el cérvix uterino de pacientes con displasia del tejido cervical y su relación con la infección por VPH. sólo si usted consiente la utilización de ese material biológico a los fines anteriormente señalados.

3- FASES DEL ESTUDIO

Si acepta participar en este estudio, será evaluada desde los puntos de vista ginecológico y microbiológico, a los fines de diagnosticar y llevar un control estricto de la infección por VPH y de tratar oportunamente cualquier alteración que se produzca en el cuello del útero.

Fase 1: En la primera visita, se hace recopilación de los datos clínicos y recolección de las primeras muestras por hisopado cervical. Procesamiento de las mismas en cuanto al análisis citológico, detección y tipificación de VPH. Toda paciente cuyo resultado de la Citología, Colposcopia y Pruebas de Laboratorio sea positivo para infección por VPH u otra infección de transmisión sexual será candidata para realización de biopsia de cuello uterino y el tratamiento pertinente en cualquiera de las fases del estudio. El tratamiento será efectuado por los médicos ginecólogos del Servicio de Ginecología respectivo. Toda paciente que resulte sin infección o sin alteración del cuello uterino, pasará directamente a la Fase 3 del estudio (nueva consulta ginecológica en 1 año).

Fase 2: previo resultado de la colposcopia con diagnóstico de algún tipo de lesión, será tomada una biopsia la cual también será utilizada para el estudio por inmunofluorescencia indirecta en el epitelio y estroma cervical de áreas con displasia (grados I, II y III) estratificadas por la infección por VPH, y en epitelio y estroma normal de mujeres controles sanas del mismo rango de edad de los siguientes parámetros:

- 1) Presencia de células con expresión de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-2 y su receptor (IL-2R).
- 2) Presencia de células con expresión de citoquinas con actividad anti-inflamatorias: IL-4, IL10 y TGF- β 1.
- 3) Presencia de células expresando GM-CSF y VEGF.

4- Toda paciente participante estará continuamente informada del curso de la investigación, de los resultados de los exámenes y de los tratamientos. Si tiene cualquier duda durante cualquier fase del estudio, queja o molestia, tiene derecho a contactar y ser atendida por los responsables del estudio.

5- Toda paciente está en su derecho de negarse a participar o abandonar el estudio en cualquiera de sus fases sin que ello conlleve represalias o pérdida de algún beneficio.

6- Este estudio no comprende pruebas con fármacos o procedimientos quirúrgicos a menos que el caso y la condición de enfermedad lo amerite, en cuyo caso se le informará oportunamente y dependerá del Servicio de Ginecología.

7- Los beneficios esperados como resultado de la investigación, consisten en el diagnóstico oportuno y veraz de diagnóstico de cáncer de cuello uterino y en particular del VPH así como la detección de citoquinas y factores de crecimiento y el tratamiento según el caso.

8- No se usará ningún resultado de exámenes o imágenes sin su consentimiento expreso y en todo caso se protegerá su identidad.

9- Todos los datos, especialmente los publicados al término de la investigación, mantendrán el compromiso de confidencialidad y sin causar identificación o daño personal.

SEGUNDA PARTE: DECLARACIÓN DE LA PARTICIPANTE VOLUNTARIA

Declaro haber comprendido el propósito y los términos de mi participación en el proyecto de investigación: **CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNITARIA- INFLAMATORIA EN EL CUELLO UTERINO EN PACIENTES CON DISPLASIAS DE CERVIX.**

el cual consiste en un estudio clínico que servirá para establecer el diagnóstico y la frecuencia de la infección genital por VPH así como la detección de citoquinas y factores de crecimiento. Declaro entender también que mi participación es voluntaria y que en cualquier momento de la investigación, puedo retirarme de la misma si así lo deseo, sin que mi decisión conlleve a represalias o a la pérdida de cualquier beneficio como producto de la investigación.

Así lo declaro y firmo en Maracaibo, Venezuela a los _____ días del mes de _____ del año 20_____

Firma o huella dactilar de la Participante

Firma o huella del Testigo:

TERCERA PARTE: DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

Luego de haber explicado detalladamente a la Sra. _____, la naturaleza del protocolo de investigación mencionado, certifico mediante la presente que, a mi leal saber, la participante que firma este formulario de CONSENTIMIENTO comprende los requerimientos, riesgos y beneficios de su participación. Este CONSENTIMIENTO establece un común acuerdo con la persona participante, con el tiempo previo que sea necesario para que esta última pueda ampliar su consulta y comprenderla, de manera que pueda tomar conscientemente la decisión de participar en la investigación.

Dr. Diana Callejas M/ Dr. Freddy Alaña
Universidad del Zulia Facultad de Medicina
Laboratorio Regional Referencia Viroológica
Instituto Investigaciones Clínicas Dr. Américo Negrette.
Avenida 18 Sector Paraíso Maracaibo- Edo Zulia

Se entrega 1 copia para la participante. Se deja en archivo 1 copia para los investigadores-----

A decorative flourish consisting of several black, swirling lines of varying thickness, some ending in small dots, positioned above the text box.

IX.-PUBLICACIONES

Original Article 2012: Sometido arbitraje **Clinical Ovarian Cancer & Others Gynecological Malignancies**

INCREASED CHEMOKINE EXPRESSION AND LYMPHOCYTE INFILTRATION IN HUMAN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND CERVICAL CANCER.

Yenddy Carrero MSc.¹, Diana Callejas PhD.¹, Melchor Alvarez-Mon. MD, PhD², Jesús Mosquera MD³.

¹Regional Laboratory of Virological Reference, Faculty of Medicine, Zulia University, Maracaibo, Venezuela; ²Department of Immune System Diseases and Oncology, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain.

³Institute of Clinical Investigation "Dr. Americo Negrette," Faculty of Medicine, Zulia University, Maracaibo, Venezuela

Running title: Cervical neoplasia and chemokines

Source of support: This manuscript was supported by FONACIT (S1-2002000531) and Mision Ciencias (2007001088).

Financial disclosures and conflicts of interest: There are no financial disclosures from any authors. The manuscript has no conflict of interest.

Condense Abstract

This study shows increased expression of MCP-1, IL-8 and lymphocytes in cervix from patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma.

ABSTRACT

BACKGROUND: *Chemokines play a role in tumor-inflammation and angiogenesis that could be involved in tumor progression. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Interleukin-8 (IL-8) and macrophage inflammatory proteins (MIP) have been identified in tumor tissues of patients with different neoplasias. Therefore, the aim of the current study was to investigate the expression of MCP-1, IL-8 and MIP-1 α , mononuclear leukocyte infiltration and leukocyte/chemokine expression in cervical tissues from patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical carcinoma (CC), and their relationship with human papillomavirus (HPV) infection.*

METHODS: *Indirect immunofluorescence was used to study the expression of MCP-1, IL-8, MIP-1 α and leukocyte infiltration in cervical samples from 55 patients with CIN, 4 patients with CC and 7 normal controls. HPV-DNA and HPV types were identified by the hybrid capture 2 HPV DNA test. **RESULTS:** Increased expression of MCP-1 was observed in CIN not related to degree of neoplasia. IL-8 was observed increased in CIN and CC. Increment of lymphocytes and coexpression of CD3/MCP-1 and CD3/IL-8 were found in CIN and CC. MIP-1 α remained similar to control values. The incidence of HPV infection was 16% in patients with CIN and 100% in patients with CC. No significant differences were observed in the chemokine values from HPV-positive or HPV-negative patients. **CONCLUSIONS:** The increased expression of MCP-1 and IL-8 in cervical neoplasia may lead to tumor progression and the presence of those molecules is most likely not related to the HPV infection.*

Key words: *lymphocytes, chemokines, cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma*