

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

**CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA
INMUNITARIA-INFLAMATORIA EN EL CUELLO UTERINO
EN PACIENTES CON DISPLASIAS DE CERVIX**

**TESIS DOCTORAL
DIANA ESTELA CALLEJAS MONSALVE**

ALCALÁ DE HENARES, 2011

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



**CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA
INMUNITARIA-INFLAMATORIA EN EL CUELLO UTERINO
EN PACIENTES CON DISPLASIAS DE CERVIX**

TESIS DOCTORAL

Diana Estela Callejas Monsalve

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

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a:

- A Dios misericordioso, por permitirme a lo largo de mi vida caminar por la senda del saber.
- A mi hijo Enmanuel, y mi esposo Oswaldo mis dos pilares de apoyo que me permitieron culminar otra etapa de mi vida profesional. Sin ellos no hubiese tenido el estímulo de seguir adelante. Gracias por su enorme paciencia, y por el tiempo que no les he dedicado.
- Mi agradecimiento Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (Condes), y 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.
- A mi querida Universidad del Zulia Institución donde he permanecido desde mis 16 años mozos, y donde en el transcurrir de los años he recibido y sigo recibiendo todos los conocimientos para cada día ser una mejor docente, profesional y ser humano.
- 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.
- Al Dr. **Jesús Mosquera**, tutor, amigo y profesor incondicional, gracias, por sus enseñanzas, tiempo, paciencia y valiosos aportes científicos, por estar siempre dispuestos a orientarme en la realización de este trabajo.
- Al Profesor Dr. **Melchor Álvarez de Mom**, a quien le doy mis respetos y agradecimiento por el apoyo obtenido para el logro de esta importante meta en nuestra formación profesional. Gracias por permitirme formar parte de la

prestigiosa Universidad de Alcalá. Gracias por su dedicación personal al corregirme el manuscrito.

- **A MgSC. Yenddy Carrero**, alumna y amiga, que con toda su juventud se ha convertido en mi orgullo como docente, donde vale decir cuando el alumno es capaz de superar a su profesor. Tú has sido un gran pilar y apoyo para este proyecto.
- A todas mis compañeras Doctorantes quien durante todos estos años permanecemos unidas y solidarias para ver realizado en cada una de nosotras las metas que nos propusimos para la culminación de este compromiso, Gracias...

Quiero agradecer al **Laboratorio Regional de Referencia Viroológica** institución que está bajo mi coordinación, y a todo su personal por facilitarme el camino en esta nueva travesía. Les agradezco su ayuda en una y mil cosas que han ido surgiendo en estos años de trabajo en común ya que siempre he contado con el ánimo el cariño y respeto de muchos de ustedes ya que sin sus estímulos constante, sus ideas, sus consejos y el entusiasmo que han sabido infundir en todo momento, no hubiera sido posible la realización de este trabajo. En este Laboratorio donde han transcurrido 24 años de mi vida, se ha realizado la mayor parte de este trabajo.

- A todos mis alumnos de Pregrado de la Cátedra de Virología, y del Postgrado de Inmunología, sin ellos no hubiese podido llegar hasta aquí.
- Al personal del sub-proyecto 2 FONACIT, especialmente a las Licenciadas **Alinkenia Agelvis y María Elena Castellano**, por su infinita paciencia en las correcciones de transcripción del manuscrito. Gracias amigas.

- A **Leticia y Raimy**, amigas, compañeras, por su paciencia, cooperación y asesoría en el diagnóstico molecular de esta investigación.

- Por supuesto, y tratándose de un proyecto clínico, no podría olvidarme de los médicos y enfermeras que hicieron posible la obtención de las muestras necesarias para asegurar la calidad del trabajo científico, expreso mi agradecimiento al Dr. José Trinidad Núñez, y Dr. Freddy Alaña, por su apoyo clínico y colaboración en la toma de las muestras y hasta el final de este estudio, ambos son un ejemplo a seguir ,y a las *anónimas*, a cada una de las mujeres y comunidades que formaron parte de la población objeto de estudio.

- A las Médico Patólogos **Mariela Delgado y Chiquinquirá Silva** por su aporte y conocimientos, fueron fundamentales en la obtención de los resultados de esta investigación.

- Al Instituto de Investigaciones Clínicas y a la Escuela de Bioanálisis mis dos sitios de trabajos, y donde he aprendido a lo largo de estos años lo que significa hacer docencia e investigación

A todos, muchísimas gracias.

DEDICATORIA

A la memoria de mi adorada madre Celia, fuente de inspiración en mi vida
A mi hijo Enmanuel, la gran razón de mi vida para el logro de mis objetivos

A mi esposo Oswaldo, por su paciencia y apoyo

A ustedes, mis alumnos

LOS AMO.

INDICE

INDICE

	Págs.
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	
SUMMARY	
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Cáncer	1
I.2 Historia	4
I.3 Epidemiología.	6
I.4 Factores de riesgo asociados al cáncer cervicouterino	7
I.4.1 Edad de la primera relación sexual	7
I.4.2 Características del compañero sexual	7
I.4.3 Numero de Compañeros Sexuales	8
I.4.4 Condición socioeconómica y cultural	8
I.4.5 Paridad y edad del primer parto	9
I.4.6 Inmunosupresión	9
I.4.7 Anticonceptivos orales	10
I.4.8 Déficit nutricional	11
I.4.9 Tabaquismo	12
I.4.10 Enfermedades de transmisión sexual	12
I.5 Cáncer de Cuello Uterino y VPH	13
I.6 Agente Etiológico	13
I.6.1 Características del Virus	13
I.6.2 Organización Genómica del VPH	14
I.6.2.1 Región E1	14
I.6.2.2 Región E2	16
I.6.2.3 Región E4	18
I.6.2.4 Región E6	19
I.6.2.5 Región E7	20
I.6.2.6 La Proteína E2 ^ E8	21
I.6.2.7 Proteínas L1 Y L2	21

I.6.2.8 Región Larga de Control (LCR)	22
I.7 Clasificación Genómica del VPH	24
I.8 Diagnóstico Clínico y Molecular de la Infección Genital por VPH	26
I.8.1 Técnicas de Detección Genómica de VPH	27
I.9 Lesiones Malignas Pre-invasivas de Cuello Uterino: Histología, Diferenciación y Diagnostico.	31
I.10 Sistema Inmunitario	35
I.10.1 Células del Sistema Inmunitario	37
I.10.1.1 Linfocitos	38
I.10.1.2 Linfocitos T	38
I.10.1.3 Linfocitos B	40
I.10.1.4 Células NK	42
I.10.1.5 Células Accesorias	42
I.10.2 Moléculas Del Sistema Inmunitaria. Citoquinas	45
I.10.2.1 Citoquinas Producidas en la Respuesta Inmune Innata	48
I.10.2.1.1 Interleucina 6 (IL-6)	49
I.10.2.1.2 Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	49
I.10.2.1.3 Interleucina 10 (IL-10)	50
I.10.2.2 Citoquinas producidas en la Respuesta Inmune Adaptativa	51
I.10.2.2.1 Interleucina 2 (IL-2) y Receptor de Interleucina 2 (IL-2R)	52
I.10.2.2.2 Interleucina 4 (IL-4)	54
I.10.2.2.3 Factor de Crecimiento Transformante (TGF)	54
I.10.2.2.4 GM-CSF	55
I.10.2.2.5 Interferón (IFN)	56
I.10.2.2.6 Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)	57
I.11 Respuesta Inmunitaria e interacción Virus- Huésped en infección por VPH	58

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

II.1 Objetivo General	64
II.2 Objetivos Específicos	65

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño del estudio	67
III.1.1 Tipo de diseño	67
III.1.2 Periodo de estudio	67
III.1.3 Área de estudio	67
III.1.4 Selección y procedencia de la población	67
III.1.5 Población de estudio	68
III.1.6 Criterios de Inclusión	68
III.1.7 Criterios de Exclusión	68
III.1.8 Criterios Bioéticos	68
III.2 Grupos de estudio	69
III.2.1 Grupo 1	69
III.2.2 Grupo 2	69
III.2.3 Grupo 3	69
III.2.4 Grupo 4	69
III.3 Toma de Muestra para el estudio Histológico y Determinación de Citocinas y Factores de Crecimiento	69
III.4 Estudio Histológico	70
III.5 Estudio Inmunohistológico	70
III.5.1 Determinación de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-6 en tejido por Inmunohistoquímica	70
III.5.2 Determinación de IL-2R e IL-10 en Tejido por Inmunohistoquímica	71
III.5.3 Determinación de GM-CSF Y TGF- β 1 En Tejido Por Inmunohistoquímica	71
III.5.4 Determinación del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)	72

III.6 Toma de muestra para el Diagnostico de VPH	73
III.7 Detección y Tipificación del VPH Mediante Identificación Genómica: HPV fast (PHARMAGEN S.A)	73
III.8 Análisis Estadístico	74
III.9. Búsqueda Bibliográfica	74
IV. RESULTADOS	
IV.1 GRUPO I: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-6 en pacientes con lesiones preinvasivas del cuello uterino y en controles	76
IV.2 GRUPO 2: IL-10 y IL-2R en pacientes con lesiones preinvasivas de cuello uterino y controles	81
IV.3 GRUPO 3: GM-CSF y TGF- β 1 en pacientes con lesiones preinvasivas de cuello uterino y controles	84
IV.4 GRUPO 4: VEGF en pacientes con lesiones preinvasivas de cuello uterino y controles	86
IV.5 Expresión de citoquinas y factores de crecimiento de acuerdo al tipo de lesión encontrada e infección por el virus de papiloma humano	88
IV.6 Expresión tisular de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 E IL-6 en relación a la Infección por VPH	88
IV.7 Porcentaje de controles y pacientes que expresaron citoquinas en relación al tipo de lesión y a la infección con el VPH	90
V. DISCUSIÓN	100
VI. CONCLUSIONES	111
VII. BIBLIOGRAFÍAS	113
VIII. ANEXOS	125

Índice de Figuras

	Págs.
Figura 1 Teoría de la Vigilancia Inmunológica .	1
Figura 2 Mecanismo de Acción de los Oncogenes y Genes Supresores de Tumores	3
Figura 3 Organización del Genoma del VPH.	14
Figura 4 E1, E2 y la replicación	17
Figura 5 Interacción de E2 Con LCR y con otras Proteínas E2	18
Figura 6 Efecto de E6 y E7 en el Ciclo Celular	21
Figura 7 Región Larga de Control LCR	23
Figura 8 Dinámica de la infección por VPH en Cuello Uterino	24
Figura 9 Primers usados en la identificación Molecular del VPH	30
Figura 10 Cortes Histológicos de Neoplasia Intraepitelial Cervical	33
Figura 11 Principales Componentes que Conforman el Sistema Inmunitario	36
Figura 12 Características Funcionales Principales de las Células del Sistema Inmune	38
Figura 13 Reconocimiento de Antígenos por Linfocitos TCD4 Y TCD8	40
Figura 14 Estructura de un Monómero de Inmunoglobulina	41
Figura 15 Receptores para IgG e IgE de las Células Accesorias	43
Figura 16 Señales Coestimuladoras positivas y negativas en la Activación del Linfocito T	44
Figura 17. Efecto Paracrino, Endocrino y Autocrino de las Citoquinas	45
Figura 18. Mecanismo de Acción del INF γ en la Respuesta Inmunitaria	57
Figura 19. Respuesta Inmune en la Infección por VPH	61
Figura 20. Expresión de IFN- γ en tejido de cuello uterino en pacientes y controles distribuidos según el grado de lesión	78
Figura 21 Expresión de TNF- α en tejido de cuello uterino en pacientes y controles distribuidos según el grado de lesión	78
Figura 22. Expresión de IL-2 en tejido de cuello uterino en pacientes y	79

controles distribuidos según el grado de lesión	
Figura 23. Expresión de IL- 4 en tejido de cuello uterino en pacientes y controles distribuidos según el grado de lesión	79
Figura 24. Expresión de IL-6 en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión	80
Figura 25. Tejido de cuello uterino expresando células IL-2 positivas	80
Figura 26. Expresión de IL-10 en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión	82
Figura 27. Expresión de IL2-R en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión	82
Figura 28. Tejido de cuello uterino mostrando células IL-10 positivas	83
Figura 29. Tejido de cuello uterino expresando células IL-2R positivas	83
Figura 30. Expresión de GM-CSF en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión	85
Figura 31. Expresión de TGF β 1 en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión	85
Figura 32. Expresión de VEGF en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión	87
Figura 33. Tejido de cuello uterino de paciente con NIC III expresando células VEGF positivas.	87
Figura 34. Células positivas para IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , e INF- γ detectadas en biopsias de cuello uterino de pacientes y controles	89
Figura 35. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-2 en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH	90
Figura 36. Porcentaje de pacientes que expresaron TNF- α en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH	91
Figura 37. Porcentaje de pacientes que expresaron IFN- γ en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH	92
Figura 38. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-6 en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH	93
Figura 39. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-4 en tejido uterino	94

de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH

Figura 40. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-10 en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH 95

Figura 41. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-2R en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH 96

Figura 42. Porcentaje de pacientes que expresaron GMCSF en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH 97

Figura 43. Porcentaje de pacientes que expresaron TGF- β 1 en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH 98

Figura 44. Porcentaje de pacientes que expresaron VEGF en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH 99

Índice de Tablas

	Págs.
Tabla 1. Principales Tipos de VPH y sus Propiedades Clínicas	26
Tabla 2 Clasificación y nomenclatura de las citoquinas	47
Tabla 3 Citoquinas, fuente y principales funciones	48
Tabla 4. Distribución de VPH de acuerdo al grupo de estudio y grado de lesión encontrada	88

ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

VPH: Virus del Papiloma Humano.

IL-2: Interleucina 2

IL-10: Interleucina 10

IL-2R: (CD25) receptor para interleucina 2

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

CaCu: Cáncer De Cuello Uterino

SI: Sistema Inmunitario

IL-1: Interleucina 1

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-13: Interleucina 13

IFN: Interferón

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

F (ab)'2: Molécula compuesta por dos subunidades Fab y la región de la bisagra, con enlaces disulfuro intercadena H

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

IgG: Inmunoglobulina G

NaCl: Cloruro de Sodio

PBS: Buffer Fosfato Salino

CD4⁺: Células T restringidas por el MHC de clase II (Ayudadoras)

CD8⁺: Células T restringidas por el MHC de clase I (Supresoras, citotóxicas)

NK: Células Asesinas Naturales

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

TBE: Tris borato

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

LAK: Células Asesinas Activadas por Linfocinas

PGE₂: Prostaglandina E₂

GM-CSF: Factor estimulador de colonias granulocito macrofágico.

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1.

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

NaCl: Cloruro de sodio.

NK: Células asesinas naturales.

CCV: Citología cérvico-vaginal.

CU: Cuello uterino.

CD: Células dendríticas.

CL: Células de Langerhans.

SUMMARY

SUMMARY

Diana Callejas M. **CHARACTERIZATION OF INFLAMMATORY IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH INTRAEPITHELIAL LESIONS OF THE CERVIX.**
Tesis Doctoral. Universidad Alcalá de Henares 2011.

Introduction: Uterine cervix cancer is one of the most prevalent pathologies in the world. According to Health World Organization is the second cause of mortality by cancer in women. Molecular studies have shown the association between intraepithelial neoplasia and human papilloma virus (HPV) infection, suggesting a role of this virus in the progression of cervix intraepithelial lesions. **Aims:** To determine the cytokine and growth factor profiles in uterine cervix of patients with intraepithelial dysplasia and their association with dysplasia grades and HPV infection. **Materials and Methods:** Four groups of patients (n= 183) were studied in different periods of time and obtained from a population of 500 women from different health centers. Controls are uterine cervix samples from healthy women. Tissue expression of cytokine and growth factors (TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-2R, GM-CSF, TGF- β 1 and VEGF) were determined by indirect immunofluorescence and HPV infection by polymerase chain reaction. Cells were counted in stroma and epithelial zones and the mean \pm SD in X400 field was obtained. Statistical analysis was performed comparing means of patients vs. control and means of cytokine expression vs. HVP infection. **Results:** Increased IFN- γ , TNF α , IL-6, IL-10, GM-CSF, TGF- β and VEGF expressions in the intraepithelial lesions were observed. Increments of IFN- γ , TGF- β , VEGF were related to dysplasia grades. IL-2 expression was found decreased and its receptor (IL-2R) increased related to dysplasia grades. IL-4 remained unaltered. HVP infection was not associated to the expression of cytokines and growth factors. **Conclusions:** The present study showed a heterogeneous cytokine and growth factor profiles, may be related to progression or inhibitions of intraepithelial neoplasia. The role of HVP infection was not relevant in these profiles, suggesting that the local immune response to the neoplasia was predominant to the modulation by external factors such as viral infection.

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

I.- INTRODUCCION

I.1.- CANCER

Se entiende por cáncer una enfermedad neoplásica que se produce por el crecimiento exacerbado de células transformadas, que proliferan de manera anormal y descontrolada dentro del organismo como consecuencia de una serie de alteraciones del ADN (Ácido Desoxirribonucleico). Estas anomalías genéticas pueden tener diferentes mecanismos etiopatogénicos entre los que incluyen errores aleatorios de réplicas, exposición a carcinógenos o diferencias de los procesos de reparación del ADN (*Kasper D, 2005*).

De forma más amplia, el cáncer se refiere a todos los tipos de neoplasias malignas, que a pesar de sus diferentes tipos de origen y manifestaciones clínicas, velocidad de evolución, vía de propagación y diagnóstico final comparten ciertos atributos fundamentales que los diferencian de otras enfermedades. Estos atributos son sus capacidades para crecer, invadir, metastatizar y dañar el tejido del huésped así como su principal característica, “la autonomía” (*Pérez R, 2004*).

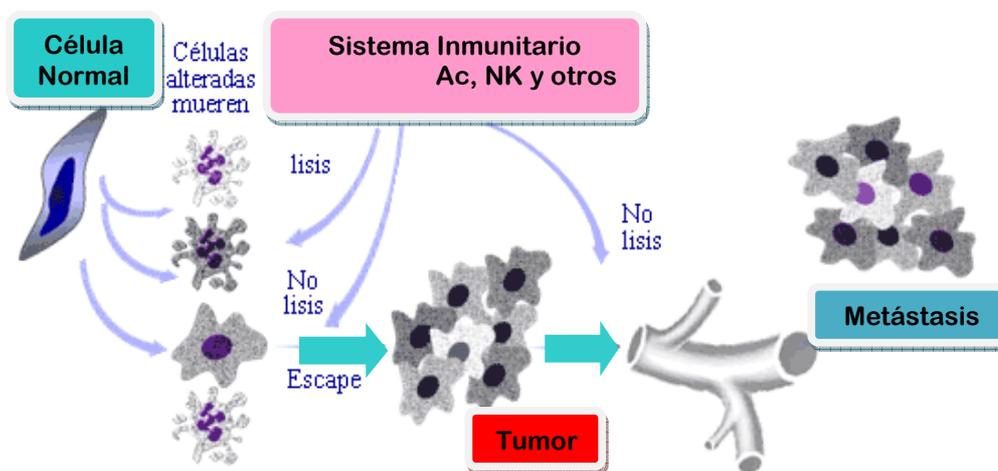


Figura 1. La teoría de la vigilancia inmunológica frente al tumor supone que las células tumorales poseen antígenos, que no se encuentran en las células normales y que en consecuencia son reconocidos por el sistema inmunitario y destruidas. Ramírez, Pera y Pena. Malignización, Acción antitumoral, Antígenos

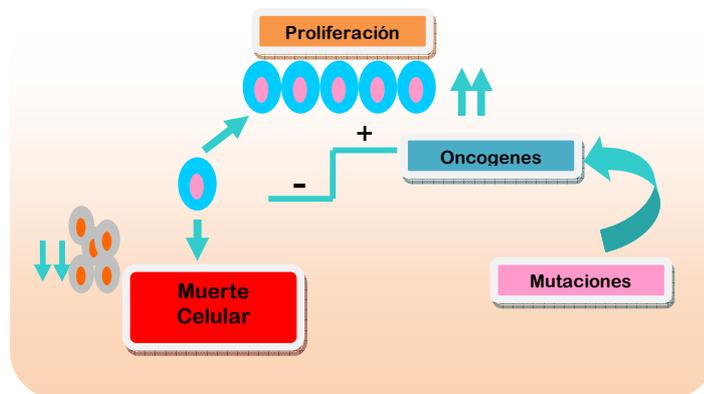
tumorales, Escape tumoral, Diagnostico inmune, Inmunoterapia, Inmunología Tumoral Capitulo 24. Disponible www.vi.cv.com.

El descubrimiento en 1953 de la estructura del ADN y la transmisión de la información genética a las células hijas, llevó a poner en evidencia, que las 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 delección 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.

A.- Oncogenes:



B.- Genes Supresores de Tumores

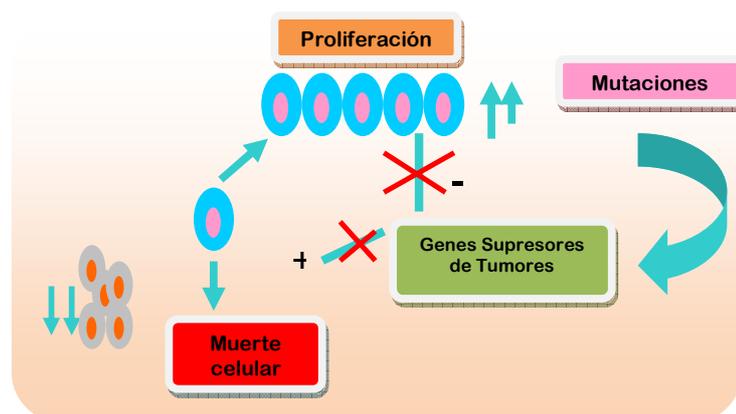


Figura 2 Mecanismo de Acción de los Oncogenes y Genes Supresores de Tumores. Callejas 2010.

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 un individuo (**Simpson AJG, 1977**).

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 (virus de papiloma humano y el herpes virus tipo 2), y la producción de radicales libres, entre otros, todos ellos considerados cofactores en la génesis del cáncer cervical (**Simpson AJG, 1977**).

I.2.- 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 cervix 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.3 EPIDEMIOLOGIA

El cáncer cervical es considerado actualmente la neoplasia más frecuente en la población femenina. Anualmente se diagnostican 437.000 nuevos casos a nivel mundial y se estima que mueren 231.000 mujeres como consecuencia de esta enfermedad. De ese total, el 80% son mujeres que viven en países pobres o en desarrollo (**Parkin DM, 2006**). Según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), los carcinomas del tracto anogenital, particularmente el cáncer de cuello uterino (CaCU), representan el 12 % de todos los canceres en las mujeres; el CaCu ocupa el segundo lugar en incidencia a nivel mundial (52.000 nuevos casos/año), después del cáncer de seno (**Ferlay J, 2002**). En España, el cáncer invasor de cuello uterino es el sexto más frecuente, constituye el 4,8% de los cánceres en la mujer (**Miñarro R, 2000**), una de las tasas más bajas del mundo, entre 3,4 y 12,2 casos por 100.000 mujeres/año (**Parkin DM, 2002**). La tasa de mortalidad es de 2,7 por 100.000 mujeres/año, semejante al promedio europeo (**De Sanjosé S, 2006**). En América Latina se estiman al menos 76 000 casos de CaCu y 30.000 muertes, representando 16 y 13 % del total del mundo, respectivamente (**Parkin DM, 2006**). En Colombia, también constituye la segunda causa de mortalidad en mujeres (16/100. 000) y registra una incidencia de 32 por cada 100. 000 mujeres (**Oliveros J, 2006**). En Venezuela se describieron 18.543 (15,32%) muertes para el año 2006, donde el grupo de edad más afectado por el CaCu es el de 45-64 años con 942 defunciones seguido por el de 25-44 con 478 muertes (**Oliveros J, 2006**). En el Estado Zulia se reportaron 296 muertes por esta causa.

Estudios realizados indican que para el año 2010 el porcentaje de la región se podrá incrementar hasta un 9.5%, así mismo la Organización Mundial de la Salud (OMS) proyecta que para el año 2015 dos tercios de los 15 millones de nuevos casos de cáncer se producirán en los países en desarrollo (**Rodríguez D, 2006**).

I.4 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A CANCER CERVICOUTERINO

La evidencia epidemiológica sugiere, desde hace varios años, que el cáncer cervical se comporta como una enfermedad de transmisión sexual por lo que sus factores de riesgo tienden a ser similares a los de este grupo de enfermedades, es decir, el inicio de relaciones a edad temprana, promiscuidad, bajo nivel socioeconómico, paridad, edad del primer parto, inmunosupresión, uso de anticonceptivos orales (ACO), déficit nutricional, tabaquismo y antecedentes de infecciones de transmisión sexual (ITS) provocadas por virus del herpes simple tipo 2, *Chlamydia trachomatis*, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del papiloma humano (VPH), este último considerado un potencial cofactor en la génesis del cáncer cervical (**Valencia A, 1998, Valdespino V, 2004**).

I.4.1 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.4.2 Características De La Pareja Sexual. Diversos estudios sugieren que una mujer posee mayor riesgo de contraer la enfermedad debido a las características de su compañero sexual, aunque no satisfaga las condiciones de relaciones sexuales precoces y múltiples compañeros; de hecho, la historia sexual de su compañero podría ser tan importante como la propia (**Bosch FX, 2002**). En un estudio realizado se encontró que los compañeros de las mujeres que integraban el

grupo de casos con cáncer habían tenido mayor número de parejas que las mujeres control; de la misma forma se halló que habían tenido la primera relación sexual a edad más precoz y mostraban una historia mayor de infecciones de transmisión sexual. Otras características que presentaban con mayor frecuencia eran las relaciones con prostitutas, el hábito de fumar y el poco uso de preservativos (**Schlecht NF, 2001**).

Además, una mujer tiene alto riesgo de lesión intraepitelial si sus compañeros sexuales tienen antecedentes de cáncer de pene, o haber estado casado anteriormente con una mujer con neoplasia cervical (**De Sanjosé S, 1993**).

I.4.3 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.4.4 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**).

En diversos estudios se ha demostrado que en Estados Unidos las mujeres de ascendencia hispánica o africana tienen más riesgo de adquirir VPH y padecer lesiones pre malignas y malignas del cuello uterino; sin embargo, este aspecto de raza es más un marcador de riesgo que un evento causal por sí mismo, en la medida que las poblaciones con este antecedente son más pobres y tienen conductas de mayor riesgo que sus contrapartes caucásicas (**Judge, DE, 2002**).

I.4.5 Paridad Y Edad Del Primer Parto. Se ha establecido que mujeres con dos o más hijos tienen un riesgo 80% mayor respecto de las nulípara de presentar lesión intraepitelial; luego de cuatro hijos dicho riesgo se triplica, después de siete se cuadruplica y con doce aumenta en cinco veces (**Castañeda-Iñiguez MS, 1998**). A pesar de no existir ninguna explicación definitiva para este fenómeno, se cree que la inmunosupresión del embarazo o su influjo hormonal aumentan la susceptibilidad a la infección por VPH. Bosch demostró cómo la presencia de uno o más partos antes de los 22 años cuadruplica el riesgo de neoplasia del cuello uterino (**Bosch FX, 2002**).

I.4.6 Inmunosupresión. La respuesta inmunitaria 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.

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 neutrófilos disminuida. Un ejemplo evidente ha sido demostrado en pacientes infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 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 inmunitaria contra la progresión de la enfermedad. Además, el comportamiento de los mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria en pacientes con lesiones del

cuello uterino, varían según el estadio y el tipo de VPH que infecta (**León G, Bosques O, 2005**).

I.4.7 Anticonceptivos Orales. Aunque no existen evidencias, se cree que su uso prolongado se asocia con mayor riesgo de lesión intraepitelial. En un estudio multicéntrico realizado por la International Agency for Research of Cancer (IARC), encontró que el uso de anticonceptivos orales por menos de cinco años no se relacionaba con la presencia de CaCu. El riesgo aumentó para las pacientes que los usaban entre cinco y diez o más años (**Moreno V, 2002**).

En algunos estudios se ha investigado a mujeres positivas para VPH sin encontrar asociación con este factor. Se plantea que esta asociación con el cáncer tiene probablemente más una relación con el comportamiento sexual que por efecto directo; se ha visto que las mujeres que han utilizado anticonceptivos orales por menos de cinco años tienen el mismo riesgo que aquellas que nunca los han utilizado, pero puede subir hasta cuatro veces cuando el uso es mayor de diez años (**Mohar A, 1997**), además se ha descrito que 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.

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, 2000**). Existen regiones de regulación de la transcripción del ADN viral que contienen elementos de reconocimiento a hormonas y que aumentan el nivel de expresión de 2 genes virales, E6 y E7 (**León G, Bosques O, 2005**).

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 (**León G, Bosques O, 2005**).

También los esteroides inhiben la efectiva respuesta inmunitaria 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, 1997**).

I.4.8 Déficit Nutricional. 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 ("imprinting" genómico) son inactivos, mientras que los no metilados o hipometilados pueden ser transcritos para generar un producto proteico. La pérdida del "imprinting" en los fenómenos de carcinogénesis podrían vincularse con factores fisiológicos, ambientales y dietéticos, que poseen la capacidad de metilar al ADN (**Gómez 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**).

I.4.9 Tabaquismo. Existe una relación directa entre el riesgo de lesiones preinvasoras y la duración e intensidad del hábito. En promedio se considera que las fumadoras tienen doble riesgo de lesión intraepitelial con respecto de las no fumadoras. Experimentalmente se ha demostrado la presencia de nicotina, cotinina y otros mutágenos derivados del tabaco, en mujeres fumadoras con lesión intraepitelial. Además, es bien conocido el daño molecular del ADN del tejido cervicouterino en mujeres que fuman. De igual manera, se postula que el tabaco induce un efecto inmunosupresor local. Diferentes estudios han encontrado mutágenos en el moco cervical, algunos a concentraciones muy superiores a las sanguíneas, lo que sugiere un efecto carcinogénico directo, aunque no es posible separar el hecho de las conductas de riesgo para adquirir VPH que se asumen con más frecuencia entre las mujeres fumadoras (**Thun MJ, 2000**).

I.4.10 Enfermedades 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 multicentro 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 (**Woodman Ciaran BJ, 2007, Lizano-Soberón M, 2009**).

I.5 CANCER DE CUELLO UTERINO Y VPH

Los virus oncogénicos desempeñan un papel etiológico de gran importancia en varios de los tumores malignos que afectan al hombre. Los estudios moleculares han demostrado la relación entre las células intraepiteliales y escamosas de cérvix con numerosas infecciones inducidas por los virus Epstein Barr, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), herpes virus tipo II (VSH-2), citomegalovirus (CMV) y particularmente por el Virus de Papiloma Humano (VPH). Observaciones clínicas y estudios moleculares han permitido establecer un importante papel del VPH en el origen de las lesiones preinvasivas de cuello uterino. Desde hace casi 30 años se sugirió que el Virus del Papiloma Humano (VPH) era el agente causal del cáncer de cérvix uterino (**Zur Hausen H, 1977**). Esta idea le concedió el Premio Nobel en 2009 al profesor Harald Zur Hausen. Actualmente se ha establecido que la infección persistente por tipos oncogénicos de VPH es la causa necesaria del cáncer de cérvix. Mediante múltiples estudios epidemiológicos, moleculares y clínicos se ha demostrado que esta neoplasia es una secuela de una infección no resuelta de ciertos genotipos de VPH (**Bosch FX, 2002**). En esencia, todos los cánceres de cérvix contienen DNA de algún tipo de VPH de alto riesgo. 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. El VPH ha sido considerado un factor importante en el origen y evolución de las lesiones pre-malignas del CaCu; sin embargo, la exposición al virus no es suficiente para originar o causar una neoplasia intraepitelial cervical (**Lizano-Soberón M, 2009**).

I.6.- AGENTE ETIOLOGICO

I.6.1 Características Del Virus. El VPH es un miembro del género A de la

familia Papovaviridae, es un virus sin cubierta que mide de 50 a 55 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 (**Braunwalal E, 1999, Muñoz N, 2003**).

I.6.2 Organización Genómica Del VPH. El genoma viral está organizado y dispuesto en bloques separados que consisten en regiones de lectura abierta (ORF, 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 tardíos (L) que codifican proteínas de la cápside (L1 y L2); además poseen una región denominada región reguladora ascendente (URR) o región larga de control (LCR), que contienen secuencias para la replicación y expresión genética del VPH (**McMurray HR, 2001, Lizano-Soberón M, 2009, López-Saavedra A, 2006**).

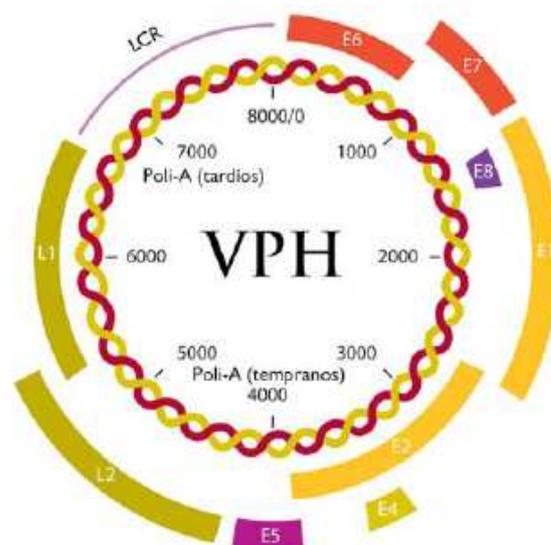


Figura 3. Organización del Genoma del VPH. López Saavedra y Lizano Soverol. Cancerología 2006.

I.6.2.1 Región E1. El gen E1 es el más grande y de los más conservados de los VPH, presenta 2 Kb de secuencia y de 67.5 (VPH 47) a 76.2 kDa (VPH 10)

para la proteína nuclear de 593 (VPH 48) a 681 aminoácidos (VPH 10). La proteína se divide en tres regiones: un dominio amino terminal, que se sospecha regula las actividades de E1 residentes en el C-terminal, pues es blanco de una serie de fosforilaciones que influyen positiva o negativamente en la función; una región espaciadora de longitud variable y una región carboxilo terminal más grande, relacionada en función a las ATPasas y helicasas. E1 es una 3' → 5' helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del ADN viral.

Estas funciones de ATPasa y de helicasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática y se hallan codificadas en el dominio carboxilo terminal. E1 se une al origen de replicación, en una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T que se halla en la LCR, formando hexámeros y dobles hexámeros. El hexámero rodea al ADN de modo que el sustrato pasa a través del centro del anillo hexamérico (**Fouts ET, Yu X, 1999, Liu JS, Kuo SR, 1998**). La unión de E1 al sitio de origen causa una curvatura, vital para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación y para las primeras etapas de desenrollamiento de la doble hélice (Figura 4) (**Gillitzer E, 2000, Gillette TG, 1994**). E1 interactúa directamente con la ADN polimerasa α , mientras que esta necesita las proteínas RPA (Proteína de Replicación A), que estabilizan la cadena sencilla del dúplex abierto, topoisomerasas I y II y los cofactores PCNA y RFC (Factor de Replicación C) para que se lleve a cabo la replicación. La unión de E1 a su sitio en la LCR depende a su vez de su acoplamiento con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice. Las interacciones E2-E1 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 a un complejo inicial E2-E1-ADN. Conforme se ensamblan oligómeros más grandes de E1, E2 es finalmente desplazado mediante una reacción dependiente de ATP. Se ha demostrado recientemente que el dominio de unión al ADN de E1 (E1DBD) estimula la actividad transcripcional de E2 dependiente de E1, lo que sugiere que la interacción E1DBD - E2TAD funciona más en la regulación de la actividad transcripcional que en la replicación del ADN viral.

I.6.2.2 Región E2. El producto del gen E2, de aproximadamente 1100 pb, es una proteína nuclear de 45 kDa. Se divide en tres dominios funcionales. El primero, en el extremo amino terminal, es el dominio de activación (E2TAD), responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. Promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes, provocando una curvatura en la molécula de ADN y otros cambios conformacionales (Figura 5) (**McBride A, 1997, Hegde RS, 2002**). El segundo dominio es el de bisagra o dominio central, de longitud y secuencia más variables entre los VPH. En el subtipo 11 es importante para regular la función de E2 durante la transcripción del ARNm y la replicación viral, además que le da estabilidad al complejo E2 - ADN. El tercer dominio, en el extremo carboxilo terminal, es de dimerización y de unión al ADN, de casi 100 aminoácidos E2 se une al palíndromo de 12 pb ACCgNNNNcGGT, llamado el sitio de unión de E2 (E2BS), que sufre un cambio de conformación al unirse a la proteína. Las letras en minúsculas son las bases preferenciales pero no requeridas para la unión al ADN. La región NNNN se llama espaciadora, su longitud es conservada entre los diferentes tipos de VPH pero la secuencia varía con el genotipo viral. El genoma de los VPH-AR contiene 4 sitios E2BS ubicados en la LCR, que se hallan hacia el extremo 5' del promotor viral que regula la expresión de los genes tempranos. La unión de E2 al ADN provoca la represión o activación de dicho promotor y la replicación del ADN viral. A su vez, estas funciones dependen de la concentración intracelular de E2, así como del sitio, de los cuatro existentes, al que se haya unido. La unión al sitio más próximo del promotor, BS1, no solo interfiere con la unión de TBP a la caja TATA, sino también afecta la estabilidad del complejo de preinicio de la transcripción una vez que TBP ya se unió a su sitio. La unión a los sitios BS2 y BS3 también contribuye a la represión del promotor compitiendo con factores de transcripción como SP1. La unión a BS3 es necesaria para la replicación viral. E2 es más afín a BS4 y la unión a este sitio regula positivamente la expresión génica, aunque los mecanismos para que se lleve a cabo no son del todo claros. E2 puede también activar al complejo de preinicio de la transcripción (PIC) e influye en el remodelaje de la cromatina (**Lefebvre O, 1997**); interactuando con el coactivador CBP/p300, el cual se sabe

tiene una actividad de acetilación de histonas (HAT). La interacción es débil pero se sabe que E2 también se une a la proteína celular AMF-1/Gps2, quien también interactúa con el coactivador p300. Por tanto, la unión de E2 a AMF-1 atrae a p300 y el resultado es la sobreexpresión génica por un efecto aditivo (**Peng YC, 2000**). E2 también tienen una función anti proliferativa, pues puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, en parte mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como por el consecuente aumento de P53 (**Demeret C, 1997, Desaintes C, 1997, Desaintes C, 1999**), E2 induce arresto en G1 por medio de la activación del complejo p21/ WAF, inhibidor del complejo ciclina E/CDK2. Este arresto lleva a la célula transformada por VPH a senescencia. La reintroducción de E2 en células HeLa provoca muerte por apoptosis (**Desaintes C, 1997**). A diferencia del arresto en G1, esta apoptosis inducida puede ser tanto independiente de P53, como de secuencias virales (**Desaintes C, 1999**).

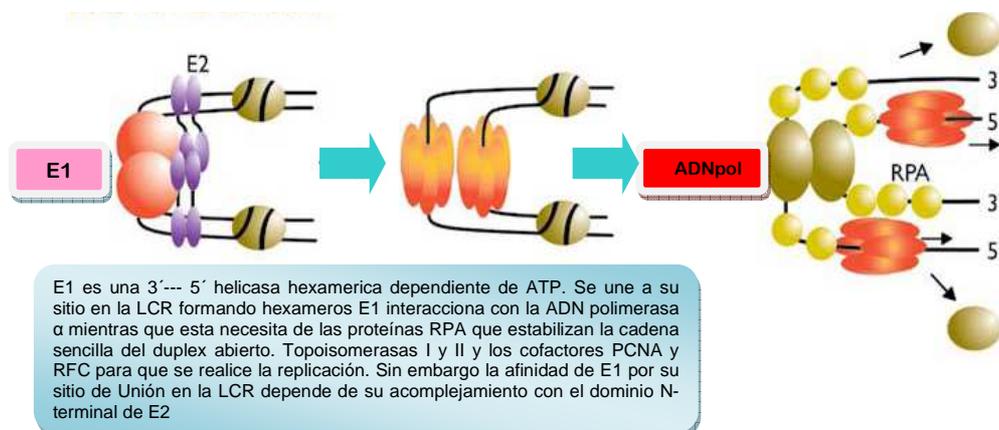


Figura 4. E1, E2 y la replicación. López Saavedra y Lizano Soverol. Cancerología 2006.

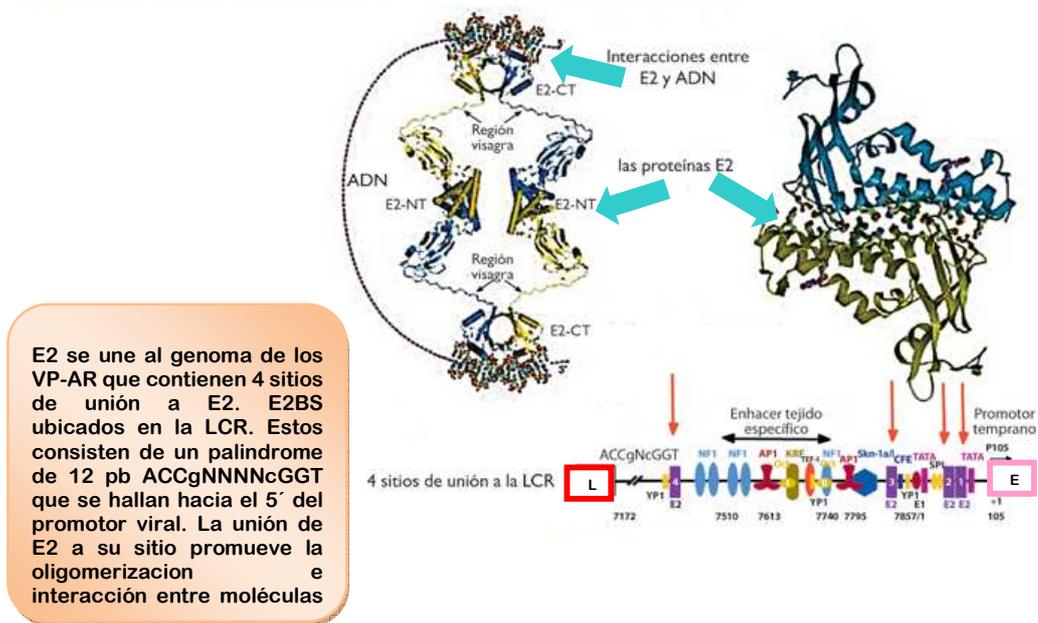


Figura 5. Interacción de E2 Con LCR y con otras Proteínas E2. López Saavedra y Lizano Soverol. Cancerología 2006

I.6.2.3 Región E4. La secuencia codificante de E4 es de aproximadamente 260 pb, está contenida dentro del marco de lectura de E2. La proteína E4, posee de 10 a 44 kDa, se expresa a partir de un ARNm procesado (E1^ΔE4) de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del ADN viral (**Doorbar JA, 1990, Nasser M, 1987, Breitburd F, 1987**). La expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza en parte en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma (IF) durante las LSIL causadas por VPH 16, pero también se halla de manera difusa en regiones perinucleares y citoplasmáticas. E4 causa el colapso de dichas queratinas y esto se ha relacionado con la liberación de los viriones. E1^ΔE4 de VPH 16 causa arresto en la fase G2 del ciclo celular cuando se expresa en células HeLa y SiHa. Esto sugiere un papel antagónico con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como el requerimiento de E1^ΔE4 y E2 para inhibir la

división celular durante el ciclo viral (**Deborah E, 2002**). E4 puede expresarse junto con E1 y E2 durante la infección. El hecho de que ambas proteínas, E2 y E4, pueden inhibir el ciclo celular, sugiere que cooperan durante el ciclo viral. La expresión elevada de E2 y E4 en células epiteliales en cultivo provoca la acumulación de E2 en el citoplasma y colocalización de esta con E4. La adición de E4 incrementa o disminuye la transcripción mediada por E2, dependiendo de las concentraciones relativas de ambas proteínas. A las concentraciones fisiológicas hay un incremento de la actividad transcripcional del promotor P97. Esta evidencia sugiere que durante la infección productiva, E4 regula los niveles de la proteína nuclear E2 para facilitar la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas (**Sorathia, Davy C, 1999**).

I.6.2.4 Región 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, 2001, Mantovani F, 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, 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 destruiría a una célula infectada por VPH antes de que se dé la replicación de esta. Por tanto la modulación de los niveles de P53 por parte de E6 es importante para una infección productiva (**Krajewski S, 1996**).

I.6.2.5 Región 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. 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, Factor de transcripción AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27 (Inhibidores de cinasas). Como resultado de la liberación de E2F se expresa la 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 (**Boyer SN, 1996, Munger K, 2001**).

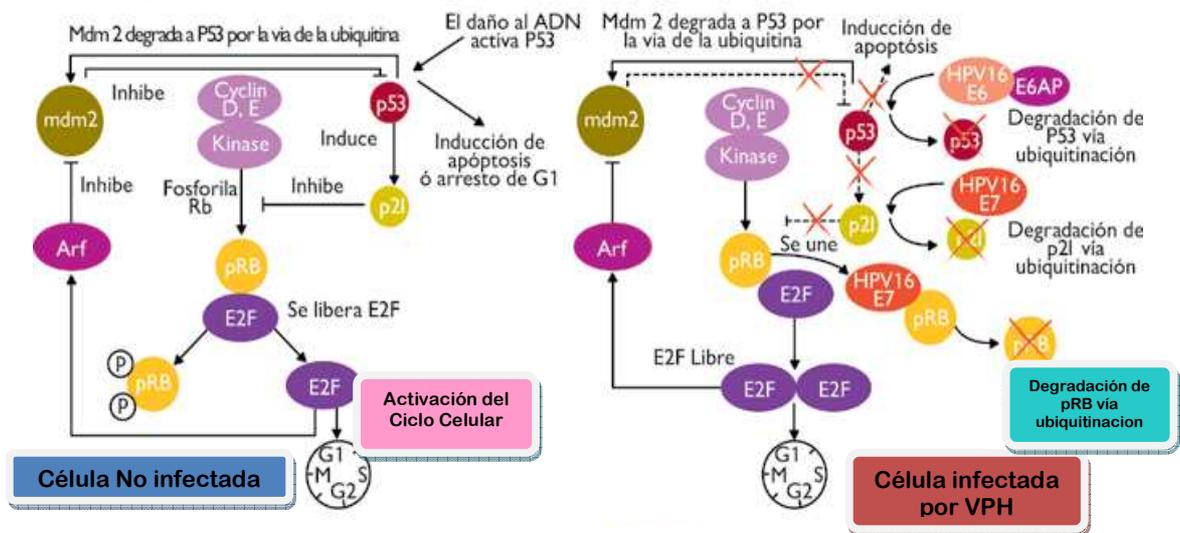


Figura 6. Efecto de E6 y E7 en el Ciclo Celular. López Saavedra y Lizano Soverol. Cancerología 2006

I.6.2.6 La Proteína E2 ^ E8. Recientemente se ha descrito una nueva proteína E2, resultado de una fusión del producto del pequeño marco de lectura E8 con parte de la proteína E2. Esta proteína de 20 kDa reprime la replicación viral, así como la transcripción y por tanto se creó que es importante para el mantenimiento del estado latente observado en las células basales del epitelio infectado (**Stubenrauch F, 1999, Stubenrauch F, 2001**).

I.6.2.7 Proteínas L1 Y L2. La proteína L2 posee 43 a 53 kDa, representando la menor proporción de la cápside viral, que junto a L1, se producen en células que expresan E4. La proteína mayoritaria L1, de 57 kDa conforma cerca del 80 % de la cápside y se expresa después de L2. La cápside está constituida por 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia promonocítica (PML) durante el ensamblaje del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del ADN viral y

que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento (**Doorbar J, 1997, Day PM, 1998**).

I.6.2.8 Región Larga De Control (LCR). La región larga de control (LCR) es un segmento genómico, que no contiene marco de lectura alguno, por el contrario posee numerosos elementos de respuesta en cis que gobiernan la expresión génica y la replicación viral. El tamaño varía según el genotipo, extendiéndose de un 7 a 11% del genoma y de casi 850 pb en el caso de los VPH genitales. La LCR puede dividirse en 3 partes: el promotor temprano, el amplificador o enhancer, de alrededor de 230 pb y la región más alejada del 5'. Numerosos factores, celulares y virales, interaccionan con esta región, ejemplo de ello son las proteínas virales E1 y E2, las cuales modulan la actividad transcripcional y la replicación del virus; componentes de la maquinaria basal de transcripción como SP1 y TBP; receptores de glucocorticoides que modulan positivamente la transcripción, así como otros factores que parecen intervenir en la especificidad por el tejido como KRF, Skn – 1a/i, TEF, AP1, etc. (**Bouallaga I, Thierry F, 1999**).

Los VPH infectan solo a los tejidos epiteliales de la piel y mucosas, fijándose primero a proteínas como integrina α -6 y heparán – sulfato (**Evander M, 1997, Girolou T, 2001, Yoon CS, 2001**). El promotor temprano, responsable de la transcripción de los oncogenes virales, es activo en células de tejido de cáncer cervical o en los queratinocitos de la piel. Sin embargo, no es activo en las células epiteliales del hígado (HepG2) o del seno (MCF7). Esta especificidad por el tejido, no muy común en muchos virus, corresponde al amplificador transcripcional o enhancer. Se conocen diversos factores proteicos de las células epiteliales asociados a la actividad transcripcional del promotor, que pertenecen a familias de proteínas cuyos miembros se hallan en diferentes cantidades en los diferentes tipos celulares (**Thierry F, Spyrou G, 1992, May M, Dong XP, 1994**). El complejo proteico que se ensambla en el enhancer, conocido como el enhanceosoma, interacciona con las proteínas del aparato basal de transcripción, que se unen en la región promotora hacia el extremo 3' del LCR, aumentando de esta manera la

actividad transcripcional del promotor y por ende la expresión de los genes tempranos (**Bouallaga I, 2000**).

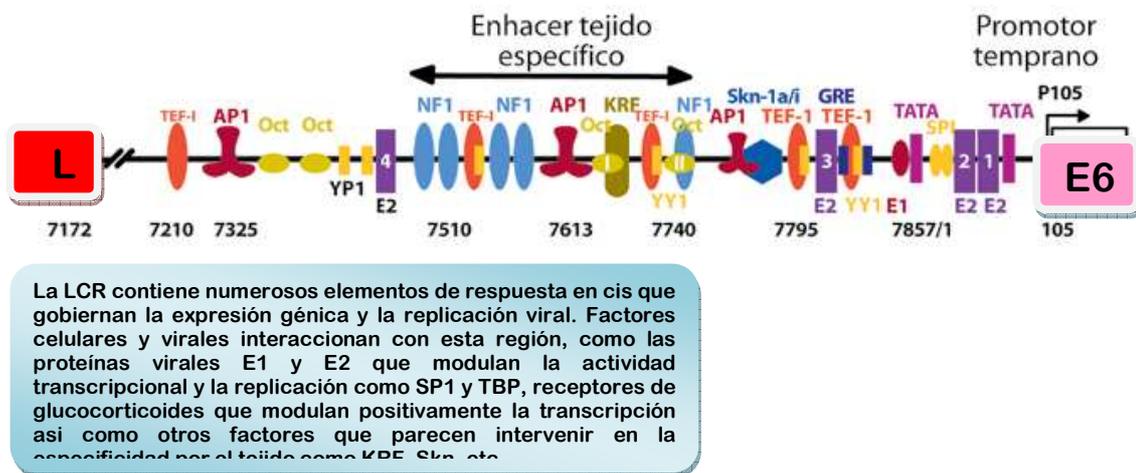


Figura 7. Región Larga de Control LCR. López Saavedra y Lizano Soverol. *Cancerología* 2006.

En conclusión, 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**).

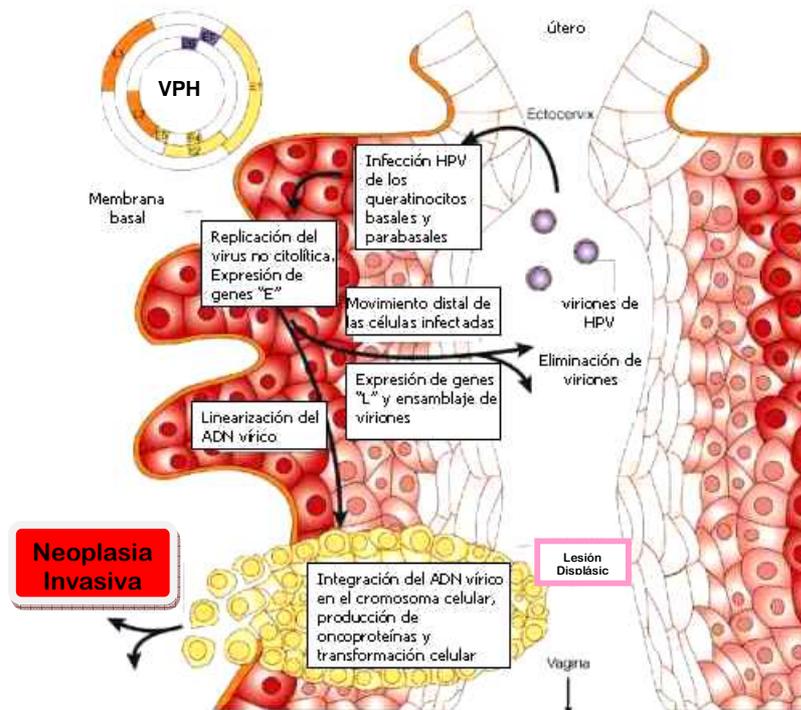


Figura 8. Dinámica de la infección por VPH en Cuello Uterino. Tindle R. *Natural Reviews cancer*, 2002, 2,59-64.

I.7.- CLASIFICACION GENOMICA DEL VPH

Mediante técnicas de Biología Molecular se han podido identificar alrededor de 100 genotipos del VPH, clasificándose la mayoría de ellos de acuerdo a su afinidad por un tejido u órgano en particular (**Torrejón, R. 2002, Lizano M, 2009**). Es así que en el epitelio cutáneo se han identificado los genotipos 1, 17, 19, 29, 38, 41, 46, 49 y 58, en la mucosa oral han sido reportados los genotipos 1, 2, 6, 7, 11, 13, 16, 30 y a nivel del epitelio anogenital los genotipos 5, 10, 11, 16, 18, 20, 31, 32, 35, 39, 40, 42, 45, 51 y 58. Estos últimos divididos en dos clases, según su relación con lesiones clínicas: virus con bajo y alto riesgo de oncogenicidad, siendo el 6 y el 11 considerados de bajo riesgo de oncogenicidad y agentes etiológicos del

condiloma acuminado, pero rara vez asociados con NIC o CaCu. En la categoría de virus con alto riesgo se incluyen los genotipos 16, 18, 31, 33, 35 y 45, asociados a lesiones preinvasivas e invasivas malignas tanto en la mujer como el hombre. Debemos tener en cuenta que ciertos tipos virales pueden aparecer en lesiones cancerosas como resultado de una coinfección y no ser los agentes etiológicos causales de la transformación tumoral. Estudios epidemiológicos atribuyen variaciones poblacionales importantes en la prevalencia y relación causa/efecto de los diferentes tipos virales, es por ello que se han implicado en las patologías de alto grado y carcinomas en nuestra población a los tipos 16 y 18, mientras que los genotipos 6 y 11 están vinculados a patologías de tipo condilomatoso (**Rincón O, Pareja L, 2007**).

En los procesos de transformación maligna del cuello uterino han sido detectados los genotipos 16 y 18, de acuerdo al hallazgo de células típicas de la infección vírica en las lesiones de displasia, de la presencia del genoma vírico en casi todas las lesiones de neoplasia intraepitelial y en diversos tipos de cáncer invasores de distinta naturaleza histológica y distinta localización. Por lo tanto, parece evidente que estos genotipos deben participar de alguna manera en el proceso neoplásico, aunque su papel causal aún no ha sido del todo dilucidado. Diversos estudios señalan al VPH-16 como el responsable del 54% de los cánceres asociados a VPH, seguido del VPH-18 (15%), VPH-45 (9%) y VPH-31 (6%), siendo estos los responsables del 84% de todos los cánceres asociados con la presencia de este virus (**Rincón O, 2007**).

Tabla 1. Principales Tipos de VPH y sus Propiedades Clínicas

GeneroEspecie	Tipos	Propiedades	
Virus del papiloma-Alfa	4	VPH -2, -27, -57	Verrugas comunes de la piel, frecuentemente en verrugas genitales en niños.
	5	VPH -26, -51, -69, -82	Lesiones benignas en mucosas, así como malignas de alto riesgo.
	6	VPH -53, -30, -56, -66	Lesiones benignas en mucosas, así como malignas de alto riesgo.
	7	VPH -18, -39, -45, -59, -68, -70	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH -18 más frecuente en adenocarcinomas que en carcinomas escamosos del cérvix.
	8	VPH -7, -40, 43	Lesiones cutáneas y mucosas de bajo riesgo.
	9	VPH -16, -31, -33, -35, -52, -58, -67	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH -16 mas frecuente en carcinoma de cervix que en adenocarcinoma, y es el tipo viral más frecuente en las lesiones del cérvix
	10	VPH -6, -11, -13, -44, -74	Lesiones benignas en mucosa. VPH -6 y -11 en verrugas genitales de hombres y mujeres, condyloma acuminata del cérvix, papilomas laríngeos. Algunas de estas lesiones pueden progresar a la malignidad.
Virus del papiloma-Beta	1	VPH -5, -8 (por citar solo dos tipos de un género más amplio)	Lesiones cutáneas benignas y malignas en pacientes EV e inmunosuprimidos.
Virus del papiloma-Gama	1	VPH -4, -65 (por citar solo dos)	Lesiones cutáneas benignas
Virus del papiloma-Delta	4	Virus del papiloma bovino -1 (VPB -1); (por citar solo uno)	Papilomas fibrosos en el ganado vacuno, papilomas sarcoides en caballos.
Virus del papiloma-Kappa	1	Virus del papiloma del conejo de cola de algodón (CRPV)	Lesiones cutáneas.
	2	Virus del papiloma oral en conejo (ROPV)	Lesiones en la cavidad bucal.
Virus del papiloma-Mu	1, 2	VPH -1, -63	Lesiones cutáneas como verrugas de los pies.
Virus del papiloma-Un	1	VPH -41 (no relacionado con ningún otro tipo de VPH)	Lesiones cutáneas.
Virus del papiloma-Xi	1	VPB -3, -4	Papilomas en el canal alimentario en ganado vacuno.

I.8 DIAGNÓSTICO CLINICO Y MOLECULAR DE LA INFECCIÓN GENITAL POR VPH

La importancia epidemiológica de las infecciones subclínicas, asintomáticas y/o latentes, y la evidencia de la implicación del VPH como agente carcinógeno en las lesiones de cervix y en otros tumores de la área urogenital a finales de los años

ochenta ha contribuido al desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas de la infección por VPH.

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. Se han descrito ciertos parámetros para el diagnóstico de VPH, los mismos contemplan los siguientes criterios:

- Valorar el papel de los métodos de detección de infección por VPH en el cribado para la prevención de cánceres genitales en relación con la citología y otras técnicas diagnósticas.
- Caracterizar cual es el genotipo viral (alta o baja capacidad oncogénica),
- Demostrar la persistencia o no de la infección en exámenes seriados.
- Detectar el nivel de carga viral

Es importante señalar que todos estos parámetros se relacionan con alto riesgo de progresión neoplásica y que permiten seleccionar grupos de riesgo y mejorar la prevención de cánceres genitales relacionados con VPH (**Martínez J, 2010**).

I.8.1 Técnicas De Detección Genómica De VPH. Estas técnicas consisten en un análisis cualitativo y/o cuantitativo del ADN. Todas ellas se basan en la detección específica de secuencias de ADN del VPH en tejido o en tomas de material procedente del área a estudiar (cérvix), y permiten, por tanto, identificar el tipo de virus presente en la lesión. Básicamente, todas ellas consisten en enfrentar el ADN de una determinada muestra con un fragmento conocido de un ácido nucleico cuya secuencia es complementaria de la secuencia de ADN que intentamos detectar. Dicho fragmento conocido se denomina sonda y el proceso hibridación.

Existen numerosas técnicas de análisis cualitativo del ADN y una gran diversidad de variaciones y modificaciones de estas técnicas, donde algunas inclusive permiten cuantificar el número de copias del virus. Estas diferentes técnicas presentan entre ellas diferencias en cuanto a su sensibilidad, complejidad, y reproductibilidad.

Técnicas de tipaje VPH

1. Hibridación in situ
2. Southern blot
3. Dot blot
4. Hibridación con mezcla de sondas de alto y bajo riesgo*
5. LIPA
6. Line blotting
7. Secuenciación
8. Real-time PCR

❖ Captura de híbridos de segunda generación (HC2)

Las técnicas de hibridación han sido las más utilizadas, hasta la aparición de la de las técnicas de amplificación de ADN, si bien tienen el inconveniente de necesitar mayor cantidad de ADN para su detección y tipificación. Independientemente del método utilizado emplean sondas de ADN o ARN específicas que permiten detectar secuencias específicas en los tejidos. La mayoría requieren extracción previa y purificación del ADN de la muestra clínica y por lo tanto no son aplicables "a priori" a muestras fijadas con formol o parafinadas. Las técnicas de hibridación "*in situ*" en sus distintas modalidades: no requieren extracción ni purificación de ADN y se pueden aplicar a muestras fijadas con formol o parafinadas. La eficacia de estas técnicas varía dependiendo de la técnica y del procesamiento de la misma

La elección del método depende de la información deseada y todas las técnicas tienen ventajas y desventajas, que se relacionan con el método, la experiencia del personal que la realiza y la necesidad de una rápida respuesta. No obstante, de todas ellas sólo la técnica de captura de híbridos (Digene Hybrid Capture Sytem), que permite la detección y tipificación del tipo de virus (Alto y bajo riesgo); está aprobada por la FDA (U.S. Food and Drug Administration).

El método de captura de híbridos (HC2-VPH test), es el único método comercializado, perfectamente normalizado, que permite en raspados de cervix o en muestras de biopsias la detección cualitativa de un total de 14 tipos de virus, diferenciando aquellos de alto/intermedio riesgo (tipos 16, 18, 31, 33.35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) de los de bajo riesgo (6, 11, 42, 43, 44). Utiliza sondas de ARN que reconocen las secuencias específicas de los diferentes tipos de VPH. Los híbridos de ADN-ARN que se forman en solución son capturados por anticuerpos anti-híbridos inmovilizados en microplaca y reconocidos mediante amplificación de señal por quimioluminiscencia. El procedimiento es fácilmente automatizable y más asequible que las técnicas de PCR. La sensibilidad y especificidad del ensayo de captura de híbridos depende del valor umbral establecido. Con 1 pg/ml se obtienen los mejores resultados en el conjunto de los grupos de edad y es por ello recomendado este valor umbral, aunque en otro tipo de poblaciones han sido utilizados valores de 0,5 a 5 pg/ml.

La utilización de una técnica de amplificación del genoma (Polymerase Chain reaction) (PCR) previa a la hibridación aumenta significativamente la sensibilidad de la técnica, lo que permite un límite teórico de detección de una sola partícula. Esto supone a la vez su mejor ventaja e inconveniente. La sensibilidad y especificidad de estas técnicas varían en relación con los cebadores, sondas y procedimientos empleados (**Martínez J, 2010, García A, 2006, Burd EM, 2003, Ferenczy A, 2002, Clavel Ch, 2000**).

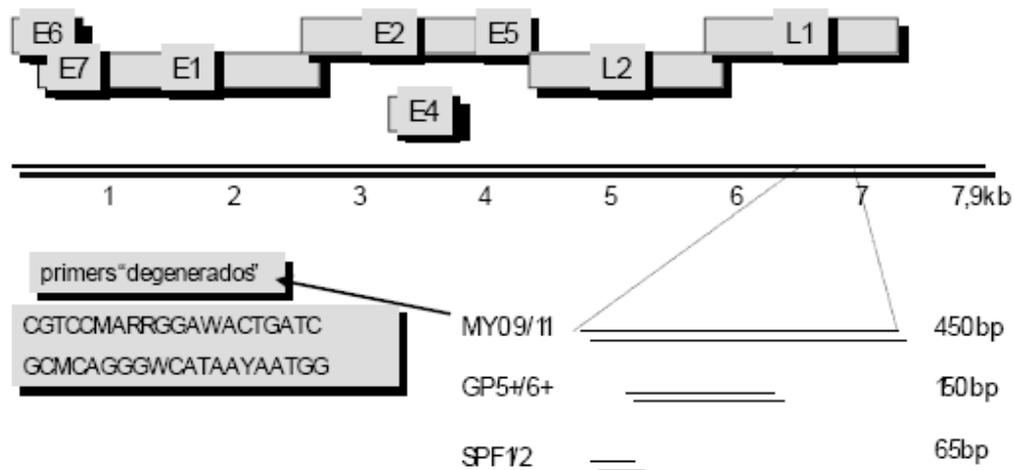


Figura 9 Primers usados en la identificación Molecular del VPH

❖ Citología, detección y tipado molecular de VPH

La técnica de Papanicolau (Pap) ha significado, desde su descripción, una herramienta de extraordinaria importancia para el diagnóstico precoz de alteraciones citológicas premalignas que pudieran evolucionar a cáncer de cervix. La disminución mantenida de los casos de cáncer de cervix en países desarrollados tiene mucha relación con los programas de screening en los que el Pap era la técnica básica utilizada. No obstante, diversos factores, especialmente la recogida inadecuada de la muestra y la escasa reproducibilidad, dependiendo de la experiencia y los criterios utilizados por el citólogo observador, condicionan unas limitaciones de sensibilidad y especificidad que requieren nuevos enfoques para el control de la enfermedad.

La detección de VPH, sola o combinada con la citología, ha sido evaluada en el "triage" de mujeres con diagnóstico citológico de ASCUS y en el screening

primario (**García J, 2003**). Recientemente Clavel y col, han obtenido con la captura de híbridos (HC-II) una sensibilidad del 100% en la detección de H-SIL, aunque con una especificidad del 87,6% cuando la muestra estaba asociada a citología convencional, y del 85,6% si había sido tratada con citología líquida, con valores predictivos positivos de 14,2% y 9,3% respectivamente. Si la prevalencia es muy elevada, la especificidad del método es tan baja que no resulta discriminativa su utilización. Por otra parte, si consideramos que el valor predictivo negativo de la captura de híbrido es del 100%, el test de VPH es muy adecuado para seleccionar las pacientes con ASCUS e infección por VPH, que deben ser remitidas para colposcopia (**Clavel Ch, 2000**).

I.9 LESIONES MALIGNAS PREINVASIVAS DE CUELLO UTERINO: HISTOLOGIA, DIFERENCIACION Y DIAGNOSTICO.

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. El CaCu puede originarse en el epitelio plano estratificado (escamoso) de la exocervix, o en el epitelio glandular del endocervix.. Con la edad, los cambios en el pH vaginal desencadenan un proceso de metaplasma en el que las células escamosas comienzan a cubrir las células columnares, lo cual produce un área denominada zona de transformación (**Bravo J, 2006, Oho S, 1999**).

El cáncer invasivo de cuello uterino por lo general esta precedido de una historia de diez a veinte años de cambios celulares pre invasivos que varían desde la displasia leve hasta el carcinoma in situ (**González B, 1992 , Martínez F , 2004**).

Según Melder RJ, Koenig GC 1996, la alteración más temprana en el cuello uterino es la aparición de células atípicas en la capa basal del epitelio escamoso, lo que inicialmente se denominó hiperplasia de células basales, más tarde displasia. Dichas neoplasias puede detectarse por examen microscópico de las células cervicales en un frotis teñido por la técnica de Papanicolau (**Melder RJ, 1996**).

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**).

Las lesiones malignas precursoras del cáncer cervical invasivo denominadas displasias, forman un espectro morfológico conocido como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) o Lesión Escamosa Intraepitelial (LIE), los cuales corresponden a un grupo de lesiones que afectan en mayor o menor grado el epitelio cervical (**Valencia A, 1998**). Este término se refiere a alteraciones donde se pierde gradualmente el control de la división celular, así como también las funciones básicas de la célula como lo son los procesos de división y diferenciación celular, produciéndose la transformación neoplásica. Las células entonces retienen su capacidad mitótica, pero no se identifican adecuadamente conforme ascienden en el epitelio, por lo que dicha proliferación es desordenada (**Valdespino V, 2004**). La intensidad de las alteraciones nucleares, la relación núcleo/citoplasma y las características citoplasmáticas han permitido clasificar estas displasias (**Valencia A, 1998**).

La primera y aparentemente más temprana alteración a nivel de cuello uterino es la aparición de células atípicas en la capa basal del epitelio escamoso, lo que inicialmente se denominó hiperplasia de células basales, más tarde displasia leve y en la actualidad NIC I (**Lázaro J, 1998**). La presencia de estos cambios atípicos en las dos terceras partes de la capa epitelial constituye la NIC II o displasia moderada y la etapa siguiente, en la cual existe una transformación de casi todas las células epiteliales en células neoplásicas sin invasión del estroma subyacente es denominada NIC III, esta categoría incluye tanto la displasia severa como el carcinoma *in situ*, los cuales se clasifican en el mismo grupo, ya que en ocasiones resulta prácticamente imposible establecer diferencias histológicas entre ambos (**Schiffman MH, 1992, Villiers EML, 1981**).

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, NIC III y carcinoma in situ de la clasificación de Richard, y el término «bajo grado» el NIC I y las alteraciones celulares producidas por VPH (*Schiffman MH, 1992*).

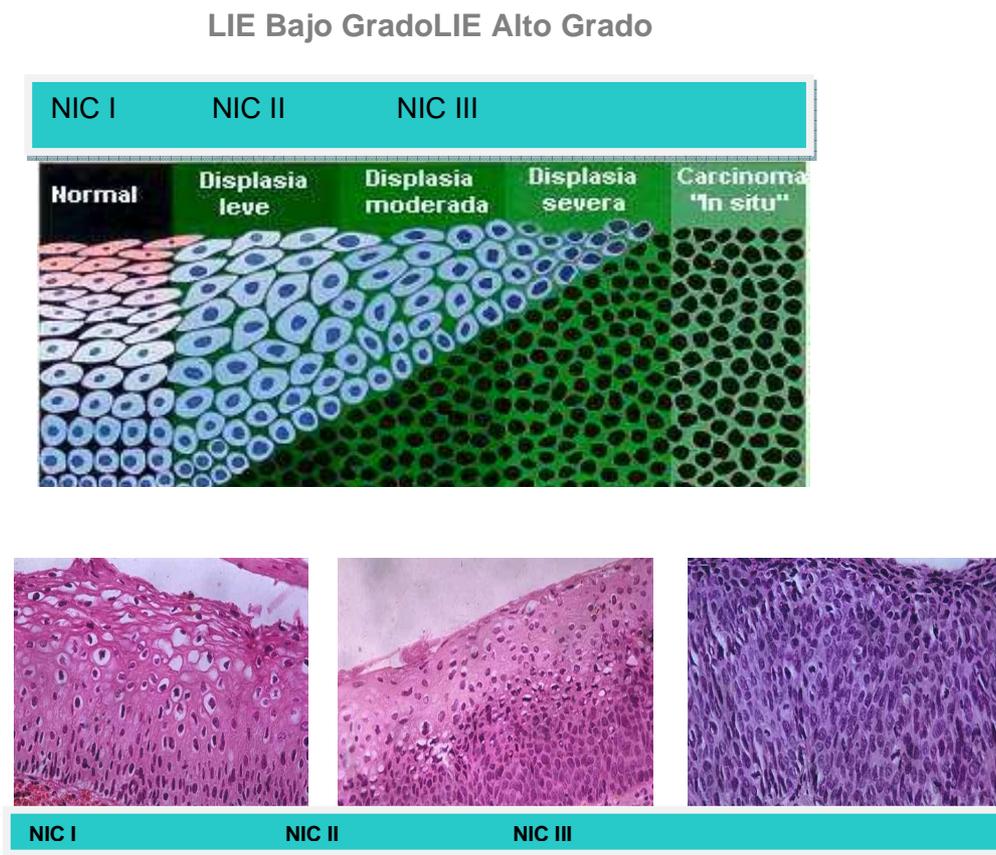


Figura 10. Cortes Histológicos de Neoplasia Intraepitelial Cervical Talaat S. Tadros MD, Emory University School of Medicine. Cancerquest.

Existen criterios para la clasificación histopatológica de las displasias como: criterios citológicos, relaciones de las células entre sí, criterios arquitecturales, relaciones del epitelio pavimentoso con el tejido conjuntivo y relaciones del epitelio pavimentoso con las glándulas en la zona de transformación (**Martínez F, 2004**).

El diagnóstico virológico para la identificación del VPH en lesiones de pacientes o en muestras biológicas durante el examen clínico rutinario se dificulta al carecer de pruebas serológicas, y a la dificultad del 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 (**Carreras R, 1997, Cartier René, 1978**).

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.

La citología cervicovaginal es un test de pesquisa diseñado para identificar pacientes quienes podrían tener lesiones preinvasivas malignas y ocultas que requieren evaluación posterior **(Carreras R, 1997)**.

El diagnóstico cito e histopatológico son de la misma naturaleza que el examen clínico, es decir que por separado son insuficientes para diagnosticar una patología de cuello uterino. El diagnóstico y pronóstico consisten en establecer una relación entre la histopatología de una lesión observada al microscopio y la evolución espontánea de lesiones que tienen una morfología comparable **(Cartier R, 1978)**.

I.10 SISTEMA INMUNITARIO.

El sistema inmunitario constituye una compleja red estructural y funcional cuyo principal objetivo es discriminar lo propio de lo extraño, en el que están implicados una amplia variedad de células y tejidos dirigidos y coordinados por diferentes moléculas. La característica biológica esencial del sistema inmunitario es el reconocimiento específico mediante constantes interacciones de sus componentes y los restantes componentes del organismo con elementos extraños que puedan penetrar en el cuerpo humano **(Alvarez-Mon M, 1987)**.

Durante el desarrollo embrionario se establece el reconocimiento de lo propio, todos aquellos componentes que entran en contacto con el sistema inmunitario en desarrollo son incorporados al sistema de reconocimiento generando un estado de tolerancia o provocando su eliminación.

El sistema inmunitario está formado por órganos linfoides primarios y secundarios en los cuales se generan, seleccionan y adquieren su función las células implicadas en la respuesta inmune **(Janeway CA, 2000)**.

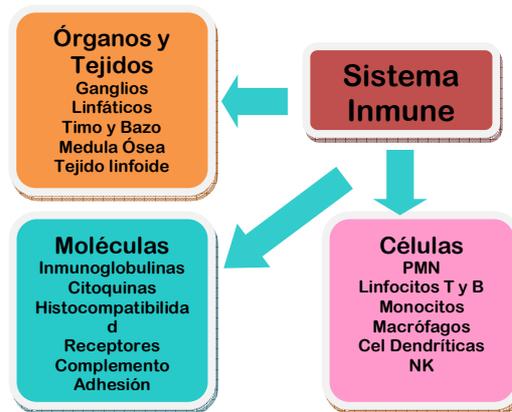


Figura 11. Principales Componentes que Conforman el Sistema Inmunitario. Callejas 2010

❖ **Órganos linfoides primarios o hematopoyéticos:** Su función principal es la producción de componentes celulares del sistema inmunitario durante toda la vida del individuo. Los principales órganos son la médula ósea, donde se generan los precursores hematopoyéticos que posteriormente se diferenciarán en el resto de componentes celulares, y el timo, donde migran los precursores de células T para sufrir el proceso de diferenciación y selección que originará las diferentes subpoblaciones de células T maduras. Durante la vida fetal y en situaciones de stress durante la vida adulta (quimioterapia) el hígado actúa como órgano hematopoyético (*Alvarez-Mon M, 1990*).

❖ **Órganos linfoides secundarios:** Forman una extensa red por todo el organismo a través de la cual circulan las células maduras del SI, entran en contacto con los posibles agentes extraños (antígenos) y sufren los procesos de selección, activación y proliferación necesarios para establecer la respuesta inmune. Los principales órganos linfoides secundarios son los ganglios linfáticos, cadenas de nódulos paralelos a las principales vías circulatorias, y el bazo, ambos órganos están muy vascularizados y son ricos en células del SI agrupadas en formaciones específicas denominadas folículos, actúan como filtros de posibles antígenos y los retienen hasta la llegada de células compatibles. El resto de

órganos secundarios lo forman agrupaciones de células asociadas a mucosas (MALT), principalmente la piel, y a tubo digestivo (GALT), que engloba las amígdalas, las placas de Peyer y el apéndice, son zonas en contacto directo con el exterior y por lo tanto constituyen la primera línea de defensa contra componentes extraños (**Nössal GJV, 1987**).

Los Componentes Celulares del SI son los linfocitos, agrupados en linfocitos T, linfocitos B y células NK, y las células accesorias, entre las cuales se incluyen células fagocíticas como monocitos/macrófagos y neutrófilos, células dendríticas, células de Kupffer y células de Langerhans (**Klein J, 1986**). Los linfocitos son células efectoras y necesitan de la colaboración de las células accesorias para su activación y regulación, estas células entran en contacto con el antígeno, lo procesan y lo presentan a los linfocitos cuando recirculan por los órganos linfoides secundarios, por ello también se denominan células presentadoras de antígeno (APC). Sin embargo, la división entre células efectoras y células accesorias no es tan clara, ya que los linfocitos B son células presentadoras de antígeno y los macrófagos tienen funciones efectoras (**Alvarez-Mon M, 1987, Janeway CA, 2000**).

La comunicación entre los diferentes componentes del SI se establece mediante moléculas solubles secretadas tanto por las células efectoras como por las células accesorias, conformadas por el componente molecular constituido por el sistema del complemento, las inmunoglobulinas (Igs), las citoquinas y las quimioquinas (**Nössal GJV, 1987**).

I.10.1 Células Del Sistema Inmunitario. Las células del SI se clasifican en dos grandes grupos, los linfocitos y las denominadas células accesorias o células con receptores para la región constante de las inmunoglobulinas. Estas últimas incluyen tanto a células presentadoras de Ag (monocitos y células dendríticas) como a células centinelas (mastocitos) y, efectoras (leucocitos polimorfonucleares: neutrófilos, basófilos y eosinófilos) (**Alvarez-Mon M, 1990**).

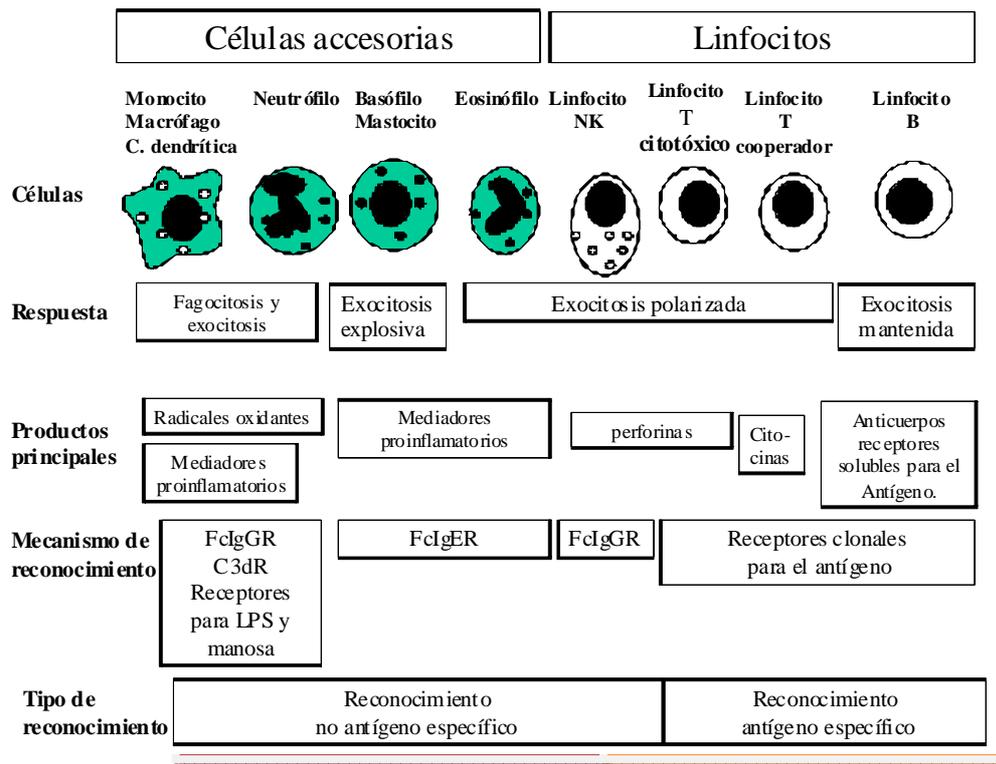


Figura 12. Características Funcionales Principales de las Células del Sistema Inmunitario

I.10.1.1 Linfocitos. Se incluyen tres poblaciones celulares definidas, los linfocitos T y B y las células citotóxicas espontáneas (células natural killer en inglés o NK)

I.10.1.2 Linfocitos T. Son un grupo heterogéneo de células que comparten una característica biológica esencial, que es la de tener reordenados los genes que codifican la síntesis de las cadenas proteicas del receptor clonotípico de las células T (TCR). Es decir, en estas células y no en otras del organismo se produce la reorganización de los fragmentos de genes de las distintas familias cuya unión lineal constituye el gen funcional que codifica las proteínas del TCR, que permite el reconocimiento de antígenos procesados y unidos al HLA en la superficie

de otras células. Los linfocitos T en fase de reposo o de activación son morfológicamente similares. Sin embargo, se identifican distintas sub-poblaciones por la expresión de diferentes moléculas en la membrana citoplasmática (marcadores de superficie) y por su capacidad funcional. Se distinguen dos grandes sub-poblaciones, los linfocitos T cooperadores (Th) que expanden y regulan la respuesta inmune y los efectores T citotóxicos capaces de lisar a las células diana y que se asocian, de forma mayoritaria, a la expresión, mutuamente excluyente, de los marcadores CD4 y CD8, respectivamente. Los linfocitos T CD8 reconocen a Ag presentados por moléculas de histocompatibilidad (HLA) de clase I que suelen ser péptidos de síntesis intracelular, mientras que los CD4 reconocen Ag presentados por moléculas HLA de clase II en la superficie celular y que suelen ser péptidos de síntesis extracelular que la célula presentadora ha captado por fagocitosis o endocitosis mediada por receptores. Los linfocitos T también expresan otras moléculas o marcadores de membrana relacionados con el estadio de diferenciación y de activación y que permiten su caracterización e identificación, como las isoformas RO y RA del CD45 (identifican células que han sido o no activadas por un Ag), CD25 (una cadena del receptor de la IL-2) y CD28 y CD152 (correceptores de regulación positiva o negativa de la activación linfocitaria) **(Alvarez-Mon M, 1990).**

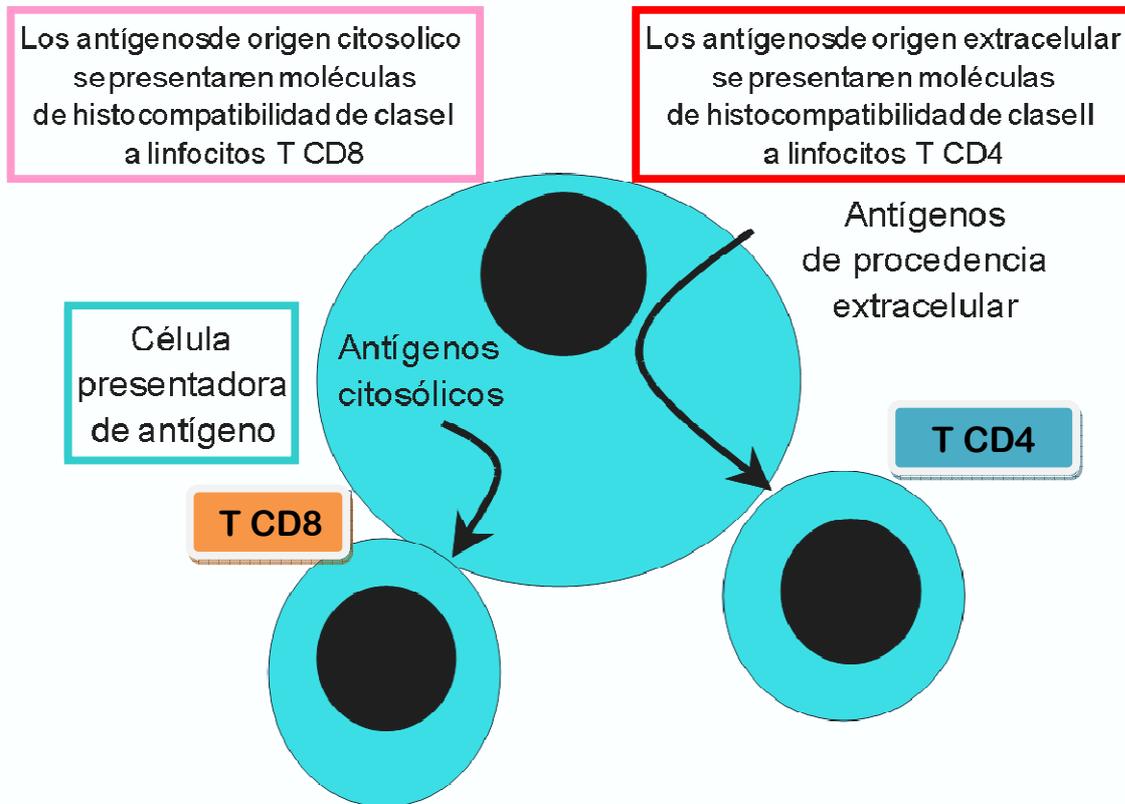


Figura 13. Reconocimiento de Antígenos por Linfocitos TCD4 Y TCD8.

I.10.1.3 Linfocitos B. Son un grupo heterogéneo de células que comparten una característica biológica esencial que es la de tener reordenados los genes que codifican para la síntesis de las cadenas proteicas de las inmunoglobulinas (Igs) que constituyen sus receptores antigénicos. El receptor de la célula B (BCR) está constituido por inmunoglobulinas ligeramente modificadas para que permanezcan unidas a la membrana y otros marcadores de membrana implicados en la transducción de la señal (por ejemplo, CD79).

La exposición al antígeno induce la expansión clonal de los linfocitos y su transformación en células plasmáticas productoras de anticuerpos, esto es, capaz de liberar inmunoglobulinas de forma masiva al medio extracelular.

Cada Ig se compone de 4 cadenas, dos de mayor peso molecular e idénticas en cada molécula, o cadenas pesadas (H), y dos ligeras (L), también idénticas entre sí, unidas por puentes disulfuro. La porción aminoterminal de las cadenas L y H es variable, de tal manera que su secuencia de aminoácidos es única en las Ig secretadas por las células derivadas de un único linfocito B y diferente a la de los demás clones de células B del organismo (**Alvarez-Mon M, 1990**).

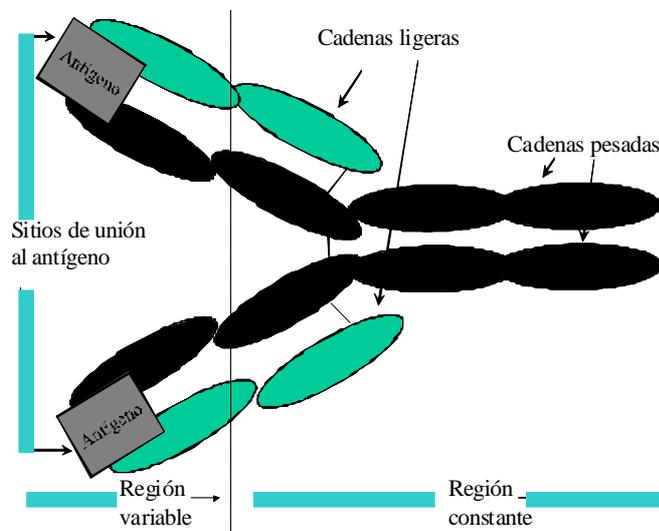


Figura 14. Estructura de un Monómero de Inmunoglobulina

Cada monómero de de Ig tiene por lo tanto dos sitios de unión al Ag idénticos formados por una cadena ligera y una pesada cuya secuencia de aminoácidos es única, diferente a la del resto de Igs. Sin embargo, como se ha referido previamente, todas las Igs secretadas por las células de un mismo clon linfocitario B son idénticas en su región variable. El resto de la molécula de la Ig es idéntica en todas las Igs de un mismo isotipo (tipo o clase de cadena pesada) y se denomina región constante (**Alvarez-Mon M, 1990**).

I.10.1.4 Células NK. Las células citotóxicas espontáneas (natural killer, NK) constituyen otra estirpe de diferenciación linfoide que se caracteriza morfológicamente por ser linfocitos grandes con núcleo arriñonado y gránulos en el citoplasma. Desde una perspectiva funcional se caracterizan por ser capaces de reconocer y lisar, sin sensibilización previa, a células tumorales o infectadas por virus. Estas células, que constituyen un 10-20% de los linfocitos de sangre periférica, expresan el fenotipo CD2+, CD7+, CD3–, CD5–, CD56+, CD16+, CD8+/- CD57+/-; aunque algunos marcadores varían en diferentes subpoblaciones

Las células NK reconocen las estructuras propias por medio de receptores específicos de moléculas del MHC de clase I en las células y esta interacción suprime su función efectora. Por lo tanto, su actividad lítica se dirige frente a:

- a) células que han perdido total o parcialmente la expresión de moléculas del MHC de clase I en condiciones patológicas
- b) células que no expresan moléculas de clase I adecuadas

Otros receptores, por el contrario, inducen funciones efectoras y se postula que el control de las células NK depende del equilibrio entre las señales inhibitoras y activadoras. Cada célula NK madura debería expresar al menos un receptor inhibitor para una molécula del propio MHC, previniendo así la posible reactividad contra células normales (**Álvarez-Mon M, 1990**).

I.10.1.5 Células Accesorias. Estas células, que se encuentran dispersas por el organismo con diversas diferenciaciones tisulares, se caracterizan por la expresión de receptores para la región constante de las inmunoglobulinas (receptores Fc) de isotipo IgG o IgE. Parte de las células accesorias son células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales con capacidad para fagocitar, procesar y presentar Ags a los linfocitos T. El procesamiento de los elementos ingeridos supone su fragmentación molecular y acoplamiento intracitoplasmático a moléculas HLA de clase I y/o II que se expresan posteriormente en la membrana celular. Las CPA dan a los linfocitos T las dos señales necesarias para su activación: la primera, el antígeno en el contexto de MHC, y la segunda, señales

coestimuladoras de membrana. De entre estas señales coestimuladoras en células CPA destacan el CD80 y CD86, ligandos de los receptores de coestimulación CD28 y CD152 en linfocitos T. Las señales coestimuladoras dependientes de CD28 contribuyen al aumento de la transcripción del gen de IL-2 y también a la estabilización de su ARN. Las células accesorias además secretan citoquinas como la interleucina IL-12 y la IL-15 que también modulan la capacidad funcional linfocitaria.

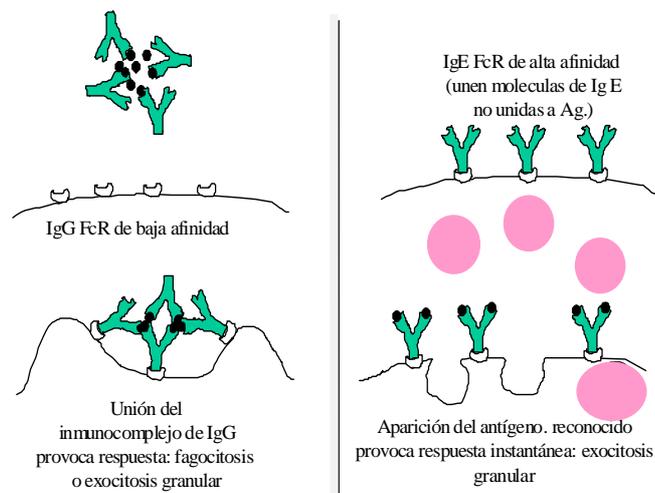


Figura 15. Receptores para IgG e IgE de las Células Accesorias.

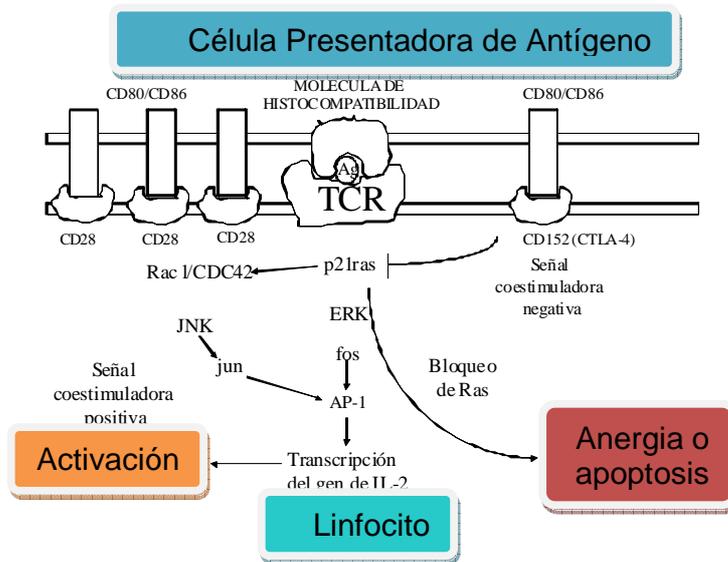


Figura 16. Señales Coestimuladoras positivas y negativas en la Activación del Linfocito T.

Las CPA consideradas “profesionales” son células accesorias (caracterizadas por la presencia de receptores Fc) que están especializadas en la captación de antígenos, así como en su procesamiento y su presentación a los linfocitos T. Las CPA profesionales están concentradas en los órganos linfoides periféricos, lugares donde se produce la interacción inicial entre los linfocitos novatos y los antígenos. Los patógenos en los tejidos son recogidos y atrapados en el sistema linfático, que facilita su acceso a los ganglios. Los que entran en la sangre son atrapados en el bazo, los que infectan la superficie de las mucosas se atrapan en las placas de Peyer o en las amígdalas.

Los tres tipos principales de CPA profesionales en los órganos linfoides periféricos son los macrófagos, las células dendríticas y las células B. Cada tipo de CPA está especializado en procesar y presentar antígenos de distinta procedencia. Así, los macrófagos se encuentran en todas las áreas del ganglio e ingieren microbios y antígenos particulados. Las células dendríticas están presentes en las áreas T y son especialmente importantes en la presentación de antígenos víricos. Y por último, las células B se encuentran en los folículos linfoides y son especialmente

eficientes atrapando antígenos solubles, como las toxinas bacterianas, a través de sus inmunoglobulinas de superficie. Los macrófagos y las células B, además de ser CPA, también son las células efectoras sobre las que ejercerán su acción cooperadora los dos tipos de linfocitos CD4 efectoras: los linfocitos T productores de IFN α (Th1 o proinflamatorios) y los linfocitos productores de IL-4 (Th2 o cooperadores en la síntesis de anticuerpos), (*Alvarez-Mon M, 1990*).

I.10.2 Moléculas Del Sistema Inmunitario: Citoquinas. 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*).

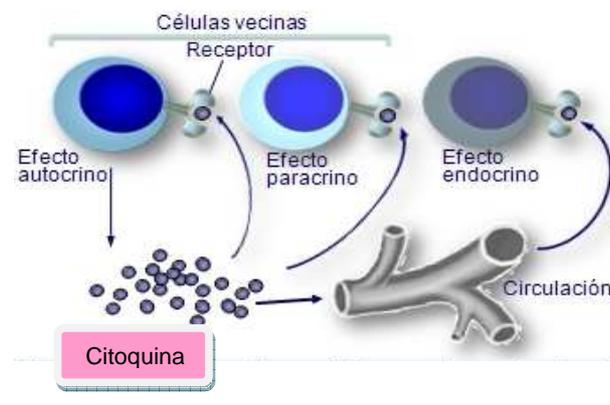


Figura 17. Efecto Paracrino, Endocrino y Autocrino de las Citoquinas. Aguzzi y cols, 2005.

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. Originariamente se estableció el término linfocina para denominar productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta al antígeno, sin embargo posteriormente se amplió a moléculas de características similares secretadas por otros tipos celulares, por lo que se propuso un término más amplio, citoquina.

Por otra parte, el término interleucina (IL) se aplicó en concreto a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose correlativamente a medida que se descubrían (IL-1, IL-2, etc.). No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *in Vitro* y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del TNF (factor de necrosis tumoral) y el TGF (factor transformante de tejidos).

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**).

No obstante, algunas citoquinas se pueden acumular en el interior de la célula, o bien, permanecer ancladas a la membrana o en la matriz extracelular. En general, son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, del orden de picogramos, mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora o en otros tipos celulares muy variados.

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 citoquinas 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**).

Tabla 2 Clasificación y nomenclatura de las citoquinas

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 y PF-4
	MIP1alfa y beta, RANTES, CPP1,2,3,4 y eotaxin

Los efectos biológicos de las citoquinas pueden ser muy variados, ya que, no solamente desempeñan un papel esencial en las respuestas inmunes, sino que

algunas de ellas están también implicadas en la embriogénesis y en el desarrollo de órganos (por ejemplo, en la angiogénesis), otras juegan un papel clave en procesos neuroinmunes y neuroendocrinos, y muchas son importantes reguladores, tanto positivos como negativos, de acontecimientos celulares como la mitosis, la diferenciación, la migración, la supervivencia, la muerte celular, e, incluso, de su transformación maligna (**Moore MA, 2002**).

Tabla 3 Citoquinas, fuente y principales funciones.

Citoquina	Fuente	Funciones
IL1a Y b	Monocito y Macrófago	Proinflamatoria, Pirógeno, Induce proteínas de fase aguda
IL-2	Linfocitos T	Estimula proliferación y diferenciación de T y Nk
IL-3	Linfocitos T	Diferenciación Precusores Hematopoyeticos
IL-4	Linfocitos Th2	Promueve Th2 e Inhibe Th1
IL-5	Linfocitos T	Diferenciación de Eosinófilos(Inf parasitarias)
IL-6	Monocitos	Induce proteínas fase aguda y activa cel B
IL-7	Cel Estromales	Crecimiento de Precusores B
IL-8	Monocitos	Factor Quimiotactico
IL-9	Linfocitos T	Diferenciación precusores eritroides y T
IL-10	Linfocitos Th2	Induce Inmunosupresión inhibiendo TNF- α , IL2 e IL12

I.10.2.1 Citoquinas Producidas En La Respuesta Inmune Innata. La respuesta innata forma parte de los mecanismos inespecíficos de defensa y representa el primer sistema defensivo del organismo y es de especial significación frente a la protección del mismo ante infecciones ya sean de tipo bacteriano o viral. Las citoquinas se producen de forma inmediata tras el contacto de las células implicadas en las respuestas inmunes innatas con un agente extraño. Los monocitos y macrófagos activados son la principal fuente de estas moléculas aunque también pueden ser producidas por linfocitos activados y otras células no pertenecientes al sistema inmunitario, como células endoteliales y fibroblastos.

I.10.2.1.1 Interleucina 6 (IL-6). 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 citoquinas IL-2, -4 y -5 hayan estimulado previamente su multiplicación. Esta citoquina 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 (**Mota F, 1999**). Es producida fundamentalmente por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. Junto con la IL-1 es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, sobre todo de fibrinógeno. Además de su efecto en la inflamación, se ha observado que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas. También puede aumentar la producción de IL-2 y el desarrollo de los precursores hematopoyéticos dependientes de la IL-3 (**Joost,2000,Abbas A, 2000**).

I.10.2.1.2 Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Los factores de necrosis tumoral fueron descritos inicialmente por su capacidad de causar necrosis en algunos tumores. Se han descrito dos moléculas estrechamente relacionadas, el TNF- α y el TNF- β , con elevada homología en su secuencia aminoacídica. El TNF es una citoquina pro-inflamatoria que comparte muchas de las actividades biológicas con la IL-1 e IL-6. Esta citoquina 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 citoquina constituye la principal respuesta del cuerpo a 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 (19-20). También puede ser producido por linfocitos T y B, células NK, fibroblastos y mastocitos. Junto con la IL-1 está implicado en los

procesos inflamatorios derivados de los procesos infecciosos. Inducen la producción de factores de crecimiento endotelial y tienen actividad angiogena. Por otra parte, induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de IL-8 por células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos (**Joost J, 2000, Abbas A, 2000, Eigler A, 1997**).

I.10.2.1.3 Interleucina 10 (IL-10). 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), citoquinas proinflamatorias (TNF α , 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 (**Abbas A, 2000**).

La IL-10 es producida por linfocitos del tipo Th2, así como también por monocitos/macrófagos, linfocitos B, queratinocitos y otros varios tipos celulares. Es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citoquinas, entre las que podemos citar IFN- γ y TNF- α , IL-2, IL-12, y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. También tiene efectos antiproliferativos sobre muchos tipos celulares. La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmunomoduladoras. Se ha visto que es un cofactor para el crecimiento de líneas y colonias de células mastocíticas in vitro. Regula las funciones mediadas

por linfocitos B induciendo la síntesis de IgG, y por linfocitos T, influyendo en el desarrollo de timocitos y células T. También ejerce efectos reguladores sobre la angiogénesis (**Akdis CA, 2001, Hernández UM, 2001, Haddad J J, 2002**).

I.10.2.2 Citoquinas Producidas En La Respuesta Inmune Adaptativa.

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza porque es efectiva solo frente a aquellos antígenos que iniciaron este tipo de respuesta y es mediada por linfocitos que cuentan con la colaboración de células dendríticas y macrófagos principalmente.

Los linfocitos que participan en este tipo de respuesta son de dos tipos: linfocitos B y linfocitos T. Los linfocitos T a su vez pueden ser de los tipos colaborador (Th), citotóxico (Tc) o regulador (Treg).

En cuanto a la funcionalidad de los linfocitos T se identificaron 2 tipos de respuestas colaboradoras: la TH1(inmunidad celular o retardada)y laTH2(inmunidad humoral).LasTH1son altamente efectivas en la eliminación de patógenos intracelulares y las TH2 son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos. Esta división en 2subtiposse baso en el panel de citoquinas que esto serán capaces de secretar una vez activados y con las que modulaban a diversos tipos celulares. Se denominó TH1 a los linfocitos secretores de interferón gamma (IFN- γ) einterleucina2 (IL-2), y se denominó TH2 a loslinfocitosqueliberanIL-4eIL-1(**Stites D P, 1999**).

Los linfocitos Th1, en colaboración con los macrófagos, están implicados en la respuesta inmune celular, mientras que los Th2 promueven la respuesta inmune humoral. Para llevar a cabo su función los linfocitos Th1secretan IL-2, IFN- γ y TNF, mientras que los Th2 producen IL4, IL-5, IL-10 e IL-13. Se han descrito otras subpoblaciones de linfocitos T CD4+ efectores que secretan un perfil de citoquinas diferente y llevan a cabo funciones específicas (**Stites DP, 1999**). Los linfocitos T CD8+ por su parte se diferencian hacia linfocitos T citotóxicos como respuesta a la

estimulación antigénica y a la presencia de citoquinas secretadas por otras células. Ejercen su función efectora mediante la secreción fundamentalmente de IL-2, IL-16, IFN- γ y TNF. Finalmente hay una serie de citoquinas que pueden ser producidas por ambos tipos de linfocitos T, CD4+ y CD8+, tales como IL-2, Factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF) y Factor Transformante de tejidos Beta (TGF- β) (**Stites D, 1999, Suárez, A**).

I.10.2.2.1 Interleucina 2 (IL-2) y Receptor de Interleucina 2 (IL-2R).

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. (**Aguzzi A, 2005**). 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 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, 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), (**Abbas A, 2000 Granucci F, 2003, Taniguchi T, 1993**).

❖ **Receptor de interleucina 2 (IL-2R).** Pertenece a la familia Clase I de receptores alfa, beta y gamma (α , β y γ). A esta familia pertenecen la mayor parte de los Rc de Citoquinas (IL 2, IL-3, IL-5, IL 6, IL 7, IL 9, IL 13, IL 15, GM-CSF (factor

estimulante de colonias granulocitos-monocitos) y G-CSF (Factor estimulador de colonias de Granulocitos)). La subfamilia de receptores a la que pertenece el receptor de IL-2 (el llamado IL2-R) consta de tres subunidades: Cadena α (CD25) específica de cada citoquina; dos subunidades (cadena β (CD122) y cadena común γ (CD132) transductoras de señal. Esta versión trimérica de IL-2R es la que se une a IL-2 con mayor afinidad, y la versión monomérica (IL-2R α) de baja afinidad, sin cadenas transductoras, y por lo tanto incapaz de reenviar la señal, y una forma de afinidad intermedia (IL-2R β/γ), (**Gaffen S L, 2001, Taniguchi T, 1993**).

IL-2R es un antígeno expresado en la superficie de diferentes tipos de células como los linfocitos T y B, las células NK y las células monocíticas. La estructura de este receptor responde a un modelo heterotrimérico.

La cadena beta tiene un peso molecular de 70 a 75 kD. Con un dominio citosólico y otro extracelular, es la subunidad más pesada del receptor. Su función está relacionada con la unión fuerte con el ligando e interleucina-2, pero también con la transducción de la señal mediante la proteína tirosina-quinasa (PTK).

La cadena gamma tiene un peso molecular de 64 kD. Fuertemente anclada en la membrana de la célula, se expresa de forma constitutiva. También contiene dos dominios, uno extracelular y el otro citoplasmático. El dominio extracelular contiene diversos motivos comunes con los receptores de diversas citoquinas, indicando que IL-2R γ pertenece a una superfamilia de receptores de citoquinas. Además, su función se implica en la transducción de señal (**Sugamura K H, 1996**).

La cadena α (también llamada antígeno Tac o p58) es una proteína de peso molecular 58 kD con un dominio citosólico y otro extracelular. Es la única de las subunidades inducible, es decir, su presencia en la membrana celular no es constitutiva, sino que únicamente está presente en aquellas células activadas. Se cree que su función es la de ligar en un primer contacto la molécula de ligando, es decir, la interleucina-2 (IL-2), posteriormente la subunidad β se encargará de sujetar mejor la molécula. Sin embargo, algunos estudios parecen confirmar que en el IL-

2R la sub unidad α no se expresa en cantidades equimolares con las otras dos cadenas.

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 α 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 α no produce ninguna respuesta biológica detectable, la segunda proteína ligadora de la IL-2 es la IL-2 β , la afinidad de la unión de la IL-2 a este receptor es mayor que al IL-2 α . IL-2R β se expresa de manera coordinada con un péptido llamado cadena común γ (γ_c) y forma un complejo llamado IL-2R $\beta\gamma_c$ (**Granucci F, 2003, Nelson B H, 2002**).

I.10.2.2.2 Interleucina 4 (IL-4). 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 citoquinas del patrón Th2. La IL-4 actúa sobre actividades biológicas de los macrófagos y pueden inhibir la producción de TNF- Así mismo antagoniza la activación de los macrófagos por el IFN, cuando esta citoquina se añade a cultivos de LT activados, deprime la síntesis de IL-2 y de IFN- (**Mosmann T R , 1996, Finney M, 1990, McKenzie A N J, 2000, Martin R, 2003**).

I.10.2.2.3 Factor de Crecimiento Transformante (TGF). Existen dos tipos de factor transformante, el TGF- α y el TGF- β , que no poseen ninguna similitud estructural ni comparten los mismos efectos. Solamente el TGF- β tiene efectos inmunomoduladores. Es producido por linfocitos T, plaquetas y otros muchos tipos celulares.

Su nombre responde a la observación inicial de que inducía cambios fenotípicos en los fibroblastos de rata. Incrementa la proliferación de fibroblastos,

osteoblastos y células musculares lisas e incrementa la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, lo que favorece la curación de las heridas.

El Factor de Crecimiento Transformante Beta 1 (TGF β -1) es una proteína homodimérica de aproximadamente unos 28 Kd. Y debe ser activado por proteasas extracelulares. Tanto las células T activadas por el antígeno como los fagocitos mononucleares activados por lipopolisacáridos (LPS) secretan un TGF- β 1 biológicamente activo (**Kodama J, 1999**). 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. El TGF β -1 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 (**Kodama J, 1999, Kehrl J H, 1985**).

I.10.2.2.4 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**).

I.10.2.2.5 Interferón (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 α , IFN β , IFN γ , IFN δ , IFN ϵ , e *interferones tipo II* que únicamente incluye el IFN γ (**Aguzzi A, 2005, Smith P L, 2005**).

Es producido por linfocitos Th1, linfocitos También tiene efectos antiproliferativos sobre muchos tipos celulares T citotóxicos y por células NK. Además de su efecto antiviral posee una importante actividad inmunomoduladora. Incrementa la expresión de antígenos de MCH de clase I y II en varios tipos celulares, lo que facilita su función presentadora de antígeno y activa a los macrófagos, incrementando su capacidad tumoricida y de defensa contra las infecciones. Actúa de forma autocrina sobre las propias células NK que lo producen, aumentando su actividad citolítica y, como consecuencia, incrementando su efecto antitumoral. Sobre los linfocitos Th2 inhibe la proliferación, de manera que su presencia durante la estimulación antigénica induce la diferenciación de linfocitos T

hacia células efectoras tipo Th1 favoreciendo, por lo tanto, el desarrollo de l el desarrollo de las respuestas inflamatorias (**Smith P, 2005**).

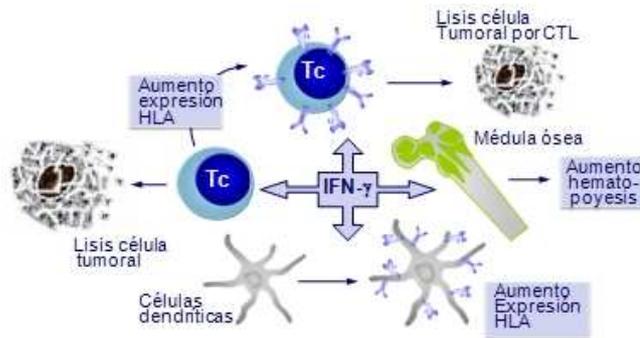


Figura 18. Mecanismo de Acción del $\text{IFN}\gamma$ en la Respuesta Inmunitaria. Aguzzi A y col, 2005.

I.10.2.2.6 Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF). El VEGF es una glucoproteína 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, 2005, Dai Y, 2005**). VEGF es producido por las células endoteliales, los macrófagos, las células T activadas, además de otros tipos de células (**Ferrara N, 1997, Melder R J, 1996, Barleon B, 1996**). Este factor de crecimiento se une a tres receptores: el de tirosin kinasa de alta afinidad, Flt-1 (Vegfr-1), KDR (Vegfr-2) (**Ferrara N, 1997**), y neuropilina, los cuales son expresados casi exclusivamente por las células endoteliales, aunque Flt-1 también es expresado por los monocitos (**Soker S, 1996, Clauss M, 1996**). El estímulo

principal para la expresión de VEGF es la hipoxia (**Shweiki D, 1992**). Además de otros factores que pueden regular la expresión del VEGF entre los que se pueden incluir el grado de diferenciación de la célula; concentraciones locales de glucosa y prostaglandinas en suero, óxido nítrico y estimuladores de la adenilato ciclasa (**Ferrara N, 1997 Sato K, 1995, Williams B, 1995**). La expresión del VEGF es estimulada por algunas citoquinas y factores de crecimiento (TGF β , PDGF, TGF α) y especialmente por la hipoxia celular la cual se ha asociado con la angiogénesis desde hace mucho tiempo (**Dvorak H F, 1995**).

I.11 RESPUESTA INMUNITARIA E INTERACCION VIRUS-HUESPED EN INFECCION POR VPH.

Los virus provocan diferentes efectos sobre las células que infectan aun cuando no se repliquen, alterando numerosos procesos esenciales para la célula. El sistema inmunitario utiliza tanto elementos de la inmunidad natural como respuestas mediadas por linfocitos T y B para hacer frente a las infecciones virales. Los principales componentes de la inmunidad innata son la producción de interferones tipo I y la activación de las células NK. Mientras que los principales efectores de la inmunidad adaptativa, son la producción de anticuerpos, fundamentalmente IgA a nivel de mucosas, y de respuestas celulares citotóxicas. El VPH utiliza varios mecanismos para evitar esta respuesta antiviral. El ciclo vital de este virus, constituye por sí mismo un mecanismo de evasión (**Rincon O, Pareja L, 2007, Berrueta L, Salmen S, 2007**).

El VPH infecta y se multiplica en los queratinocitos en forma episomal, y sólo consiguen la expresión de las proteínas estructurales en los estratos celulares más distales, lejos del contacto con las células del sistema inmunitario. Cabe destacar que dado que la etapa final de la diferenciación de los queratinocitos, conlleva la muerte celular de forma natural, no se producen señales de alarma o estrés celular suficientes. El VPH no tiene efectos citopáticos, durante su replicación, por este motivo las señales de inflamación son insuficientes, no se produce viremia, y

tampoco un transporte importante de partículas virales por las células de Langerhan's (LC) a los nódulos linfáticos regionales (**Rincón O, Pareja L, 2007**).

En una situación normal, tras la infección de la mucosa, las células LC deberían, una vez que se produce el reconocimiento por los receptores de patrones moleculares, activarse, madurar y migrar a los órganos linfoides. La cápside de VPH lejos de producir estos efectos, inhibe la migración y maduración de las células LC. Además de esto, la propia configuración del MALT (tejido linfoide asociado a mucosas), en el tracto urogenital difiere de otros en la falta de estructuras organizadas de linfocitos, como lo poseen la mucosa gastrointestinal, la bronquial, y otros sitios inductores de inmunidad.

En este sentido, la falta de inducción de inmunidad tanto local como sistémica ante antígenos es una característica particular del tracto urogenital femenino, además de evitar respuestas intensas para facilitar la reproducción. Todas estas características traen consigo una insuficiente activación de las respuestas celulares y humorales a este nivel. Sin embargo, aún en ausencia de citólisis y activación de células de LC, los VPH que entran en la célula deberían desencadenar una respuesta que estimule la producción de IFNs de tipo I, el cual es importante para impedir la extensión de la infección. La producción de este tipo de IFNs no sólo ejercería un potente efecto antiviral, al inhibirse la síntesis proteica, sino que se produciría también un efecto anti-angiogénico y de estímulo de respuestas específicas o adaptativas. Sin embargo, los VPH pueden suprimir la expresión de los genes de interferón tipo I a través de las proteínas E6 y E7.

Finalmente, algunas proteínas del VPH, como E5 afectan la expresión de moléculas de histocompatibilidad (HLA) de clase I alterando la capacidad de reconocimiento de los linfocitos T citotóxicos. También las proteínas E6 y E7 parecen modificar la actividad del promotor de los genes HLA de clase I y de otros genes implicados en el procesamiento y presentación de péptidos virales. Pese a esto, no se ha podido observar una reducción significativa de expresión de

moléculas HLA en lesiones intraepiteliales cervicales, sin embargo se ha encontrado asociación entre las alteraciones en la expresión de estas moléculas con la transformación maligna. De hecho, el incremento de incidencia y progresión de las infecciones por VPH en pacientes inmunosuprimidas refleja la importancia que poseen las respuestas citotóxicas mediadas por los linfocitos T en la resolución definitiva y control de las infecciones por VPH. Paradójicamente la persistencia en la infección viral puede traer consigo que el propio sistema inmunitario, particularmente células de la inmunidad innata favorezcan el desarrollo y progresión tumoral. La respuesta inmunitaria en la historia natural de la infección por VPH puede pasar por fases de inmuno-vigilancia, inmunoselección y finalmente inmunoalteración que se corresponden con el proceso multifásico de la oncogénesis cervical (**Rincón O, 2007**).

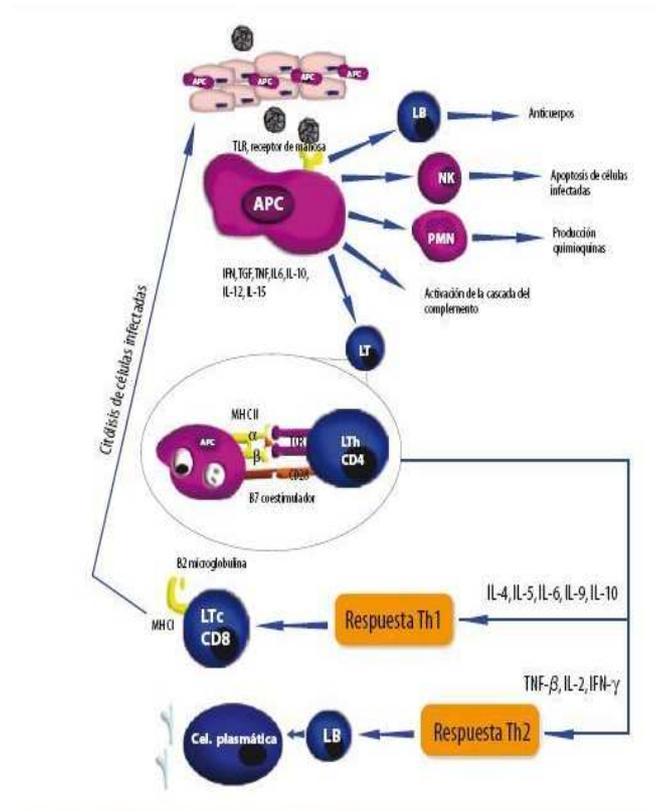


Figura 19. Respuesta Inmune en la Infección por VPH. Rincón, Pareja, Jaramillo y Aristizabal. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. Rev. Colomb Obstet Ginecol v.58 n.3 Bogotá jul./set. 2007.

II.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer de cuello uterino es una de las neoplasias más prevalentes en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer. La mayor incidencia y mortalidad de esta patología se presenta en los países en vías de desarrollo donde los programas de prevención y detección precoz no han sido exitosos (**Ferlay J, 2002**). En España, el cáncer invasor de cuello uterino es el sexto más frecuente y constituye el 4,8% de los cánceres en la mujer, (**Miñarro R, 2000**) una de las tasas más bajas del mundo, entre 3,4 y 12,2 casos por 100.000 mujeres/año (**De Sanjosé S, 2006**). En Venezuela sigue manteniéndose como la segunda causa de muerte por tumor maligno en la mujer según los anuarios de estadística del Ministerio de Salud y es el tumor más frecuente en las mujeres jóvenes y de edad media. Los factores de riesgo identificados corresponden a antecedentes ginecobstétricos y aspectos socioculturales: tales como la no escolaridad, bajo nivel socioeconómico, deficiencias nutricionales, tabaquismo, inicio de las relaciones sexuales a edad temprana, elevada promiscuidad, alta paridad (5 o más partos), y el primero antes de los 18 años. Otros factores de riesgo están relacionados con deficiente higiene genital, inflamación cérvico vaginal persistente, consumo prolongado de anticonceptivos orales, e infecciones producidas por herpes virus simple tipo 2, tricomonas, chlamydias y VPH. Estos factores se consideran como indicadores de la carcinogénesis, por lo que este tipo de cáncer se encuentra íntimamente relacionado con la infecciones de transmisión sexual. Debe señalarse que la transformación celular neoplásica se asocia a la posibilidad de inducción de estímulos del sistema inmunitario que resultan más intensos y manifiestos en CaCu por la participación de agentes biológicos en el proceso de carcinogénesis. A la expresión de antígenos tumorales se le superpone la de los de origen microbiológico y preferentemente los del VPH. Existen además fenómenos de modulación del sistema inmunitario/inflamatorio inducidos por la secreción de citoquinas, quimioquinas y/o factores de crecimiento producidos por las células del CaCu y del tejido circundante (**Oliveros J, 2006 Rodríguez D, 2006**).

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. Este reconocimiento induce una respuesta efectora que si resulta eficiente, logra lisar a las células infectadas por el VPH o a las células transformadas.

Como se ha referido, el proceso de transformación celular a nivel de cervix puede deberse a múltiples causas, ya sean cambios a nivel local, traumas, injuria e infecciones principalmente de etiología viral donde el VPH juega un papel fundamental. El proceso de respuesta inmunitaria/inflamatoria puede desempeñar diferentes funciones en la biología del crecimiento neoplásico. Las características de los factores solubles producidos por las células inflamatorias perfilan el proceso de crecimiento tumoral y del sustrato peritumoral. Se producen citoquinas y factores de crecimiento que según su patrón pueden favorecer o inhibir la supervivencia y crecimiento de las células tumorales. Por lo tanto las características de la respuesta inmunitaria humoral y celular son ya claves en las fases iniciales de la carcinogénesis y del crecimiento tumoral.

De acuerdo con estos planteamientos nos propusimos investigar en el epitelio y estroma del cuello uterino la respuesta inmunitaria asociada a la transformación displásica y a la infección por VPH. Pretendimos estudiar si el patrón de expresión de citoquinas en este tejido se relaciona con las distintas fases evolutivas de la lesión displásica tumoral cervical. Así mismo investigar si la intensidad y el patrón de esta respuesta del sistema inmunitario/inflamatorio puede modificarse por la existencia de infección por el VPH.

II.1 OBJETIVO GENERAL

Con base a los planteamientos anteriores se decidió 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.

II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

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-

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

III.1.1 Tipo De Diseño. El presente estudio fue de tipo prospectivo, inferencial, transversal y translacional.

III.1.2 Periodo De Estudio. Esta investigación fue realizada durante el periodo comprendido entre el año 2005 y año 2009.

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), 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 Laboratorio de Anatomía Patológica de la Policlínica Maracaibo; el estudio inmunohistoquímico de las citoquinas y factores de crecimiento analizados 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. La muestra poblacional objeto de estudio estuvo constituida por 500 mujeres de las cuales fueron seleccionadas 183 mujeres que acudieron a la consulta ginecológica rutinaria y a través de jornadas de pesquisa de CaCu en diferentes centros dispensadores de salud del Municipio Maracaibo y San Francisco del Estado Zulia, Venezuela: del Hospital Manuel Noriega Trigo, del Ambulatorio La Victoria, del Ambulatorio Cujicito, del Ambulatorio Los Olivos Salud Maracaibo, y del Servicio médico Odontológico de la Universidad del Zulia durante el período de Enero del 2005 a Diciembre del 2009.

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.
- 2) Ser o haber sido sexualmente activas.
- 3) Cualquier raza y edad e historia de paridad.

III.1.7 Criterios De Exclusión

- 1) Mujeres embarazadas
 - 2) Evidencia de CaCu
 - 3) Normalidad del epitelio cervical
 - 4) Infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
 - 5) Tratamiento hormonal o anti-inflamatorio o anti-infeccioso local y/o sistémico por patología genital en los tres meses previos.
 - 6) Tratamiento previo por infección con VPH.
 - 7) Padecer enfermedades autoinmunes.
 - 8) Padecer insuficiencia renal, hepática, cardíaca y/o respiratoria grave.
 - 9) 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 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.

III.2 GRUPOS DE ESTUDIO

Para la realización de este trabajo se efectuaron distintos grupos de estudio según la estrategia de investigación y los recursos disponibles para efectuarla.

III.2.1 Grupo De Estudio 1. Para la determinación de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-6. La muestra poblacional fue de total de 30 pacientes y 9 mujeres sanas como control.

III.2.2 Grupo De Estudio 2. Para la determinación de IL-2R e IL-10 se incluyeron 50 pacientes y 9 mujeres controles.

III.2.3 Grupo De Estudio 3. Para la determinación de GM-CSF y TGF- β 1 la población estuvo constituida por 48 pacientes y 4 mujeres grupo control.

III.2.4 Grupo De Estudio 4. Para estudiar la expresión de VEGF el grupo estuvo constituido por 55 pacientes y 10 mujeres control.

III.3 TOMA DE MUESTRA PARA EL ESTUDIO HISTOLOGICO Y DETERMINACION DE CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

El examen físico ginecológico fue realizado por el médico gineco-obstetra, el cual incluyó inspección de genitales externos, colocación del espejo para visualizar el cuello uterino, una toma citológica cervico-vaginal (CCV) y una exploración colposcópica. Aquellas pacientes a las cuales se les detectó alguna atipia celular, fueron sometidas a la siguiente toma de muestra:

III.4 PARA EL ESTUDIO HISTOLÓGICO

Utilizando una pinza de Schumacher para biopsia uterina, se tomó un fragmento de tejido, colocándolo en formalina al 10%, e incluyéndolo en parafina para la realización de cortes de 6 μ que fueron teñidos posteriormente con hematoxilina– eosina para identificar cambios histopatológicos.

III.5 PARA EL ESTUDIO INMUNO-HISTOLÓGICO

Otro fragmento de tejido se utilizó para la determinación de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL- 6. IL-2R, IL-10, TGF β -1 y GM-CSF y VEGF por técnicas de inmunohistoquímica, 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.5.1 Determinación De Il-2, Ifn- γ , Tnf- α , Il-4 E Il- 6 En Tejido Por Inmunohistoquímica. Se analizaron 21 pacientes NIC I, 5 NIC II , 4 NIC III y 9 controles. Se realizaron cortes de 4 micras de grosor en un criostato (*Shandon®*, *Pittsburg, Pennsylvania, USA*), de cada una de las biopsias de cuello uterino congeladas, tanto de las pacientes con lesión de cuello uterino como de las controles. Para evaluar la expresión de las citoquinas IL-2, -4, -6, IFN- γ y TNF- α , los cortes de tejido se fijaron con acetona fría durante 5 minutos, luego de un lavado de 10 minutos con buffer fosfato pH 7.2 (PBS), se incubaron durante una hora con los respectivos anticuerpos monoclonales, previa dilución de los mismos 1:100, IgG2a anti IL-2 humana, IgG1 anti IL-4 humana, IgG1 anti IL-6 humana, IgG1 anti TNF- α humana e IgG1 anti IFN- γ humana.(*PHARMINGEN-BECTON DICKINSON Co, USA*). Después de lavar los tejidos durante 10 minutos en PBS, se incubaron con un anticuerpo IgG anti mouse-FITC-F(ab)²(*ACCURATE CHEMICAL AND SCIENTIFIC CORPORATION,N.Y.USA*) previa dilución 1:80. A todas las secciones de tejido después de lavadas con PBS durante 10 minutos, se les agregó una solución de parafenilendiamina en PBS y glicerol para evitar la rápida disminución de la fluorescencia al ser observada en un microscopio con

epifluorescencia (OLYMPUS, BX-MAX 50, NY, USA), usando un objetivo de 40X. Los controles negativos estuvieron representados por anticuerpos monoclonales del mismo isotipo pero no dirigidos a antígenos relevantes en el tejido.

III.5.2 Determinación De Il-2r E Il-10 En Tejido Por Inmunohistoquímica.

Se analizaron 36 pacientes con NIC I, 6 con NIC II, 8 con NIC III y 9 controles. De las biopsias congeladas se realizaron cortes de 4 μ por cada tejido utilizando un criostato (*Shandon®, Pittsburg, Pennsylvania, USA*). Se realizó la detección de la citoquina IL-10 y el receptor IL-2R por el método de inmunofluorescencia indirecta, de la manera siguiente: los cortes de tejido se fijaron en acetona fría durante 5 minutos, luego se lavaron por 2 minutos con buffer fosfato salino pH 7.2 (PBS), se incubaron durante una hora con los respectivos anticuerpos monoclonales IgG_{2a} de rata anti IL-10 humana, IgG_{1,k} de ratón anti IL-2R humana. (*PHARMINGEN- Becton Dickinson Co, USA*), previa dilución de los mismos 1:100. Culminado el tiempo se procedió a realizar otros dos lavado de los tejidos durante 2 minutos en PBS, y se incubaron nuevamente por una hora, con un anticuerpo secundario anti IgG de rata producido en conejo y conjugada con isotiocianato de fluoresceína (SIGMA St. Louis, MD. USA), a una dilución 1:80 para la citoquina IL-10, mientras que para IL-2R se utilizó un anticuerpo secundario diluido 1:80 anti IgG de ratón F(ab')₂ producido en oveja conjugado con isotiocianato de fluoresceína (SIGMA St. Louis, MD. USA). Luego se lavaron los tejidos 2 veces con PBS durante 2 minutos, finalmente se les agregó una solución de PBS –Glicerol-parafenilenediamina y se observaron en un microscopio con epifluorescencia (OLYMPUS, BX-MAX 50, NY, USA) usando un objetivo de 40X.

III.5.3 Determinación De Gm-Csf Y Tgf-B1 En Tejido Por Inmunohistoquímica.

Se analizaron 32 pacientes NIC I, 9 NIC II, 7 NIC III y 4 controles. La detección de los factores TGF β -1 y GM-CSF se realizó por inmunohistoquímica. Para esta técnica se realizaron cortes de 4 micras de grosor de las diferentes biopsias de cuello uterino congeladas, tanto de las pacientes como de los controles mediante la utilización de un criostato (*Shandon, Pittsburg,*

Pennsylvania, USA). Los cortes de tejidos se fijaron con acetona fría durante 5 minutos, luego de un lavado con buffer fosfato pH 7,2 (PBS), se incubaron con suero de conejo al 1% durante 35 minutos a 37°C. Luego se lavaron 2 veces con PBS durante 10 minutos. Para determinar la expresión del TGF-β1 se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TGF-β1 humano y para la determinación de GM-CSF se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata anti-GM-CSF humano (BD PHARMINGEN TECHNICAL DATA SHEET Co, USA), previa dilución de los mismos 1:40. Ambas láminas se lavaron 2 veces con PBS durante 10 minutos, se incubaron nuevamente por una hora a 37°C con un segundo anticuerpo, previa dilución 1:80, de tipo anti IgG ratón producido en conejo conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (SIGMA) para el TGF-β1, y para GM-CSF con un anticuerpo secundario anti IgG de rata F(ab)₂ producido en oveja conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SIGMA). Luego se lavaron 2 veces con PBS durante 2 minutos se secaron y se le agregó PBS-glicerol-p-fenilenediamina para evitar la rápida disminución de la fluorescencia, al ser observada en un microscopio con epifluorescencia (Olimpus; Bx-Max 50, NY, USA), usando un objetivo de 40X. Los controles negativos estuvieron representados por anticuerpos monoclonales del mismo isotipo pero no dirigidos a antígenos relevantes en el tejido.

III.5.4 Determinación Del Factor De Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF). Se analizaron 45 pacientes NIC I, 5 NICII, 5 NIC III y 10 controles. En este estudio se determinó la expresión del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF). De las biopsias congeladas se realizaron cortes de 4μ 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). Los tejidos se incubaron con un anticuerpo biotilnado anti Factor de Crecimiento Endotelial Vascular humano hecho en cabra (R&D Systems), el cual se hizo reaccionar con el tejido por una hora, se lavo con PBS y se le agrego posteriormente streptavidina marcada con Ficoeritrina por media hora. Después de lavar con PBS, se agregó una solución de PBS-glicerol-p-fenilenediamina para evitar la pérdida de fluorescencia. Se observó

en microscopio con epifluorescencia. (Olimpus; Bx-Max 50, NY, USA). El control negativo estuvo representado por un anticuerpo monoclonal del mismo isotipo contra un antígeno no relevante en el tejido a estudiar.

Se contaron células positivas fluorescentes por campo de 400X tanto en epitelio como en estroma y se obtuvo la media de las células observadas por tejido. Los tejidos controles fueron tratados de igual manera que los tejidos de las pacientes. Los controles negativos estuvieron representados por anticuerpos monoclonales del mismo isotipo pero no dirigidos a antígenos relevantes en el tejido.

III.6 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 colocado en un tubo esteril para ser posteriormente trasladado al Laboratorio Regional de Referencia Viroológica. Estas se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

III.7 DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VPH MEDIANTE IDENTIFICACIÓN GENÓMICA: PVHFAST (PHARMAGEN S.A.)

La detección del ADN del VPH se realizó mediante la amplificación genómica por la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizándose para ello el Kit VPH-Fast del Laboratorio PHARMA-GEN (España). Utilizándose para ello primers específicos a la secuencia de 450pb la cual representa la región L1 de marco abierto de lectura (ORF) del virus. En base a esto el fragmento L1 fue sometido a cortes con enzimas de restricción (PHARMA GEN- VPH-FAS), PSA I y II para obtener el genotipo específico del virus.

III.8 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 las diferentes citoquinas entre los grupos de sujetos estudiados (casos vs. controles) y comparando la presencia del VPH con las diferentes citoquinas estudiadas, utilizando ANOVA más post test de Bonferroni. Se consideran significativos los valores de $p < 0.05$

III.9. 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

EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LOS PACIENTES CON LESIONES PREINVASIVAS DEL CUELLO UTERINO Y EN CONTROLES.

En la siguiente sección se presentan los resultados obtenidos para cada una de las determinaciones de citoquinas en biopsias de cuello uterino, así como la identificación genómica del VPH. Los hallazgos fueron reportados en cuatro diferentes grupos de pacientes y relacionados a la expresión de la citoquina o factor de crecimiento, al grado de la lesión del cuello uterino y a la presencia de infección por el VPH.

IV.1 GRUPO I: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-6 EN PACIENTES CON LESIONES DISPLÁSICAS DEL CUELLO UTERINO.

Se estudiaron biopsias de cuello uterino de 30 pacientes que presentaron diferentes grados de lesiones displásicas de cuello uterino: 21 (70%) con NIC I, 5 (16,7%) con NIC II y 4 (13,3%) con NIC III. Como controles se analizaron biopsias de cuello uterino de 9 mujeres sanas.

Se diagnosticó la presencia del VPH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 14 casos de los 30 estudiados (36%) de los cuales 9(64,3%) correspondían a NIC I, 2(11,3%) a NIC II y 3 (21,4%) fueron NIC III.

La expresión general del IFN- γ en los tejidos del CU de las pacientes se encontró aumentada con respecto al grupo control que estuvo ausente. Cuando se comparó la expresión de la citoquina en los grados de NICs, no se encontró diferencia significativa entre los NIC I y II y NIC II y III. Sin embargo si existieron entre NIC I y III ($p < 0,001$), observándose que a medida que aumenta el grado de lesión mayor es la expresión de IFN- γ (Figura 20).

Con respecto a la expresión general de TNF- α se observó un incremento en las muestras de pacientes que presentaron lesiones cervicales comparadas con el grupo control $5,26 \pm 3,58$ vs. $1,55 \pm 2,65$ ($p < 0,006$). No se observaron

diferencias significativas en la expresión de TNF- α a medida que aumentaba el grado de las lesiones; sin embargo, al comparar la expresión del factor en cada uno de los grupos de lesión con respecto al control se observó diferencia significativa con los estadios NIC I y NIC III ($p < 0.05$) (Figura 21).

Se encontró aumento en la expresión de la IL-2 en el epitelio y estroma de los tres grupos de mujeres con displasia con respecto a las controles. En grupo NIC I y NIC II esta expresión fue significativamente superior a la de los controles. ($p < 0.001$). No se apreció diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la IL-2 al comparar los diferentes grados de lesión entre sí, sin embargo se apreció la tendencia de disminución de la expresión de esta citoquina a medida que aumentaba el grado de la lesión (Figura 22).

En la expresión general de la IL-4 tanto en las pacientes con lesión como en el grupo control, no se evidenciaron diferencias significativas (7.18 ± 5.14 vs 5.77 ± 7.32). Esto estuvo reflejado al analizar los diferentes grados de lesión con el grupo control (Figura 23).

Finalmente se observó un incremento general de la IL-6 en las pacientes con lesión displásica del cérvix con respecto a los controles (5.31 ± 2.52 vs. 0.77 ± 2.33 ; $p < 0.001$). Estas diferencias alcanzaron significación estadística entre los grupos NIC II y NIC III y el control. No se encontró diferencia significativa al comparar la expresión de la citoquina en los diferentes grados de lesión (Figura 24).

La figura 25 muestra al microscopio con epifluorescencia, la expresión de la IL-2 en epitelio y estroma en una biopsia de un paciente con neoplasia intraepitelial cervical.

Expresión de IFN- γ en tejido de cuello uterino en pacientes y controles distribuidos según el grado de lesión

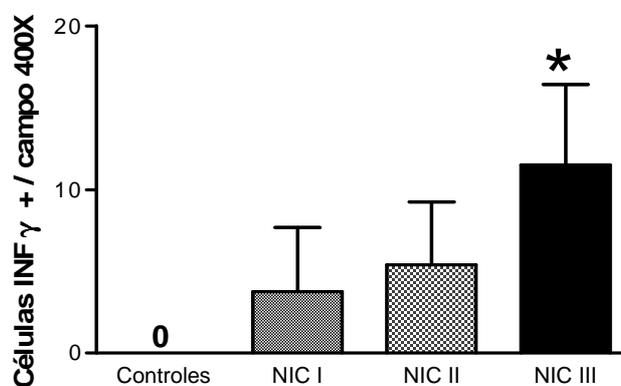


Figura 20. Células positivas para IFN- γ en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=30) y controles (n=9) detectadas por técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar. Ninguno de los pacientes del grupo control expreso IFN- γ . * $p < 0.001$ NIC III vs. NIC I. 0= ausencia de expresión.

Expresión de TNF- α en tejido de cuello uterino en pacientes y controles distribuidos según el grado de lesión

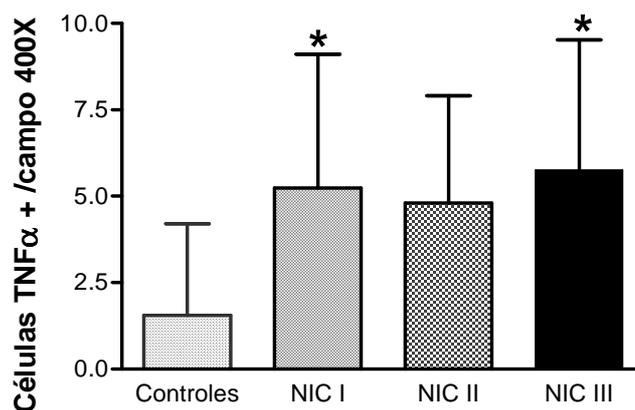


Figura 21. Células positivas para TNF- α en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=30) y controles (n=9) detectadas por técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ vs. Control.

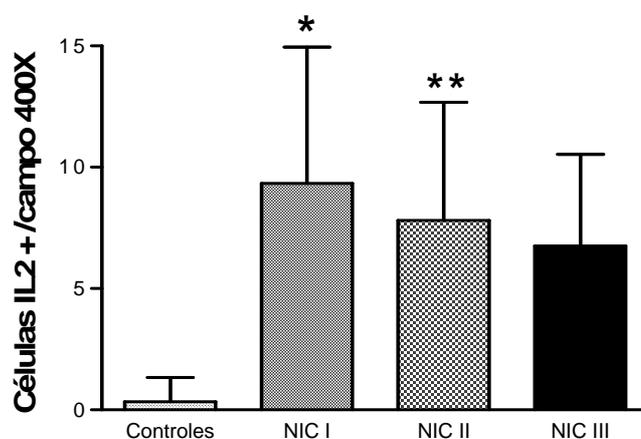
Expresión de IL-2 en tejido de cuello uterino en pacientes y controles distribuidos según el grado de lesión

Figura 22. Células positivas para IL-2 en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=30) y controles (n=9) detectadas por técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar. * $p < 0.001$ NIC I vs. Control; ** $p < 0.05$ NICII vs. Control

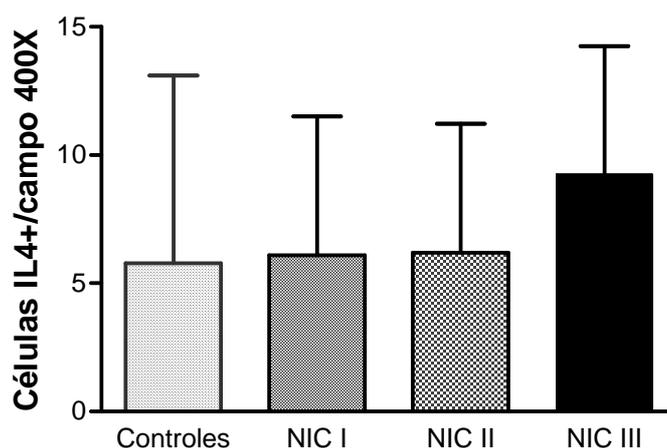
Expresión de IL-4 en tejido de cuello uterino en pacientes y controles distribuidos según el grado de lesión

Figura 23. Células positivas para IL-4 en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=30) y controles (n=9) detectadas por técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar.

Expresión de IL-6 en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión

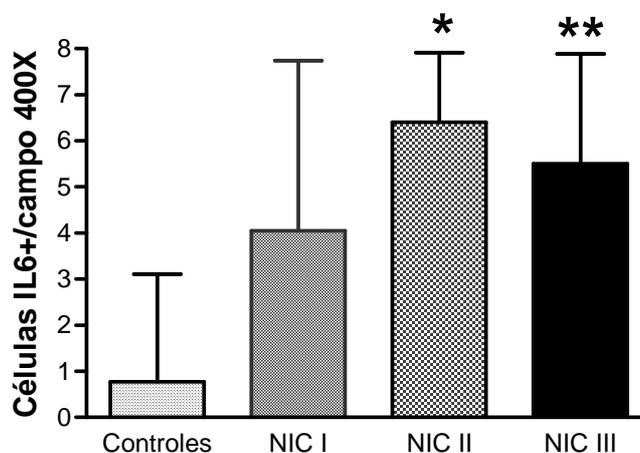


Figura 24. Células positivas para IL-6 en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=30) y controles (n=9) detectadas por técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar. * $p < 0.01$ NIC II vs. Control; ** $p < 0.05$ NICIII vs. Control.

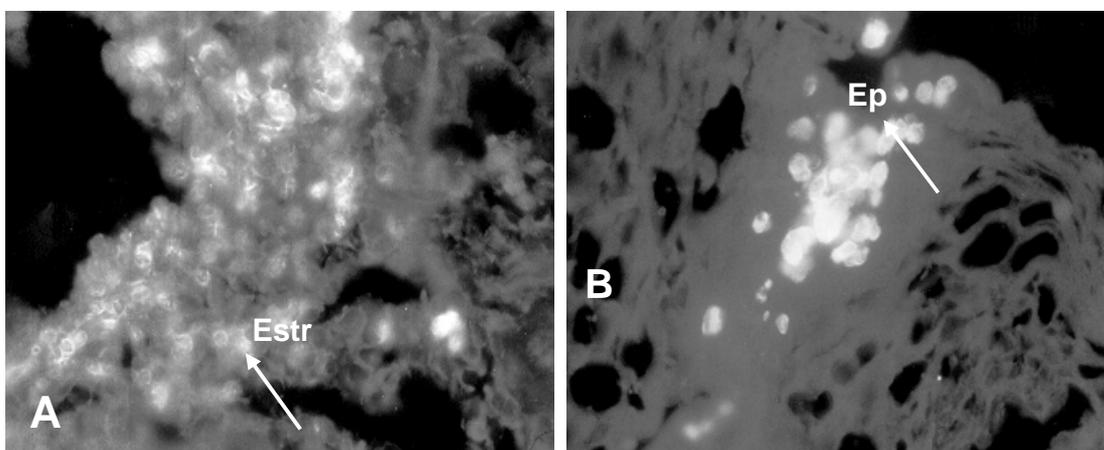


Figura 25. **A)** Tejido de cuello uterino expresando células IL-2 positivas en el estroma (flecha). **B)** Tejido de cuello uterino mostrando acumulo de células IL-2 positivas en el epitelio. Ep (epitelio), Estr (estroma). Magnificación 400X.

IV.2 GRUPO 2: IL-10 Y IL-2REN PACIENTES CON DISPLASIA DE CUELLO UTERINO Y CONTROLES.

Se estudiaron biopsias de cuello uterino de 50 pacientes con displasia de cuello uterino 36 (72%) NIC I, 6 (12%) NIC II y 8 (16%) NIC III y de 9 mujeres sanas seleccionadas como controles para el estudio.

Se diagnosticó la presencia de VPH mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 10 (20%) de las pacientes estudiadas de las cuales 4 (40%) correspondían a NIC I, 1 (10%) NICII y 5 (50%) NICIII, así mismo se encontró el genoma viral en 3 (33%) de las pacientes control.

La expresión de IL-10 fue superior en las mujeres con lesiones displásicas (4.1 ± 8.0) que en las controles sanas (0.01 ± 0.03) y se encontró significancia estadística cuando se comparó NIC III con el control ($p < 0.01$) (Figura 26).

De igual forma se observó un aumento en la expresión de IL2-R en los diferentes grados de lesión (1.0 ± 1.7) con respecto a los tejidos del grupo control (0.05 ± 0.1). En las pacientes con grado de lesión NIC I (1.0 ± 1.7) y NIC II (1.2 ± 2.5) no se evidencio diferencia significativa al compararlos con el control. Solo en NIC III (3.0 ± 4.3) observó aumento de la expresión de este receptor ($p < 0.05$) con respecto al control. De manera general se apreció la tendencia a incrementarse la expresión de este receptor a medida que aumentaba el grado de la lesión. (Figura 27).

La expresión de las citoquinas determinadas en este grupo observadas mediante inmunofluorescencia mostró una localización epitelial y en el estroma (Figuras 28 y 29).

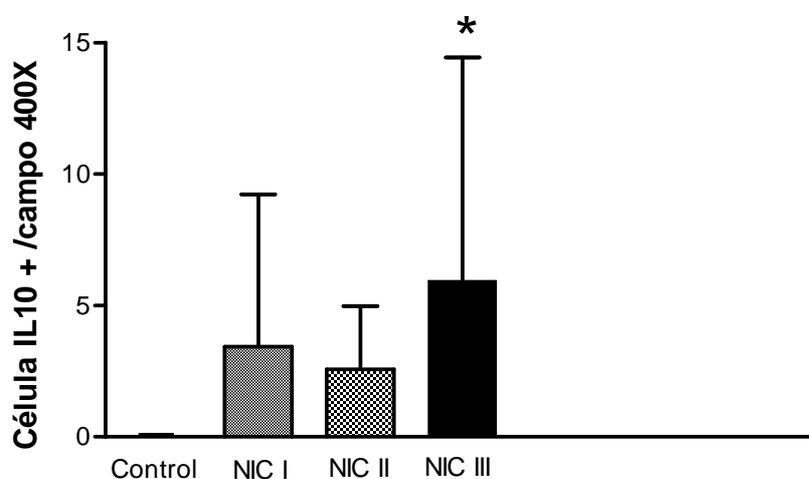
Expresión de IL-10 en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión

Figura 26. Células positivas para IL-10 en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=50) y controles (n=9) detectados por inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar. * $p < 0.01$ NIC III vs. Control.

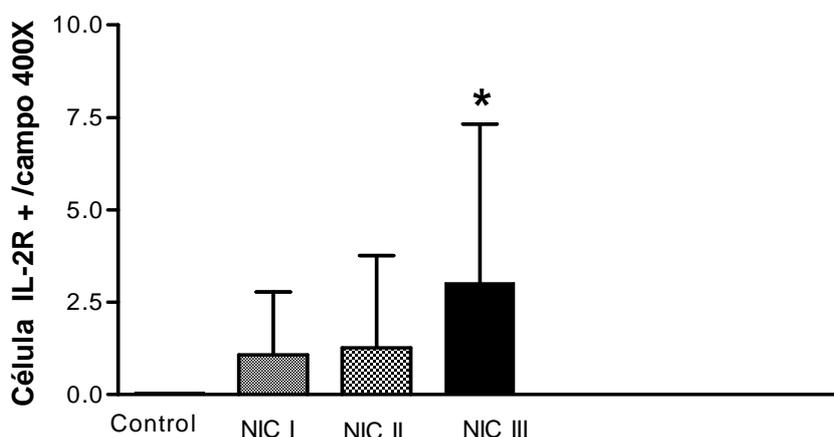
Expresión de IL2-R en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión

Figura 27. Células positivas para IL-2R en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=50) y controles (n=9) detectados por inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ vs. Control.

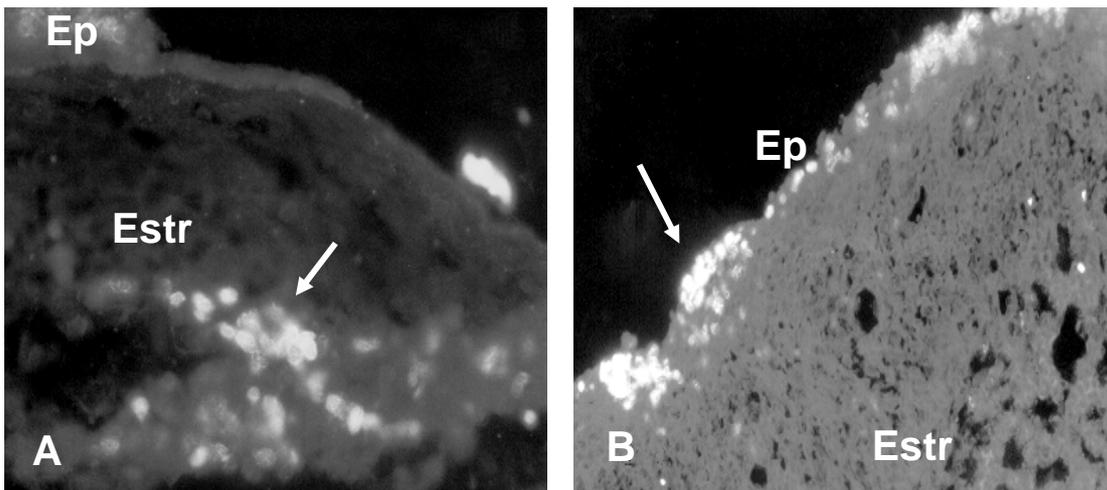


Figura 28. A) Tejido de cuello uterino mostrando células IL-10 positivas en el estroma (Estr; Flecha); B) Tejido de cuello uterino expresando acumulo de células IL-10 positivas en el epitelio (Ep; Flecha). Magnificación 400X.

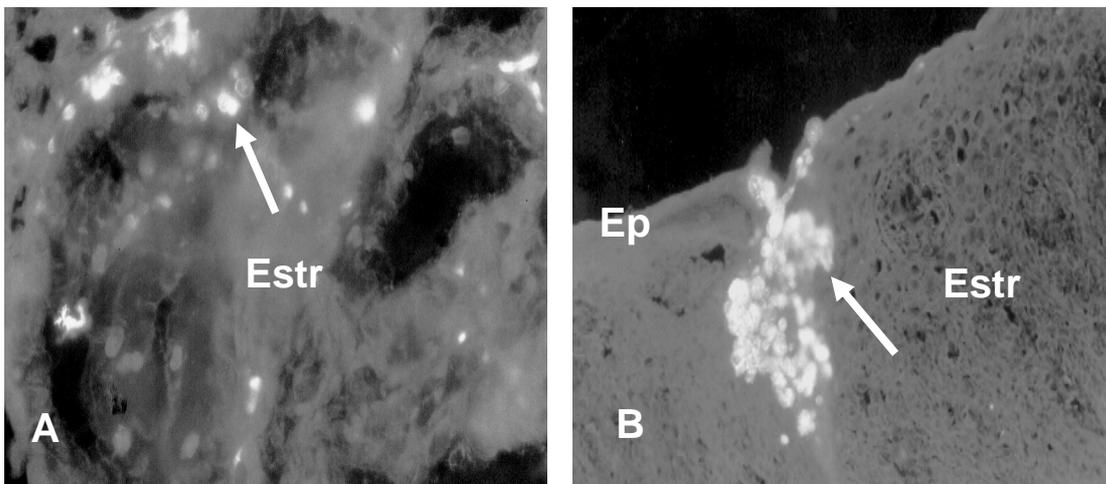


Figura 29. A) Tejido de cuello uterino expresando células IL-2R positivas en estroma (flecha); B) Tejido de cuello uterino expresando acumulo de células IL-2R positivas en el epitelio (flecha). Ep (epitelio) Estr (estroma). Magnificación 400X.

IV.3 GRUPO 3: GM-CSF Y TGF-B1 EN PACIENTES CON LESIONES PREINVASIVAS DE CUELLO UTERINO Y CONTROLES.

Se estudiaron biopsias de cuello uterino de 48 pacientes con displasia epitelial de cuello uterino 32 (66.66%) con NIC I, 9 (18.75%) con NIC II y 7 (14.58%) con NIC III y de 4 mujeres sanas seleccionadas como controles para este grupo.

Sé diagnosticó la presencia de VPH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 13 (25 %) de las pacientes estudiadas de las cuales 6 (46.15%) correspondían a NIC I, 2 (15.38%) a NIC II y 5 (38.46%) a NIC III.

En la figura 30 se observa la expresión de GM-CSF en los diferentes estadios de lesión ($1,32 \pm 0,07$) y grupo control ($0,22 \pm 0,16$). En las pacientes con grado de lesión NIC I, NIC II y NIC III ($1,32 \pm 0,57$, $1,12 \pm 0,52$, $1,55 \pm 0,32$, respectivamente) se evidenció incremento de la expresión de GM-CSF en el tejido, con respecto al grupo control ($0,22 \pm 0,16$) ($p < 0,01$, $p < 0,03$ y $p < 0,003$ respectivamente). No se apreció relación entre la expresión de la citoquina y el grado de lesión.

Se observó una diferencia significativa ($*p < 0,0001$) cuando se comparó el grupo de pacientes con lesión ($2,23 \pm 0,13$) en relación al grupo control ($0,61 \pm 0,27$). En las pacientes NIC I la expresión del TGF- β 1, estuvo elevada en el tejido uterino ($1,89 \pm 0,77$) al compararla con el grupo control con una diferencia significativa de $p < 0,008$. El grupo de lesión NIC II, también mostró un incremento en la expresión del TGF- β 1 ($2,69 \pm 0,78$) con respecto al tejido control ($p < 0,0008$). De igual forma, en las pacientes con NIC III la expresión del TGF- β 1 estuvo aumentada en tejido uterino ($3,27 \pm 0,52$) cuando se comparó con los tejidos del grupo control ($p < 0,003$). (Figura 31). La expresión de esta citoquina estuvo asociada al grado de lesión del cérvix.

Expresión de GM-CSF en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión

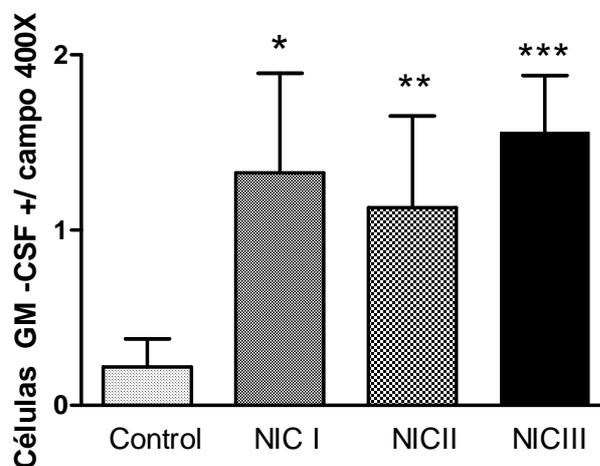


Figura 30. Células positivas para GM-CSF en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=48) y controles (n=4) detectados por inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar. * $p < 0.01$ NIC I vs. Control ** $p < 0.03$ NIC II vs. Control *** $p < 0.003$ NIC III vs. Control

Expresión de TGF β 1 en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión

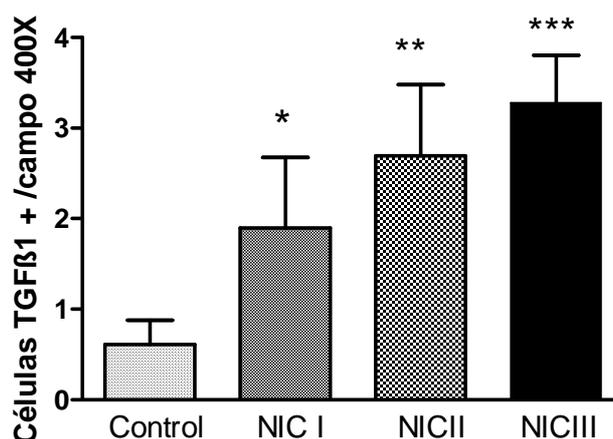


Figura 31. Células positivas para TGF β 1 en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=48) y controles (n=4) detectados por inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar. * $p < 0.008$ NIC I vs. Control ** $p < 0.0008$ NIC II vs. Control *** $p < 0.003$ NIC III vs. Control

IV.4 GRUPO 4: VEGF EN PACIENTES CON LESIONES PREINVASIVAS DE CUELLO UTERINO Y CONTROLES

Se estudiaron biopsias de cuello uterino de 55 pacientes que presentaron diferentes grados de lesiones preinvasivas de cuello uterino 45 (81.8%) con NIC I, 5 (9.09%) con NIC II y 5 (9.09%) con NIC III y de 10 mujeres sanas seleccionadas como controles para este grupo.

Se diagnosticó la presencia de VPH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 11 (17 %) de las pacientes estudiadas de las cuales 6 (54.5%) correspondían a NIC I, 2 (18.18%) a NICII y 3 (27.27%) a NICIII.

Se observó diferencia ($p < 0.01$) en la expresión del VEGF en pacientes con lesión (3.876 ± 1.08) y controles (0.214 ± 0.265). La figura 32 muestra la expresión del VEGF en el grupo control y en pacientes de acuerdo al grado de lesión. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre NIC I (1.77 ± 1.357) y el grupo control (0.214 ± 0.265), entre NIC II (4.878 ± 0.955) vs. NIC I y grupo control ($p < 0.001$), y entre NIC III (4.99 ± 0.95) con respecto al grupo NIC I y el control ($p < 0.001$). Es importante señalar que el número de células que expresaron VEGF se incrementó a medida que aumentaba el grado de lesión. La figura 33 es demostrativa de células positivas al VEGF en el tejido uterino.

Expresión de VEGF en tejido de cuello uterino en paciente y controles distribuidos según el grado de lesión

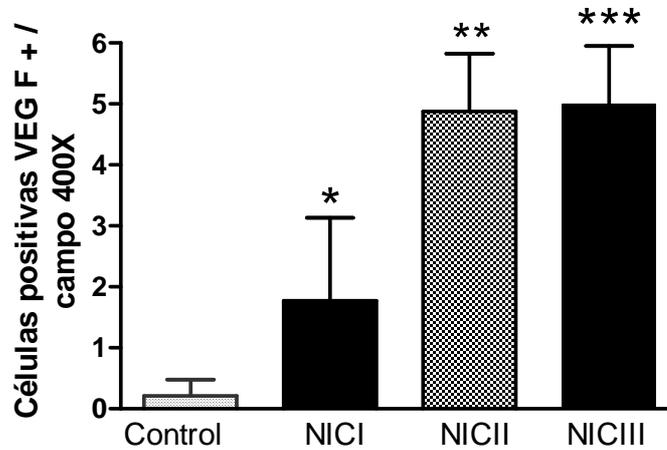


Figura 32. Células positivas para VEGF en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=55) y controles (n=10) detectados por inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo \pm desviación estándar. * $p < 0.01$ NIC I vs. Control ** $p < 0.001$ NIC II vs. NIC I y control *** $p < 0.001$ NIC III vs. NIC I y Control

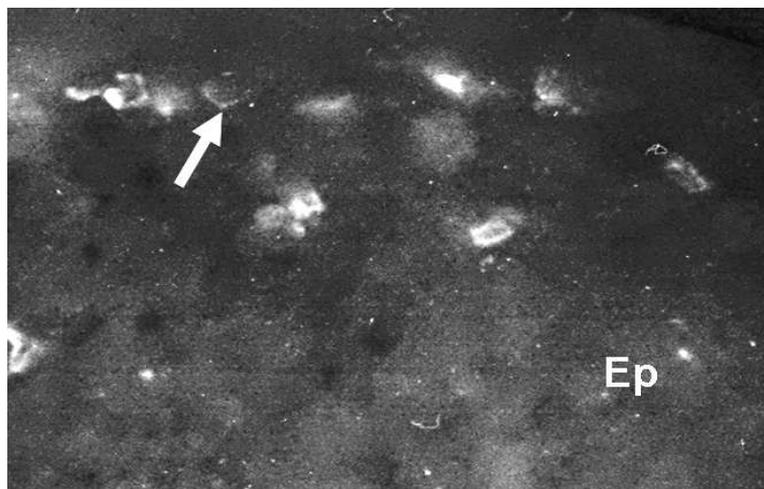


Figura 33. Tejido de cuello uterino de paciente con NIC III expresando células VEGF positivas (flecha) en epitelio (Ep). Magnificación 400X.

IV.5 EXPRESION DE CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO DE ACUERDO AL TIPO DE LESION ENCONTRADA E INFECCION POR VPH.

La tabla 4 muestra el número de pacientes VPH positivos y negativos correspondientes a cada uno de los grupos objeto de estudio, distribuidos de acuerdo al tipo de lesión encontrada. Del total de pacientes incluidos se observó un mayor porcentaje de infección por VPH en los pacientes con NIC III 13/25 (52 %). Cuando se analizó el número de casos positivos y negativos para infección por VPH de acuerdo a los tipos de lesión se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0006$) entre el grupo NIC I vs. NIC III.

Tabla 4. Distribución de VPH de acuerdo al grupo de estudio y grado de lesión encontrada.

Control	NIC I		NIC II		NIC III			
	VPH +	VPH -	VPH +	VPH -	VPH +	VPH -	VPH +	VPH -
Grupo 1	0	9	9	12	2	3	3	1
Grupo 2	3	6	4	30	1	5	5	5
Grupo 3	0	4	6	26	2	7	2	5
Grupo 4	0	10	6	39	2	3	3	2
TOTAL	3	29	25	107	7	18	13	12

IV.6 EXPRESIÓN TISULAR DE IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 E IL-6 EN RELACIÓN A LA INFECCIÓN POR VPH.

Se analizó la expresión de las citoquinas estudiadas en el Grupo I de acuerdo a la positividad o negatividad ante la infección por VPH. La figura 34 muestra el número de células que expresaron IL2, IL6, IL4, TNF α , e INF γ en controles y pacientes VPH positivos y negativos. Se encontraron diferencias significativas cuando se comparó el número de células positivas para IL2, IL6, TNF α , e INF γ al

compararlo con el control. Sin embargo en los pacientes, la infección por el VPH no demostró tener un efecto significativo en la expresión de estas citoquinas.

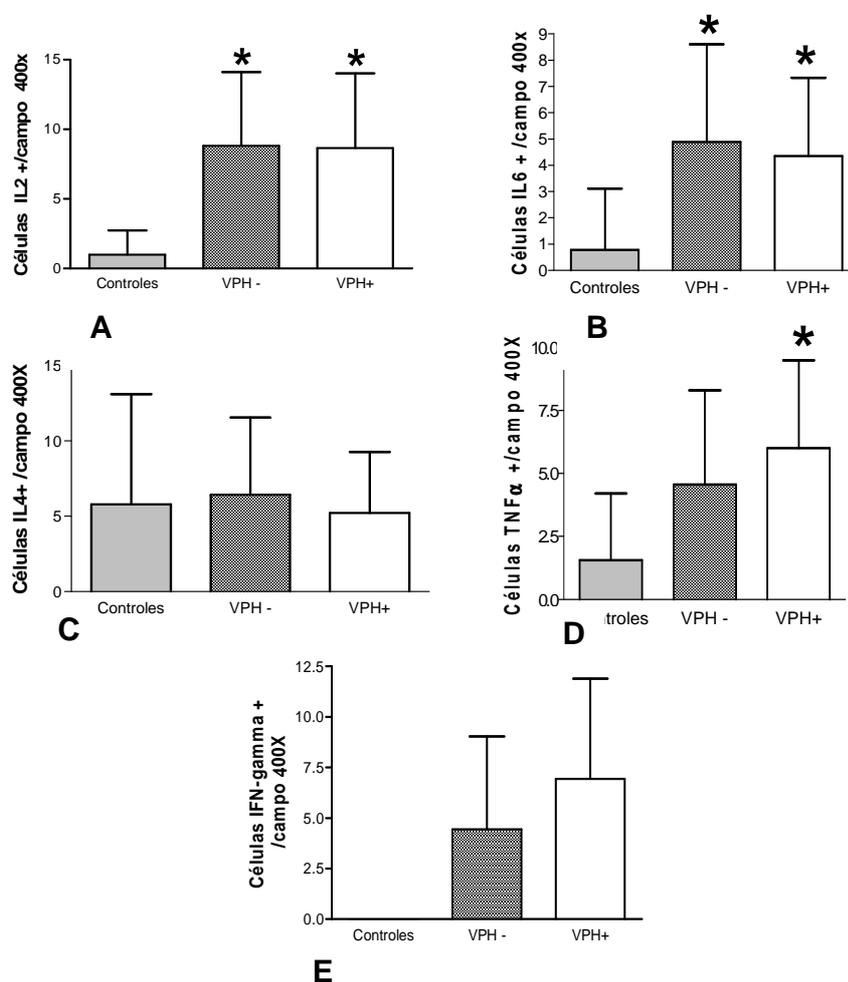


Figura 34. Células positivas para IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , e INF- γ detectadas en biopsias de cuello uterino de pacientes (n=30) y controles (n=9) por técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Pacientes VPH += 14 y VPH - = 16. Los resultados se expresan como promedio de células positivas por campo de 400x \pm desviación estándar. **A:** IL-2, * $p < 0.05$ VPH + y VPH- vs. Control. **B:** IL-6, * $p < 0.001$ VPH + y VPH- vs. Control. **C:** IL-4. **D:** TNF-alfa, * $p < 0.05$ VPH + vs. Control. **E:** IFN-gamma; control value = 0. No se apreció diferencias significativas entre los pacientes VPH+ y VPH-.

IV.7 PORCENTAJE DE CONTROLES Y PACIENTES QUE EXPRESARON CITOQUINAS EN RELACIÓN AL TIPO DE LESIÓN Y A LA INFECCIÓN CON EL VPH.

El análisis del porcentaje de pacientes que expresaban alguna de las citoquinas estudiadas en relación al grado de lesión y a la infección por el VPH, demostró de manera general que los pacientes con el grado NCI I que no presentaban infección por el VPH fueron el grupo de mayor porcentaje en la expresión de citoquinas. Los grados NIC II y NIC III mostraron variaciones de acuerdo a la citoquina estudiada y a la infección del VPH (Figuras 35 a la 44).

Grupo 1: Expresión de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-6.

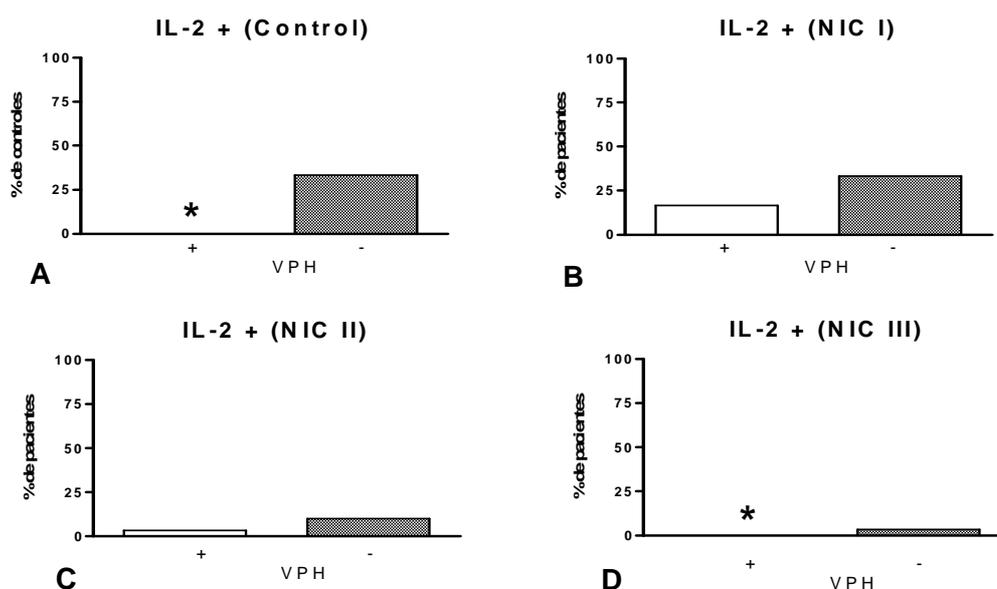


Figura 35. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-2 en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. Se aprecia que el mayor porcentaje fue en el grupo de pacientes con NIC I negativos para la infección por VPH (B). El valor 0 está representado por un asterisco.

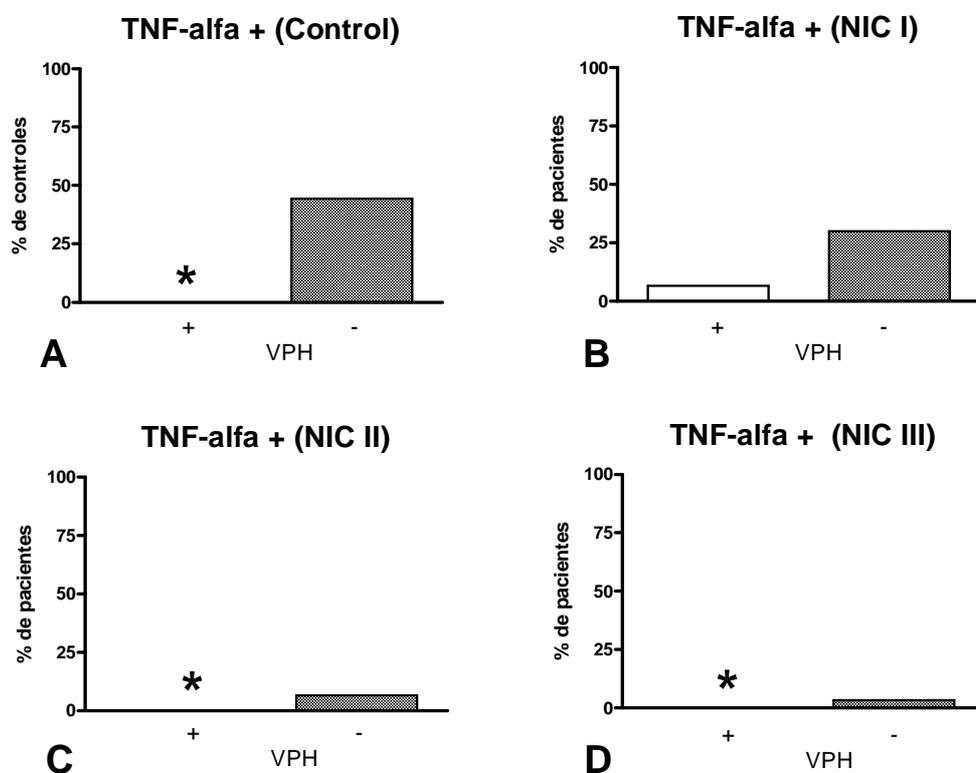


Figura 36. Porcentaje de pacientes que expresaron TNF- α en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. Se aprecia que el mayor porcentaje fue en el grupo de pacientes con NIC I negativos para la infección por VPH (B). El valor 0 está representado por un asterisco.

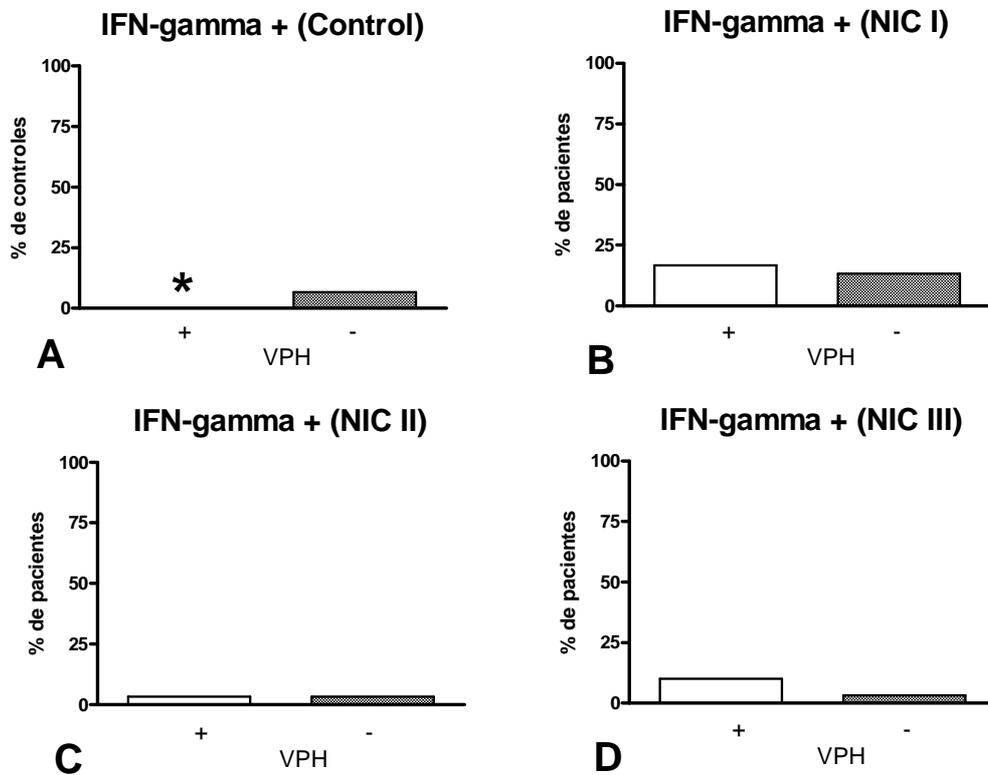


Figura 37. Porcentaje de pacientes que expresaron IFN- γ en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. No se aprecia una distribución preferencial para los grupos de pacientes infectados o no por el VPH. El valor 0 está representado por un asterisco.

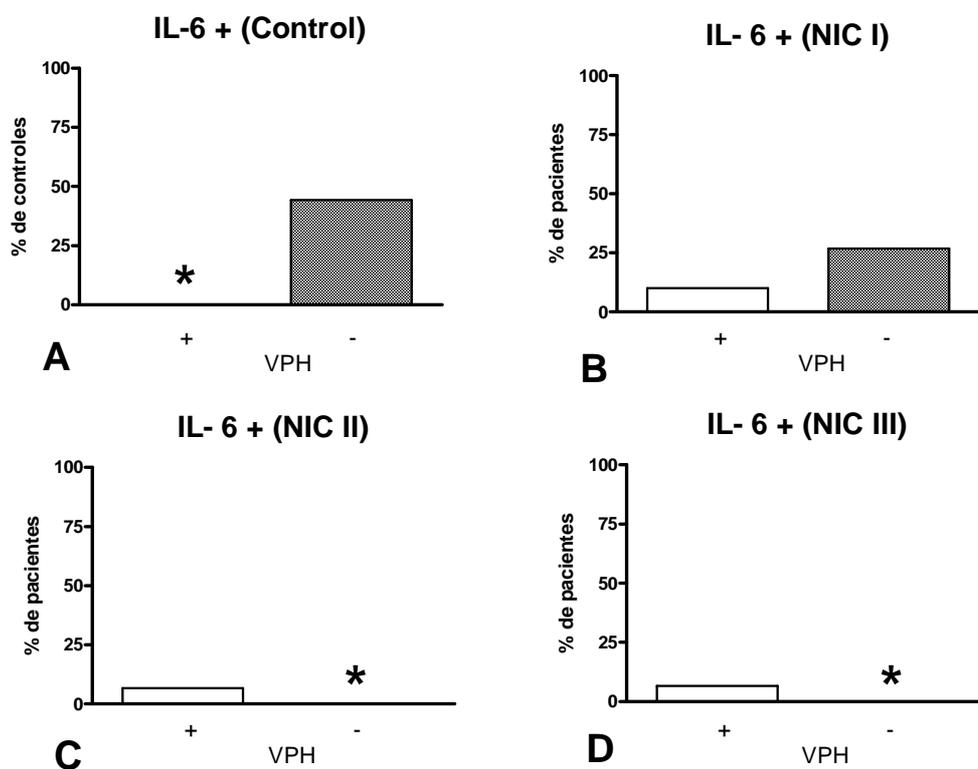


Figura 38. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-6 en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. Se aprecia que el mayor porcentaje fue en el grupo de pacientes con NIC I negativos para la infección por VPH (B). En los estadios NIC II y III solo se encontró producción de la citoquina en los infectados por el virus. El valor 0 está representado por un asterisco.

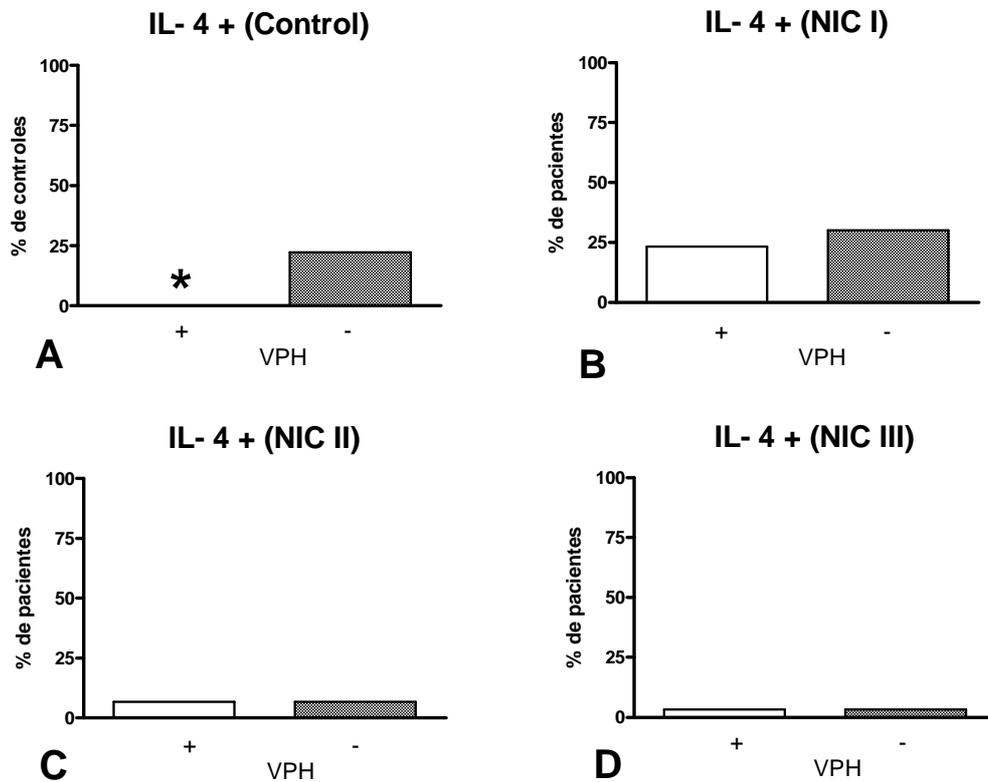


Figura 39. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-4 en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. Se aprecia que el mayor porcentaje fue en el grupo de pacientes con NIC I negativos para la infección por VPH (B). El valor 0 está representado por un asterisco.

Grupo 2: Expresión de IL-10 y receptor para IL-2 (IL-2R)

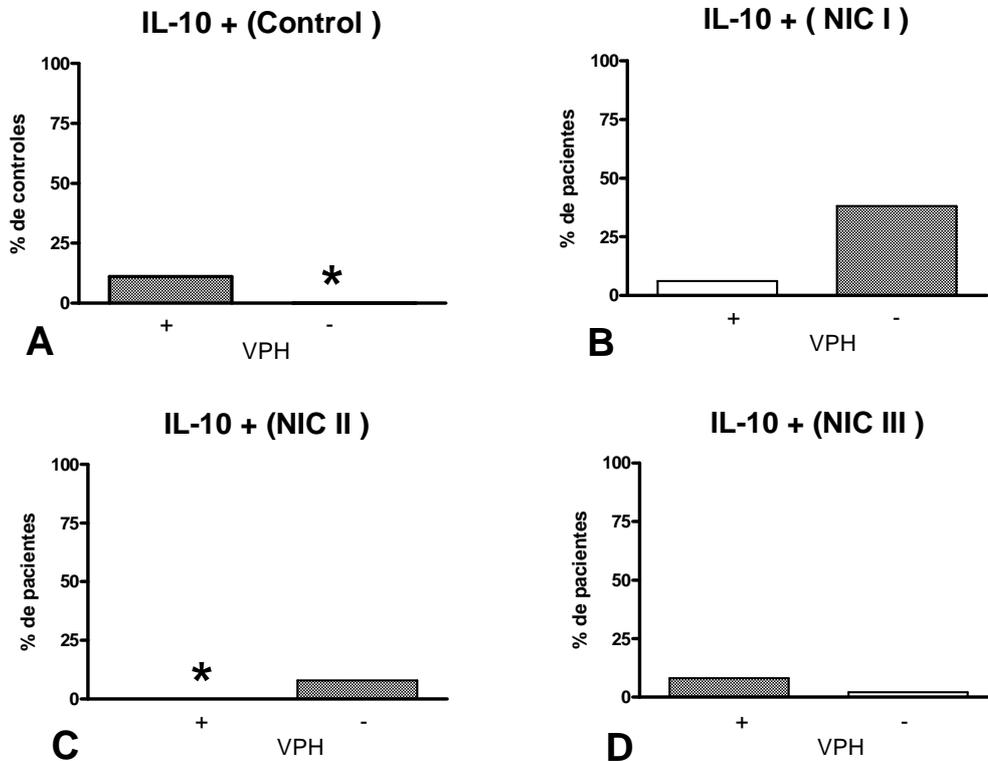


Figura 40. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-10 en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. Se aprecia que el mayor porcentaje fue en el grupo de pacientes con NIC I negativos para la infección por VPH (B). En los estadios NIC II y III fue variable la distribución. El valor 0 está representado por un asterisco.

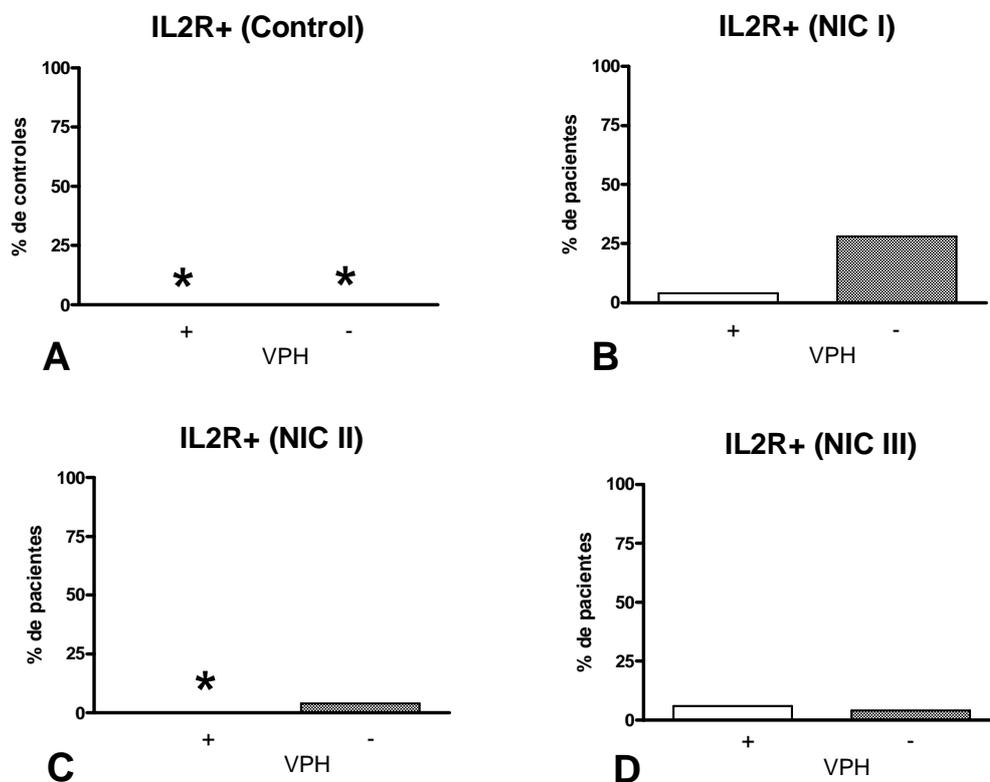


Figura 41. Porcentaje de pacientes que expresaron IL-2R en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. Se aprecia que el mayor porcentaje fue en el grupo de pacientes con NIC I negativos para la infección por VPH (B). En los estadios NIC II y III fue variable la distribución. El valor 0 está representado por un asterisco.

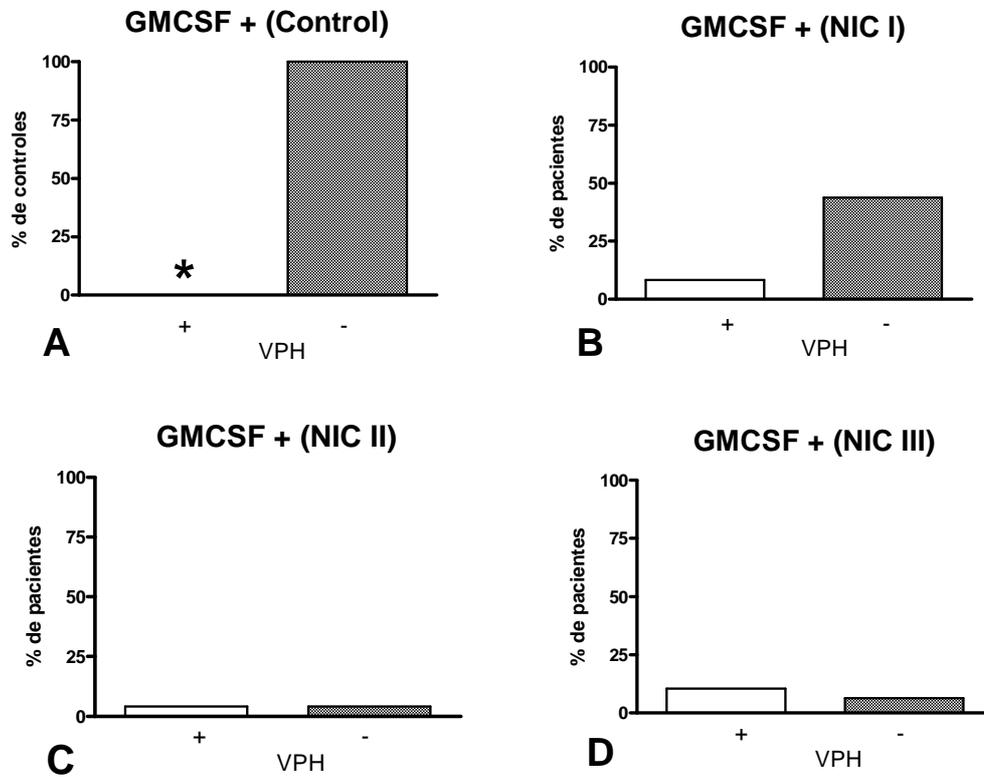
Grupo 3: Expresión de GM-CSF y TGF- β 1

Figura 42. Porcentaje de pacientes que expresaron GMCSF en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. Se aprecia que el mayor porcentaje fue en el grupo de pacientes con NIC I negativos para la infección por VPH (B). El valor 0 está representado por un asterisco.

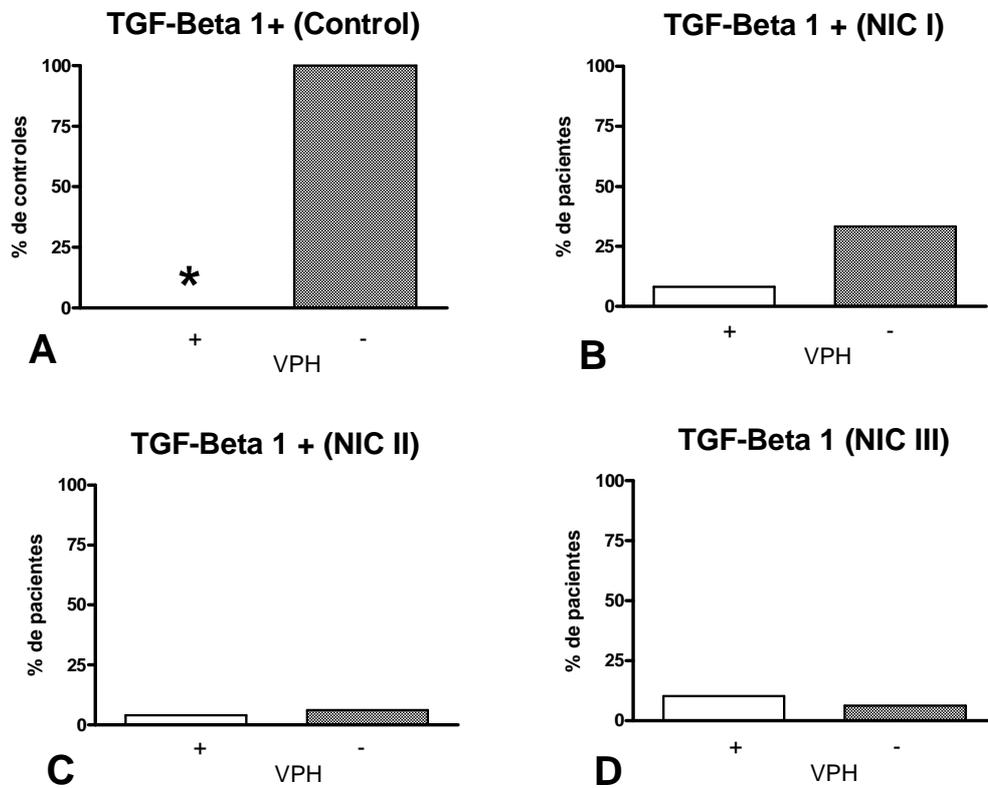


Figura 43. Porcentaje de pacientes que expresaron TGF- β 1 en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. Se aprecia que el mayor porcentaje fue en el grupo de pacientes con NIC I negativos para la infección por VPH (B). El valor 0 está representado por un asterisco.

Grupo 4: Expresión de VEGF

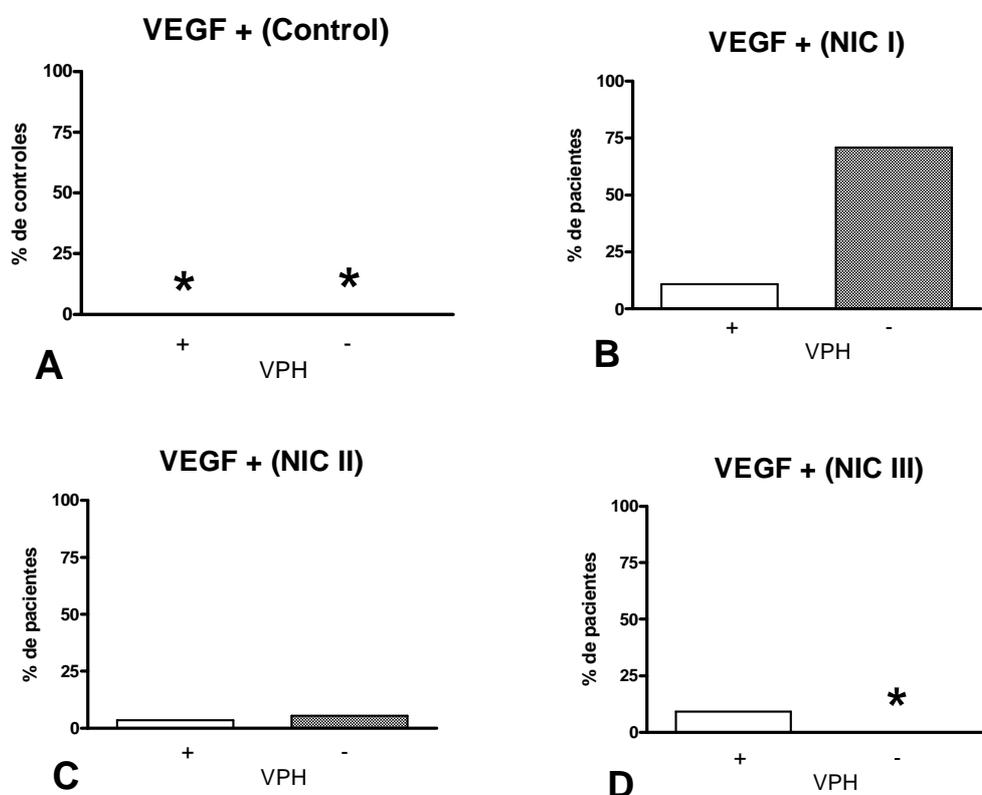


Figura 44. Porcentaje de pacientes que expresaron VEGF en tejido uterino de acuerdo al grado de lesión e infección por VPH. Se aprecia que el mayor porcentaje fue en el grupo de pacientes con NIC I negativos para la infección por VPH (B). En los estadios NIC II y III fue variable la distribución. El valor 0 está representado por un asterisco.

V.-DISCUSSION

El cáncer es uno de los flagelos más temidos por la humanidad y sigue siendo un desafío para la ciencia médica moderna y para los organismos e instituciones públicas y privadas relacionados con la prevención y recuperación de la salud. El cáncer del cuello uterino tiene gran importancia médica, por su alta prevalencia en diferentes regiones del mundo y su marcada morbilidad y mortalidad. Sin embargo es un tumor para el que se conocen medidas preventivas de tipo higiénico-sanitarias e incluso se ha introducido en la práctica una eficiente vacuna para evitar la acción cancerígena de uno de sus mecanismos etiopatogénicos más relevantes como el VPH. La incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino se relacionan con la pobreza, el acceso limitado a los servicios, la vida en zonas rurales los bajos niveles de educación y la carencia de programas de prevención y detección temprana (**Nazzal O, 2006, Martínez M, Francisco Javier, 2004**).

La historia natural del CaCu es larga en términos temporales y se ha identificado que es el resultado de la progresión de anomalías epiteliales iniciales llamadas displasias o neoplasias intraepiteliales (NIC). Estas displasias suelen diagnosticarse en mujeres jóvenes entre los 20 y 30 años de edad e incluso ya en el estado carcinoma *in situ* en un margen de edad similar entre los 25 y 35 años, y en la fase final de carcinoma invasivo más tardíamente pacientes mayores de 40 años. Las neoplasias malignas del cuello uterino en estadios tempranos son claramente identificables por la confirmación histoanatomopatológica, sin embargo, las cifras de incidencia de esta enfermedad continúan alarmando (**Nazzal O, 2006, Martínez F, 2004**).

Se ha avanzado de forma notoria en la comprensión etiopatogénica del CaCu que han permitido introducir las ya mencionadas estrategias de prevención. Es claro en la actualidad que diferentes factores etiológicos están involucrados en el desarrollo de un entorno inflamatorio en el cérvix uterino y en cuyo seno se desencadenan los procesos moleculares y celulares que provocan las alteraciones características de la displasia y de la malignización del CaCu. El ambiente inflamatorio cervical puede deberse a la acción de diferentes factores externos que

lo desencadenan y favorecen su perpetuación. A esta inflamación se le superpone las interacciones que las células displásicas y tumorales establecen con las células del sistema inmunitario inflamatorio y con las residentes no transformadas (**Coussens L & Werb Zena, 2002**).

En la respuesta inmunitaria a estímulos antigénicos e inflamatorios se ha identificado una cascada de eventos en su desarrollo local, en la cual las células infiltrantes atraídas al sitio de la lesión incluyen los linfocitos T CD4 y CD8, linfocitos B, células NK, macrófagos y granulocitos, que expresan diferentes patrones de secreción de citoquinas, quimioquinas y otros factores solubles. Estas citoquinas poseen efectos sobre la función de las células inmunitarias y sobre las residentes con modulación de la activación y crecimiento de las endoteliales, epiteliales y mesenquimales. Esta infiltración celular también se objetiva en el cérvix uterino y en su inducción pueden participar diferentes señales de carácter infeccioso, tumoral e incluso otros factores etiológicos físicos y químicos. El entorno inflamatorio, a su vez, modifica la patocronia y evolución de los procesos infecciosos y neoplásicos coincidentes o asociados a nivel cervical (**Carrero Y, 2009**).

De acuerdo a este postulado se distinguen dos grupos de citoquinas clasificadas en base a su participación en los procesos de inflamación: las que la promueven directa o indirectamente como la IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ y el TNF- α , o citoquinas proinflamatorias, y las que la suprimen como la IL-4, IL-10 e IL-13 o genéricamente denominadas anti-inflamatorias. De esta manera el perfil e intensidad de expresión de citoquinas presentes en una enfermedad contribuye a determinar el efecto final que se generara (**Coussens L & Werb Zena, 2002**).

Durante el presente estudio en el que se investigó la expresión celular de citoquinas y factores de crecimiento tanto en el epitelio como estroma cervical displásico se encontró a nivel de biopsias una clara anomalía en términos de la intensidad de su expresión y del patrón observado. Se cuantificó incremento de algunas citoquinas sin predominio manifiesto de las de una respuesta Th1 y Th2 y

además se comprobó que mantenían una asociación variable con el grado de displasia sufrido en el epitelio y estroma cervical estudiado.

En nuestro trabajo hemos detectado un aumento de la expresión de IFN- γ e IL-2 en el epitelio y estroma cervical displásico. Se apreció una clara relación de la intensidad de la expresión de estas citoquinas con el grado de displasia de ambos tipos de tejido, siendo esta relación positiva para INF- γ y negativa para la IL-2. Una observación similar es la descrita por Scott y cols (**Scott M, 1999**). Ambas citoquinas son preferentemente secretadas por linfocitos, células inmunitarias como las NK e incluso por células tumorales (**Scott M, 2001**). Nuestros datos no permiten establecer la naturaleza de las células que lo expresan pudiendo ser tanto las infiltrantes inmunitarias como las del tejido displásico. La expresión de IL-2 al inicio de la lesión se puede relacionar con eventos de desencadenamiento de activación de la respuesta inmunitaria y la progresiva disminución de su expresión reflejar su limitación al menos en términos cuantitativos. Nuestras observaciones en relación a la expresión de IFN- γ son diferentes a las descritas por Pao C C, 1995, en el presente estudio se encontró lo contrario, aumento de la expresión del IFN- γ a medida que aumenta el grado de la lesión; lo cual pudiera interpretarse como una respuesta de producción de esta citoquina por las células cancerosas o un aumento en el número de células infiltrantes productoras de IFN- γ . En ambos casos lo que es claro es que a pesar del aumento de las células que expresan esta citoquina no se logra conseguir controlar la enfermedad con empeoramiento del fenotipo displásico. Esta citoquina es clave en la generación de la respuesta efectora citotóxica adaptativa mediada por linfocitos T y natural por células NK e incluso de las reguladoras dendríticas y monocitárias. Al analizar la expresión del receptor para la IL-2 (IL2-R) en el tejido displásico observamos su aumento asociado al grado de alteración celular epitelial y de estroma. De forma relevante debe señalarse que en estudios recientes se ha evidenciado la expresión de IL-2 e IL2R en las células de cáncer de cérvix, lo que se ha implicado en un posible sistema de retroalimentación que favorece su crecimiento (**Rocha-Zavaleta L, 2004**).

Estos hallazgos indican la presencia progresiva de células que expresan este receptor y que sugerentemente pertenecen a la estirpe T o NK. De nuevo pone en evidencia la posible inducción de respuesta inmunitaria por el tejido displásico y su intensidad aumenta con su grado y la ineficiencia para lisar a las potenciales células inductoras con transformación displásica.

La expresión del TNF- α por células del epitelio y estroma displásico se encontró elevada, pero no se relacionó el número de las que lo expresan con la severidad de la patología. Este hallazgo fue previamente reportado en pacientes con NIC de bajo y alto grado, en ausencia de VPH. Si bien el TNF- α se expresa en los queratinocitos basales de cuellos uterinos normales se observa un claro aumento en los procesos inflamatorios cervicales (**Tjong MY, 2001, Mota F, 1999**). El TNF posee la capacidad de inducir una serie de genes pro-inflamatorios, que pueden favorecer el crecimiento tumoral, entre los que se incluyen los de otras citoquinas, factores angiogénicos y de crecimiento y metaloproteínas, los cuales contribuyen a la formación, crecimiento, invasión y metástasis del tumor a otras localizaciones (**Joost J, 2000; Abbas A, 2000**).

La expresión de las células IL-4 positivas en las pacientes comparadas con las controles no presento diferencias significativas. La IL-4 forma parte del patrón Th2 y su expresión a nivel de la patología maligna del cuello uterino es controversial Al Saleh W, 1998, encontraron esta citoquina elevada en pacientes con NIC III (**Scott M, 1999**), mencionan que la IL-4, además de la IL-1, IL-6, TNF- α , entre otras, se producen en circunstancias normales por los queratinocitos cervicales, lo que pudiera explicar la presencia de dichas citoquinas en ausencia de procesos patológicos del cuello uterino.

Nuestros hallazgos demuestran que en el tejido displásico se produce un aumento del número de células que expresan IL-6 y que además aumenta con el grado de alteración celular. Otros estudios encontraron expresión de esta citoquina en pacientes con lesiones premalignas de alto grado y en ausencia de infección viral (**Al Saleh W, 1998, Tjong MY, 2001 y Moela E, 2000**).

La IL-6 puede desempeñar una función activa en la angiogénesis del proceso neoplásico lo cual favorecería el crecimiento y diseminación del tumor. Así mismo, IL-6 desempeña una actividad relevante en el control y modulación de la respuesta inflamatoria (**Moela E, 2000**).

En cuanto a la IL-10 se encontró también aumentada en los pacientes con NIC en relación con las pacientes control, pero no relacionada con el grado de la neoplasia intraepitelial. Se ha descrito que la expresión de IL-10 aumenta de forma paralela con la severidad de la lesión, alcanzando su nivel máximo en las displasia de alto grado, lo cual está de acuerdo con los estudios que han descrito el papel de la IL-10 como una citoquina inmunosupresora (**Syrjanen S 2009, Satín P, 2000**). Contrariamente, la IL-10 también es capaz de aumentar la actividad antineoplásica de las células NK debido al aumento de los niveles de los genes relacionados con la actividad celular citotóxica, por ejemplo; secretogranin, TIA-1, HMG-1, genes inductores de IFN) y la expresión de genes relacionados con la migración celular, por ejemplo; L-selectina, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), receptor-1, activador del plasminógeno (**Mocellin S, 2001**).

Otras citoquinas importantes estudiadas fueron el GM-CSF y TGF- β 1. Ambas citoquinas estuvieron aumentadas en las muestras cervicales de las pacientes con diferentes grados de displasia cuando se compararon con la población control. La presencia de las células TGF- β 1 positivas estuvo asociada a la severidad de las lesiones cervicales. Se conoce que el TGF- β 1 induce la angiogénesis y el desarrollo de un estado de inmunosupresión incluyendo la inhibición de la respuesta antitumoral de las células NK (**Oscar Peralta-Zaragoza, 2001**), la activación de los macrófagos y de los linfocitos citotóxicos y tiene la capacidad de dotar a los linfocitos T de actividad supresora. TGF- β 1 incrementa la producción de IL-10 por los macrófagos, lo cual es una potente citoquina inmunosupresora (**Suzane H, 2001**). Así mismo, inhibe la proliferación de linfocitos T y B dependiente de IL-2 y en los linfocitos B, la secreción de inmunoglobulinas inducida por la IL-2. Estas situaciones favorecerían la evolución de la neoplasia

intraepitelial (**Oscar Peralta-Zaragoza, 2001**).

Existen pocos estudios relacionados con la respuesta del GM-CSF en lesiones preinvasivas de cuello uterino. Se ha demostrado mediante terapia génica en diferentes modelos tumorales en animales y en ensayos clínicos en humanos que el GM-CSF es un potente activador de la respuesta inmunitaria antitumoral. (**Scott M, 2001, Pao CC, 1995**). Es producido constitutivamente por los macrófagos, células endoteliales y epiteliales (**Vimlarani Ch, 1998**). Estudios previos han demostrado la capacidad de las células tumorales de producir GM-CSF y la de esta citoquina de inducir el infiltrado de células dendríticas/Langerhans (CD/LH) en varias neoplasias entre las cuales se encuentra la neoplasia del cuello uterino. Clásicamente se ha correlacionado este hecho con un pronóstico favorable de la enfermedad, dado que las CD podrían ser capaces de inducir y mantener una respuesta inmunitaria apropiada capaz de inhibir el crecimiento tumoral y la posibilidad de dar metástasis. Aunque el mecanismo de acción de las CD que infiltran tumores aún no está del todo aclarado, el hecho de encontrarse en íntimo contacto con las células neoplásicas sugiere una función captadora y presentadora de antígenos tumorales a las células efectoras de la respuesta inmunitaria (**Coronato S, 1998**).

En el análisis de las biopsias de los pacientes con neoplasia intrauterina se encontró incremento de células positivas para el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) asociado con el grado de evolución de la neoplasia. El incremento de este factor puede estar relacionado con la producción de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) lo que puede conducir a la invasión por el cáncer cervical. A este respecto, se ha demostrado que el VEGF está involucrado en la progresión de la neoplasia intraepitelial (**Coussens L M, 2002**). Reportaron que el reclutamiento de macrófagos en el sitio de la lesión estuvo asociado con la angiogénesis lo que jugaría un papel importante en la formación de nuevos vasos sanguíneos y una posterior metástasis. La expresión de VEGF en los periodos iniciales de la neoplasia es sugerente de un marcador temprano de neovascularización y diseminación del cáncer. Relacionado con este hallazgo, se

ha demostrado previamente la expresión genética del VEGF y su receptor en la neoplasia intraepitelial de bajo grado (**Coussens L M, 2002**).

Actualmente es aceptado como una de las principales causas del CaCU la infección por VPH de alto riesgo y sus precursores; sin embargo, estudios epidemiológicos han mostrado que sólo una pequeña fracción de mujeres infectadas con VPH eventualmente progresan a lesiones intraepiteliales de alto riesgo y carcinoma *in situ*, por lo que se ha asumido que otros factores actúan en conjunto con el VPH, influenciando el riesgo de transición de la infección cervical a la malignidad.

La síntesis de citoquinas inapropiadas puede dirigir la respuesta inmunitaria local lejos de un patrón Th1 y puede subsecuentemente contribuir al desarrollo y progresión de la neoplasia (**A Kaya, 2005, Zetter B R, 1998**). Previamente ha sido reportado un aumento en la producción *in vitro* de IL-10 y una disminución de IL-2 por parte de las células mononucleares de sangre periférica en mujeres con NIC asociadas con la infección general o localizada por el VPH, sugiriendo que un cambio en el tipo de respuesta de Th1 a Th2 está asociado con una infección diseminada del VPH (**Obermair A, Wanner C, 1998**). Otros resultados sugieren que una disminución de IFN- γ y un aumento en la síntesis de IL-10 en el sub-epitelio, juegan un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer cervical asociado al VPH 16 (**Zetter BR. 1998**). Se ha descrito que un cambio del perfil de citoquinas de Th1 (IL-2 y el IFN- γ) a Th2 (IL-4 e IL-10) está relacionado con un mal pronóstico para pacientes con lesiones cervicales por VPH (**Zetter B R, 1998**). La expresión de VEGF se ha relacionado con la evolución de la neoplasia cervical y con la infección por los genotipos de alto riesgo de VPH (**Núñez J, 2006**). En nuestro estudio el diagnóstico molecular de la infección por VPH concluyó que el mayor número de infectado estaba en los pacientes con NIC III con un predominio de genotipos de alto riesgo oncogénico (VPH16). Cuando se relacionó la expresión de las citoquinas estudiadas con la presencia del VPH y el grado de displasia de las pacientes, no se evidenció asociación entre la infección y la expresión de las citoquinas. La mayoría de las pacientes que

expresaron las citoquinas evaluadas correspondió a las que tenían NIC I y no presentaron infección por VPH.

Este estudio demuestra que durante los diferentes estadios de la neoplasia intraepitelial se producen diferentes tipos de citoquinas y factores de crecimiento que pudieran contribuir a suprimir o inducir la evolución de la neoplasia. Esta heterogeneidad en la producción de citoquinas en la neoplasia cervical ha sido reportada previamente en cultivo de tejido epitelial de neoplasias intraepiteliales. **(Barillari, 1998)**. La producción de citoquinas puede ser originada por las células neoplásicas, las células propias del tejido no neoplásicas y las células infiltrantes. Las citoquinas producidas por las células tumorales son generalmente angiogénicas dirigidas a favorecer el crecimiento y la supervivencia del tumor e influencia la migración de la célula y la metástasis del cáncer. Sin embargo se pueden producir también citoquinas que induzcan la atracción de células inmunitarias al sitio del tumor. La migración de leucocitos circulantes al tumor es facilitada obviamente por la actividad antigénica **(Carrero, 2009)**.

Es difícil definir la evolución que seguirá una neoplasia intraepitelial en función del perfil de citoquinas que está presente. Hay dos mecanismos que pueden explicar la participación de las citoquinas en el desarrollo del cáncer: 1) Es posible que las citoquinas favorezcan el desarrollo tumoral al interactuar con factores de proliferación, inducir la actividad de la angiogénesis del tumor y promover la metástasis: 2) Las citoquinas como mediadores de la respuesta inmunitaria pueden inhibir la expresión de las moléculas y receptores involucrados en la identificación y destrucción de la célula tumoral (como las moléculas MHC clase I y II, las moléculas coestimuladoras y la desregulación de la cadena zeta del complejo TcR/. Por otro lado el balance entre el estatus inflamatorio tendiente a destruir el tumor y el anti-inflamatorio tendiente a mantenerlo es un aspecto a tener en cuenta. En diferentes neoplasias se ha observado una tendencia en la expresión de citoquinas anti-inflamatorias y una disminución de expresión de citoquinas proinflamatorias, lo que podría facilitar la progresión tumoral por la disminución de los mecanismos de inmunovigilancia celular **(Huang M, 1995,**

Kruger-Krasagakes S, 1994). Estudios previos han reportado un perfil de expresión de citoquinas antiinflamatorias en pacientes con carcinoma cervical. En este sentido, la expresión de IL-4, IL-10 y TGF- β 1 se ha relacionado con la severidad de la enfermedad asociada con la infección por VPH (**Wu T-C, 1997, De Grujil TD, 1999, Bor-Ching S, 2001 y Clerici M, 1997**). La expresión de un perfil de citoquinas anti-inflamatorias en el microambiente tumoral cervical podría favorecer un estado de inmunosupresión local, el cual se asocia con la desregulación de varias moléculas de la respuesta inmunitaria. En nuestro estudio, el patrón encontrado estuvo relacionado con citoquinas y factores de crecimiento tanto inflamatorio como antiinflamatorio. Debido al papel multifuncional que tienen en general las citoquinas y factores de crecimiento y a la capacidad que tienen de interactuar entre sí, se hace difícil establecer de manera inequívoca el papel individual de algunas de estas moléculas. El factor infección por VPH no estuvo significativamente involucrado en la modificación de la producción de las moléculas estudiadas, por lo tanto lo más probable es que nuestro estudio refleje el comportamiento del tejido uterino ante la aparición de la neoplasia. Por otro lado, debido a que no es posible hacer estudios en seres humanos de manera individual referente a la evolución de las citoquinas en las diferentes etapas del NIC a través del tiempo, los análisis se basan en un punto estático de la enfermedad en cada uno de los pacientes; por tanto no se puede conocer la cinética de aparición o desaparición de una citoquina y relacionar el predominio de alguna de estas durante el inicio de la enfermedad hasta la presencia del cáncer invasivo. Esto amerita la utilización de un modelo experimental adecuado.

Tomado en conjunto, nuestros resultados demuestran la expresión de diferentes citoquinas y factores de crecimiento en las células del epitelio y estroma cervical que presentan diferentes grados de displasia. Teniendo en cuenta que hemos observado la expresión de citoquinas relevantes en la regulación de la respuesta inmunitaria con aumento de las mediadoras de la inflamación como IFN e IL-6, de la respuesta linfocitaria T de patrón Th1 como IFN- γ , la no implicación de la más característica del patrón th2 o IL-4 y el aumento de la inmunomoduladora IL-10, no puede dejarse de señalarse la posible

relevancia de la respuesta inmune inflamatoria en la patogenia de la transformación displásica y en su caso carcinomatosis. No es posible establecer el significado exacto de cada uno de estos hallazgos pero tomados en conjunto soportan el concepto de desencadenamiento y/o utilización de los mediadores solubles o citoquinas de la inflamación durante el proceso biológico displásico. Los diferentes patrones de expresión de estas citoquinas en los distintos estadios displásicos sugieren el progresivo desencadenamiento de un entorno proinflamatorio con generación de señalizaciones que no favorecen la eficiencia defensiva de la respuesta inmunitaria, así se observa un progresivo aumento de IFN- γ e IL-10 con disminución de la IL-2. Esta interpretación todavía se favorece más por el progresivo incremento de la citoquina supresora TGF- β . Además en términos de predominio biológico de un entorno protumoral debe señalarse el incremento del VEGF.

Nuestros datos indican que la presencia VPH es un factor que se asocia a modificaciones del patrón de expresión de estas moléculas en el tejido displásico, pero no es el factor condicionante esencial. En futuros trabajos, algunos de los cuales ya los hemos puesto en marcha pretendemos conocer las características de las células productoras de estas citoquinas y factores de crecimiento y pretender establecer su significación biológica en la patogenia del CaCu.

VI.-CONCLUSIONES

De este trabajo prospectivo realizado en biopsias de tejido de cérvix uterino de pacientes con diferentes grados de displasia se concluye que:

1. La existencia de displasia se asocia a un significativo aumento de la expresión de citoquinas y factores de crecimiento tanto en el epitelio como en el estroma.

2. El grado de displasia se asocia a distinto patrón de expresión de citoquinas. Se aprecia un aumento progresivo de las células productoras de IFN- γ e IL-10 y disminución de las de IL-2, sin modificarse la expresión de la IL-4. Simultáneamente se observa un estado incrementado de producción de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-6 en el tejido displásico.

3. La existencia de displasia se asocia a un incremento de la expresión de TGF- β y VEGF que aumenta conforme progresa su grado.

4. La presencia de VPH no modifica el número de células productoras de citoquinas y factores de crecimiento en el tejido displásico de las mujeres que lo expresan, pero si su incidencia en la población global.

Por lo tanto la displasia epitelial cervical uterina se asocia a una marcada presencia de células en el tejido que expresan moléculas del sistema inmunitario/inflamatorio implicadas en la regulación de su respuesta y en control del crecimiento celular y vascular.

VII.-BIBLIOGRAFIA

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. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Citoquinas. Inmunología Celular y Molecular. Editora **Interamericana McGraw- Hill** 4º Ed. Mexico 2000. pp 276-307.
3. Aguzzi A, Heikenwalder M Prions. Cytokines and chemokines: a meeting in lymphoid organs. **Immunity** 2005; 22: 145-54.
4. Akdis CA ,Blazer K. Mechanisms of interleukine 10-mediated immune suppression. **Immunology** 2001;103: 131 136.
5. Al-Saleh W, Giannini SL, Jacobs N, Moutschew M, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Correlation Of T-Helper Secretary Differentiation And Types Of Antigen-Presenting Cells In Squamous Intraepithelial Lesion Of The Uterine Cervix. **J pathol**. 1998;184 (3):283-290.
6. Alvarez-Mon M, Durantez A. Fisiopatología de las linfocinas y monocinas. **Medicina Clínica (Barcelona)** 1987; 89: 387-93.
7. Alvarez-Mon M, Prieto A. "Bases celulares y moleculares del sistema inmune. Mediadores solubles". **Ed Acción Médica** 1990; 26: 17-28.
8. 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.
9. Apgar BS, Brotzman G. HPV testing in the evaluation of the minimally abnormal Papanicolau smear. **Am Fam Physician** 1999; 59:2794-801.
10. Araizo Chuco Godofredo. Epidemiología del carcinoma del cuello uterino. 2008. Disponible en: www.geosalud.com/cancerpacientes/e-picancercervical.htm
11. 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.
12. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. **Blood** 1996; 87: 3336-3343.
13. 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.
14. Berrueta L, Salmen S, Montes H. Respuesta inmunitaria frente a virus. **Revista Médica Extensión Portuguesa-ULA**. 2007; 2: 73-90.
15. Bor-Ching S, Rong-Hwa L, Huang-Chun L, Hong-Nerng Ho, Su-Ming H, Su-Cheng H. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. **J Immunol** 2001; 167:2972-2978.
16. 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.
17. 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.

18. Bouallaga I, Massicard S, Yaniv M. An enhanceosome containing the Jun B/Fra-2 heterodimer and the HMG-I(Y) architectural protein controls HPV 18 transcription. **EMBO Rep** 2000;1:422-427.
19. Bouallaga I, Thierry F. Control of Human Papillomavirus type 18 transcription: role in carcinogenesis. **Recent Research Developments in Virology** 1999;1:369-383.
20. Boyer SN, Wazer DE, Band V. López-Saavedra y Lizano-Soberón. E7 protein of human papillomavirus 16 induces degradation of the retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. **Cancer Res.** 1996;56:4620-4.
21. Braunwalal E, Isselbacher K, Petersdor R, Wilson J, Martin J, Fauci A. Principio de Medicina Interna. Tomo I y II. **Interamericana McGraw-Hill**. 11^o ed México 1999. p. 2585.
22. Bravo J, Victoria ME. Ciclo celular y carcinogenesis. **Acta Cient. Estud** 2006; 4:176-185.
23. Breitburd F, Croissant O, Orth G, 1987: Expression of human papillomavirus type-1 E4 gene products in warts, p. 115-122. In B. M. Steinberg, J. L. Brandsma, and L. B. Taichman (ed), *Cancer cells*. vol. 5 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
24. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clin Microbiol Rev** 2003; 16:1-17.
25. 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.
26. 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.
27. Carrero Y, Callejas D, Alaña F, Silva, Ch, Mindiola R, Mosquera J. Increased vascular endothelial growth factor expression, CD3-positive cell infiltration, and oxidative stress in premalignant lesions of the cervix. **Cancer**. 2009; Vol 115(16): 3680-3688.
28. Cartier R. **Colposcopia práctica**. Editorial científico-médica. Barcelona, España. 1978: 13-35.
29. Castañeda-Iñiguez MS, Toledo-Cisneros R, Aguilera-Delgadillo M. Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino en mujeres de Zacatecas. **Salud Pública Méx** 1998; 40:330-8.
30. Castle P. Beyond human papillomavirus: the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer. **Am Soc Colpo Cer Pathol**. 2004; 8: 224-230.
31. 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.
32. Clauss M. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. **J Biol Chem** 1996; 271: 17629-1734.
33. Clavel Ch, Masure M, Levert M, Putaud I, Mangeonjean Ch, Lorenzato M. Human Papillomavirus detection by the Hybrid Capture II assay: A reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. **Diagn Mol Pathol** 2000; 9: 145-50.
34. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattini D, Villa ML, Stefanon B. Cytokines production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:245-250.

35. Coronato S, Laguens G, Spinelli O, Salas M, Di Girolano W. Celulas dendríticas y su papel en la patología. **Medicina**. 1998; 58: 209-218.
36. Esteller A, Cordero M **Fundamentos y patología general**.1ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill. Interamericana, Madrid 1998.
37. Coussens Lisa M, Zena Werb. Inflammation and cancer. **Nature**. 2002; Vol 420:19-26.
38. Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z. The expression of cyclooxygenase-2 VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. **Gynecol Oncol** 2005; 97: 96-103.
39. Day PM, Roden RBS, Lowy DR. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication E2, to PML oncogenic domains. **J Virol** 1998;72: 142-50.
40. De Gruijl TD, Bontkes HJ, Van Den Muysenberg AJ, Van Oostveen JW, Stukart MJ, Verheijen RH, Van der Vange N, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM, Scheper RJ. Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. **Eur J Cancer**. 1999; Mar 35(3):490-7.
41. De San José S, García AM. 4ª Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Virus del Papiloma Humano y Cáncer: epidemiología y prevención. Madrid: **EMISA**, 2006:141-146.
42. De San José, Palacio V, Tafur LA, Vázquez S, Espitia VE, Vázquez F. Prostitution, HIV, and cervical neoplasia: a survey in Spain and Colombia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1993; 2:531-5.
43. Deborah E, Jackson J, Doorbar J. Identification of a G2 Arrest Domain in the E1[^]E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16. **J Virol** 2002; 76:9806-9818.
44. Demeret, Desaintes C, Yaniv M. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. **J Virol** 1997; 71:9343-9349.
45. Desaintes C, Demeret C, Goyat. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. **EMBO J** 1997; 16(3):504-14.
46. Desaintes C, Goyat S, Garbay S. Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. **Oncogene** 1999; 18:4538-45.
47. Diane E. Judge, APN/CNP Invasive cervical cancer among hispanic and non-hispanic women - United States, 1992-1999. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 2002; 51:1067-70.
48. Divorak HF. Vascular permeability factor vascular endothelial growth factor microvascular hypermeability and angiogenesis. **Am J Patol** 1995; 146: 1029.
49. Doorbar J, Foo C, Coleman N. Characterisation of events during the late stages of HPV 16 infection in vivo using high affinity synthesis fabs to E4. **Virology** 1997; 238: 40-52.
50. Doorbar JA, Parton K, Hartley L, Banks T, Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. **Virology** 1990:178:254-262.
51. Edward SP, Pondichery G, Satyaswaroop, Rodique M. Hormonal interaction in gynecologic malignancies. **Principles and Practice of Gynecologic Oncology** Hoskins WJ, Pérez CA, Young RC, Editors. 3ª Ed. Lippincott: Williams and Wilkins; 2000. p. 199-224.
52. Eigler A, Sinha B, Hartman G, Endres S. Taming TNF: Strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunology Today** 1997; 18; 487-492.

53. Evander M, Frazer IH, Payne E. Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **J Virol** 1997; 71:2449-2456.
54. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Lancet Oncol** 2002; 3: 11-16.
55. Ferlay J., Bray F, Pisani P. and Parkin D.M. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC **CancerBase** No. 5. version 2.0, IARC Press, Lyon, 2004. Disponible. <http://www-dep.iarc.fr/>
56. 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; 14:133-47.
57. Fernández-Tilapa G, Zamudio-López N, Cruz-Valdez A, Antonio-Vejar V, Llades-Aguilar B. RNAm de la IL-4 en lesiones premalignas y cáncer cervical asociados a la infección por VPH. **Revista FASPIN-Especial Genética**. 15-21 de Octubre. Monterrey, Nuevo León, México 2000 Edición Especial N° 2.
58. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev** 1997; 18: 4- 25.
59. Finney M, Guy GR, Michell RH. Interleukin 4 activates human B lymphocytes via transient inositol lipid hydrolysis and delayed cyclic adenosine monophosphate generation. **European J of Immunology** 1990; 20: 151-6.
60. Fouts ET, Yu X, Egelman EH. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. **J Biol Chem** 1999; 274:4447-4458.
61. Gaffen SL. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. **Cytokine** 2001; 14: 63-77.
62. García A, Berumen J, Jiménez R, Escobedo A, Cruz O. Utilidad de las técnicas de biología molecular en el Virus de Papiloma Humano. **Gamo** 2006; 5: 109-10.
63. García J, Vilaplana E, Lopez D, Meisels A, Vilaplana E, ASCUS en citología cervicovaginal de rastrel y captura Híbrida II. **Revista Española de Patología** 2003; 36:59-64.
64. 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.
65. Gillette TG, Lusky M, Borowiec JA. Induction of structural changes in the bovine papillomavirus type 1 origin of replication by the viral E1 and E2 proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1994; 91:8846-8850.
66. Gillitzer E, Chen G, Stendlund A. Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. **EMBO J** 2000; 19:3069-3079.
67. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. **J Virol** 2001; 75:1565-1570.
68. Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Clin Cancer Res** 2005; 11: 8364-71.
69. Gómez DE, Alonso DF. Introducción a la Oncología Molecular. Editora **ECSA**; Argentina 1998.
70. González V, Ordóñez A, García ML, Feliu J, Zamora P. **Oncología Clínica**, 1era edición. Vol 1; 1992.
71. Gosain A, Gamelli RL. A primer in cytokines. **J Burn Care Rehabil** 2005; 26: 7-12.

72. Granucci F, Zanoni I, Feau S, Ricciardi- Castagnoli P. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. **EMBO J** 2003; 22: 2546-51.
73. 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.
74. Haddad JJ, Fahlma CS. Redox- and oxidant- mediated regulation of interleukine-10: an anti-inflammatory, antioxidant cytokine? **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2002: 297; 163-176.
75. 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.
76. Hasenyager C. Knowledge of cervical cancer screening among women attending a university health center. **J Am Coll Health** 1999; 47:221-4.
77. Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: Structure, function, and biology. **Annu. Rev Biomol Struct** 2002;31:343-60.
78. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirusE6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. **Proc. Natl Acad Sci USA.** 2001 98: 1218-23.
79. Hernandez UM, Alvarado NA. Interleucina e inmunidad innata. **Rev. Biomed** 2001; 12: 272-80.
80. Huang, M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao J, Meissner H, Uyemura K, Modlin R, Wollman J, Dubinett S. Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Express a Type 2 Cytokine Pattern. **Cancer Res.** 1995; 1: 55: 3847.
81. Hubert P, Evrard B, Maillard C, Franzen- Detrooz E, Delattre L, Foidart JM, Noel A, Boniver J, Delvenne. Delivery of Granulocyte-Macrophage Colony- Stimulating Factor in Bioadhesive Hydrogel Stimulates Migration of Dendritic Cells in Models of Human Papillomavirus- Associated (Pre) Neoplastic Epithelial Lesions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2004; 48: 4342-4348.
82. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. **Nat Rev Immunol** 2005; 7: 521-31.
83. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra D. Producción de anticuerpos por linfocitos B en Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad 4ª Ed. Barcelona Masson S.A. 2000; 4: 309-24.
84. Joost J, Oppenheim M D, Francis W.R. Citocinas. **Introducción a la Inmunología Humana.** Editorial Médica Panamericana. 5º ed. 2000. Caracas. p 165-92.
85. Kasper D, Braunwals E. Fauci A, Stephen H, Longo D, Larry J. Harrison. Principios de Medicina Interna. Editora Interamericana **McGraw-Hill** 16a Ed. Mexico.
86. Kehrl JH, Alvarez Mon M, Fauci AS. Type B TGF suppresses the growth and differentiation of human B and T lymphocytes. **Clin Res** 1985; 33: 610.
87. Klein J. The cell. En natural history of the major histocompatibility complex. **Ed Wiley and sons.** New York 1986; 28: 291.
88. Kodama J, Seki N, Tokumo K, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M, et al. Vascular Endothelial Growth Factors is Implicated in Early Invasion in Cervical Cancer. **Eur J Canc** 1999; 35: 485-48.
89. 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.
90. Kruger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, Schmitt E, HulsCB, Blankenstein T, Diamantstein T. Expression of interleukin 10 in human melanoma. **Br J Cancer.** 1994; 70:1182-1185.
91. Lázaro J, Muniesa J, Pardo A. Citología Exfoliativa Cervicovaginal (Método Papanicolaou). Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Obispo Polanco de Truel. **Boletín Oncológico** 1998; 8: 46-54.
92. Lefebvre O, Steger G, Yaniv M. Synergistic transcriptional activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure. **J Mol Biol** 1997; 266:465–78.
93. 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.
94. Liu JS, Kuo SR, Makhov AM. Human Hsp 70 and Hsp 40 proteins facilitate human papillomavirus type 11 E1 protein to binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. **J Biol Chem** 1998; 273:30704-30712.
95. López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. Cáncer de Cuello Uterino y Virus de Papiloma Humano. La historia que no termina. **Cancerología** 2006;1:31-55.
96. Lorant V, Boland B, Humblet P, Deliege D. Equity in prevention and health care. **J Epidemiol Community Health** 2002; 56:510-6.
97. 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.
98. 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.
99. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. **Oncogene.** 2001; 20:7874–87.
100. Marcela Lizano-Soberón, Adela Carrillo-García Y Adriana Contreras-Paredes. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis **Cancerología** 4. 2009; 205-216.
101. Martin R. Interleukin 4 treatment of psoriasis: are pleiotropic cytokines suitable therapies for autoimmune diseases? **Trends in Pharmacological Sciences** 2003; 24: 613-616.
102. Martínez F. Epidemiología del Cáncer de Cuello Uterino. Monografías 2004. Disponible en: <http://www.monografias.com/epidemiologiadelcancerdecuellouterino.html>
103. Martínez J. Diagnóstico microbiológico de infecciones de transmisión sexual. Parte II. ITS Virales. **Rev Chil Infect** 2010; 27: 60-64.
104. Martínez M, Francisco Javier. 2004. Epidemiología del Cáncer de Cuello Uterino. Monografías. Disponible: <http://www.mografias.com/epidemilogiadelcancerdecuellouterino.html>.
105. May M, Dong XP. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV-16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. **EMBO J** 1994; 13:1460-1466.
106. McBride A, Myers G. The E2 proteins. Human papillomavirus 1997. **Los Alamos National Laboratory.** 1992;p. III-54 - III-72.
107. McKenzie ANJ. Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. **Pharmacology & Therapeutics** 2000; 88: 143-151.

108. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol** 2001; 82:15-33.
109. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. **Nat Med** 1996; 2: 992-997.
110. Miñarro R, Black RJ, Martínez C, Navarro C, Garau I, Izarzugaza I. Cancer incidence and Mortality in Spain- Patterns and Trends. **IARC Technical Report** 2000; 36: 27.
111. Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and Immune Response in the Tumor Microenvironment. **J Immunother.** 2001; Sep24(5):392-407.
112. Moela-Barrientos E, Fernández-Tilapa G, Domínguez-Arrebillaga S, Llades-Aguilar B, Madrid MV. Mensaje de IL-6 en lesiones precursoras y cáncer del cerviz uterino infectado con virus del papiloma humano. **Revista FASPYN-Especial Genética.** 2000 Monterrey, Nuevo León, México. Edición Especial N° 2.
113. Mohar A, Frías-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macías T, de la Garza JG. Epidemiología descriptiva del cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. **Salud Pública Méx** 1997; 39:253-8.
114. Moore MA. Cytokine and chemokine networks influence stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing. **Journal of Cell Biochemistry** 2002; 38: 29-38.
115. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **Lancet** 2002; 359:1085-92.
116. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T- cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today** 1996; 17: 138-146.
117. 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.
118. 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.
119. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:518-27.
120. Nasser M, Hirochika R, Broker TR, Chow L. A human papillomavirus type 11 transcript encoding an E1^{E4} protein. **Virology** 1987; 159:433-439.
121. Nazzari O, Suárez E P, Larraguibel R, Rojas L, Bronda A. Lesiones preinvasoras de cuello uterino: Una visión actual. **Rev Chi Obstet Ginecol** 2006; 71(5): 341-348.
122. Nelson BH. Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. **Current Direction in Autoimmunity** 2002; 5: 92-112.
123. Nossal GJV. The basic components of the immune system New England. **Journal of Medicine** 1987; 316: 1320-1325.
124. Nuñez, Jose, Carrero Y, Gotera, J. Callejas, D. Virus Herpes Simple tipo II y su influencia en el origen de las lesiones premalignas y malignas de cuello uterino. **Rev Obstet Ginecol Venez.** 2006; vol 66(3):162-171.

125. 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.
126. Oliveros J, Pérez N, Montiel L, Meza N. **Anuario de Mortalidad 2006**. Ministerio del Poder Popular para la Salud Disponible: <http://www.msds.gov.ve/ms/modules.php?name=News&file=article&sid=1346>
127. Omar Nazzal N, Eugenio Suárez P, Raúl Larraguibel P, Luciano Rojas F., Alessandro Bronda M. Lesiones Preinvasoras de cuello uterino. Una visión actual. **Rev Chil Obstet Ginecol** 2006; 71(5);341-348.
128. 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 México**. 2001; 43 (4): 340-351.
129. Pao C C, Lin CY, Yao DS, Tseng CJ. Differential expression of cytokines in cervical cancer tissues. **Biochem Biophys Res Commun** 1995; 214(3):1146-1151.
130. Parkin D M, Bray F. The burden of HPV-related cancers. **Vaccine** 2006; 24: 3:11-25.
131. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. Cancer Incidence in Five Continents. Vol III. **IARC Scientific Publication** Nº 155:002:27.
132. Peng YC, Breiding DE, Sverdrup F. AMF-1/Gps2 binds p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins. **J Virol** 2000; 74:5872-9.
133. Pérez R, Lage A. Los factores de crecimiento y sus relaciones con la transformación maligna. **Interf y Biotech** 1986; 13 (3):179-209.
134. Pisa P, Halapi E, Pisa E.K, Gerdin E, Hising C, Bucht A, Gerdin B. & Kiessling R. Selective expression of interleukin 10, interferon- γ , and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in ovarian cancer biopsies. **Proc. Natl Acad Sci**. 1992; 89, 7708-7712.
135. Rafiq, K L, Charitidou D M A, Bulles A, Kasran K, Lorre J L. Ceuppens and S. W. Van Gool. Regulation of the IL-10 production by human T cells. **Scand. J. Immunol**. 2001;53:139-147.
136. Rincón O, Pareja L, Jaramillo S, Aristizabal B. Virus de papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. **Rev Colomb Obstet Ginecol** 2007; 58: 202-212.
137. Rocha-Zavaleta L, Huitron C, Caceres-Cortes J R, Alvarado-Moreno J A, Valle-Mendiola A, Soto-Cruz I, Weiss-Steider B, Rangel-Corona R. Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta/gamma signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human. **Cell Signal**. 2004; Nov; 16(11):1239-47.
138. Rodríguez, D. 2006. El Cáncer mata a 3 zulianas cada 24 horas. **Panorama**. Maracaibo – Venezuela. 2 de julio de 2006. Primer cuerpo, columna 1. Pág. 1-12. Ejemplar Nº 30-901.
139. Satin P; Alessandro D, Hermonat A, Ravagri S, Bellone S and Pecorelli J. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus specific CD8 cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Virology**. 2000; May. P.4729-4737.
140. Sato K, Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and *flt* mRNA expression in the

- rat thyroid in vivo. **J Clin Invest** 1995; 96: 1295-1302.
141. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papilloma virus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA** 2001; 286:3106-14.
142. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus **Clin Diagn Lab Immunol.** 2001;8 (2): 209-220.
143. Scott M, Stites D, Moscicki, A. Th1cytokine patterns in cervical human papillomavirus. **Clin Diagn Lab Immunol.**1999; 6 (5):751-755.
144. Sedjo RL, Roe DJ, Abrahamsen M, Harris RB, Craft N, Baldwin S. Vitamin A, carotenoids and risk of persistent oncogenic human papilloma infection. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2002;11(9):876-84.
145. Shannon J, Thomas DB, Ray RM, Kestin M, Koetsawang A, Chitnarong K, Dietary risk factors for invasive and in situ cervical carcinoma in Bangkok, Thailand. **Cancer Causes Control.** 2002;13(8):691-9.
146. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. **J Immunol** 2001;167:2972-2978.
147. Shiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst** 1992; 84: 394-8.
148. Shirley E. Oho. Cáncer ginecológico. Libro de enfermería oncológica. Cáncer ginecológico. Tercera Edición vol 1 1999. pp 999.
149. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature** 1992; 369: 843-845.
150. Simpson AJG. The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis. **Adv Cancer Res** 1977; 71:209-40.
151. Smith P L, Lombardi G, Foster G R. Type I interferons and the innate immune response-more than just antiviral cytokines. **Mol Immunol** 2005; 42: 869-77.
152. Soker S, Fidler IJ, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. **J Biol Chem** 1996; 271: 5761-5767.
153. Sorathia, Davy C, Doorbar J. Regulation of E2-mediated transcription by 16 E4. **Study ongoing.**
154. Stina Syrjänen, Paulo Naud, Luis Sarian, Sophie Derchain, Cecilia Roteli-Martins, Adhemar Longatto-Filho, Silvio Tatti, Margherita Branca, Mojca Eržen, L S Hammes, S Costa and Kari Syrjänen. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. **Virchows Arch path Anat**2009; 455(6):505-515.
155. Stites DP, Abbas AK, Parslow TG. Inmunidad innata: neutrófilos, macrófagos y células natural killer. **Inmunología Básica y Clínica.** Editorial El Manual Moderno México. 9ªEd Santa Fé de Bogota. 1999. Pp 51-91.

156. Stubenrauch F, Laimins L A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Semin Cancer Biol** 1999;9:379-86.
157. Stubenrauch F, Zobel T. The E8 domain confers a novel long distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high risk human papillomavirus type 31. **J Virol** 2001; 75:4139-49.
158. Suárez A, Mozo L, Gutierrez M. Citocinas y sus Receptores. Disponible en www.inmunologiaenlinea.es.
159. Sugamura K H, Asao M K, Tanaka N, Ishii K O, Nakamura M, Takeshita T. The interleukine-2 receptor y Caín: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. **Ann Rev Immunol** 1996; 14: 179-205.
160. Suzane H, Gert J F, J J Baelde, Ed Schuurin, Gemma G Kenter and Arko Gorter. Citokine Profile of Cancer Cells. **Gynecologic Oncology** 2001;(83) 235-243.
161. Syrjänen S, Naud P, Luis Sarian L, Derchain S, Roteli-Martins C, Adhemar Longatto-Filho, Tatti S, Margherita Branca M, Eržen M, L S Hammes, CostaandKariSyrjänen. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort **Virchows Arch path Anat**455(6):505-515 (2009).
162. Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 Receptor system: A current overview. **Cell** 1993; 73: 5-8.
163. Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. **J Virol** 1992; 66:3740-3748.
164. Thun MJ, Apicella LF, Henley SJ. Smoking vs other risk factors as the cause of smoking-attributable deaths: confounding in the courtroom. **JAMA** 2000; 284:706-12.
165. Tjong M Y, Van der Vange, Schegget J S, Burger M P Tjong, Ten Kate, F W. Cytokine in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. **Cytokine**. 2001; 14:357-60.
166. Torrejón, R. Factores de Riesgo de Cáncer Uterino. Estrategias de Prevención. **Salud Total de la Mujer**: 2002; 4:23-31.
167. Valdespino V, Valdespino V E. Perspectivas actuales en el estudio y en la atención de las pacientes con cáncer cervicouterino. **Ginecol Obstet Mex** 2004; 72: 29-38.
168. Valencia A, Olín L, Osoria R. ¿Cuál es la relación entre el VPH y el cáncer de cuello uterino? **Biología experimental de la división de Ciencias Biológicas y de Salud**.UAM- Vol.1. 1998.
169. Villiers E M L, Zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. **J Virol** 1981; 40:932-935.
170. Vimlarani Chopra, Tung V, Dinh and Edward V. Hannigan. Circulating Serum Levels of Cytokines and Angiogenic Factors in Patients with Cervical Cancer. **Cancer Investigation**1998; Vol.16.(3)152-159.
171. Von Knebel D M, 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.
172. Williams B, Quinn-Baker A, Gallacher B. Serum and platelet-derived growth factor- induced expression of vascular permeability factor mRNA by human vascular smooth muscle cells in vitro. **Clin Sci** 1995; 88: 141- 147.

173. Wu T C, Kurman RJ. Analysis of cytokine profiles in patients with human papillomavirus associated neoplasms. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:185-187.
174. Yoon C S, Kim K D, Park S N and Cheong SW. Alpha (6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 283:668-673.
175. Zamora P, Espinosa E, de la Gándara I. Síndromes paraneoplásicos: En: González M, Ordoñez A, García ML, Feliú J, Zamora P. **Oncología Clínica. Fundamentos y patología general.** 1ª ed. Madrid: Interamericana-McGraw- Hill; 1992. P XIII/159-170.
176. Zetter B R. 1998. Angiogenesis and tumor metastasis. **Annu Rev Med** 49:407-24.
177. 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.
178. Zur Hausen H. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta** 1996; 1288:55-78.
179. Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. **Proc Assoc Am Physicians** 1999;111:581-587.
180. Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Curr Top Microbiol Immunol** 1977; 78:1-30

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:

Sí: _____ No: _____

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

Tiempo: _____

HÁBITOS CAFEICOS:

Sí: _____ No: _____

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

**ANTECEDENTES DE OTRAS INFECCIONES DE TRANSMISION SEXUAL
(FECHA DE SU DIAGNÓSTICO)**

Sí: _____ No: _____

Sífilis: _____ Gonorrea: _____ Linfgranuloma Venéreo: _____

Chancro Blando: _____ Chlamydia: _____ Herpes Genital: _____

Tricomonas: _____

Tratadas: Sí: _____ No: _____ Control Actual: _____

Ultima citología Vaginal: _____

ANTECEDENTES PATOLÒGICOS:

Sí: _____ No: _____ Cúal?: _____

Desde cuándo sufre la patología?: _____

INGESTION DE MEDICAMENTOS:

Sí: _____ No: _____ ¿Cuál?: _____ ¿Desde cuándo lo toma?: _____

FLUJO VAGINAL:

Sí: _____ 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 prueba, 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-----
