



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE MEDICINA

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:
EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS BAX Y BCL2 EN LESIONES
PREINVASIVAS E INVASIVAS DE CÉRVIX.

Requisito previo para optar por el Título de Médico:

Autora: Mestanza Zurita, Jéssica Gabriela

Tutora: Dra. PHD. Carrero Castillo, Yenddy Nayghit

Ambato – Ecuador

Febrero 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación sobre el tema: **“EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS BAX Y BCL2 EN LESIONES PREINVASIVAS E INVASIVAS DE CÉRVIX”** de Mestanza Zurita, Jéssica Gabriela, estudiante de la Carrera de Medicina; considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador, designado por el H. Consejo de la Facultad Ciencias de la Salud.

Ambato, febrero 2021

LA TUTORA



Dra. PHD. Carrero Castillo, Yenddy Nayghit

AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el presente trabajo de investigación sobre: **“EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS BAX Y BCL2 EN LESIONES PREINVASIVAS E INVASIVAS DE CÉRVIX”** como también los contenidos, ideas, análisis y conclusiones son de responsabilidad de mi persona, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, Febrero del 2021

LA AUTORA



Mestanza Zurita, Jéssica Gabriela

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato para que haga de este proyecto de investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi proyecto de investigación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de Proyecto de Investigación, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta producción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.

Ambato, febrero del 2021

LA AUTORA



Mestanza Zurita, Jéssica Gabriela

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal de Examinador aprueban el Informe del Proyecto de Investigación, sobre el tema: **“EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS BAX Y BCL2 EN LESIONES PREINVASIVAS E INVASIVAS DE CÉRVIX”** de Mestanza Zurita Jéssica Gabriela, estudiante de la Carrera de Medicina.

Ambato, febrero del 2021

Para su constancia firman:

PRESIDENTE/A

1er Vocal

2do Vocal

DEDICATORIA

A mi Padre del cielo y a mis madres, con todo mi amor, a pesar de las dificultades.

Mestanza Zurita, Jéssica Gabriela

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios, amor de mis amores, y a mi Madre del cielo, sin ella nada soy.

Gracias a mi mamá, a mi abuelita y a mi hermana, son el regalo más grande de mi vida.

Gracias a mi querida tutora, por su paciencia y amistad, por hacerme amar la ciencia y buscar nuevos horizontes.

Gracias a mis enemigos por mostrarme con su ejemplo el camino equivocado.

Mestanza Zurita, Jéssica Gabriela

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	ii
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Antecedentes investigativos	3
1.1.1. Contextualización	3
1.1.1.1. Generalidades del cáncer de cérvix.....	3
1.1.1.2. VPH en el cáncer de Cérvix.....	3
1.1.1.3. p53 y pRb inductores de apoptosis.....	4
1.1.1.4. BAX y BCL2 en la apoptosis.....	4
1.1.1.5. VPH y las proteínas apoptóticas BAX y BCL2	5
1.1.2. Justificación	5
1.1.3. Estado del Arte.....	7

1.1.4.	Fundamentación Teórico – científico	11
1.1.4.1.	Cáncer de cérvix.....	11
1.1.4.1.1.	Historia	11
1.1.4.1.2.	Epidemiología.....	13
1.1.4.1.3.	Factores de riesgo	13
1.1.4.1.4.	Fisiopatología	17
1.1.4.1.5.	Clínica.....	23
1.1.4.1.6.	Diagnóstico.....	25
1.1.4.1.7.	Tratamiento.....	28
1.1.4.1.8.	Pronóstico	29
1.1.4.1.9.	Prevención	30
1.1.4.2.	BAX y BCL2 en el cáncer de cérvix.....	32
1.1.4.2.1.	Generalidades	32
1.1.4.2.2.	Apoptosis	33
1.1.4.2.3.	BAX y BCL2.....	36
1.1.4.2.4.	Mecanismos patogénicos de VPH asociados a la expresión de BAX y BCL2	37
1.2.	Objetivos.....	38
1.2.1.	General.....	38
1.2.2.	Específico.....	38
CAPÍTULO II		39
METODOLOGÍA		39
2.1	Materiales	39
2.1.1	Recursos humanos:	39
2.1.2	Recursos materiales	39
2.1.3	Recursos financieros	40
2.2	Métodos	41

2.2.1	Nivel y tipo de investigación	41
2.2.2	Descripción de metodología	41
2.2.3	Selección de la población	41
2.2.3.1	Criterios de inclusión	41
2.2.3.2	Criterios de exclusión.....	42
2.2.3.3	Criterios de bioética	42
2.2.4	Historia clínica.....	42
2.2.5	Examen físico ginecológico.....	42
2.2.6	Procedimientos.....	42
2.2.6.1	Toma de muestra de Papanicolao (PAP).....	42
2.2.6.2	Colposcopia.....	43
2.2.7	Procesamiento de muestras.....	43
2.2.7.1	Inmunocitoquímica	43
2.2.8	Cultivo celular.....	44
2.2.8.1	Descongelación celular	44
2.2.8.2	Pase de células.....	44
2.2.8.3	Extracción de ARN	45
2.2.8.4	Reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real de controles... 45	
2.2.9	Análisis estadístico	46
2.2.10	Búsqueda Bibliográfica.....	46
2.2.11	Hipótesis	46
CAPÍTULO III.....		47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		47
3.1	Análisis y discusión de los resultados	47
3.1.1	Análisis de los resultados.....	47
3.1.1.1	Expresión de BAX y BCL2 en lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix.	47

3.1.1.2	Positividad o negatividad para VPH en el total de la población de estudio	49
3.1.1.3	Comportamiento de la expresión de las proteínas BAX y BCL2 en sangre total de pacientes con lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix.	53
3.1.1.3.1	Immunopatogénesis de VPH asociado al cáncer de cérvix.....	53
3.1.1.3.2	Comportamiento del sistema inmune en sangre periférica en cáncer de cérvix	58
3.1.1.4	Discusión de los resultados	63
CAPÍTULO IV		67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		67
4.1	Conclusiones.....	67
4.2	Recomendaciones.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		68
ANEXOS.....		80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de VPH en tipos de “bajo riesgo” y “alto riesgo”	18
Tabla 2 Rangos de regresión y progresión de las lesiones displásicas cervicales.	23
Tabla 3 Estadificación FIGO para el cáncer de cuello uterino	26
Tabla 4 Tumores de los órganos reproductores femeninos.....	28
Tabla 5 Distribución de frecuencias según el número de casos para cada grupo de estudio	47
Tabla 6 Expresión de BAX y BCL2 en HeLa por qtPCR.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Apoptosis	35
Figura 2 Expresión de BAX según el número de células en lesiones de cérvix.	48
Figura 3 Expresión de BCL2 según el número de células encontradas en lesiones de cérvix.....	49
Figura 4 Expresión relativa de BAX y BCL2 en células Hela.....	49
Figura 5 Expresión de la proteína BAX y BCL2 en células Hela.....	51
Figura 6 Expresión de BAX en tejido cervical de paciente con Dx de Ca in situ.	52
Figura 7 Expresión de BCL2 en tejido cervical de paciente con Dx de Ca in situ.....	52
Figura 8 Diafonía entre el microambiente tumoral y el sistema inmunológico.....	60

RESUMEN

Introducción: El cáncer de cérvix representa el 7,5% de la mortalidad femenina a nivel mundial. La detección tardía, el desconocimiento de los factores de riesgo, de las pruebas de detección y su difícil acceso, constituyen sus principales causas.

Los procesos neoplásicos a nivel del cuello uterino son desencadenados por el Virus del Papiloma Humano (VPH) 16 y 18, así como, la progresión a la malignidad por lo que es indispensable la aplicación de modelos de prevención costo-efectivos como el cribado y tratamiento oportuno de lesiones preinvasivas.

Los mecanismos y factores que determinan la progresión de lesiones preinvasivas a invasivas sigue siendo motivo de debate. Sin embargo, se han identificado puntos estratégicos de acción de VPH en los mecanismos de persistencia de la infección, la evasión y alteración del sistema inmune; y la modificación de las vías apoptóticas, todos estos a favor de la inmortalización celular llevada a cabo a través de la alteración de la proteína 53 (p53) y la proteína del Retinoblastoma (pRb) y, por ende, en la señalización de las proteínas de la familia BCL2, proteínas indispensables en la regulación de la apoptosis celular para la homeóstasis de los tejidos, así como, en los mecanismos celulares de protección frente a daño del ADN, estrés celular o estímulos nocivos, y uno de los principales objetivos de VPH por lo que su interacción es motivo de varias investigaciones.

Objetivo: Analizar la expresión de las proteínas BAX y BCL2 en lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix.

Metodología: La población en estudio estuvo conformada por pacientes femeninas que cumplieron con los criterios de inclusión, se realizó la historia clínica, examen físico ginecológico, toma de muestras de Papanicolao, colposcopia y biopsias que posteriormente fueron procesadas por inmunohistoquímica. Además, se realizaron cultivos de células HeLa, a las cuales se les extrajo el ARN y realizó qRT-PCR para BAX y BCL2.

Resultados: BAX presentó expresión *in situ* estadísticamente significativas al comparar el control Vs NIC I, II, III y cáncer, pero no se encontró relación entre la progresión de las lesiones. Sin embargo, BCL2 no mostró valores de expresión

significativos. En la expresión relativa de Bax y Bcl2 por qRT-PCR en células HeLa, Bax mostró una mayor expresión. No se evidenciaron modificaciones en la expresión de las proteínas BAX y BCL2 en función de la positividad por infección de VPH.

Conclusiones: BAX y BCL2 son proteínas proapoptóticas cuyos patrones de expresión se alteran in situ y en linfocitos de sangre periférica por su interacción con VPH por lo que estas proteínas son consideradas potenciales marcadores diagnósticos y pronósticos, de allí la importancia de su determinación en muestras provenientes de pacientes con diferentes grados de lesión.

Recomendaciones: Elaborar estudios cuantitativos sobre la expresión de BAX y BCL2 en lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix y en linfocitos de sangre periférica para determinar su valor predictivo en la progresión de los procesos cancerígenos.

PALABRAS CLAVES: CÁNCER DE CÉRVIX, APOPTOSIS, BAX, BCL2.

SUMMARY

Introduction: Cervical cancer represents 7.5% of female mortality worldwide. Late detection, lack of knowledge about risk factors, about detection tests and their difficult access are the main causes.

Neoplastic processes in cervix are triggered by the Human Papilloma Virus (HPV) 16 and 18, as well as the progression to malignancy whereby the application of cost-effective prevention models such as screening and opportune treatment of preinvasive lesions is essential.

The mechanisms and factors which determine the progression from preinvasive to invasive lesions remain a matter of debate. However, strategic HPV action points have been identified in the mechanisms of infection persistence, evasion and alteration of the immune system; and the modification of apoptotic pathways, all of these for the purpose of cell immortalization carried out through the alteration of protein 53 (p53) and Retinoblastoma protein (pRb) and, therefore, in protein signaling of the BCL2 family, essential proteins in the regulation of cellular apoptosis for tissue homeostasis, as well as in the cellular mechanisms of protection against DNA damage, cellular stress or harmful stimuli, and one of the main targets of HPV so their interaction is the subject of several investigations.

Objective: Analyze the expression of BAX and BCL2 proteins in pre-invasive and invasive cervical lesions.

Methodology: The study population was composed of female patients who met the inclusion criteria, a clinical history, gynecological physical examination, taking Papanicolao samples, colposcopy and biopsies that were later processed by immunohistochemistry. In addition, HeLa cell cultures were performed, from which the RNA was extracted and qRTPCR was performed for BAX and BCL2.

Results: BAX presented statistically significant in situ expression when comparing the control vs CIN I, II, III and cancer, but no relationship was found between the progression of the lesions. On the other hand, BCL2 did not show significant expression values. In the relative expression of Bax and Bcl2 by qRTPCR in HeLa cells, BAX showed higher expression. No changes were identified in the expression of BAX and BCL2 proteins depending on the HPV positivity infection.

Conclusions: BAX and BCL2 are pro-apoptotic proteins whose expression patterns are altered in situ and in peripheral blood lymphocytes due to their interaction with HPV, so these proteins are considered potential diagnostic and prognostic markers, hence the importance of their determination in samples from of patients with different degrees of injury.

Recommendations: Carry out quantitative studies on the expression of BAX and BCL2 in pre-invasive and invasive lesions of the cervix and in peripheral blood lymphocytes to determine their predictive value in the progression of carcinogenic processes.

KEY WORDS: CERVICAL CANCER, APOPTOSIS, BAX, BCL2.

INTRODUCCIÓN

El cáncer ocupa el segundo lugar en las causas de muerte a nivel mundial siendo responsable de 8,8 millones de fallecimientos durante el 2015, de los cuales el 70% fueron registrados en países de bajos y medianos ingresos. El 25% de los casos son atribuidos a infecciones por virus oncogénicos, entre ellos el virus del papiloma humano (VPH) y el virus de la hepatitis (1).

Los VPH 16 y 18 son los principales desencadenantes de los procesos neoplásicos a nivel del cuello uterino, patología que representa el 7,5% de la mortalidad femenina por cáncer ubicándolo en el segundo tipo más frecuente. El 84% de los casos nuevos y 85% de las muertes por año se concentran en los países de bajos recursos (2).

El cáncer de cérvix es detectado en estadios avanzados por el desconocimiento de las pruebas de detección y de los factores de riesgo. Es indispensable la aplicación de modelos de prevención costo-efectivos como el cribado para la identificación y tratamiento oportuno de lesiones preinvasivas. Por otro lado, la vacunación contra VPH es un método de prevención primaria eficaz, no obstante, no está al alcance de los países de bajos recursos (1–4).

En países de bajos y altos recursos la mortalidad por cáncer de cérvix es un problema de salud pública. A pesar de la eficacia de la vacunación, el cribado y el tratamiento de lesiones preinvasivas aún existen casos de progresión y recidivas. En la actualidad, no se han identificado marcadores de progresión que muy probablemente se establecerían como un método de prevención decisivo en la continuidad del cribado, el seguimiento y el tratamiento (5).

Dentro de la fisiopatología, la progresión de las lesiones preinvasivas a invasivas sigue siendo motivo de debate. Sin embargo, la patogenia de VPH ha dado paso a la identificación de puntos estratégicos entre ellos los mecanismos de persistencia de la infección, la evasión y alteración del sistema inmune y la modificación de las vías apoptóticas (5,6).

Una de las áreas de investigación más llamativas son los mecanismos de inmortalización celular de VPH por su capacidad de alterar la vía apoptótica a nivel de la proteína 53 (p53) y la proteína del Retinoblastoma (pRb) lo que resulta en la señalización de las proteínas de la familia BCL2, proteínas indispensables en la regulación de la apoptosis celular como parte de la homeostasis de los tejidos (5,6).

Las proteínas del linfoma antiapoptótico de células B2 o BCL2 determinan el destino de la célula a través de la interacción entre los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos. Son un punto decisivo en los mecanismos celulares de protección frente a daño del ADN, estrés celular o estímulos nocivos, y uno de los principales objetivos de VPH (5,7,8).

El VPH establece una relación de comensalismo con las células cervicales para mantener su replicación y durante este proceso, se induce la inmortalización celular con las consecuencias ya conocidas. La transformación celular es un proceso que requiere la alteración de los mecanismos apoptóticos. VPH altera la vía mitocondrial, probablemente al desequilibrar la expresión de las proteínas BCL2. Los resultados obtenidos en estudios anteriores son controversiales. Sin embargo, la investigación en este campo permitirá el desarrollo de marcadores moleculares pronósticos y/o dianas terapéuticas que permitan predecir el destino de las lesiones intraepiteliales de cérvix desde estadios tempranos (9–11).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Contextualización

1.1.1.1. Generalidades del cáncer de cérvix

El cáncer de cuello uterino es una patología prevenible y curable cuya incidencia y mortalidad ha disminuido a lo largo del tiempo, gracias a la mayor disponibilidad de métodos de cribado. Sin embargo, continúa siendo un problema de salud pública debido a su alta mortalidad, siendo responsable de más de 300.000 millones de muertes por año. Un factor determinante en el desarrollo de esta enfermedad es el desconocimiento de los factores de riesgo y los métodos de detección que conlleva la demora en el diagnóstico y tratamiento permitiendo el desarrollo de la enfermedad (3,4).

Los factores de riesgo se asocian principalmente a las conductas sexuales que predisponen la infección por el Virus del Papiloma Humano, uno de los principales agentes causales, que junto a los factores socioeconómicos condicionan el progreso de las lesiones (4).

1.1.1.2. VPH en el cáncer de Cérvix

El VPH es un ADN de doble cadena cuyas cepas de alto riesgo oncogénico como los VPH 16, 18, 31 y 45 se aíslan en el 80-85% de los casos de cáncer de cuello uterino, siendo VPH 16 y 18 responsables del 70% de los carcinomas de células escamosas y del 90% de los adenocarcinomas. De manera general, aproximadamente el 80% de las mujeres se infectará con VPH de alto riesgo hasta los 50 años de edad, de las cuales el 10% tendrá una infección activa, el 4% tendrá anomalía en la citología, el 1% tendrá verrugas genitales y todas tendrán el riesgo de contraer cáncer de cérvix en dependencia de los factores predisponentes (4,12–15).

El VPH tiene tropismo por las células proliferativas basales del epitelio estratificado del cérvix las cuales son necesarias para su supervivencia. Se replica en el interior de la célula a manera de episomas manteniendo un número bajo de copias que fluctúa entre 20 – 100 copias, seguido de una fase de replicación establecida con 50-100 copias por célula infectada. Para iniciar la replicación viral se requiere la proteína E1 con actividad helicasa - ATPasa y la E2 que ayuda al reclutamiento de E1 en la cadena de ADN. A lo largo de la diferenciación, E4 y E5 actúan en la replicación

viral, proceso que se mantiene activo a través de las proteínas E6 y E7 que inactivan a la proteína 53 (p53) y a la proteína del Retinoblastoma (pRb), respectivamente. La inactivación de pRb obliga a la célula a permanecer en un estado proliferativo evitando su salida del ciclo celular. Además, la inactivación de p53 previene la apoptosis y por tanto asegura la supervivencia celular. Tras la diferenciación, la célula entra a la fase productiva lo que resulta en miles de copias virales por célula, seguido de la amplificación de las proteínas L1 y L2 que empaquetan los viriones y forman la cápside icosaédrica (16).

1.1.1.3. p53 y pRb inductores de apoptosis.

La proteína del retinoblastoma (pRb) es un regulador en muchos procesos celulares y se lo ha relacionado con los procesos patogénicos neoplásicos debido a que dos terceras partes de los tumores humanos presentan mutaciones en los reguladores de esta proteína (17).

Generalmente, pRb interactúa con los factores de transcripción E2F y los inhibe, no obstante, durante la señalización mitogénica, los complejos cdk/ciclina fosforilan a pRb y liberan a E2F permitiendo la progresión del ciclo celular. Por otro lado, están bien establecidas sus funciones transcripcionales directas e indirectas en procesos apoptóticos y en la diferenciación y senescencia celular (17).

La pRb tiene una función proapoptótica que responde a un estímulo de la misma índole que es enviada por TNF- α a través de su vía intrínseca/mitocondrial. TNF- α activa la familia de proteínas de BCL2, BAX y BAK que producen la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y liberan factores inductores de apoptosis, tales como el citocromo c que activa la caspasa efectora. Además, inducen una respuesta proinflamatoria mediada por NF κ B, para inhibir la apoptosis; por el inhibidor del proteosoma MG-132 o el inhibidor de la traducción cicloheximida (CHX) para oponerse a este último efecto (17).

Por otro lado, p53 es un supresor de tumores que promueve la muerte celular, suprime la migración e invasión celular y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), funciones no transcripcionales que tienen lugar en el citoplasma donde interactúa con las proteínas BCL-2 (18).

1.1.1.4. BAX y BCL2 en la apoptosis.

La familia de BCL-2 son proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas que regulan la vía apoptótica mitocondrial. La clasificación de esta familia está en dependencia de

la homología de sus dominios con BCL2 y la función de los mismos. Existen dominios BH del 1 al 4 de los cuales derivan las proteínas antiapoptóticas: BCL2, BCL-XL, BCL-W, A1, MCL-1, las proteínas proapoptóticas: BAX, BAK, BOK, y las proteínas proapoptóticas BH3 individuales: BID, BIM, BAD, PUMA, NOXA, BIK, BMF, HRK, BNIP3 (5,19).

La interacción entre proteínas específicas de la familia BCL2, BAX y BAK, determinan el destino inmediato de la célula permitiendo o evitando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. El desequilibrio entre la expresión e interacción de las proteínas de esta familia conlleva la desregulación de la vía mitocondrial apoptótica, evento crucial en la carcinogénesis (5,7,8).

1.1.1.5.VPH y las proteínas apoptóticas BAX y BCL2

La relación entre los VPH de alto riesgo y la expresión de las proteínas apoptóticas de la familia BCL2 no es clara. Probablemente, la interacción de BAX, BCL2 y VPH está mediada por p53 y pRb, principales dianas de las oncoproteínas de este virus (20)

La oncoproteína E6 inhibe a p53 lo que incrementa la expresión de BCL2 y disminuye la expresión de BAX, predominando las señales antiapoptóticas sobre las apoptóticas. Estos mecanismos están involucrados en la inmortalización celular y el desarrollo del proceso cancerígeno evidenciando la relación entre VPH y las proteínas de la familia BCL2 (13,21).

1.1.2. Justificación

El cáncer de cuello uterino es un problema de la salud pública con más de medio millón de casos diagnosticados y causante de más de 300.000 millones muertes por año a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (3).

Los hábitos sexuales predisponen la infección por VPH. El inicio de la vida sexual activa entre los 15 y 20 años es un factor de riesgo importante que se relaciona con mayor número de parejas sexuales y mayor riesgo de infecciones de transmisión sexual (22).

El VPH es reconocido como el principal desencadenante del proceso cancerígeno a nivel del cuello uterino. La progresión a carcinoma cervical radica en la persistencia de la infección y la integración del ADN viral a las células, características propias de los VPH de alto riesgo (16 y 18); a diferencia de los tipos de bajo riesgo que se

conservan como episomas, unidades extracromosómicas replicantes que funcionan autónomamente (23,24).

El VPH activa su ciclo celular durante la diferenciación de la célula infectada y crea un entorno competente para la replicación, amplificación del genoma y el empaquetamiento en partículas infecciosas. Estas funciones son posibles por los genes open Reading frames de expresión temprana (E1 – E8) encargados de expresión de las proteínas: E5, E6 y E7, necesarias para la replicación viral; y genes de expresión tardía encargados del ensamblaje de la cubierta viral. Además, poseen una región de control, región larga de control (RLC), que desencadena la expresión de genes tempranos E6 y E7, los cuales determinan la capacidad del virus para integrarse al genoma hospedero (23–25).

La oncoproteína E6 codifica una proteína que inmortaliza a las células del hospedero a través de dos mecanismos dependientes o no a p53. La proteína p53 es supresora tumoral, encargada de la detención del ciclo celular y la apoptosis tras la progresión aberrante del mismo. Esta proteína es degradada por E6 para facilitar la integración al ADN foráneo y desequilibrar la señalización de control del ciclo celular (24).

La oncoproteína E7 codifica una proteína vinculada a la degradación de pRb (proteína del retinoblastoma) la cual actúa como supresora del crecimiento celular. Este proceso conlleva la inactivación de los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas que permite un crecimiento celular descontrolado. Además, E7 produce una inestabilidad genómica estableciendo una aneuploidía característica (24).

Las oncoproteínas virales de VPH al interferir con las proteínas p53 y pRb, altera la vía de señalización de la familia BCL2, entre ellas BAX y BCL2. Estas proteínas regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa determinando la liberación de proteínas mitocondriales inductoras de apoptosis, por lo que al alterar su curso normal les concedería un potencial carcinogénico. Cabe destacar que ha sido identificado el valor pronóstico y predictivo de la expresión génica de estos marcadores en lesiones cancerígenas. Además, la identificación de BAX y BCL2 por inmunotinción también se ha mostrado útil para diferenciar lesiones precancerígenas y cancerígenas de cérvix (7,26–30).

Por otro lado, la interacción y señalización celular permite un cambio generalizado en el patrón génico de las células inmunes que puede evidenciarse en la producción de proteínas proapoptóticas BAX y BCL2 identificables en sangre (31).

Por lo anteriormente expuesto, se plantea el siguiente trabajo de investigación que pretende determinar el patrón de expresión de las proteínas proapoptóticas BAX y BCL2 en los mecanismos carcinogénicos inducidos por VPH in situ y en sangre en pacientes con diferentes tipos de lesiones de cérvix. La importancia de este estudio radica en la necesidad de marcadores pronósticos que prevean la transformación cancerígena de las lesiones de cérvix y su relación con el grado histológico de lesión (9,10).

Pregunta de investigación

¿Existe relación entre lesiones invasivas y preinvasivas de cérvix y la expresión de BAX y BCL2 in situ y a nivel sistémico?

1.1.3. Estado del Arte

Una vez revisada la bibliografía en diferentes repositorios se han encontrado los siguientes trabajos de investigación que sirvieron de apoyo para el proyecto en cuestión:

El potencial de BCL2 como predictor de supervivencia ha sido expuesta por varios estudios, entre ellos, Crawford et al. en 1998 determinaron que las pacientes con cáncer de cérvix de aparición reciente que expresaron BCL2 tuvieron mayor supervivencia en 5 años, mientras que aquellas que presentaban positividad para p53 tuvieron peor pronóstico. Estos datos coinciden con los presentados por Dimitrakakis et al. en 1999 quienes además determinaron la relación entre la expresión de BCL2 y el grado de las lesiones intraepiteliales cervicales (32,33).

Tjalma et al. en el 2001 corroboraron los resultados de los anteriores estudios y concluyeron que la positividad de BAX y BCL2 se relacionó con mayor supervivencia en comparación con aquellos que no expresaban estos marcadores y añaden que BCL2 presenta una disposición heterogénea, con lugares donde se expresaba fuertemente hasta lugares donde llegaba a ser negativo dentro del mismo tumor. En el mismo año, Chung et al. identificaron una mayor expresión de BAX en pacientes que cursan la fase resolutive de la enfermedad posterior al tratamiento y su positividad se relaciona con mayor supervivencia. BCL2 y BAK se relacionaron con el estadio del tumor. En base a este, concluyeron que existe una regulación compleja de las proteínas apoptóticas relacionada con el comportamiento clínico del carcinoma de células escamosas de cérvix (34,35).

Por otro lado, Munakata et al. en el 2005 no encontraron relación entre BCL2 y FasL con el tipo histológico, el estadio clínico o con metástasis a nódulos linfáticos. Sin embargo, los casos que presentaron FasL positivo y BCL2 negativo se asociaron con peor pronóstico y, por tanto, menor supervivencia. Por su parte Chea et al. en el 2006 usa la escala numérica del 0 al 4 para valorar la intensidad y porcentaje celular de tinción a la expresión de BAX y BCL2, siendo 0 si es negativo, 1 tinción ligera con porcentaje celular 1-25%; 2 tinción moderada con porcentaje celular 26-50%; 3 tinción fuerte con porcentaje celular 51-75% y 4 porcentaje celular >75%. Además, determinan la distribución de expresión de BCL2, proteína identificada inicialmente en el tercio inferior del epitelio escamoso benigno del cérvix y aumentando su expresión a nivel de tercio medio y superior del epitelio de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LIEAG) y a nivel de tercio inferior de epitelio de lesiones de bajo grado. Por otro lado, BAX presentó un patrón de expresión difuso a nivel de carcinomas de células escamosas, lesiones de alto grado, lesiones de bajo grado y en el epitelio escamoso cervical benigno. En base a lo encontrado los autores concluyen que BCL2 y BAX están aparentemente regulados positivamente en diferentes fases de la carcinogénesis cervical siendo así que BCL2 se expresa en lesiones de alto grado y BAX posterior a la invasión del proceso cancerígeno (36,37). Mee et al, en el 2008 confirmaron la falta de utilidad de p53 en la estadificación de las lesiones cervicales y encontraron una distribución homogénea de la expresión de BCL2 en las capas de NIC III y en el carcinoma de células cervicales escamosas sugiriendo su relación con la pérdida de diferenciación y supervivencia celular, y por tanto, la predisposición a la progresión de NIC III a cáncer (38)

Hossein Ayatollahi et al, en el 2014 determinaron que la expresión de BAX, BCL2 y p53 fue significativamente mayor en las muestras con VPH 16/18 positivo concluyendo que es posible la inactivación de la vía apoptótica por VPH de alto riesgo y que las diferencias de expresión de estos marcadores sugieren una vía carcinogénica temprana en presencia de VPH 16/18 (13).

Khalissa et al, en el 2018 evaluaron la expresión de BCL2 y p53 en carcinomas de células escamosas y adenocarcinoma de cérvix llegando a la conclusión que p53 no es útil como factor pronóstico, mientras que BCL2 parece aportar mayor información por lo que puede ser considerado como un importante marcador del cáncer de cuello uterino (39).

Los datos son controversiales acerca de la capacidad de las proteínas p53 y BCL2 para aportar información sobre la gravedad o progresión de las lesiones cervicales intraepiteliales. Shukla et al, en un estudio del 2014 determinó que la expresión de p53 y BCL2 no tuvo relación con las lesiones premalignas y malignas de 35 pacientes con cáncer de cérvix en presencia de VPH 16 y 18. Sin embargo, BCL2 mostró una diferencia de expresión entre las lesiones intraepiteliales y el carcinoma de cérvix. Al contrario, Eli et al, investigadores que durante 2017 hasta 2019 llevaron a cabo un estudio para determinar la correlación de p53 y BCL2 en lesiones precancerosas y cancerosas de cérvix en presencia de VPH 16 encontraron que estas proteínas se expresan específicamente en displasias severas y, por tanto, muestran una asociación estadísticamente significativa con el tipo histológico, el estadio de las lesiones y la presencia de este virus. Sin embargo, BCL2 mostró mayor relevancia en la asociación con el grado de la lesión (30,40).

La expresión de las proteínas de la familia BCL2 y los procesos cancerígenos han sido estudiados en otros tipos de cáncer. BCL2 muestra variaciones en lesiones displásicas de la mucosa oral, que interpretado por Muthukumaran et al en el 2019 se definió la posible intervención de BCL2 en estadios tempranos de la enfermedad. Mientras, Coutinho-Camillo et al demostraron el valor pronóstico de estas proteínas. Datos que coinciden con los hallados por Chrysovergis et al, en pacientes con carcinoma laríngeo donde la sobreexpresión de BCL2 estuvo relacionada con fenotipos agresivos y mala respuesta a la quimioterapia (41,42).

En las lesiones hiperplásicas y neoplásicas glandulares de endometrio la expresión de BAX y BCL2 fue identificada en el 77 y 82% de los casos, respectivamente, en un estudio llevado a cabo en el 2020, cuyos resultados llevaron a Ahmed et al a plantear la fuerte relación entre estas proteínas, los tipos histológicos y estadios de la enfermedad con afectación glandular, pero no, estromal. A través de lo cual definen la importancia de la expresión asociada entre BAX/BCL2 en la progresión de los procesos tumorigénicos. Este último hallazgo coincide con los encontrados por Mirakhor et al en el 2018 donde BAX se expresó en todas las muestras de tejido normal y en el 85,4% de las muestras con cambios malignos; p53 se expresó únicamente en lesiones malignas, mas no, en tejido sano; en relación con BCL2, se expresó en el 54,2% de lesiones cancerígenas, 76,2% de lesiones hiperplásicas y en el 60% de tejidos normales. La media entre BCL2/BAX fue mayor en el grupo con

lesiones malignas. En base a lo cual, los autores concluyen que la baja expresión de BAX y p53 y la mayor expresión de BCL2 comparado con BAX están asociados al carcinoma cervical. Sin embargo, la expresión de BCL2 por sí sola no mostró importancia (43,44).

El papel de BCL2, no solo como marcador pronóstico, sino también como posible objetivo terapéutico ha sido bien identificado en un estudio llevado a cabo por Zhang Y. et al en el 2020, al demostrar la influencia de la molécula CDS-3078 en el arresto del ciclo celular en G₂/M, encontrando disfunción mitocondrial manifestada en la disminución de la expresión de BCL2 y el aumento de BAK, fenómeno motivado por la activación de p53 que es determinante para la apoptosis de células cervicales cancerígenas (HeLa). A diferencia de los anteriores autores, Wang et al en el 2018, identificaron los efectos anticancerígenos de 1,3,5-triazine en células HeLa efectuados a través del aumento de BAX, C-caspasa-3 y C-caspasa-9, y la disminución de BCL2 (45,46).

De igual manera, RECK activa la vía p53 e inhibe la migración de células cancerígenas cervicales y su capacidad invasora. Sus siglas significan “proteína rica en cisteína inductora de reversión con motivos kazal” involucrada en varias actividades fisiológicas entre ellas la integridad de la matriz extracelular y el crecimiento vascular. Su relación en los procesos cancerígenos radica en su silenciamiento o inhibición en varios tipos de cánceres y varios estudios como el presentado por Lui Y. et al, confirman esta característica y, además, identifican su influencia en la activación de la p53, la sobreexpresión de BAX y la disminución de BCL2 para acelerar la apoptosis celular y llevar a cabo las funciones antes mencionadas (47).

Zhang M. et al, coinciden con los anteriores resultados en células HeLa. Los autores determinaron la utilidad de Fra-1 (FOS relacionado al antígeno 1), importante factor de transcripción de la familia FOS, en la inhibición de la proliferación celular, promoción de la apoptosis y alteración del ciclo celular, funciones que lleva a cabo aparentemente al aumentar la expresión de p53, p38 y p21, y al disminuir la expresión de MDM2, BCL2, CDK4 y ciclina 1 (48).

Por otro lado, Liu M. et al identificaron un IncARN denominado HOTAIR por sus siglas en inglés “HOX transcript antisense RNA” (ARN antisentido de la transcripción HOX) molécula encargada de anular la supresión de la proliferación

celular y la apoptosis en células cancerígenas de cérvix mediante la modulación de la expresión de BCL2 vía miR-143-3p (49).

1.1.4. Fundamentación Teórico – científico

1.1.4.1. Cáncer de cérvix

1.1.4.1.1. Historia

A través de la investigación filogenética moderna se han identificado aspectos característicos del virus del papiloma, entre ellos su preferencia por especies, capacidad de mutación y cientos de genomas diferentes. Estos descubrimientos permiten tomar conciencia de los cientos de millones de años atrás a los que se remonta esta familia de virus y su papel en la salud de las mujeres de la prehistoria.

VPH se ha adaptado al ser humano y se incluye en la sexualidad humana como parte de su evolución para la supervivencia con lamentables daños colaterales. No se ha podido determinar con exactitud desde cuando VPH causa infecciones, pero en una momia medieval de una mujer noble del renacimiento italiano que murió en 1568 se identificó una verruga genital con detección de VPH 18. El resto de los registros es resultado de las descripciones de médicos antiguos. Sin embargo, la definición de cáncer de cérvix tuvo lugar en la segunda mitad del siglo XIX e inicios de siglo XX con el estudio de la patología celular microscópica encabezado por Carl Ruge y Johann Veit en 1880, ginecólogos de la Universidad de Berlín, quienes definieron las diferencias entre cáncer de útero y cáncer de cérvix al analizar tejidos con malignidad de mujeres intervenidas quirúrgicamente por Karl Schroeder. El carcinoma in situ fue descrito en 1886 por John Williams, al mismo tiempo se sospechó una causa infecciosa relacionada a los protozoos (11).

En 1920 y 1930 la detección tardía del cáncer de cérvix y su desenlace fatal crearon la necesidad de un método de cribado periódico para la detección temprana lo que posteriormente dio paso a medidas de prevención. En 1924, Hans Hilseman, ginecólogo alemán, implementó el uso de la colposcopia utilizando ácido acético y en 1928, Walter Schiller añadió yodo para marcar las regiones afectadas del cérvix. El mismo año, se validó la citología vaginal para identificar el cáncer de cérvix. En 1938, la ginecóloga Catherine Macfarlane de Filadelfia, implementó la extirpación de la región afectada por biopsia o traquelectomía. En 1943, se extendió la citología a los tecnólogos médicos y en 1949, Ayres descubrió la forma celular que ahora

conocemos como coilocitos, asociando la patogenia del cáncer de cérvix a la acción de VPH (11).

En 1960, se inicia el tamizaje cervical altamente organizado a través de la citología y el tratamiento a través de la biopsia de cono lo que resultó en una disminución del 50 – 75% de la incidencia de esta patología (11).

En 1971, en el Congreso Latinoamericano de Patología, en Maracaibo, Venezuela, se dio a conocer por primera vez la presencia de partículas virales en lesiones de cérvix que se veían como manchas rosadas a la colposcopia, hallazgos presentados por el Dr. Jorge Nágel, ginecólogo y el Dr. Elio Casale Ochoa, patólogo (50).

El conocimiento sobre el virus Polioma – Papiloma se reducía a su capacidad para producir verrugas que años más tarde se definieron como verdaderos tumores. Se empezó a sospechar sobre el origen viral del cáncer de cérvix. A partir de lo cual, se empezaron estudios basados en la toma de biopsias y estandarización de resultados. Se encontraron halos coilocíticos interpretados erróneamente como sobrecarga glucogénica cuya idea de que esté relacionado con un proceso cancerígeno fue considerada imposible (50).

En 1973, se presentaron los resultados obtenidos por Dr. José Trinidad Núñez Montiel y Dr. José García Tamayo, en el Congreso Latinoamericano de Patología en la ciudad de México demostrando la presencia de VPH en el epitelio cervical y su relación con el cáncer de cérvix(50).

En 1976, Meisels y Fortín, así como Puroloa y Savia describieron los cambios citológicos del cérvix en presencia de infección por VPH. Sin embargo, no fue hasta la década de los 90 que se identificaron secuencias de ADN viral en lesiones cancerígenas por Harald Zur Hausen, Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier cuyo logro fue merecedor del premio Nobel de Medicina del 2008. Desde entonces los estudios han logrado definir la infección por el Virus del Papiloma Humano como principal causante del cáncer de cérvix (50).

A pesar de que la citología de cérvix sufrió altibajos creando desinterés de la comunidad científica, se mejoraron los procesos de la toma de muestras y aumentaron la calidad en los análisis que dio paso a la creación de un programa de cribado sensible y específico para la detección de celularidad cervical anormal (11).

1.1.4.1.2. Epidemiología

La distribución geográfica del VPH a nivel mundial es homogénea ubicándose entre el 75 y 100% con pequeñas variaciones entre continentes como se presenta a continuación: América del Sur y Central (87,7%), Norteamérica y Australia (88,1%), Europa (86,7%), Asia (79,3%) y África (86,5%) (51).

Sin embargo, los casos de cáncer de cérvix en países de bajos y medianos recursos económicos muestran un incremento o estabilización con un riesgo de por vida hasta los 74 años de 1,6% que se explica por las altas tasas de infección de VPH y a la baja disponibilidad o inexistencia de programas de detección. Al contrario, los países con altos recursos presentan tasas de incidencia y mortalidad menores desde la inserción de programas para tamizaje y con un riesgo de por vida de 0,9% (52,53).

A nivel global, en el 2018 se estimaron 569847 casos, 311365 muertes y la mayoría se concentraron en África (sur, este y oeste) ocupando los tres primeros puestos de la lista. El número de casos en América del Sur ocuparon el noveno lugar con una incidencia del 15,2% y mortalidad del 7,1% (54–56).

Ecuador no escapa de esta realidad. Según datos de la OMS, se estimaban 1612 (10,6%) casos nuevos de cáncer de cérvix en el 2018 ubicando a esta patología en el segundo cáncer más frecuente por debajo del cáncer de mama. Por otro lado, según la Sociedad de Lucha contra el Cáncer, SOLCA, núcleo de Quito, las tasas de incidencia de cáncer de cuello uterino fueron de 18,6 por cada 100000 mujeres por año. Un estudio realizado en Guayaquil que incluye datos del 2009 – 2018 en menores de 75 años presenta una tasa de mortalidad que desciende progresivamente de 7,05 en el año 2009 hasta 4,24 por cada 100000 mujeres en el 2018. La edad comprendida entre 60-74 años presentó la mayor tasa de mortalidad seguido del grupo de 45-59 años. Con respecto a Tungurahua, la tasa de mortalidad fluctuó entre 7 y 6,8 en los años 2011 y 2013, respectivamente, siendo Mocha el cantón con mayor número de muertes y por tanto, reducción de años de vida (54–58).

1.1.4.1.3. Factores de riesgo

Los factores de riesgo se concentran en las conductas que suponen el contagio por VPH, entre ellas: menarquia precoz (<13 años), inicio precoz de la actividad sexual, primer parto antes de los 18 años, múltiples parejas sexuales, múltiples parejas sexuales de su pareja, promiscuidad, uso de anticonceptivos hormonales por más de 4 años, múltiples partos, diferencia menor de 2 años entre cada embarazo,

antecedentes de enfermedades de transmisión sexual, y factores propios del individuo como defectos en la respuesta inmunitaria, enfermedades autoinmunes, edad, raza, factores hormonales. También existen factores socioeconómicos: vivienda en áreas rurales, condiciones de la vivienda, bajos ingresos económicos, analfabetismo, bajo nivel educativo, hábitos higiénicos genitales, falta de acceso a servicios de salud, tabaquismo, exposición a mutágenos, comorbilidades añadidas (59–62).

Conductas sexuales: La menarquia precoz marcará, en la mayoría de los casos, el inicio de la actividad sexual y, por ende, mayor actividad sexual, exposición prolongada y mayor riesgo de infección. El mismo razonamiento se aplica en el resto de hábitos sexuales mencionados como el inicio de la actividad sexual antes de los 18 años, múltiples parejas sexuales, etc. (63–65).

Se hace especial referencia a la transmisión del VPH desde la pareja masculina, siendo la historia sexual de este último tan importante como la de la paciente. Al comparar el grupo de mujeres que tienen una pareja sexual masculina monógama con aquellas cuya pareja tenía otras compañeras sexuales y las que desconocían, se identificó que tenían cinco y ocho veces más riesgo de adquirir la infección por VPH, respectivamente. Es decir, el comportamiento sexual masculino es un determinante del desarrollo del cáncer de cérvix (51,64).

Agentes Infecciosos: Las infecciones previas por *chlamydia trachomatis* aumenta en 1,8 veces el riesgo para carcinoma de células escamosas. Este germen causa una infección crónica a nivel de las células escamosas con daño del ADN celular por la producción de especies reactivas de oxígeno lo que aumenta la susceptibilidad celular a los efectos de VPH. En algunos estudios se ha relacionado con el serotipo G de esta bacteria (64,66).

Las infecciones concomitantes por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) determinan la persistencia de la infección por VPH al alterar las respuestas inmunológicas aumentando el riesgo en 3,2 veces (64,66).

Paridad: Los partos vaginales de embarazos a término, partos antes de los 22 años y más de 5 partos están asociados con el cáncer de cérvix. Se presume que los traumatismos del cérvix durante el parto vaginal, la mayor susceptibilidad a las infecciones, la alteración de la diferenciación entre los dos epitelios, el debilitamiento del sistema inmune, las deficiencias dietéticas y factores hormonales pueden aumentar la susceptibilidad a la infección por VPH (64,65,67).

Anticonceptivos orales: Su uso por más de 4 años aumenta 3 veces el riesgo de desarrollar cáncer, si excede los 10 años incrementa a 4 veces. Sin embargo, estos hallazgos son controvertidos y se cree que la relación se basa en la actividad sexual más que el efecto directo de estas hormonas. Dunan et al. mencionan que el uso prolongado de anticonceptivos causan una disminución de los folatos a nivel de las células cervicales con alteración de la actividad de las células megaloblásticas, relacionado con el debut sexual precoz y múltiples parejas sexuales (64,65,68).

Edad: Existen diferencias en la edad de prevalencia del cáncer de cérvix. Osorio et al, en un estudio realizado a 105 pacientes muestran que la edad de aparición de lesiones intraepiteliales de cérvix se ubicó entre 25 – 35 años seguido de las pacientes menores de 25 años. En contraste, Kashyap et al, menciona que el número de casos ha empezado a predominar entre los 20 a 29 años, pero que alcanza su pico entre los 55 y 64 años. Con lo cual se evidencia que los hábitos sexuales actuales tiene una repercusión en el desarrollo temprano de esta patología que empieza a superar a la influencia producida por los cambios hormonales de la perimenopausia (51,59,63).

Obesidad: Las mujeres con un índice de masa corporal mayor o igual a 25 tienen el doble de riesgo de desarrollar la patología, en especial, posterior a la menopausia debido a que aumenta la conversión de andrógenos a estrógenos en el tejido adiposo periférico. Es decir, tiene un componente hormonal que se relaciona con la patogenia del adenocarcinoma de cérvix. Por otro lado, las mujeres obesas acuden con menor frecuencia a la consulta médica por vergüenza al rechazo de su aspecto físico y falta de voluntad de bajar de peso lo que dificulta el acceso a métodos de detección (66).

Factores nutricionales y dietéticos: El mayor consumo de antioxidantes parece tener un efecto beneficioso en el riesgo de cáncer de cérvix. El consumo de vegetales verdes, frutas verdes y amarillas, α - y γ -tocoferol se relacionaron con una disminución del 50% de NIC III al igual que el ácido fólico, betacarotenos, las vitaminas A, C y E. Las vitaminas C y E actúan a nivel de la producción mucosa del cérvix contra infecciones y radicales libres, es decir, tienen la capacidad de regular la respuesta inmune local y, por tanto, disminuyen la replicación viral (63,66).

Tabaquismo: El tabaquismo incrementa al doble el riesgo de lesiones intraepiteliales. La nicotina y la conitina, su producto de degradación, son los elementos resultantes de la combustión del tabaco que se extienden por varios tejidos de cuerpo una vez que entra a la circulación, entre ellos, el cuello uterino, lugar donde altera la respuesta inmunitaria primaria alterando la actividad de las células de Langerhans y permitiendo su acumulación en el moco cervical para modificar las funciones de vigilancia de las células del epitelio cervical (63–65).

Otras comorbilidades: Las enfermedades inflamatorias como lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea aumentan en 1,5 las probabilidades de desarrollar cáncer de cérvix debido a la patogenia autoinmune y el uso de inmunosupresores (66).

Inmunodepresión: El estado de sistema inmunitario determinará la progresión o la resolución de las lesiones intraepiteliales. Las pacientes inmunodeprimidas por infecciones concomitantes como VIH o por los medicamentos administrados pos - trasplantes de órganos tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (65).

Factores genéticos: Arévalo et al, mencionan que tener un pariente de primer grado con esta patología aumenta el riesgo relativo de desarrollarla al doble, mientras que la susceptibilidad genética en el cáncer de cérvix es menor del 1%. Sin embargo, se han identificado polimorfismos genéticos que se relacionan con el desarrollo de esta patología al alterar el procesamiento antigénico de la respuesta inmunitaria lo que determinaría la persistencia y progresión de la enfermedad (61,66,69).

Se han identificado anomalías vinculadas a esta patología a nivel del antígeno leucocitario humano (HLA), el receptor de Quimiocina-2 del cromosoma 3p21, el Fas gen 10q24.1, a nivel de factores de transcripción como TNFa-8, TNFa-572, TNFa-857, TNFa-863, TNFG-308^a; polimorfismos a nivel de Tp53 y CASP8 (69).

Se ha identificado anormalidades a nivel de la vía de fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K), específicamente en PI3KCA; y a nivel de KRAS en adenocarcinomas, mutaciones encontradas en el 30% y 17,5% de los casos en un estudio llevado a cabo por Wright et al. En otro estudio llevado a cabo por Ojesina et al, se encontraron mutaciones en E322K en el 8%, en el gen HLA-B (HLA-B*07 y HLA-B*0302) en el 9%, en EP300 en el 16%, FBXW7 en el 15%, Tp53 en el 5%, ERBB en el 6%, ELF3 en el 13%, y en CBF3 en el 8% de 125 casos de carcinoma escamocelular (64,70).

Factores educativos, socioeconómicos y cultural: Existe una mayor incidencia en las mujeres con bajo nivel educativo, socioeconómico y cultural, condiciones que suponen la mayor exposición a VPH y/o la falta de acceso a la salud. Las mujeres con un nivel de educación alto tendrán conciencia de los síntomas inusuales y estarán más motivadas a informarlo a diferencia de aquellas mujeres que por desconocimiento subestiman muchos signos de alarma permitiendo el progreso de la enfermedad. Además, los problemas económicos disuaden a las mujeres de buscar atención hasta que los síntomas son importantes, realidad a la que se suma la baja cobertura de salud, especialmente en las áreas rurales. Además. la calidad en los servicios conlleva deficiencias en la toma de muestras, altos porcentajes de falsos negativos y detección tardía. El temor y las trabas administrativas también es un factor que evita el alcance adecuado a los servicios de salud (62,64,71).

1.1.4.1.4. Fisiopatología

En 1999, Lazo atribuyó a la fisiopatología del cáncer de cérvix tres mecanismos principales: el efecto de las proteínas virales E6 y E7, la integración del ADN viral

en regiones cromosómicas relacionadas con fenotipos tumorales y las alteraciones genéticas recurrentes no relacionadas con VPH (72).

La adquisición de la infección por VPH se da alrededor de los 20 años y permanece latente hasta los 40 años, edad de mayor incidencia de cáncer de cérvix. La capacidad de producir lesiones reversibles y la persistencia de la infección depende del estado del sistema inmunológico de cada paciente. La presencia de VPH de alto riesgo no condiciona el desarrollo de cáncer, como han mostrado varios estudios in vitro, este virus requirió de varias alteraciones cromosómicas y la acumulación de daños en el ADN para transformar e inmortalizar a las células (72).

El VPH es un virus de ADN de doble cadena con una cápsula icosaédrica sin envoltura perteneciente a la familia *papilomaviridae*. Este virus se ha adaptado al ser humano para mantener una relación comensal mas no patógena, idea sustentada en una infección silenciosa y subclínica que mantiene la replicación viral durante la diferenciación celular casi imperceptible a los mecanismos inmunológicos de defensa (11,61,73).

VPH está compuesto por 8 kilobases (Kb) covalentes dispuestas de manera circular que codifican 8 genes desde E1 hasta E7, L1 y L2 open Reading frames (ORF). Existen cientos de VPH, pero filogenéticamente se ha clasificado en los géneros alfa, beta, delta y mu, según la diferencia entre la secuencia de bases. Los VPH del género alfa son agentes etiológicos del cáncer de cérvix y difieren en el 10% de la secuencia de L1 ORF, muestran tropismo por los tejidos siendo causantes de lesiones premalignas y malignas. Se dividen en “bajo riesgo” asociado con lesiones cutáneas y “alto riesgo”, asociado con lesiones mucosas, según su potencial oncogénico (Tabla 1) (61,74).

Tabla 1 Clasificación de VPH en tipos de “bajo riesgo” y “alto riesgo”

Tipos de bajo riesgo	6, 11, 40, 42 – 44, 54, 61, 72, 81
Tipos de alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82

Fuente: Ibeanu et al, 2011 (61)

Los tipos oncogénicos son 6, 11, 16 y 18. VPH 6 fue detectado inicialmente en verrugas genitales invasivas, VPH 11 en verrugas laríngeas y verrugas genitales, VPH 11 y 16 se encontraron en lesiones a nivel de cérvix, y, por último, VPH 16 y 18 se aíslan en el 95% de los casos de carcinoma de células escamosas y en la

mayoría de los casos de adenocarcinoma junto a VPH 45. Los tipos 31, 33, 45, 52 y 58 también son oncogénicos, pero son menos comunes (61).

Las variantes de VPH alfa difieren en el 3% de la secuencia de L1. Existen 4 variantes de VPH 16: europeo (E), africano (Af-1, Af2), asiático americano (Aa); y 3 variantes similares para VPH 18: europeo (E), africano (Af) y asiático amerindio (AsAi). En este caso, se usan para describir la migración y los patrones de comportamiento sexual de la población (61).

La infección por VPH puede ser asintomática, por lo general, en pacientes inmunocompetentes que superan la infección al cabo de 2 años, independientemente de las características de la citología. Aún se desconoce si el virus es eliminado o solo suprimido, pero se vuelve indetectable en análisis in situ. Por otro lado, en una minoría de casos se vuelve sintomática con la presencia de lesiones que pueden resolver espontáneamente y otras que persisten y progresan a cáncer invasivo al cabo de 15 a 20 años. Existen factores que determinan el curso de la infección, entre ellos el tipo de VPH, el estado inmunológico, la integración viral al genoma y la inestabilidad genética del epitelio producto de una infección de larga data (14,15,53,61).

Durante las relaciones sexuales se producen ulceraciones a nivel del cérvix que exponen a las células de la capa basal al VPH. Este virus ingresa a la célula a través de la interacción con heparán sulfato de la superficie seguido de endocitosis mediado por clatrina. Las células de la capa basal se dividen en dos células hijas, una de ellas permanece en esta capa y otra migra hacia la superficie donde maduran y se desprenden como parte del ciclo normal. Por tanto, al ser expuestas predispone a que la infección por VPH se ubique en el epitelio del cérvix, a nivel de la capa suprabasal diferenciada no proliferativa y en la capa basal no diferenciada (16,61).

Tras la infección, se activa la respuesta inmunológica adaptativa controlada por el complejo principal de histocompatibilidad o MHC de clase I y II las cuales presentan el antígeno a los linfocitos T CD8 y T CD4, respectivamente. También son activados los mecanismos inmunológicos innatos llevadas a cabo por los macrófagos, células de Langerhans y células NK o asesinas naturales que expresan los receptores Tipo Toll (TLR), los cuales reconocen las partículas virales y activan el factor nuclear similar al factor de transcripción kappa B (NFκB) y el factor de respuesta al interferón 3 (IRF3) que se encargan de activar la producción de citocinas. Como se

expone más adelante, VPH actúa sobre los mecanismos inmunológicos de defensa a través de las oncoproteínas para evitar su eliminación (16,61).

La integración de ADN viral en el genoma de las células infectadas es parte del proceso infeccioso de VPH y es considerada por Lazo, como un tipo de alteración recurrente del cáncer de cérvix relacionada con daño genético irreversible. Existe una falta de homología entre el ADN viral y celular por lo que se presume que se integra al genoma por regiones cromosómicas denominadas frágiles por permitir mayor accesibilidad al ADN celular. En el caso de VPH16, Wilke et al, en 1996, definieron a 3p14.2 como su sitio de integración al genoma. El ADN viral se integra en regiones del genoma que probablemente tienen alteraciones genéticas lo que confiere un fenotipo tumoral. Es decir, el cáncer de cérvix puede ser resultado de la selección biológica de ubicaciones cromosómicas específicas en las que se integran el ADN del VPH (72).

Entre las formas de presentación de las alteraciones genéticas en el cáncer de cérvix se encuentran las pérdidas de heterocigosidad o LOH por sus siglas en inglés (losses of heterozygosity), término usado para describir la pérdida recurrente de una región particular de ADN que supone una relación en la patogenia del tumor. Además, LOH actúa como un paso previo a la inactivación de p53 y pRb que más que la inactivación de ambos alelos debido a su acción hemicigótica se explicaría por un efecto de dosis. El estudio de esta alteración genética ha permitido identificar varias regiones cromosómicas que intervienen en el desarrollo de tumores (72).

En el cáncer de cérvix, LOH en el cromosoma 3p se relaciona con la inmortalización de los queratinocitos, inestabilidad celular, pérdida de material genético y, por tanto, la tumorigenicidad de las células. LOH han sido identificados a nivel de la región 3p12-24 tanto en carcinoma de células escamosas como en adenocarcinomas y aparenta ser un marcador de progresión encontrándose en el 25% de los casos en estadio I hasta el 100% en lesiones en estadio IV. Por otro lado, a nivel de la región 3p14.2 se encuentra en el gen FHIT relacionado con carcinomas de pulmón, mama y esófago, pero su rol en el cáncer de cérvix no está bien definido. Sin embargo, comprende el sitio frágil FRA3B, lugar de integración de VPH16, y se ha mostrado que la disminución de esta proteína está relacionada con la pérdida de la transcripción normal. Además, LOH a nivel de la región 3p21 está relacionado con un incremento de la actividad mitótica (72).

La expresión de los genes E1 y E2 es el paso siguiente a la entrega del ADN viral al genoma, evento que desencadena la replicación viral valiéndose de maquinaria celular. La proteína E1 interactúa con factores de replicación de la célula, entre ellos polimerasa α -primasa, la proteína de replicación A, la topoisomerasa I y la ciclina E / Cdk2. E2 actúa como factor de transcripción esencial para la persistencia del virus (61).

El gen viral E2 codifica dos proteínas: la proteína E2 con N-terminal, dominio de activación transcripcional, y proteína E2 con C-terminal, dominio de unión a ADN que actúa como represor, es decir, E2 actúa como activador y represor de las proteínas diana de VPH. Además, la proteína E2 completa induce el arresto del ciclo celular en la fase S con el fin de permitir la replicación del ADN viral y la reproducción de aneuploidías del ADN celular que son parte de proceso cancerígeno. Una vez que el ADN viral se integra al genoma, se inhibe E2 y se liberan E6 y E7 que activan los mecanismos para el crecimiento celular (16,61,72).

La proteína del gen E5 activa el crecimiento celular a través de la formación de complejos con los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas y del factor de crecimiento epidérmico. Además, mantiene la replicación viral e inhibe la apoptosis por lo que se considera oncogénico, pero no se expresa en las células de los carcinomas de cérvix lo que pone en duda este potencial. Por otro lado, se lo relaciona con los mecanismos de protección contra la inmunidad celular por mostrar una baja regulación de MHC-I (61).

La oncoproteína E6 induce de manera débil la transformación celular, pero amplía este potencial de la proteína E7. La proteína E6 secuestra a p53, supresor tumoral, e induce su degradación a través de la vía proteolítica dependiente de ubiquitina. En un estado normal p53 se activa por la inhibición del MDM2 frente al daño del ADN o frente a señales de proliferación celular anormales y envía señales antiproliferativas. La ausencia de p53 altera el punto de control G1, paso previo a fase S del ciclo celular, lo que resulta en la progresión del ciclo celular con acumulación de daños de ADN antes de ser reparados. Además, E6 degrada a Blk, consiguiendo la proliferación celular descontrolada; degrada a BAK, proteína crucial en la formación de poros en la membrana mitocondrial externa y evita la apoptosis. También altera la vía apoptótica extrínseca al unirse al receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNFR-1), Fas, ligando CD95 y ligando de apoptosis relacionado con TNF (61,72).

Por otro lado, E6 altera la señalización entre las células de la capa basal y la matriz extracelular (MEC). Las células basales del epitelio del cérvix se unen a la MEC por moléculas de adhesión, MEC envía señales de crecimiento a través del citoesqueleto de la membrana basal hasta el núcleo de las células, señales que se cesan cuando las células ascienden a la superficie y empiezan su diferenciación celular. E6 altera las uniones normales de las células a la MEC, resultando en su desprendimiento, alteración de la señalización celular e inhibición de la diferenciación celular. De esta manera, VPH mantiene a las células en un estado de división continuo que favorece a la replicación viral constante (61,72).

E6 altera la interacción célula-célula mediante la unión de las proteínas celulares a PDZ, lo cual desregula la proliferación y anima la transformación celular. Otro de los mecanismos con los que E6 ha sido vinculado es la estimulación de la telomerasa para la inmortalización de las células (61,72).

La proteína E7 disocia la interacción entre pRb, p197 y p130 con los factores de transcripción E2F dando paso a su actividad transcripcional sin restricciones. Como consecuencia inducen la progresión del ciclo celular sin controlar la entrada de la fase G1/S y aumentan la proliferación celular al permitir que E2F interactúe directamente con las ciclinas A y E, proceso relacionado con la diferenciación y crecimiento celular al interactuar con c-jun (61,72).

E6 y E7 modifica la respuesta inmunológica innata viral de acción temprana. El receptor tipo toll 9 (TLR9) al tener un papel importante en las respuestas antivirales de la inmunidad innata y en la respuesta al interferón y producción de citocinas, es inhibido por estas oncoproteínas facilitando la persistencia de la infección. Por otro lado, suprimen la expresión de TNF alfa por mecanismos poco conocidos, pero E7 se ha relacionado con la inhibición de CDK o inhibidores de la cinasa dependientes de ciclina. Con respecto a E6, se sabe que altera el contacto entre las células epiteliales y las células presentadoras de antígenos (células de Langerhans) al disminuir la expresión de cadherina E, proteína de superficie celular (61,74).

Para mantener el crecimiento y división celular VPH codifica las proteínas E5, E6, y E7 hasta llegar a la diferenciación celular, proceso controlado por las proteínas de genes virales tardíos E4, L1 y L2 que forman la cápside del virus, seguido de su liberación del epitelio durante el desprendimiento celular. Se presume que la proteína

E4 facilita la propagación del virus dentro de los queratinocitos al interactuar y debilitar los filamentos de queratina (61).

1.1.4.1.5. Clínica

El cuello uterino es el estrechamiento de la porción inferior de útero, cuya mucosa o endocérvix está revestida por epitelio cilíndrico simple, el cual presenta un canal que comunica con la cavidad endometrial a través del orificio cervical interno y con la vagina mediante el orificio cervical externo. En continuidad con el endocérvix la mucosa del cuello uterino llamada también porción vaginal o exocérvix se encuentra revestida por epitelio pavimentoso estratificado. La región donde se sustituye el epitelio cilíndrico simple por el epitelio escamoso estratificado está ubicada en el orificio cervical externo y toma el nombre de zona de transición activa o unión escamosa - cilíndrica que por ser albergue de la mayoría de lesiones premalignas y malignas se ha denominado “zona de transformación”(61,74).

VPH causa cambios displásicos en la zona de transformación cuyas lesiones resultantes se conocían como “neoplasia intraepitelial cervical” o NIC que a partir del 2001 con la clasificación Bethesda de displasia tomó el nombre de “lesión intraepitelial escamosa” o LIE divididas en alto grado (LIEAG) y bajo grado (LIEBG), también se encuentran células escamosas atípicas definidas como ASC-US. Estos cambios son evidenciados en el Papanicolaou, sin embargo, al encontrar anormalidades es necesaria la evaluación colposcópica con toma de biopsia. A través de este método ha sido posible evidenciar que las lesiones LIEBG comprometen el tercio inferior del epitelio cervical, mas no la membrana basal ni el estroma, y generalmente hay cambios denominados “coilocitosis” descrito como patognomónico de estas lesiones producidas por el virus del papiloma humano y que se caracteriza por atipia nuclear, cavitaciones o halo claro perinuclear y granulaciones citoplasmáticas, anomalías cromosómicas evidenciadas durante la mitosis dando un aspecto multinucleado. Con respecto a LIEAG, la alteración epitelial puede evidenciarse a nivel de los 2/3 inferiores del espesor del epitelio para NIC II y en todo el espesor epitelial para NIC III, respetando la membrana basal, la presencia de células basaloideas inmaduras con granulaciones citoplasmáticas, pérdida de la polaridad nuclear y celular, actividad mitótica incrementada y anisonucleosis. Por otro lado, ASC-US son lesiones que no pueden ser definidas como LIEAG ni LIEBG. Estas lesiones tomarán diferentes caminos, es así como Ibeanu et al, muestra

la tasa regresión, persistencia y progresión de lesiones LIEAG y LIEBG en la siguiente tabla 2 (61).

Tabla 2 Rangos de regresión y progresión de las lesiones displásicas cervicales.

	Regresión	Persistencia	Progresión
NIC 1 y 2	57	27	15
NIC 3	8	69	22

Fuente: Ibeanu et al, 2011(61)

Las lesiones de cérvix de alto grado pueden presentar síntomas como sangrado vaginal anormal o poscoital, dispareunia, secreción vaginal fétida y abundante, molestias urinarias y dolor pélvico. Cuando el proceso neoplásico está instaurado puede extenderse a lo largo de la anatomía, invadiendo cavidad endometrial, pared pélvica, vejiga y recto. La presencia de edema en miembro inferior unilateral, ciática e hidronefrosis u obstrucción ureteral es una triada que sugiere invasión de la pared pélvica lateral. La eliminación de orina a través de la vagina sugiere compromiso de la vejiga con formación de fístula vesicovaginal, también puede presentar síntomas de obstrucción ureteral, hidroureter o hidronefrosis. La invasión del recto se evidencia como estreñimiento e incluso como una fístula rectovaginal con la eliminación de las heces por la vagina (14,52,69).

La infección por VPH no determina el progreso a cáncer, aunque es una condición necesaria. El tipo de VPH, la duración y persistencia de la infección, el estado inmunológico de la paciente y las infecciones concomitantes son factores involucrados en la transformación celular. Normalmente, las células están programadas para reparar los daños del ADN o inducir apoptosis, sin embargo, la oncoproteínas de VPH corrompen este mecanismo de protección e inmortaliza a las células, perpetua su proliferación y crecimiento para instaurar su replicación y propagación a lo largo del epitelio cervical (14,61,69).

Arevalo et al y Bhatla et al coinciden en que el 90% de los casos la infección por VPH no es detectable hasta el cabo de dos años, la mayoría resuelve espontáneamente y solo una pequeña cantidad de casos persisten. El 5% de los casos desarrollará NIC I y II en los 3 años siguientes. Del total de las lesiones de NIC III, el 20% se convertirá en cáncer invasivo al cabo de 5 años y el 40% al cabo de 30 años. Ninguna de las lesiones intraepiteliales progresará a carcinoma invasor en menos de 18 meses (14,64,69,73).

1.1.4.1.6. Diagnóstico

Para realizar el diagnóstico de las lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix se requiere el análisis histopatológico de una biopsia. Sin embargo, el primer acercamiento a las lesiones de cérvix será en la consulta médica donde es importante realizar la historia clínica dirigida para identificar con exactitud los síntomas sugerentes de cáncer, seguido de un examen físico ginecológico minucioso conformado por el examen pélvico, la especuloscopia y la citología vaginal (52).

Un cérvix normal a la inspección no descarta la patología, se debe considerar lesiones microinvasivas o del canal cervical en pacientes con citología sugestiva de invasión. Se continua el estudio con la colposcopia y una biopsia de cono con una escisión de 1,5 cm de profundidad en una sola pieza correspondiente al tipo III (52).

Para la estadificación del cáncer, Cohen et al concuerdan en la asignación del estadio al momento del diagnóstico clínico por encima del quirúrgico para facilitar su acceso en países de bajos recursos. Bhatla et al clasifican las lesiones como microinvasivas e invasivas. Dentro del primer grupo incluye los estadios I y II de la FIGO recomendando el examen microscópico de una muestra de 3-5 mm de profundidad obtenida por LEEP (procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa) o por biopsia cónica con reporte del estado de sus márgenes (positivos o negativos). En caso de presentar lesiones visibles, grandes o con márgenes positivos se catalogarían dentro del estadio IB y sus derivaciones según las características. La evaluación del espacio linfovascular es necesario para la toma de decisiones en cuanto al tratamiento (14,52).

Para las lesiones invasivas se requiere una muestra tomada por punción, biopsia en asa o en cono. Además, para la definir el estadio es imprescindible la evaluación clínica apoyada en los métodos de imagen, entre ellos: ecografía, tomografía, resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones, que permitirán evaluar las características del tumor, los ganglios y metástasis. Es necesario realizar esta evaluación ya que provee datos pronósticos que direccionan el tratamiento y evitan la terapia dual. Su uso en la identificación de ganglios linfáticos metastásicos en controvertida frente al diagnóstico quirúrgico (14).

La resonancia magnética identifica tumores mayores de 10 mm. La tomografía por emisión de positrones es más sensible para identificar ganglios mayores de 10 mm. Se debe evaluar el requerimiento de biopsia o aspiración con aguja fina cuando se

sospeche metástasis tomando en cuenta que VIH también aumenta el tamaño de los ganglios. La presencia de metástasis a este nivel confiere el estadio IIIC (14).

Evaluar recto y vejiga por cistoscopia y sigmoidoscopia en caso de presentar síntomas. En casos de cáncer invasivo evaluar tórax y riñón, este último en busca de hidronefrosis (14).

Para determinar el estadio de la lesión la FIGO en el 2018 presentó una división que toma en cuenta los nódulos linfáticos para guiar las decisiones terapéuticas y la estimación del pronóstico (Tabla 3). Por otro lado, es necesario clasificar histológicamente la lesión de acuerdo a la lista de Tumores de los órganos reproductivos femeninos de la OMS, 2014 y los grados histológicos (Tabla 4)(14,75):

Tabla 3 Estadificación FIGO para el cáncer de cuello uterino

Etapa	Descripción
I	El carcinoma se encuentra estrictamente confinado al cérvix (la extensión al cuerpo uterino debe ignorarse)
IA	El carcinoma invasivo que solamente puede diagnosticarse por microscopía, con una invasión profunda máxima < 5mm ²
IA1	Invasión estromal < 3mm de profundidad
IA2	Invasión estromal ≥ 3mm y < 5mm de profundidad
IB	Carcinoma invasivo con invasión más profunda ≥ 5mm (mayor que el estado IA), lesión limitada al cérvix uterino
IB1	Carcinoma invasivo ≥ 5mm de profundidad de invasión estromal, y < 2 cm en mayor dimensión
IB2	Carcinoma invasivo ≥ 2 cm y < 4cm en mayores dimensiones
IB3	Carcinoma invasivo ≥ 4cm en mayores dimensiones
II	El carcinoma invade más allá del útero, pero no se ha extendido en el tercio inferior de la vagina o en la pared pélvica
IIA	Compromiso limitado a los dos tercios superiores de la vagina sin compromiso parametrial
IIA1	Carcinoma invasivo < 4cm en mayores dimensiones
IIA2	Carcinoma invasivo ≥ 4cm en mayores dimensiones
IIB	Con compromiso parametrial, pero no hasta la pared pélvica
III	El carcinoma involucra el tercio inferior de la vagina y/o se extiende

	hasta la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o insuficiencia renal y/o involucra ganglios linfáticos pélvicos y/o para-aórticos
IIIA	El carcinoma involucra el tercio inferior de la vagina, sin extensión a la pared pélvica
IIIB	Extensión a la pared pélvica y/o hidronefrosis o insuficiencia renal (a menos que se sepa de otra causa)
IIIC	Involucra ganglios linfáticos pélvicos y/o para-aórticos, independientemente del tamaño y extensión del tumor (anotaciones tanto r y p)
IIIC1	Solamente metástasis en los ganglios linfáticos pélvicos
IIIC2	Metástasis en los ganglios linfáticos para-aórticos
IV	El carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis verdadera o ha involucrado (probado por biopsia) la mucosa de la vejiga o recto (globo vesical como tal no permite clasificarlo a la etapa IV)
IVA	Diseminado a órganos conjuntos a la pelvis
IVB	Diseminado a órganos distantes
<p>En caso de duda se debe asignar la estadificación menor</p> <p>^a Imagenología y patología pueden ser usados, cuando se encuentren disponibles, para suplementar los hallazgos clínicos con respecto al tamaño y extensión del tumor, en todos los estados</p> <p>^b La afectación de los espacios vasculares/linfáticos no cambia la estadificación. La extensión lateral de la lesión ya no se considera.</p> <p>^c Agregar una nota radiológica (r) o patológica (p) para indicar los hallazgos que son usados para asignar el caso al estado IIIC. Ejemplo: Si la radiología indica metástasis de nodos linfáticos pélvicos, se debe asignar el estado IIIC1r, y si se confirma por medio de hallazgos patológicos será el estado IIIC1p. El tipo de modalidad radiológica o la técnica de estudio patológico que se use siempre deberá estar documentada.</p>	

Fuente: Bhatla et al, 2018 (14)

Tabla 4 Tumores de los órganos reproductores femeninos

Tumores de los órganos reproductivos femeninos de la OMS, 2014	Grados histológicos
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma de células escamosas (queratinizante; no queratinizante; papilar, basaloide, verrugoso, verrugoso, escamotransicional, similar al linfoepitelioma) • Adenocarcinoma (endocervical; mucinoso, villoglandular, endometriode) • Adenocarcinoma de células claras • Carcinoma seroso • Carcinoma adenoescamoso • Carcinoma de células vítreas • Carcinoma adenoide quístico • Carcinoma adenoide basal • Carcinoma de células pequeñas • Carcinoma indiferenciado 	<p>GX: no se puede evaluar la calificación</p> <p>G1: bien diferenciado</p> <p>G2: moderadamente diferenciado</p> <p>G3: pobre o indiferenciado</p>

Fuente: Kurman et al, OMS, 2014 (75)

1.1.4.1.7. Tratamiento

La decisión del tratamiento se basa en la estadificación clínica de la enfermedad según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (70).

El tratamiento en fases iniciales como IA1 dependerá del deseo de concepción de la paciente. Se aplica la conización del área afectada con evidencia de márgenes negativos o traquelectomía simple si desea preservar la fertilidad o, caso contrario, la histerectomía extrafacial simple. El riesgo de compromiso ganglionar es del 1%, pero si existe afectación se requiere linfadenectomía pélvica (15,52,70).

En el estadio IA2, el riesgo de compromiso ganglionar es del 8%. La histerectomía radical y linfadenectomía pélvica bilateral es el tratamiento estándar. Sin embargo, la disfunción vesical, sexual e intestinal junto a la capacidad de la resonancia para limitar el tumor ha hecho que varios autores consideren la histerectomía simple y linfadenectomía pélvica como el nuevo estándar. También se está considerando la traquelectomía radical con resección completa del cérvix más 2-3 cm de la parte superior de la vagina creando un neocérvix. Esta consideración se basa en el

porcentaje de recurrencia similar entre esta técnica y el tratamiento estándar en presencia de factores de riesgo como lesiones >4 cm, compromiso linfático y análisis histológicos no compatibles con adenocarcinoma ni carcinoma de células escamosas. Para los pacientes que rechazan el procedimiento quirúrgico o que no son aptos se recomienda la radiación pélvica con braquiterapia (15,52,70).

En el estadio IB1, la FIGO indica histerectomía radical tipo III con linfadenectomía pélvica bilateral con o sin muestreo de ganglios paraaórtica. Se menciona el uso de radioterapia primaria, pero no hay evidencia sólida de su eficacia sobre el tratamiento establecido. Esta técnica mencionada como la traquelectomía radical y la linfadenectomía pélvica se usan en pacientes seleccionadas que desean preservar la fertilidad. En el estadio IB2 se aplica la histerectomía radical con linfadenectomía pélvica y paraaórticos seguido de radioterapia adyuvante, pero tiene alta morbilidad a largo plazo. Se mencionan los criterios de Sedlis de riesgo intermedio para recidiva en los estadios IB: diámetro del tumor >4 cm, invasión profunda del estroma cervical y compromiso del espacio linfovascular (15,52).

Para los estadios IIB a IVA dependerá de accesibilidad a radioterapia, el tratamiento quirúrgico no es curativo (52).

La histerectomía radical puede realizarse por laparotomía o laparoscopia estándar siendo esta última la preferida por menor pérdida sanguínea, menores transfusiones, menores episodios febriles e infecciones quirúrgicas. A pesar de estas ventajas en ensayo LACC realizado a 631 mujeres en estadio IA1, IA2 Y IB1 a quienes se le asignó al azar el método quirúrgico por laparoscopia y abierto. La supervivencia libre de enfermedad a los 4,5 años fue de 80,6% para pacientes tratadas con histerectomía por laparoscopia en comparación al 96,5% para las que fueron intervenidas con histerectomía abierta. Las pacientes intervenidas por cirugía abierta presentaron menor recurrencia y mejor supervivencia. Frente a lo cual la ESGO propone a la cirugía abierta como el estándar de oro (15,52).

1.1.4.1.8. Pronóstico

La supervivencia de las pacientes está en función de las características de la patología al momento del diagnóstico tales como: el estadio, el compromiso, número y ubicación de los ganglios linfáticos afectados, la invasión del espacio linfovascular, el tamaño y profundidad del tumor, el compromiso de estroma cervical, el tipo histológico, y las características propias de la paciente (52).

1.1.4.1.9. Prevención

El contacto con el virus en mujeres sexualmente activas es casi inevitable, el 80% de las mujeres habrán tenido, contacto, por lo menos, con un tipo de VPH de alto riesgo en toda su vida. La prevalencia de VPH varía desde 2 – 40% a nivel mundial con un pico de prevalencia del 25% en mujeres de 25 años lo que denota una relación entre el contagio y la vida sexual. El primer paso para la prevención es evitar el contagio de VPH a través de prácticas sexuales seguras como la abstinencia sexual, la monogamia y el uso de métodos anticonceptivos de barrera. Por otro lado, este conocimiento ha dado paso a nuevos puntos de intervención entre ellos el inicio de la vacunación antes del debut sexual, entre los 10 -14 años. La vacunación como método de prevención primaria es la solución para eliminar a VPH de la población (14,52,53).

La vacunación profiláctica tiene como objetivo crear anticuerpos neutralizantes contra VPH para evitar que se instaure la infección a nivel de cérvix. Las vacunas contienen partículas similares a virus (VLP) compuestas por la proteína L1 de la cápside de VPH. Las vacunas no tienen ADN viral por lo que su potencial de infección es nulo. Actualmente, existen 3 vacunas aplicables a hombres y mujeres de VPH de alto riesgo. La vacuna bivalente (VPH2, Cervarix®, desde 2007) cubre VPH 16 y 18, la vacuna tetravalente (VPH4, Gardasil®, desde 2006) cubre VPH 6, 11, 16, 18, la novalente (VPH9, Gardasil 9®, desde 2014) cubre lo anteriores mencionados más 31, 33, 45, 52 y 58 (14,70,76).

Se recomienda un esquema de dos dosis de 0,5 ml para niños entre 9 – 14 años, la segunda dosis posterior a los 5-13 meses desde la primera, caso contrario se deberá administrar una tercera dosis al igual que en los casos de inmunosupresión o mayores de 15 años en los que se aplica la primera dosis, después de 1 mes y a los 6 meses (14,70).

La vacuna novalente confiere una protección contra el cáncer de cérvix del 90% y contra las verrugas genitales al mismo porcentaje. Los programas organizados de vacunación con cobertura extensa han mostrado una reducción de la prevalencia de las lesiones en cérvix y de verrugas genitales por encima del 80%. Varios estudios han realizado el seguimiento hasta 15 años sin encontrar lesiones preinvasivas ni cáncer, mientras la positividad para anticuerpos se encontró hasta 10 años después. Es bien tolerada por hombre y mujeres, las reacciones adversas comprobadas son

anafilaxia y síncope, este último relacionado en la mayoría de los casos con ansiedad o estrés y que se evita con el reposo posterior a la administración de la vacuna. La OMS considera que esta vacuna es extraordinariamente segura (66,76).

A pesar de su eficacia, la vacuna contra VPH sigue estando lejos de realidad de los países en vías de desarrollo por sus altos costos, por lo que la citología se ha convertido en el arma de lucha disminuir la prevalencia del cáncer de cérvix, no obstante, se ha demostrado que la detección de VPH es más eficaz para identificar lesiones premalignas (14,52,53).

El frotis de Papanicolaou es una técnica mundialmente utilizada en el tamizaje de esta patología. Tiene una gran variabilidad en relación a la sensibilidad y especificidad, mostrando valores entre el 11-90% y 14-97%, respectivamente y el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos varía entre 20-40% según los estudios. Un tercio de los falsos negativos es atribuido a los errores de lectura e interpretación de las muestras, los otros dos tercios se deben a deficiencia en la toma de la muestra. La concordancia entre la histología y la citología llega al 75,8% de los casos. Además, el 10% de la mujeres con citologías normales son positivas para VPH, esto crea la necesidad de múltiples pruebas para llegar a un diagnóstico y aumenta los costos sanitarios (14,51,53,64).

Por otro lado, la detección de VPH provee una protección del 60 – 70% contra el cáncer de cérvix invasivo y con compromiso glandular en comparación con la citología. Existen estimaciones de reducción de la incidencia de cáncer de cérvix en un 30% en mujeres entre 25 y 64 años. Las pruebas bioquímicas para VPH permiten el diagnóstico de la infección, la definición del riesgo de las lesiones en función del tipo de virus, la evaluación de la persistencia de la infección, el seguimiento, tamizaje en regiones de bajos recursos y vigilancia epidemiológica. Son métodos reproducibles, con un valor predictivo negativo elevado y alta sensibilidad, ventajas que apoyan su aplicación primaria en el tamizaje de cáncer de cérvix. Sin embargo, no identifica las características de las lesiones por lo que se necesita la citología, regulando su requerimiento a la positividad de la prueba de detección de VPH mientras que un resultado negativo incrementaría los intervalos de tamizaje entre 3 a 5 años, basados en la baja probabilidad de desarrollar cáncer en los siguiente 5 a 10 años. En efecto, una prueba para VPH positiva dará paso a la citología o una segunda prueba para VPH en 6 a 12 meses en busca de la persistencia de la infección. Dos

pruebas VPH positivas o resultados citológicos anormales son indicativos de colposcopia. Esta terapia combinada ha mostrado una sensibilidad del 90% y su negatividad reduce el riesgo de lesiones cervicales precancerosas en los 5 años siguientes (53).

Según datos de Estados Unidos, de los frotis realizados anualmente 3-4% corresponden a LIEBG, 0,6% a LIEAG y 4-6% a ASC-US. Por lo que el primer tamizaje para patología de cérvix se recomienda realizar 3 años posterior al inicio de la actividad sexual y no pasados los 21 años (61).

Se toman en cuentas las recomendaciones de cribado extendidas por el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG), Sociedad Americana del Cáncer (ACS), Sociedad Americana de Patología Clínica (ASCP), la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical (ASCCP), US Preventive Services Task Force (USPSTF) donde mencionan (69):

- Menor de 21 años: No se recomienda el cribado
- 21 a 29 años: Citología cada 3 años
- 30 a 65 años: Detección de VPH y citología cada 5 años (preferido) o solo citología cada 3 años (aceptable)
- 65 años: Si los controles pasados son normales y el riesgo es bajo, no está indicado el cribado (69)

1.1.4.2. BAX y BCL2 en el cáncer de cérvix

1.1.4.2.1. Generalidades

El gen BCL2 fue identificado por primera vez en el linfoma de célula B cuya relación cancerígena estuvo vinculada a t14, translocación del cromosoma 18. Fue el primer oncogén descubierto que inhibía la muerte celular e inducía la proliferación. Actualmente, es reconocido su papel en la regulación de procesos como la apoptosis, necrosis y autofagia. El equilibrio en la apoptosis o muerte celular programada y la proliferación celular permiten la homeostasis de los tejidos. La alteración de este equilibrio trae como consecuencia el desarrollo de procesos cancerígenos, enfermedades autoinmunes y enfermedades degenerativas. Para la ejecución de la apoptosis existe la vía intrínseca o mitocondrial y extrínseca o de receptor de muerte las cuales han sido objeto de investigación. El presente trabajo se concentra en el efecto regulador de las proteínas BAX y BCL2 sobre la vía mitocondrial sustentados

en el hallazgo de alteraciones a nivel de este gen en más de la mitad de procesos cancerígenos humanos (5,6).

1.1.4.2.2. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo de protección que elimina a las células envejecidas, enfermas o dañadas mediante tres procesos: iniciación, regulación y ejecución. La iniciación es desencadenada por un estímulo de estrés celular como daño del ADN, hipoxia celular, privación de nutrientes, entre otros, que desencadena la vía intrínseca o extrínseca. La regulación está dada por la combinación de señales que deciden el destino de la célula y la fase de ejecución es llevada a cabo por las caspasas que escinden proteínas celulares cruciales en el ciclo celular (6,7).

La vía extrínseca requiere la participación de los factores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) entre ellos ligando Fas (FasL), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL). Estos factores son sintetizados como proteínas de membrana tipo II requiriendo de su escisión para desprenderse y activarse. TNF- α es escindido por ADAM17, una desintegrina y metaloproteasa o por TACE, enzima convertidora de TNF- α , mientras que FasL es escindido por ADAM10. Estas proteínas tienen receptores de muerte específicos que pertenecen a la familia de receptores TNF entre ellos: TNF 1 (TNF-R1), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) y en el caso de FasL, su receptor es conocido como Fas, APO-1 O CD95. Estos receptores con proteínas de membrana tipo I cuya región citoplasmática contienen dominio de muerte a través del cual Fas recluta a FADD (proteína de dominio de muerte asociada a Fas), procaspasa 8 y c-FLIP (proteína celular inhibidora FLICE/caspasa 8; FLICE significa ICE similar a FADD), estos factores se unen entre sí a través de sus dominios de muerte y dominios efectores de muerte y forman el complejo DISC o complejo de señalización inductora de muerte mediante importante para la activación de la caspasa 8. Esta última puede activar la procaspasa 3 o inducir la vía mitocondrial con

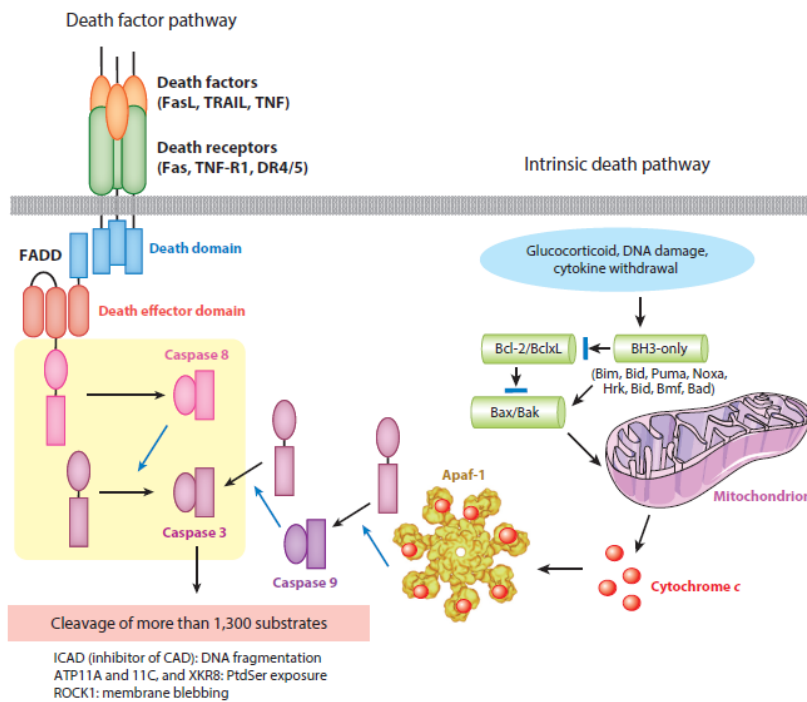
la activación de BH3 sola y BID escindido (tBID) que liberan el citocromo c para impulsar la vía caspasa 9-caspasa 3. Esta última se encuentra al final de la cascada de proteólisis y es activada en las dos vías apoptóticas (Figura 1) (77).

Figura 1 Apoptosis

Fuente:

al,

Nagata et
(2018) (77)



1.1.4.2.3. BAX y BCL2

El destino de la célula en la vía intrínseca de la apoptosis está regulado por la interacción de señales antiapoptóticas y proapoptóticas de las proteínas del linfoma antiapoptótico de células B2 las cuales comparten dominios de homología BCL2 (BH 1-4) que definen su división en tres grupos funcionales. Las proteínas antiapoptóticas son BCL2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, BFL-1, y presentan los cuatro dominios de homología de BCL2. Las proteínas proapoptóticas son BAX, BAK, BOK, también conocidas como proteínas multidominio debido a que contienen los dominios de homología de BCL2 del 1 al 3. Las proteínas BH3 individuales son BID, BIM, BAD, PUMA, NOXA, BIK, BMF, HRK, BNIP3, y solo comparten el tercer dominio BH con las otras proteínas de la familia BCL-2 (6,7).

En el contexto de un estímulo nocivo, las proteínas BH3 proapoptóticas son la primera línea de acción mediante procesos de regulación transcripcional. BH3 regulan la interacción proteína-proteína entre los miembros de esta familia, es así como, se denominan sensibilizadoras cuando interactúan con proteínas antiapoptóticas para inhibirlas y activar indirectamente BAX/BAK; y se denominan activadoras cuando interactúan con proteínas multidominio como BAX y BAK para estimular su función apoptótica. PUMA (modulador de apoptosis regulado por p53), NOXA (proteína inducida por forbol-12-miristato-13-acetato), también conocida como PMAIP1 y BAD, promotor de muerte asociado con Bcl-2, son proteínas sensibilizadoras que tienen la capacidad de unirse competitivamente en vez de las proteínas proapoptóticas evitando su secuestro por las antiapoptóticas permitiendo la apoptosis. Mientras que BIM, proteína similar a BCL2 11, y BID, agonista de muerte del dominio de interacción BH3 son proteínas activadoras (5,19,78).

Los estímulos nocivos desencadenan la respuesta de BH3 y, por consiguiente, la activación de la proteína X asociada a BCL2 conocida como BAX, o del antagonista/asesino de BCL2 conocida como BAK. BAK se encuentra unido a la membrana mitocondrial mientras que BAX se transloca desde el citosol hasta la membrana mitocondrial externa. BAX se activa mediante un cambio conformacional con exposición de su N-terminal como marcador de estabilización propio, que se inserta en la membrana mitocondrial externa y forma oligómeros para dar paso a la permeabilización mediante la formación de poros a través de sus hélices alfa 5 y 6. Este proceso es seguido de la liberación de moléculas proapoptóticas tales como el

citocromo c y el segundo activador de caspasa derivado de mitocondrias (Smac) al citoplasma celular. El citocromo c se combina con APAF-2 y caspasa 9 para formar el apoptosoma, compuesto que activa a la caspasa 3 desencadenando la proteólisis generalizada de más de 1300 proteínas en 1700 sitios distintos y los cambios morfológicos de la apoptosis como la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, encogimiento celular, formación de ampollas en la membrana, exposición de fosfatidilserina (PtdSer) en la membrana celular externa, muerte celular y el aclaramiento de la célula apoptóticas por células de sistema reticuloendotelial (5,6,8,19,77–79).

Al otro extremo se encuentran las proteínas antiapoptóticas: BCL2, Bcl-XL (Bcl2-like 1/ linfoma de células B extragrande), Bcl-w (Bcl2-like 2/ proteína 2 similar a Bcl2), Bfl-1 (proteína A1 relacionado con Bcl2), Mcl-1 (leucemia de células mieloides -1). Estas proteínas secuestran o inactivan a BH3 o BAX y BAK y evitan la muerte de la célula creando una dependencia de BCL2 para su supervivencia (5,8,78).

El desequilibrio entre las proteínas de la familia BCL2 lleva a cargo una serie de alteraciones. La expresión elevada de BCL2 condiciona la resistencia a la apoptosis al inhibir la relocalización mitocondrial de BAX, su inserción en la membrana y la liberación de citocromo c, no obstante, las concentraciones de esta proteína están por encima de las concentraciones apoptóticas normales lo que sugiere un potencial proapoptótico latente de BCL2 denominando a estas células como “preparadas para la muerte”. Este efecto se puede evidenciar claramente en las células linfocíticas también conocidas como células BCL2 debido a la capacidad de esta proteína para inducir linfomas (8).

1.1.4.2.4. Mecanismos patogénicos de VPH asociados a la expresión de BAX y BCL2

Los patrones de expresión de las proteínas apoptóticas son diferentes en cada tipo de tumor por lo que es necesario determinar que proteínas actúan en su supervivencia. Se ha identificado que las células cancerígenas evaden las señales citotóxicas al promover la acción de las proteínas antiapoptóticas. En el caso de las células cancerígenas de cérvix varios estudios han identificado que la expresión de BCL2, proteína antiapoptótica, es elevada y se relaciona con el estadio del tumor. Por tanto,

es probable que esta proteína esté involucrada en la inmortalización celular por mecanismos que aún no son claros (80)

Las oncoproteínas de VPH actúan a nivel del genoma y alteran la respuesta celular a este estímulo nocivo que en condiciones normales desencadenaría la eliminación de la célula. Es evidente la acción de E6 en la desintegración de la proteína supresora tumoral p53 y en consecuencia la sobreexpresión de BCL2 permitiendo que predomine su efecto antiapoptótico sobre las señales apoptóticas normales. Además, se ha definido la asociación de E6 con BAK y BAX, principales proteínas proapoptóticas en la vía intrínseca. Utilizando la interferencia de ARN (ARNi), Vogt et al, mostraron que la inhibición de BAX inducida por E6 atraviesa la vía p53 y PUMA. Estas características sientan la base de la relación entre VPH y los miembros de la familia BCL2 (13,21,81,82).

1.2.Objetivos

1.2.1. General

Analizar la expresión de las proteínas BAX y BCL2 en lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix.

1.2.2. Específico

1.2.2.1.Determinar la expresión de las proteínas BAX y BCL2 in situ en tejidos de pacientes con lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix y controles.

1.2.2.2.Describir el comportamiento de la expresión de las proteínas BAX y BCL2 en sangre total de pacientes con lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix.

1.2.2.3.Correlacionar los hallazgos histopatológicos y la infección por VPH con la expresión de proteínas BAX y BCL2 en pacientes con lesiones de cérvix.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Recursos humanos:

- Tutora del proyecto: Dra. Yenddy Carrero PhD
- Tesista
- Red de estudiantes investigadores de la Universidad Técnica de Ambato.

2.1.2 Recursos materiales

- Instalaciones: Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica de Ambato (Campus Querochaca).
- Línea celular: HeLa ATCC® CCL-2™
- Soluciones
 - Alcohol etílico al 70%
 - Acetona
 - Agua destilada
 - Solución ARNasa 1 y 2
 - 2-mercaptoetanol
 - Etanol 70%
 - Etanol al 96-100%
 - Trypsin-EDTA 0.05%, phenol red (Gibco™)
 - PBS - Phosphate-Buffered Saline (Gibco™)
 - Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100X) (Gibco™)
 - Fetal Bovine Serum (Gibco™)
 - L-Glutamine (200 mM) (Gibco™)
- Reactivos
 - Anticuerpo monoclonal primario correspondiente a BAX y BCL2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
 - Anticuerpo secundario de unión a IgG kappa de ratón marcado con ficoeritrina (m-IgGκ BP-PE Santa Cruz Biotechnology, Inc.) para BCL2 y IgG kappa de ratón marcado con Alexa 488 (m-IgGκ BP-A488 Santa Cruz Biotechnology, Inc.).
 - Pure Link™ Total RNA Kit (Thermo Fisher Scientific).
 - qPCR Master Mix (GoTaq®)

- Primers para BAX, BCL2, GADPH, actina y p53
- Materiales de laboratorio
 - Papel aluminio
 - Tissue Teck
 - Servilletas
 - Pipetas
 - Pipetas de volumen variable de canal único
 - Puntas
 - Frascas para cultivo
 - Vasos de precipitación
 - Eppendorf 1,5 ml
 - Tubos con fondo cónico de 50ml y 15ml
 - Cubre y portaobjetos
- Equipos
 - Refrigeradora
 - Congelador
 - Autoclave
 - Cámara de cultivo celular
 - Incubadora
 - Baño maría digital
 - Microscopio
 - Centrífugas
 - Vortex
 - Microscopio de fluorescencia
 - Criostato
 - Pipeteador
 - Sonicador
 - PCR en tiempo real (qPCR)

2.1.3 Recursos financieros

El presente proyecto de investigación forma parte del proyecto titulado **“ESTUDIO ETNOBOTÁNICO Y BIOENSAYOS DE PLANTAS MEDICINALES RELACIONADAS CON EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE CERVIX EN LA CIUDAD DE AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA, ECUADOR”**.

Con resolución 0904-CU-P-2018.- Financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Técnica de Ambato (DIDE).

2.2 Métodos

2.2.1 Nivel y tipo de investigación

Se propone un estudio no experimental al plantear la identificación del patrón de las proteínas apoptóticas BAX y BCL2 en lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix, es decir, no se manipulan ni modifican las variables, como menciona Hernández et al, se observan la actuación de los fenómenos en el contexto natural. Además, tomando en cuenta que se pretende determinar la relación entre las variables antes mencionadas en muestras citológicas y biopsias recolectadas en un solo momento, el diseño apropiado para esta investigación sería el transversal o transeccional (83)

Por otro lado, se clasifica como correlacional debido a que se plantea la hipótesis sobre la utilidad de pronóstica de BAX y BCL2 en las lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix para lo cual se establece una relación no causal entre las variables (83).

A pesar de no incluirse en este estudio, se requiere el seguimiento de las pacientes para determinar la relación entre la expresión de las proteínas apoptóticas y la progresión o regresión de las lesiones de cérvix, lo que confiere al estudio la denominación de prospectivo. Sin embargo, estos datos podrán ser recolectados en una segunda etapa de esta investigación (84).

2.2.2 Descripción de metodología

2.2.3 Selección de la población

Se seleccionó una población conformada por 157 pacientes que acudieron a consulta ginecológica en SOLCA– Unidad Oncológica Tungurahua, durante el período 2016 - 2018 y se incluyó en el estudio una muestra conformada por 87 pacientes con PAPTEST sugestivos de lesión, de las cuales se tomó biopsia a 35 pacientes, las cuales reposaban en el banco de muestras del Laboratorio de Biología Molecular y celular. Así mismo se realizaron jornadas una vez confirmado el diagnóstico histopatológico para la toma de muestra sanguínea de las pacientes.

2.2.3.1 Criterios de inclusión

- a. Mujeres fértiles mayores de 18 años.
- b. Vida sexual activa.

- c. Resultados de colposcopia alterados con diagnóstico histológico de lesión intraepitelial de cérvix.
- d. Sin distinguir raza o paridad

2.2.3.2 Criterios de exclusión

- a. Gestantes
- b. Infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
- c. Patología genital infecciosa y en tratamiento.
- d. Infección previa por VPH tratada o en tratamiento.
- e. Uso de anticonceptivos hormonales.
- f. Antecedentes de patología cardiaca, renal, hepáticas, respiratorias o enfermedades autoinmunes.

2.2.3.3 Criterios de bioética

A las pacientes seleccionadas aceptaron su participación en la investigación mediante en el consentimiento informado para permitir el acceso a sus datos clínicos y a los resultados de colposcopia, anatomía patológica y citología.

Con el fin de asegurar los principios bioéticos de la presente investigación se tomaron en cuenta los reglamento establecidos por la Asociación Médica Mundial (AMM) basados en la promulgación de los principios éticos la Declaración de Helsinki investigación médica en seres humanos, así mismo el Comité de Bioética aprobado por el Ministerio de Salud del Ecuador.

2.2.4 Historia clínica

Se realizó una historia clínica en la cual se recogieron datos sociodemográficos, antecedentes personales, familiares, y datos clínicos de cada una de las pacientes incluidas en el estudio, además de la firma de un consentimiento informado para participar en la investigación (Anexos).

2.2.5 Examen físico ginecológico

El examen físico ginecológico fue realizado por un médico especialista y estuvo conformado por la inspección de la región genital externa (vulva, vagina, región perianal) y la especuloscopia para valoración del cuello uterino (85).

2.2.6 Procedimientos

2.2.6.1 Toma de muestra de Papanicolao (PAP)

Es un procedimiento que permite identificar anormalidades celulares a nivel del endocervix y exocervix cuyas muestras son obtenidas a través de una espátula y

cepillo para ser observadas al microscopio y determinar cambios morfológicos en dichas células.

Para este estudio se utilizó la citología en fase líquida donde se introduce el espéculo permitiendo la suspensión de las células lo que aumenta la calidad de la muestra y permite usarla en otros test (85).

2.2.6.2 Colposcopia

La colposcopia se realizó a las pacientes con hallazgos sospechosos de atipia celular a la especuloscopia. Se utilizó ácido acético y lugol visualizándose lesiones preinvasivas de cérvix de las cuales se tomaron dos biopsias, una fue enviada al laboratorio de anatomía patológica para realizar el diagnóstico histológico y la otra muestra se aplicó inmunohistoquímica para la determinación de las proteínas apoptóticas BAX y BCL2.

2.2.7 Procesamiento de muestras

2.2.7.1 Inmunocitoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica de tinción basada en un anticuerpo dirigido (primario) que detectan un antígeno específico seguido del contacto directo con un anticuerpo secundario mediante un complejo enzimático y un sustrato cromógeno que se hará visible cuando esté presente el antígeno (86).

En este estudio se tomó biopsias de lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix que fueron incluidas dentro del componente OCT Tissue Teck en conos de papel aluminio para ser congelados a -70 grados centígrados. Posteriormente, del bloque contenedor de biopsia se obtuvieron cortes de 4 um en el criostato Thermo, los cuales fueron colocados en un portaobjetos y posteriormente fijados con acetona fría durante 5 minutos, se lavó con Buffer fosfato salino pH 7.2 (PBS) durante 2 minutos y se dejó secar. Se diluyó el anticuerpo primario (BAX y BCL2) de Santa Cruz Biotechnology en relación 1:500, tanto para BAX, como para BCL2 se agregaron a los cortes 100 ul del anticuerpo primario diluido en cámara húmeda, se dejó incubar durante 1 hora a 37°C en agitación y se lavaron con PBS por 3 ocasiones. Seguidamente se agregó el anticuerpo secundario (Anticuerpo secundario de unión a IgG kappa de ratón marcado con ficoeritrina para BCL2 y IgG kappa de ratón marcado con Alexa 488 de Santa Cruz Biotechnology, se realizaron 3 lavados con PBS. Todo este procedimiento se realizó con protección de luz y se dejó secar por 24 horas. Finalmente se aplicó 1 gota de Aqueous Mounting médium (UltraCruz®

Aqueous Mounting Medium with DAPI) y se observó al microscopio de fluorescencia (LEICA Invertido Dmi8) con una magnificación de 630 X, se diferenció el epitelio del estroma cervical y se emplearon los filtros GPF y Texa Red mediante el software LASX. Se empleó un control negativo representado por un anticuerpo monoclonal del mismo isotipo contra un antígeno no relevante en el tejido a estudiar en lugar del anticuerpo primario. Así mismo se incluyeron células HeLa (células de cáncer de cuello uterino) las cuales sirvieron de control positivo de malignidad.

2.2.8 Cultivo celular

2.2.8.1 Descongelación celular

Se extrajeron los crioviales de la resuspensión de células HeLa (ATCC®CCL-2™) en medio de cultivo DMEN y DMSO al 10 % en FBS almacenados en nitrógeno líquido para ser resuspendidas con 1 ml de medio de cultivo DMEN a 37°C y pasar su contenido a un tubo estéril de 15 ml de capacidad con 5 ml de medio de cultivo. Se centrifugó a 3500 revoluciones por minuto durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en 1 ml de medio de cultivo y se pasó este contenido a una frasca completando a 10 ml de medio de cultivo. Posteriormente, se incubó a 37°C con CO₂ al 5% con atmósfera húmeda.

2.2.8.2 Pase de células

Para continuar con el cultivo celular es necesario que la frasca de células presente una confluencia del 90 – 100%. Se preparó la cámara para cultivo celular con la activación de la luz ultravioleta por 10 – 15 minutos, se limpió con alcohol al 70% y papel toalla, previo uso de medidas de bioseguridad (mandil, guantes, mascarilla, gorro, zapatones).

Se eliminó el medio de cultivo con restos del metabolismo celular, se realizó 1 lavado con 5 ml de PBS, se aplicó 3 – 5 ml de tripsina para despegar las células de la frasca y se dejó reposar en la incubadora por 1-4 minutos para evitar la lisis celular. Se aplicó la misma cantidad de tripsina en medio de cultivo, se pipeteó varias veces hasta observar las células suspendidas en el medio celular y se recogió el contenido en un tubo estéril de 50 ml que fue centrifugado a 500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 8 ml de medio de cultivo y se dividió este contenido celular en 2 – 4 frascas que se completaron con medio de cultivo hasta completar 10 – 12 ml. El medio de cultivo para este tipo de células es

DMEM con FBS al 10%, Penicilina 100 U/ml, estreptomicina 10 ug/ml al 1% y L-glutamina al 2%.

2.2.8.3 Extracción de ARN

El proceso fue realizado en base a un protocolo de extracción de ARN en tejido con los cálculos necesarios para cantidad de muestra celular de HeLa. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Las células se conservaron a -80°C . Se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron 100 ul de muestra en tubos libres de ARNasa de 1,5 ml mantenidos en hielo. Previamente se preparó el buffer de lisis con 2-mercaptoetanol al 1% añadiendo a cada muestra 303 ul. Se procedió a limpiar el sonicador con solución ARNasa 1 y 2 seguido del procesamiento de las muestras en 3 ciclos de 10 segundos. Posteriormente, se centrifugó las muestras a 12000 gpm durante 2 minutos 30 segundos. Se añadió a las muestras un volumen de etanol al 70% y se vortearon. Menos de 700 ul de muestra fue transferida al cartucho de kit, se centrifugó a 12000 gpm durante 20 segundos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se reinsertó en cartucho en el mismo tubo de recolección. Este paso se repitió 3-4 veces. Seguidamente, se añadió 500 ul de buffer de lavado en el cartucho, se centrifugó a 12000 gpm durante 20 segundos y se reinsertó el cartucho en el mismo tubo de recolección. Este paso se repitió una vez más.

Luego, se centrifugó a 12000 gpm por 1 minuto 30 segundos a temperatura ambiente para secar la membrana del cartucho que contiene el ARN. Se descartó el tubo de recolección colocando el cartucho en un tubo libre de ARNasa de 1,5 ml nuevo y rotulado. Finalmente, se añadió 75 ml de agua libre de ARNasa en el centro del cartucho y se centrifugó a 12000 gpm por 2 minutos 30 segundos a temperatura ambiente. Los tubos contenedores de las muestras de ARN se conservaron a -80°C .

2.2.8.4 Reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real de controles

En primer lugar, se prepararon los primers para BAX, BCL2, GADPH, actina, bajo la relación de 22% y 78% con agua libre de ARNasa, solución que se coloca en tubos esterilizados de 2 ml.

En segundo lugar, se preparó el reactivo para PCR. Se presentan las cantidades requeridas de los reactivos por cada muestra: 0,5 ul de superscript, 12,5 ul de Syber Green, 1 ul del primer forward y 1 ul del primer reverse para un total de 15 ul, empleando 2 ul de muestra de ARN células y completar con agua libre de ARNasa

para llegar a los 25 ul de solución. Para la muestra de control se añade 15 ul de reactivo para PCR y 10 ul de agua libre de ARNasa.

Se colocan los 25 ul de solución por duplicado para cada primer en forward y reverse junto con el control en tirillas para PCR que son finalmente colocadas en el qRTPCR CFX96 de Biorad, para su amplificación y lectura.

2.2.8.5 Análisis de Expresión Génica

Los análisis de los resultados obtenidos se realizaron empleando la cuantificación relativa por el método $\Delta\Delta Ct$, el cual fue descrito por Livak y Schmittgen en 2001. Las fórmulas usadas para los cálculos una vez obtenidos los CT fueron (79):

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{Control endógeno})$$

$$\Delta Ct(\text{Calibrador}) = Ct (\text{gen diana control}) - Ct (\text{Control endógeno})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct(\text{calibrador})$$

2.2.9 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 630X 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 + 1 desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando el promedio de células positivas para BAX y BCL2 (casos vs. controles). Los análisis comparativos se realizaron usando análisis de varianza más post test de Tukey de acuerdo con los grupos analizados. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.

2.2.10 Búsqueda Bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos: Pubmed, Clinical Key, Springer, Scholar Google, Scopus; tomando en mayormente en cuenta artículos publicados a partir del 2010 sobre el tema propuesto.

2.2.11 Hipótesis

Los patrones de expresión de las proteínas apoptóticas BAX y BCL2 son útiles en el pronóstico y el estadio de las lesiones de cérvix.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Análisis de los resultados

3.1.1.1 Expresión de BAX y BCL2 en lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix.

El cáncer de cuello uterino representa un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en Latinoamérica. Ecuador no escapa a esta realidad, siendo el cáncer de cérvix uno de los más prevalentes, después del cáncer de mama. En el estudio se incluyó un universo de 87 pacientes, de las cuales se tomó en consideración como población 35 pacientes que tenían criterios clínicos y diagnósticos para toma de biopsia. De acuerdo con las características clínicas se organizaron en cinco grupos como se muestra en la tabla 1.

Tabla 5 Distribución de frecuencias según el número de casos para cada grupo de estudio

Diagnóstico	N° de casos	%
CONTROL	7	20
NIC I	7	20
NIC II	7	20
NIC III	7	20
Ca in situ	7	20
TOTAL	35	100

Fuente: Autor del proyecto

Este estudio permitió identificar a través de inmunohistoquímica la expresión cualitativa de las proteínas BAX y BCL2 en lesiones de cérvix (Figura 5). Del total de pacientes estudiados (n=35), distribuidos en 7 pacientes para cada diagnóstico. Se presenta la figura 1 donde se evidencia la expresión de BAX en el epitelio y el estroma de lesiones de cérvix. Se obtuvieron valores estadísticamente significativos en lesiones NIC I ($p < 0,01$), II y III ($p < 0,001$) y en cáncer de cérvix ($p < 0,05$) vs control. No se encontró relación entre la progresión de las lesiones, de acuerdo con la expresión de BAX. Es importante señalar un ligero incremento en los tejidos de pacientes con cáncer (figura 2 y 6).

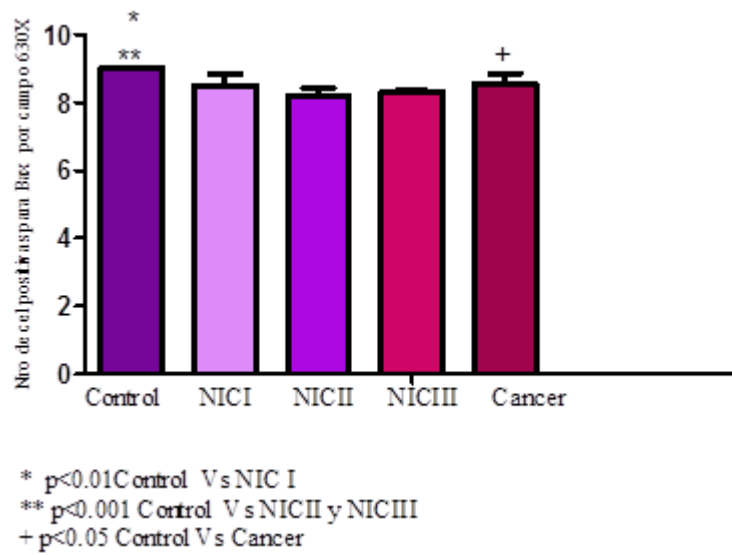
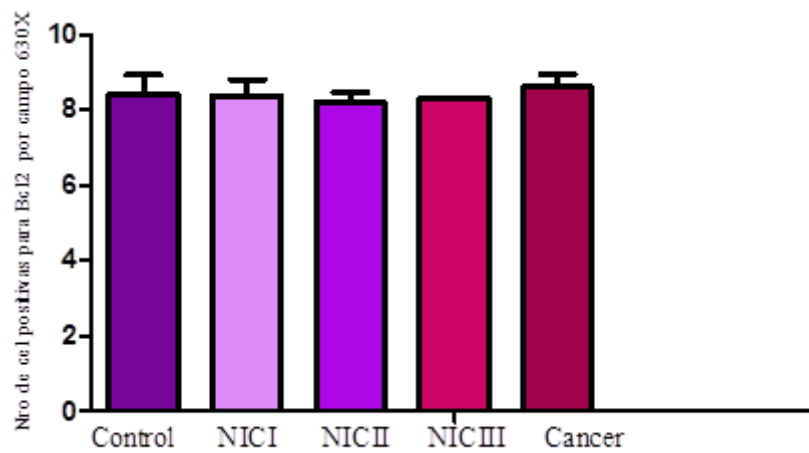


Figura 2 Expresión de BAX según el número de células en lesiones de cérvix.

Al contrario, BCL2 (figura 7) no mostro expresión estadísticamente significativa en relación con los grados de lesiones cervicales vs control, mostrando medias y DS muy



similares con respecto al control como se muestra en la figura 3.

Figura 3 Expresión de BCL2 según el número de células encontradas en lesiones de cérvix.

A continuación, en la tabla 6 se presentan los valores de la expresión de ARN de BAX y BCL2 para células HeLa.

Tabla 6 Expresión de BAX y BCL2 en HeLa por qtPCR

Expresión de BAX y BCL2 en HeLa por qtPCR Control: 0.70	BAX	0.84	0.63
	BCL2	1.8	0.74

Fuente: Autor del proyecto

Tomando en consideración que las células HeLa se corresponde con una línea de células carcinoma de cuello uterino infectadas con VPH 18, se encontró diferencia significativa en cuanto a la expresión de BAX, datos que se correlacionan con la expresión in situ, sin embargo, es importante ampliar los hallazgos, mediante un estudio que permita verificar estos datos en muestras provenientes de pacientes con diferentes grados de lesión y comparar su expresión relativa (Figura 4)

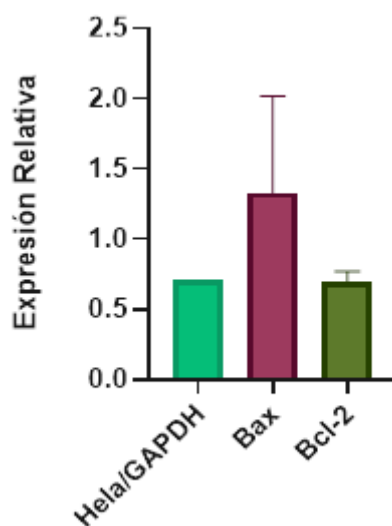


Figura 4 Expresión relativa de Bax y BCL2 en células HeLa

3.1.1.2 Positividad o negatividad para VPH en el total de la población de estudio

Al total de la población estudiada (n= 87), se les realizó diagnóstico molecular de Virus de Papiloma Humano (VPH) como prueba idónea en el cribado y prevención de cáncer de cuello uterino, en virtud que la atención primaria es vital para el diagnóstico oportuno y manejo adecuado de las pacientes, en conjunto con el

Papanicolao y la colposcopia. Es importante resaltar, que el diagnóstico molecular fue objeto de estudio del macroproyecto en el cual se encuentra implícita esta investigación, el mismo se realizó a través de una nested PCR siguiendo la metodología de Sotlar.

Del total de mujeres incluidas en el estudio un 22% resultaron positivas a infección por VPH, siendo los genotipos de alto riesgo 16, 18 y 31 los más prevalentes con una correlación directa con los diagnósticos de LIEAG, en relación con las pacientes diagnosticadas con CaCu in situ (n=7) un 88% presento infección por genotipos de alto grado de VPH; sin embargo, también se encontró genotipo 6/11 considerado de bajo riesgo en pacientes sanas. Es de gran importancia señalar que del total de pacientes incluidas esta investigación (pacientes con biopsia) en las cuales se analizó la expresión de proteínas Bax y BCL2 no se encontró una correlación directa con un aumento o disminución en relación con la positividad a infección por VPH, sin embargo, a estudios futuros se recomienda el incremento de número de pacientes, ya que esto permitiría comprobar a nivel estadístico una posible correlación en la expresión de estas proteínas de la ruta apoptótica y la infección por VPH.

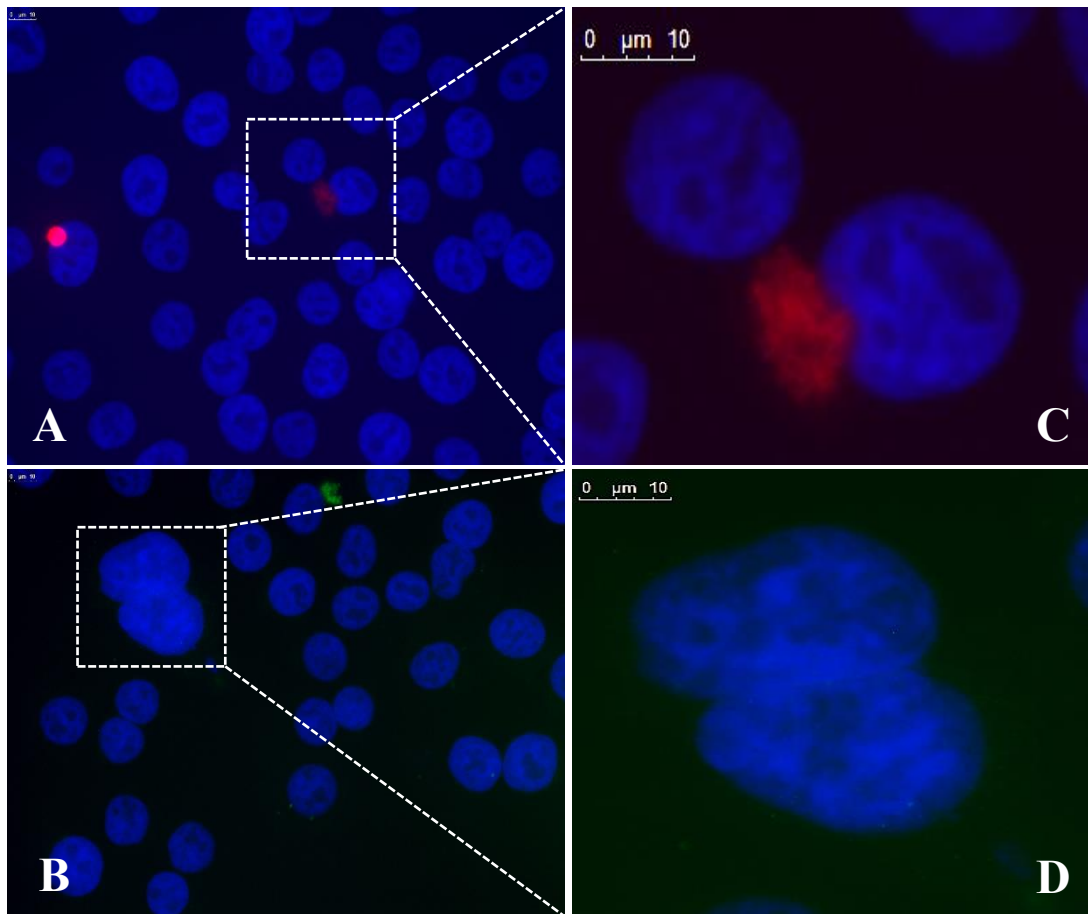


Figura 5 Expresión de la proteína Bax (A Y C) y Bcl2(B y D) en células Hela con magnificación 630X. Las células con expresión de Bax fueron teñidas con el anticuerpo específico para la proteína y el anti-mouse m-IgGk BP marcado con FITC y leído en los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm). Las células con expresión de Bcl-2 fueron teñidas con el anticuerpo específico y anti-mouse m-IgGk BP marcado con PE y leído en los filtros Texa red (595-615 nm) y DAPI (489-513nm).

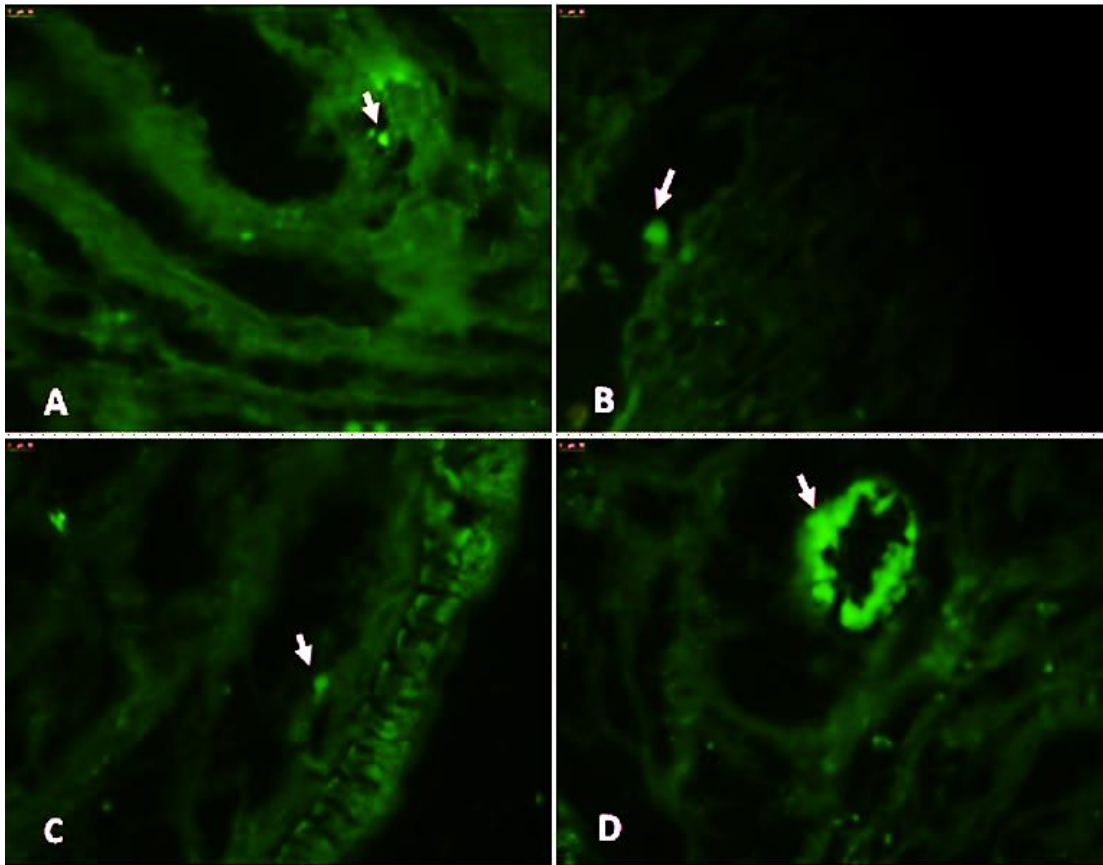


Figura 6 Expresión de Bax en tejido cervical de paciente con diagnóstico de Ca in situ, teñidas con el anticuerpo específico y anti-mouse m-IgGk BP marcado con FIT y leído con GFP (475-509 nm) a una magnificación de 630X. Las flechas en A y B muestran expresión de la proteína, C la delimitación epitelio y estroma y D vaso sanguíneo.

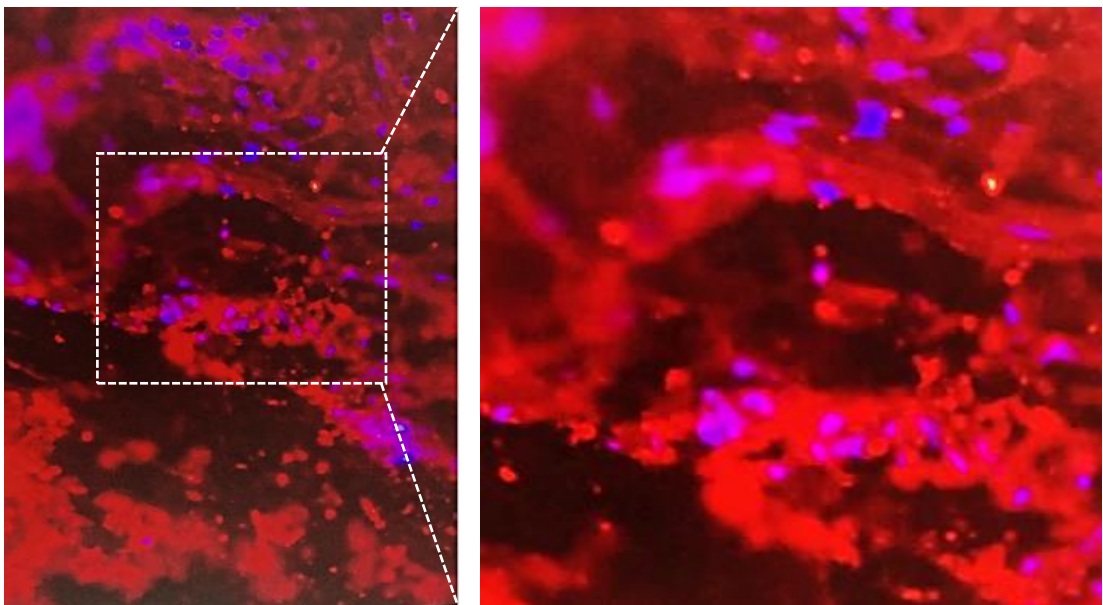


Figura 7 Expresión de Bcl-2 en tejido cervical de paciente con diagnóstico de Ca in situ, teñidas con el anticuerpo específico y anti-mouse m-IgGk BP marcado con PE y leído en los filtros Texa red (595-615 nm) y DAPI (489-513nm) a una magnificación de 630 X

3.1.1.3 Comportamiento de la expresión de las proteínas BAX y BCL2 en sangre total de pacientes con lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix.

3.1.1.3.1 Inmunopatogénesis de VPH asociado al cáncer de cérvix

El potencial antitumoral del sistema inmune se ve comprometido en procesos neoplásicos. La progresión de las lesiones del cérvix está determinada por el predominio de los mecanismos de evasión inmunológica sobre la respuesta inmune, mecanismo que permite la persistencia de la infección. (87–89)

Dentro de los mecanismos de evasión inmunitaria se toma en cuenta el periodo de incubación de VPH de aproximadamente 10 años, que es posible debido a estrategias de evasión inmunológica activas y pasivas. Durante la fase inicial de infección la producción de antígenos es muy baja y una vez producidas estas proteínas se trasladan de inmediato al núcleo celular evadiendo su exposición al sistema inmune. De esta manera, VPH mantiene una infección silenciosa que le permite replicarse. Por otro lado, durante la fase tardía VPH aumenta la producción de proteínas de cápside altamente antigénicas que se expresan en la capa externa de la membrana celular y se desprenden rápidamente por alteraciones en la presentación de antígenos (88,90,91).

Los mecanismos activos de evasión inmunológica son llevados a cabo por las oncoproteínas E6 y E7, las cuales al presentar una gran afinidad por las proteínas inmunitarias de regulación evitan la expresión de genes y la señalización requerida para que los queratinocitos despierten la respuesta inmune. De esta manera, se crea un ambiente inmunodeprimido que predispone la progresión al cáncer (90).

Los queratinocitos componen la primera barrera física de protección contra infecciones y están armados de moléculas de reconocimientos de patógenos, citocinas y quimiocinas que conforman la respuesta inmune de primera línea. Los queratinocitos infectados muestran mecanismos de evasión inmunitaria inducidos por VPH, entre ellos la ausencia de citólisis, la alteración de los mecanismos de expresión de antígenos, la inhibición de la señalización del Interferón I y la secreción de citocinas. Dentro de su función como centinela inmunológico presenta receptores de reconocimiento de patógenos (RRP), entre ellos los receptores tipo Toll (TLR) detectan la infección y son reconocidos por las células dendríticas para desencadenar la vía de adaptador MyD88 y así activar la inmunidad innata representada por

citoquinas y quimiocinas que a su vez inducen la respuesta inmune adaptativa y la regulación de los linfocitos T citotóxicos, Th1 y Th2 (88,90,92).

Los receptores tipo Toll 9 (TLR9) que normalmente desencadenan respuestas inflamatorias al reconocer ADN viral de doble cadena son obligados por E7 de HPV38 a reclutar en su región promotora a EZH2, enzima modificadora de histonas, con el fin de reprimir su transcripción. En el caso de HPV16, E7 recluta a la histona desacetilasa HDAC1 e histona desmetilasa JARID1B que cumplen el mismo propósito. Además, TLR9 actúa en la secreción de citocinas al reconocer el ADN viral citosólico a través del modulador del monofosfato de adenosina (AMP) - monofosfato de guanosina cíclico (GMP) sintasa o cGAS, seguido de la activación de la proteína STING, cuya vía es bloqueada por E7 y en consecuencia bloquea la secreción de citocinas (88,90,91,93).

Una vez reconocido el ADN viral por los RRP requiere la activación del receptor de TNF (TRAF) y la fosforilación del factor de transcripción regulador de interferón (IRF) para iniciar la secreción del interferón de tipo I (IFN I), especialmente IFN α e IFN β , citocinas proinflamatoria. E6 y E7 de HPV 16 se une a IRF y evita la transcripción de IFN I. En la misma vía de señalización, elevan la producción de la enzima ubiquitina hidrolasa carboxi-terminal L1 (UCHL1) que inhibe la activación de TRAF3 (88,90)

Es posible que la expresión elevada de las oncoproteínas virales, E6 y E7, en los queratinocitos infectados permitan su escape de las células T citotóxicas. VPH disminuye la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I) molécula necesaria para la despertar la actividad de las células T citotóxicas. El 30% de los casos de cáncer de cérvix muestra una disminución de la expresión de MHC I a través de varios mecanismos, entre ellos la interacción de E7 con el promotor de esta molécula, es decir, con RXR-beta causa su bloqueo y sustitución con histonas desacetilasas en la región promotora de MHC I. Además, altera el transporte de moléculas para la presentación de antígenos al alterar la vía de señalización de LMP2 y TAP1. E5 también interviene en este proceso al condicionar la baja expresión de CD1d, molécula presentadora de antígenos necesaria para la activación de las células asesinas naturales (NK), así como la baja expresión de sus receptores NKp30, NKp45, NKp46, NKG2D y NKp80 (88,90).

Las células NK son parte de la respuesta inmune innata que reaccionan al MHC I y se alteran en presencia de VPH, quien regula al alza la molécula indolamina 2, 3-dioxigenasa (IDO), enzima que regula negativamente la inmunidad supresora de tumores y que posiblemente es secretada por las células presentadoras de antígenos y células tumorales. Además, las células NK también se ven afectadas por la baja de IL-10 e INF I que disminuye su proliferación y activación (90).

Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígenos que reconocen a partículas de organismos patógenos mediante los receptores Tipo Toll e interactúan a través de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) con las células T para desencadenar la respuesta inmunitaria específica contra el patógeno. La baja expresión de CCR7 causa la disminución de la cantidad de las células dendríticas a nivel del cérvix, fenómeno atribuido a los efectos de E7 sobre la E-cadherina. Además, la falta de madurez de estas células por la secreción de factores inmunosupresores producidos por las células tumorales como IL-10, IL-6, factor de crecimiento transformante (TGF) - β , prostaglandina E2 (PGE2) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), que incluso evitan la diferenciación de monocitos a CD y por tanto evitan la activación de la respuesta inmunitaria adecuada perpetuando la infección por VPH. Estos mecanismos condicionan un número bajo de CD plasmocitoides en sangre periférica, característica que ha demostrado relacionarse con la persistencia de la VPH. Mientras, la expresión baja de CD80 y CD86 en estas células se asocia con grados mayores de las lesiones de cérvix (88,90).

Las células de Langerhans (CL) son presentadoras profesionales de antígenos que predominan en la epidermis de cérvix. Al entrar en contacto con VPH migra hasta los órganos linfoides para activar a las células de la respuesta inmunitaria adaptativa. VPH disminuye la cantidad de estas células a nivel de la zona de transformación del cuello uterino al interferir en la movilización celular, proceso relacionado con la gravedad de la enfermedad. Las oncoproteínas E6 y E7 evitan su migración al inhibir al factor de transcripción de quimiocinas ligando 20 (CCL20), citocina encargada de la quimioatracción de las CL a sitios con inflamación activa. Este mecanismo ha sido relacionado con la capacidad de E6 y E7 para inhibir la señalización de NF- κ B. Por otro lado, se ha identificado que E7 produce la baja expresión de E-cadherina, molécula de adhesión que permite la estancia de las CLs. (88,90).

Los procesos tumorales e inflamatorios despiertan células reguladoras denominadas leucocitos innatos reguladores, entre ellos los macrófagos asociados a tumores (TAM) cuyo fenotipo M2 se ha relacionado con la progresión tumoral y mal pronóstico por tener funciones determinantes dentro de los procesos de proliferación y migración celular, angiogénesis y evasión inmunitaria. Es considerado un punto determinante en la patología de carcinogénesis del cérvix por ser la célula inmunitaria predominante durante las lesiones preinvasivas (88,90).

La plasticidad de los macrófagos los hace susceptibles a factores ambientales. Es así como, los TAM se diferencian a partir de la exposición de los macrófagos derivados de monocitos a factores propios del huésped y factores producidos por las células tumorales como respuesta a los estímulos de VPH. Dentro del primer grupo se encuentran: la quimiocina CCL-2, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), e inmunosupresores como TGF- β , IL-10, IL-6 y PGE2, por otro lado, las citocinas T helper 2 (Th2) como IL-4, IL-10 e IL-13 promueven la diferenciación de TAM (90).

No se conoce con exactitud los mecanismos a través de los cuales TAM contribuye con los efectos de VPH sobre el epitelio del cuello uterino. Sin embargo, se cree que radica en su incapacidad para producir IL-12, factor determinante de la supervivencia, diferenciación y actividad de las células T citotóxicas, células asesinas naturales y células Th1. Por otro lado, secretan factores relacionados el desarrollo de las células Th2 tales como IL-4, IL-10 e IL-13 que trabajan junto a TAM para inhibir a el resto de las células de la respuesta inmunitaria. Además, los TAM actúan en el reclutamiento de las células Treg al expresar la quimiocina CCL2, función apoyada por IL-10 (88,90).

Dentro de los leucocitos innatos reguladores se encuentran las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) que está conformado por granulocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras alteradas para desempeñar funciones inmunosupresoras, de invasión tumoral y angiogénesis por lo que se relacionan a procesos inflamatorio-crónicos y procesos cancerígenos. El tipo de célula predominante está relacionado con el tipo de tumor y su hallazgo en sangre periférica sugiere mal pronóstico. Sus mecanismos patógenos no son claros, no obstante, se sabe que reaccionan al estímulo de factores secretados por células tumorales como GM-CSF, VEGF, TNF- α , PGE2, IL-1 β , IL-6 e IL-10 y como respuesta expresan

arginasa 1 (Arg-1), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), IDO, especies reactivas de oxígeno (ROS) y citocinas inmunosupresoras como TGF- β e IL-10 para inactivar a las células T efectoras, células asesinas naturales e inducir el desarrollo de las células Treg. Además, MDCS aumentan la expresión de PD-L1 para que se una a PD-1 a nivel de las células T efectoras e inhibirlas, la importancia de este mecanismo se comentará más adelante (87,90).

La inmunidad adaptativa se ve ampliamente afectada por la alteración de los mecanismos de presentación de antígenos. En primer lugar, se evita la diferenciación de células T CD8 a células T citotóxicas (CTC), importantes para la destrucción de las células infectadas; se altera la diferenciación de las células T CD4, resultando en células T auxiliares tipo 1 (Th1) defectuosas que no colaboran con la secreción de IFN- γ y IL-2, mientras que las células Th2 secretan factores tumorigénicos. Es decir, disminuye la actividad de las células Th1 y aumenta la respuesta de Th2 para suprimir la inmunidad celular. También se describe la intervención de los Th17 inducidos por IL-17 reclutados en lesiones cervicales, posiblemente por la acción de los fibroblastos asociados a tumores (CAF) (88,90).

Los CAF han sido relacionado con la inmunosupresión local, el crecimiento celular y la metástasis en procesos cancerígenos causados por VPH. En estudios experimentales se ha demostrado que CAF induce la penetración de células neoplásicas en la membrana de Matrigel, homólogo de la matriz de la membrana basal en cultivos celulares, y también hubo un aumento de la secreción del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (87).

Las células Treg o células T reguladoras es un término utilizado para definir a las células T CD4 + / CD25 + / Foxp3 + como inductores de la inmunotolerancia frente a la infección por VPH presentes in situ, en ganglios linfáticos y en sangre. Se cree que su activación se da por células Treg naturales autoreactivas existentes que presentan una reacción cruzada por la similitud entre E7 y la pRb 1 y la proteína complementaria de XP-G (XPGC), o por el reconocimiento de moléculas de daño celular. Por otro lado, las células Treg inducidas se derivan de células T CD4 vírgenes o diferenciadas que responde a la presentación de antígenos de las CD bajo el estímulo de TGF- β , IL-10 e IL-2. Es decir, la alteración de la respuesta inmunitaria y el estado inmunodepresor inducido por VPH promueven la tolerancia de las células Treg y su expansión. La proteína E2 induce la expresión de IL-10 que patrocina el

reclutamiento de las células Treg dando paso acciones directas e indirectas de inmunodepresión. Además, aniquila a las células T efectoras por interacciones Fas-Fas o por secreción de perforina y granzima B, inhiben la maduración de las CD80 y 86 mediante la unión a MHC II y dos moléculas de superficie, LAG-3 y CTLA-4, respectivamente, e inducen la secreción de moléculas IDO. El mecanismo indirecto se da por la expresión de las citocinas IL-10, TGF- β e IL-35 que inactivan las funciones de las células T efectoras, CD y la actividad inflamatoria de las células de inmunidad innata. Además, junto a factor de crecimiento transformante β (TGF- β) determina la progresión de estas lesiones. Es posible que estos mecanismos de inhibición expliquen el fracaso de las células T CD4 y CD8 infiltradas en los tumores en el control la infección (87,88,90).

Los mecanismos anteriormente explicados se presentan en el siguiente gráfico (Figura 3).

3.1.1.3.2 Comportamiento del sistema inmune en sangre periférica en cáncer de cérvix

Los procesos cancerígenos causan cambios inmunológicos locales y sistémicos. En el cáncer de cérvix con infección concomitante por VPH ha mostrado cambiar los patrones inmunológicos sistémicos de los linfocitos, así como de la cantidad de citocinas circulantes. La identificación de las alteraciones en los patrones de respuesta de linfocitos frente a las etapas tempranas del cáncer de cérvix en comparación a las etapas avanzadas permite determinar su papel en la carcinogénesis, así como, su relación con el tipo histológico, estadio clínico y pronóstico (93–97).

Stone et al, mostraron que las lesiones cancerígenas de cérvix VPH positivas muestran aumento de la proliferación de células mieloides en la médula ósea y el bazo, los pacientes con grados avanzados del cáncer muestran leucocitosis de células mieloides como marcador de mal pronóstico, al igual que el ratio neutrófilos/linfocitos que también representa mala respuesta al tratamiento a la quimio y radioterapia. Zhao et al, demostraron que la linfopenia en sangre periférica está vinculada a menor supervivencia sugiriendo la importancia de los linfocitos en los estadios del cáncer. Otras investigaciones en este campo han encontrado que el aumento de los linfocitos B, linfocitos T reguladores, CD4 e IL-10 circulantes predomina en lesiones invasivas de cérvix exponiendo la progresión de la

enfermedad. Estos hechos sugieren un fenotipo supresor de células derivadas de mieloides infiltradas in situ y en órganos linfoides periféricos que inhiben la respuesta inmune de las células T y dan paso a la progresión del cáncer (93–98).

Es previsible que las respuestas inmunes locales sean mayores que en sangre periférica tomando en cuenta que VPH causa una infección localizada en mucosa. Passmore et al comparan el comportamiento de los linfocitos T in situ y en sangre demostrando que la respuesta inmunitaria contra la proteína de cápside L1 presenta un sesgo compartimental en función de la replicación viral in situ y la correlación y/o codependencia entre estas reacciones. Por otro lado, la respuesta inmune de CD4 y CD8 contra E7 fue de magnitud similar in situ y en sangre (96,99).

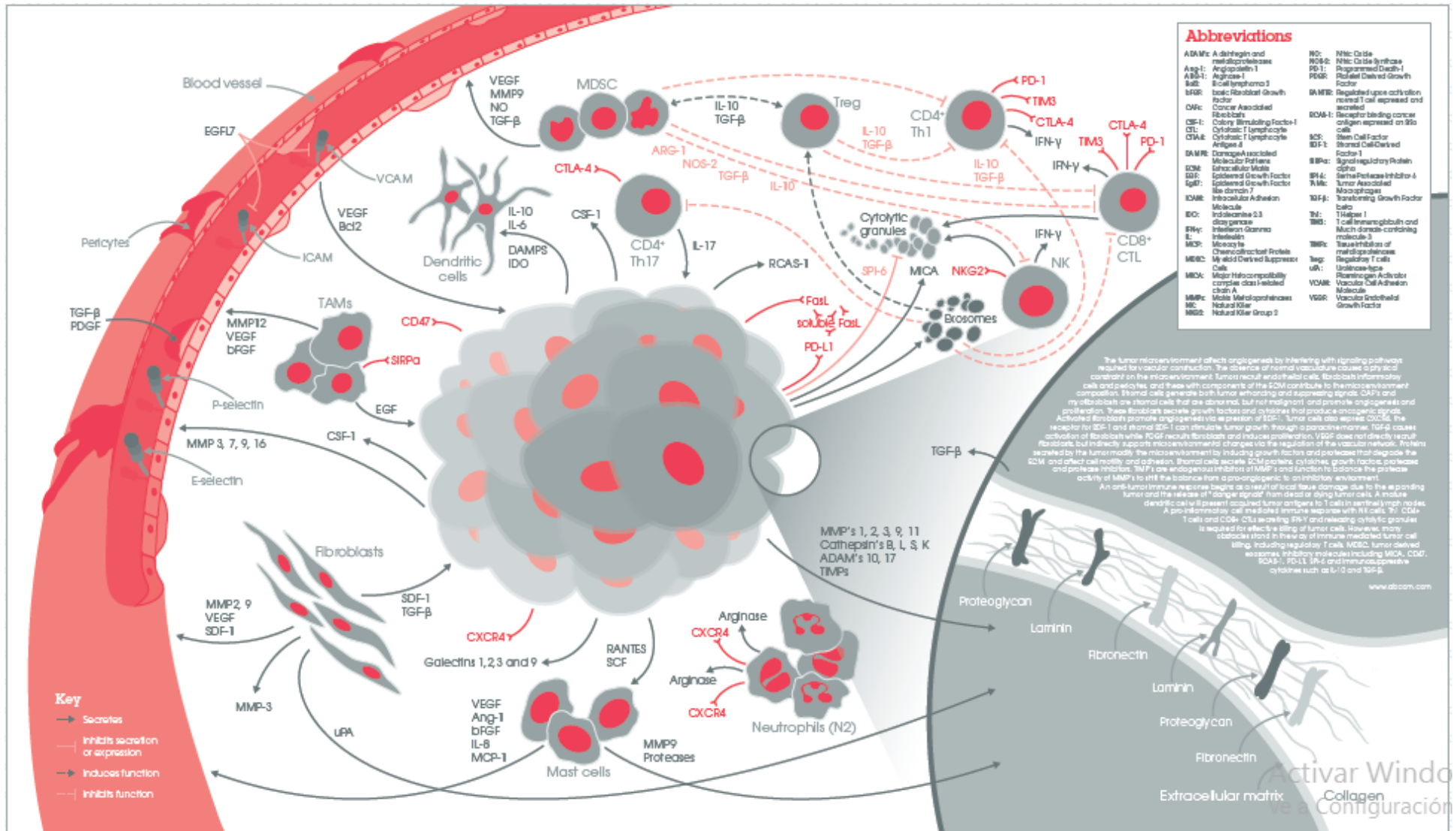


Figura 8 Diafonía entre el microambiente tumoral y el sistema inmunológico

Fuente:

O'Sullivan

et

al,

2017

(100)

Se sabe que VPH modifica las funciones de Th1 y Th2 para favorecer la progresión cancerígena. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que desencadenan estas alteraciones. En otros tipos de cáncer se tiene nociones de la afectación sistémica de procesos tumorales localizados. En el cáncer de cabeza y cuello se ha identificado evidencia de apoptosis en los linfocitos in situ y en sangre periférica lo que sugiere un efecto sistémico inmunosupresor vinculada parcialmente a la vía Fas/FasL cuya magnitud se ha relacionado con la enfermedad avanzada. Aún se desconoce si este efecto es producto del ambiente tumoral o de la muerte celular inducida por activación. (101).

Los cultivos in vitro han demostrado que las células tumorales inducen apoptosis en los linfocitos T de sangre periférica mediante la vía intrínseca y extrínseca. Dentro de la vía intrínseca, se considera la baja expresión de BCL2 relacionado con bajos niveles de linfocitos T y B en sangre periférica apoyados en la importante función de las proteínas de la familia BCL2 en la supervivencia y proliferación en los linfocitos y en células tumorales por lo que se ha considerado su utilidad como biomarcador diagnóstico y pronóstico. Sin embargo, los resultados no son concluyentes (6,89,102).

En apoyo a esta hipótesis, Bin-Alee et al evaluaron la expresión de proteínas apoptóticas de la vía intrínseca en linfocitos circulantes de pacientes con cáncer oral. El fenotipo apoptótico de los linfocitos se encontró mayormente en el estadio IV de la enfermedad, en contraste, su número fue menor, al igual que los linfocitos asesinos naturales. Al contrario, los linfocitos CD4 presentaron un número mayor. En relación a las proteínas apoptóticas se evaluaron BAX y BCL2 cuya magnitud de expresión fue similar para el estadio y tamaño tumoral, y el compromiso de ganglios. Como era de esperarse, la expresión de BAX fue levemente mayor, mientras que la expresión de BCL2 fue levemente menor. Por tanto, los autores concluyen que el cociente de estas proteínas es favorable en la determinación del pronóstico de pacientes con esta patología (103)

Tano et al., al analizar la expresión génica de ARNm de BAX y BCL2 en células inmunitarias circulantes en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello llegaron a establecer la relación entre la mayor supervivencia global y menor cociente de expresión BCL2/BAX tomando en cuenta un punto de corte 2,0, datos que fueron estadísticamente significativos ($p = 0,035$). “Con respecto a la supervivencia libre de

enfermedad (SLE), cuando el nivel de corte se estableció en 1,2, la SLE de los pacientes con cocientes Bcl-2/Bax mayor o igual a 1,2 fue significativamente mayor que la de los pacientes con cocientes Bcl-2/Bax menor de 1,2 ($p = 0,001$). Cuando el nivel de corte se estableció en 2,0, los pacientes con cocientes Bcl-2/Bax $\geq 2,0$ sobrevivieron mucho más tiempo que los pacientes con cocientes Bcl-2/Bax $< 2,0$ ($p = 0,0005$), y todos los pacientes con Bcl-2/Bax $\geq 2,0$ han estado vivas sin enfermedad durante más de 24 meses” (89).

Los hallazgos encontrados en este estudio llevaron a la conclusión de que la expresión de BAX y BCL2 en linfocitos circulantes podría tener utilidad pronóstica. Se encontró que el cociente BCL2/BAX sugiere sugerir riesgos y ventajas pronósticas superiores a la clasificación TNM. Además, estos biomarcadores pueden incluso tener potencial terapéutico en caso que se encuentre citocinas que aumente la relación BCL2/BAX (89).

En contraste, dentro de las posibilidades de la vía extrínseca se incluyen los puntos de control en los que interviene el sistema inmunitario en el ciclo celular, entre ellos: proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), inmunoglobulina de células T y dominio contenedor de mucina 3 (Tim-3), 2B4, receptor de lectina G1 de células asesinas (KLRG-1), TIGIT, atenuador de linfocitos B y T (BTLA) y CD160. La cronicidad de la infección por VPH activa la vía de muerte programada 1 (PD-1) y su ligando PD-L1 y L2 pertenecientes a la familia de las proteínas B7 que se expresan en linfocitos T y B, células dendríticas, macrófagos y células asesinas naturales para promover la inmunotolerancia (88,95,104,105).

Los linfocitos T expresan la PD-1 mientras que uno de los dos ligandos (PD-L1) para esta proteína se expresa en las células presentadoras de antígenos, macrófagos M2 y las células dendríticas que se infiltran en las lesiones invasivas de cérvix. La interacción de estas dos moléculas induce la apoptosis, anergia, agotamiento celular, protección contra la lisis celular, producción aumentada de IL-10 que resulta en la inmunotolerancia de los linfocitos T dando paso a la invasión celular maligna (88,104–107)

3.1.1.4 Discusión de los resultados

El cáncer de cérvix es la segunda causa de muerte a nivel mundial. Es una patología prevenible y curable en estadios tempranos por lo que requiere especial atención en salud pública y medidas de acción eficaces contra su principal causante, el Virus del Papiloma Humano (1).

Los mecanismos resultantes de la interacción de este patógeno y las particularidades del epitelio cervical conducen a la cronicidad de la infección y a cambios silentes en aras de la transformación celular. La relación entre VPH y el entorno local y sistémico no es comprendido en totalidad, especialmente, los mecanismos determinantes en la progresión de las lesiones cervicales, campo en el que las proteínas apoptóticas, BAX y BCL2 han mostrado ser puntos clave y, por tanto, potenciales marcadores pronósticos, no obstante, los estudios son contradictorios (5,6,13,21).

BAX y BCL2 forman parte de la familia de proteínas BCL2 que se encarga de la muerte celular programada por la vía intrínseca como extrínseca. El equilibrio de su expresión decide el destino de la célula y, por tanto, es de esperarse que VPH potencie estas cualidades para perpetuar la vida celular y evadir la apoptosis. Sin embargo, la actuación de BAX y BCL2 en las diferentes fases de las lesiones de cérvix no son previsibles. En el presente estudio, se encontró un aumento de la expresión de BAX en relación con lesiones NIC I, II, III y cáncer, estadísticamente significativo. Este último hallazgo coincide con los encontrados por Mirakhor et al en el 2018 donde BAX se expresó en el 85,4% de lesiones cervicales malignas. En relación a BCL2, al igual que este autor, su expresión no mostró importancia (6,7,43,44,108).

Estos resultados coinciden con los presentados por Shukla et al en 2014, quienes no encontraron relación entre BCL2 y p53, no obstante, determinaron una diferencia en la expresión de BCL2 en relación a lesiones intraepiteliales y el carcinoma de cérvix. Al contrario de lo encontrado en este estudio, Khalissa et al en el 2018 encuentran que la expresión de BCL2 puede ser un marcador en las lesiones de cérvix, así como, Ali et al. en el 2020 encontraron que estas proteínas se expresan específicamente en displasias severas y, por tanto, muestran una asociación estadísticamente significativa con el tipo histológico, el estadio de las lesiones y la presencia de este

virus. Sin embargo, BCL2 mostró mayor relevancia en la asociación con el grado de la lesión_(30,39,40).

La literatura revisada sustenta el papel de BAX y BCL2 en los procesos cancerígenos de cérvix desencadenados por VPH que a través de la oncoproteína E6 degrada a p53 y causa la sobreexpresión de BCL2 para potenciar su efecto antiapoptótico. Por otro lado, inhibe la acción de BAX y evita que desencadene la apoptosis (13,21,81,82).

Estos datos han sido corroborados por varios estudios, entre ellos, el propuesto por Zhang Y. et al en el 2020, donde al demostrar la influencia de la molécula CDS-3078 en el arresto del ciclo celular en G₂/M, encontraron disfunción mitocondrial manifestada en la disminución de la expresión de BCL2 y el aumento de BAK, fenómeno motivado por la activación de p53 y determinante para la apoptosis de células cervicales cancerígenas (HeLa). En paralelo, Wang et al en el 2018, identificaron los efectos anticancerígenos de 1,3,5-triazine en células HeLa efectuados a través del aumento de BAX, C-caspasa-3 y C-caspasa-9, y la disminución de BCL2. Por último, un estudio sobre RECK, un activador de la vía p53 e inhibidor de la migración de células cancerígenas cervicales y su capacidad invasora, fue llevado a cabo por Liu Y. et al, quienes identificaron su influencia en la activación de la p53, la sobreexpresión de BAX y la disminución de BCL2 para acelerar la apoptosis celular y llevar a cabo las funciones antes mencionadas (45–47). Es evidente la acción de BAX y BCL2, no obstante, se requieren más estudios que definan los patrones de expresión en las diferentes etapas de la enfermedad y los factores que alteran su variación. Son proteínas con potencial pronóstico que permitirían prevenir la progresión de lesiones cervicales e incluso, valorar la respuesta al tratamiento y pronóstico del paciente. Estas características han sido identificadas en otros tipos de cáncer y se han obtenido resultados alentadores, como es el caso de las lesiones displásicas de la mucosa oral, donde Muthukumaran et al en el 2019 define la posible intervención de BCL2 en estadios tempranos de la enfermedad. Mientras, Coutinho-Camillo et al plantean el valor pronóstico de estas proteínas. Datos que coinciden con los hallados por Chrysovergis et al, en paciente con carcinoma laríngeo donde la sobreexpresión de BCL2 estuvo relacionada con fenotipos agresivos y mala respuesta a la quimioterapia. Además, en las lesiones hiperplásicas y neoplásicas glandulares de endometrio la expresión de BAX y BCL2 fue identificada den el 77 y 82% de los casos, respectivamente, en un estudio llevado

a cabo por Ahmed et al en el 2020 donde definen la importancia de la expresión asociada entre BAX/BCL2 en la progresión de los procesos tumorigénicos (41–43). Los cambios *in situ* dan paso al interés en los cambios sistémicos resultantes de la interacción entre el proceso cancerígeno de cérvix y la respuesta inmunológica en el contexto de la infección concomitante por VPH. Varios estudios prevén cambios en los patrones inmunológicos sistémicos de los linfocitos cuya explicación contribuiría al entendimiento de la patogenia de VPH y su aplicación en la clínica. Los datos sobre esta relación han sido identificados por Stone et al, quienes mostraron que las lesiones cancerígenas de cérvix VPH positivas muestran aumento de la proliferación de células mieloides en la médula ósea y el bazo en pacientes con grados avanzados del cáncer como marcador de mal pronóstico. Zhao et al, sugieren la importancia de los linfocitos en los estadios del cáncer al demostrar que la linfopenia en sangre periférica está vinculada a menor supervivencia. Otras investigaciones en este campo han encontrado que el aumento de los linfocitos B, linfocitos T reguladores, CD4 e IL-10 circulantes predomina en lesiones invasivas de cérvix alarmando sobre la progresión de la enfermedad (93–98).

Para entender las causas de este fenómeno mencionamos los resultados obtenidos por Passmore et al, quienes al comparar el comportamiento de los linfocitos T *in situ* y en sangre demuestran que la respuesta inmunitaria contra la proteína de cápside L1 presenta un sesgo compartimental en función de la replicación viral *in situ* y la correlación y/o codependencia entre estas reacciones. Este último hecho se apoya en estudios *in vitro* que identificaron mecanismos apoptóticos por vía intrínseca y extrínseca sobre linfocitos circulantes inducidos por células cancerígenas que se evidenciaron en la baja expresión de BCL2 relacionado con bajos niveles de linfocitos T y B en sangre periférica con lo cual consideran a las proteínas de la familia BCL2 útiles en la supervivencia y proliferación en los linfocitos y en células tumorales. Otras investigaciones muestran una relación entre la expresión de BAX y BCL2 y el fenotipo apoptótico de los linfocitos en el estadio IV del cáncer. A partir de lo cual, varios autores lo definen como posible biomarcador diagnóstico y pronóstico. (89,99,102,103,108).

A pesar de que los resultados no son concluyentes y la literatura es limitada en el cáncer de cérvix, lo expuesto anteriormente sugiere un fenotipo supresor de células derivadas de mieloides infiltradas *in situ* y en sangre periféricos que inhiben la

respuesta inmune de las células T y dan paso a la progresión del cáncer probablemente desencadenado por VPH (89,93–99,108).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- La proteína BAX se expresa en lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix *in situ* mostrando valores estadísticamente significativos. La expresión de BCL2 no mostró valores significativos, infiriendo que a futuro podría representar un factor pronóstico.
- BAX y BCL2 son proteínas proapoptóticas cuyos patrones de expresión se alteran *in situ* y en linfocitos de sangre periférica por los efectos supresores apoptóticos inducidos por la interacción con VPH por lo que estas proteínas son consideradas potenciales marcadores diagnósticos y pronósticos.
- Se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de BAX y las lesiones cervicales NIC I, II, III y cáncer al comparar con los controles.
- Es importante establecer diferencias en la expresión *in situ* y sistémica de estas y otras proteínas, a fin de establecer el patrón predictivo de los mecanismos apoptóticos en la evolución del cáncer.

4.2 Recomendaciones

- Elaborar estudios cuantitativos sobre la expresión de BAX y BCL2 en lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix para determinar su utilidad en la progresión de los procesos cancerígenos.
- Realizar estudios sobre la expresión génica por qRT-PCR de BAX y BCL2 en linfocitos de sangre y órganos linfoides periféricos de mujeres con lesiones preinvasivas e invasivas de cérvix para determinar los patrones de expresión y su utilidad en la progresión de los procesos cancerígenos.
- Realizar estudios para determinar los posibles cambios en los patrones de expresión de BAX y BCL2 durante las fases ciclo celular en presencia de VPH *in situ* y en sangre periférica.
- Estudiar los patrones de expresión de BAX y BCL2 en otras líneas celulares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LINKOGRAFÍA

- R. H. Ahmed RAB, A. R. H. Ahmed RAB. Balance of glandular and stromal Bcl2/Bax expression in pre-neoplastic and neoplastic endometrial tissues. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 15 de abril de 2020;41(2):265-72. (43)
- Abdul Rahman SF, Xiang Lian BS, Mohana-Kumaran N. Targeting the B-cell lymphoma 2 anti-apoptotic proteins for cervical cancer treatment. *Future Oncology*. 26 de julio de 2020;16(28):2235-49. (80)
- Ali ET, Mohamed NS, Hassan LA, Shafiq IR, Muneer MS, Mohamed AM, et al. Correlation of P53 and Bcl-2 With the Presence of Hpv-16 in Sudanese Female Patients Diagnosed with Cervical Pre-cancerous and Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. [Internet]. 2020 jul [citado 12 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.researchsquare.com/article/rs-40531/v1> (40)
- Alvarez KLF, Beldi M, Sarmanho F, Rossetti RAM, Silveira CRF, Mota GR, et al. Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils. *Scientific Reports*. 21 de agosto de 2017;7(1):9002. (94)
- Arévalo B. AR, Arévalo Salazar DE, Villarroel Subieta cj. El cáncer de cuello uterino. *Revista Médica La Paz*. 2017;23(2):45-56. (69)
- Armenta Castro ER, Navarro López RA. Participación de los receptores pd-1 y ctla-4 en cáncer cervicouterino. *Alianzas y tendencias -BUAP*. 2018;3(12):15. (105)
- Asih TSN, Lenhart S, Wise S, Aryati L, Adi-Kusumo F, Hardianti MS, et al. The Dynamics of HPV Infection and Cervical Cancer Cells. *Bulletin of Mathematical Biology*. enero de 2016;78(1):4-20. (12)
- Ault KA. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2006; 2006:1-5. (4)
- Ayatollahi H, Sharifi N, Sadeghian MH, Alenabi A, Ghasemian-Moghadam HR. Immunohistochemical Expression of Apoptosis Regulators in Squamous Cell Carcinoma of the Cervix and Their Association with Human Papillomavirus 16/18 Subtypes. *Balkan Med J*. Septiembre de 2014;31(3):202-7. (13)

- Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 17 de julio de 2019 [citado 15 de agosto de 2020];55(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6681523/> (74)
- Barros MR, de Melo CML, Barros MLCMGR, de Cássia Pereira de Lima R, de Freitas AC, Venuti A. Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 5 de julio de 2018;37(1):137. (87)
- Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer*. 15 de junio de 2017;123(12):2219-29. (60)
- Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. octubre de 2018; 143:22-36. (14)
- Bin-Alee F, Arayataweegool A, Buranapraditkun S, Mahattanasakul P, Tangjaturonrasme N, Mutirangura A, et al. Evaluation of lymphocyte apoptosis in patients with oral cancer. *Journal of Applied Oral Science* [Internet]. 2020 [citado 26 de octubre de 2020];28. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1678-77572020000100467&lng=en&nrm=iso&tlng=en (103)
- Bravo LE, Muñoz N. Epidemiology of cancer in Colombia. *Colombia Médica*. 1 de enero de 2018;49(1):9-12. (57)
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424. (54)
- Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*. 15 de febrero de 2009;122(4):437-41. (5)
- Cabrera JAC, Cosmelli MIB. *Manual Obstetricia y Ginecología*. Décima Edición. (2019):652. (85)
- Cheah P-L, Looi L-M. Significance of Bcl-2 and Bax proteins in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study in squamous cell carcinoma and squamous intraepithelial lesions. 2006;5. (36)

- Chelimo C, Wouldes TA, Cameron LD, Elwood JM. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *Journal of Infection*. marzo de 2013;66(3):207-17. (51)
- Chen A, Madu CO, Lu Y. The Functional Role of Bcl-2 Family of Proteins in the Immune System and Cancer. *Oncomedicine*. 2019; 4:17-26. (108)
- Chen AB, Madu CO, Lu Y. The Functional Role of Bcl-2 Family of Proteins in the Immune System and Cancer, 2019. (6)
- Chrysovergis A, Papanikolaou VS, Tsiambas E, Ragos V, Peschos D, Kyrodimos E. Digital Analysis of BCL2 Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 3 de enero de 2019;39(3):1253-7. (42)
- Chung TKH, Cheung TH, Lo WK, Yim SF, Yu MY, Krajewski S, et al. Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. *Cancer Letters*. junio de 2002;180(1):63-8. (35)
- Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *The Lancet*. enero de 2019;393(10167):169-82. (52)
- Crawford RA, Caldwell C, Iles RK, Lowe D, Shepherd JH, Chard T. Prognostic significance of the bcl-2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *British Journal of Cancer*. julio de 1998;78(2):210-4. (32)
- Cruz LKD, Calviño LC, Tabío NII, Lin TH. Factores de riesgo ginecoobstétricos para el cáncer cervicouterino en la atención primaria de salud. *MEDISAN*. 2011;15(5):573-9. (68)
- Cui J, Placzek WJ. Post-Transcriptional Regulation of Anti-Apoptotic BCL2 Family Members. *Int J Mol Sci* [Internet]. 20 de enero de 2018 [citado 7 de octubre de 2020];19(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5796252/> (78)
- De Juan A, Redondo A, Rubio MJ, García Y, Cueva J, Gaba L, et al. SEOM clinical guidelines for cervical cancer (2019). *Clin Transl Oncol*. 1 de febrero de 2020;22(2):270-8. (15)
- Deffar K, Abdelhalim K, Xie X, Ying L, Ouhida S, Mahnane A. Immunohistochemical Expression of p53 and Bcl-2 in Algerian Cervical Carcinoma. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 25 de marzo de 2018;11(1):67-75. (39)

- Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou I, et al. The Possible Role of p53 and bcl-2 Expression in Cervical Carcinomas and Their Premalignant Lesions. *Gynecologic Oncology*. abril de 2000;77(1):129-36. (33)
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. marzo de 2015;25(Suppl 1):2-23. (25)
- Dunyo P, Effah K, Udofia EA. Factors associated with late presentation of cervical cancer cases at a district hospital: a retrospective study. *BMC Public Health* [Internet]. diciembre de 2018 [citado 26 de agosto de 2019];18(1). Disponible en: <https://bmcpublikealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-018-6065-6> (71)
- Feng W, Xiao J, Zhang Z, Rosen DG, Brown RE, Liu J, et al. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. *Modern Pathology*. septiembre de 2007;20(9):961-6. (21)
- García-Tamayo J, Molina J. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. *Investigación Clínica*. 2010;17. (50)
- Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, et al. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Research*. 15 de octubre de 1999;59(20):5356-64. (102)
- Gerardo MCJ, Michelle MC, Eduardo MCÁ, Drusso MC. Marcadores inmunohistoquímicos para virus de papiloma humano. *Revisión sistemática*. 2013;9. (86)
- Gradíssimo A, Burk RD. Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention. *Expert Rev Mol Diagn*. abril de 2017;17(4):379-91. (53)
- Grillot, D A, R Merino, J C Pena, W C Fanslow, F D Finkelman, C B Thompson, y G Nunez. «BCL-x Exhibits Regulated Expression during B Cell Development and Activation and Modulates Lymphocyte Survival in Transgenic Mice. »

- Journal of Experimental Medicine 183, n.o 2 (1 de febrero de 1996): 381-91.
<https://doi.org/10.1084/jem.183.2.381>. (24)
- Guo L, Hua K. Cervical Cancer: Emerging Immune Landscape and Treatment. *OncoTargets and Therapy*. agosto de 2020; Volume 13:8037-47. (95)
 - Gupta SM, Mania-Pramanik J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. *J Biomed Sci* [Internet]. 23 de abril de 2019 [citado 16 de septiembre de 2019];26. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6477741/> (16)
 - Hamivand Z, Haddadi G, Fardid R. Expression of Bax and Bcl2 Genes in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Differentiated Thyroid Cancer. *J Med Phys*. 2018;43(1):41-5. (31)
 - Heeren AM, Punt S, Bleeker MC, Gaarenstroom KN, van der Velden J, Kenter GG, et al. Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Modern Pathology*. julio de 2016;29(7):753-63. (106)
 - Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la investigación. México: McGraw Hill Interamericana; 2014. (83)
 - Hilgendorf KI, Leshchiner ES, Nedelcu S, Maynard MA, Calo E, Ianari A, et al. The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes Dev*. 1 de mayo de 2013;27(9):1003-15. (17)
 - Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 1 de febrero de 2011;11(3):295-306. (61)
 - Jave-Suárez LF, Ratkovich-González S, Olimón V, Aguilar-Lemarrooy A. Modulación de la apoptosis por el virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. :6. (27)
 - Jenkins D. A Brief History of Cervical Cancer. En: *Human Papillomavirus* [Internet]. Elsevier; 2020 [citado 29 de septiembre de 2020]. p. 1-12. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128144572000015> (11)
 - Kashyap N, Krishnan N, Kaur S, Ghai S. Risk Factors of Cervical Cancer: A Case-Control Study. *Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing*. 2019;6(3):308. (59)
 - Katkoori VR, Suarez-Cuervo C, Shanmugam C, Jhala NC, Callens T, Messiaen L, et al. Bax expression is a candidate prognostic and predictive marker of

colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2 de diciembre de 2010;1(2):76-89-89. (29)

- Khodapasand E, Jafarzadeh N, Farrokhi F, Kamalidehghan B, Houshmand M. Is Bax/Bcl-2 Ratio Considered as a Prognostic Marker with Age and Tumor Location in Colorectal Cancer? *Iran Biomed J*. abril de 2015;19(2):69-75. (7)
- Kim EM, Park JK, Hwang S-G, Kim W-J, Liu Z-G, Kang SW, et al. Nuclear and cytoplasmic p53 suppress cell invasion by inhibiting respiratory Complex-I activity via Bcl-2 family proteins. *Oncotarget*. 6 de agosto de 2014;5(18):8452-65. (18)
- Klapsinou E, Argyri E, Panotopoulou E, Daskalopoulou D, Patsouris E, Nonni A, et al. Bax and Bak expression in cervical smears of women with low-and high-risk HPV types: A study of 120 cases. *J Cytol*. 2015;32(4):223-9. (26)
- Kour P, Lal M, Panjaliya R, Dogra V, Gupta S. Study of the Risk Factors Associated with Cervical Cancer. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 25 de marzo de 2015;3(1):179-82. (67)
- Kurman R, Carcangiu M, Herrington C, Young R. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs [Internet]. [citado 6 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Female-Reproductive-Organs-2014> (75)
- Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer*. agosto de 1999;80(12):2008-18. (72)
- Liu M, Jia J, Wang X, Liu Y, Wang C, Fan R. Long non-coding RNA HOTAIR promotes cervical cancer progression through regulating BCL2 via targeting miR-143-3p. *Cancer Biol Ther*. 04 de 2018;19(5):391-9. (49)
- Liu Y, Li L, Liu Y, Geng P, Li G, Yang Y, et al. RECK inhibits cervical cancer cell migration and invasion by promoting p53 signaling pathway. *J Cell Biochem*. 2018;119(4):3058-66. (47)
- Looi ML, Dali AZHM, Siti Aishah MdA, Wan Zurinah WN, Yasmin Anum MY. AQCH Feature Article. AQCH [Internet]. 2008 [citado 12 de octubre de 2020];30(2). Disponible en: <https://www.aqch.com/feature/2008/feature042008.php> (38)

- López ER-. Cáncer cervicouterino relacionado con mortalidad temprana en la zona centro del Ecuador. :9. (58)
- Malave-Saltos JR, Bermello-Sornoza IA, Cárdenas-Saltos KG, Guerrero-Robles CM, Recalde-Rosado JV, Santana-Intriago OL. Factores de riesgo que inciden para la presencia del cáncer cervicouterino. *Dominio de las Ciencias*. 4 de junio de 2019;5(2):363. (65)
- Manterola C, Quiroz G, Salazar P, García N. Metodología de los tipos y diseños de estudio más frecuentemente utilizados en investigación clínica. *Rev Med Clin Condes*. 1 de enero de 2019;30(1):36-49. (84)
- Martinou J-C, Youle RJ. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family Members and Mitochondrial Dynamics. *Dev Cell*. 19 de julio de 2011;21(1):92-101. (19)
- Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, et al. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: A prospective cohort study. *International Journal of Cancer*. 2011;128(12):2898-910. (10)
- Mirakhor Samani S, Ezazi Bojnordi T, Zarghampour M, Merat S, Fouladi DF. Expression of p53, Bcl-2 and Bax in endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia and normal endometrium: a histopathological study. *J Obstet Gynaecol*. octubre de 2018;38(7):999-1004. (44)
- Momenimovahed Z, Salehiniya H. Incidence, mortality and risk factors of cervical cancer in the world. *Biomed Res Ther*. 8 de diciembre de 2017;4(12):1795-811. (66)
- Munakata S, Watanabe O, Ohashi K, Morino H. Expression of Fas Ligand and bcl-2 in Cervical Carcinoma and Their Prognostic Significance. *American Journal of Clinical Pathology*. junio de 2005;123(6):879-85. (37)
- Muthukumaran R, Vezhavendhan N, Vidyalakshmi S, Sivaramakrishnan M, SanthaDevy A, Suganya R. Immunohistochemical Expression of Bcl-2 in Oral Squamous Cell Carcinoma. 2019;4. (41)
- Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*. 2018;36(1):489-517. (77)
- Nehls O, Okech T, Hsieh C-J, Enzinger T, Sarbia M, Borchard F, et al. Studies on p53, BAX and Bcl-2 protein expression and microsatellite instability in stage III (UICC) colon cancer treated by adjuvant chemotherapy: major prognostic

impact of proapoptotic BAX. *Br J Cancer*. 7 de mayo de 2007;96(9):1409-18. (28)

- Nunes RAL, Morale MG, Silva GÁF, Villa LL, Termini L, Nunes RAL, et al. Innate immunity and HPV: friends or foes. *Clinics* [Internet]. 2018 [citado 9 de octubre de 2020];73. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1807-59322018000200328&lng=en&nrm=iso&tlng=en (107)
- O’Sullivan DraJ, Lysaght DraJ, Trinity College Dubling, ABCAM. Cross-talk between tumor microenvironment and the immune system [Internet]. 2017 [citado 9 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://docs.abcam.com/pdf/cancer/tumor-microenvironment-and-the-immune-system.pdf> (100)
- Organización Mundial de la Salud. Cáncer [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2018 [citado 11 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (1)
- Organización Mundial de la Salud. Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2019 [citado 11 de octubre de 2020]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer) (2)
- Ortiz Serrano R, Uribe Pérez CJ, Díaz Martínez LA, Dangond Romero YR. Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 30 de junio de 2004;55(2):146-60. (64)
- Osorio MP, Flores ADR, Mesa AIT. Factores de riesgo en las lesiones intraepiteliales del cuello uterino. *Revista Finlay*. 19 de diciembre de 2019;9(4):291-305-305. (63)
- Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions. *Human Pathology*. julio de 2011;42(7):1007-12. (9)
- Passmore J-AS, Milner M, Denny L, Sampson C, Marais DJ, Allan B, et al. Comparison of cervical and blood T-cell responses to human papillomavirus-16 in women with human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasia. *Immunology*. 1 de diciembre de 2006;119(4):507-14. (99)

- Peinador M, Castellanos L, Jiménez A. Infección por virus del Papiloma Humano (VPH). Vacunas profilácticas. Indicaciones. AEPAP. :20. (76)
- Pujani M, Shukla S, Dass J. p53 and bcl2 expression in malignant and premalignant lesions of uterine cervix and their correlation with human papilloma virus 16 and 18. South Asian Journal of Cancer. 2014;3(1):48. (30)
- Quiala IR, Drangue DJV, Torriente KR, Chacón RP, Cruz NRD la. Estrategia de intervención en féminas para la prevención de cáncer cervicouterino. Revista Información Científica. 2015;90(2):229-38. (22)
- Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. Clin Cancer Res. octubre de 2002;8(10):3137-45. (101)
- Rincón OL, Pareja LR, Jaramillo S, Aristizábal BH. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2007;58(3):202-12. (92)
- Rincón, Olga L., Luis René Pareja, Sergio Jaramillo, y Beatriz H. Aristizábal. «Human papillomavirus, immune response and cervical cancer: a complex relationship». Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología 58, n.o 3 (septiembre de 2007): 202-12. (23)
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians. enero de 2020;70(1):7-30. (55)
- Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. Cancer. 2017;123(13):2404-12. (70)
- Smola S. Immunopathogenesis of HPV-Associated Cancers and Prospects for Immunotherapy. Viruses. 12 de septiembre de 2017;9(9):254. (91)
- Solca matriz. Registro de tumores, mortalidad por cáncer de cérvix en guayaquil. Período 2009-2018 [Internet]. 2019 [citado 4 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/publicaciones2.jsp?tipo=2> (56)
- Song D, Li H, Li H, Dai J. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer (Review). Oncology Letters. 1 de agosto de 2015;10(2):600-6. (88)

- Stone SC, Rossetti RAM, Lima AM, Lepique AP. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2014;2(2):63-75. (93)
- Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Koido S, et al. Prognostic Impact of Expression of Bcl-2 and Bax Genes in Circulating Immune Cells Derived from Patients with Head and Neck Carcinoma. *Neoplasia*. marzo de 2013;15(3):305-IN35. (89)
- Teijido O, Dejean L. Upregulation of Bcl2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria. *FEBS Letters*. 4 de agosto de 2010;584(15):3305-10. (8)
- The World Health Organization's work to eliminate cervical cancer. [Internet]. [citado 19 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/cancer/cervical-cancer> (3)
- Tjalma WA, Weyler JJ, Bogers JJ, Pollefliet C, Baay M, Goovaerts GC, et al. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. agosto de 2001;97(2):223-30. (34)
- Vogt M, Butz K, Dymalla S, Semzow J, Hoppe-Seyler F. Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene*. julio de 2006;25(29):4009-15. (81)
- Wang X, Yi Y, Lv Q, Zhang J, Wu K, Wu W, et al. Novel 1,3,5-triazine derivatives exert potent anti-cervical cancer effects by modulating Bax, Bcl2 and Caspases expression. *Chemical Biology & Drug Design*. marzo de 2018;91(3):728-34. (46)
- Wootipoom V, Lekhyananda N, Phungrassami T, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. Prognostic significance of Bax, Bcl-2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecologic Oncology*. 1 de septiembre de 2004;94(3):636-42. (82)
- Wu J, Yang W, Wu X. Measurement of CD4~+ CD25~(high)CD127~(low) regulatory T cells in peripheral blood from cervical cancers and precursors-- 《China Oncology》 2013年03期. CNKI [Internet]. 2013 [citado 26 de octubre de

2020]; Disponible en: https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTTotal-ZGAZ201303004.htm (97)

- Wu Y, Ye S, Goswami S, Pei X, Xiang L, Zhang X, et al. Clinical significance of peripheral blood and tumor tissue lymphocyte subsets in cervical cancer patients. *BMC Cancer* [Internet]. 4 de marzo de 2020 [citado 23 de octubre de 2020];20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7057584/> (96)
- Yang W, Song Y, Lu Y-L, Sun J-Z, Wang H-W. Increased expression of programmed death (PD)-1 and its ligand PD-L1 correlates with impaired cell-mediated immunity in high-risk human papillomavirus-related cervical intraepithelial neoplasia. *Immunology*. 2013;139(4):513-22. (104)
- Yeo-Teh NSL, Ito Y, Jha S. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 8 de junio de 2018 [citado 16 de agosto de 2020];19(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032416/> (20)
- Zhang M, Liang L, He J, He Z, Yue C, Jin X, et al. Fra-1 Inhibits Cell Growth and the Warburg Effect in Cervical Cancer Cells via STAT1 Regulation of the p53 Signaling Pathway. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:579629. (48)
- Zhang Y, Li P, Rong J, Ge Y, Hu C, Bai X, et al. Small molecule CDS-3078 induces G2/M phase arrest and mitochondria-mediated apoptosis in HeLa cells. *Exp Ther Med*. diciembre de 2020;20(6):284. (45)
- Zhao J, Huang W, Wu Y, Luo Y, Wu B, Cheng J, et al. Prognostic role of pretreatment blood lymphocyte count in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell International*. 10 de enero de 2020;20(1):15. (98)
- Zhou C, Tuong ZK, Frazer IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2 de agosto de 2019 [citado 9 de octubre de 2020];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00682/full> (90)

CITAS BIBLIOGRÁFICAS -BASE DE DATOS UTA

- Carrasco P, Cristina M. “Expresión de las proteínas bax y bcl2 en células de cáncer de mama in vitro tratadas con amaranthus hypochondriacus”. 2020;73. (79)
- Reinoso J, Carrero Castillo Y. “Etiopatogenia de lesiones cervicales precancerosas y cancerosas e infección por papiloma virus y su relación con factores de riesgo y modos de vida en pacientes femeninas de la comunidad de Pilahuin”. 1 de julio de 2020 [citado 8 de febrero de 2021]; Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/31112> (62)
- Semblantes Paredes N, Carrero Castillo Y. “correlación de hallazgos colposcópicos e histopatológicos en lesiones cervicales asociadas o no a papiloma virus en pacientes femeninas atendidas en Solca- unidad oncológica Tungurahua”. 2020;142. (73)

ANEXOS

HISTORIA CLÍNICA

No de Historia: _____ CI: _____

Fecha: _____

Centro Asistencial: _____

Nombre: _____ Edad: _____

Fecha de Nacimiento: _____ Lugar de Nacimiento: _____

Dirección: _____ Teléfono:

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

Ocupación: _____

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS PERSONALES Y FAMILIARES:

Si: _____ No: _____ Cual?: _____ ¿Desde cuándo sufre la patología usted o familiar?: _____

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

ANTECEDENTES GINECO-OBSTETRICOS: 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 qué edad la usa? _____

TIPOS DE RELACIÓN SEXUAL: Hábitos Sexuales:

Genital: _____ Orogenital: _____ Anal: _____

HÁBITOS TABAQUICOS: FUMA: Sí: _____ No: _____ ¿Cuánto
tiempo? _____ ¿Cuándo lo dejó? _____ ¿Cuántos cigarrillos
fuma o fumaba? _____

HÁBITOS ALCOHÓLICOS: Si: _____ No: _____

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

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

Si: _____ No: _____
Sífilis: _____ Gonorrea: _____ Linfogranuloma Venéreo: _____ Chancro
Blando: _____ Chlamydia: _____ Herpes Genital: _____
Tricomonas: _____

Tratadas: Si: _____ No: _____ Control Actual: _____
Ultima citología Vaginal: _____

EXAMEN FÍSICO GINECOLÓGICO:

• Vulva: _____

• Vagina: _____

• Cuello: _____

• Citología: _____

• Colposcopia: _____

• Biopsia: _____

GRADO DE LESIÓN A NIVEL DE CUELLO UTERINO:

• NIC I: _____

• NIC II: _____

• NIC III: _____

• CARCINOMA IN SITU:

ESTUDIO

MOLECULAR:
