



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIR-145-5P, MIR-195-

5P, MIR-148B-3P EN PACIENTES CON NEOPLASIA

INTRAEPITELIAL CERVICAL Y VPH DE ALTO RIESGO POSITIVAS”

TESIS

QUE PRESENTA

MC. MARISSA REYES BASTIDAS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTORES

DRA. ELIAKYM ARÁMBULA MERAZ

DR. ENRIQUE JHONATAN ROMO MARTÍNEZ

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A **MAYO** DE 2024.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

A mis padres Margarita y Arturo, por su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, mis logros son suyos, sus consejos y enseñanzas me han ayudado a lograr cualquier cosa que me he propuesto. Los amo.

A mis hermanas por su apoyo, cariño y por ser mi modelo a seguir.

A mis sobrinos por ser mi motor y mayor alegría, por su amor y cariño.

A mis abuelita Mina por ser mi gran motor y propulsor para continuar con mi vida, por su amor infinito que me acompañara siempre.

A mis abuelos Rosario y Roberto por su amor y cariño y por ser parte de mi vida.

A mis tios y primos por sus consejos y compañía.

A mis amigos por siempre apoyarme a lograr mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, la Dra. Eliakym Arámbula Meraz y Dr. Jhonatan Enrique Romo Martínez, su dirección, apoyo y confianza brindada para este proyecto de tesis.

A los miembros del comité tutorial; Dr. Guadalupe Rendón Maldonado, Lorenzo Ulises Osuna Martínez, Elsa Maribel Aguilar Medina, por sus valiosos consejos y apoyo para que este proyecto de tesis se desarrollara de la mejor manera. Gracias.

A la Dra. Noemí García Magallanes por su apoyo para la realización de este proyecto.

Al Dr. Ignacio Osuna Ramírez por sus consejos y apoyo académico estadístico para la realización de este proyecto.

Al Dr. Parra Unda por sus consejos y apoyo académico.

Al Dr. Omar Venancio Fragoza Sosa por su apoyo en la recolección de muestras para este proyecto y valiosos consejos en el área médica y amistad brindada.

A la enfermera Ana María Coronel Valenzuela por su apoyo en la toma de muestras y consejos en el manejo del paciente y amistad brindada.

A la Dra. Patricia García Ocaranza, Dra. Muñoz Chablé, Dr. Ávila Vergara y al Dr. Juárez Garate por su apoyo en recolección de muestras y valiosos consejos para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Saúl, Cristian, Paúl, Kassandra, Fernando Bergez, por su apoyo y amistad brindada.

Al consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por la beca otorgada para mis estudios de posgrado.

A los directivos del Instituto Sinaloense de Cancerología y Hospital de la Mujer por permitirme realizar mi investigación con pacientes de dichos hospitales.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa y a la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas por permitirme realizar mis estudios de Doctorado en sus instalaciones.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	11
I. RESUMEN (Español)	12
II. ABSTRACT	13
III. INTRODUCCIÓN	14
IV. ANTECEDENTES	16
4.1 Epidemiología del cáncer cervicouterino (CaCu)	16
4.2 Papillomavirus (PVs)	17
4.3 Virus de Papiloma Humano (VPH)	17
4.3.1 Clasificación taxonómica de VPH	18
4.3.2 Genoma del VPH	20
4.3.3 Nomenclatura citohistológica	25
4.4 Patogénesis de cáncer cervicouterino (CaCu)	30
4.4.1 VPH de alto riesgo y CaCu	35
4.4.2 Infección por VPH y sistema inmunológico	36
4.4.3 Historia natural de CaCu	39
4.4.4 Diagnóstico de CaCu	42
4.5 microRNAs	43
4.5.1 Biogénesis de los microRNAs	44
4.5.2 Acercamiento al blanco de miRNAs	49
4.5.3 miRNAs como biomarcador de cáncer	49
4.5.4 miRNAs circulantes	50
4.5.5. Detección de miRNAs en fluidos corporales en pacientes con cáncer VPH-positivos	52
4.5.6. miRNAs y CaCu	53
4.5.6.1 Regulación de la expresión de miRNAs por la oncoproteína E7	56
4.6. VPH altera expresión de miRNAs	58
4.6.1. miR-145-5p	59
4.6.1.1 Regulación del miR-145	61
4.7.1 miR-148b-3p	64
4.7.1.1. Cáncer de mama	67
4.7.1.2. Cáncer pancreático	67
4.7.2 miR-195-5p	69
V. JUSTIFICACIÓN	74
VI. HIPÓTESIS	75

VII. OBJETIVOS	76
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	77
8.1 Tipo de estudio.....	77
8.2 Características del grupo participante de mujeres	77
8.3 Cálculo de la muestra	77
8.4 Lugar de trabajo	77
8.5 Criterios de inclusión	77
8.6 Criterios de exclusión.....	78
8.7 Criterios de eliminación	78
8.8 Extracción y cuantificación de DNA de células cervicales	78
8.9 Determinación de genotipo de alto riesgo VPH 16, 18, 35, 45.....	79
8.9.1 Amplificación del gen <i>beta-globina</i> humana.....	79
8.9.2 Identificación de VPH.....	80
8.9.3 Determinación de la presencia de los miRNA: miR-145-5p, miR-148b-3p, miR-195-5p en tejido cervical	84
8.9.3.1 Análisis de expresión miRNA	84
8.9.3.2 Obtención de muestra de tejido cervical	84
8.9.3.3 Extracción de miRNA de tejido cervical.....	84
8.9.3.4 Conversión de miRNA a cDNA.....	86
8.9.3.5 Determinación de expresión de miRNAs mediante RTq-PCR	87
8.9.4 Análisis estadístico.....	89
IX. RESULTADOS.....	91
9.1 Datos epidemiológicos de pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical y CaCu 91	
9.1.1 Prevalencia de pacientes VPH+ con y sin neoplasia intraepitelial cervical.....	91
9.1.2 Factores de riesgo asociados a cáncer cervicouterino	93
9.1.2.1 Edad	93
9.1.2.2 Número de parejas sexuales	93
9.1.2.3 Inicio de sexualidad Temprana	93
9.1.2.4 Tabaquismo	94
9.1.2.5 Antecedentes Heredofamiliares.....	94
9.1.2.6 Índice de masa corporal	94
9.1.2.7 Anticonceptivos.....	94
9.1.2.8 Partos.....	95
9.1.3 Asociación de factores de riesgo de CaCu y VPH.....	99
9.2 Determinación de Genotipo de VPH de alto riesgo (VPH16, VPH18, VP35 y VPH45) ...	99
9.2.1 Integridad de DNA mediante gen de <i>beta-globina</i>	99

9.2.2 Genotipo de VPH 16, 18, 35 y 45 de alto riesgo en pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical.....	102
9.2.3 Frecuencia de infección múltiple de VPH de alto riesgo	105
9.3 Expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p en pacientes con NIC, CaCu VPH+ de alto riesgo y sin NIC VPH-.....	105
9.3.1 Evaluación de la expresión de sondas taqman miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-16-5p (constitutivo), miR-195-5p	105
9.3.2 Determinación de niveles de expresión relativa de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p en pacientes con NIC, CaCu VPH+ de alto riesgo y sin NIC VPH-.....	105
9.3.3.1 Edad	112
X. DISCUSIÓN	114
10.1 Datos epidemiológicos de pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical.....	114
10.1.1 Prevalencia de pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical	114
10.1.2 Factores de riesgo asociados a cáncer cervicouterino	117
10.1.2.1 Edad	117
10.1.2.2 Número de parejas sexuales	119
10.1.2.3 Inicio de sexualidad temprana	120
10.1.2.4 Índice de masa corporal (IMC)	123
10.1.2.5 Uso de anticonceptivos	124
10.1.2.6 Tabaquismo	125
10.1.2.7 Partos.....	127
10.2 Genotipo VPH de alto riesgo (VPH16, VPH18, VPH35, VPH45)	128
10.2.1 Infección múltiple de genotipo de VPH de alto riesgo	134
10.3 Expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p en pacientes con NIC, CaCu VPH positivos de alto riesgo y sin NIC VPH-.....	137
10.3.1 Factores de riesgo asociados a CaCu en pacientes VPH16, 18, 35, 45 positivos en las cuales se evaluó expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR195-5p.....	140
XI. CONCLUSIONES	141
11.1. Conclusión general	141
11.2. Conclusiones específicas	141
XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	142
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	143
XIV. ANEXOS	166
14.2. Productos Académicos	166
XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES.....	168

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Genoma de Virus de VPH.....	13
2	Progresión de cáncer cervical mediado por VPH.....	23
3	Biogénesis de miRNA.....	38
4	Prevalencia de pacientes VPH con y sin neoplasia intraepitelial cervical.....	88
5	Determinación de Beta-globina	95
6	Presencia de VPH utilizando iniciadores GP5+/GP6+ e identificación de genotipo con iniciadores específicos.....	97
7	Frecuencia de genotipos de VPH de alto riesgo en pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical.....	98
8	Frecuencia de infección múltiple de VPH16, 18, 35, 45.....	102
9	Expresión relativa de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p.....	103
10	Niveles de expresión relativa de miRNAs.....	104
11	Niveles de expresión de miR-195-5p y genotipo VPH45.....	105
12	Análisis de correlación entre expresión relativa de miRNAs.....	106

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Función de proteínas virales.....	14
2	Secuencias de iniciadores consenso GP-E6-E7 para determinación de genotipo 16, 18, 35, 45 de VPH.	77
3	Secuencias de iniciadores tipo-específico PCR anidada empleados en el estudio.	78
4	Factores de riesgo asociados a CaCu.....	91
5	Características sociodemográficas de las participantes del estudio	92
6	Asociación entre factores de riesgo de CaCu y VPH.....	94
7	Factores de riesgo asociados a CaCu en pacientes VPH16,18,35,45 positivos de alto riesgo en los cuales se evaluó nivel de expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR.195-5p.....	108

I. RESUMEN (Español)

El cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa el 2° lugar de muertes en el mundo por cáncer en mujeres, reportando 569,847 casos nuevos en 2018. En México, el CaCu ocupa el 2° lugar en frecuencia, con una tasa de mortalidad de 11.3 por 100,000 mujeres. En Sinaloa se ha reportado una alta tasa de mortalidad de 9.5 por 100,000 mujeres mayores de 25 años. La principal causa para el desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y CaCu es la presencia de VPH de alto riesgo, los genotipos más comunes son el 16 y el 18. Numerosos estudios han encontrado una correlación significativa entre los patrones de expresión de miRNA y cáncer cervical. Con el objetivo de determinar la relación entre expresión de miRNAs y VPH de alto riesgo, se midieron parámetros epidemiológicos y niveles de expresión de miRNAs en tejido cervical de pacientes con NIC VPH+ de alto riesgo y sin NIC VPH -. Los genotipos de alto riesgo 16, 18, 35 y 45 estuvieron presentes en el 56.5% de la población de estudio. Los más prevalentes fueron VPH16 y VPH45 (18.8%). Mujeres entre 20 y 24 años presentaron 5.3 veces de riesgo de ser VPH+ (IC 95% =1.22-23.27). Asimismo, se encontró una diferencia significativa en los niveles de expresión de miR-148b-3p y miR-145-5p entre pacientes VPH+ y VPH -, y en niveles de expresión de miR-195-5p en pacientes VPH45+ y VPH45 las pacientes con (NICII/III) presentaron mayores niveles de expresión de miR-195-5p. Se encontró una correlación entre los niveles de expresión de miR-145-5p y miR-148b-3p.

Palabras clave: Cáncer cervicouterino, neoplasia intraepitelial cervical, VPH, miRNAs

II. ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common cancer among woman worldwide and the leading cause of mortality in developing countries. 569,847 new cases were reported in 2018. High mortality rates due to CC have been reported in Sinaloa, Mexico, where the mortality rate was 9.5 deaths per-100,000 >25 years old women. The major cause of intraepithelial neoplasia and cervical cancer is the presence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) types, predominantly the HPV16 and/or HPV18 genotypes. The presence of HPV16 DNA has been reported in approximately 63-90 per-cent of CC cases, being the most common worldwide. Small, noncoding human RNAs termed microRNAs, regulate gene expression and have been implicated in cervical cancer. Our study want to determine the expression of miRNAs in patients with cervical intraepithelial neoplasia HR-HPV+ and his association with the grade of CIN and cervical cancer risk factors. The genotypes of high risk 16,18,35,45 were presents in 56.5% of patients of the study. The most prevalent was HPV16 and HPV45. Women between 20 and 24 years present 5.3 the risk of HPV infection: OR 5.3 (CI95%:1.22-23.27). Furthermore, we found significant differences in expression levels of miR-148b-3p and miR-145-5p between HPV-positive and HPV-negative patients and a significant difference in the expression levels of miR-195-5p between HPV-45 positive and HPV-45 negative patients. Interestingly, we identified that miR-195-5p expression was higher in CIN II/III.

Keywords: Cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia, HR-HPV, miRNAs.

III. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) (OMS, 2024). Esta enfermedad se desarrolla con la acumulación de mutaciones en múltiples genes, las cuales son el resultado de la interacción entre factores genéticos y factores externos, como la edad, sexo, raza, dieta, estilo de vida, estatus socioeconómico y el medio en general, así como la infección por microorganismos (*Helicobacter pylori*, virus Epstein Barr, virus de papiloma humano (VPH) y hepatitis B y algunos parásitos) (Ding et al., 2007; Oliveira et al., 2007). Todos estos son factores que actúan sobre el genoma de las células como indicadores o promotores tumorales en la transformación celular (Ding et al., 2007; Oliveira et al., 2007). El virus de Papiloma Humano de alto riesgo (HR-HPV) está asociado predominantemente a cáncer cervicouterino (CaCu) (Santos et al., 2018), el cual está precedido por severas lesiones consecutivas conocidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) promovido por una infección persistente de VPH (Pisarka et al., 2020). El mayor evento asociado con la progresión de alto grado y cambios tumorogénicos es la integración del DNA viral en el material genético del hospedero. Esto lleva a la expresión de oncoproteínas virales E6, E7 y E5, lo cual afecta la inestabilidad genética y progresión incontrolada del ciclo celular (Pisarka et al., 2020). Los tipos más prevalentes de HR-HPV son 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 asociados con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) y lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG) y CaCu (Rochi et al., 2021; Sathapathy et al., 2017). Por otro lado, numerosos miRNAs tienen un papel en

estadios iniciales de progresión de cáncer y lesiones precursoras ya sea apoyando o contrarrestando el desarrollo maligno (Rochi et al., 2021; Sathapathy et al., 2017). Los miRNA son moléculas de RNA pequeños de cadena simple no codificados de 21-23 nucleótidos que pueden ser encontrados en fluidos corporales y tejidos, regulan la expresión génica post-transcripcionalmente (Rochi et al., 2021; Sathapathy et al., 2017). Los miRNAs, miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p fueron identificados en ejercer un papel tumor supresor en CaCu mediante inhibición de proliferación e invasión a través de regulación de genes involucrados en el ciclo celular (Li et al., 2019; Zhong et al., 2018; Mou et al., 2016). Además, las oncoproteínas de VPH pueden desregular la expresión de miRNAs del hospedero al controlar varios aspectos del ciclo viral (Santos et al., 2018); este cambio puede ser utilizado como biomarcador en diagnóstico temprano y pronóstico de diferentes grados de NIC y CaCu mediante la identificación de miRNAs activados o reprimidos por HR-HPV (Gunasekharan and Laimins, 2013). El presente proyecto identificó la asociación entre la expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p y la presencia de genotipos de VPH oncogénicos, con la finalidad de generar conocimiento que nos permita comprender los mecanismos involucrados en el desarrollo de CaCu y lesiones precancerosas.

IV. ANTECEDENTES

4.1 Epidemiología del cáncer cervicouterino (CaCu)

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que produce la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos, dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (OMS, 2020). La presencia de tumores malignos en el cuello del útero es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia en México. En mujeres de 20 a 29 años y 30-59 años, una de las principales causas de defunción es cáncer de cuello uterino (INEGI, 2021). El cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial, con alrededor de 660 000 casos nuevos y alrededor de 350 000 muertes en 2022 (OMS, 2024). La mayoría de los casos ocurren en países en vías de desarrollo (Woodman et al., 2007; OMS, 2024). La infección por el virus del papiloma humano (VPH) ha sido reconocida como un factor etiológico para el desarrollo de CaCu. Se han descrito más de 120 tipos de VPH y aproximadamente una tercera parte de ellos son capaces de infectar el tracto genital (Moody et al., 2010).

El VPH es la causa de cerca del 90 % de los cánceres de ano y cuello uterino, de cerca del 70 % de los cánceres de vagina y vulva y 60 % de los cánceres de pene (CDC, 2023). Los cánceres en la parte posterior de la garganta (orofaringe) tradicionalmente han sido causados por el tabaco y el alcohol, pero en estudios recientes se muestra que cerca del 60 % al 70 % de los cánceres orofaríngeos

pueden estar vinculados al VPH. Muchos de estos pueden ser causados por una combinación de tabaco, alcohol y VPH (CDC,2023).

4.2 Papillomavirus (PVs)

Los PVs son virus de DNA de doble cadena no envueltos, que infectan hospederos mamíferos y aviares (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017). Los PVs contienen un genoma de DNA de doble cadena circular de aproximadamente 8000 pares de base (pb) (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017). En la célula infectada, el genoma viral ingresa al núcleo donde permanece en un estado extracromosomal a través del ciclo de vida viral (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017). La integración del DNA viral en el cromosoma de la célula infectada no es común en el ciclo de vida viral, pero puede ocurrir en algunos cánceres asociados a los PVs (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017).

Los PVs constituyen una gran familia de virus de DNA oncogénicos pequeños que infectan el epitelio mucoso o cutáneo (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017). Los PVs se han encontrado en la mayoría de las especies de vertebrados incluyendo a humanos, otros mamíferos, aves y reptiles (Rector et al., 2013). Los PVs contienen un genoma de DNA circular pequeño de doble cadena de 7000 a 8000 pb (Tommasino et al., 2014).

4.3 Virus de Papiloma Humano (VPH)

Existen más de 100 genotipos de VPH que pueden infectar epitelio mucoso o cutáneo (Pereira et al., 2009; Garland et al., 2010). Los PVs comparten en común la propiedad de inducir lesiones benignas proliferativas en los tejidos epiteliales que infectan, por ejemplo, VPH 6 y 11 (Pereira et al., 2009; Garland et al., 2010). En

estas lesiones, los virus se replican de tal manera que están unidos al programa de diferenciación del epitelio de la célula hospedera (Pereira et al., 2009; Garland et al., 2010). Los genotipos de VPH se subcategorizan en genotipos de bajo y alto riesgo, reflejando estos últimos una asociación franca con cáncer (Pereira et al., 2009; Garland et al., 2010). El VPH de alto riesgo es mejor conocido como agente etiológico de CaCu, otros cánceres anogenitales, así como también de un subconjunto de cáncer de cabeza y cuello (Pereira et al., 2009; Garland et al., 2010). El VPH de alto riesgo más frecuente es el VPH 16 (Pereira et al., 2009; Garland et al., 2010). Dentro de los VPH de alto riesgo, VPH 16 se encuentra en aproximadamente el 60% de todos los CaCu, el VPH18 está involucrado en un 10-20%, mientras que los VPHs tipo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 73 juntos constituyen el 20-30% restante de los CaCu (Pereira et al., 2009; Garland et al., 2010). El VPH ha sido implicado en el 85% del cáncer del canal anal, 50% del cáncer de vulva, vagina y pene, 20% del cáncer orofaríngeo y 10% del cáncer laríngeo y esofágico (Pereira et al., 2009; Garland et al., 2010). A pesar de que la tasa de progresión carcinogénica es relativamente baja, las infecciones con VPH de alto riesgo se encuentran en la mayoría de los CaCu humanos (ZurHausen, 2002).

4.3.1 Clasificación taxonómica de VPH

Los PVs son clasificados en distintos géneros, especies, tipos o subtipos (paVE; Van Doorslaer et al., 2017). Donde las secuencias de DNA de su gen L1 comparten menos del 60%, 70%, 90% o 98% de identidad, respectivamente (paVE; Van Doorslaer et al., 2017). 353 tipos de PVs se han clasificado en 49 géneros distintos (paVE; Van Doorslaer et al., 2017). Estos incluyen más de 200 tipos de

VPH que pertenecen a 5 géneros distintos (alfa, beta, gamma, mu y nu) (Egawa et al., 2017). La mayoría de los VPH alfa presentan un tropismo hacia mucosa, mientras que beta, mu y nu infectan piel (Egawa et al., 2017). Sin embargo, las especies del VPH alfa-2, alfa-4 y alfa-8 son encontradas en verrugas de piel (Egawa et al., 2017). Por otra parte, la especie de VPH beta-3 es más comúnmente encontrada en cavidad nasal que en piel y por lo tanto desempeñan un tropismo por mucosa. El VPH gamma al parecer presenta tropismo por mucosa y piel (Egawa et al., 2017).

Todos los PVs inducen proliferación en células afectadas (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017; Mittal et al., 2017). Esta proliferación moviliza la replicación del DNA y la maquinaria productora de proteínas, la cual es secuestrada por el virus para su propio beneficio (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017; Mittal et al., 2017). En general, la proliferación dura poco tiempo permitiendo la producción de viriones listos para infectar a otro individuo (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017; Tommasino et al., 2014). Esto activa la respuesta inmunológica del hospedero llevando la mayoría de las veces a un despeje del virus (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017; Tommasino et al., 2014). La mayoría de los tipos de PVs son designados de bajo riesgo generando efectos patogénicos benignos, como verrugas de piel, lesiones en la mucosa o en el peor de los casos condilomas en mucosa que requieren cirugía (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017; Tommasino et al., 2014). Sin embargo, un subconjunto de VPH denominados genes virales de alto riesgo no son totalmente erradicados del hospedero (McBride et al., 2017). Parte del genoma viral permanece al menos en una célula, en su forma episomal o insertado en el genoma de la célula (McBride et al., 2017). Estos oncogenes virales remanentes

tienen la capacidad de promover por un largo periodo que puede durar hasta 3 décadas, cambios futuros en la célula pueden llevar eventualmente al cáncer (Doorbar et al., 2012; Harden et al., 2017; Tommasino et al., 2014; Mittal et al., 2017).

Los PVs más oncogénicos o de alto riesgo están asociados a CaCu (Li et al., 2011; Smith et al., 2007), están agrupados en una clase de alfa-papillomavirus (alfa-5, alfa-6, alfa-7 y alfa-9) (Burk et al., 2009) y son causantes del 90% de CaCu en todo el mundo (Li et al., 2011).

4.3.2 Genoma del VPH

El genoma viral está organizado en 3 regiones: la región de control largo (LCR), que contiene varios elementos cis involucrados en la regulación de transcripción y replicación de DNA; así como también regiones tempranas (E) y tardías (L) que codifican subconjuntos de genes denotados por la aparición de su expresión en el contexto del ciclo de vida viral (**Figura 1**) (Lambert y Collins, 2008).

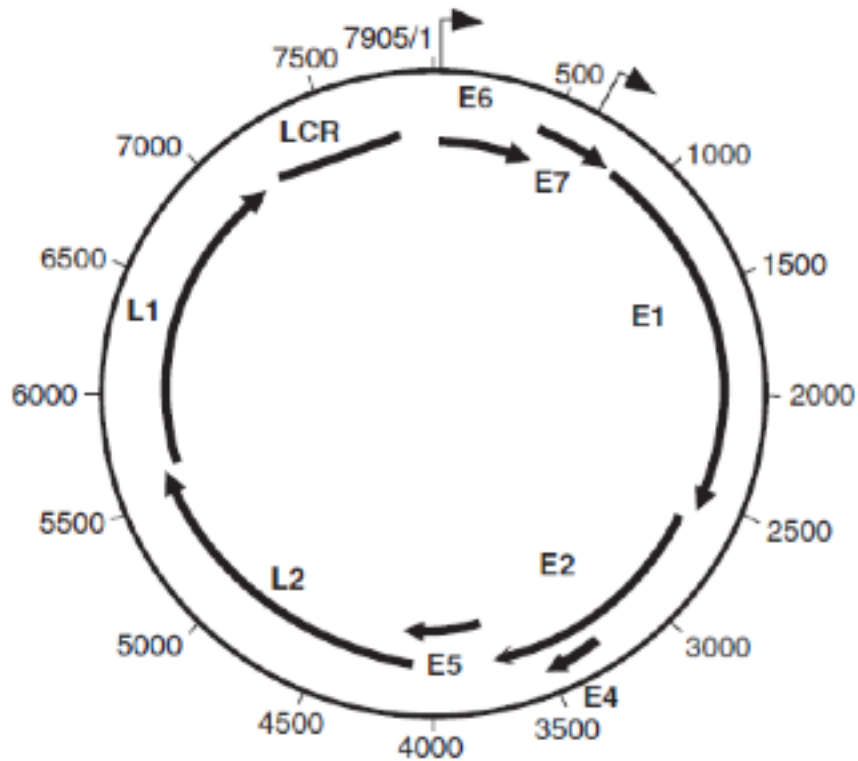


Figura 1. Genoma de VPH. La transcripción del genoma viral ocurre unidireccionalmente y es dirigida por múltiples promotores que están localizados en el LCR y en la parte final 5' de la región E. Diversas señales de "splicing" y poliadenilación dependiendo del estado del ciclo de vida viral, llevando a una variedad de transcritos con una capacidad codificante diferencial. Un subconjunto de genes tempranos (E5, E6 y E7) posee propiedades transformantes en cultivo de tejido y propiedades antitumorigénicas en modelos animales experimentales. Los genes estructurales tardíos codifican para la proteína de cápside mayor L1 y la proteína de cápside menor L2 (Lambert y Collins, 2008).

El genoma viral generalmente contiene una región reguladora denominada región de control largo (LCR), la cual contiene sitios de unión de factores de transcripción y el origen de replicación y 2 grupos de ORFs, los cuales son designados tempranos (E) o tardíos (L) (Bergvall et al.,2013; McBride et al., 2013). Los genes principales incluyen proteínas E1 y E2 necesarias para la replicación viral (Bergvall et al.,2013; McBride et al., 2013) y proteínas virales tardías L1 y L2 (Buck et al.,2013; Wang et al. 2013). Los genes virales restantes E6, E7, E5 pueden ser considerados genes accesorios que han evolucionado para facilitar la replicación en el epitelio estratificado (Vande et al., 2013; Roman et al., 2013; Dimaio et al., 2013). E4 participa de forma clave en el escape del virus de las capas epiteliales cornificadas (Bergvall et al., 2013). L1 codifica estructuras primarias de la proteína de la cápside viral y la proteína menor de la cápside viral L2 se une al DNA circular viral para facilitar una óptima encapsulación (Bergvall et al., 2013).

E1 codifica una DNA helicasa específica del virus (Bergvall et al., 2013), mientras que E2 en transcripción viral y replicación del genoma. E6, E7 y E5 codifican proteínas que modifican el ambiente celular y realiza funciones durante el ciclo celular para soportar la producción de progenie de viriones y afectar la virulencia (McBride et al., 2013).

En el **cuadro 1** se muestra algunas de las funciones de las proteínas del VPH (Egawa et al., 2015). El ciclo viral está relacionado con el proceso de diferenciación del epitelio escamoso estratificado, en las etapas tempranas de la infección, la actividad de oncogenes E6 y E7 está regulada por la proteína E2 y el virus permanece episomal (Pett et al., 2007). Sin embargo, la integración del genoma viral en el genoma celular está caracterizado por eventos de VPH asociados a

neoplasia que está vinculado con carcinogénesis (Pett et al., 2007). La integración viral ocurre en más del 90% de los casos de CCI (cáncer cervical invasivo). Usualmente la disrupción del genoma viral ocurre en la región E2 incrementando la expresión y estabilidad de los oncogenes E6 y E7 (Pett et al., 2007). Adicionalmente, la integración afecta la expresión de genes celulares e induce inestabilidad genómica (Pett et al., 2007). Generalmente la integración toma lugar en regiones intragénicamente transcripcionalmente activas. 8q24, 13q22, 1p36 y 3q28 son puntos de acceso para integración de VPH16 y VPH18 (Zhang et al., 2016). Además, hay sitios preferencialmente afectados por VPH18 como 8q24 y 1p36 por VPH16 (Zhang et al., 2016). Un mecanismo descrito recientemente derivado en la integración viral es la generación de transcritos quiméricos, que son altamente expresados y promueven la transformación (Liu et al., 2022).

Cuadro 1. Función de proteínas virales. Tomado de Egawa et al. 2015.

E1	Replicación del genoma viral
E2	Transcripción viral y replicación del genoma
E4	Implicada con el gen E2 y se expresa abundantemente como E1-E4. Proteína de fusión durante las últimas etapas del ciclo de vida viral. Se une a los filamentos de citoqueratina y disrumpe su estructura. E4 contribuye a la liberación y transmisión del virus.
E5	Proteína transmembranal pequeña en α -VPH es interactiva con el receptor E6F y activa los patrones de señalización mitogénica. Evasión de la respuesta inmunológica y apoptosis.
E6	Permite la entrada al ciclo celular de la célula hospedera para la amplificación de su genoma en las capas epiteliales superiores. E6 de α -VPH de HR-HPV se une y degrada a p53.
E7	Permite la entrada al ciclo celular de la célula hospedera para la amplificación de su genoma en las capas epiteliales superiores. E7 de α -VPH de HR-HPV se une a pRB e induce inestabilidad cromosómica.
L1	Codifica proteína estructural primaria de la cápside viral.
L2	Une DNA viral. Facilita encapsulación del genoma.

Proteínas celulares son afectadas por la interacción directa o indirecta con oncoproteínas E6 y E7 (White et al., 2012). E6 interactúa con al menos 150 proteínas celulares, incluyendo MALM, p300/CBP, y proteínas con dominios PDZ (White et al., 2012). E6 induce alteraciones celulares no están exclusivamente clasificadas con VPH tipo 1 clasificado en el género alfa (White et al.,2012; Dacus et al.,2021). E6 del género beta VPH8 interactúa con MALM e histona acetiltransferasa p300 afectando el patrón NOTCH y estabilidad genómica (White et al.,2012; Dacus et al.,2021). ENC1 interactúa solo con genotipos de las especies a7 (VPH18 y VPH45) y ZER1 con VPH16 y las especies a9 (White et al.,2012). Oncoproteínas virales molestan la maquinaria episomal e induce cambios en la metilación del DNA, modificación de histona y transcripción, inclusive cuando el virus está en su forma episomal. VPH tiene modificaciones epigenéticas de acuerdo a su ciclo viral (Castro-Oropeza et al., 2022; Fang et al., 2014). VPH16 y VPH18 pueden inducir patrones de metilación específicos en DNA incluso en la forma episomal (Leonard et al.,2012).

4.3.3 Nomenclatura citohistológica

CaCu usualmente es precedido por una larga fase de enfermedad preinvasiva. Ésta es caracterizada microscópicamente por eventos de atipia celular a varios grados de displasia o NIC antes de progresión a carcinoma invasor (Kumar et al., 2010). Estas alteraciones precursoras usualmente son asintomáticas y solo se detectan mediante citología, colposcopia y biopsia, según el grado de evolución se clasifican en:

Lesión intraepitelial cervical de bajo grado (LEIBG). Caracterizada por displasia en el tercio inferior del epitelio (Kumar et al., 2010). La mayoría se curan espontáneamente a los 2 años, pero el 10% progresan a lesiones de mayor grado, a este tipo de lesión también se le conoce como neoplasia intraepitelial cervical grado I o NIC I (Kumar et al., 2010).

Lesión intraepitelial cervical de alto grado (LEIAG). Se observa displasia en los dos tercios inferiores del epitelio, además éste es displásico en su totalidad (Kumar et al., 2010). También recibe el nombre de Carcinoma *in situ*. La mayoría no curan espontáneamente y a los 2 años el 10% se transforma en un carcinoma invasor, en esta clasificación se encuentran NIC II y NIC III (cáncer *in situ*) (Kumar et al., 2010).

Histológicamente alrededor del 90-95% de CCI que aparecen en el cuello uterino son cánceres de células escamosas y 2 al 8% son adenocarcinomas en países en desarrollo (Kumar et al., 2010). Microscópicamente, la mayoría de los carcinomas de células escamosas aparecen como redes infiltrantes de bandas de células neoplásicas con estroma interviniente, con una gran cantidad de variación en el patrón de crecimiento, tipo de célula y grado de diferenciación (Kumar et al., 2010). El estroma cervical separando las bandas de células malignas, es infiltrado por linfocitos y células plasmáticas (Kumar et al., 2010). Estas células malignas pueden ser divididas en queratinizantes y no queratinizantes (Kumar et al., 2010).

Los tumores pueden ser carcinomas, bien, moderada o pobremente diferenciados (Kumar et al., 2010). El carcinoma de células escamosas queratinizante está compuesto de espirales característicos de células epidermoides conteniendo nidos centrales de queratina (Kumar et al., 2010). El núcleo es grande

e hiper cromático (Kumar et al., 2010). Puentes intercelulares son visibles con gránulos de queratohialina y queratinización citoplásmica (Kumar et al., 2010). Solo unas pocas figuras mitóticas son visibles (Kumar et al., 2010).

El carcinoma de células escamosas no queratinizantes aparece como nidos irregulares y dentados de células poligonales invadiendo el estroma cervical (Kumar et al., 2010). Puede haber disqueratosis y puentes intercelulares. El polimorfismo nuclear y celular es más obvio y las figuras mitóticas son abundantes. Además, hay ausencia de perlas de queratina (Kumar et al., 2010).

Otro tipo común de carcinoma de células escamosas incluye carcinoma de células escamosas condilomatoso (conocido como carcinoma verrucoso), carcinoma de células escamosas papilar, carcinoma tipo linfopitelioma y carcinoma de célula escamosatransicional (Kumar et al., 2010). El adenocarcinoma más común es el tipo endocervical, donde las glándulas anormales son de diferentes formas y tamaños con brotes y ramificaciones (Kumar et al., 2010). La mayoría de estos tumores están bien diferenciados (Kumar et al., 2010).

Otros tipos de adenocarcinoma incluyen el de tipo intestinal, anillo de sello, adenocarcinoma maligno, papilar viloglandular, endometroide y papilar seroso (Kumar et al., 2010). El carcinoma adenoescamoso incluye tumores con patrones de crecimiento glandular y escamoso (Kumar et al., 2010).

La presencia de células tumorales en el lumen del espacio capilar es evidencia de crecimiento potencialmente agresivo en células escamosas y adenocarcinoma de cérvix y ha sido correlacionado con incremento de riesgo de metástasis de nódulo linfático regional (Kumar et al., 2010). La invasión de vasos sanguíneos ocasionalmente ocurre y es señal de pobre pronóstico (Kumar et al.,

2010). La citología no es un método confiable para diagnóstico de lesiones invasivas (Kumar et al., 2010). El diagnóstico confirmatorio final de cáncer invasor está siempre basado en histopatología (Kumar et al., 2010).

El sistema de estadio de CaCu fue desarrollado por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (Kumar et al., 2010). Éste es un sistema de estadio clínico basado en el tamaño del tumor y extensión de la enfermedad en la pelvis (Kumar et al., 2010). La extensión del crecimiento del cáncer es evaluada clínicamente para clasificar la enfermedad en estadios I-IV (Kumar et al., 2010). El estadio I representa crecimiento localizado en el cérvix mientras que estadio IV representa la fase de crecimiento, en la cual el cáncer se ha expandido a distintos órganos por metástasis (Kumar et al., 2010). El estadio FIGO se evalúa utilizando métodos incluyendo inspección y palpación por examinación rectal y vaginal, colposcopia, citoscopia, legrado endocervical, histeroscopia, urograma intravenoso y rayos X (Kumar et al., 2010). La linfagografía, ultrasonido, tomografía computarizada y resonancia magnética pueden dar información adicional (Kumar et al., 2010).

Estadio I. Carcinoma estrictamente confinado al cérvix, el diagnóstico de IA1 y IA2 debe estar basada en examinación microscópica del tejido removido preferentemente de cono para que incluya la lesión entera (Kumar et al., 2010).

Estadio IA. Cáncer invasor identificado únicamente microscópicamente. La invasión limitada al estroma con una profundidad máxima de 5 mm y no más ancho de 7 mm (Kumar et al., 2010).

Estadio IA1. Invasión del estroma no más de 3 mm de profundidad y no más de 7mm (Kumar et al., 2010).

Estadio IA2. Invasión del estroma mayor de 3 mm, pero no más de 5 mm en profundidad y no más ancho de 7 mm (Kumar et al., 2010).

Estadio IB. Lesiones clínicas confinadas al cérvix o lesiones preclínicas mayores del estadio IA. Todas las lesiones graves incluso las de invasión superficial son cánceres estadio IB (Kumar et al., 2010).

Estadio IB1. Lesiones clínicas no mayores de 4 cm de tamaño (Kumar et al., 2010).

Estadio IB2. Lesiones clínicas mayores de 4 cm de tamaño (Kumar et al., 2010).

Estadio II. Carcinoma que se extiende más allá del cérvix, pero no se extiende a la pared pélvica. El carcinoma involucra la vagina, pero no más del tercio inferior (Kumar et al., 2010).

Estadio IIA. Participación parametrial no obvia. Participación de hasta dos tercios superiores de la vagina (Kumar et al., 2010).

Estadio IIB. Participación parametrial obvia pero no hasta la pared lateral pélvica (Kumar et al., 2010).

Estadio III. Carcinoma que se extiende a la pared lateral pélvica. En la examinación rectal no hay un espacio libre entre el tumor y la pared lateral pélvica. El tumor involucra el tercio bajo de la vagina. Todos los casos con hidronefrosis o riñón no funcional (Kumar et al., 2010).

Estadio IIIA. No extensión a la pared lateral pélvica, pero participación del tercio bajo de la vagina (Kumar et al., 2010).

Estadio IIIB. Participación de la pared lateral pélvica o hidronefrosis o riñón no funcional (Kumar et al., 2010).

Estadio IV. Carcinoma que se extiende más allá de la pelvis verdadera o tiene involucrado clínicamente la mucosa de la vejiga y/o recto (Kumar et al., 2010).

Estadio IVA. Esparcimiento del tumor en órganos pélvicos adyacentes (Kumar et al., 2010).

Estadio IVB. Esparcimiento a órganos distantes (Kumar et al., 2010).

4.4 Patogénesis de cáncer cervicouterino (CaCu)

El CaCu resulta de un proceso de varios pasos que incluye la transformación del epitelio cervical normal a un estado preneoplásico seguido por NIC, siendo grado 1-3 y por último un CCI (Woodman et al., 2007). El desarrollo de una lesión precancerosa y CaCu involucra diversos eventos (Woodman et al., 2007). La exposición al VPH de alto riesgo causa una infección inicial del epitelio escamoso en la zona de transformación, esto es seguido por una infección persistente, integración del genoma viral en el genoma de la célula hospedera, alteraciones genómicas, inmortalización y transformación de células epiteliales (**Figura. 2**) (Woodman et al., 2007).

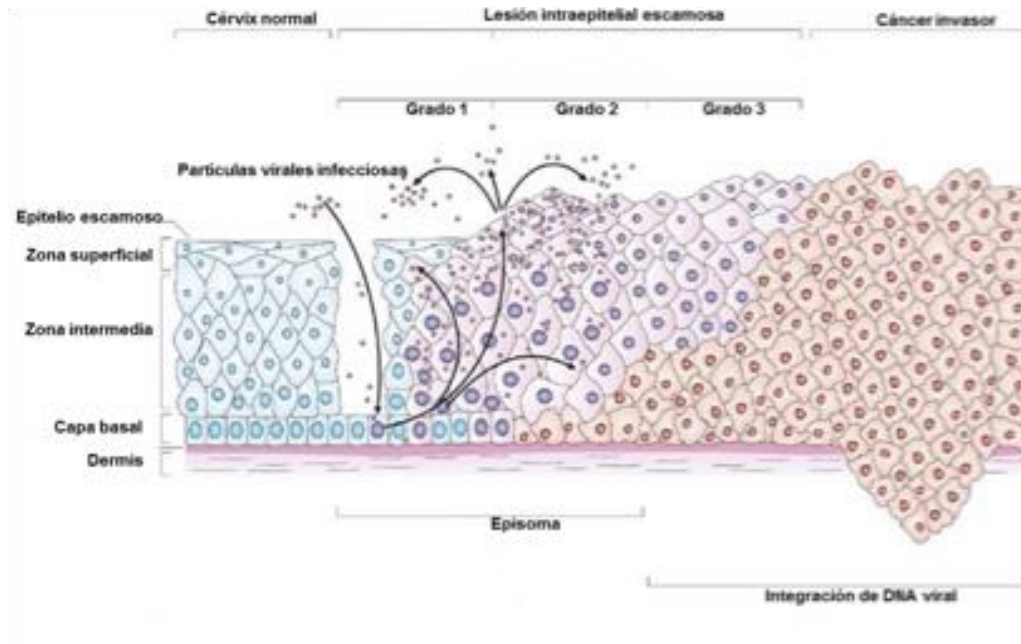


Figura 2. Progresión de Cáncer cervical mediado por el VPH. Las células basales del epitelio cervical descansan en la membrana basal que es soportado por la dermis. Se piensa que el VPH accesa a las células basales a través de microabrasiones en el epitelio cervical. Durante la infección los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6, E7 son expresados y el DNA viral se replica del DNA episomal. En las capas media y superficial del epitelio el genoma viral es replicado y los genes tardíos L1 y L2 son expresados. L1 y L2 encapsulan el genoma viral para formar progenie de viriones en el núcleo. El virus oculto puede iniciar entonces una nueva infección. Lesiones intraepiteliales de bajo grado soportan una replicación viral productiva. La progresión de lesiones no tratadas a cáncer microinvasivo e invasivo está asociado con la integración del genoma de VPH en los cromosomas (núcleo rojo), asociado con la pérdida de la disrupción de E2 y una subsecuente sobrerregulación de la expresión oncogénica de E6 y E7 (Woodman et al., 2007).

Los VPH de bajo riesgo inducen verrugas genitales benignas, a diferencia de VPH de alto riesgo que están asociados a cáncer cervical (Sargent et al., 2008). El VPH-16 de alto riesgo es el tipo más prevalente, seguido de los tipos 18, 31, 33 y 35 (Sargent et al., 2008). De acuerdo con la expresión de los genes virales E1, E2, E5, E6 y E7 en etapas de diferenciación celular del epitelio son considerados como de expresión en etapa temprana E1 y E2 regulan la expresión génica viral a través de actividad enzimática en la replicación y transcripción (Liao et al., 2012; Dimaio et al., 2013). El potencial oncogénico de VPH de alto riesgo es mayormente atribuido a genes de etapa temprana E5, E6 y E7 (Liao et al., 2012; Dimaio et al., 2013). E6 y E7 ejercen su efecto oncogénico desestabilizando y degradando pRB y p53 (Liao et al., 2012; Dimaio et al., 2013). E7 codifica una proteína hidrofóbica que se localiza en la membrana celular (Liao et al., 2012; Dimaio et al., 2013). Se cree que E5 juega un papel importante durante los pasos tempranos de transformación en las capas basales del epitelio e incrementa el efecto oncogénico de E6 y E7. Sin embargo, el mecanismo aun no es claro durante la carcinogénesis cervical (Liao et al., 2012; Dimaio et al., 2013).

Las oncoproteínas E6 y E7 son cruciales para la inducción de transformación asociada a VPH, así como para el mantenimiento del fenotipo tumorigénico de células de cáncer cervical VPH-positivas (McLaughlin-Drubin et al., 2009). E6 induce la degradación proteolítica de la proteína supresora de tumor p53 y estimula la actividad telomerasa, mientras E7 interfiere con la actividad de la proteína supresora de tumor pRB y otras proteínas, como consecuencia, E6 y E7 desregulan patrones intracelulares involucrados en el control de proliferación celular, senescencia, apoptosis y estabilidad genética (McLaughlin-Drubin et al., 2009).

La inhibición de la actividad viral de E6/E7 en células de cáncer VPH-positivas lleva a la reactivación de patrones “dormidos” supresores de tumores (Yamato et al., 2008). Por ejemplo, diversos estudios indican que la inhibición de E6 primeramente resulta en apoptosis, mientras que la inhibición combinada de E6/E7 conduce a la detención del crecimiento y la senescencia celular (Yamato et al., 2008). La reversión del fenotipo maligno por el VPH no solamente es interesante por sí mismo, sino que también puede ser blanco terapéutico interfiriendo con dicho mecanismo (Honegger et al., 2015). Esto pudiera ser logrado bloqueando el oncogén E6/E7 o alternativamente corrigiendo la desregulación de las vías celulares alteradas por los oncogenes virales (Honegger et al., 2015).

La expresión sostenida de E6/E7 es requerida para mantener los niveles intracelulares de miembros del bloque 17-92, el cual reduce la expresión anti-proliferativa del gen p21 en células de cáncer VPH positivas (Honegger et al., 2015).

La proteína E6 tiene una alta afinidad por la proteína p53 que regula la replicación celular e induce su degradación; esta proteína es el principal represor de las células tumorales (Lewin, 2014). La proteína E7 se une al producto del gen supresor de tumores Rb; éste es un factor que regula el ciclo celular, ya que se une directamente al factor transcripcional E2F, que induce la transcripción de los elementos involucrados en la replicación celular (Lewin, 2014).

La proteína p53 es un factor de transcripción celular, es decir, un factor que controla la expresión de genes específicos. El gen p53 actúa como un guardián del ciclo celular preservando la fidelidad de la replicación del DNA (McLaughlin-Drubin et al., 2009).

Las mutaciones de p53 son la anomalía genética más comúnmente encontrada en los tumores humanos. Si el DNA celular es dañado, los niveles de p53 aumentan y se produce una detención del ciclo celular en G1, permitiendo su reparación (McLaughlin-Drubin et al., 2009). Además, p53 induce apoptosis en células con daño irreparable del DNA. La oncoproteína E6 del VPH de alto riesgo se une a p53 a través de una proteína llamada E6-AP, necesaria para la formación del complejo E6-p53 (McLaughlin-Drubin et al., 2009).

La degradación de p53 impide una adecuada reparación del DNA, lo cual lleva a inestabilidad del genoma, mutaciones, alteraciones cromosómicas y formación de tumores (McLaughlin-Drubin et al., 2009). La pRB es una fosfoproteína cuya función es regular la entrada de la célula al ciclo de división celular (Lewin, 2014). Durante el ciclo celular la pRB experimenta ciclos de fosforilación y desfosforilación (Lewin, 2014). La forma no fosforilada es la forma activa que suprime la división celular (Lewin, 2014). Durante la fase tardía de la mitosis, la pRB es desfosforilada, se une al factor de transcripción E2F, lo secuestra e impide que este factor transcriba los genes necesarios para que la célula entre a la fase S del ciclo celular, de modo que la célula se detiene en la fase G1 del ciclo celular (Lewin, 2014). Durante la fase S, G2 y la mitosis temprana, la pRB es fosforilada por enzimas cinasas dependientes de ciclinas y pasa a su forma inactiva, permitiendo la labor del factor de transcripción (Lewin, 2014). La oncoproteína E7 se une a pRB en el mismo sitio de unión que el factor de transcripción E2F desplazando a este último, de modo que queda libre para activar la replicación y transcripción del DNA (Lewin, 2014). La inactivación funcional de pRB, permite la progresión de la célula a la fase S del ciclo celular (fase de replicación del DNA). La oncoproteína E7 de los

VPH de bajo riesgo interactúa con la pRB con menor afinidad y eficacia (Lewin, 2014).

La formación de este complejo, a través de la activación del mecanismo proteolítico de la ubiquitina, produce la degradación de p53 (McLaughlin-Drubin et al., 2009). La oncoproteína E6 del VPH de bajo riesgo, no inactiva a p53 porque sólo se une a su extremo C-terminal y esta interacción no produce la degradación de p53 (McLaughlin-Drubin et al., 2009).

4.4.1 VPH de alto riesgo y CaCu

Una infección persistente por VPH de alto riesgo (HR-HPV), en particular VPH-16 y VPH-18 es reconocido como el factor de riesgo más alto para el desarrollo de CaCu (Pett et al., 2007). La mayoría de las infecciones por HR-HPV pueden ser latentes o permisivas (Pett et al., 2007). En las infecciones latentes, el genoma viral está de manera episomal en las células basales y parabasales en el epitelio induciendo obvias alteraciones fenotípicas en la célula (Pett et al., 2007). La replicación viral está confinada a células diferenciadas de las capas epiteliales intermedias y superficiales, esto permite un cambio de la fase latente a permisiva o directamente a una infección aguda (Pett et al., 2007). Normalmente las infecciones de HR-HPV están autolimitadas y se resuelven en algunos meses, sin embargo, en el 10% de los casos un tipo transformante de infección por VPH evoluciona (Pett et al., 2007). Este proceso de transformación es caracterizado por la desregulación de oncogenes virales E6 y E7 en células ciclables, lo cual resulta por último en inestabilidad cromosómica y la acumulación de mutaciones (Pett et al., 2007). La integración del genoma de VPH es un paso característico en la carcinogénesis

cervical y se correlaciona con la progresión de lesiones precancerosas (NIC2/NIC3) a carcinoma invasivo (Pett et al., 2007). Sin embargo, la integración no es obligatoria en este proceso y ha mostrado ser VPH dependiente (Vinokurova et al., 2008). Los genotipos VPH-16, 18 y 45 estaban substancialmente más presentes en un estado integrado comparado con los tipos 31 y 33 (Vinokurova et al., 2008). La pérdida del gen viral E2 es una consecuencia común de la integración de VPH (Han et al., 2015). Esto lleva a la elevada expresión de los oncogenes virales E6 y E7 debido a que no está presente E2 para reprimir la expresión de los oncogenes virales en trans (Han et al., 2015).

Las pruebas de DNA de VPH de alto riesgo han demostrado tener una mayor sensibilidad para detección de LIEAG y cáncer que la prueba de papanicolaou basada en citología (Ronco et al., 2014).

La progresión de una infección inicial por VPH a CaCu ocurre mediante lesiones precursoras (neoplasia intraepitelial cervical, NIC grado 1, NIC grado 2 hasta 3) y puede tardar décadas (Stanley et al., 2015). El tratamiento de las lesiones NIC 2/3 es ablativo o escisional. Mujeres tratadas por lesiones NIC 2/3 tienen 5-15% de riesgo de desarrollar lesiones de alto grado recurrentes después de 2 años del tratamiento (Smola et al., 2017).

4.4.2 Infección por VPH y sistema inmunológico

El sistema inmunológico juega un papel importante durante la carcinogénesis por VPH en la regresión de las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (90%) o de bajo grado (75%) (Jin et al., 2010). Tras la infección transcurren 2-3 años hasta el desarrollo de NIC I/II, y/o una lesión intraepitelial de alto grado (NIC III) y

casi un tercio de las pacientes no tratadas de HSIL desarrollan cáncer en aproximadamente 10 años (Jin et al., 2010).

El VPH penetra a las células basales a través de microabrasiones en el epitelio del cérvix (Maglennon et al., 2012). Después de la infección, los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7 son expresados en células infectadas y el genoma viral es mantenido episomalmente (Maglennon et al., 2012). El genoma viral es replicado a gran intensidad por los genes tardíos L1 y L2, los cuales son expresados en las capas superficiales del epitelio (Maglennon et al., 2012). La ruptura de la cápside permite la liberación del genoma viral, la formación de nuevos viriones y el comienzo de una nueva infección (Maglennon et al., 2012).

El periodo de latencia largo entre infecciones iniciales y la emergencia de cáncer sugiere que el VPH puede evadir el reconocimiento por el sistema inmunológico (Stanley et al., 2010). El ciclo infeccioso de VPH está caracterizado por la ausencia de viremia, bajos niveles de expresión proteica, no inflamación y ninguna señal que alerte al sistema inmunológico (Stanley et al., 2010).

Las respuestas del hospedero contra el VPH generalmente son bajas debido a que el virus se encuentra en las células epiteliales basales, está oculto de las células inmunológicas circulantes durante las etapas iniciales de la infección, en este momento existe una limitada expresión de proteínas virales (Moody et al., 2010; Maglennon et al., 2012). La mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y subclínicas, la progresión está asociada con el VPH persistente (Moody et al., 2010; Maglennon et al., 2012). Este proceso lleva a la disrupción de las proteínas virales E1/E2 e integración del genoma viral en la célula hospedera, la ruptura de E2 libera

los promotores virales E6/E7 e incrementa la expresión de estos oncogenes (Moody et al., 2010; Maglennon et al., 2012).

Durante la progresión del cáncer, el patrón de cambios de las oncoproteínas virales varía; en NIC I, el orden de eventos es similar a la observada en lesiones productivas, en NIC II y NIC III, la producción de viriones es restringida a zonas pequeñas cercanas a la superficie epitelial (Maglennon et al., 2012). La integración de secuencias de VPH en el genoma de la célula hospedera puede ser acompañada de estos cambios y llevar a una desregulación de la expresión de E7 y una pérdida de la replicación de las proteínas E1 y E2 (Maglennon et al., 2012). En el CaCu, la producción de los cambios del ciclo viral no es permanente y los episomas virales se pierden (Maglennon et al., 2012).

La infección por VPH de alto riesgo desencadena una serie de eventos en cascada, mecanismos de reparación y corrección de replicación celular, los cuales son mediados por p53 y pRB alterados (Ghittoni et al., 2010). El ciclo celular es controlado por el virus, lo cual crea cambios celulares que culminan en la transformación e inmortalización de las células epiteliales, en consecuencia, se establecen condiciones para la aparición de cáncer (Ghittoni et al., 2010).

Un predominio del perfil de citocinas de Th2, en asociación con una disminución del perfil de Th1 ha sido demostrado en pacientes con CaCu (Maglennon et al., 2012). Una respuesta inmunológica alterada inducida por citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TNF- β 1 han sido involucradas en infecciones por VPH de alto riesgo persistentes y desarrollo de CaCu (Alcocer-González et al., 2006). La respuesta del sistema inmunológico, la cual involucra macrófagos, células NK juegan un papel importante en la primera línea de defensa

contra la infección por VPH (Rincón-Orozco et al., 2009). El IFN tipo I es un mecanismo de defensa antiviral clave, éste es activamente suprimido por proteínas virales E6 y E7 de VPH de alto riesgo, las cuales inhiben los patrones de señalización del receptor de IFN y previenen la activación de los genes de respuesta del IFN (Rincón-Orozco et al., 2009).

En mujeres infectadas con VPH de alto riesgo el nivel de células de Langerhans en el tracto genital disminuye (reducción de E-caderina por E6) (García-Chacón et al., 2009). Las células Treg CD4 actúan como los mayores mediadores de la tolerancia inmunológica periférica regulando la respuesta inmunológica de Th1 y Th2 (Adurthi et al., 2012). Las células Treg contribuyen a la producción de IL-10 Y TGF- β 1. La IL-10 inhibe la respuesta inflamatoria del hospedero y favorece el desarrollo tumoral (Bhat et al., 2011).

4.4.3 Historia natural de CaCu

La infección persistente puede ser definida detectando el mismo genotipo en 2 o más evaluaciones consecutivas cada 6 meses. Aclaramiento de la infección se considera tener más de 2 pruebas negativas para el mismo genotipo en intervalos de 6 meses después de una prueba positiva (Jaimsararn et al., 2013). Está estimado que el 80% de las personas sexualmente activas tuvieron una infección de VPH antes de los 45 años (Smith et al.,2008). Afortunadamente en un 80% de los casos la infección es transitoria y aclarada naturalmente en individuos inmunocompetentes 12-24 meses (Jaimsararn et al., 2013), los picos de infección fueron identificados en el inicio de la vida sexual hasta los 25 años (Bunni et al.,2010). Diversos estudios han reportado un segundo pico de infección en mujeres postmenopáusicas,

particularmente en África y América central (Yan et al.,2021). Se sugiere que la senescencia del control inmunológico celular, la reactivación de la infección viral latente y la adquisición de nuevas infecciones a través de la transmisión sexual están relacionadas con esta observación (Piña-Sánchez, 2022).

Syrjanen K, et al. Describen que la mayoría de las infecciones de VPH en mujeres mayores de 55 años están asociados con lesiones de alto grado y CCI (Cáncer cervical invasivo). Esto se debe a la inhabilidad para aclarar el virus y la transición de infección episomal a integración viral, así como la selección clonal (Syrjanen et al.,2008). El microbioma vaginal está relacionado con la capacidad de aclaramiento viral. *Lactobacillus iners* está asociado al aclaramiento viral, mientras que *Gardnerella* es la especie dominante de progresión (Usyk et al.,2020). El aclaramiento de la infección de VPH y la regresión de neoplasia intraepitelial cervical grado 2 (NIC II) y grado 3 (NIC III) , equivalente a HSIL, puede ser superior al 50% en mujeres jóvenes (Moscicki et al.,2020). Sin embargo, la infección persistente puede evolucionar hacia lesiones precursoras. Se estima que el lapso de tiempo entre la infección persistente por VPH y el desarrollo de lesión precursora o cáncer es de cinco a 15 años (Sudenga et al., 2013), y que el pico de detección de lesiones precursoras es alrededor de los 30 años de edad.(Vink et al., 2013). Aproximadamente el 60% de las lesiones de bajo grado regresan espontáneamente y entre el 5 y el 10% progresan a una lesión de alto grado. En promedio, el 33% de las lesiones de alto grado regresan y alrededor del 10% progresan a CPI (Sudenga et al., 2013). Se ha estimado que la persistencia con los VPH 16 y 33 aumenta el riesgo de desarrollar NIC III en 25 veces, en 10 veces con el genotipo 31 y en 6 veces para los genotipos 18 y 45 (Jaimsararn et al., 2013). Las mujeres con VPH16

o VPH18 y Papanicolaou normal tienen una probabilidad del 18 al 21% de progresar a NIC III a los diez años, mientras que, con otros genotipos, el riesgo se reduce al 1,5% (Khan et al.,2005).

En cambio, los genotipos 18, 33, 58 y 52 tienen un riesgo considerado intermedio (3,9-5%), y los genotipos 45, 51, 35/39/68 y 56/59/66 tienen un riesgo bajo (1,2-3,6). % (58) (Wheeler et al.,2006). El riesgo acumulado a dos años de desarrollar NIC III en pacientes con LSIL o ASCUS es del 39,1, 14,8 y 6,1 % con VPH 16, 31 y 18, respectivamente (Wheeler et al.,2006). Desarrollar NIC III a los cinco años con 16, 18, 31, 33, 35, 52 y 58 el riesgo disminuye al 6% para los otros genotipos de alto riesgo (Matsumoto et al.,2011).

La presencia de múltiples infecciones (más de un genotipo viral simultáneamente) es más frecuente en las lesiones precursoras que en las CCI (Vargas et al.,2018 Sin embargo, en poblaciones aisladas, es menos frecuente encontrar infecciones múltiples, por ejemplo, en amerindios en comparación con poblaciones mestizas (Vargas et al.,2018). Del total de casos positivos de VPH en lesiones precursoras de bajo y alto grado, el 70% presenta infecciones múltiples, mientras que, en ICC, solo el 30% (Aguilar-Lemarroy et al., 2015). Sin embargo, la importancia biológica y clínica de las infecciones múltiples sigue siendo controvertida. Matsumoto K, et al. informaron que las infecciones múltiples son más persistentes que las infecciones únicas, aunque el riesgo de progresión no aumenta (Matsumoto et al.,2011). Por el contrario, otros autores informaron que las infecciones por VPH múltiples se asocian con la persistencia viral y el desarrollo de lesiones de alto grado (De Brot et al., 2017; Kim et al.,2021).

Por lo tanto, el riesgo de progresión debe evaluarse considerando la presencia de múltiples infecciones, combinación de genotipos, edad, grado de lesión, ya que son factores determinantes en el desarrollo y progresión de la CCI (Vink et al.,2013). Se estima que el tiempo de progresión desde la lesión precursora hasta la CCI es de entre 20 y 26 años, y el 2% de las NIC II con VPH16 progresan en diez años (Vink et al.,2013).

4.4.4 Diagnóstico de CaCu

La prueba citológica de Papanicolaou sigue dando la pauta para el diagnóstico de lesiones cervicales precancerosas y/o la detección del carcinoma invasor, al igual que técnicas complementarias como colposcopia, biopsia, tipificación viral e inmunohistoquímica (Serman, 2010). La mayor parte de los métodos de identificación directa de infección por el VPH están basados en la detección del genoma del virus (Serman, 2010). De manera ideal, un método para la detección del DNA del VPH debe ser capaz de detectar, identificar y cuantificar la presencia de múltiples tipos del VPH (Serman, 2010). La tecnología disponible para la detección molecular del DNA viral consiste en sistemas de hibridación directa en soporte sólido (hibridación *in situ*, southern blotting), hibridación en soporte líquido (captura de híbridos) y los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos sintéticos específicos y/o consenso para su aplicación en métodos caseros y comerciales (Serman, 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el cribado primario basado en el VPH en mujeres de 30 a 65 años, ya sea como prueba primaria o en una prueba

conjunta (Force et al.,2018). Sin embargo, la Sociedad Estadounidense del Cáncer sugiere comenzar a los 25 años (Fontham et al.,2020).

Los sistemas de PCR de amplio espectro son los más utilizados en la detección de VPH y la mayoría están diseñados en la región L1, dado que es una de las regiones más conservadas dentro del genoma de los VPH (Lizano et al., 2009). La determinación de la carga viral se ha convertido en una necesidad debido a que los diferentes estudios realizados indican que un alto número de copias de DNA viral, o al menos del VPH del tipo 16, está relacionado con el incremento en el riesgo del desarrollo de una lesión cervical asociada al VPH (Lizano et al., 2009). Actualmente, no existe un consenso sobre cuál de los métodos disponibles es el más exacto para la cuantificación de DNA viral en una muestra, pero la metodología que se desarrolla con mayor rapidez y tiene importantes ventajas frente al resto es el método de PCR en tiempo real (Lizano et al., 2009).

4.5 microRNAs

Los miRNA son moléculas de RNA pequeños de cadena simple no codificados de 21-23 nucleótidos que regulan la expresión génica post-transcripcionalmente (Ebert et al., 2012). El primer miRNA animal, lin4 fue descubierto durante un escaneo genético de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) y se encontró que reprimía la expresión del gen codificante de proteína *lin-14* (Ambros et al., 1989). Los miRNAs son actualmente bien reconocidos por su importante papel en muchos procesos biológicos, los cuales han cobrado gran importancia como reguladores clave de la expresión génica, jugando un papel crítico en procesos como angiogénesis, enfermedades vasculares y tumorigénesis. Sin embargo, la

función de la mayoría de los miRNA aún se desconoce (Ambros, 2003). La degradación del RNAm puede ser iniciada por desadenilación, además del corte de secuencias específicas por ribonucleasas 1 (PMR-1) que también puede ocurrir (Jin et al., 2010). Los miRNA maduros eventualmente son transferidos a la Argonauta 2 y guiados hacia la actividad de RISC, donde para regular la traducción los miRNAs se unen con sus sitios diana en la región 3' UTR del RNAm (Lytle et al., 2007). Se ha reportado que la represión traduccional también puede ocurrir cuando el sitio diana se encuentre en la región 5'UTR del RNAm (Lytle et al., 2007).

4.5.1 Biogénesis de los microRNAs

La RNA polimerasa II, es la enzima responsable en la transcripción de los genes primarios de miRNA (pri-miRNA) (Borchert et al., 2006). Algunos miRNA humanos, que están rodeadas por repeticiones Alu son transcritos por la RNA transcriptasa III en lugar de la II. Estos transcritos que contienen pri-miRNA de varias kilobases de largo, tienen una brecha 5' 7-metilguanosina y una cola 3' poliadenilada similar al convencional RNAm (Cai et al., 2004) Los transcritos de pri-miRNA deben ser escindidos y empalmados durante la maduración de los miRNAs para formar miRNAs maduros (Duan et al., 2007). Los pri-miRNAs se transforman primero en un miRNA precursor de unos 70 nucleótidos de largo (Duan et al., 2007). En el interior del núcleo, los pri-miRNA son escindidos por un microprocesador miRNA compuesto de Drosha y DGCR8 (Duan et al., 2007). Drosha es una endonucleasa RNasa III que realiza la escisión a través de su dominio de la RNasa III (Duan et al., 2007). Para que el microprocesador reconozca el pri-miRNA, la conservación de la estructura del tallo de la horquilla pri-miRNA es esencial (Duan

et al., 2007). Se ha reportado que polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el tallo bloquean el proceso adecuado de Drosha (Duan et al., 2007). DGCR8 funciona como una regla molecular que permite a Drosha cortar en una posición precisa para formar el miRNA precursor (pre-miRNA) (Bohnsack et al., 2004). Después del procesamiento nuclear, el pre-miRNA se transporta hacia el citoplasma a través de la Exportina-5. La Exportina-5 reconoce al pre-miRNA no por su secuencia, si no por su tallo y horquilla característica saliente 3' (Bohnsack et al., 2004). Estos requerimientos de reconocimiento permiten solamente el transporte de los pre-miRNA correctamente procesados (Bohnsack et al., 2004). Con la unión de alta afinidad de la Exportina-5 al miRNA se protege tan pronto como se procesa por Drosha (Bohnsack et al., 2004).

Una vez dentro del citoplasma, el pre-miRNA se procesa adicionalmente generando un miRNA de doble cadena, la composición de una hebra madura y una cadena complementaria, este procesamiento es llevado a cabo por otra endonucleasa RNasa III, Dicer (Bernstein et al., 2003). Dicer tiene una PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) de dominio, que se une preferentemente a la saliente 3' de RNA monocatenario (Song et al., 2003). La distancia entre su dominio PAZ y dos dominios RNasa III es 65 angstrom, que es aproximadamente 25 nucleótidos de longitud de acuerdo con el análisis de la estructura cristalina (Song et al., 2003). Por lo tanto, después de la escisión del bucle terminal, el pre-miRNA de doble hebra es de aproximadamente 22-25 nucleótidos de longitud con 2 nucleótidos salientes en cada lado 3' (Song et al., 2003).

A raíz de la escisión por Dicer, se forma un dúplex miRNA pequeño. Dicer y sus proteínas asociadas TRBP o PACT disocian el dúplex miRNA. Sin embargo,

sólo una hebra del dúplex miRNA actuará como la hebra guía, la otra hebra del dúplex se refiere como la cadena complementaria y posteriormente se degrada (Macrae et al., 2008). El mecanismo de esta asimetría en hebra selección sigue siendo poco clara, pero se sospecha que la selección hebra está determinada por un complejo de ribonucleoproteína llamada complejo de silenciamiento de RNA inducido (RISC). RISC es compuesto de Dicer, TRBP para RNA vinculante y Argonata2 (Ago2) para la actividad catalítica (Macrae et al., 2008). Ago2 parece tener la capacidad de eliminar por cadenas complementarias para hacer un corte en la hebra endonucleolítica pasajera (Macrae et al., 2008). La degradación de la hebra pasajera facilita la carga de la hebra guía y la activación de RISC (Macrae et al., 2008). Experimentos de reconstitución *in vitro* han demostrado que no existen chaperones o cofactores distintos de los mecanismos básicos que sean necesarios para la formación de RISC (Macrae et al., 2008). Dicer, TRBP y Ago2 son los componentes básicos necesarios para el procesamiento de miRNA y su funcionamiento. Sin embargo, helicasas particulares pueden estar implicados en la facilitación de desenrollado de miRNAs específicos (**Figura.3**) (Lizano, 2009).

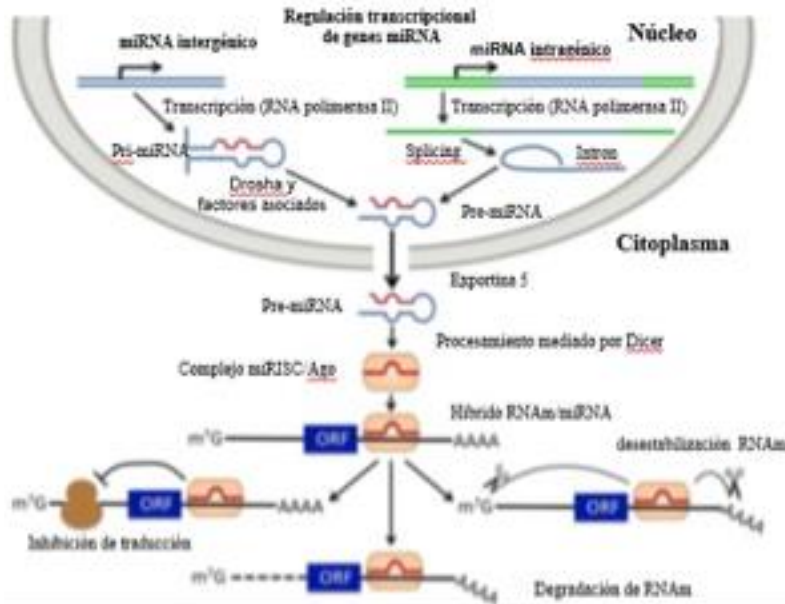


Figura 3. Biogénesis de miRNA. Fuente: Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Van Rooij and Olson, 2012. Los genes de microRNA generalmente se transcriben mediante la RNA polimerasa II (Pol II) para formar un transcrito cubierto y poliadenilado. El precursor de miRNA, denominado miRNA primario (primiRNA), forma una estructura de bucle en forma de horquilla que es escindida por la RNAasa III Drosha y región crítica 8 del síndrome de DiGeorge (DGCR8), que produce un miRNA precursor en forma de horquilla (pre-miRNA) que tiene ~70 nucleótidos de longitud. El pre-miRNA es exportado desde el núcleo al citoplasma, donde es escindido aún más por la enzima RNasa III Dicer, produciendo un dúplex imperfecto de miRNA-miRNA* de aproximadamente 22 nucleótidos de largo. Aunque cualquier cadena del dúplex puede actuar potencialmente como un miRNA; generalmente solo se incorpora una cadena al complejo silenciador inducido por RNA (RISC). Los miRNA incorporados en el RISC a menudo reconocen sus objetivos: 2 a 7 nucleótidos del miRNA (conocido como "región semilla"). La asociación de un miRNA con su objetivo de RNAm da como resultado la degradación del RNAm, así

como la inhibición de la traducción. Recientemente, los pseudogenes también han sido implicados en la regulación de la actividad de los miRNA. Las transcripciones de pseudogenes a menudo se conservan entre especies y muchas contienen sitios de unión de miRNA conservados, denominados RNA endógenos competitivos (ceRNA), que actúan como señuelos o esponjas al secuestrar los miRNA e impedir que se unan a sus objetivos de RNAm. Las condiciones de estrés pueden influir en la biogénesis de miRNA en múltiples niveles (indicados en la figura mediante rayos). lncRNA, RNA largo no codificante; m7G, 7-metilguanosa (una forma modificada de guanosa unida a los extremos 5' de los RNAm); ORF, marco de lectura abierto.

4.5.2 Acercamiento al blanco de miRNAs

- a. Oligonucleótidos anti-miRNA (AMOs). Moléculas de cadena simple que forman complementariedad directa y esto inhibe miRNAs específicos (Garzon et al., 2010).
- b. AntagomiRs. Son moléculas de cadena sencilla que son complementarios a miRNA, que puede ser modificado con 2'-O-metil colesterol conjugado en orden para mantener estabilidad mientras minimiza su degradación (Garzon et al., 2010).
- c. Esponjas de miRNAs. Funcionan utilizando sitios complementarios del 3'UTR del RNAm para un miRNA específico. Las esponjas competitivamente se unen a los miRNAs, interfiriendo con el blanco normal de miRNA (Ebert et al., 2010).

4.5.3 miRNAs como biomarcador de cáncer

Los miRNAs constituyen una clase de pequeños RNA que funcionan como reguladores transcripcionales de la expresión génica (Kozomara et al., 2019). Aunque son pocos en número (< 2000 miRNA humanos), una tercera parte de los transcriptomas celulares están regulados por miRNA (Cortez et al., 2011). Los miRNAs juegan un papel importante en la mayoría de los procesos celulares y de desarrollo y han sido asociados a una gran cantidad de enfermedades (Cortez et al., 2011). Desde el descubrimiento de los miRNAs extracelulares y circulantes, su estudio en biofluidos como suero, plasma, orina y fluido cerebroespinal ha sido rápidamente expandido (Cortez et al., 2011) debido a su amplio potencial biológico y al hecho de que los miRNA parecen ser muy estables en estos biofluidos, estas pequeñas moléculas son candidatos primarios para el uso como biomarcador no invasivo en el diagnóstico molecular de enfermedades y en otras condiciones clínicas como daño de órganos, así como en ensayos toxicológicos preclínicos de

seguridad de medicamentos (Mitchell et al., 2008; Kosaka et al., 2010; Wang et al., 2010; Hanash et al., 2011).

El papel preciso de los miRNA circulantes permanece desconocido. Los miRNAs circulantes o extracelulares han demostrado ser estables y protegidos de la degradación de la RNAasa por inclusión en varios complejos de proteínas o partículas membranosas como microvesículas o exosomas (Collino et al., 2010; Wang et al., 2010; Arroyo et al., 2011). Al parecer, son un subconjunto de miRNAs celulares libres presentes en sangre normal con posibles funciones en el sistema circulatorio e inmunológico (Vasilatou et al., 2010). El perfil de miRNA en suero y plasma se ha presentado en estados de enfermedad como cáncer (Bryant et al., 2012).

4.5.4 miRNAs circulantes

Los miRNAs circulantes están presentes en fluidos corporales extracelulares humanos, incluyendo sangre periférica, orina, saliva, leche materna y semen (Weber et al., 2010; Wang et al., 2013). Éstos se encuentran encapsulados en vesículas extracelulares o libres no asociados a vesículas en plasma y suero (Ismail et al., 2013; Chen et al., 2012). Vesículas circulantes extracelulares son referidos como exosomas, macropartículas o microvesículas (Ismail et al., 2013). Las vesículas extracelulares transportan las moléculas de RNA a sus células blanco, éstas sirven como un conducto para comunicación intercelular (Ismail et al., 2013). Los miRNAs en circulación parecen mantener la homeostasis y cuando se encuentran desregulados pueden jugar un papel central en la patogénesis de la enfermedad (Landi et al., 2010; Cho et al., 2011; Ezzie et al., 2012). Adicionalmente

miRNAs circulantes regulan genes involucrados en diferenciación celular, proliferación, apoptosis, regulación inmunológica y cáncer (Mo et al., 2012; Ismail et al., 2013).

Inicialmente los miRNA en circulación participan como biomarcadores, encontrándose éstos en pacientes con tumores prostáticos (Mitchell et al., 2008). Las vesículas extracelulares también pueden ser liberadas al sistema inmunológico y células parenquimales como células endoteliales y células epiteliales en respuesta al sitio del tejido patológico (Hunter et al., 2008). La presencia de miRNA en circulación es un proceso homeostático debido a lesión celular, con la finalidad de mediar el proceso inflamatorio y por tanto reparación tisular (Hunter et al., 2008).

Los miRNAs son sobreexpresados en tejido de pulmón en respuesta a una lesión para asistir en la remodelación y reparación de tejido (Nana-sinkam et al., 2009). Biopsias de rutina de pulmón para el vigilancia de la enfermedad y respuesta a la terapia presentan sus propios retos y aumentan la necesidad de biomarcadores accesibles (Wang et al., 2015). Diversos estudios han revelado que los miRNAs son secretados fuera de la célula y su significancia biológica ha empezado a ser reconocida (Pegtel et al., 2010). La comunicación célula-célula es mediada no solamente por proteínas, como citosinas, quimiocinas y hormonas sino también por RNA (Kosaka and Ochiya, 2012).

Los RNAm y miRNAs son secretados a circulación corporal. Los miR-141, miR-149, miR-299-5p y miR-135b son encontrados en placenta y plasma materno, mostrando disminución de estos después del parto (Lawrie et al., 2008). Por otra parte, los niveles séricos de miR-155, miR-210 y miR-21 en pacientes con linfoma

difuso de linfocitos B grandes en comparación a un grupo control sano mostraron una mayor expresión (Lawrie et al., 2008).

Un estudio reciente mostró que el mecanismo de transferencia horizontal de miRNA no es solamente dependiente de transferencia por vesículas, como exosomas, sino también a través de herramientas de conexión intercelular, como uniones gap y proteínas de unión de RNA (Lim et al., 2011; Arroyo et al., 2011). Los miRNA son transmitidos del estroma de la médula ósea a células cancerosas de mama vía unión gap y exosomas en células tumorales quiescentes (Lawrie et al., 2008), asimismo se empleó una técnica de centrifugación diferencial y cromatografía de exclusión de tamaño para caracterizar miRNA circulantes en plasma y suero humano y encontraron que la mayoría eran miRNA cofraccionados con proteína Ago2; complejos de proteína y no dentro de vesículas, esto fue confirmado por otros grupos que mostraron que la Ago2 (Arroyo et al., 2011), o nucleofosmina 1 son transportadores secretados de miRNA (Wang et al., 2010).

En tejido fibrótico de pulmón, el bloque miR-17-92 es disminuido para permitir la expresión de genes asociados con fibrosis, incluyendo colágeno, metaloproteinasas, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y tromboplastina (Concepción et al., 2012; Dakhlallah et al., 2013).

4.5.5. Detección de miRNAs en fluidos corporales en pacientes con cáncer VPH-positivos

El uso de fluidos corporales como saliva, sangre y sudor como biomarcadores de relevancia clínica están emergiendo en el diagnóstico molecular (Salazar et al.,

2014). Por ejemplo, la detección de cánceres orofaríngeos se realiza mediante muestras de saliva (Salazar et al., 2014; Chai et al., 2016; Sun et al., 2017) la cual ha demostrado albergar miRNAs tumor específico como miR-191, miR-9, miR-222 en cánceres de cabeza y cuello (Salazar et al., 2014). Los exosomas son fundamentales para entender comunicación intracelular durante la transformación oncogénica mediada por el VPH (Lee et al., 2012). Los exosomas son de 50 a 100 nm y estas vesículas encapsulan miRNAs (Lee et al., 2012). Los exosomas comúnmente provienen de endosomas y son secretados en fluidos corporales como saliva, sangre o suero (Gocze et al., 2013). Como un modo de comunicación celular se ha referido como propagación horizontal de moléculas como proteínas, mRNA, miRNAs (Gocze et al., 2013). Ha sido reportado la abundancia de miRNAs en plasma, los cuales representan casi la mitad de los miRNAs desregulados en células cancerígenas VPH positivas (Overmeer et al., 2011). Los miRNAs exosomales más significativos en cánceres VPH positivos incluyen miembros de la familia miR-378 (miR-378a-3p, miR-378c), familia miR-let-7 (let-7a-5p, let-7d-5p, let 7f-5p, let 7g-5p (57), familia miR-99 (miR-99-5p, miR-100-5p), y bloque miR-17-92 (miR-20a-5p, miR-92a-3p) (Honegger et al., 2015). Estos miRNAs presentan un patrón de expresión diferencial, por ejemplo, let7d-5p, miR-20a-5p, miR-378-3p, miR-423-5p, miR-7-5p y miR-92a-3p mostraron subregulación a diferencia del miR-21-5p que fue encontrado sobre regulado bajo el silenciamiento de E6/E7 (Honegger et al., 2015).

4.5.6. miRNAs y CaCu

Los miRNAs, con base en su patrón de expresión en tumores, son clasificados como oncogénicos o supresores de tumor (Gómez-Gómez et al., 2013).

Asimismo, algunos miRNAs en la célula poseen características de supresor de tumor/pro-apoptótico, mientras que otros tienen un papel de anti-apoptótico/promoción-proliferación (Gómez-Gómez et al., 2013). En el CaCu, la infección por VPH de alto riesgo puede afectar el patrón de expresión de miRNAs, esto a través de las oncoproteínas E5, E6 y E7, lo cual contribuye en la patogénesis viral (Gómez-Gómez et al., 2013). Se ha observado que el perfil de expresión de miRNAs en el CaCu es distinto al del tejido normal, por lo que su expresión de miRNAs puede servir como biomarcador de diagnóstico y pronóstico de cáncer (Wang et al. 2008). Un estudio previo publicado por Greco et al., mostraron que los queratinocitos VPH16 positivos que expresan E5 son capaces de subregular miR-203 y miR-324-5 y sobrerregular miR-146a (Greco et al., 2011). Por otra parte, es conocido que la expresión activa de E6 y E7 es requerida para incrementar la capacidad de proliferación de células malignas y diferenciación desacoplada a través de reguladores prominentes en el control de la progresión del ciclo celular (Zheng et al., 2011). El núcleo central del modelo clásico E6/E7 es la unión y desactivación de las proteínas tumor supresor p53 y pRB, respectivamente, afectando patrones moleculares involucrados en la carcinogénesis cervical (Zheng et al., 2011). Por ejemplo, señalización autoproliferativa, evasión de supresión de crecimiento, evasión de muerte celular programada e inmortalidad replicativa, entre otras. Además, ha sido demostrado que las interacciones complejas entre E6 y E7 de HR-HPV involucran la activación de factores de transcripción, como E2F y c-Myc, los cuales pueden promover la transactivación de la expresión de miRNA (Zheng et al., 2011). Por lo tanto, es concebible que la expresión de oncoproteínas virales puedan modular los niveles de expresión de miRNAs mejorando las alteraciones

progresivas llevando a cáncer invasivo y fenotipo radiorresistente. Yeung et al. demostraron que miR-23b está subregulado por el blanco de E6 activador de plasminógeno tipo urokinasa (Upa), el cual está sobreexpresado en el CaCu. Por lo tanto, los niveles disminuidos de miR-23b, incrementan la expresión de uPA y así induce la migración de células derivadas del CaCu (Au et al., 2011). Además, un sitio de unión consenso de p53 fue detectado en la región promotora de miR-23b, por lo tanto, miR-23b/uPA están involucrados con VPH16 E6 en el desarrollo de CaCu (Au et al., 2011).

Múltiples miRNAs tienen expresión alterada en células de CaCu HR-HPV positivas comparado con células CaCu VPH negativas o tejidos cervicales normales (Martínez et al., 2008; Wang et al., 2009). Calin et al. reportaron que un bloque de sitios de fragilidad (FRAs) en el cromosoma 17q23 contiene 3 eventos de integración VPH16 y 4 genes de miRNAs (miR-21, miR-301, miR-142 y miR-142a), ellos concluyeron que estos miRNAs son posibles blancos de tal integración viral que puede llevar a la desregulación de expresión de miRNAs (Calin et al., 2004). Es conocido que un número significativo de miRNAs están localizados en FRAs y estos sitios son preferenciales de integración de VPH16, cromátidas hermanas, intercambio, translocación, delección y amplificación en tumores cervicales (Calin et al., 2004). Adicionalmente las líneas celulares caski VPH16 positivas y SiHa VPH positivas y carcinoma de células escamosas (SCC) presentan sobreexpresión de miR-21 comparado con tejido normal VPH negativo, lo cual puede indicar que la sobrerregulación de miR-21 pueda deberse a la integración del VPH (Martínez et al., 2008). Sin embargo, una comparación directa de perfiles de expresión de miRNAs en líneas celulares VPH16 integradas contra episomales no revelaron diferencia

significativa (Martínez et al., 2008). Algunos miRNAs son similarmente desregulados en líneas celulares VPH16 y VPH18 positivas (Martínez et al., 2008).

Líneas celulares SiHa y Caski VPH16 positivas han mostrado una sobreexpresión de miR-182, miR-183 y miR-210. En contraste miR-1, miR-126, miR-133b, miR-143, miR-145, miR-195, miR-214 están subexpresados en líneas celulares comparado con tejido cervical normal (Gómez-Gómez et al., 2013).

Línea celular HeLa VPH18 positivas muestra sobreexpresión de miR-182 y miR-183, mientras que miR-1, miR-133b, miR-143, miR-145, miR-214 está subexpresado en esta línea celular comparado con tejido cervical normal (Gómez-Gómez et al., 2013).

4.5.6.1 Regulación de la expresión de miRNAs por la oncoproteína E7

Los niveles elevados de miRNAs oncogénicos y la baja expresión de miRNAs supresores de tumor en el CaCu está frecuentemente asociada a la infección por VPH de alto riesgo, por lo que la alteración de expresión de miRNAs también está ligada a la expresión de las oncoproteínas virales (Gómez-Gómez et al., 2013). La oncoproteína E7 del VPH16 induce la expresión de miR-15b en CaCu (Myklebust et al., 2011). Es conocido que E7 induce la degradación de pRB, lo que ocasiona que se libere E2F del complejo pRB-E2F. E2F libre puede llevar a cabo su función de factor de transcripción de genes relacionados con proliferación, asimismo se ha reportado que la expresión de miR-15a, miR-15b y miR-16 es regulada por E2F1 y E2F3 (Myklebust et al., 2011), lo que sugiere que la oncoproteína induce la alta expresión de los mencionados miRNAs a través de la vía E2F (Gómez-Gómez et al., 2013). La oncoproteína E7 del VPH16 es también capaz de inducir la alta

expresión de miR-27b para promover la proliferación e invasión en el CaCu (Zhang et al., 2015). Estos datos sugieren que la inducción de la alta expresión de miR-27b por la oncoproteína E7 en CaCu es para promover proliferación celular e invasión de las células de carcinoma cervical (Zhang et al., 2015).

Para reflexionar en el riesgo relativo de progresión de CaCu, las lesiones NIC I son hoy en día conocidas como lesiones de bajo grado, mientras que NIC II/III son lesiones de alto grado (Mccredie et al., 2008). Sin embargo, las lesiones de alto grado pueden aumentar bastante rápido por una infección de VPH de alto riesgo (2-3 años), subsecuente desarrollo de carcinoma invasivo puede tomar una o más décadas (Mccredie et al., 2008), indicando que lesiones NIC II-III representan una enfermedad heterogénea. Casi todas las lesiones de alto grado y prácticamente todos los carcinomas se asocian con el llamado HR-HPV transformante, el cual es caracterizado por desregular la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 en la proliferación de células suprabasales del epitelio (Tian et al., 2014). Se presenta inestabilidad genómica debido a la presencia de una infección transformante que termina resultando en la acumulación de cambios epigenéticos específicos en el genoma de la célula hospedera conduciendo a la progresión de fenotipo maligno (Tian et al., 2014). Sharma et al., identificó un total de 246 miRNAs que se encontraron subregulados en cáncer cervical, miR-21, miR-143, miR-145, miR-214 y miR-218. Tian et al., publicaron un análisis de un panel de miRNAs candidatos en citologías VPH positivas de pacientes que acudieron a una clínica ginecológica (Tian et al., 2014). miRNAs candidatos analizados por Tian et al., se expresaron diferencialmente durante la progresión de la enfermedad (Tian et al., 2014). Una combinación de miR-375 y miR-424 resultaron en una buena detección de NIC III,

el análisis complementario de miRNAs pueden mejorar la detección de enfermedad cervical (Babion et al., 2018). La combinación del perfil de miRNA con genotipo VPH16/18 pueden mejorar aún más la detección de lesiones precancerosas cervicales (Babion et al., 2018).

4.6. VPH altera expresión de miRNAs

La expresión de miRNA ha sido reportada en tejidos y líneas celulares de cáncer cervical (Martínez et al., 2008; Greco et al., 2011). Numerosos estudios han encontrado una correlación significativa entre miRNA y los patrones de expresión de cáncer cervical (Lui et al., 2007; Martínez et al., 2008; Wang et al., 2008; Hu et al., 2010; McBee et al., 2011; Rao et al., 2012; Zhou et al., 2017; Kozomara et al., 2019; Sun et al., 2022). Diversos miRNA han sido desregulados en tumores cervicales como miR-21, miR-127, miR-145, miR-143, miR-155, miR-199, miR-146a, miR-196, miR182, miR-29a, miR-15a, miR-16, miR-214, miR-218 y miR-203, entre otros, algunos de estos miRNAs han sido descritos en la literatura como influyentes en procesos neoplásicos de una variedad de cánceres (Lui et al., 2007; Martínez et al., 2008; Wang et al., 2008; Hu et al., 2010; McBee et al., 2011; Rao et al., 2012; Zhou et al., 2017; Kozomara et al., 2019; Sun et al., 2022).

La expresión alterada de miRNAs en diferentes tipos de cánceres ha sido estudiada como marcador de un posible diagnóstico y tratamiento (Wang et al., 2014). Los VPH inducen expresión aberrante de muchos miRNA celulares y la infección por VPH-18 produce miRNAs virales no detectables (Wang et al., 2014). Los miRNAs fueron específicamente regulados por VPH-16 y VPH-18 en cultivos

poco comunes de queratinocitos vaginales determinados por microarreglos en combinación con secuenciación de miRNA (Wang et al., 2014).

Las oncoproteínas virales E6 y E7 de VPH de alto riesgo desestabilizan 2 proteínas celulares supresoras de tumores, p53 y retinoblastoma (pRB), ambas proteínas funcionan para soportar la fase productiva de la diferenciación postmitótica de células escamosas sin embargo, la expresión repetidamente elevada de VPH de alto riesgo E6 y E7 en células epiteliales no diferenciadas o células madre interrumpen la regulación del ciclo celular, inhiben la diferenciación celular, inducen daño cromosómico y previenen la apoptosis resultando en inmortalización celular y transformación, la base de la carcinogénesis de VPH (Roman et al., 2013). La expresión de HR-HPV E6 y E7 es consistentemente elevada en cáncer cervical (Wang et al., 2014).

4.6.1. miR-145-5p

El miR-145 se encuentra en el cromosoma 5q32 y contiene 2 subtipos miR-145-5p y miR-145-3p (Kozomara et al. 2014) en la base de datos de secuenciación referida en miRbase (Kozomara et al. 2011). El miR-145-5p tiene una expansión mayor que miR-145-3p (Schaefer et al. 2010; Pecqueux et al. 2016; Azizmohammadi et al. 2017). Substancialmente la información obtenida en estudios previos ha demostrado que miR-145 está subregulado en varios tumores y corresponden a líneas celulares y es considerado como tumor supresor (Schaefer et al. 2010; Pecqueux et al. 2016; Azizmohammadi et al. 2017).

La subregulación de miR-145 está asociado a baja sobrevida en cáncer colorrectal, glioma, osteosarcoma, pero no en cáncer pulmonar, cáncer cervical,

cáncer esofágico y cáncer de mama (Wang et al. 2008). Se observó que el miR-145 está subregulado en CaCu (Wang et al. 2008). Un estudio previo demostró que el miR-145 puede suprimir la migración celular e invasión en células HeLa (Xing et al. 2013). El miR-145 suprime la expresión de su gen blanco CDK6 (proteína cinasa dependiente de ciclina) y la proliferación de células HeLa (Zhang et al. 2014). Estos resultados sugieren que miR-145 sirve como tumor supresor y la subregulación de miR-145 en CaCu puede resultar en pobre pronóstico (Zhang et al. 2014). P53 conocido como tumor supresor se une al elemento respuesta p53 en el promotor de miR-145 y facilita la transcripción de miR-145 (Spizzo et al. 2010). La invasión vascular juega un papel importante en la progresión de CaCu. Un estudio previo encontró que el miR-145 es el miRNA más abundante en células vasculares del músculo liso (Ji et al. 2007).

Se ha reportado que un número creciente de miRNAs circulantes están desregulados en etapas tempranas del cáncer (Wang et al. 2008). La expresión alterada puede ser observada antes de los síntomas o biopsia. El miR-145 en plasma está incrementado en pacientes de cáncer de pulmón de células pequeñas en etapa I y II (Wang et al. 2008). Lajer et al, 2012 identificaron al miR-145 dentro de un conjunto de miRNAs controlados VPH- y observaron que está subregulado en carcinoma de células escamosas cervicales (CSCC) así como en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello VPH+ (Wang et al. 2008).

Los miR-143 y miR-145 mostraron previamente suprimir el crecimiento celular en CSCC y por lo tanto su implicación en carcinogénesis cervical (Wang et al. 2008). La regresión del miR-143-145 pudiera ser resultado del oncogén E6 del VPH (Lajer 2012). Los Niveles reducidos de miR-195, miR-143, miR-145 pudieran

ser secundarios a la pérdida de p53/p63/p73 dependiente de E6 que normalmente regulan los miRNAs (Xu et al. 2019). La expresión del miR-145 está disminuida en pacientes con etapas avanzadas de CaCu; significativamente más bajo en pacientes con metástasis a nódulo linfático que en pacientes con metástasis a nódulo linfático negativo e invasión vascular de CaCu, el cual se analizó la expresión de tejido de cáncer cervical y tejido de tumor adyacente mediante qRT-PCR (Xu et al. 2019). La expresión del miR-145 fue más baja en tejido de cáncer cervical comparado con el tejido adyacente no tumoral (Xu et al. 2019).

4.6.1.1 Regulación del miR-145

Evidencia reciente mostró que p53 estimula la expresión del miR-145, interactuando con un elemento de respuesta p53 (p53RE) en el promotor del miR-145. Además, el miR-145 flanquea directamente al oncogén c-Myc (Sachdeva et al. 2009). El miR-145 desempeña un papel crítico en la regulación transcripcional de c-Myc por p53 (Sachdeva et al. 2009). Adicionalmente c-Myc incrementa la expresión de p53 a través de p19Arf (Meng et al. 2015). Está claro que c-Myc también interviene en la transcripción de genes de miRNAs. Además, c-Myc se une a la caja E del promotor del bloque miR-17-92 y promueve su transcripción (Davis et al. 2009). También se ha observado que c-Myc reduce la expresión de varios genes de miRNAs tumor supresor, incluyendo los miR-15a, miR-29, miR-34 y familias let-7 (Davis-Dusenbery et al. 2010). El tumor supresor miR-145 puede ser regulado por fosfatoinositidín 3-quinasa (PI-3K) /Akt y patrones p53, en donde la expresión específica de PI3K/Akt causa la sobrerregulación de miR-145 de manera dependiente de p53 (Sachdeva et al. 2009). La expresión del miR-145 regula a la

proteína p53 flanqueando permanentemente importantes mediadores (Vijayakumaran et al. 2015). Por ejemplo, E3 ubiquitina ligasa, MDM2 como el principal regulador negativo de p53, el cual es blanco de miR-145 para su degradación (Vijayakumaran et al. 2015). MDM4, es otro inhibidor importante de la actividad transcripcional de p53. Existe una regulación de circuito positivo entre el miR-145 y p53, en parte por la retroalimentación de p53-MDM2 (Vijayakumaran et al. 2015). Esta es la razón por la cual el miR-145 se encuentra subregulado en cánceres con p53 mutado (Vijayakumaran et al. 2015). C-Myc reduce la expresión de miR-145 por la activación de miR-17-92, seguido de la inhibición de PTEN, después del patrón de señalización PI3K, vía activación de MDM2 e inhibición de p53 disminuye la expresión del miR-145. Por otra parte, Boyi Gan et al. mostraron que FoxOs modulaba la actividad de Myc y su expresión por modulación transcripcional del Mxi-SR α y miR-145 (Kent et al. 2010; Karimi et al. 2017). Otro mecanismo que regula la expresión de miR-145 a través del patrón Ras. Se ha observado que la señalización k-Ras, contribuye a la subexpresión del bloque miR-143/145 por la activación de RREB1 directamente suprimiendo la función del promotor miR-143/145 e induce k-Ras (Kent et al. 2010; Karimi et al. 2017).

Glucocorticoides modulan p53 dependiente de expresión de miR-145 en células de cáncer cervical VPH positivas a través de la inducción de la proteína E6 (Shi et al., 2012). El tratamiento de línea celular HeLa de carcinoma cervical humano VPH18 positivo con cortisol causó una subregulación de miR-145, el nivel de p53 disminuyó significativamente, mientras que la expresión de E6 aumentó insinuando que el cortisol puede subregular el nivel de miR-145 vía inhibición de expresión de p53, adicionalmente, el efecto supresivo de cortisol en la expresión de p53 fue

también observada en línea celular de cáncer cervical VPH16 positivas Caski y SiHa (Shi et al., 2012). Se ha observado que p53 transcripcionalmente induce la expresión de miR-145 en líneas celulares de mama y cáncer de colon MCF-7 y HCT-116 (Sachdeva et al., 2009). miR-145 suprime la expresión de c-Myc, IRS-1 y MUC-1. Es conocido que p53 puede suprimir la expresión del oncogén c-Myc a nivel transcripcional y traduccional induciendo miR-145 (Sachdeva et al., 2009). El efecto de miR-145 en la expresión c-Myc se podría revertir completamente invertida por inhibidores de miR-145 puede cooperar con p53 y reforzar el potencial de p53 para inhibir actividades oncogénicas (Sachdeva et al., 2009).

miR-145 se ha encontrado como tumor supresor en diferentes tipos de cánceres, es regulado por p53 de manera dependiente o independiente de la transcripción (Sachdeva et al., 2009; Suzuki et al., 2009). Un análisis de microarreglos mostró que la expresión de miR-145 se perdió en carcinoma cervical, sin embargo, los mecanismos de subregulación de miR-145 son poco claros (Shi et al., 2012). La invasión y migración de células de cáncer cervical fueron significativamente inhibidas por la sobreexpresión de miR-145, confirmando la significancia funcional de miR-145 en el desarrollo y progresión de CaCu (Shi et al., 2012).

El miR-145 se encuentra subregulado bajo la expresión de Kras. La señalización de Kras lleva a la represión del bloque miR-143/145 y reducción de la expresión, lo cual es necesario para mantener el potencial tumorigénico en células de cáncer pancreático (Kent et al., 2010). Evidencia significativa indica que miR-143/145 poseen actividad tumor supresor (Akao et al., 2007). Expresión reducida de miR-143/145 es un atributo común de diversos tipos de cáncer como carcinoma

de colon (Akao et al., 2007). La expresión de estos miRNAs inhibe proliferación y activa apoptosis de células de cáncer in vitro e in vivo (Kent et al., 2010). La expresión RREB1 fue reducida bajo la sobreexpresión de miR-145 en células pancreáticas (Kent et al., 2010).

Expresión de miRNAs reduce fosforilación de ERK1/2 (indicativo de señalización MAPK) y AKT (Chen et al., 2009; Sachdeva et al., 2009). Esta expresión de miR-143/145 suprime la actividad del patrón Ras. MiR-143/145 están bien documentados efectos antiproliferativos y proapoptóticos a través de su habilidad de negativamente regular a genes blancos, incluyendo MYC, IRS-1 y ERK5 (Chen et al., 2009; Sachdeva et al., 2009).

Los miR-145, miR-195, miR-218, miR-376a y miR-376b, que están subregulados en CaCu en comparación con el cuello uterino normal. En cuanto al SIL, aunque sólo existen pocos informes disponibles, algunos miRNA se han descrito en más de un estudio con el mismo estado de expresión (Pereira et al., 2010). miR-10a, miR-21, miR-146a y miR-196a se sobreexpresó en tejidos LSIL y HSIL, mientras que miR-99a, miR-143, miR-145 y miR-218 están regulados negativamente en muestras SIL (Pereira et al., 2010).

4.7.1 miR-148b-3p

Los miR-148a, miR-148b y miR-152 representan a los miembros de la familia miR-148/152, los cuales están localizados en los cromosomas humanos 7,12,17 y en ratón en los cromosomas 6,15 y 11 (Coordinators, 2017). Interesantemente, miR-148b y miR-152 se encuentran en el mismo contexto genómico, precisamente intergénicamente en el complejo proteínico subunidad zeta (COPZ) genes en

homosapiens y *Mus musculus* indicando que es una familia de miRNA muy conservada (Lagos-Quintana et al., 2002).

Se observaron bajos niveles de miR-148b, en estado basal (Enerly et al., 2011) y tumor de mama ERBB2+/ER-/PR-, lo cual sugiere su intervención en malignidad (Mattie et al., 2006). El miR-148b ejerce su función supresor-metástasis principalmente controlando el movimiento celular (Ma et al., 2008). Expresión ectópica de miR-148b en células tumorales malignas lleva a una disminución en el crecimiento tumoral, niveles altos de miR-148b llevan a una adhesión fuerte y anoikis y reducción de invasión *in vitro* (Ma et al., 2008). Además, *in vivo* miR-148b reduce fuertemente extravasación y colonización pulmonar poco después de inyección de células en circulación sanguínea, cuando la proliferación no tiene tiempo de jugar un papel importante (Ma et al., 2008). En general, está bien aceptado que los miRNAs tienen funciones pleiotrópicas y, por lo tanto, puede actuar en eventos independientes, como la formación de tumores y progresión a través de la activación / represión de una cascada selectiva y limitante de genes específicos (Ma et al., 2008).

Genes relevantes en progresión tumoral; CTSA, NRPI, CSF1, MMP15 y ITGA5, todos ellos suprimidos por miR-148b, ITGA5, ROCK1, PIK3CA/p110 α y NRAS son directamente subregulados por miR-148b, lo cual sugiere un control específico de estos miRNAs en un patrón conocido por estar involucrado en diseminación de metástasis y respuesta de quimioterapia (Cimino et al., 2013). ITGA5 y ROCK1 se encontraron sobreexpresados en tumor maligno de mama y son conocidos por incrementar crecimiento tumoral o progresión (Cimino et al., 2013).

miR-148b es un supresor de progresión tumoral y modulador de respuesta a quimioterapia actuando vía integrina (Cimino et al., 2013).

El miR-148b parece ser un importante regulador en cáncer de mama (Cimino et al., 2013). Teniendo como blanco jugadores principales de señalización de integrina como ITGA5, ROCK1, PIK3CA/p110 α y NRAS, miR-148b controla un patrón involucrado en crecimiento tumoral y metástasis, adicionalmente, miR-148b, ha demostrado regular el factor 1 estimulante de colonia y está potencialmente asociado a conexiones tumorales tumor-stroma (Cimino et al., 2013).

En células pancreáticas, expresión de miR-148b se correlaciona directamente con un peor pronóstico y reducción de sobrevida de pacientes, sugiriendo algunas funciones reguladoras cruciales de miR-148b en esta entidad tumoral (Zhao et al., 2013). Zhao et al. Encontraron actividad elevada de protein cinasa α 1 activada por AMP (AMPK α 1) en tejido de cáncer de páncreas y líneas celulares los cuales fueron asociados con niveles reducidos de expresión de miR-148b (Zhao et al., 2013). knockdown de AMPK α 1 por miR-148b incrementó apoptosis, arresto del ciclo celular e inhibición de invasión celular (Fiedrich et al., 2017). miR-148b, un bucle de retroalimentación con DNA metiltransferasa (DNMT1) existe en diferentes tipos de tumores (Huang et al., 2010; Zhu et al., 2012). La sobreexpresión del miR-148b-3p inhibe la proliferación de células de cáncer cervical posiblemente induciendo la fase G1/S del ciclo celular (Mou et al. 2016). La sobreexpresión del miR-148b induce apoptosis de células de CaCu, aparentemente de una manera dependiente de caspasa-3 (Mou et al. 2016).

El miR-148b está subregulado en CaCu y su sobreexpresión significativamente disminuye la expresión de DNMT1 (Mou et al. 2016). La

sobreexpresión del miR-148b inhibe la viabilidad celular, el crecimiento e invasión de cáncer cervical, así como la inducción de apoptosis (Mou et al. 2016). Estos efectos pueden ocurrir regulando la expresión de ciclina D1 y proteína caspasa-3 (Mou et al. 2016). Diversos miRNAs como los miR-21, miR-148a, miR-152, miR-148b y miR-140 han sido identificados como reguladores potenciales de traducción de DNMT (Pan et al. 2010; Takata et al. 2013; Azizi et al. 2014), así como supresión y proliferación e inducción de apoptosis (Song et al. 2011; Wu et al. 2012). La expresión de miR-148b fue mostrada en diferentes tipos de cáncer como cáncer de mama y cáncer pancreático (Cimino et al. 2013).

4.7.1.1. Cáncer de mama

El miR148-b parece ser un gran regulador de cáncer de mama. Mientras que directamente flanquean reguladores clave de la señalización de integrina como ITGA5, ROCK1, PI3KCA/p110 α , así como NRAS. El miR148-b controla el patrón involucrado en crecimiento tumoral y metástasis (Cimino et al. 2013). Adicionalmente el miR148-b mostró estimular el factor estimulante de colonias 1 y, por lo tanto, está potencialmente asociado con interacciones del tumor del estroma celular (Cimino et al. 2013).

4.7.1.2. Cáncer pancreático

En pacientes con cáncer pancreático, la expresión del miR148-b se correlaciona con un peor pronóstico y reducción en la supervivencia de vida de los pacientes, sugiriendo funciones reguladoras del miR148-b en esta entidad tumoral (Zhao et al. 2013). Niveles elevados de la proteína AMP activada por protein cinasa

$\alpha 1$ (AMPK $\alpha 1$) en tejido de cáncer de próstata y líneas celulares, estuvieron asociados con disminución de la expresión del miR148-b (Zhao et al. 2013).

El miR-148b se ha identificado como un importante regulador de traducción de DNMTs directa o indirectamente flanqueando la expresión de DNMT1 (Azizi et al., 2014; Pan et al., 2010; Takata et al., 2013). miR-148b pertenece a la familia miR-148/152, los cuales están involucrados en varios procesos (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2014; Azizi et al., 2014). Está demostrado que miR-148b es responsable de tumorigenesis, metástasis distante y pobre pronóstico en cáncer (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2014; Azizi et al., 2014), así como supresión de proliferación e inducción de apoptosis (Song et al., 2011; Wu et al., 2012). Sin embargo, su expresión y su papel potencial funcional en CaCu es poco entendido (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2014; Azizi et al., 2014). Mou et al. Confirmaron en su estudio que miR-148b protege contra CaCu regulando la expresión de ciclina D1, la activación de caspasas lleva a un declive de proteínas que son claves para la sobrevivencia celular (Mou et al., 2016).

Subregulación de miR-148b fue asociado con malos resultados en pacientes con carcinoma hepatocelular (Ziari et al., 2016). Zhang et al encontraron que una disminución en la expresión de miR-148b en carcinoma hepatocelular predice mal pronóstico, subregulación de miR-148b incrementa progresión de cáncer con una avanzada invasión de venas y etapa TNM (Zhang et al., 2014).

El miR-148b específicamente suprime la ruta HR en la fase G1. Estos miRNAs tienen como blanco los transcritos de los factores de recombinación homóloga (HR), BCRA1, BCRA2 y RAD51, e inhibiendo miR-148b incrementa la expresión de BCRA1, BCRA2 y RAD51 específicamente en la fase G1 llevando a la

reparación deteriorada del rompimiento de doble cadena de DNA (DSB) (Choi et al., 2014). miR-148b impacta en la eficacia de reparación del DNA impidiendo la recombinación homóloga de DSBs (Choi et al., 2014). Puede haber una sobrerregulación de los factores de recombinación homóloga por la inhibición de miR-148b en células G1 y puede también desestabilizar el balance de HR y patrones de unión final no homóloga y tal vez impedir la reparación de DSB (Choi et al., 2014).

4.7.2 miR-195-5p

El miR-195-5p influencia la proliferación e invasión de células de CaCu regulado por MMP14 a través de una realimentación positiva del patrón de señalización TNF (Li et al. 2018). El miR-195-5p inhibe la proliferación celular, invasión y migración apuntando a genes blanco relacionados, mientras que el silenciamiento del miR-195-5p tiene el impacto contrario en procesos celulares en CaCu (Du et al. 2015; Zhou et al. 2016). Se identificó que el miR-195 ejerce un papel tumor supresor en varios tipos de cánceres humano (Fei et al. 2012; Wang et al. 2017). Por ejemplo, se observó que el miR-195 inhibe el consumo de glucosa y proliferación de células de cáncer de vejiga humana teniendo como objetivo miembros de la familia 2 de portadores de soluto (Kaneko et al. 2016). Adicionalmente el miR-195 fue encontrado en inhibición de proliferación, migración, e invasión de células de CaCu apuntando al miembro 3 de la familia SMAD (Smad 3). Ciclina D2 (CCND2), protooncogen MYB transcripción del factor MYB y ciclina D1 (Timoshenko et al. 2014; Managit et al. 2017). miR-195 pudiera ser la clave en el desarrollo y progresión de CaCu, sin embargo, los genes blanco de miR-195 permanecen poco claros (Zhong et al. 2018).

El miR-195 realiza su papel en CaCu teniendo como blanco a DCUN1D1 (Zhong et al. 2018). Los niveles de expresión del miR-195 se encuentran disminuidos en muestras de tejido de CaCu comparado con muestras de tejido tumoral adyacente (Zhong et al. 2018). La expresión del miR-195 fue asociado con metástasis nodular y etapas clínicas avanzadas de TNM en CaCu, en el cual se encontró asociación del miR-195 y HR-HPV (Zhong et al. 2018).

La sobreexpresión de DCUN1D1 está asociado con la progresión agresiva y pobre pronóstico de cáncer cervical. Una reducción significativa del RNAm y niveles de expresión de la proteína de DCUN1D1 en la sobreexpresión de miR-195 en células SiHa y HeLa (Zhong et al. 2018). E6 VPH16 regula los niveles de expresión del miR-195 y DCUN1D1 en células de cáncer cervical (Zhong et al. 2018). Los niveles del miR-195 fueron significativamente bajos en células HeLa (VPH18) y SiHa (VPH16) comparadas con C33A (VPH-) (Zhong et al. 2018). La eliminación de E6 reduce la expresión de DCUN1D1 en células SiHa y HeLa. Los efectos oncogénicos de E6 en cáncer cervical pudieran ser en parte regulando la expresión de los niveles del miR-195 y su gen blanco DCUN1D1 (Zhong et al. 2018). El miR-195 es un tumor supresor en una gran variedad de cánceres, incluyendo carcinoma hepatocelular (Amer et al., 2014; Yang et al., 2014), cáncer de pulmón de células no pequeñas (Yongchun et al., 2014), glioblastoma humano, cáncer de mama, cáncer colorrectal. miR-195 ha sido reportado estar subregulado en tejido tumoral y suero en pacientes con cáncer. miR-195 está involucrado en múltiples procesos durante el desarrollo de cáncer, incluyendo proliferación celular, migración, invasión y metástasis (Liu et al., 2012; Amer et al., 2014). Las células HeLa transfectadas con miR-195 incrementó el número de células en fase G₀/G₁ y

disminuyó el número de células en fase S (Du et al., 2015). Esta información sugiere que miR-195 induce el arresto en células HeLa. Series de 3'UTRs de genes humanos contienen posibles secuencias de unión a miR-195 (Du et al., 2015). Dos de ellos, CCND2 y MYB, fueron estrechamente asociadas con el ciclo y migración celulares (Du et al., 2015). Niveles de CCND2 y MYB disminuyeron significativamente en células transfectadas con miR-195 (Du et al., 2015). Esta información demostró que la expresión de miR-195 inhibió la expresión de CCND2 y MYB en células HeLa (Du et al., 2015). Los niveles de expresión de miR-195 disminuyó significativamente en tejido de CaCu comparado con tejidos normales (Du et al., 2015). La sobreexpresión de miR-195 disminuyó la proliferación, migración e invasión de células HeLa (Du et al., 2015). La progresión de CaCu es un proceso complejo que involucra crecimiento tumoral y metástasis (Jemal et al., 2011). miR-195 inhibe la expresión de CCND2 sugiriendo que miR-195 regula el ciclo celular e induce el arresto de G₁ en células HeLa. miR-195 regula la transición del ciclo celular G₁/S, subregulando la expresión de CCND2 y por lo tanto inhibe la proliferación celular de células HeLa (Du et al., 2015).

El miR-195-5p inhibe la expresión GLUT3 flanqueando la región 3'UTR y luego realizando análisis funcionales de miR-195-5p en células de cáncer de próstata, la expresión de miR-195-5p fue fuertemente subregulado en células T24 comparado con células HUC sugiriendo una correlación inversa entre miR-195-5p y expresión de GLUT3 en células T24 (Fei et al., 2015). miR-195-5p media la inhibición de crecimiento y apoptosis celular de manera dependiente de GLUT3 en células T24 (Fei et al., 2015). miR-195-5p directamente reduce los niveles de proteína GLUT3, indicando que la expresión aberrante de miR-195-5p podría ser un

mecanismo nuevo subyacente de sobrerregulación de GLUT3 en cáncer de próstata (Fei et al., 2015). La expresión de miR-195-5p se ha reportado estar elevada en leucemia linfocítica crónica (Zanette et al., 2007). La expresión de miR-195 induce el arresto de la fase G₁, mientras que inhibidores de miR-195 acortan la fase G₁ en células de CaCu. Adicional al efecto supresor de miR-195 en el ciclo celular; fosforilación de pRb y antígeno celular nuclear proliferador (PCNA) (Wang et al., 2016).

El miR-195 es miembro de una familia de miRNAs micro-15a/b/16/195/497 y su expresión aberrante en múltiples cánceres (Strzalka et al., 2011). Se demostró que miR-195 suprime tumorigenesis de carcinoma hepatocelular y células glioma modulando la expresión de una serie de proteínas del ciclo celular (Strzalka et al., 2011). El nivel de pRb disminuyó significativamente en células HeLa que sobreexpresaban miR-195 en comparación con las de control (Strzalka et al., 2011). Además, PCNA, una proteína sintetizada en fases de G₁ y S, con actividad en replicación y reparación del DNA (Strzalka et al., 2011), fue subregulado en sobreexpresión de miR-195 en células HeLa (Wang et al., 2016), la fase de G₁ se acortó en células HeLa transfectadas con inhibidor de miR-195 comparado con el control (Wang et al., 2016). Consistentemente la subexpresión de miR-195 resultó en un nivel incrementado de fosforilación de Rb y sobrerregulación de PCNA (Wang et al., 2016). La sobreexpresión de miR-195 reduce la expresión de ciclina D1 en células HeLa y SiHa (Wang et al., 2016). PFKFB4 aumentó anormalmente e impulsó la progresión maligna de las células de cuello uterino (Sun et al., 2022). Por otro lado, miR-195-5p disminuyó notablemente y restringió a PFKFB4 en ese tipo de cáncer (Sun et al., 2022). El efecto supresor de tumores de miR-195-5p se restauró

parcialmente al sobreexpresar PFKFB4, lo que indica que miR-195-5p y PFKFB4 pueden ser nuevas dianas terapéuticas para pacientes con cáncer de cuello uterino (Sun et al.,2022).

V. JUSTIFICACIÓN

El CaCu es la segunda causa de mortalidad en mujeres a nivel mundial, lo cual genera una gran carga económica para los sistemas de salud y resultan en una disminución significativa en la calidad de vida. En México, el CaCu ocupa el 2° lugar en frecuencia, diagnosticándose 500,000 casos nuevos con una tasa de mortalidad del 50%. En distintas entidades tumorales, se ha demostrado que la desregulación de la red celular miRNA desempeña un papel fundamental para el desarrollo del cáncer y su mantenimiento. La oncogenicidad de los miRNA ha sido especialmente demostrada en miR-145-5p, miR195-5p, miR-148b-3p. En CaCu, la infección de VPH de alto riesgo puede afectar el patrón de expresión de miRNAs, ya que se ha demostrado que interacciones complejas entre E6 y E7 de HR-HPV involucran la activación de factores de transcripción, como E2F y c-Myc, involucrados en el desarrollo de cáncer. Los miRNAs, además de presentar una potencial aplicación como biomarcadores de CaCu, pueden ser utilizados como indicadores del estado clínico del paciente, así como predictores de la progresión y metástasis. El papel que juegan los miR-145-5p, miR195-5p, miR-148b-3p en CaCu no ha sido muy estudiado, por lo cual es de importancia conocer la participación de estos miRNAs en el desarrollo de cáncer cervicouterino, lo cual sugiere una posible aplicación de estos microRNAs como biomarcadores no invasivos en diagnóstico molecular de CaCu.

VI. HIPÓTESIS

La expresión disminuida de miR-145-5p, miR195-5p, miR-148b-3p en tejido cervical se encuentra directamente asociado con el grado de neoplasia intraepitelial cervical en pacientes VPH positivos de alto riesgo.

VII.OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar los niveles de expresión de miR-145-5p, miR195-5p, miR-148b-3p en muestras de tejido cervical en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical y su asociación con parámetros epidemiológicos y genotipo de VPH de alto riesgo.

7.2. Objetivos específicos

7.2.1. Determinar los niveles de expresión de miR-145-5p, miR195-5p, miR-148b-3p en tejido cervical en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical y CaCu VPH + de alto riesgo y pacientes sin NIC VPH-.

7.2.2. Asociar el grado de neoplasia intraepitelial cervical y el nivel de expresión de miR-145-5p, miR195-5p, miR-148b-3p.

7.2.3. Asociar miR-145-5p, miR195-5p, miR-148b-3p y el genotipo de VPH de alto riesgo en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical.

7.2.4. Asociar los parámetros epidemiológicos y el genotipo de VPH de alto riesgo en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical.

7.2.5. Asociar los parámetros epidemiológicos y el nivel de expresión de miR-145-5p, miR195-5p, miR-148b-3p de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Tipo de estudio

Es un estudio de tipo transversal, observacional, descriptivo y comparativo.

8.2 Características del grupo participante de mujeres

Se utilizaron 234 muestras de cepillado y biopsia cervicales de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical VPH positivos (n=134) y pacientes sin neoplasia intraepitelial cervical (n=100).

8.3 Cálculo de la muestra

Se invitó a participar a todos los pacientes que acudían a revisión colposcópica del Instituto Sinaloense de Cancerología, Instituto Mexicano del seguro social y Hospital de la Mujer SS, aquellos que cumplieron los criterios de inclusión y aceptaron participar bajo la firma del consentimiento informado fueron considerados en esta investigación.

8.4 Lugar de trabajo

Este trabajo fue desarrollado en el Instituto Mexicano del Seguro Social, Instituto Sinaloense de Cancerología, Hospital de la Mujer SS, Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Sinaloa, Laboratorio de Genética Molecular, Universidad Politécnica de Sinaloa.

8.5 Criterios de inclusión

Pacientes: Mujeres con muestra cervical y tinción de papanicolaou con citología positiva, colposcopia con lesión cervical visible, estudio histopatológico, PCR (reacción en cadena de polimerasa) con carta de consentimiento informado.

Sanos: Mujeres con muestra cervical y tinción de papanicolaou con citología negativa, estudio histopatológico y PCR negativa, diagnóstico uterino sin cáncer con carta de consentimiento informado.

8.6 Criterios de exclusión

Mujeres con diagnóstico previo de cáncer y/o se hayan sometido a tratamientos oncológicos.

8.7 Criterios de eliminación

Muestras que hayan sido insuficientes o se encuentren dañadas o estudios de diagnóstico incompletos.

8.8 Extracción y cuantificación de DNA de células cervicales

Se recolectaron 234 cepillados cervicales que asistieron a control del HGR N°1 IMSS, a consulta de colposcopia del Instituto Sinaloense de Oncología y Hospital de la Mujer de SS. Con el cepillado cervical se realizó una citología vaginal interpretada y clasificada por un patólogo según el sistema Bethesda.

Las células cervicales remanentes en el cepillado cervical, se resuspendieron en PBS y centrifugadas a 3,000 rpm por 10 min. Luego se descartó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió y homogenizó en 0.4 mL de trizol® reagent. Posteriormente se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. La extracción del DNA, RNA y proteínas de los cepillados cervicales se realizó según las instrucciones del fabricante (10296-028, Ambion®, Austin, TX, USA).

Las muestras homogeneizadas en trizol se incubaron durante 5 min. a 15-30°C, luego se añadieron 0.2 mL de cloroformo para realizar la separación de fases. La fase acuosa se trasladó a un tubo nuevo para precipitar el RNA con isopropanol;

la interfase y la fase roja se utilizaron para la extracción de DNA. El RNA precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75% posteriormente se secaron durante 5-10 min. al aire y fue resuspendido en agua libre de RNasas. El RNA obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría y conservado a -70°C hasta su uso. El DNA se precipitó con 0.3 mL de etanol absoluto de la interfase y de la fase roja resultante de la adición del cloroformo. Luego se lavó dos veces con solución de citrato de sodio (0.1 M citrato de sodio en etanol 10%, pH 8.5) y una vez con etanol al 75%. Finalmente fue secado y resuspendido en NaOH 8mM y conservado a -20°C hasta el momento de su uso. Las proteínas fueron precipitadas del sobrenadante de la precipitación del DNA con 1.5 mL de alcohol isopropílico. El precipitado de proteínas fue lavado tres veces con hidroclorehidrato de guanidina 0.3 M en etanol al 95%; luego fue secado y resuspendido en SDS al 1% y conservado a -70°C, hasta el momento de su uso. Posteriormente se cuantificó el DNA por espectrofotometría en un nanodrop y se observó la integridad mediante un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1%.

8.9 Determinación de genotipo de alto riesgo VPH 16, 18, 35, 45

8.9.1 Amplificación del gen *beta-globina* humana

Para verificar la viabilidad de las muestras de DNA, se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final, un fragmento de 280 pares de bases (pb) del gen beta-globina humana utilizando los oligos PC04 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') y GH20 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') (Saiki et al., 1986).

8.9.2 Identificación de VPH

Para detectar la presencia de VPH en las muestras, una PCR fue realizada usando oligos GP5+/GP6+, obteniendo un fragmento de 150 pb en casos positivos, confirmando su presencia en un gel de agarosa al 1.5%. En tanto que el genotipo se realizó mediante PCR anidada, como se describe a continuación. La extracción de DNA y el análisis de genotipo de VPH se realizó en 234 mujeres de acuerdo con el estatus del grupo (VPH + n=170; VPH - n=64). El DNA genómico de las muestras de citología se analizó con reacción en cadena de la polimerasa anidada múltiple (NMPCR), con la finalidad de determinar el genotipo de VPH. La secuencia blanco de los genes E6-E7 fueron obtenidas del GenBank. Los VPH-16 (K02718), VPH18(X05015), VPH35 (X74477), VPH45 (X74479), fueron alineados con el programa CLC *Sequence Viewer versión 8.0* y se determinó una región consenso GP-E6-E7; para el diseño de iniciadores consenso entre los 4 genotipos analizados; sentido (GP-E6-3F) para VPH 16,18,35,45, antisentido para VPH16 y VPH 35(GP-E6-5B) y antisentido para VPH 18 y 45(GP-E6-6B) (**cuadro 2**). Para incrementar la sensibilidad, se realizó una PCR anidada; en la primera ronda se utilizaron iniciadores consenso GP-E6/E7, obteniendo un amplicón de 600-630 pb, el cual fue usado como molde para la PCR anidada utilizando pares de iniciadores específicos para cada genotipo (VPH16, VPH18, VPH35, VPH45) (**cuadro 3**). Para reducir el número de PCR anidadas diversos iniciadores de genotipos de VPH fueron acomodados en múltiples cocteles; Primer coctel contenía 3 diferentes pares de iniciadores de genotipos VPH-16, 18 y 45, el segundo coctel un par de iniciadores del genotipo 35.

Las condiciones de PCR con iniciadores consenso E6 fueron las siguientes: 94°C por 1 minuto (min)., 40°C por 1 min. y 72°C por 2 min. para un total de 40 ciclos de amplificación. El primer ciclo fue precedido por desnaturalización a 94°C por 4 minutos. El último ciclo fue seguido por elongación a 72°C por 10 min. La PCR anidada múltiplex fue realizada con iniciadores específicos bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (seg), 56°C por 30 seg, y 72°C por 45 seg. El primer ciclo fue precedido por un paso de elongación por 4 min, paso de desnaturalización y último ciclo por 4 min de paso de elongación. Todas las PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 µL conteniendo: 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) 50 mM NaCl, 200 µM cada dNTP, 1.8 mM MgCl₂, 1U DNA polimerasa termoestable (GoTaq® Flexi DNA Polymerase; promega, USA) y 0.1 µM de cada iniciador. Cuatro µL de producto de PCR se usaron como templado para las reacciones de PCR anidadas. 10 µL de productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1.5% previamente caracterizadas y tinción con gelred. Muestras clínicas VPH-16, 18, 35 y 45 fueron utilizadas como control positivo.

Cuadro 2. Secuencias de iniciadores consenso GP-E6-E7 para determinación de genotipo 16, 18, 35,45 de VPH^a.

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Secuencia (5´-3´)	Amplicón (pb)
GP-E6-3F SENTIDO	GGG WGK KAC CGA AAA CGG T	35-53	630 pb
GP-E6-5B ANTISENTIDO (VPH16,35)	GAG NCA ACT GAN CTN TAC TGT	636-658	
GP-E6-6B ANTISENTIDO (VPH18, 45)	TNC TNT GTN ACG ATC AAT TAA GC	663-688	

^a Código de una sola letra: W, A/T; K, G/T; R, A/G; Y, C/T; N, A/C/G/T, -, idéntico a secuencia consenso.

Cuadro 3. Secuencias de iniciadores tipo-especifico PCR anidada empleados en el estudio.

Iniciador	Amplicón (pb)	Secuencia (5´-3´)	Posición (pb)
VPH 16	457	CACAGTTATGCACAGAGCTGC CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA	141-161 597-573
VPH 18	322	CACTTCACTGCAAGACATAGA GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA	170-190 491-470
VPH 35	358	CAA CGA GGT AGA AAG CAT C CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G	157-178 514-493
VPH 45	151	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	82-101 232-213

8.9.3 Determinación de la presencia de los miRNA: miR-145-5p, miR-148b-3p, miR-195-5p en tejido cervical

8.9.3.1 Análisis de expresión miRNA

Se seleccionó un subgrupo de pacientes (n = 35) para medir los niveles de expresión de miRNA. Se realizó la extracción de RNA y expresión relativa en este subgrupo de estudio.

8.9.3.2 Obtención de muestra de tejido cervical

Se obtuvieron muestras de tejido cervical aproximadamente 0.5-1.5 cm de diámetro mediante biopsia y se colocaron en tubos eppendorf estériles de 2 mL, con 1 mL de trizol LS (Ambion®, Austin, TX, USA) por cada 50-100mg de tejido y se colocaron en hielo para evitar la degradación del RNA durante su homogenización con la ayuda de un homogeneizador Tissue tearor® (Biospec). Posteriormente se almacenó a -70°C hasta su procesamiento.

8.9.3.3 Extracción de miRNA de tejido cervical

El miRNA se extrajo de muestras de tejido cervical de pacientes con NIC y CaCu VPH+ y sin NIC VPH-, utilizando el kit miRNA easy RNA Qiagen®. Las muestras de tejido cervical fueron descongeladas y se colocaron en hielo para evitar la degradación del RNA durante su procesamiento, posteriormente se procedió a la fase de separación de RNA que consistió en incubar durante 5 min. a temperatura ambiente con el fin de permitir una disociación completa del complejo de nucleoproteínas, posteriormente se añadieron 140 µL de cloroformo al tubo que contiene el homogenizado; se tapó y agitó vigorosamente durante 15 seg, seguido de incubación por 3 min a temperatura ambiente para iniciar la separación de las

fases. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. Una vez separadas las fases, se tomó el sobrenadante (fase acuosa) de las muestras y se colocó en un tubo eppendorf estéril de 2 mL, mientras que la fase orgánica de fenol-cloroformo y la interfase de cada tubo se almacenaron a -20°C para extracciones de DNA y proteínas. Se añadieron 350 µL de etanol 70% y se mezcló vigorosamente en vórtex. Se tomaron 700 µl incluyendo cualquier precipitado que se haya formado en una columna RNeasy Mini spin en un tubo recolector de 2 mL, se cerró el tubo y se centrifugó a 10000 rpm por 15 seg a temperatura ambiente, se recolectó el líquido sobrante (contiene miRNA) en un tubo de reacción de 2 mL, se añadieron 450 µL de etanol 100% al líquido obtenido anteriormente, se agitó vigorosamente. Se añadieron 700 µL de muestra en una columna RNeasy Mini spin colocada en un tubo recolector de 2 mL, centrifugó 10000 rpm por 15 seg a temperatura ambiente. Se descartó el líquido sobrante (se repitió este paso hasta que toda la muestra fue pipeteada en la columna spin). Se añadieron 700 µL de buffer RWT a la columna RNeasy Mini spin y centrifugó 10000 rpm por 15 seg para lavar la columna. Se añadieron 500 µl de buffer RPE en la columna RNeasy Mini spin y centrifugó 10000 rpm por 15 seg; se descartó el sobrenadante, posteriormente se añadieron 500 µL de etanol 80% en la columna RNeasy Mini spin y centrifugó 10000 rpm por 2 min. Para secar la membrana de la columna (descartar el tubo recolector y el líquido sobrante), se colocó la columna RNeasy Mini spin en un tubo recolector nuevo de 2 mL y centrifugó 10000 rpm por 5 min, finalmente se colocó la columna RNeasy Mini spin en un tubo recolector de 1.5 mL y añadió 14 µl de agua libre de nucleasas en la columna spin de membrana y centrifugó a 10000 rpm por 1 min para obtener la fracción enriquecida de miRNA.

8.9.3.4 Conversión de miRNA a cDNA

Una vez obtenido los miRNA se realizó una transcripción reversa mediante Taqman Advanced MicroRNA cDNA synthesis Kit Applied Biosystems (Foster City, California, USA).

a. Reacción Cola poly A:

Se añadieron 2 μ L muestra miRNA y 3 μ L de la reacción Poly A teniendo un volumen final de 5 μ L, el cual en vórtex se homogenizó y se colocó en el termociclador con las siguientes condiciones: poliadenilación: 37°C, Reacción Stop 65°C 10 min., Hold: 4°C.

b. Reacción de Ligación:

Se mezcló la reacción de ligación para homogenizar reactivos y se añadieron 10 μ L de reacción de ligación a cada tubo que contenía previamente 5 μ L de reacción poly A dando un total de 15 μ L, se colocaron los tubos de reacción en un termociclador con las siguientes condiciones: ligación; 16°C 60 min., Hold 4°C.

c. Reacción RT:

Se añadieron 15 μ L de reacción RT a cada tubo de reacción que previamente contenía 15 μ L del producto de reacción de ligación, se homogeneizó con vórtex, se colocaron los tubos de reacción en un termociclador con las siguientes condiciones: transcripción reversa: 42°C durante 15 min, Reacción stop 85°C 5 min., Hold 4°C.

d. Reacción miR-Amp:

Se añadieron 45 μ L de reacción miR-Amp en un tubo nuevo. Se añadieron 5 μ L de producto de reacción RT para un volumen final de 50 μ L. se colocaron los tubos de reacción con las siguientes condiciones: Activación enzima: 95°C durante 5 min., desnaturalización: 95°C 3 seg., alineamiento y extensión: 60°C 30 seg., reacción stop 99 °C 10 min. Hold 4°C.

8.9.3.5 Determinación de expresión de miRNAs mediante RTq-PCR

La amplificación y cuantificación para los miR-148b-3p, miR-145-5p y miR-195-5p se realizaron en PCR en tiempo real (RTq-PCR), utilizando sondas Taqman Advanced microRNA Assays de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), para esto los 5 μ L del producto de preamplificación de RT se diluyeron en 45 μ L de agua inyectable (dilución 1:10), se preparó la mezcla que contenía 5 μ L de buffer 2X master mix fast advanced, 0.5 μ L miRNA taqman advanced assay 20X (miR-145-5p, miR-148b-3p, miR-195-5p), 2 μ L agua libre de nucleasas y 2.5 μ L de cDNA diluido. Realizándose ensayos por duplicado para cada miRNA.

La relación se llevó a cabo en el termociclador Step One Plus Real Time PCR de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), con las siguientes condiciones: activación enzima 95°C 20 seg., desnaturalización 95°C 1 seg., alineamiento y extensión 60 °C 20 seg. por 40 ciclos.

Los resultados de expresión entre los pacientes con NIC, CaCu y sin NIC VPH- con patología benigna del cuello uterino permitieron tener los valores de CT de cada miRNA. Como miRNA constitutivo se utilizó el miR-16-5p, el cual fue seleccionado de acuerdo con su estabilidad entre diversos candidatos.

Todas las muestras se realizaron por duplicado. Para cuantificar la expresión génica relativa se utilizó el método de Livak y Schmittgen (2001).

Los cálculos se basaron en la comparación de los valores de umbral de ciclo (Ct).

El método $2\Delta\text{Ct}$ expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct Muestra} - \Delta\text{Ct Control})$$

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct miRNA problema} - \text{Ct miRNA constitutivo}$$

Validación del ensayo

Se realizó RTq-PCR en un equipo StepOnePlus (Applied Biosystems). Se utilizó agua libre de nucleasas (Ambion®) para los controles negativos. Junto a estos, se utilizó cDNA de las muestras y se sometieron a amplificación en un volumen de reacción de 10 μL . Las mezclas de reacción para los controles y miR-145-5p, miR-148b-3p, miR-195-5p contenían los siguientes componentes: TaqMan microRNA assays ® y Taqman universal PCR Máster Mix, agua libre de nucleasas (Ambion®), cDNA de tejido cervical. El ensayo se realizó por duplicado en reacciones dúplex miR-145-5p, miR-miR-148b-3p, miR-195-5p. La validación del ensayo se realizó de curvas estándar de 5 puntos con una dilución 1:2 a concentraciones de 400 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng y 25 ng de cDNA. La eficiencia de amplificación de la curva estándar con un valor $< 95\%$ para miR-145-5p, miR-148b-3p, miR-195-5p y miR-16-5p permitió utilizar una concentración de 50 ng de cDNA en cada reacción.

La eficiencia de amplificación de la curva estándar presentó un valor <95% para miR-145-5p, miR-148b-3p, miR-195-5p y miRNA endógeno (miR-16-5p) y se utilizó una concentración de 50 ng de cDNA en cada reacción. Se realizó una cuantificación relativa para obtener la diferencia entre los niveles de expresión del miRNA endógeno de referencia y el miRNA diana en las muestras de CaCu en comparación con los niveles de expresión de los mismos miRNAs en las muestras de mujeres voluntarias en donde el método $\Delta\Delta Ct$ mostró los cambios en los niveles de expresión en relación con los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control, los cuales fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ representado de la siguiente manera:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct \text{ miRNA Diana} - Ct \text{ miRNA endógeno muestra}) - (Ct \text{ miRNA Diana} - Ct \text{ miRNA endógeno control})]}$$

La eficiencia de amplificación de la curva estándar con valor <95% para miR-145-5p, miR-148b-3p, miR195-5p y miRNA endógeno (miR-16-5p) permitió utilizar una concentración de 50 ng de cDNA en cada reacción.

8.9.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm desviación estándar. Se utilizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) comparando las medias con prueba post-test de Bonferroni, t de Student y prueba U de Mann-Whitney con un nivel de significancia de $p < 0.05$ (comparando perfil de expresión de cada uno de los miRNAs en NIC y CaCu VPH+ y pacientes sin NIC VPH-. En el caso de los rasgos dicotómicos se realizó prueba de chi-cuadrada para diferentes frecuencias de genotipo entre las pacientes con y sin NIC y prueba de Pearson y

Spearman fueron usadas para calcular coeficiente de correlación entre variables.

Se utilizó el software estadístico STATA versión 13.0.

IX. RESULTADOS

9.1 Datos epidemiológicos de pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical y CaCu

9.1.1 Prevalencia de pacientes VPH+ con y sin neoplasia intraepitelial cervical

Para el análisis se incluyeron 234 pacientes, correspondiendo 134 casos a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en estadios diferentes (I-III). Para NIC I se contó con 107 casos (79.8%), NIC II con 17 (12.7%), y NIC III con 6 (4.5%) y cuatro casos con CaCu (3%). El 100% de las pacientes con NIC y CaCu resultaron VPH+. Se incluyeron 100 pacientes con patología del cuello uterino diversa de tipo benigno sin NIC y en este grupo, el 36% fueron VPH+ y 64% VPH-.

En relación con la prevalencia de VPH+ en los diferentes grados de NIC. Donde NIC I presentó 62.9%, seguido de mujeres sin NIC con 21.2%, NIC II 10%, NIC III 3.5% y CaCu 2.4% (**Figura 4.**).

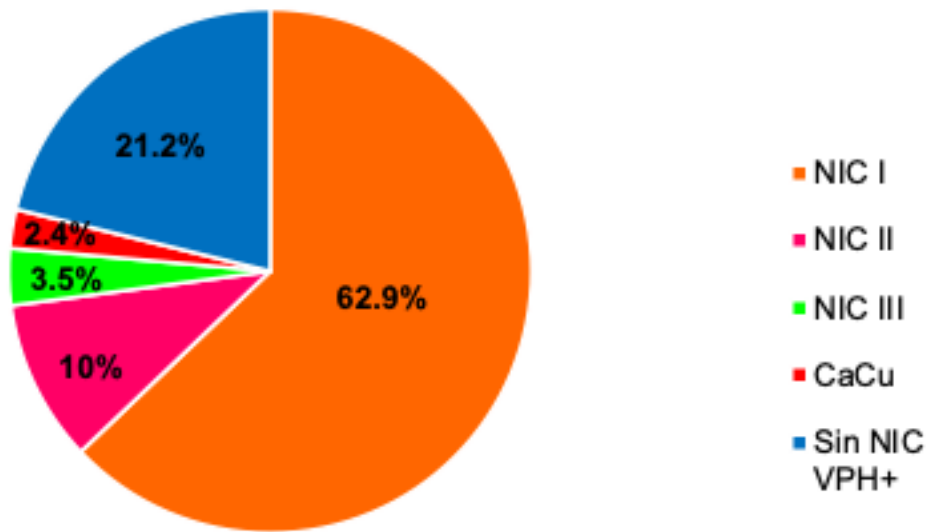


Figura 4. Prevalencia de pacientes VPH+ con y sin neoplasia intraepitelial cervical. NIC I: neoplasia intraepitelial cervical grado 1; NIC II: neoplasia intraepitelial cervical grado 2; NIC III: neoplasia intraepitelial cervical grado 3; Sin NIC: sin neoplasia intraepitelial cervical.

9.1.2 Factores de riesgo asociados a cáncer cervicouterino

9.1.2.1 Edad

La edad promedio de las pacientes fue de 37 años (IC95% 35.8-38.7). En NIC I (34.1 años), NIC II (31.5), NIC III (39 años), CaCu (52.5 años) y pacientes sin NIC (41 años), encontrándose una diferencia significativa entre NIC I y VPH- ($p=0.000$) (**Cuadro 4**). El mayor número de pacientes se encontró entre 25-44 años; el 61.2% resultaron ser NIC, sin NIC VPH+ (47.2%) y sin NIC VPH- (53.1%) (**Cuadro 5**), encontrándose una asociación significativa en las pacientes entre 20-24 años ($p=0.011$) y 50-59 años ($p=0.0025$) en relación con VPH (**Cuadro 6**).

9.1.2.2 Número de parejas sexuales

El número de parejas sexuales promedio para pacientes con NIC I fue de 2.3 ± 0.2 , NIC II 2 ± 0.3 , NIC III 2.2 ± 0.5 , CaCu 2 ± 0.7 , sin NIC VPH+ 1.9 ± 0.2 , sin NIC VPH- 1.8 ± 0.1 , presentándose con el menor número de parejas sexuales las pacientes sin NIC VPH – (**Cuadro 4**). encontrándose una diferencia significativa en pacientes VPH+ y VPH- que tuvieron 4 o más parejas sexuales ($p=0.018$) (**Cuadro 6**).

9.1.2.3 Inicio de sexualidad Temprana

El inicio de relaciones sexuales en promedio fue de 17 años (IC95% 17.3-18.2), presentándose un mayor número con NIC (79.9%) y sin NIC VPH + (77.8%) entre los 15 y 20 años. Las edades de las pacientes con NIC I fueron de 17.6 ± 0.3 años, NIC II 16.2 ± 0.5 años, NIC III 16.6 ± 0.4 , CaCu 17.5 ± 1.4 , sin NIC VPH+ 17.3 ± 0.5 y sin NIC VPH- 18.9 ± 0.5 Encontrándose una diferencia significativa entre pacientes con neoplasia intraepitelial cervical y sin NIC VPH- ($p=0.01$) (**Cuadro 4**).

9.1.2.4 Tabaquismo

El 92.5% de las pacientes con NIC y CaCu no consumían tabaco y el 7.5% consumía tabaco, el 100% de las pacientes sin NIC no consumían tabaco (**Cuadro 5**).

9.1.2.5 Antecedentes Heredofamiliares

El 82.8% de las pacientes con NIC no presentaron antecedentes heredofamiliares, el 17.2% si lo hicieron. Las pacientes sin NIC, el 41.7% presentó antecedentes heredofamiliares, el 58.3% no presentó (**Cuadro 5**).

9.1.2.6 Índice de masa corporal

El índice de masa corporal (IMC) promedio fue de 28 (IC95%: 27.3-28.6) en el total de las pacientes. El 41.9% de las pacientes mantenían sobrepeso y 29% obesidad (**Cuadro 5**). El promedio de las pacientes con NIC I fue de 27.5 ± 0.5 , NIC II 27.5 ± 1.6 , NIC III 29.9 ± 1.8 y CaCu 32.6 ± 0.9 . Se observó un mayor porcentaje de obesidad conforme aumentó el grado de lesión cervical.

9.1.2.7 Anticonceptivos

El uso de anticonceptivos fue referido en un 52.1% de las pacientes con NIC, siendo quirúrgico (30.6%), DIU (14.9%), hormonal (23.9%), condón (3.7%) y sin método (26.9%) y sin NIC VPH+: DIU (5.6%), quirúrgico (13.8%), sin método (80.6%), sin NIC VPH-: DIU (6.3%), hormonal (7.8%), condón (3.1%), quirúrgico (9.4%), sin método (73.4%) (**Cuadro 5**). Encontrándose una diferencia significativa en el uso de anticonceptivos orales entre pacientes VPH+ y VPH- ($p=0.004$) (**Cuadro 6**).

9.1.2.8 Partos

Se observó una mayor paridad en las pacientes con LIEAG, observándose 100% de paridad en pacientes con NIC III. El número de partos promedio en NIC I fue de 2 ± 0.2 , NIC II 1.9 ± 0.4 , NIC III 4.3 ± 1.1 , CaCu 1 ± 1 , Sin NIC VPH+ 1.9 ± 0.3 y Sin NIC VPH- 2.4 ± 0.2 (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Factores de riesgo más asociados a cáncer cervicouterino

Variable	NIC n = 134				Sin NIC n = 100		P
	NIC I (n=107)	NIC II (n = 17)	NIC III (n = 6)	CaCu (n = 4)	VPH+ (n = 36)	VPH- (n = 64)	
Edad, años	34.1(1.0)	31.6(1.9)	39(3.9)	52.5(10.1)	40.6(1.9)	41.3(1.2)	0.000 *
Parejas sexuales	2.3(0.2)	2(0.3)	2.2(0.5)	2(0.7)	1.9(0.2)	1.8(0.1)	0.06
Inicio sexualidad, años	17.6(0.3)	16.2(0.5)	16.6(0.4)	17.5(1.4)	17.3(0.5)	18.9(0.5)	0.01*
IMC	27.5(0.5)	27(1.6)	29.9(1.8)	32.6(0.9)	28.5(0.7)	28.5(0.6)	0.49
Partos	2(0.2)	1.9(0.4)	4.3(1.1)	1(1)	1.9(0.3)	2.43(0.2)	0.43
Cesáreas	0.4(0.8)	0.5(0.2)	0(0)	0.5(0.5)	0.8(0.1)	0.6(0.1)	0.07
Abortos	0.2(0.1)	0.1(0.1)	0(0)	0.25(0.2)	0.1(0.1)	0.2(0.09)	0.66

Resultados expresados como la media \pm desviación estándar. Se realizó comparación entre grupos. Se consideró como significativo un valor de $p \leq 0.05$, se utilizó un ANOVA de una vía con prueba poshoc tipo Bonferroni. IMC; índice de masa corporal; CaCu: cáncer cervicouterino; NIC I: neoplasia intraepitelial cervical grado 1; NIC II neoplasia intraepitelial cervical grado 2; NIC III neoplasia intraepitelial cervical grado 3; VPH+: virus de papiloma humano positivo; VPH-: virus de papiloma humano negativo.

Cuadro 5. Características sociodemográficas de los participantes del estudio.

Variable	NIC VPH+ (n =134)		Sin NIC VPH+ (n = 36)		Sin NIC VPH- (n = 64)	
	N	%	N	%	N	%
Edad, años	6	4.4	0	0	1	1.6
15-19						
20-24	22	16.4	3	8.3	2	3.1
25-44	82	61.2	17	47.2	34	53.1
45-49	13	9.7	9	25	11	17.2
50-59	8	6	5	13.9	16	25
60-64	1	0.8	0	0	0	0
65+	2	1.5	2	5.6	0	0
Parejas sexuales	54	40.3	14	38.9	34	53.1
1						
2	38	28.3	13	36.1	17	26.6
3	22	16.4	7	19.4	9	14
4 o más	20	14.9	2	5.6	4	6.3
Inicio de sexualidad años						
<15	11	8.2	5	13.9	5	7.8
15-20	107	79.9	28	77.8	41	64.1
21-24	13	9.7	3	8.3	10	15.6
25 o más	3	2.2	0	0	8	12.5
Tabaquismo						
SI	10	7.5	2	5.6	0	0
NO	124	92.5	34	94.4	64	100
AHF						
SI	23	17.2	15	41.7	23	35.9
NO	111	82.8	21	58.3	41	64.1
IMC						
Bajo peso	3	2.2	0	0	0	0
Normal	43	32	6	16.7	16	25
Sobrepeso	49	36.6	21	58.3	28	43.8
Obesidad	39	29.2	9	25	20	31.2
Anticonceptivos						
DIU	20	14.9	2	5.6	4	6.3
Hormonal	32	23.9	0	0	5	7.8
Condón	5	3.7	0	0	2	3.1
Quirúrgico	41	30.6	5	13.8	6	9.4
Sin método	36	26.9	29	80.6	47	73.4
Paridad						
Ninguno	36	26.9	8	22.2	10	15.6
1-2	53	39.6	17	47.2	24	37.5
3 o más	45	33.5	11	30.6	30	46.8
Cesáreas	103	76.8	18	50	40	62.5
Ninguno						
1-2	25	18.7	15	41.7	20	31.2
3 o más	6	4.5	3	8.3	4	6.3
Abortos	117	87.3	32	88.9	56	87.5
Ninguno						
1-2	16	12	4	11.1	6	9.4
3 o más	1	0.7	0	0	2	3.1

n: número de pacientes; VPH: virus de papiloma humano; IMC: índice de masa corporal; AHF: Antecedentes Heredofamiliares. Las edades fueron de acuerdo con Dirección general de Epidemiología de la SS.

9.1.3 Asociación de factores de riesgo de CaCu y VPH

En relación con factores de riesgo asociados a CaCu y VPH, encontramos una asociación significativa entre grupo de pacientes de 20-24 años y VPH+ (OR: 5.3, IC95%:1.22-23.27), 50-59 años y VPH+ (OR: 0.27, IC95% 0.12-0.60). Por otra parte, las pacientes con 4 o más parejas sexuales tuvieron un mayor riesgo de contagio de VPH (OR: 3.6, IC95%: 1.19-10.68), de igual manera observamos una asociación significativa entre el uso de anticonceptivos orales y VPH+, mostrando 15.6 veces más riesgo de contagio de VPH que las pacientes que utilizaban otro método anticonceptivo (**cuadro 6**).

9.2 Determinación de Genotipo de VPH de alto riesgo (VPH16, VPH18, VP35 y VPH45)

9.2.1 Integridad de DNA mediante gen de *beta-globina*

Para verificar la viabilidad de las muestras de DNA, se amplificó por PCR punto final un fragmento de 280 pb que corresponde al gen de la *beta-globina* utilizando los oligos PCO4 y GH2O. Se observó la integridad de DNA en un gel de agarosa al 1.5 %. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb. Se utilizaron 8 muestras de pacientes con NIC, control positivo y control negativo (**Figura. 5**).

Cuadro 6. Asociación de factores de riesgo de CaCu y VPH

Iniciador	VPH+	RM	VPH-	P	IC 95%
20-24 años (edad)	25	5.3	2	0.011	1.22-23.27
50-59 años (edad)	13	0.27	15	0.025	0.12-0.60
4 o más parejas sexuales	22	3.6	4	0.018	1.19-10.68
Uso de Anticonceptivos orales	32	15.65	5	0.004	0.92-263.08

RM: razón de momios; IC= intervalo de confianza; $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. VPH+: virus de papiloma humano positivo; VPH-: virus de papiloma humano negativo.

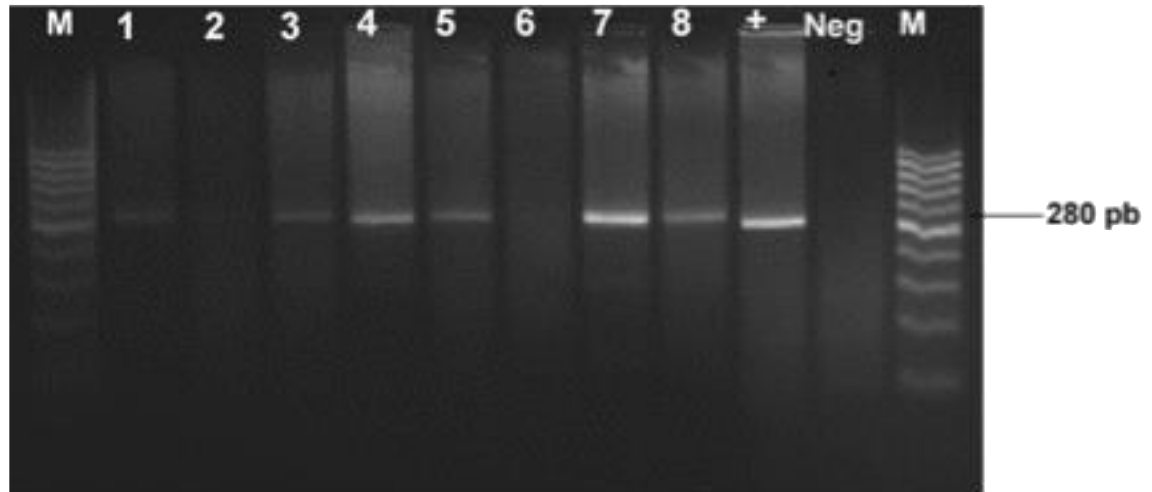


Figura 5. Determinación del gen *beta-globina*. Carril 1 (marcador de 50 pares de base), carriles 2 al 9 (muestras de pacientes con NIC) encontrándose un producto de 280 pb del gen de la beta globina, carril 10 control positivo y carril 11 control negativo, Carril 12 (marcador de 50 pares de base).

9.2.2 Genotipo de VPH 16, 18, 35 y 45 de alto riesgo en pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical

De los 234 pacientes analizados, 72.6% (n =170) fueron positivas a la detección molecular de VPH, con una edad promedio 35.8 ± 11.3 para VPH+ y 41.3 ± 9.9 VPH- (P=0.001), el 34.1% de pacientes VPH positivos fueron genotipos de alto riesgo (16,18,35,45); 16 (20%), 45 (18.8%), 35 (12.4%) y 18 (5.3%); encontrándose algún genotipo de alto riesgo en 26.9% de casos VPH+ y en 22% sin NIC VPH+; utilizando iniciadores GP5+ y GP6+ e iniciadores específicos de genotipo (**Figura 6**).

En la **Figura 7**, se muestra la frecuencia de genotipos de alto riesgo en pacientes con y sin NIC, VPH16 por grado de NIC fue de 17.8% en NIC I, 11.8% en NIC II, 33.3% en NIC III, 30.6% en pacientes sin NIC; VPH18: 4.7% NIC I, 5.9% NIC II, 25% CaCu y 5.6% sin NIC. VPH35: 9.3% NIC I, 11.8% NIC II, 25% CaCu, 22.2% sin NIC. VPH45: 12.5% NIC I, 17.6% NIC II, 33.3% NIC III, 38.9 sin NIC. Observamos una alta frecuencia de VPH 45 en pacientes sin NIC (38.9%) y VPH18 y 35 en pacientes con CaCu.

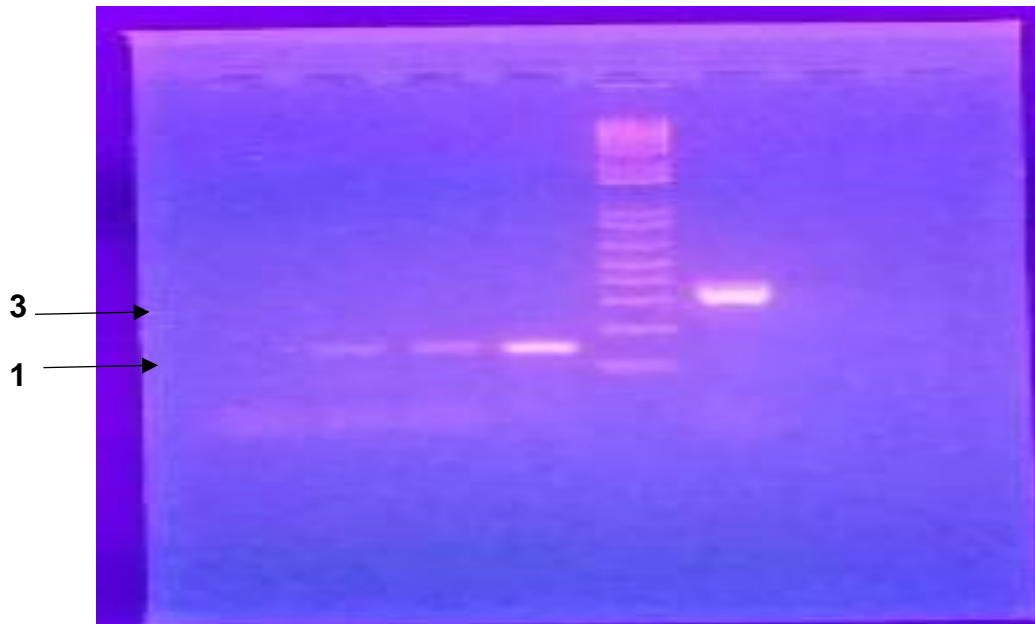


Figura 6. Presencia de VPH utilizando iniciadores GP5+/GP6+ e identificación de genotipo con iniciadores específicos. Carril 1: control negativo, carril 2,3: muestras sin NIC VPH+ con un fragmento de 150 pb, Carril 4: control positivo, Carril 5: marcador de 50 pares de bases), Carril 6: muestra VPH 35 positiva con un fragmento de 358 pb.

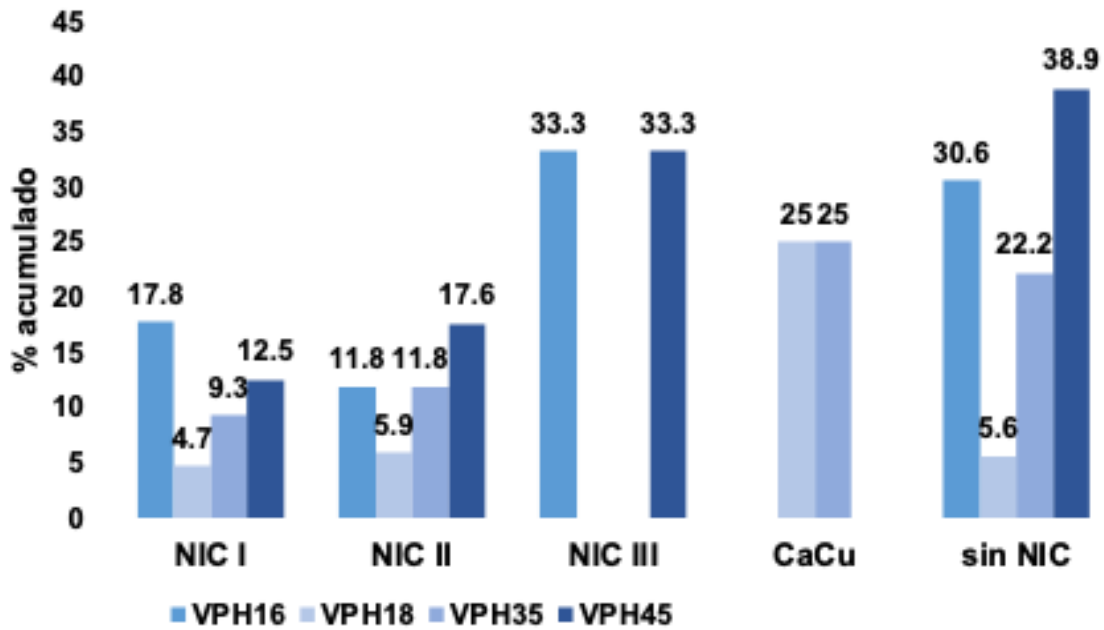


Figura 7. Frecuencia de genotipos de VPH de alto riesgo en pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical. CaCu: cáncer cervicouterino; NIC I: neoplasia intraepitelial cervical grado 1; NIC II neoplasia intraepitelial cervical grado 2; NIC III neoplasia intraepitelial cervical grado 3; VPH: virus de papiloma humano; Sin NIC: sin neoplasia intraepitelial cervical.

9.2.3 Frecuencia de infección múltiple de VPH de alto riesgo

En relación con la presencia de más de un genotipo de VPH de alto riesgo, se muestra en la **figura. 8**, que el 13.1% de las pacientes con NIC I presentaban más de un genotipo de alto riesgo, 17.6% NIC II, 33% NIC III, 25% CaCu, 27.8% sin NIC. El mayor porcentaje de infección múltiple se presentó entre genotipos en NIC I: VPH 16 y 18, 35 y 45, NIC II: 16 y 45, 16,35,45 y 35,45; NIC III: 16 y 35, CaCu: 18 y 35; sin NIC: 16 y 35, 16 y 45.

9.3 Expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p en pacientes con NIC, CaCu VPH+ de alto riesgo y sin NIC VPH-

Se midieron los niveles de expresión de miRNA en un subgrupo de 35 mujeres con NIC VPH+ de alto riesgo (n=12) y sin NIC VPH- (n=23).

9.3.1 Evaluación de la expresión de sondas taqman miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-16-5p (constitutivo), miR-195-5p

En relación con la adecuada amplificación de las sondas, se realizó una qPCR para determinar amplificación de cada una de las sondas miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p, miR16-5p) para comenzar a procesar todas las muestras de pacientes con NIC VPH positivas de alto riesgo y pacientes sin NIC VPH-, donde pudimos observar que si amplificaron correctamente.

9.3.2 Determinación de niveles de expresión relativa de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p en pacientes con NIC, CaCu VPH+ de alto riesgo y sin NIC VPH-

Se realizó la determinación de expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p en 12 muestras de pacientes con NIC y CaCu VPH+ de alto riesgo (16, 18, 35, 45) y 23 muestras sin NIC VPH-.

miR-148b-3p y miR-145-5p mostraron sobreexpresión 15.35 veces y 18.25 veces en pacientes con NIC VPH+ respectivamente con respecto a pacientes sin NIC VPH-, encontrándose una diferencia significativa ($p = 0.002$ and $p = 0.003$, respectivamente). miR-195-5p mostró sobreexpresión 2.60 veces más en pacientes con NIC VPH+ con respecto a pacientes sin NIC VPH- (**Figura.9**). Se observó mayor expresión en pacientes con LIEAG respecto a pacientes de LIEBG y sin NIC VPH- de miR-148b-3p, miR-145-5p y miR-195-5p.

El miR-148b-3p se sobreexpresó 57.61 veces en infección simple respecto a infección múltiple 49.3 veces; miR-145-5p se sobreexpresó 36.53 veces en infección múltiple respecto a infección simple, encontrándose diferencia significativa ($p = 0.047$), miR-195-5p se sobreexpresó 4.19 veces en infección múltiple respecto a infección simple. Los genotipos de VPH de alto riesgo en infección simple fueron VPH 16 y 35 y en infecciones múltiples fueron VPH16 con 18, 16 con 45 y 18 con 35 (**Figura. 10**). Además, observamos una diferencia significativa en los niveles de expresión de miR-195-5p entre pacientes VPH 45+ y VPH 45-. Pacientes con genotipo VPH 45+ presentaron mayores niveles de expresión 5.65 veces ($p = 0.046$) (**Figura. 11**). Interesantemente, encontramos que la expresión de miR-195-5p distinguía a pacientes con NIC I de aquellos más agresivos NIC II/III, los niveles de expresión más elevados fueron observados en NIC de alto grado ($p = 0.045$). Observamos una fuerte correlación entre miR-148b-3p y miR-145-5p con un coeficiente de correlación de 0.917 ($p=0.001$). Sin embargo, no se encontró una relación significativa entre miR-195-5p y miR-148b-3p y miR-145-5p ($p=0.253$ y $p=0.086$ respectivamente (**Figura 12.**).

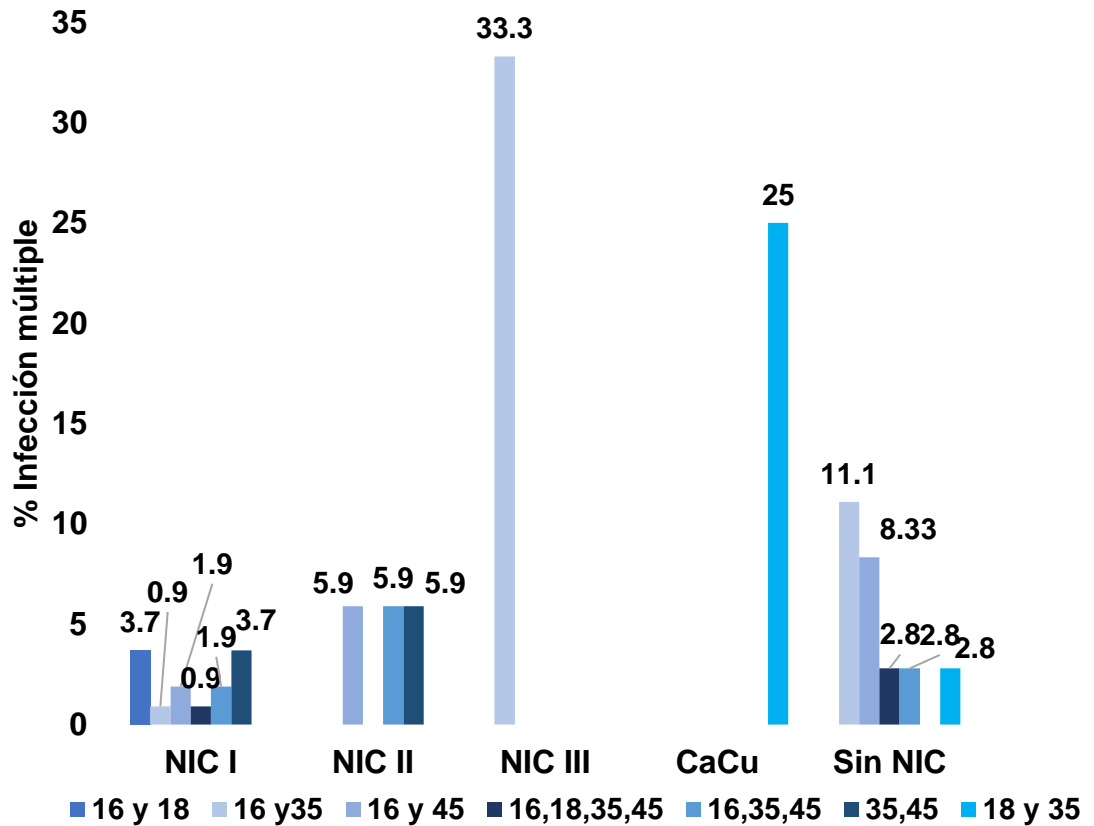


Figura 8. Frecuencia de infección múltiple de VPH16, VPH18, VPH35 y VPH45.

CaCu: cáncer cervicouterino; NIC I: neoplasia intraepitelial cervical grado 1; NIC II neoplasia intraepitelial cervical grado 2; NIC III neoplasia intraepitelial cervical grado 3; VPH: virus de papiloma humano; Sin NIC: sin neoplasia intraepitelial cervical.

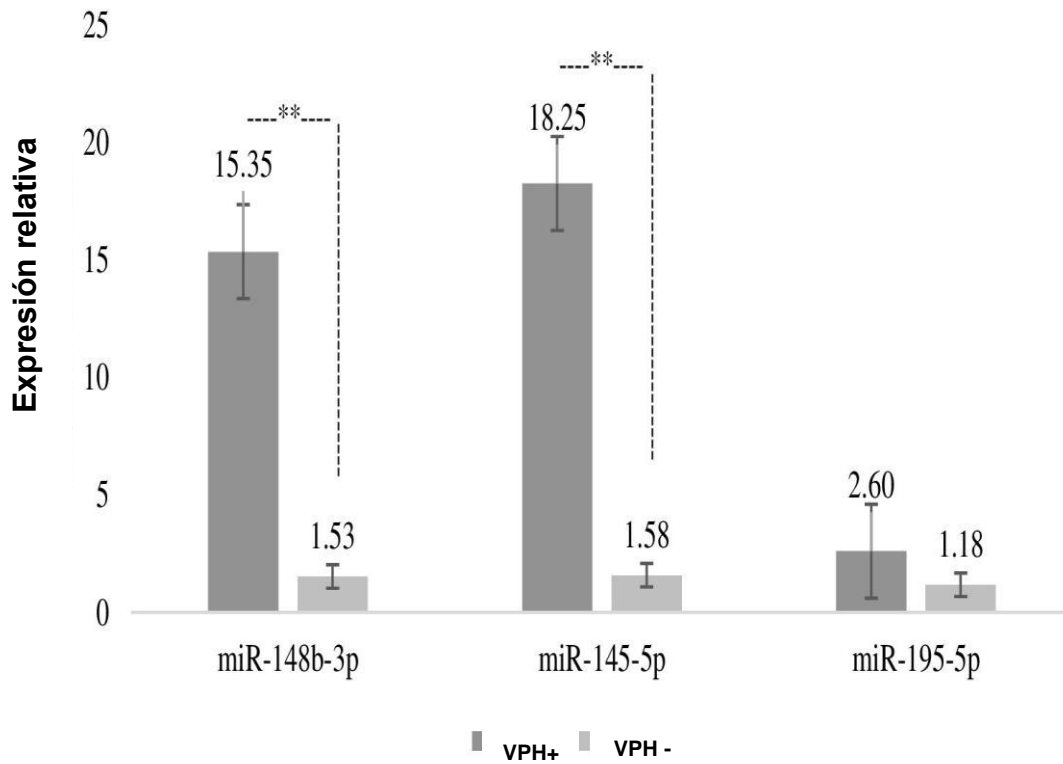


Figura 9. Expresión relativa de miR-148b-3p, miR-145-5p y miR-195-5p. PCR en tiempo real muestra niveles de expresión más altos de miR-148b-3p and miR-145-5p en pacientes VPH positivas. Nuestros resultados no mostraron diferencia significativa en los niveles de expresión de miR-195-5p entre grupos. Barras de error indican \pm DE. ** $p < 0.05$.

Expresión de miRNA y Tipo de infección

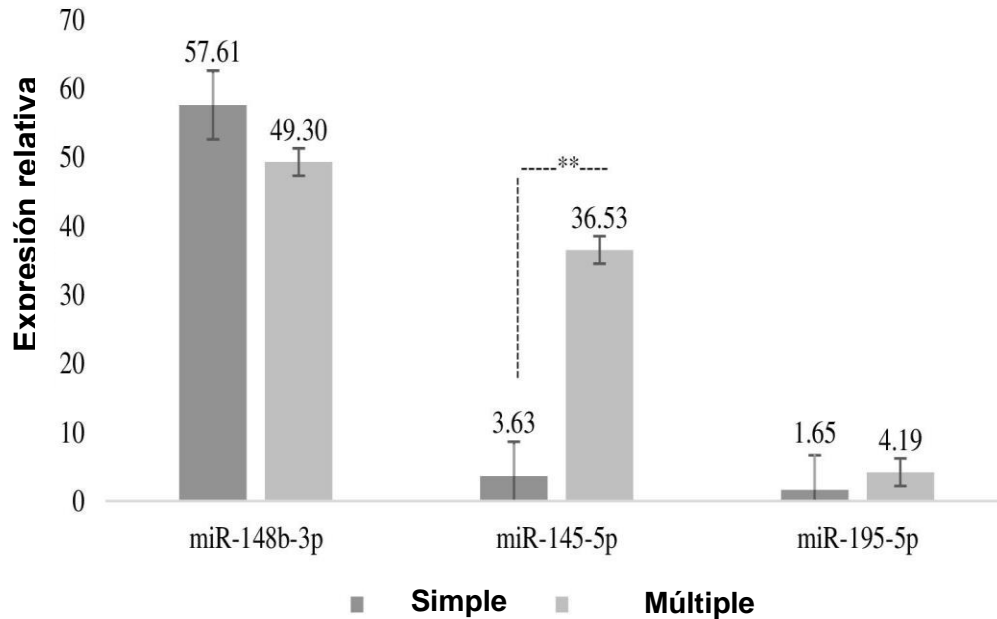


Figura 10. Niveles de expresión relativa de miRNAs y tipo de infección.

Nuestros resultados muestran niveles de expresión significativamente más altos de miR-145-5p entre infecciones simples e infección múltiple, sin embargo, esto no se observó en miR-148b-3p y miR-195-5p. Barra de error indica \pm DE. ** $p < 0.05$.

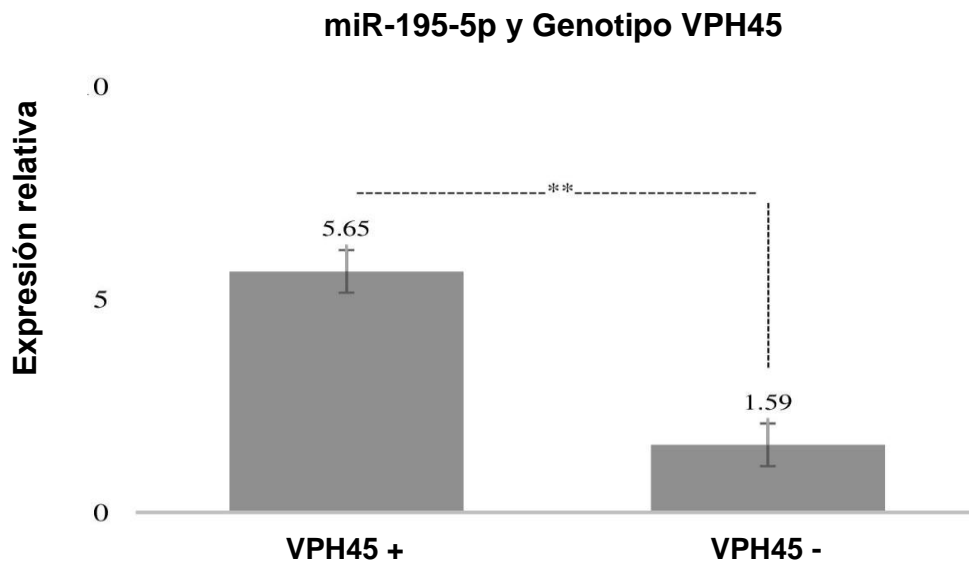


Figura 11. Niveles de expresión de miR-195-5p y genotipo VPH45. PCR tiempo real muestra una diferencia significativa en los niveles de expresión de miR-195-5p entre los estados de pacientes con VPH45. VPH45 positivos muestran mayor nivel de expresión con un cambio de 5.64 veces. Barras de error indican \pm DE. ** $p < 0.05$.

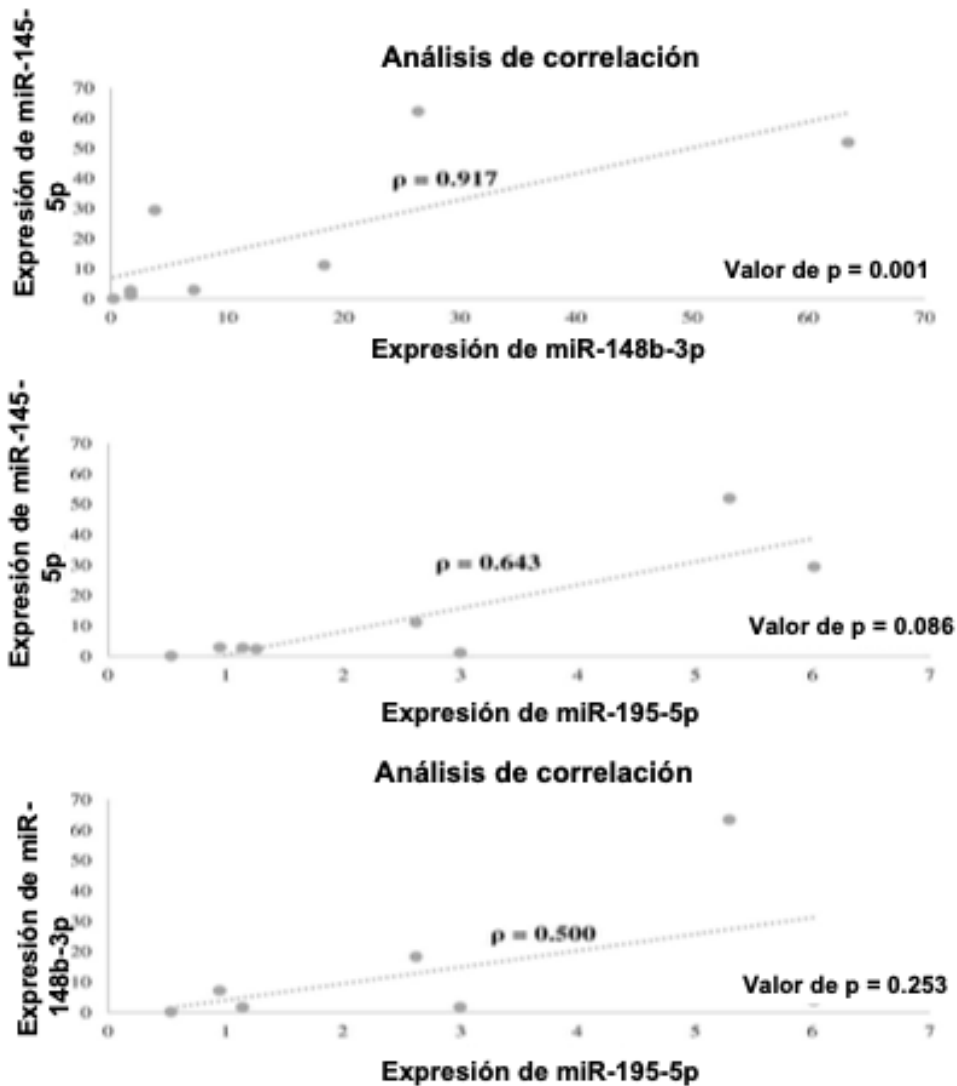


Figura 12. Análisis de correlación entre expresión relativa de miRNAs. Se realizó un análisis de correlación a los miRNAs de nuestro estudio. La expresión relativa de miR-145-5p y miR-148b-3p tuvieron una fuerte correlación positiva con un coeficiente cercano a 1. Respecto a *miR-195-5p*, nuestros resultados no mostraron una correlación significativa entre los niveles de expresión de miRNAs 148b-3p y 145-5p.

9.3.3 Factores de riesgo asociados a CaCu en pacientes VPH16, 18, 35, 45 positivos de alto riesgo en las cuales se evaluó expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR195-5p.

9.3.3.1 Edad

La edad promedio de las pacientes fue de 39 años (IC95% 35.8-42.3). En LIEBG (35.5 años), LIEAG (40.9 años) y sin NIC VPH- (41.2 años) no encontrándose una diferencia significativa. En cuanto a cesáreas se observó una diferencia significativa entre LIEBG y sin NIC VPH- (P=0.02). En las demás variables de riesgo asociadas a cáncer cervicouterino no fueron estadísticamente significativas, lo cual se refiere en el **cuadro 7**.

Cuadro 7. Factores de riesgo más asociados a cáncer cervicouterino en pacientes VPH 16, 18, 35, 45 positivos de alto riesgo, en las cuales se evaluó expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR195-5p.

Variable	NIC n= 25		Sin NIC n=25	P
	LIEBG n=18	LIEAG n= 7	VPH- n=25	
Edad, años	35.5±11.6	40.9±16.2	41.2±8.1	0.23
Parejas sexuales	1.6±0.8	2.7±1.3	1.8±0.9	0.06
Inicio sexualidad, años	17.4±2.6	16.8±0.8	18.4±3.9	0.40
IMC	26.4±4.4	27.6±3.2	28.1±5.0	0.49
Partos	2.7±2.7	3±3.2	2.1±1.7	0.61
Cesáreas	0.1±0.3*	0.1±0.3	0.9±1*	0.01
Abortos	0.1±0.3	0±0	0.2±0.8	0.59

Resultados expresados como la media ± desviación estándar. Se realizó comparación entre grupos. Se consideró como significativo un valor de $p \leq 0.05$, se utilizó un ANOVA de una vía con prueba poshoc tipo Bonferroni. IMC; índice de masa corporal; CaCu: cáncer cervicouterino; NIC I: neoplasia intraepitelial cervical grado 1; NIC II neoplasia intraepitelial cervical grado 2; NIC III neoplasia intraepitelial cervical grado 3; VPH +: virus de papiloma humano positivo; VPH-: virus de papiloma humano negativo.

X. DISCUSIÓN

10.1 Datos epidemiológicos de pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical

10.1.1 Prevalencia de pacientes con y sin neoplasia intraepitelial cervical

La prevalencia de NIC en nuestra población de acuerdo al estudio histopatológico fue de 62.9% NIC I, 10% NIC II, 3.5% NIC III, 2.4% CaCu y 21.2% sin NIC, lo cual concuerda por lo reportado por Medina-Villaseñor et al., 2014, en donde analizaron 568 pacientes donde la edad más frecuente fue de 24-45 años y quienes encontraron de acuerdo al estudio histopatológico mayor prevalencia en NIC I con 83.98% y 16.02% de NIC II, NIC III y carcinoma in situ (LEIAG), en nuestro grupo de estudio de igual manera la edad más frecuente de pacientes con NIC fue de 24-45 años y la prevalencia en pacientes con LIEAG fue similar con 15.9%; ambas poblaciones son mexicanas por lo cual tiene comportamiento similar respecto a la prevalencia de NIC. En población brasileña la edad fue de 18-85 años (edad media 38 años), en la cual se detectó 31.9% de LEIBG), 15.8% LEIAG y CaCu 2.3% (De Brot et al., 2017), lo cual concuerda con la tendencia de prevalencia encontrada en nuestro estudio. En relación con VPH+ todas las pacientes con algún grado de NIC fueron positivas a VPH (100%), y 21.2% de las pacientes sin NIC, lo cual coincide con lo reportado por Wolday et al., 2018 encontrando que el 100% con algún grado de lesión cervical fue VPH+ y 48.9% con citología normal. Camacho-Ureta et al. 2018 observaron 52.4% de citología. La edad de nuestras pacientes coincide con la edad de otros estudios, es por esto la razón de una prevalencia similar de NIC y CaCu en nuestro estudio con lo reportado por otros autores; sin

embargo, en población china el 77.6% con algún grado de NIC fue VPH+ y 22.4% de pacientes sin NIC (Bao et al., 2022). La distribución del promedio de edad en las 3 etapas cada vez más severas en carcinogénesis cervical e infección aguda de VPH, NIC III y cáncer es esencial (Franceschi et al., 2006). Los picos de distribución varían por región geográfica (Franceschi et al., 2006) y reflejan la edad promedio local de la primera relación sexual, dado que la infección de VPH “inicia el reloj” para los eventos siguientes (Herrero et al., 2005). Pocos años después de la edad promedio a la cual la mujer comienza su vida sexual activa, hay un pico alto de infecciones de VPH seguido por una disminución gradual (Herrero et al., 2005); un pico bajo de NIC III sucede de 5-15 años después (el pico de diagnóstico de NIC III sucede a edades más jóvenes con el incremento de intensidad de programas de detección); y el pico o meseta prolongado en cánceres invasivos ocurre en las décadas siguientes (Altekruse et al., 2007). El tiempo prolongado requiere una transición de infección a cáncer invasivo, tiene dos aplicaciones importantes: pocos casos de rápida aparición de CaCu ocurren antes de los 25 años y la mayoría de los cánceres diagnosticados se presentan después de los 40 años de edad (Altekruse et al., 2007).

La prevalencia de VPH permanece debajo de los 25 a 35 años y disminuye con la edad en Italia, países bajos, España, Argentina, Korea y Vietnam. Mientras que en México, Colombia y Chile un segundo pico de la prevalencia de VPH fue detectado en mujeres de mayor edad, en regiones más pobres de Asia y Nigeria fue alta en todas las edades (Franceschi et al., 2006). Illades et al., 2009, el 100% de las mujeres con CaCu fueron VPH positivas y 35.5% de los controles. Illades et al. 2009, reportaron que VPH de alto riesgo estuvo presente en 94.7% de los casos de

CaCu similar a lo encontrado en otras partes del mundo (Walboomers et al., 1999) y en México (Tirado-Gómez et al., 2005). VPH16 es por lejos el más prevalente en CaCu, en carcinoma de células escamosas fueron VPH16,18,31,45,58,69,52 y 6,11,33,56,67; en adenocarcinoma fueron VPH16,18,31,69 (Tirado-Gómez et al., 2005). Existe una variación entre diferentes tipos histológicos de cáncer, VPH16 se encontró más seguido en adenocarcinoma o carcinoma adenoescamoso (ADC/ADSC) (78.7%) y en carcinoma de células escamosas (SCC) (65.5%); similar a lo encontrado en el norte y sur de África donde VPH16 fue encontrado en 72% de los casos de ADC (Castellsague et al. 2006), sin embargo a nivel mundial VPH16 fue identificado en 55.2% de SCC y 31.3% de ADC y en la ciudad de México fue encontrada en 45.1% de los casos de CaCu. En el sureste de México, VPH18 fue más frecuente en SCC (9.3%) que en ADC (7.1%) con lo cual no concuerda con otros estudios donde SCC está presente en 12.3% (Clifford et al., 2003) y 37.7-39% en ADC (Castellsague et al., 2006). López Revilla reportó en pacientes de 16 a 78 años una prevalencia de LSIL (73.1%), HSIL (16.7%) y carcinoma invasivo en 10.2% (López Revilla et al., 2008).

A través de edades (20 a 69 años), los tipos de VPH más comunes asociados con alto grado de neoplasia intraepitelial cervical (NIC grados 2 y 3) fueron VPH16 (51%), 52 (19%), 31 (17%), 33 (13%) y 18 (12%) (Innes et al., 2018). Sin embargo, hubo una tendencia a tasas más altas de infección por VPH 16 y 18 en comparación con otros genotipos de VPH en mujeres de 20 a 29 años (Innes et al., 2018). Los genotipos de VPH comúnmente detectados asociados con cáncer cervical invasivo fueron VPH16 (51%), 18 (21%), 31 (4%), 45 (3%) y 52 (3%) (Innes et al., 2018).

10.1.2 Factores de riesgo asociados a cáncer cervicouterino

10.1.2.1 Edad

El VPH es la infección de transmisión sexual más común en las mujeres (Aral et al., 1999). El 50% de las mujeres sexualmente activas están infectadas con algún tipo de VPH, que puede promover el desarrollo de cáncer (Galloway et al., 1998). Pacientes con VPH de alto riesgo que no aclaran espontáneamente después de 1 o 2 años tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer (De Brot et al., 2017). La tasa de infección por VPH en mujeres sanas jóvenes esta entre 28 a 46% (Bauer et al., 1991; Collins et al., 2002). Esa misma infección puede remitir con el tiempo. El pico de prevalencia de la infección por VPH en mujeres ocurre cerca de los 20 años (Naucler et al., 2008). Después de los 20 años la prevalencia declina, aunque ocurre un segundo pico en mujeres posmenopáusicas en algunas áreas geográficas (Naucler et al., 2008). Esto podría ser atribuido a la persistencia viral, o posiblemente nuevas adquisiciones (Naucler et al., 2008). El 80% de las personas sexualmente activas tuvieron una infección de VPH antes de los 45 años (Smith et al., 2008). Afortunadamente en un 80% de los casos la infección es transitoria y aclarada naturalmente en individuos inmunocompetentes 12-24 meses. (Jaisamrarn et al., 2013) los picos de infección fueron identificados en el inicio de la vida sexual hasta los 25 años (Bruni et al., 2021; Smith et al., 2008). Diversos estudios han reportado un segundo pico de infección en mujeres postmenopáusicas, particularmente en África y América central (Yan et al., 2021).

El intervalo entre la infección y el diagnóstico de cáncer es de 10 a 20 años (Snijders et al., 2008). En nuestro grupo de estudio, la edad promedio de las

pacientes fue de 37 años con un rango de edad de 16 a 70 años, las pacientes con mayor grado de neoplasia presentaron una mayor edad que aquellas más jóvenes, esto quizá debido a que hay una mayor persistencia del virus conforme la edad aumenta, lo cual fue reportado por Plummer et al., 2007 donde mujeres ≥ 50 años comparado con mujeres < 20 años presentaban mayor persistencia viral (Plummer et al., 2007). En nuestro grupo de estudio observamos que las pacientes de CaCu fueron las de mayor edad con un promedio de 52 años. Syrjanen et al. Describen que la mayoría de las infecciones de VPH en mujeres mayores de 55 años están asociados a lesiones de alto grado y CCI, esto se debe a la inhabilidad para aclarar el virus y la transición de infección episomal a integración viral, así como la selección clonal (Syrjanen et al., 2008). La edad más frecuente fue de pacientes con NIC fue 24-45 años, lo cual coincide con Medina-Villaseñor et al., 2014 en población mexicana (Medina-Villaseñor et al., 2014). La edad media de las pacientes con NIC I fue 34 años, NIC II (31 años), NIC III (39 años), CaCu (52 años), sin NIC (40 años), lo cual es similar a lo reportado por Medina-Villaseñor donde la edad media de las pacientes con NIC I fue de 36 años, para las lesiones de alto grado NIC II y NIC III fue de 41 años (Medina-Villaseñor et al., 2014), lo cual corresponde a lo reportado en otras publicaciones nacionales (Villalobos et al., 2008; Yáñez et al., 2009). Illades et al., 2009 reportaron que el promedio de edad fue de 52.2 años en los casos y 50.5 años en los controles; el 53% de los casos de CaCu ocurrió en mujeres de 50 años o más, 41% en mujeres de 35-49 años y 6% de mujeres de 34 años o más jóvenes (illades et al., 2009). Velázquez-Márquez en población poblana reportó que la mayor prevalencia de infección de VPH fue en mujeres jóvenes (18-24 años) y disminuyó ligeramente 25-34 y 35-44 años, bajó drásticamente 45-54 años e

incrementó para alcanzar el mayor nivel 55-64 años (Velázquez-Márquez et al., 2009). La edad media fue 41.5 años (18-85 años) la edad media para el grupo de cáncer fue 52.7 años, HSIL 50.3 años, LSIL 38.7 años y en el grupo de citología normal fue 45.2 años (Velázquez-Márquez et al., 2009). Los picos de infección fueron identificados en el inicio de la vida sexual a los 25 años (Bruni et al., 2010) y un segundo pico de infección en mujeres postmenopáusicas (Yan et al., 2021), esto debido a la senescencia del control inmunológico celular, reactivación de la infección latente y adquisición de nuevas infecciones a través de transmisión sexual (Yan et al., 2021).

10.1.2.2 Número de parejas sexuales

El número de parejas sexuales en pacientes con y sin NIC fue en promedio de 2, presentándose con el menor número de parejas las pacientes VPH -. Se observó una diferencia significativa en pacientes con NIC y sin NIC VPH+ y sin NIC VPH- ($p=0.04$).

El riesgo de contagio con VPH fue mayor en aquellas pacientes con más de 4 parejas sexuales (RM: 3.16, 95% IC: 1.19-10.68). El mayor porcentaje de las pacientes refirieron tener una pareja sexual y más de 2 parejas, las pacientes con algún grado de neoplasia, lo cual concuerda con lo reportado por Castellsague; el número de parejas y la sexualidad temprana se relacionan con genotipos de alto riesgo a nivel mundial (Castellsague et al., 2008). En el estudio de Medina-Villaseñor et al, 2014, el 14.89% de los casos tuvieron solo un compañero sexual y el 85.01% más de uno (Medina-Villaseñor et al, 2014), en mexicanas sexualmente activas con infección subclínica detectada por PCR, la frecuencia encontrada es de 20%, con

incremento en el riesgo a 50-60% cuando tienen o han tenido varias parejas sexuales (Sam-Soto et al. 2011).

10.1.2.3 Inicio de sexualidad temprana

El inicio de relaciones sexuales en promedio fue de 17 años (IC95% 17.3-18.2), presentándose un mayor número en pacientes con NIC (79.9%) y sin NIC VPH + (77.8%) entre 15 y 20 años. Se observó una diferencia significativa entre pacientes con NIC y sin NIC VPH- ($p=0.01$), lo cual difiere por lo reportado por Camacho et al. 2018 quienes encontraron que el 46% inició relaciones sexuales >18 años y 52% VPH+ >18 años (Camacho et al. 2018). Sin embargo, fue similar a lo reportado por Medina-Villaseñor donde el inicio de vida sexual tuvo un rango de 13-35 años, con promedio de 16 años, lo cual confirma que la infección por el VPH se adquiere en la adolescencia, muy rápidamente después de iniciar su actividad sexual (Medina-Villaseñor et al, 2014),. Se ha documentado que la prevalencia de la infección por VPH entre las mujeres de 20 años es del 22-24% (Medina-Villaseñor et al, 2014).

El promedio de inicio de las relaciones sexuales en los Estados Unidos de Norte América es de 16.4 años; en México según la encuesta Gente Joven de la Fundación Mexicana de la Formación Familiar (MEXFAM), la edad promedio de la primera relación sexual fue de 15.2 años en hombres y 15.3 años en mujeres en el grupo de 13 a 19 años (Baseman et al., 2005). En el 2000, el Instituto Mexicano de la Juventud, reportó que el 60% de los hombres y 51% de las mujeres del grupo de 15 a 29 años eran sexualmente activos (Baseman et al., 2005). Se ha documentado que el inicio temprano de la vida sexual incrementa el riesgo de infección por VPH

y se relaciona con el mayor número de compañeros sexuales, que cada nueva pareja sexual aumenta 10 veces el riesgo (Baseman et al., 2005). Tener un compañero sin circuncidar y el uso inconstante o inadecuado del preservativo, aumenta el riesgo de transmisión (Baseman et al., 2005). De acuerdo a la CONAPO 2014, en las mujeres entre 25 y 34 años y 35 a 49 años, brinda la posibilidad de comparar el comportamiento de dos generaciones, para la última generación mencionada, las nacidas entre 1965 y 1979, se estimó que el 50 por ciento había experimentado su primera relación sexual a los 18.4 años, mientras que las nacidas entre 1980 y 1989 tuvieron su primer encuentro sexual a los 17.7 años; es decir, a una edad menor que la cohorte anterior, por lo cual podríamos decir que la generación más joven tendrá un periodo más amplio de exposición al riesgo de un embarazo o de adquirir alguna ITS (CONAPO, 2014).

Tal como indican los datos, en la etapa de la adolescencia es cuando la mitad de las mujeres tuvieron su primera relación sexual, además se observa que, al clasificarla, de acuerdo al nivel de escolaridad, hubo un descenso de la edad en todos los niveles en las dos generaciones, aunque en ambos casos hay una postergación de la edad de inicio de la primera relación sexual conforme aumenta el nivel de escolaridad (CONAPO 2014).

Así, en 2014, las que no tienen escolaridad o cuentan con primaria incompleta comenzaron en la etapa media de la adolescencia de 15.9 y 16.5 años, respectivamente; las que cuentan con primaria completa a los 16.8 y 17.5 años, en este caso se observa que las más jóvenes comienzan un poco antes de la fase tardía de la adolescencia; y las de secundaria o más, en ambas generaciones inician en la fase tardía de esa etapa, 17.9 y 19.0 años, respectivamente; en el caso de las

jóvenes la brecha entre las menos escolarizadas y las más escolarizadas baja a dos años respecto a las más adultas que tuvieron una brecha de 2.5 años; esto muestra que las mujeres con bajo nivel de escolaridad tienen una mayor posibilidad de tener un hijo a una edad más temprana (CONAPO 2014). De acuerdo al lugar de residencia, se observa que, en los últimos cinco años, en las zonas rurales no se presentaron cambios en la edad mediana al primer encuentro sexual (17.5 años en las mujeres de 25 a 34 y 17.6 años en las de 35 a 49 años), mientras que en las zonas urbanas las jóvenes tienden a iniciar a una edad más temprana respecto de las adultas, de 17.7 a 18.6 años, respectivamente (CONAPO 2014).

El inicio de las relaciones sexuales a una edad más temprana en las mujeres entre 25 y 34 años se presentó en todas las entidades federativas del país, entre las que destaca Nuevo León con un descenso de la edad en año y medio, seguido por Jalisco, Aguascalientes, Sonora, Nayarit, Ciudad de México y Coahuila, quienes comenzaron un año antes que las mujeres entre 35 y 49 años (CONAPO 2014). Asimismo, se observa que en Chiapas la generación de 35 a 49 años inició a una edad más temprana (17.6 años) que en el resto de las entidades; de igual forma, considerando a las de 25 a 34 años, Chihuahua es la entidad en la que 50 por ciento de las mujeres tuvo su primera relación sexual antes de los 17.2 años, esto es, una edad todavía menor que la registrada en Chiapas (CONAPO 2014). Por otra parte, la entidad federativa donde la mitad de las mujeres inició a una edad más tardía en las adultas (35 a 49 años) fue Nuevo León a una edad de 19.2 años y, en las más jóvenes es Zacatecas con una edad de 18.3 años (CONAPO 2014). Estos resultados muestran que, si no hay un acompañamiento de orientación y acceso al uso de métodos anticonceptivos, existe una mayor posibilidad de que las mujeres

tengan un embarazo en la adolescencia, o bien contraigan una ITS. Se ha observado un incremento en el riesgo de lesiones preinvasivas y CaCu, cuando las mujeres iniciaron su vida sexual activa antes de los 20 años, lo cual puede deberse a la inmadurez del cuello uterino como mencionan algunos autores (Muñoz et al.,2007). La exposición del VPH es muy común en la adolescencia después del inicio de las relaciones sexuales, como por ejemplo se ha encontrado que el 38% de las mujeres universitarias han resultado positivas a la prueba del DNA del VPH por PCR, pero solo el 13% desarrollan cambios citológicos por alguna lesión de bajo grado por el VPH (Winer et al., 2011). En nuestro estudio el 46% de las pacientes presentaron algún grado de neoplasia. El riesgo de infección aumenta con el número total de parejas sexuales y con el número de parejas sexuales del compañero actual (Ho et al., 1998) Velázquez-Márquez reportó que el inicio de vida sexual en sus pacientes fue 18.8 años (14-36 años) (Velázquez-Márquez et al., 2009).

10.1.2.4 Índice de masa corporal (IMC)

El IMC promedio fue de 28 (IC95%: 27.3-28.6) en el total de las pacientes. El 41.9% de las pacientes mantenían sobrepeso y 29% de obesidad. Las pacientes con NIC I presentaron 27.7% de obesidad, NIC II (27.8%), NIC III (60%), y CaCu (80%), sin NIC (28.8%), por lo anterior las pacientes con mayor grado de neoplasia presentaron mayor porcentaje de obesidad, lo cual coincide con Lacey et al. 2003, quienes observaron mayor prevalencia de obesidad en mujeres con LIEAG (Lacey et al. 2003).

10.1.2.5 Uso de anticonceptivos

Fue referido en un 52.1% del total de las pacientes, siendo los más frecuentes la cirugía (22.2%) y hormonal (31.7 %). Moreno et al. 2002 observaron un incremento en el riesgo en la incidencia de CaCu y lesiones precursoras en mujeres que consumen anticonceptivos orales, lo que concuerda con nuestra población de estudio, ya que se encontró 15.6 más riesgo de CaCu en las pacientes que utilizan anticonceptivos orales ($p=0.004$) comparado con pacientes que utilizaban algún otro método anticonceptivo. En el estudio de Medina-Villaseñor, los anticonceptivos orales fueron utilizados en el 30.99% de los casos (Medina-Villaseñor et al., 2014). El uso de anticonceptivos orales se ha asociado con CaCu, en sujetos VPH+ de un estudio en Manchester para NIC III un OR de 1.5 (95%CI, 0.8-2.9) por 8 años o más de uso de anticonceptivos orales comparado con quienes no usaban anticonceptivos orales (Deacon et al., 2000), Otros estudios no encontraron un incremento del riesgo para NIC o CaCu (Schiffman et al., 1993; Lacey et al., 1999), pero el estudio realizado por Lacey encontró una asociación con el uso de anticonceptivos orales para adenocarcinoma in situ (OR=17.1, 95% CI:1.5-188.2). En el estudio de Copenhagen un patrón de disminución de riesgo de ASCUS, LSIL y HSIL fue visto con el incremento en el número de años con anticonceptivos orales en mujeres VPH positivas (Kruger-Kjaer et al., 1998). En el estudio de Costa Rica de HSIL/CC, encontraron un incremento de riesgo por 5 años o más en el uso de anticonceptivos orales solo en mujeres con menos de 3 embarazos (OR= 3.1, 95% IC: 1.1-9.1) (Hildesheim et al., 2001). En contraste, la información del estudio IARC en mujeres VPH+ mostraron un incremento en el riesgo de 5-9 años de uso (OR=2.8, 95% 1.5-5.4) y por más de 10 años (OR= 4.0, 95% 2.1-7.8). El uso de

anticonceptivos orales por más de 5 años es un cofactor que puede aumentar 4 veces más el riesgo de CaCu en mujeres VPH+ (Moreno et al., 2002). Estos hallazgos en otros estudios comparado con el nuestro muestran que en nuestra población existe un riesgo mayor que en otras poblaciones por el uso de anticonceptivos orales en mujeres VPH+.

Mecanismos hormonales pueden influenciar la progresión de lesiones premalignas a lesiones cervicales malignas promoviendo la integración de DNA de VPH en el genoma del hospedero, lo que resulta en una desregulación de la expresión de E6 y E7 (IARC, 2012), estudios experimentales han mostrado que el estradiol puede estimular la transcripción de VPH16 E6 y E7 en líneas celulares que contienen integrado VPH16 (Mitrani-Rosenbaum et al., 1989), desde que los marcos de lectura de E6 y E7 han sido asociados con el potencial oncogénico de VPH16, el efecto de estrógenos en la transcripción de estos genes virales pueden ser de importancia biológica en la transformación maligna de células cervicales infectadas con VPH16 (Elson et al., 2000). Información de estudios experimentales demostraron un mecanismo sinérgico ante la exposición crónica de estrógeno y oncogenes de VPH16 que modulan la carcinogénesis escamosa en el tracto reproductivo femenino de ratón expresando VPH16 (Elson et al., 2000).

10.1.2.6 Tabaquismo

Louie et al. 2011, consideraron al tabaquismo como factor de riesgo para CaCu, sin embargo, en nuestro estudio no fue estadísticamente significativo, las pacientes con NIC el 7.5% refirieron fumar, sin NIC VPH+ (5.6%), y sin NIC VPH- (100%) (Louie et al. 2011). Fumar ha sido asociado con CaCu desde 1970 basado

en la correlación entre la incidencia de CaCu y la incidencia de otros cánceres relacionados con el tabaco (Winkelstein, 1977). Un artículo de revisión extenso de la relación entre fumar y CaCu fue publicada en 1998 incluyendo 8 estudios de cohorte y 44 casos-controles (Szarewski and Cuzick, 1998). El reporte concluyó que la asociación era consistente en análisis en mujeres VPH+, el riesgo fue de 1-3 veces, el riesgo incrementaba conforme aumentaba el grado de neoplasia preinvasiva (Louie et al. 2011). El hecho de que la nicotina y carcinógenos tabaco específicos han sido detectados en moco cervical de fumadores incrementa la hipótesis de la acción sinérgica entre fumar tabaco y VPH para el desarrollo de LSIL y CaCu (Louie et al. 2011). Carcinógenos químicos del tabaco pueden ejercer un efecto mitógeno directo causando daño en el DNA (Poppe et al., 1995). Algunos autores mencionan que la exposición a tabaco puede afectar la habilidad de la respuesta del hospedero a montar una respuesta inmune local contra las infecciones virales, como se ha demostrado que el fumar disminuye el número de células de Langerhans y otros marcadores de la función inmune (Poppe et al., 1995). Una correlación significativa entre la disminución del consumo de tabaco y disminución en la zona de la lesión en un estudio de intervención en mujeres fumadoras con lesiones de bajo grado incrementa la fuerza del posible papel del fumar tabaco en carcinogénesis de VPH (Szarewski et al., 1996). Velázquez-Márquez et al., 2009 no encontró ninguna asociación de tabaco como factor de riesgo, porque la mayoría de las mujeres eran no fumadoras (93.8%) (Velázquez-Márquez et al., 2009).

10.1.2.7 Partos

Observamos que el 100% de las pacientes con NIC III tuvieron más de 4 partos, lo cual coincide con Schiffman et al. y Muñoz et al., quienes mostraron que la alta paridad está asociada a CaCu y LIEAG (Schiffman et al., 2003; Muñoz et al., 2002). Alta paridad ha sido asociada con CaCu y carcinoma in situ en estudios de casos y controles (Muñoz et al., 2002). Estudios en mujeres VPH+ reportaron un incremento en el riesgo de HSIL/CaCu con un incremento en el número de embarazos (Muñoz et al., 2002). En el estudio de IARC mujeres con 7 o más embarazos a término incrementaron 4 veces el riesgo de desarrollar células escamosas de CaCu comparado con mujeres nulíparas (OR =3.82, 95% IC:2.66-5.48) (Muñoz et al., 2002). Riesgo de HSIL/ CaCu significativamente incrementaron con el aumento en el número de embarazos en el estudio de Costa Rica (P=0.04) (Hildesheim et al., 2001). Una asociación estadística fue encontrada con NIC III en un estudio en Manchester para mujeres con 3 o más embarazos a término comparado con mujeres nulíparas OR= 1.9, 95% IC:0.9-3.8) (Deacon et al., 2000). El estudio caso-control de Copenhagen no detectó efecto de paridad en HSIL, pero esto se puede deber a la baja paridad de la población de estudio (Kruger-Kjaer et al., 1998). Un estudio en Honduras mostró tener efectos en paridad, sin embargo, no fueron significativos en casos VPH+ y controles (Ferrera et al., 2000). La alta paridad puede incrementar el riesgo de CaCu porque mantiene la zona de transformación del exocérnix por muchos años (Autier et al., 1996), facilitando la exposición directa al VPH y posiblemente otros cofactores. Cambios hormonales inducidos por el embarazo también modulan la respuesta inmune a VPH e influencia el riesgo de persistencia o progresión (Muñoz et al., 2002; Sethi et al., 1998).

Velázquez-Márquez reportó que las mujeres de su estudio tuvieron 4 embarazos en promedio y encontró una asociación positiva entre el número de embarazos y el grado de neoplasia ($p < 0.05$).

10.2 Genotipo VPH de alto riesgo (VPH16, VPH18, VPH35, VPH45)

En México CaCu es la segunda causa más frecuente de neoplasia y la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres (Jemal et al., 2011), se ha reportado que los tipos de VPH 16, 18, 58, 31 y 45 son los más frecuentes en muestras de pacientes mexicanas (Velázquez-Márquez et al., 2009; Illades et al., 2010; López-Rivera et al., 2012), en relación al genotipo de VPH de alto riesgo en nuestra población se encontró en el 34.1 % de mujeres VPH+, siendo los más prevalentes VPH16(20%) y VPH45(18.8%); lo cual difiere con lo reportado por Peralta-Rodríguez et al., 2014, quienes encontraron los genotipos VPH16 y VPH18, esto quizá por la variabilidad de genotipos en cada población (Peralta-Rodríguez et al., 2014). En cuanto a las pacientes sin NIC VPH+, el genotipo VPH45 fue el más prevalente, lo cual coincide con Salcedo et al., 2014 y Peralta Rodríguez et al., 2012 cuyos estudios mostraron que el VPH45 fue el genotipo más prevalente en pacientes con citología normal sin NIC (Salcedo et al., 2014; Peralta Rodríguez et al., 2012), esto último es de relevancia ya que este genotipo al estar presente en este tipo de pacientes podría ser un riesgo ya que no hay presencia de neoplasia intraepitelial cervical, una posible explicación de esto es la presencia de diferentes sublinajes de VPH45 de acuerdo a la región, lo cual concuerda con lo reportado por Chen et al. en población china (Chen et al., 2013; Chen et al., 2014), por lo cual se requerirían estudios posteriores para determinar el sublinaje de VPH45 presente en

esta población. Algunos autores sugieren que las diferencias geográficas en la distribución de VPH podrían tener un impacto en la efectividad de la vacuna de VPH en diferentes poblaciones (Dong et al., 2017). El más frecuente fue VPH16 seguido por VPH 42, 58, 31, 18, 56, 81, 35, 33 Y 45. En México, los tipos VPH 16, 18, 31, 33, 39, 45, 53, 58 y 59 fueron encontrados en muestras cervicales normales (Orozco-Colín et al., 2010; Illades-Aguiar et al., 2010; Illades-Aguiar et al., 2009). Información regional de la prevalencia y distribución de VPH son esenciales para estimular el impacto de las vacunas en CaCu y desarrollo de programas de detección (Orozco-Colin et al., 2010). Una posible explicación a la diferencia en la prevalencia de VPH incluye variables relacionadas con la edad, edad de inicio de relación sexual, número de parejas sexuales, estatus socioeconómico, nivel de educación, estatus marital, número de embarazos, uso de anticonceptivos hormonales, fumar y variación intrarregional (Orozco-Colin et al., 2010). Similar a otros estudios previos edad-específico en México y otras regiones del mundo, López-Rivera encontró dos grupos con alta prevalencia de VPH, mujeres menores de 20 años y mujeres de 70-76 años. El grupo más joven (<20 años) con una mayor incidencia de infección de VPH puede ser un indicador de transmisión sexual y coincide con la iniciación de vida sexual. El grupo de mayor edad (70-79 años) de mujeres VPH+ pudieron estar expuestas por más tiempo a la transmisión por VPH cuando eran jóvenes o tienen infecciones por VPH reactivas latentes por factores asociados a la edad (López-Rivera et al., 2012). Aguilar-Lemarroy reportó que el 100% de las pacientes con CaCu y NIC III fueron VPH+ y 12.4% de las mujeres en el grupo control. Esta observación fue consistente con lo reportado en distintas partes del mundo (de San José et al., 2007; Bruni et al., 2010; Crow et al., 2012) estudios previos en pacientes

mexicanas reportaron una incidencia 10-12% de infección de VPH en mujeres sanas de la ciudad de México (López-Rivera et al., 2012), 16.7% en mujeres sanas en el estado de Morelos (Lazcano-Ponce et al., 2001) y 35-40% en mujeres sanas en el sureste de México (Illades et al., 2010), sin embargo en nuestro estudio encontramos 36% en mujeres sanas. Estas diferencias pueden reflejar la variabilidad epidemiológica actual en las diferentes regiones del país o a las diferencias de la sensibilidad del método de detección. La prevalencia de VPH y sus genotipos en mujeres mexicanas es heterogénea de acuerdo con el tipo de lesión y área geográfica (Oyervides et al., 2020). De acuerdo con la prevalencia de VPH respecto a la edad, el mayor pico de infección de VPH fue observado en mujeres <25 años (54.9%) y esto disminuyó substancialmente en mujeres de 46-55 años (27.5%), de igual manera en mujeres sanas y con NIC I la infección mayor fue en mujeres <25 años, con 20% y 63.2% respectivamente. Esto disminuyó conforme la edad (Sargent et al., 2008; Ting et al., 2010). Aguilar- Lemarroy reportó que el genotipo más prevalente fue VPH16 en todos los grupos de diagnóstico, como lo fue reportado alrededor del mundo por diversos autores (Guan et al., 2012; de San José et al., 2010; Forman et al., 2012; Peralta Rodríguez et al., 2012). Además, Berumen et al. sugieren que las variantes americano-asiáticas (AA) son más oncogénicas que las variantes europeas y pueden contribuir a la alta incidencia de CaCu en México (Berumen et al., 2001). VPH16 es el genotipo más frecuente en CaCu alrededor del mundo y la asociación entre sus variantes y CaCu ha sido encontrada (Berumen et al., 2001), Illades-Aguilar reportó que VPH 16 se encontraba en 45% de mujeres, González-Losa et al. encontraron que VPH58 era el más frecuente en HSIL (30.6%), seguido por VPH16 (27.4%), VPH33 (16.1%) y

VPH 18 (11.3%). López-Revilla et al. encontró que VPH16 fue el más frecuente en HSIL en el estado de San Luis Potosí y en el estado de Guanajuato y Torroella-Kouri et al. Encontró que fue el más frecuente en la ciudad de México (López-Revilla et al.,2008; Torroella-Kouri et al., 1998).

Illades-Aguiar en pacientes con LSIL, VPH33 fue el más frecuente (29%), seguido de VPH16 (23%), González-Losa et al. encontró VPH58 en LSIL en el estado de Yucatán, López-Revilla encontró que VPH16 es el más común en LSIL en San Luis Potosí y Guanajuato (González-Losa et al., 2004; González-Losa et al., 2017; López-Revilla et al.,2008). La distribución en el mundo de tipos de VPH en mujeres con LSIL reportado por Clifford et al., mostraron que VPH16 es el tipo más frecuente y en Sudamérica y Centroamérica VPH33 es uno de los más frecuentes (Clifford et al, 2005). En mujeres sin lesión intraepitelial puede variar entre poblaciones, en estudios basado en poblaciones, la frecuencia de VPH fue 25.6% en África, 8.7% en Asia, 14.3% en Sudamérica y 5.2% en Europa (Clifford et al, 2005) y 12.4% en el estado de Morelos (Lazcano-Ponce et al., 2001).

A nivel mundial hay variaciones importantes en la prevalencia de VPH en diferentes grupos. En los EUA y en Europa la prevalencia de VPH disminuye con la edad. En Asia es variable, Korea, Tailandia y Vietnam, disminuye con la edad; pero en la india la prevalencia permanece alta y muy similar en todos los grupos (Franceschi et al., 2006). En África (Nigeria), prevalencia es uno de las más altas en el mundo y muy similar en todos los grupos (Franceschi et al., 2006). En algunos países de Latinoamérica (Chile, Colombia y Morelos en México) hay una prevalencia edad específica y en otros como Argentina disminuye con la edad. En el estudio de Illades-Aguiar, la infección por cualquier tipo de VPH disminuye con la edad, pero

infecciones con VPH de alto riesgo en general y VPH16, la frecuencia de infección por VPH aumenta en mujeres mayores de 55 años de edad (Yamada et al., 1997). En mujeres del sureste de México encontraron variantes europeas y asiático-americanas (Yamada et al., 1997); en los casos de CaCu 35% fueron positivos para variantes AA, apuntando a la subvariante AA-c estuvo presente en CaCu y no en SIL y lesión no intraepitelial (González-Losa et al., 2004). Berumen et al., encontraron que la cuarta parte de los casos de CaCu en mujeres mexicanas eran atribuibles a la variante AA e identificaron la subvariante AA-c como la más prevalente en mujeres con CaCu (Berumen et al., 2008). Ha sido propuesto que las variantes AA de VPH16, en particular la subvariante AA-c son más oncogénicas que las variantes E (Kammer et al., 2000). López-Revilla et al. reportaron la prevalencia de VPH de alto riesgo: 16 (53.4%), 31 (15.6%), 18(8.9%), 35 (5.6%), 52(5.4%), 33 (1.2%), 58 (0.7%). La prevalencia de infección por 2 ó 3 tipos de VPH de alto riesgo 25.9% y 2.7%; VPH18 fue acompañado de genotipos 31, 52 y 35. por otra parte, Benavente et al., 2018 reportó que el 63.6% de las pacientes presentaban VPH de alto riesgo; 23.1% oncogénico y 7.4% de bajo riesgo y otros tipos fueron detectados en 19.83% (López-Revilla et al., 2008). Coinfecciones entre 2 o más genotipos fueron observadas en 12 casos entre VPH 39-45-68, 40-43-91, y 31-91 en población peruana. Perú mostro una alta frecuencia de VPH de alto riesgo en mujeres de zona urbana comparada con mujeres de las amazonas, en la población urbana VPH16 fue el genotipo más común seguido por VPH18 y VPH31, en la comunidad de amazonia, VPH16 no fue común como otros tipos VPH39, VPH71 y VPH96; la distribución de genotipos es diferente en dos regiones cercanas del mismo país y cambió la prevalencia de genotipos (Martorell et al., 2012). La prevalencia de VPH16

disminuye significativamente debido a la introducción de la vacuna (Dong et al., 2017; Mesher et al., 2013; Mesher et al., 2016). Velázquez -Márquez reportó que 6/8 muestras de CaCu fueron VPH16 y una VPH18. VPH16 fue el más frecuente sin NIC (5.9%), LIEBG (12.9%), LIEAG (13.7%) y 75% en CaCu. La prevalencia de VPH16 se presentó 5.9% en muestras normales, 12.9% en LIEBG, 13.7% en LIEAG y 75% en CaCu, la prevalencia de VPH18, 31,6 y 11 fueron 37.3%, 9.6%, 9.6%, y 4.8%. es importante que una de las muestras con LIEAG estaba infectada con genotipos de bajo riesgo, pero con el mayor número de embarazos. Múltiples infecciones con genotipos virales diferentes fueron detectadas en los grupos de LIEBG y LIEAG, pero no en pacientes con CaCu y muestras normales. La más alta prevalencia de VPH18 en mujeres jóvenes (18-34 años) y disminuyó con la edad, mientras que VPH16 mostró alta prevalencia en dos grupos 35-44 y 55-64 años. La media de edad con múltiples infecciones fue 41.8 años, pero no se encontró asociación con ningún grupo de edad. Nogueira et al., 2017 reportó que los tipos de VPH más frecuentes fueron VPH16 (54%), VPH 18 (10%), VPH33-58 (7%), VPH45 (5%), la presencia de más de un genotipo en muestras tumorales fue en 4%. Adenocarcinoma se asoció con mayor proporción con VPH 18 (37.5%) que VPH16 (19.1%) ($p=0.032$). En población coreana el genotipo mas prevalente fue VPH53, seguido de 16,58,52 y 68, siendo los VPH de alto riesgo más frecuentes VPH33, 35, 39, 51, 52, 53, 58 (Kim et al., 2017).

10.2.1 Infección múltiple de genotipo de VPH de alto riesgo

En relación con la presencia de más de un genotipo de VPH de alto riesgo en pacientes con NIC I encontramos 13.1% de infección múltiple, lo cual es similar a lo reportado por López-Revilla et al. Quienes reportaron 21.1% y observaron que un 10% podría evolucionar a lesiones de mayor grado (López-Revilla et al.2014). y Kim et al., 2021 que reportaron 15.7% de infección múltiple en LEIBG (Kim et al., 2021)

En pacientes sin NIC VPH+ con citología normal (27.6%) observamos un alto número de infecciones múltiples en nuestra población, lo cual concuerda con lo reportado por Aguilar-Lemarroy et al. 2015 (63%) en población mexicana (Aguilar-Lemarroy et al. 2015). En los pacientes con CaCu, VPH16, 18 y 45 fueron los más prevalentes seguidos por 52, 58 y 39. VPH 52 fue el más reportado en Asia (Quek et al., 2013; Wu et al., 2013) en EUA (Hariri et al., 2012) y Chile (Fereccio et al., 2008). En mujeres con NIC III, los más prevalentes son VPH 16, 31, 18,70 y 51 pero VPH 16 y 31 tienen una mayor atribución, es claro que la presencia de tipos de VPH 16, 31 y 18 es común en este tipo de lesión alrededor del mundo (Castle et al., 2010; Coutlee et al., 2011; Hariri et al., 2012; Anderson et al., 2013). Los VPH más comunes en NIC I aparte de VPH16, son 84 y 62; VPH 84 fue reportado en población suiza (Froberg et al., 2012) e India (Datta et al., 2010).

En muestras de CaCu hay una disminución mayor en la prevalencia de infección múltiple similar a la reportado por Aguilar-Lemarroy et al., 2015 y Hariri et al., 2012. En contraste una alta prevalencia de coinfecciones ha sido reportada en pacientes japoneses en CaCu (Watari et al., 2011), Adicionalmente VPH16 fue más frecuentemente encontrada en coinfección con VPH 18, 39 y 70 en mujeres con

CaCu, en cambio en mujeres sin lesión cervical, está acompañado de los tipos 62, 51 y 84 (Aguilar-Lemaroy et al., 2015) VPH16, VPH18, 45, 39, 52, 58 Y 33 son responsables de la mayoría de los casos de CaCu en pacientes mexicanas. El papel de coinfecciones en carcinogénesis cervical no es claro, por lo que sería interesante determinar si la presencia de coinfecciones con ciertos tipos de VPH modifica el tiempo de progresión y/o el tiempo de regresión de las lesiones (Michimata et al., 2013). Ha sido reportado que la coinfección con VPH34 está asociada con una menor incidencia de metástasis de nódulo linfático en pacientes con CaCu (Michimata et al., 2013). Estudios posteriores son necesarios para determinar la contribución biológica de las coinfecciones de VPH, especialmente aquellas asociadas con respuestas inmunogénicas que pueden tener serias implicaciones en tratamiento y/o diagnóstico (Bachtiary et al., 2002).

Illades et al., 2009 reportaron que el tipo de VPH más prevalente en mujeres con carcinoma de células escamosas (SCC) fue VPH16 (65.5%) seguido de VPH18 (9.3%), 31 (7.6%), 45 (5.1%) y 58 (4.2%). En mujeres con carcinoma adenoescamoso (ADC) VPH16 fue el más frecuente (78.7%), seguido de VPH18 (7.1%), 31(7.1%) y 69 (7.1%) y sujetos control 29.6% fueron infectados con tipos de alto riesgo y únicamente 11 (4.3%) se detectaron de bajo riesgo. Es importante hacer notar que, en el grupo sin lesión cervical, VPH33 fue el más recurrente (13.7%) seguido por VPH16 (11.3%), 58 (1.6%), y 61(1.6%). En Puebla Velázquez-Márquez, reportó que las pacientes presentaron 3.4% de coinfección.

VPH 18, 45 y otros tipos en las especies alfa-7 tienen una alta propensión a lesiones glandular endocervical y adenocarcinoma cervical (Clifford et al., 2008), los

cuales son menos eficientemente detectados y prevenidos en detección citológica (Ronco et al., 2010; Katki et al., 2011; Ault et al., 2011).

VPH31, 33 y 58 se han reportado como de alto riesgo para el desarrollo de NIC III que otros tipos de VPH de alto riesgo aparte de VPH16. Este metaanálisis confirma una fuerte relación entre citología normal y NIC III, este patrón se observó también entre VPH 52 y VPH 35 (Guan et al., 2012). En población coreana reportaron 33.2% de coinfección en lesiones de alto grado (NIC II, NIC III) y el más frecuente fue VPH16 (Kim et al., 2017).

El Diagnóstico citológico de ASCUS o LIEBG tienen una limitada utilidad para estratificación de riesgo de mujeres VPH+ y junto con NIC I, son predominantemente pronósticas para infección de VPH a diferencia de verdaderos precursores de cáncer (Schifman et al., 2011; Wang et al., 2009). En efecto, un diagnóstico de ASCUS y/o LIEBG ha mostrado tener una pequeña estratificación de riesgo a largo plazo para NIC III en comparación con las pruebas de VPH de alto riesgo (Schifman et al., 2011; Wang et al., 2009). NIC II VPH16+ indica más un estado precanceroso que NIC II sin VPH16 + (Wang et al. 2009).

Interesantemente VPH 45 no es considerado de alto riesgo en pacientes con citología normal, sin embargo es causante de CaCu y podría desarrollar en poco tiempo una lesión de alto grado, aún falta hacer un análisis exhaustivo del genotipo de las pacientes ya que muchas de ellas no desarrollan una lesión cervical y tienen presentes genotipos de alto riesgo, consideramos se necesita un monitoreo más exhaustivo del genotipo de VPH a edades más tempranas para poder brindarles a estas pacientes un tratamiento oportuno ya que hay una mayor incidencia de

mujeres VPH+ a edades tempranas y un posterior desarrollo de lesiones de alto grado en edades posteriores de su vida.

10.3 Expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p en pacientes con NIC, CaCu VPH positivos de alto riesgo y sin NIC VPH-

La participación funcional de miR-148b-3p ha sido investigado en diferentes tipos de patologías como cáncer y actúa como un tumor supresor (Ge et al., 2015; Zhao et al., 2013). Por ejemplo, este miRNA es conocido por jugar un papel en cáncer gástrico, pulmón y próstata a través de la regulación de patrones de señalización de Wnt, MAPK y Jak-STAT (Luo et al., 2015; Huang et al., 2016). La sobreexpresión de miR-148b-3p inhibe la proliferación de células de cáncer cervical posiblemente induciendo la fase G1/S del ciclo celular de CaCu (Mou et al., 2016).

Sin embargo, poca información está disponible sobre el papel de miR-148b en infección por VPH. Nuestro estudio es el primer reporte de sobreexpresión de miR-148b-3p en pacientes VPH + y se observa un aumento conforme aumenta el grado de lesión; mayor expresión en pacientes con LIEAG respecto a pacientes con LIEBG VPH+ y sin NIC VPH-. En 2016, se observó que miR-148b-3p se encontraba subexpresada en células cervicales VPH16 positivas, sugiriendo que la sobreexpresión de este miRNA puede proteger contra CaCu (Mou et al., 2016).

miR-145-5p es conocido comúnmente como tumor supresor. Se ha demostrado que miR-145-5p tiene como blanco E1 y E2 de VPH; los cuales tienen mecanismos oncogénicos (Laimins, 2013; Shi et al., 2012). Se ha demostrado la reducción de miR-145-5p por VPH-31 a través de la oncoproteína E7, la cual suprime la actividad de NF-KB, un factor de transcripción que promueve la expresión

de miR-145-5p (Gunasekharan y Laimins,2013). Algunos miRNAs se encuentran desregulados en líneas celulares VPH16 y VPH18 positivas. En líneas celulares SiHa y Caski VPH16 + han mostrado una subexpresión de miR-145 comparado con tejido cervical normal. De igual manera en líneas celulares HeLa VPH18 +, miR-145 está subexpresado en esta línea celular comparado con tejido cervical normal (Gómez-Gómez et al., 2013). Los niveles elevados de miRNAs oncogénicos y la baja expresión de miRNAs supresores de tumor en CaCu está frecuentemente asociada a la infección por VPH de alto riesgo, por lo que la alteración de expresión de miRNAs también está ligada a la expresión de las oncoproteínas virales (Gómez-Gómez et al., 2013). La subregulación de miR-145 está asociado a baja supervivencia de CaCu, VPH+. Muestras VPH+ y VPH- tienen diferentes patrones de expresión (Wang et al., 2008). Lajer et al., mostraron que carcinoma de células escamosas tienen distinto perfil de miRNA comparado con VPH-; el bloque miR-145 parecen tener blancos relacionados con la patogénesis de VPH (Lajer et al., 2012).

Similarmente nuestros resultados muestran una diferencia significativa en los niveles de expresión entre pacientes VPH+ y VPH-, sin embargo, donde muchos autores han observado a este miRNA subexpresado, en nuestro estudio observamos una sobreexpresión de miR-145-5p en LIEAG y CaCu a diferencia de pacientes sin NIC VPH-. Es importante mencionar que se hizo su asociación con VPH16 y 35, sin embargo, en nuestros resultados el genotipo más común fue VPH45. Similar a nuestros resultados, Draher et al., observaron una sobreexpresión de miR-145-5p en VPH 16 y 45 en coinfección (Draher et al., 2011). De igual manera encontramos una diferencia significativa entre pacientes con infección simple y múltiple donde los más altos niveles fueron en pacientes con infección múltiple.

Probablemente la existencia de dos variantes de VPH puede afectar el mecanismo por el que la proteína E7 inhibe la expresión de miR-145, llevando a una sobreexpresión. El tumor supresor miR-145 puede ser regulado por fosfatidín 3-quinasa (PI-3K) (Akt y patrones p53), en donde la expresión específica de PI3K/Akt causa la sobrerregulación de miR-145 de manera dependiente de p53 y ya que tiene una regulación importante de p53 podría influenciar en las oncoproteínas virales E6 y E7 y un importante rol en el desarrollo de CaCu (Shi et al., 2012).

El miR-195-5p, un miembro de la familia miR-15/16 está localizado en el cromosoma 17p13.1 (Song et al., 2017). Estudios previos han demostrado una expresión reducida de miR-195-5p en líneas de carcinoma cervical y muestras de tejido de CaCu vs muestras de cérvix normal, sugiriendo una función tumor supresor (Sammarco et al., 2020; Song et al., 2017; Granados-López et al., 2017; Gómez-Gómez et al., 2013), debido a su sobreexpresión inhibe proliferación, transición G1-S, migración e invasión flanqueando vía 3'UTR al miembro 3 de la familia SMAD (Smad3), ciclina D2, transcripción del factor MYB y ciclina D1 (Timoshenko et al., 2014; Managit et al. 2017). miR-195 puede ser la clave para el desarrollo de CaCu. Niveles reducidos de miR-195-5p, podría ser secundario a la pérdida de E6 de p53/p36/p73 que normalmente regulan este miRNA (Lajer et al., 2012). En nuestro estudio no encontramos este comportamiento, sin embargo, encontramos una diferencia significativa entre la presencia de VPH45 y sobreexpresión de miR-195-5p (5.64 veces). Este es el primer reporte presentando esta asociación; otros estudios se han enfocado en la interacción de miR-195 y VPH16 y 18, por su fuerte papel en carcinogénesis (Zhong et al., 2018; Gómez-Gómez et al., 2013), sin embargo, en nuestra población VPH45 presentó una alta prevalencia reportado

previamente por Aguilar-Lemmarroy et al., y puede ser observado en lesiones precancerosas de cérvix y en patologías benignas del cuello uterino, representando un factor de riesgo significativo (Aguilar-Lemmarroy et al., 2015). Esta evidencia nos permite ver la importancia de identificar el mecanismo molecular y su posible regulación entre miR-195-5p y VPH45.

10.3.1 Factores de riesgo asociados a CaCu en pacientes VPH16, 18, 35, 45 positivos en las cuales se evaluó expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR195-5p

La edad de las pacientes con genotipo de alto riesgo (VPH16,18,35,45) fue mayor en las pacientes con LIEAG, en comparación con las pacientes con LIEBG. En el estudio de Camacho-Ureta et al., en pacientes VPH16 positivas la edad más prevalente fue de 25-34 años (Camacho-Ureta et al., 2018), La mayoría de CaCu ocurre 15-20 años después de la primera infección inicial de VPH según lo reportado por Bruni et al., (Bruni et al., 2010). Este periodo de latencia puede explicar por qué el CaCu es más común en la edad media de la mujer, lo cual fue descrito previamente (San José et al., 2010; Tjalma et al., 2013).

XI. CONCLUSIONES

11.1. Conclusión general

La expresión del miR-148b-3 y miR-145-5p, miR-195-5p en tejido cervical de pacientes con NIC VPH + de alto riesgo fue mayor respecto a pacientes sin NIC VPH-.

11.2. Conclusiones específicas

1. El nivel de expresión de miR-145-5p, miR-148b-3p, miR-195-5p fue mayor en pacientes con LIEAG respecto a LIEBG y sin NIC VPH-.
2. La expresión de las pacientes con genotipo de alto riesgo VPH 16,18,35,45 fue menor comparado con pacientes de LIEBG con genotipo VPH16 y el nivel de expresión de miR-195-5p es mayor en pacientes VPH45 positivos comparado con VPH45 negativos.
3. El miR-195-5p presenta una expresión diferencial entre los grados de NIC permitiendo diferenciarlos.
4. La edad promedio de las pacientes VPH16, 18, 35, 45 positivos de alto riesgo en las cuales se evaluó expresión de miR-148b-3p, miR-145-5p, miR195-5p fue de 39 años.
5. La presencia de LIEAG es mayor en pacientes VPH positivas de alto riesgo a una edad mayor.

XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

1. Determinar el nivel de expresión de miR148b-3p, miR-145-5p, miR-195-5p en suero de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical VPH positivos de alto riesgo.
2. Incrementar el numero de muestras con cancer cervicouterino en conjunto con el departamento de ginecooncologia.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ding J, Feng Y, Wang H. (2007). From cell signaling to cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 28 (9), 1494-1498.
2. Oliveira, P.A, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto. H, De la Cruz LF, Lopes C. (2007). *Chemical carcinogénesis. An Acad Bras Cien*, 79 (4), 593-616.
3. Santos, J.M.O.; Gil da Costa, R.M.; Medeiros, R. (2018). Dysregulation of cellular microRNAs by human oncogenic viruses-Implications for tumorigenesis. *Biochim. Biophys.* 1861, 95–105.
4. Pisarska, J., & Baldy-Chudzik, K. (2020). MicroRNA-Based Fingerprinting of Cervical Lesions and Cancer. *Journal of clinical medicine*, 9(11), 3668.
5. Rocchi, A., Chiti, E., Maiese, A., Turillazzi, E., & Spinetti, I. (2020). MicroRNAs: An Update of Applications in Forensic Science. *Diagnostics*. 11(1), 32.
6. Satapathy S, Batra J, Jeet V, Thompson EW, Punyadeera C. (2017). MicroRNAs in HPV associated cancers: small players with big consequences. *Expert Rev Mol Diagn.* 17(7):711-722.
7. Zhong, J., Yuan, H., Xu, X., & Kong, S. (2018). MicroRNA-195 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting defective in cullin neddylation 1 domain containing 1 in cervical cancer. *International journal of molecular medicine*, 42(2), 779–788.
8. Gunasekharan, V., & Laimins, L. A. (2013). Human papillomaviruses modulate microRNA 145 expression to directly control genome amplification. *Journal of virology*, 87(10), 6037–6043.

9. Woodman C, Collins, SI, Young LS. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 7:11-20.
10. Bosch F, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55:244-65.
11. Moody C, Laimins LA. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 10:550-60.
12. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7:453-9.
13. Doorbar, J.; Quint, W.; Banks, L.; Bravo, I.G.; Stoler, M.; Broker, T.R.; Stanley, M.A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30: F55–F70.
14. Harden, M.E.; Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutat. Res*, 772, 3–12.
15. Rector, A.; Van Ranst, M. (2013). Animal papillomaviruses. *Virology*, 445, 213–223.
16. Tommasino, M. (2014). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol*, 26, 13–21.
17. Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MA (2010). MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One*, 5: e11780.
18. Zur Hausen H: (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*,2:342–350.

19. PaVE: Papillomavirus Episteme. Available online: <https://pave.niaid.nih.gov> (accessed on 14 September 2019).
20. Van Doorslaer, K.; Li, Z.; Xirasagar, S.; Maes, P.; Kaminsky, D.; Liou, D. et al. (2017). The Papillomavirus Episteme: A major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Res*, 45: D499–D506.
21. Egawa, N.; Doorbar, J. (2017). The low-risk papillomaviruses. *Virus Res*, 231: 119–127.
22. Mittal, S.; Banks, L. (2017). Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res*, 772, 23–35.
23. McBride, A.A. (2017). Playing with fire: Consequences of human papillomavirus DNA replication adjacent to genetically unstable regions of host chromatin. *Curr Opin Virol*, 26: 63–68.
24. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. (2009). Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*, 12:281–290.
25. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*, 128:927–935.
26. Lambert PF, Collins A. (2008). Papillomaviruses: Molecular Biology of Human Viruses. Elsevier, Madison, WI, USA.
27. Vande Pol, S.B. (2013). Klingelhutz, A.J. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445:115–137.

28. Roman, A. Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445:138–168.
29. DiMaio, D, Petti, L.M. (2013). The E5 proteins. *Virology*, 445:99–114
30. Bergvall, M.; Melendy, T.; Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, 445:35–56.
31. McBride, A. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445:57–79.
32. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. (2015). Human Papillomaviruses Epithelial Tropisms, and the development of Neoplasia. *Viruses*,7:3863-3890; doi:10.3390/v7072802.
33. Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 2007;212:356–367.
34. Zhang R, Shen C, Zhao L, et al. Dysregulation of host cellular genes targeted by human papillomavirus (HPV) integration contributes to HPV-related cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 2016;138:1163–1174 .
35. Liu M, Han Z, Zhi Y, et al. Long-read sequencing reveals onco-genic mechanism of HPV-human fusion transcripts in cervical cancer. *Transl Res* 2022 S1931–S5244(22)00206-7. doi: 10.1016/j.trsl. 2022.09.004
36. White EA, Kramer RE, Tan MJ, et al. Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity. *J Virol* 2012;86:13174–13186 .
37. Dacus D, Wallace NA. Beta-Genus Human Papillomavirus 8 E6 Destabilizes the Host Genome by Promoting p300 Degradation. *Viruses* 2021;13:1662. doi: 10.3390/v13081662

38. White EA, Sowa ME, Tan MJ, et al. Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:E260–E267 .
39. Fang J, Zhang H, Jin S. Epigenetics and cervical cancer: from patho-genesis to therapy. *Tumour Biol* 2014;35:5083–5093 .
40. Leonard SM, Wei W, Collins SI, et al. Oncogenic human papillo-mavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis* 2012;33:1286–1293.
41. Sargent, A, Bailey A, Almonte M, et al. (2008). Prevalence of type-specific HPV infection by age and grade of cervical cytology: data from the ARTISTIC trial. *Br J Cancer*, 98 :1704–1709.
42. Liao S, Deng D, Hu X, et al. (2013). HPV16/18 E5, a promising candidate for cervical cancer vaccines, affects SCPs, cell proliferation and cell cycle, and forms a potential network with E6 and E7. *Int J Mol Med*, 31:120–128.
43. McLaughlin-Drubin ME, Munger K (2009). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res*, 143:195–208.
44. Yamato K, Yamada T, Kizaki M, Ui-Tei K, Natori Y, et al. (2008). New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Ther*, 15:140–153.
45. Honegger A, Schilling D, Bastian S, et al. (2015). Dependence of intracellular and exosomal microRNAs on viral E6/E7 oncogene expression in HPV-positive tumor cells. *PLOS Pathogens*, doi: 10.1371/j.ppat.1004712.

46. Lewin B. 2014. Genes . Oxford Univ Pr. Toronto, Canadá ISBN: 9780763740634.
47. Pett M, Coleman N (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogénesis. *J Pathol*, 212:356–367.
48. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, et al. (2008). Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Research*, 68:307–313.
49. Jin W, Dodson MV, Moore SS, Basarab JA, Guan H (2010). Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Mol Biol*, 11:29.
50. Maglennon GA, Doorbar J. (2012) The biology of papillomavirus latency. *Open Virol J*, 6: 190-197.
51. Stanley M, Pett MR, Coleman N. (2010). HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*, 35:1456-60.
52. Woodman CB, Collins SI, Young LS. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 7:11-22.
53. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, et al. (2010). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*, 40: 1-13
54. Alcocer-González JM, Berumen J, Taméz-Guerra R, et al. (2006). In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirustransformed cervical cancer cells. *Viral Immunol*, 19:481-491.

55. Rincon-Orozco B, Halec G, Rosenberger S, et al. (2009). Epigenetic silencing of interferonkappa in human papillomavirus type 16-positive cells. *Cancer Res*, 69: 8718-8725.
56. Garcia-Chacon R, Velasco-Ramírez SF, Flores-Romo L, Daneri-Navarro A. (2009). Immunobiology of HPV Infection. *Arch Med Res*, 40: 443-448.
57. Adurthi S, Mukherjee G, Krishnamurthy H, et al. (2012). Functional tumor infiltrating TH1 and TH2 effectors in large early-stage cervical cancer are suppressed by regulatory T cells. *Int J Gynecol Cancer*, 22: 1130-1137.
58. Bhat P, Mattarollo SR, Gosmann C, Frazer IH, Leggatt GR. (2011). Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. *Immunol Rev*, 239: 85-98.
59. A. Kozomara, M. Birgaoanu, S. Griffiths-Jones, miRBase: from microRNA sequences to function, *Nucleic Acids Res*. 47 (2019) D155–D162, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
60. P.M. Pereira, J.P. Marques, A.R. Soares, L. Carreto, M.A.S. Santos, MicroRNA expression variability in human cervical tissues, *PLoS One* 5 (2010) e11780, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011780>.
61. Jaisamrarn U, Castellsague X, Garland SM, et al. Natural history of progression of HPV infection to cervical lesion or clearance: analysis of the control arm of the large, randomised PATRICIA study. *PLoS One* 2013;8:e79260 .
62. Smith JS, Melendy A, Rana RK, et al. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *J Adolesc Health* 2008;43(4 Suppl) S5-25, S e1–e41 .

63. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 2010;202:1789–1799 .
64. Yan X, Shen L, Xiao Y, et al. Prevalence, characteristics, and distribution of HPV genotypes in women from Zhejiang Province, 2016–2020. *Viol J* 2021;18:208
65. Syrjanen K, Kulmala SM, Shabalova I, et al. Epidemiological, clinical and viral determinants of the increased prevalence of high-risk human papillomavirus (HPV) infections in elderly women. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008;29:114–122 .
66. Usyk M, Zolnik CP, Castle PE, et al. Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study. *PLoS Pathog* 2020;16:e1008376 .
67. Moscicki A-B, Schiffman M, Franceschi S. The Natural History of Human Papillomavirus Infection in Relation to Cervical Cancer. *Human Papillomavirus* 2020:149–160 .
68. Sudenga SL, Shrestha S. Key considerations and current perspectives of epidemiological studies on human papillomavirus persistence, the intermediate phenotype to cervical cancer. *Int J Infect Dis* 2013;17:e216–e220 .
69. Vink MA, Bogaards JA, van Kemenade FJ, et al. Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. *Am J Epidemiol* 2013;178:1161–1169 .
70. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or

- 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1072–1079 .
71. Vargas-Robles D, Magris M, Morales N, et al. High Rate of In-fec-tion by Only Oncogenic Human Papillomavirus in Amerindians. *mSphere* 2018;3 e00176–18. doi: 10.1128/mSphere.00176-18.
72. Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Cortes-Gutierrez EI, et al. Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: type-specific prevalence and HPV coinfections. *J Med Virol* 2015;87:871–884 .
73. De Brot L, Pellegrini B, Moretti ST, Carraro DM, Soares FA, Rocha RM, et al. Infections with multiple high-risk HPV types are associated with high-grade and persistent low-grade intraepithelial lesions of the cervix. *Cancer Cytopathol* 2017;125:138–143 .
74. Kim M, Park NJ, Jeong JY, et al. Multiple Human Papilloma Virus (HPV) Infections are associated with HSIL and Persistent HPV Infection Status in Korean Patients. *Viruses* 2021;13:1342. doi: 10. 3390/v130.
75. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1):17-27
76. Lizano et al. (2009). Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, Historia natural y carcinogénesis cancerología. 4:205-216.
77. Ebert MS, Sharp PA (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149: 515–524.

78. Ruvkun G, Giusto J. (1989). The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature*, 338:313–319.
79. Ambros V (2003) microRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, Stress, and timing. *Cell*, 113:673-676.
80. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA (2007). Target miRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl acad sci*, 104:9667-9672.
81. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006). RNA polymerase iii transcribes Human micrornas. *Nat struct mol biol*. 13:1097-1101.
82. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR: (2004). Human micrornas are processed from Capped, polyadenylated transcripts that can also function as miRNAs. *RNA*, 10:1957-1966.
83. Duan R, Pak C, Jin P (2007). Single nucleotide polymorphism associated with mature mir- 125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum mol genet*, 16:1124-1131.
84. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D (2004) Exportin 5 is a rangtp-dependent dsrna-binding protein that mediates nuclear export of pre- miRNAs. *RNA*, 10:185-191.
85. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KY, Hannon G (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat genet*, 35:215- 217.

86. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar Plieberman J (2003). RNA interference targeting fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat med*, 9:347-351.
87. Macrae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, DouDNA JA. (2008). In vitro Reconstitution of the human risc- loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
88. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 9:775–89.
89. Ebert MS, Sharp PA. (2010). MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA*, 16:2043–50.
90. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. (2011). MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers, *Nat. Rev Clin.Oncol*, 8:467–477.
91. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova EL, et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:10513–10518.
92. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101 2087-2092.
93. G.K. Wang, J.Q. Zhu, J.T. Zhang, Q. Li, Y. Li, J. He, et al. (2010). Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J*, 31:659–666.

94. Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O. (2011). Emerging molecular biomarkers- blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol*, 8:142–150.
95. Collino F, Deregibus M, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, et al. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs *PloS One*, 5 e11803.
96. Arroyo J, Chevillet J.R, Kroh E.M, Ruf I, Pritchard C, Gibson D, et al. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:5003–5008.
97. D. Vasilatou, S. Papageorgiou, V. Pappa, E. Papageorgiou, J. Dervenoulas. (2010). The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur. J. Haematol*, 84:1–16.
98. R.J. Bryant, T. Pawlowski, J.W.F. Catto, G. Marsden, R.L. Vessella, B. Rhee, et al. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer, *Br. J. Cancer*, 106:768–774
99. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56(11):1733–41.
100. Ismail N, Wang Y, Dakhlallah D, et al. (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*, 121(6):984–95.
101. Chen X, Hu Z, Wang W, et al. (2012). Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive

- biomarkers for nonsmall cell lung cancer diagnosis. *Int J Cancer*, 130(7):1620–8.
102. Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, et al. (2010). MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res*, 16(2):430–41.
103. Cho JH, Gelinas R, Wang K, et al. (2011). Systems biology of interstitial lung diseases: integration of mRNA and microRNA expression changes. *BMC Med Genomics*, 4:8–8794. 4-8.
104. Ezzie ME, Crawford M, Cho JH, et al. (2012). Gene expression networks in COPD: microRNA and mRNA regulation. *Thorax*, 67(2):122–31.
105. Mo MH, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW. (2012). Cell-free circulating miRNA biomarkers in cancer. *J Cancer*, 3:432–48.
106. Nana-Sinkam SP, Karsies T, Riscili B, Ezzie M, Piper M. (2009). Lung microRNA: from development to disease. *Expert Rev Respir Med*, 3(4):373–85.
107. Pegtel D, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson D, et al. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A*, 107:6328–6333.
108. Kosaka N, and Ochiya T. (2012). Unraveling the mystery of cancer by secretory microRNA: Horizontal microRNA transfer between living cells. *Frontiers.org*, 2: 1-6.
109. Wang Q, Qin J, Chen A, Zhou J et al. (2015). Downregulation of microRNA-145 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer. *Tumor Biol*, 36:3703–3708.

110. Lawrie C, Gal S, Dunlop H, et al. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br.J.Haematol.* 141, 672–675.
111. Lim P, Bliss S, Patel S, et al. (2011). Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res*, 71:1550–1560.
112. Concepcion CP, Bonetti C, Ventura A. (2012). The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J*, 18(3):262–7.
113. Dakhlallah D, Batte K, Wang Y, et al. (2013). Epigenetic regulation of miR-17~92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 187(4): 397–405.
114. Salazar C, Nagadia R, Pandit P, et al. (2014). A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell Oncol.* 37(5):331-338.
115. Sun CX, Bennett N, Tran P, et al. (2017). A pilot study into the association between oral health status and human papillomavirus-16 infection. *Diagn*, 7(1):11.
116. Chai RC, Lim Y, Frazer IH, et al. (2016). A pilot study to compare the detection of HPV-16 biomarkers in salivary oral rinses with tumour p16 INK4a expression in head and neck squamous cell carcinoma patients. *BMC Cancer*, 16(1):178.
117. Gocze K, Gombos K, Juhasz K, et al. (2013). Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer Res*, 33(6):2561-2567.
118. Lee Y, Andaloussi SE, Wood MJ. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*, 21(R1): R125-R134.

119. Overmeer RM, Louwers JA, Meljer CJ, et al. (2011). Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-) malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women. *Int J Cancer*, 129(9):2218-2225.
120. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Gariglio P. (2013). Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: Human papillomavirus implications. *BioMed Research International*, 15 pages, doi:10.1155/2013/407052.
121. Wang X, Tang S, Le S.Y, Rader J.S., Meyers C., Zheng Z.M. (2008). Aberrant expression of oncogenic and tumor suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLos One*, 3:e2557.
122. Zheng Z, Wang X. (2011). Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta*. 1809(11-12): 668–677.
123. Au Yeung, C.L.; Tsang, T.Y.; Yau, P.L.; Kwok, T.T. (2011). Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene*. 30:2401–2410.
124. Martinez I, Gardiner A, Board F, Monzon F, Edwards P, and Khan A. (2008). Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, vol. 27-18:2575–2582.
125. Wang X, Wang H, McCoy J, et al. (2009). Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *RNA*. vol. 15-4: 637–647.
126. G. A. Calin, C. Sevignani, C. D. Dumitru et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. vol. 101-9:2999–3004.

127. Myklebust M.P., Bruland O., Skarstein L, Dahl O. (2011). MicroRNA-15b is induced with E2F-controlled genes in HPV-related cancer. *British Journal of cancer*, 105:1719-1725.
128. Zhang S, Liu F, Mao X, Yang J, Yin X, Zheng L, Wang Q. (2015). Elevation of miR-27b by HPV16 E7 inhibits PPAR γ expression and promotes proliferation and invasion in cervical carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 47:1759-1766.
129. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A (2007). Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res*, 67:6031–6043.
130. Greco, D.; Kivi, N.; Qian, K.; Leivonen, S.K.; Auvinen, P.; Auvinen, E. (2011). Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One*. 6, e21646.
131. Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, et al. (2008). Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res*, 14: 2535–2542.
132. Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr, et al. (2010). A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res*, 70:1441–1448.
133. McBee WC, Gardiner AS, Edwards RP, Lesnock JL, R. Bhargava RM, Austin, R.S. Guido SA. (2011). MicroRNA Analysis in Human Papillomavirus (HPV)-Associated Cervical Neoplasia and Cancer, *J. Carcinog Mutagen*, 5 (1) 114.
134. Rao Q, Shen Q, Zhou H, Peng Y, Li J, et al. (2012). Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas. *Med Oncol*, 29:1242–1248.

135. Kozomara A, Griffiths-Jones S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 42: D68–73.
136. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. (2010). Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*, 126:1166–76.
137. Pecqueux M, Liebetrau I, Werft W, Dienemann H, Muley T, Pfannschmidt J, et al. (2016). A comprehensive microRNA expression profile of liver and lung metastases of colorectal cancer with their corresponding host tissue and its prognostic impact on survival. *Int J Mol Sci*, 17:1–16.
138. Azizmohammadi S, Safari A, Azizmohammadi S, Kaghazian M, Sadrkhanlo M, Yahaghi E, et al. (2017). Molecular identification of miR-145 and miR-9 expression level as prognostic biomarkers for early-stage cervical cancer detection. *QJM*, 110:11–5.
139. Xing AY, Wang B, Shi DB, Zhang XF, Gao C, He XQ, et al. (2013). Deregulated expression of miR-145 in manifold human cancer cells. *Exp Mol Pathol*, 95:91–7.
140. Zhang J, Wang L, Li B, Huo M, Mu M, Liu J, et al. (2014). miR-145 downregulates the expression of cyclin-dependent kinase 6 in human cervical carcinoma cells. *Exp Ther Med*, 8:591–4.
141. Spizzo R, Nicoloso MS, Lupini L, Lu Y, Fogarty J, Rossi S, et al. (2010). miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*, 17:246–54.

142. Kodama J, Seki N, Tokumo K, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M, et al. (1999). Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer*, 35:485–9.
143. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. (2007). MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*, 100:1579–88.
144. Lajer CB, Garnaes E, Friis-Hansen L, Norrild B, Therkildsen MH, et al. (2012). The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Br J Cancer*, 106: 1526–1534.
145. M. Sachdeva, S. Zhu, F. Wu, H. Wu, V. Walia, S. Kumar, R. Elble, K. Watabe, Y. Mo, et al. (2009). p53 represses c-myc through induction of the tumor suppressor miR. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 3207–3212.
146. X. Meng, N. Carlson, J. Dong, Y. Zhang. (2015). Oncogenic c-Myc-induced lymphomagenesis is inhibited non-redundantly by the p19Arf–Mdm2–p53 and RP–Mdm2–p53 pathways. *Oncogene*, 34 (46) 5709–5717.
147. B.N. Davis, A. Hata, (2009). Regulation of MicroRNA biogenesis: a miRiad of mechanisms, *Cell Commun. Signal*, 7 (1) 18.
148. B.N. Davis-Dusenbery, A. Hata, (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis, *J. Biochem*. 148 (4) 381–392.
149. R. Vijayakumaran, K.H. Tan, P.J. Miranda, S. Haupt, Y. Haupt, (2015). Regulation of mutant p53 protein expression. *Front. Oncol*. 5

150. O.A. Kent, R.R. Chivukula, M. Mullendore, E.A. Wentzel, G. Feldmann, K.H. Lee, S. Liu, S.D. Leach, A. Maitra, J.T. Mendell. (2010). Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. *Genes Dev*, 24 (24) 2754–2759.
151. L. Karimi, B. Mansoori, A. Mohammadi, M. Aghapour, B. Baradaran, (2017). Function of microRNA-143 in different signal pathways in cancer: New insights into cancer therapy, *Biomed. Pharmacother.* 91 121–131.
152. Mou Z, Xu X, Dong M, Xu J. (2016). MicroRNA-148b acts as a tumor suppressor in cervical Cancer by inducing G1/S-Phase cell cycle arrest and apoptosis in a caspase-3-dependent Manner. *Med Sci Monit*, 22: 2809-2815. DOI: 10.12659/MSM.896862.
153. Azizi M, Teimoori-Toolabi L, Arzanani MK et al. (2014). MicroRNA-148b and microRNA-152 reactivate tumor suppressor genes through suppression of DNA methyltransferase-1 gene in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*, 15: 419–27
154. Pan W, Zhu S, Yuan M et al. (2010). MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol*, 184: 6773–81
155. Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T et al. (2013). MicroRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF-kappaB activity by directly targeting DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) expression. *Hepatology*, 57: 162–70.
156. Song YX, Yue ZY, Wang ZN et al. (2011). MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Mol Cancer*, 10:1

157. Wu Y, Liu GL, Liu SH et al. (2012). MicroRNA-148b enhances the radiosensitivity of non-Hodgkin's Lymphoma cells by promoting radiation-induced apoptosis. *J Radiat Res*, 53: 516–25
158. Cimino, D., De Pitta, C., Orso, F., Zampini, M., Casara, S., Penna, E. Quaglino, E. et al. (2013). miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1. *FASEB J*, 27: 1223–1235.
159. Zhao, G., Zhang, J.-G., Liu, Y., Qin, Q., Wang, B., Tian, K., Liu, L. et al. (2013). miR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting AMPK α 1. *Mol. Cancer Therapeut.* 12: 83.
160. Li M, Ren C, Zhang JE et al. (2018). The Effects of miR-195-5p/MMP14 on proliferation and Invasion of Cervical Carcinoma Cells Through TNF Signaling Pathway Based on Bioinformatics Analysis of Microarray Profiling. *Cell Physiol Biochem*, 50:1398-1413.
161. Du X, Lin LI, Zhang L, Jiang J. (2015). microRNA-195 inhibits the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells via the inhibition of CCND2 and MYB expression. *Oncol Lett*, 10:2639-2643.
162. Zhou Q, Han LR, Zhou YX, Li Y. (2016). MiR-195 Suppresses Cervical Cancer Migration and Invasion Through targeting Smad3. *Int J Gynecol Cancer*, 26:817-824.
163. Fei X, Qi M, Wu B, Song Y, Wang Y and Li T. (2012). MicroRNA-195-5p suppresses glucose uptake and proliferation of human bladder cancer T24 cells by regulating GLUT3 expression. *FEBS Lett*, 586: 392-397.

164. Wang J, Li L, Jiang M and Li Y. (2017). MicroRNA-195 inhibits human gastric cancer by directly targeting basic fibroblast growth factor *Clin Transl Oncol*, 19: 1320-1328.
165. Kaneko K, Williams RO, Grandfield DT, Nixon AE, Sandison A, Itoh Y: Selective Inhibition of Membrane Type 1. (2016). Matrix Metalloproteinase Abrogates Progression of Experimental Inflammatory Arthritis: Synergy with Tumor Necrosis Factor Blockade. *Arthritis Rheumatol*, 68:521-531.
166. Managit C, Sakurai H, Saiki I. (2017). Ethanolic extract of *Thevetia peruviana* flowers enhances TNF-alpha and TRAIL-induced apoptosis of human cervical cancer cells via intrinsic and extrinsic pathways. *Oncol Lett*, 13:2791-2798.
167. Timoshenko OS, Gureeva TA, Kugaevskaia EV, Soloveva NI. (2014). Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and the regulators of its activity as invasive factors in squamous cell cervical carcinomas. *Biomed Khim*, 60:683.
168. Castellsague X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 110: S4-S7.
169. Louie KS, Castellsague X, de Sanjose S, et al. (2011). Smoking and passive smoking in cervical cancer risk: pooled analysis of couples from the IARC multicentric case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20:1379-90.
170. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, et al. (2002). Oral contraceptives and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 359:1085-92.

171. Peralta-Rodríguez R, Romero-Morelos P, Villegas-Ruiz V, Mendoza-Rodríguez M, Taniguchi-Ponciano K, González-Yebra B, et al. (2012). Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: Meta-analysis. *Infect Agent Cancer*, 7:34–42.8
172. Salcedo M, Pina-Sánchez P, Vallejo-Ruiz V, Monroy-García A, Aguilar-Lemarroy A, Cortes-Gutiérrez E, et al. (2014). Human papillomavirus genotypes among females in Mexico: A study from the Mexican institute for social security. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15:10061–6.10.
173. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M, et al. (2013). Evolution and taxonomic classification of alpha papillomavirus 7 complete genomes: HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68 and HPV70. *PLoS One*, 8:e72565–80.
174. Chen AA, Heideman DA, Boon D, Gheit T, Snijders PJ, Tommasino M, et al. (2014). Human papillomavirus 45 genetic variation and cervical cancer risk worldwide. *J Virol*, 88:4514–21.
175. López-Revilla R, Martínez-Contreras LA, Sánchez-Garza M. (2008). Prevalence of high- risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infect Agent Cancer*, 3:3.
176. Stanley MA, Sterling JC. (2014). Host responses to infection with human papillomavirus. *Curr Probl Dermatol*, 45:58–74.24
177. Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Cortés-Gutiérrez EI, Salgado-Bernabé ME, Ramos-González NP, Ortega-Cervantes L, et al. (2015). Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology,

precancerous lesions, and cervical cancer: Type-specific prevalence and HPV coinfections. *J Med Virol*,87:871–84.

XIV. ANEXOS

14.1 Documentos Complementarios

14.2. Productos Académicos

De la tesis de doctorado se presentó un cartel en congreso nacional:

Asistencia y presentación en modalidad cartel **“Evaluación de la expresión de miRNA del bloque miR-17-92 en muestras de tejido cervical y suero en pacientes VPH positivos** en el 3er Encuentro de Jóvenes Investigadores en Mazatlán, Sinaloa. Octubre 2015.

Asistencia y presentación en modalidad cartel **“Parámetros epidemiológicos en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical y cáncer cervicouterino”** en el 5° Encuentro de Jóvenes Investigadores en Mazatlán, Sinaloa. Septiembre 2017.

Asistencia y presentación en modalidad cartel **“Parámetros epidemiológicos en pacientes con o sin neoplasia intraepitelial cervical y cáncer cervicouterino”** en el 6° Encuentro de Jóvenes Investigadores en Mazatlán, Sinaloa. Septiembre 2018.

Así mismo, durante el periodo de doctorado, participé como asesora de servicio social de dos alumnos de licenciatura:

Del alumno Paúl Alexis López Durán de licenciatura en Biotecnología Genómica con el proyecto de Evaluación de la expresión de miRNA del bloque miR-17-92 en

muestras de suero y tejido cervical en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical en VPH positivos de alto riesgo 2º parte Enero-Julio 2018.

De la alumna Kassandra Aguilar Cázares de licenciatura en Biotecnología Genómica con el proyecto de Evaluación de la expresión de miRNA del bloque miR-17-92 en muestras de suero y tejido cervical en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical en VPH positivos de alto riesgo 2º parte Enero-Julio 2018.

XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

OMS: Organización mundial de la salud

PVs: Papillomavirus

LCR: Región de control largo

ORF: Marco de lectura abierto

NIC: Neoplasia intraepithelial cervical

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

pRB: Proteína de retinoblastoma

HR-HPV: Papillomavirus de alto riesgo

NK: Natural Killer

IFN: Interferón

Th1: Linfocitos T cooperador 1

Th2: Linfocitos T cooperador 2

TGF: Factor de crecimiento tumoral

IL-10: Interleucina 10

DNA: Ácido desoxirribonucleico

miRNA: microRNA

RNAm: RNA mensajero

PMR-1: Ribonucleasas 1

Ago2: Agoutina 2

RISC: Complejo silenciador inducido RNA

AMOS: Oligonucleótidos anti-miRNA

miR: microRNA

E2F: Factor de elongación 2

PI3K: fosfatidilinositol- 3-kinasa

MDM2: Proteína MDM2

FRAs: Regiones frágiles cromosómica

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

DNMT Citosina metiltransferasa 1

AMP: Adenosin monofosfato

MYB: Factor de transcripción de mieloblastosis

SMAD: Proteína Smad

CCND2: Ciclina 2

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Pb: Pares de bases

Ct: Ciclo de temperatura

Rx.: Reacción

Seg: Segundo

CaCu: Cáncer cervicouterino

LIEBG: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado

LIEAG: Lesión intraepitelial escamosa de alto grado