



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
FACULTAD DE MEDICINA

---

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

**TESIS**

*DETERMINACIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y EXPRESIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T (CD4+ Y CD8+) EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO; ESTADIOS AVANZADOS.*

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

Presenta:

Vianey Morales Olivera

Directores de Tesis:

DC. María Alicia Díaz y Orea

DC. María Lilia Cedillo Ramírez

Puebla, Pue.

Noviembre, 2019

DIRECTORES DE TESIS



DC. María Alejandra Díaz y Orea



DC. María Lilia Cedillo Ramírez

COORDINACIÓN DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN



NOMBRE Y FIRMA DEL COMITÉ TUTORIAL



---

DC. Verónica Vallejo Ruiz



---

DC. Irma del Carmen Zamora Ginez



---

DC. Mario García Carrasco

## **AGRADECIMIENTOS GENERALES**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología(CONACyT) por el apoyo. A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por la oportunidad.

A la Dra. Alicia Díaz y Orea y a la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez por todo, que es demasiado como para escribirlo aquí.

A Dra. Irma del Carmen Zamora Ginez, Dra. Verónica Vallejo Ruíz y el Dr. Mario García Carrasco, por su lectura atenta y sus observaciones.

A la Mtra. Elda Carreón Moreno, por las ideas, las referencias y, en general, por su generosa erudición.

A la Dra. Nora Fernández Tamayo y al Dr. Juan Carlos Flores Alonso por su valioso apoyo en el trabajo experimental.

A Ángeles González Ronquillo, Leticia Guerrero, German García Moreno, Iván Alvarado, Alejandra, Ana Rojas Bonilla por los aprendizajes y amistad.

A Dulce, Diana, Gil, Valeria, Maritsa por sus enseñanzas y por la conversación.

Gracias, muchas gracias.

## DEDICATORIA

A mis maestros, que han sido pocos en la vida. Especialmente a la Dra. Alicia Díaz y Orea y la  
Dra. María Lilia Cedillo Ramírez

A mi familia, por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles.

## RESUMEN

### Antecedentes

El cáncer gástrico, es una enfermedad maligna, que por su elevada morbimortalidad ha causado estragos a nivel mundial. Se han identificado varios factores de riesgos, que actúan sobre la respuesta inmunológica del hospedero, afectando la expresión y función de las poblaciones de linfocitos T, célula central del sistema inmunológico, entre los factores de riesgo más importantes, tenemos alteraciones genéticas inducidas, por las infecciones virales, como el virus Epstein-Barr (VEB). Por otra parte, existe evidencia que ha demostrado las propiedades oncogénicas del virus del papiloma humano (VPH) en estudios de cáncer de cérvix, anal, oral y cáncer faríngeo, lo que sugiere un papel de este virus en la patogénesis del cáncer de otras secciones del tracto digestivo, como en el estómago (cáncer gástrico). Se han realizado estudios de este virus y cáncer gástrico, pero los estudios son controversiales. Por tal motivo el objetivo de este estudio fue:

**Objetivo general:** Determinar los genotipos del virus del papiloma humano y expresión de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4+ y CD8+) en biopsias de pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados.

**Material y métodos:** se estudiaron 34 biopsias incluidas en parafina de pacientes con cáncer gástrico, verificado por histología, del Departamento de Cirugía del Hospital Universitario (que se encuentran en el banco de muestras en el Laboratorio de Inmunología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla) en el periodo 2017-2018. Se realizó la extracción del ADN en las muestras por medio de un kit comercial y se analizó su integridad del ADN con la técnica Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizando los oligos PC04 y GH20 del gen  $\beta$ -globina. Se identificó el ADN del VPH para el gen L1 por dos sistemas de reacción usando dos pares de cebadores: MY09/MY11 y GP+5/GP+6. Se determinó la expresión Linfocitos CD4+ y CD8+ en las secciones desparafinadas de las biopsias de estudio, por la técnica Inmunofluorescencia directa e indirecta, utilizando como anticuerpo único, anti-CD4 acoplado a fluoresceína (IFD) o anti-CD8 como primer anticuerpo (IFI); y como anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a fluoresceína.

## Resultados

Se analizaron 34 muestras, la edad promedio de los pacientes fue de 58.24 (con un límite de 24-75). El estadio clínico que se encontró con mayor frecuencia fue el IV en un 65% y 35% en estadio III. El tipo histológico de acuerdo con la clasificación de Lauren que presentan las muestras son tipo difuso 56% (19 pacientes) e intestinal 44% (15 pacientes).

Del total de los pacientes estudiados, 24 muestras fueron positivas para el gen constitutivo  $\beta$ -globina (amplicon: 248 pb) lo que indica que el ADN estaba disponible para el análisis molecular. De las 24 muestras se obtuvieron resultados negativos al amplificar el fragmento de la región L1 con los amplicones MY09/MY11 y el 2.9% fue positiva para el amplicón GP+5/GP+6.

Con respecto a la expresión de linfocitos citotóxicos y cooperadores en las muestras de CG en estadios avanzados fue de 23.52% y 14.7%, respectivamente. No hay diferencia significativa entre los linfocitos, el estadio clínico y la clasificación histológica.

## Conclusiones

Por los resultados obtenidos, podemos concluir, que, en la población estudiada, el cáncer gástrico en estadios avanzados no está relacionado la infección por VPH y la expresión y función de los linfocitos T, tanto CD4, como CD8, se encuentra muy deteriorada con expresiones de las subpoblaciones de linfocitos T muy bajas e inactivas, facilitando el crecimiento tumoral.

**Palabras clave:** cáncer gástrico, Virus del papiloma humano, Linfocitos T CD8+, Linfocitos T CD4+.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	VI
CAPÍTULO 1 .....	1
I. ANTECEDENTES GENERALES .....	1
1. CÁNCER.....	1
1.1  Cáncer gástrico.....	2
1.1.1  Epidemiología .....	2
1.1.2  Clasificación .....	4
1.1.3  Factores de riesgo .....	6
1.1.4  Diagnóstico.....	8
1.1.5  Tratamiento .....	8
2.  VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO .....	9
2.1  Estructura .....	9
2.2  Clasificación .....	11
2.3  Ciclo de replicación .....	13
2.4  Detección .....	14
2.5  Tratamiento.....	15
3.  MECANISMOS DE DEFENSA ANTITUMORALES.....	16
4.  LINFOCITOS T .....	17
4.1  Clasificación de los Linfocitos T .....	17
4.2  Activación de los Linfocitos T .....	18
4.3  Evasión de la respuesta inmune del VPH.....	19
II. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	22
5.  CÁNCER GÁSTRICO Y VPH.....	22
6.  LINFOCITOS T Y CÁNCER GÁSTRICO .....	25
7.  LINFOCITOS Y VPH .....	26
CAPÍTULO 2 .....	27
III. MARCO METODOLÓGICO .....	27
8.  PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
9.  HIPÓTESIS:.....	28
10.  OBJETIVOS .....	28

11.1	Objetivo general .....	28
11.2	Objetivos específicos.....	28
11.	METODOLOGÍA.....	29
12.1	DISEÑO Y TIPO DE MUESTREO.....	29
	Tamaño de la muestra.....	29
	Tipo de muestreo .....	29
12.2	DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN .....	30
	Criterios de inclusión .....	30
	Criterios de exclusión .....	30
	Bloques de parafina dañados.....	30
	Criterios de eliminación .....	30
12.3	VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN .....	30
12.4	ESTRATEGIA DE TRABAJO .....	31
12.5	MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	32
12.6	ANÁLISIS DE DATOS .....	33
CAPÍTULO 3	.....	34
IV.	ANÁLISIS DE DATOS .....	34
12.	RESULTADOS .....	34
13.	DISCUSIÓN .....	44
14.	CONCLUSIÓN.....	50
CAPÍTULO 4	.....	51
15.	PERSPECTIVA.....	51
16.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
	Anexo 1. Clasificación o escalas de la Enfermedad.....	59
	Anexo 2. Variables y escalas de medición.....	61
	Anexo 3. Definiciones conceptuales .....	62
	Anexo 4. Definiciones operacionales .....	63
	Anexo 5. Bioética .....	64
	Anexo 6. Determinación de linfocitos T .....	65
	Anexo 7. Determinación de VPH.....	67
	Anexo 8. Hoja de control de las muestras incluidas en parafina.....	72

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b> Características del virus del papiloma humano	9
<b>Cuadro 2</b> Proteínas del virus del papiloma humano y características asociadas	10
<b>Cuadro 3</b> Principales técnicas de detección del virus papiloma humano	15
<b>Cuadro 4</b> Resumen de los principales estudios sobre el CG y VPH	24
<b>Cuadro 5</b> Porcentaje de Linfocitos positivos	42
<b>Cuadro 6</b> Porcentaje de Linfocitos positivos estudiados, en las biopsias de pacientes con cáncer gástrico por clasificación histológica	43
<b>Cuadro 7</b> Porcentaje de Linfocitos positivos estudiados, en las biopsias de pacientes con cáncer gástrico por estadio clínico	43

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Características del cáncer	1
<b>Figura 2</b> Capas de la pared del estómago	2
<b>Figura 3</b> Estimado de incidencia y prevalencia de los casos de cáncer alrededor del mundo, ambos sexos, todas las edades (epidemiología del cáncer a nivel mundial por sexo y edad)	3
<b>Figura 4</b> Tasa de incidencia estandarizada por edad estimada para el cáncer de estómago 2018, ambos sexos, todas las edades (tasa de incidencia estandarizada 2018, para cáncer de estómago por edad y sexo)	4
<b>Figura 5</b> Clasificación histológica del cáncer gástrico	5
<b>Figura 6</b> Estructura de los papilomavirus	9
<b>Figura 7</b> Frecuencia por edad de los pacientes	34
<b>Figura 8</b> Frecuencia del género de los pacientes con cáncer gástrico	35
<b>Figura 9</b> Distribución porcentual del tipo histológico del cáncer	36
<b>Figura 10</b> Distribución porcentual del tipo histológico del cáncer según el género	36
<b>Figura 11</b> Distribución de la edad de los pacientes con cáncer gástrico tipo difuso e intestinal	37
<b>Figura 12</b> Electroforesis en gel de agarosa, amplificación del gen L1 con los oligonucleótidos MY09/MY11.	38
<b>Figura 13</b> Microfotografía de inmunofluorescencia directa con escasa expresión de la proteína CD4+	40
<b>Figura 14</b> Fotomicrografía de la expresión del marcador de marcador CD8	41

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>APC</b>	Células presentadoras de antígenos
<b>BUAP</b>	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>CDB</b>	Centro de Detección Biomolecular
<b>CG</b>	Cáncer Gástrico
<b>CTL</b>	Linfocitos T citotóxicos TCD8+
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>G</b>	Grado histológico
<b><i>H pylori</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>IFD</b>	Inmunofluorescencia directa
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>INCAN</b>	Instituto Nacional de Cancerología
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>LCR</b>	Long control region
<b>M</b>	Metástasis a distancia
<b>MCH</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>MHC-I</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 1
<b>MHC-II</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 2
<b>N</b>	Ganglios linfáticos regionales
<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAP</b>	Prueba de papanicolaou
<b>pRB</b>	Proteína del Retinoblastoma
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>Th</b>	Linfocitos auxiliares CD4+
<b>Tregs</b>	Células T reguladoras
<b>T</b>	Tumor primario
<b>TAA</b>	Antígenos Asociados al Tumor
<b>TLR</b>	Receptor Tipo Toll
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>TNM</b>	Escala de Estadiaje del Cáncer
<b>VEB</b>	Virus del Epstein-Barr
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano
<b>VPH-AR</b>	Virus del papiloma humano de alto riesgo

## CAPÍTULO 1

### I. ANTECEDENTES GENERALES

#### 1. CÁNCER

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células, que pueden invadir el tejido circundante, además, provoca metástasis en puntos distantes del organismo; ésta enfermedad puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo(1).

El cáncer comprende seis características biológicas adquiridas durante el desarrollo de múltiples etapas de tumores humanos. Incluye mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores tumorales, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, activar la invasión y metástasis (Figura 1)(1).

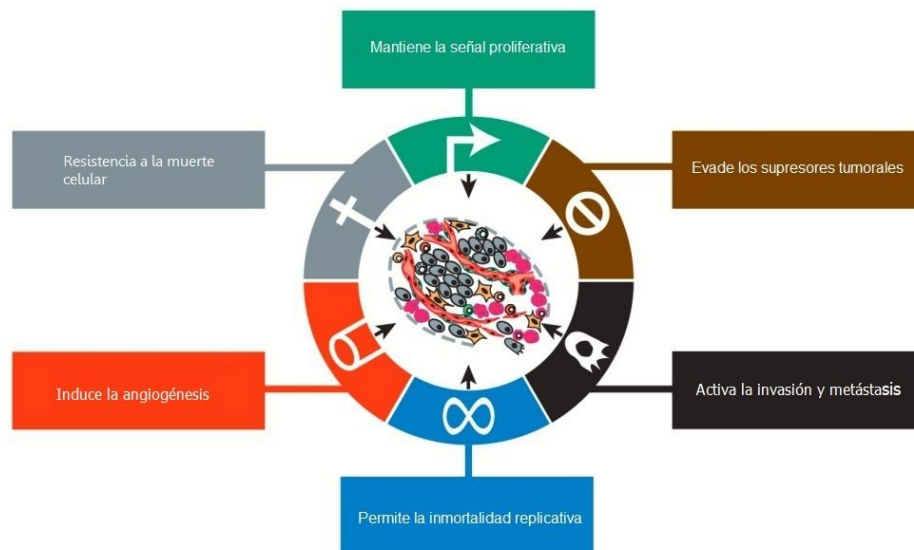


Figura 1. La ilustración abarca las seis características del cáncer. Hanahan et al, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, 2011 (1).

## 1.1 Cáncer gástrico

El cáncer gástrico(CG) es una enfermedad multifactorial que se origina en el estómago, éste órgano está ubicado en el tracto digestivo entre el esófago y el intestino delgado, segrega enzimas y ácido gástrico para ayudar a la digestión de los alimentos; consta de cuatro capas diferentes de células y la capa más externa está formada por células epiteliales que parecen como glándulas en la pared del estómago (Fig.2) (2)(3)(4).

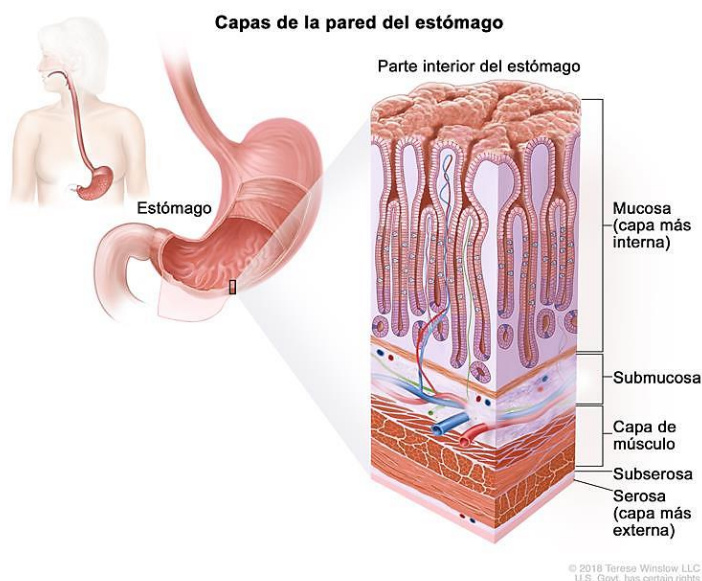


Figura 2. Capas de la pared del estómago. La pared del estómago se compone de la mucosa (capa más interna), la submucosa, la capa de músculo, la subserosa y la serosa (capa más externa). el estómago es un órgano de la parte superior del abdomen. Obtenida de: <https://www.cancer.gov/espanol> (5)

### 1.1.1 Epidemiología

El CG es uno de los tipos de cáncer más comunes y es una de las principales causas de mortalidad relacionadas con cáncer en el mundo (6). Aunque está disminuyendo constantemente en incidencia, el cáncer de estómago permanece como

una de las neoplasias más comunes y mortales en el mundo (3). El CG se ha convertido en un gran problema de salud en todo el mundo debido a la elevada morbilidad y mortalidad (7). Responsable de más de 1,000,000 de casos nuevos en 2018 y un estimado de 783,000 muertes (lo que equivale a 1 de cada 12 muertes), convirtiéndolo en el quinto cáncer más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer (Figura 3)(3)(8). Es importante señalar que el CG es uno de los contribuyentes principales a la carga global de años de vida ajustados por discapacidad en los hombres y representa el 20% del total mundial, después de los cánceres de pulmón e hígado (2).

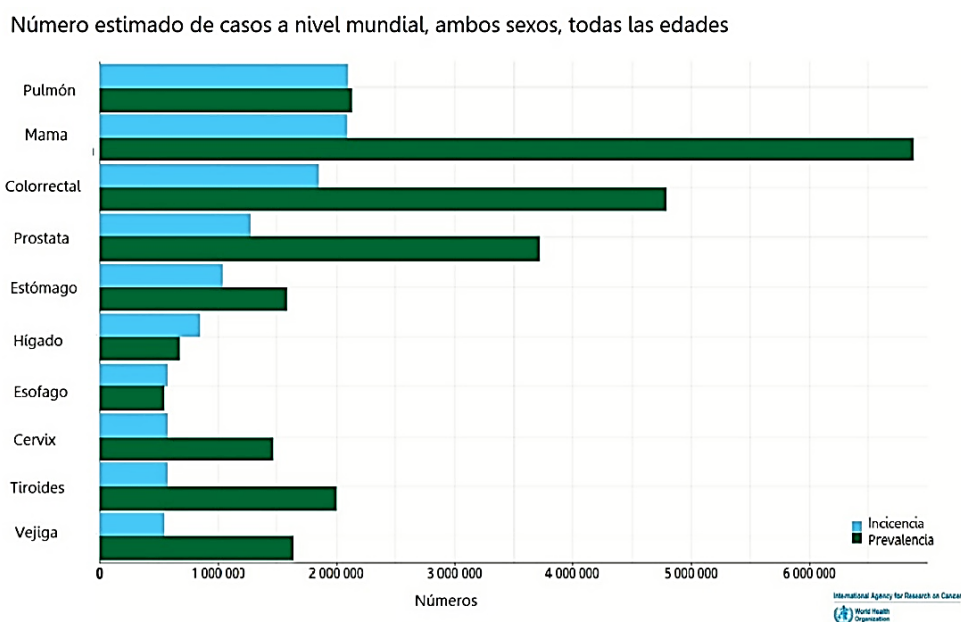


Figura 3. Estimado de incidencia y prevalencia de casos de cáncer alrededor del mundo, ambos sexos, todas las edades (tomada de <http://globocan.iarc.fr/>)

La incidencia de CG varía ampliamente en diferentes regiones geográficas, siendo la principal causa de muerte por cáncer en varios países de Asia Occidental (6)(8). Las tasas de incidencia son elevadas en Asia Oriental (por ejemplo, en Mongolia, Japón y la República de Corea), mientras que las tasas en América del Norte son generalmente bajas y es equivalente a los que se ven en las regiones Africanas (Figura 4) (8).

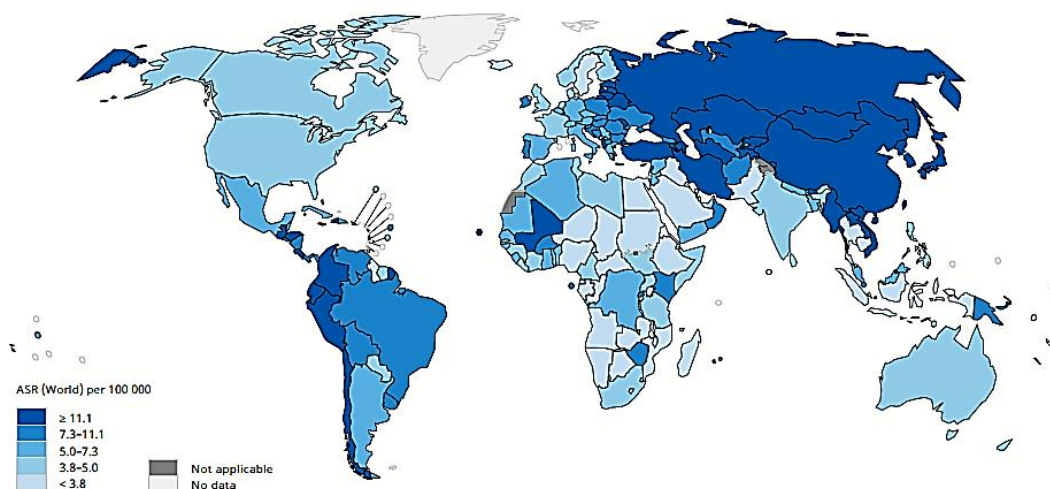


Figura 4. El mapa muestra la tasa de incidencia estandarizada por edad estimada para el cáncer de estómago en 2018, ambos sexos, todas las edades (tomada de <http://globocan.iarc.fr/>).

En México, hay un alto predominio de CG en el sexo masculino en comparación con el género femenino, incluso alcanzando una proporción de 2:1, la tasa de detección es baja (10% a 20%) y existe una incidencia de 6.8 casos por cada 100,000 habitantes (9)(10).

### 1.1.2 Clasificación

Existen varias clasificaciones del CG, clínicamente se clasifica en etapa temprana y avanzada, para ayudar a determinar una intervención apropiada (11). El carcinoma gástrico temprano se define como un carcinoma invasivo confinado a la mucosa y/o submucosa, con o sin metástasis en los ganglios linfáticos, independientemente del tamaño del tumor (11)(12). La resección quirúrgica o endoscópica en dichos casos conlleva una tasa de supervivencia a los 5 años superior al 90% (12). La mayoría de los carcinomas gástricos son pequeños, miden de 2 a 5 cm de tamaño, pueden ser multifocales e indicativos de un peor pronóstico, ya que, en las etapas tempranas el tumor es clínicamente silencioso (11)(12). El carcinoma gástrico avanzado invade la musculatura propia o más allá y tiene un mal pronóstico (11).

Anatómicamente, se divide en adenocarcinoma gástrico verdadero y adenocarcinoma de la unión gastroesofágica (2).

De acuerdo con la clasificación histológica de Lauren, los carcinomas se dividen en dos tipos principales: difuso e intestinal, además de los tipos indeterminados o mixtos (Fig. 4)(3)(2); las proporciones relativas mundiales de los subtipos de cáncer gástrico son 74% intestinal, 16% difuso y 10% otros (13). Éste sistema detalla los tumores por la descripción microscópica y los patrones de crecimiento (10).

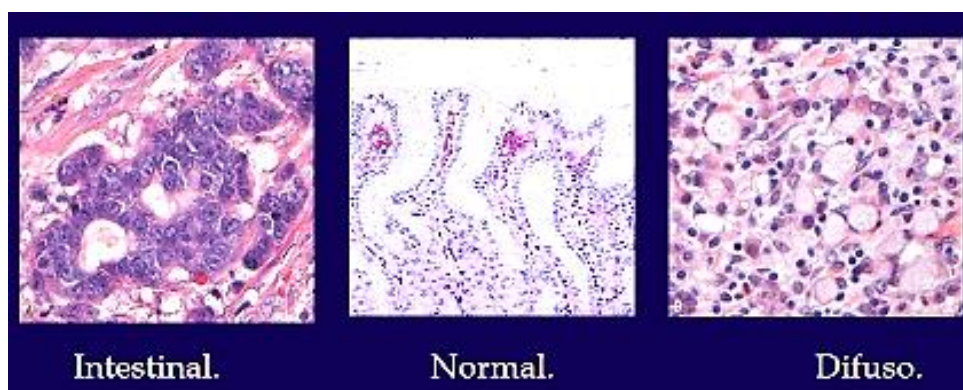


Figura 5. Clasificación histológica de Lauren del cáncer gástrico. Se aprecia en la parte central mucosa normal, en la izquierda cáncer gástrico tipo intestinal que suele presentarse estructuras glandulares; a la derecha el tipo difuso en el cual se presentan poca o ninguna formación glandular. Obtenida de: World J Gastroenterol, 2006; 12(3):354-362

El tipo difuso se caracteriza por la presencia de células cancerosas que infiltran el estroma del estómago con poca o sin formación glandular, con pobre grado de diferenciación, y mostrando en ocasiones la presencia de células “en anillo de sello”, lo cual correspondería a los tipos anillo de sello y mucinoso según la OMS (10)(14). Tienen a exhibir desmoplasia e inflamación asociada a preservación relativa de la mucosa subyacente, su crecimiento tiende a ser más expansivo que infiltrativo, posee una incidencia mayor entre familiares, tiende a afectar a poblaciones jóvenes, además de asociarse con un mal pronóstico y tener un curso clínico más agresivo que el tipo intestinal (10)(13).

El tipo intestinal está bien o moderadamente diferenciado, forma estructuras glandulares con distintos grados de diferenciación, correspondería a los tipos tubular y

papilar según las OMS, además este tipo de cáncer gástrico se asocia con la infección de *H. pylori* (2)(14).

Aunque el esquema de Lauren es simple y robusto, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que incluye cinco clasificaciones histopatológicas de cáncer, tiene la ventaja de que está de acuerdo con las clasificaciones histológicas de cáncer en otras partes del intestino. Las categorías de la OMS son basadas en los patrones histológicos predominantes del carcinoma (tubular, papilar, mucinoso, poco cohesivo y variantes raras)(2).

También se clasifica el tumor en estadios, se refiere a la extensión del cáncer, es decir, que tan grande es el tumor y si se ha extendido, existen muchos sistemas de estadificación, el TNM es una de los más reconocidos y se usa para muchos tipos de cáncer (15).

En el sistema TNM, la T se refiere al tamaño y extensión del tumor principal, la N se refiere a la extensión del cáncer que se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos y la M se refiere a si ha tenido metástasis (Estadificación TNM del American Joint Committee on Cancer) (Anexo 1)(16)(15).

### **1.1.3 Factores de riesgo**

Las causas exactas del CG son desconocidas, pero el riesgo de carcinogénesis se ha asociado a predisposición genética, historia familiar, infecciones, afecciones médicas, características demográficas, exposiciones ocupacionales, dieta, estilo de vida, trastornos de inmunodeficiencia, radiación ionizante, edad mayor de 60 años y el sexo masculino (10)(17)(18).

Los factores ambientales tienen un papel importante en el CG, por ejemplo, dietas con un alto contenido de carnes rojas, ahumadas, alimentos procesados o con conservadores, alto contenido de sal, nitratos y nitrosaminas, así como baja ingesta de frutas y verduras (10).

El consumo de cigarrillo, el consumo de alcohol y la obesidad también se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer gástrico (2)(18). Entre los factores de riesgo para CG observados en población del occidente de México se encontraron el consumo frecuente de carne de cerdo, sardina enlatada, tabaquismo y una vida sedentaria (10).

Alrededor del 1-3% se puede atribuir a los síndromes de predisposición al cáncer hereditario, la E-cadherina(CDH1) como el único gen conocido para el cáncer gástrico difuso hereditario, representa sólo el 40% de los casos, dejando el 60% con un diagnóstico genético desconocido (2)(13).

Las enfermedades como gastritis atrófica crónica, metaplasia intestinal, anemia perniciosa, pólipos adenomatosos gástricos, síndrome de Li Fraumeni y grupo sanguíneo de tipo A se han asociado con la enfermedad (5). Además, la mayoría de los cánceres gástricos son causados por *H. pylori*; esta bacteria secreta ureasa, una enzima especial que convierte urea en amonio, que reduce la acidez del estómago haciendo más hospitalario a agentes infecciosos como el VPH y el Epstein-Barr(EBV) (4). Aproximadamente del 5-10% de carcinomas gástricos son asociados al EBV, mientras que el VPH sigue siendo un agente controversial (3)(13).

Se asoció un mayor riesgo de cáncer gástrico con baja posición socioeconómica, en sí misma se asocia con una mayor incidencia de cáncer gástrico probablemente a través de un mayor riesgo de adquisición de *H. pylori* y un acceso potencialmente reducido a frutas y verduras (3)(19).

Entre la población latina el aumento observado en la incidencia de cáncer gástrico incluye las disparidades socioeconómicas, dieta y la susceptibilidad genética o biológica; por otra parte, no ha sido ampliamente estudiado el componente genético en los hispanos y aún no se han encontrado marcadores únicos que confieren un mayor riesgo en esta población (19).

### **1.1.4 Diagnóstico**

El diagnóstico de CG se basa en la endoscopia y requiere una valoración histopatológica del tejido (biopsia gástrica) (2)(8). En la mayoría de los pacientes el CG es asintomático y, por lo tanto, el diagnóstico es frecuente cuando la enfermedad se encuentra en una etapa avanzada, (2)(4) y de ello depende su baja tasa de supervivencia: solo el 4.7% de los casos alcanza los 5 años después del diagnóstico (10).

Los síntomas comunes en el diagnóstico son anorexia, dispepsia, pérdida de peso y dolor abdominal y por otro lado en los pacientes con tumores en la unión gastroesofágica o en el estómago proximal podría presentar disfagia (2).

### **1.1.5 Tratamiento**

La cirugía es el único tratamiento curativo, su extensión, va a estar determinada por la etapa del tumor, diámetro, localización y tipo histológico; cuando la enfermedad está localmente avanzada, se combina con terapia adyuvante o neoadyuvante y alguna terapia molecular dirigida (2)(21). Sin embargo, muchos pacientes tienen una enfermedad inoperable en el momento del diagnóstico o una enfermedad recurrente después de la resección con intención curativa (2).

## 2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El VPH son un grupo de más de 200 virus, miembros de la familia Papillomaviridae y tienen afinidad por el tejido epitelial (22)(23).

### 2.1 Estructura

Virus de ADN de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases(pb) asociadas con histonas, carece de cubierta, su diámetro es de 50-55 nm (Cuadro 1)(Figura 6) (22).

Características del VPH	
Genoma	ADN
Cápside	Icosaédrica
Envuelta	Desnudos
Tipo de ADN	Doble cadena
Estructura del ácido nucleico	Cadena circular

Cuadro 1. Características del VPH, realizado de: Doorbar et al. Vaccine 30, 2012 (24)

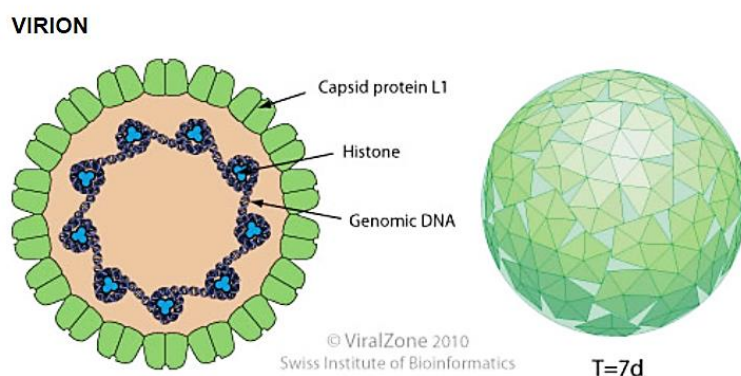


Figura 6. Estructura de los papilomavirus. Derecha: Forma icosaédrica del virus. Izquierda: Diagrama de la cápside del VPH, donde se observa la proteína principal de la cápside L1, así como el genoma viral empaquetado con histonas celulares. Obtenida de Viral Zone: <http://viralzone.expasy.org/>.

La cápside está constituida por 72 capsómeros pentaméricos de la proteína más abundante(L1) en un arreglo con número de triangulaciones de 7 (22).

Estos virus constan de varios genes de dos tipos diferentes: hasta ocho genes de expresión temprana (E1-E8), cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación y replicación viral, y dos genes de expresión tardía (L1 y L2), cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cubierta viral, la cápside (Cuadro 1) (24). Una región de control, denominada long control region (LCR), es la encargada de controlar la expresión de los genes tempranos E7 y E6 (25).

Cuadro 2. Proteínas del virus del papiloma humano y funciones asociadas

Tipo de proteína	Nombre	Funciones o actividades asociadas
No estructurales	E1	Tiene funciones de helicasa. Es esencial para la replicación y la transcripción.
	E2	Esencial para replicación y transcripción viral, segregación genómica y encapsidación.
	E4	Regula la expresión de genes tardíos, controla la maduración viral y la salida de los viriones.
	E5	Estimula la actividad transformante de E6 y E7, promueve la fusión celular generando aneuploidia e inestabilidad cromosómica, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria
	E6	Se une e induce la degradación de la proteína p53, inhibiendo la apoptosis; interactúa con proteínas del sistema inmunitario innato, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y a la persistencia del virus; activa la expresión de la telomerasa.
	E7	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores pRB; incrementa la actividad de cinasas dependientes de ciclinas; afecta la expresión de genes de fase S por interacción directa con factores de transcripción E2F y con histonas desacetilasa; contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria.
Estructurales	L1	Proteína principal de la cápside. Reconoce receptores sobre la célula hospedera. Es altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes.
	L2	Proteína secundaria de la cápside. Participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones.

La denominación de E o L se refiere a temprana(early) o tardía(late) de acuerdo con su síntesis o funciones durante el ciclo replicativo. Algunos papilomavirus tienen marcos de lectura abierta para las proteínas E5 y E8, aunque aún se desconocen sus funciones (22).

Santos-Lopez, et al, Aspectos generales de la estructura, la clasificación, la replicación del virus del papiloma humano, 2015. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457744942008>

En todo el mundo, anualmente, 550,000 nuevos pacientes padecen tumores malignos que se asocian con la infección del VPH (26).

## 2.2 Clasificación

Más de 40 tipos de VPH pueden transmitirse fácilmente por contacto sexual, anal y oral; causan una amplia variedad de enfermedades de la piel y verrugas que a menudo progresan a malignidad. De acuerdo al tipo de infección el VPH se clasifica en dos grupos: infección mucosa e infección cutánea (6).

Los tipos de VPH se clasifican en función de su potencial oncogénico en:

- Carcinogénicos tipo 1: se han reportado que aproximadamente 40 infectan el tracto ano-genital y solo los tipos de VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 han sido clasificados como carcinogénicos tipo 1, debido a la prevalencia y a los tipos virales encontrados en epitelio del cérvix normal y con cáncer (27). Dos de estos, los VPH16 y VPH18 son responsables de la mayoría de los cánceres causados por VPH a nivel mundial (25).
- Probablemente carcinogénicos (grupo 2A): VPH68
- Posiblemente carcinogénicos(grupo 2B): VPH26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 73, 82, 85 Y 97 (27).
- Los VPH de bajo riesgo, no causan cáncer, pero pueden causar verrugas en la piel o alrededor de los genitales y del ano. Los genotipos incluidos en este grupo son los VPH6 y VPH11 principalmente, que causan 90% de todas las verrugas genitales (3)(15).

En población mexicana con cáncer cervicouterino se ha reportado que los genotipos VPH16, 18, 31, 45 y 58 son los de mayor prevalencia en muestras de cérvix (27).

Varios virus de ADN se han relacionado con la etiología del cáncer (29). Los virus pueden influir directamente en el proceso oncogénico, las células en riesgo de adquirir mutaciones carcinógenas inician una transformación oncogénica. Indirectamente, los

virus también pueden contribuir a la carcinogénesis, induciendo un estado inflamatorio crónico en tejidos, que promueve el estrés oxidativo y la inflamación (30).

Hay al menos 7 virus implicados en la patogénesis, del 10% al 15% de todos los cánceres humanos en todo el mundo. A pesar de una alta prevalencia de infección con estos virus, sólo una minoría de individuos infectados desarrolla un tumor maligno subsiguiente, subrayando el papel importante que el huésped y los factores ambientales tienen en el desarrollo del cáncer (30).

El VPH es considerado como uno de los virus más importantes relacionados con el tumor, tiene un papel importante en el carcinoma cervical (4). Además el VPH es un factor efectivo en la carcinogénesis del cuello uterino, piel, cavidad oral, faringe, laringe y tumor del sistema anogenital (31). Suficiente evidencia ha demostrado las propiedades oncogénicas del VPH, lo que sugiere un papel del virus en la patogénesis del cáncer de otras secciones del tracto digestivo (32).

La mayoría de las infecciones por VPH de alto riesgo ocurren sin síntomas y desaparecen en 1 o 2 años y no causan cáncer. Sin embargo, algunas infecciones por VPH pueden persistir por muchos años y estas, pueden resultar en cambios celulares que, si no se tratan, pueden evolucionar a cáncer (28).

La Administración de Alimentos y Drogas (FDA) ha aprobado tres vacunas para prevenir la infección con ciertos genotipos del VPH: Gardasil®, Gardasil9® y Cervarix®. Estas vacunas proveen una fuerte protección contra las infecciones nuevas por VPH, pero no son eficaces para tratar infecciones por VPH ya existentes o enfermedades causadas por VPH (28).

El uso correcto y regular del condón está relacionado con una transmisión menor de VPH entre las parejas sexuales, pero el uso irregular no lo está. Sin embargo, las áreas que no están cubiertas por el condón pueden infectarse por el virus, por lo que el uso de condones no provee una protección completa contra la infección (28).

## 2.3 Ciclo de replicación

Los papilomavirus se adaptan perfectamente a su huésped y explotan la maquinaria celular para sus propios fines, responsable de la transformación maligna (12)(14). De ahí que, el virus infecta a las células y éstas cooperan con la maquinaria de replicación del huésped para producir progenie viral que pasa a infectar más células (30).

Los VPH infectan las células epiteliales; éstas células se organizan en capas, cubren las superficies internas y externas del cuerpo, incluso de piel, de garganta, del aparato genital y del ano (28). El ciclo de vida del VPH comienza con la infección de la capa basal a través de microtraumas que comprometen la barrera epitelial (33). Para prosperar, los virus necesitan superar los componentes del ciclo celular evitando la inducción de apoptosis y la vigilancia inmune del huésped, no es sorprendente que infecciones virales crónicas se asocien con el desarrollo de varios tipos de cánceres (30).

Una vez que el VPH entra en la célula epitelial, el virus empieza a expresar proteínas que codifica. Las proteínas E6 y E7 codificadas por los VPH de alto riesgo, son críticas en el proceso de replicación viral, interfieren en las funciones celulares que previenen normalmente un crecimiento excesivo; conduciendo así a una inestabilidad genómica favoreciendo el crecimiento descontrolado y evitando la muerte celular (por apoptosis) (4)(28)(30).

Las proteínas E6 y E7 interaccionan con p53 y pRB, respectivamente, moléculas centrales en el control del ciclo celular. La proteína p53 se ha denominado «el guardián del genoma», por su función central en la reparación del ADN dañado y la activación de la apoptosis cuando las mutaciones no pueden repararse. La proteína p53 es fundamental para mantener la integridad del genoma y destruir las células dañadas. De hecho, estudios clínicos muestran que más del 50 % de los casos de cáncer en humanos presentan mutaciones en p53 (4). En las infecciones por VPH no se produce lisis celular, las partículas virales son liberadas con el desprendimiento de las células que se están descamando del epitelio por lo que este tipo de infecciones no despiertan una reacción

inflamatoria. Solo pequeñas cantidades de partículas virales están expuestas a defensas (4).

## 2.4 Detección

Las infecciones por VPH pueden detectarse al analizar una muestra de células para ver si contienen ADN o ARN viral (cuadro 3). No hay en la actualidad métodos que se recomienden como exámenes de detección semejantes a una prueba de Papanicolaou (Pap) para detectar cambios celulares causados por infección de VPH en tejidos de ano, vulva, vagina, pene u orofaringe (28).

Varios estudios han utilizado diferentes métodos y kits genómicos para el diagnóstico de VPH, la técnica PCR es la más común empleada en la detección de VPH (4). Es una técnica altamente sensible con el potencial de producir millones a miles de millones de copias de un producto específico, además, solo se necesitan cantidades mínimas de ADN, he aquí la fuerza inherente de la metodología basada en PCR para que se generen suficientes copias(34). Por esta razón, la PCR es un ensayo sensible (34). Al mismo tiempo, los estrictos procedimientos y controles de laboratorio son críticos para reducir resultados de falsos positivos relacionados con la contaminación (4).

Cuadro 3. Principales técnicas de detección del virus papiloma humano

Método	Descripción	Ventajas	Desventajas
<b>ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 de RT-PCR</b>	-Detección de ARN mensajero E6/E7 VPH -Tipo de VPH específico	-Estándar de oro: mayor sensibilidad y especificidad -Detecta el VPH transcripcionalmente activo	-Difícil de reproducir en un entorno clínico
<b>P16<sup>INK4a</sup> IHC</b>	-Marcador sustituto de E7 VPH	-Técnica fácil y más implementada en el ámbito clínico. -Mayor sensibilidad -En presencia de VPH, grandes indicaciones de actividad transcripcional	-Moderadamente específico -No es exclusivo de los tumores relacionados con el VPH
<b>PCR</b>	-Amplificación de regiones conservadas del genoma del VPH -Prueba cuantitativa qPCR: el método más sensible para la detección del ADN del VPH e indica carga viral	-Diferentes kits comerciales disponibles. -Tipo de VPH específico	-Indica una infección por VPH que puede ser transitorio -Fácil contaminación -Menos específica -La sensibilidad y la especificidad de la técnica varían según los conjuntos de cebadores utilizados.
<b>VPH ADN ISH</b>	Detección y localización de VPH en tejidos o células	-Mayor especificidad -Simple y accesible -Permite distinguir el VPH episomal e integrado -mRNA VPH ISH disponible, con alta sensibilidad y especificidad a pesar de la carga viral	-Menos sensibilidad cuando hay baja carga viral

IHC, Inmunohistoquímica; ISH, Hibridación in situ; VPH, Virus papiloma humano; qPCR, Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; RT-PCR, Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa  
Taberna M, et al. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer, *Annals of Oncology* 28: 2386–2398, 2017 (23).

## 2.5 Tratamiento

Los individuos infectados por VPH que presentan cáncer reciben generalmente el mismo tratamiento que los pacientes cuyos tumores no albergan infecciones por VPH, según el tipo y el estadio de sus tumores (28).

### 3. MECANISMOS DE DEFENSA ANTITUMORALES

El sistema inmune juega un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de un organismo (35). Además de la protección contra los patógenos, está fuertemente involucrado en la prevención, desarrollo y defensa del cáncer; se divide en inmunidad innata y adaptativa (36).

La cooperación oportuna entre las células de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa asegurarán una protección y una eliminación óptima del agente infeccioso, la restauración, la función del tejido y la homeostasis (35). La inmunidad innata forma la primera línea contra las células tumorales, mientras que la inmunidad adaptativa es la responsable de la respuesta inmune a largo plazo (37).

Las células y moléculas del sistema inmunológico innato y adaptativo, como los macrófagos, las células asesinas naturales (NK), células T CD8<sup>+</sup> y células T CD4<sup>+</sup> al activarse liberan citocinas [interferón gamma (IFN $\gamma$ ), IL-6 y FNT $\alpha$ ] que inhiben la angiogénesis y la proliferación de células tumorales, con la finalidad de eliminar las células tumorales (35).

Esta interacción se describe por medio de la inmunoedición, es decir, describe cómo interactúan el sistema inmunológico y las células tumorales durante el desarrollo del cáncer (36). Consta de tres fases distintas denominadas "las 3 E", la eliminación conlleva la detección y la destrucción completa de las células tumorales por los linfocitos T, en la fase de equilibrio, aparece una población de células tumorales inmunorresistentes (36). Simultáneamente, existe una presión constante en las células tumorales no resistentes. Finalmente, durante el escape, el tumor ha desarrollado estrategias para evadir la detección o destrucción inmune (38).

## 4. LINFOCITOS T

La célula T es la célula central de la respuesta inmunológica, responsable de dirigir el reconocimiento y muerte de células tumorales. Las células T llevan a cabo la vigilancia inmunológica, proliferan, destruyen células tumorales recién diferenciadas después de reconocer los antígenos asociados a tumor (TAA) y media los efectos supresores de tumores (39)(40). Así mismo, las respuestas efectivas de las células T son necesarias para controlar las infecciones virales (41).

### 4.1 Clasificación de los Linfocitos T

Los linfocitos T se dividen principalmente en T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> (42).

#### Linfocitos T cooperadores

Los linfocitos auxiliares CD4<sup>+</sup> (Th) son una clase heterogénea de linfocitos T secretores de citocinas (38). En particular, son células capaces de instruir y orquestar varios componentes del sistema inmunológico, incluidas T CD8<sup>+</sup>, células B, células dendríticas(CD), macrófagos y células NK (41).

Se dividen en Th1, Th2 y Th3. Los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) desempeñan un papel crucial en la activación de las CTL, son caracterizadas generalmente por la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), consideradas como el tipo de célula auxiliar más importante para la inmunidad contra el cáncer, ya que participa en la destrucción de células tumorales mediante la secreción de citocinas que activan los receptores de muerte en la superficie de las células tumorales y en la inducción de la propagación de epítomos (40). Los linfocitos T tipo 2 cooperadores (Th2) producen principalmente IL4, IL5 e IL13, importantes para proveer una respuesta inmune activando eosinófilos, basófilos, mastocitos y células B, por tanto, estimulan la inmunidad humoral y ejercen efectos antitumorales (38). Las Th3 generan una respuesta reguladora o supresora, liberan citocinas, como la FGT $\beta$  e IL-10 (39)(40).

Existe mucha evidencia de que ciertas células inmunes adaptativas, específicamente células T CD8 + y T CD4 + polarizadas Th1, pueden ejercer efectos antitumorales al reconocer antígenos específicos de tumores presentados en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (43).

Las células T CD4+ contribuyen con una gran cantidad de actividades en la inmunidad protectora contra los virus que se inician por infección o por vacunación, reclutamiento de células linfoides y función efectora directa a través de la producción de citocinas o células (44).

### **Linfocitos T citotóxicos**

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (CTL) se conocen como células T citotóxicas porque pueden matar directamente células tumorales y células infectadas, en efecto, son cruciales en la lucha contra las infecciones virales y respuestas antitumorales (45)(38). Un mediador principal de la eliminación viral mediada por inmunidad es la respuesta de las células T CD8 +. Las células T CD8 + se consideran altamente efectivas contra los patógenos intracelulares como los virus, se unen y lisan las células infectadas, también, secretan IFN $\gamma$  que tiene una gama de efectos antivirales (46).

## **4.2 Activación de los Linfocitos T**

La activación de linfocitos T requiere de células presentadoras de antígeno(APC) y a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad(MHC) con el péptido procesado es llevada a cabo, pero es necesaria la unión concurrente de moléculas coestimuladoras y secreción de citocinas, particularmente la IL-12, por las APC (46).

Las células tumorales muertas, en el proceso son digeridas por células dendríticas para la presentación a las células T, si algunas células tumorales sobrevivieron a la fase de eliminación, entran a la fase de inmunoección, la fase donde las células tumorales residuales permanecen en equilibrio bajo la presión del sistema inmune. Esta fase es

típicamente la más larga de las tres fases de inmunoección del cáncer, las células T CD8<sup>+</sup> y células dendríticas que secretan IFN- $\gamma$  e interleucina IL-12, respectivamente mantienen las células tumorales en un estado de inactividad. Durante este tiempo, debido a que las células del tumor son altamente heterogéneas y genéticamente inestables, pueden cambiar sus características / poblaciones en respuesta a la edición del sistema inmune y la supresión de escape (47).

Sin embargo, en un estado inmunosuprimido dentro del microambiente tumoral, permite a las células tumorales escapar del sistema inmune y comenzar a crecer. La proliferación de células inmunitarias también se reduce y es específico de tumor (47).

#### **4.3 Evasión de la respuesta inmune del VPH**

Las células infectadas pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico y ser eliminadas. Sin embargo, no siempre estas células infectadas son destruidas, lo cual resulta en una infección persistente. Conforme las células infectadas siguen creciendo, pueden sufrir mutaciones en los genes celulares que promueven un crecimiento aún más anormal, lo que lleva a la formación de un área de células precancerosas que termina en un tumor canceroso (5).

La infección por el VPH, en la mayoría de las mujeres jóvenes sin ningún compromiso inmune, pasa desapercibida. La respuesta dada por el LT CD4<sup>+</sup> al reconocer al polipéptido viral mediante el TCR, la activación y proliferación de los LT CD8<sup>+</sup>, la producción de citocinas y por último la generación de anticuerpos logran limitar la infección por virus (25).

La creciente evidencia sugiere que la evasión de la inmunidad innata y adaptativa tiene una parte fundamental en la tumorigénesis viral. Los mecanismos de evasión inmune de estas infecciones virales tienen un papel importante en la carcinogénesis (30).

El mecanismo de la evasión inmune viral varía según el patógeno; sin embargo, son sorprendentemente similares a los utilizados por los cánceres e incluyen lo siguiente: la ruptura del sistema de las redes innatas al obstaculizar producción de interferón;

inhibición de células asesinas naturales y macrófagos; interrupción de la presentación del antígeno por células; y la creación de un microambiente inmune supresor (4).

Las respuestas inmunológicas contra el virus del Papiloma Humano (VPH) son importantes para la inmunidad antitumoral, la desregulación inmune por el VPH durante la persistencia del virus puede contribuir a la supresión inmune, esencial para la progresión del cáncer asociado al VPH (48).

Sin embargo, el virus cuenta con estrategias de evasión como lo son las proteínas virales tempranas E6 y E7 capaces de bloquear la apoptosis celular, el hecho de mantener una población viral no productiva con índices de baja replicación de ADN y la utilización de los queratinocitos que al tener un periodo de vida corto y al infectarse por el virus no desencadenan una respuesta inflamatoria que alerte al sistema inmune. La confrontación entre el sistema inmune y la infección por VPH es compleja, los dos poseen mecanismos altamente efectivos para sobreponerse al otro y la más mínima ventaja o defecto en el sistema inmune es aprovechada por el virus para replicarse y desarrollar todo su potencial oncogénico e inducir cáncer (25).

Para evadir las defensas inmunológicas del hospedero y establecer la persistencia, el VPH modula la expresión del gen, mediante la regulación de la metilación del ADN del hospedero, la modificación de histonas y los factores de transcripción (FN-kB)(48). También, el receptor tipo Toll (TLR) 9 está desregulado por la oncoproteína E7 del VPH38 y E7 del VPH17, alteran la expresión de los receptores, que son fundamentales en la respuesta inmunológica innata (45).

Las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH son importantes para regular las respuestas inmunitarias del huésped. Estas oncoproteínas desregulan la expresión genética, la interacción proteína-proteína, modificaciones postraduccionales y el tráfico celular de moduladores inmunitarios críticos del huésped (48).

Para evadir el reconocimiento inmunológico del hospedero, muchos virus suprimen la expresión superficial de las moléculas del MHC-I. Las E5 son pequeñas proteínas transmembrana que se unen a varias proteínas transmembrana del hospedero,

incluyendo el MHC-I. El enlace E5 a las moléculas MHC-I conduce a su regulación por disminución en la superficie de la célula. La E5 del VPH16 interactúa a través su región hidrofóbica, con la cadena pesada de las moléculas del MHC-I y las retiene en el aparato de Golgi y en el retículo endoplasmático (RE) (48). Se ha demostrado que E7 bloquea directamente la cadena pesada promotora del MHC-I (45).

En la evasión inmune extracelular, las células presentadoras de antígeno (APC) que son un vínculo crucial entre la inmunidad innata y adaptativa son inhibidas por el VPH (45).

Así que, para que una infección crónica sea exitosa, el sistema inmunológico adaptativo necesita ser eludido por el virus. Por lo tanto, un microambiente inmune que soporta una infección crónica puede también potencialmente acortar la fase de equilibrio y promover la evasión de la inmunovigilancia, conduciendo a un cáncer activo (30).

## II. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### 5. CÁNCER GÁSTRICO Y VPH

Se ha identificado la presencia viral del VPH en diferentes regiones del cuerpo, en estómago, pulmón y el tracto urinario (49). Se han demostrado ampliamente las propiedades oncogénicas del VPH en estudios de cáncer anal, oral y cáncer faríngeo, lo que sugiere un papel del virus en la patogénesis del cáncer de otras secciones del tracto digestivo, debido a la implicación de las infecciones virales en los cánceres (24).

Los genotipos VPH16, VPH18 y VPH33 han sido correlacionados con tumores de tracto digestivo, cáncer oral, cáncer de esófago y cáncer colorectal (26), Ding et al (51), en 2010 encontraron que el VPH16 puede jugar un papel importante en el desarrollo de carcinoma gástrico.

En China, Ma et al (52), en 2007 realizaron un estudio observacional, comparativo y transversal, donde se investigó la relación entre el VPH16 y la prevalencia de CG, se analizaron tejidos de carcinoma gástrico (CG) y tejido gástrico adyacente de mucosa normal (GANM) con la técnica reacción en cadena de la polimerasa in-situ (ISPCR) y reacción en cadena de la polimerasa acuosa (LPCR). También se analizó la presencia de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), detectado por inmunohistoquímica y por tinción con hematoxilina y eosina en tejido gástricos. El gen E6 del VPH16 se detectó en 37.5% (15/40) de los GC y 5% (2/40) de los GANM con LPCR. Con la técnica ISPCR la tasa positiva de E6 fue 27.5% (11/40) en GC y 0% (0/40) en GANM; no hubo diferencia estadística entre las dos técnicas. La tasa de infección de HPV16 en GC fue significativamente mayor que en el resto ( $P = 0.0136$ ), y VPH16 no tuvo correlación con *H. pylori* en CG ( $P = 0.0829$ ). Estos hallazgos sugieren que VPH16 puede infectar las células del epitelio glandular gástrico y la infección viral podría desempeñar un papel en la aparición de GC independiente con o sin cooperación de la infección con *H. pylori*. En un meta-análisis diseñado para evaluar la prevalencia y la relación del VPH en los cánceres gastrointestinales (GI) en población Iraní, se incluyeron 17 estudios, la prevalencia de VPH en pacientes con GI fue de 16.4% (CI95%:10.4-24.9). Considerando

todos los tipos de VPH el OR del cáncer GI positivo en pacientes fue 3.03 (CI95%: 1.42-6.45) mientras en pacientes con VPH16 fue de 3.62 (CI: 1.43-4.82). Los resultados mostraron una gran relación entre la infección de VPH16 y cáncer GI en población Iraní (53). En otro estudio parecido, realizado en China en el año 2016, se incluyeron 30 estudios donde se incorporaron 1917 casos, se estimó la prevalencia de VPH en pacientes con cáncer gástrico de 28.0% (95% CI: 23.2%, 32.7%), donde hubo más prevalencia significativa en China que en otras partes (31% vs 9%,  $I^2=95.0\%$ ,  $P 0.001$ ). La prevalencia del VPH16 en CG fue del 21%, la prevalencia de VPH18 fue del 7% y el HPV16 se detectó 3 veces más frecuentemente que HPV18 (26).

En Turquía se analizaron con técnica de PCR, 55 tumores de cáncer de esófago y gastroesofágico, donde el 9.6% presentaron VPH positivo, 3 casos fueron VPH39 y dos fueron VPH16 (31). Añadiendo el estudio de Candido et al (4), estudiaron 40 muestras de CG y 40 controles, los analizaron por PCR para el gen L1 del VPH con los cebadores MY09/11 y GP5+/GP6+, el virus fue encontrado en 4 muestras de CG y 10 en los controles ( $p=0.008$ ); por lo tanto, no hubo una diferencia significativa entre estas muestras.

<b>Cuadro 4. Resumen de los principales estudios sobre el CG y VPH</b>			
Autor	Características de población	Método usado	Resultados
Ma, T. et al, 2007(52)	40 carcinomas primarios de pacientes con CG y su correspondiente tejido gástrico adyacente de mucosa normal.	Se utilizó la técnica reacción en cadena de la polimerasa in-situ (ISPCR) y reacción en cadena de la polimerasa acuosa (LPCR) para detectar el oncogén E6 del VPH16. También se analizó la presencia de H. pylory por inmunohistoquímica y por tinción con hematoxilina y eosina.	La proporción del VPH tipo16 en CG fue mayor que en la mucosa normal ( $p=0.0004$ ). La tasa de infección de H pylory en CG fue de 57.5%. El HPV16 no tuvo correlación con H. pylory en GC ( $P = 0.0829$ ) La infección viral podría desempeñar un papel en la aparición de GC independiente, con o sin la cooperación de la infección de H. pylory.
Zeng et al, 2016 (26)	Revisión sistemática de estudios originales que identifiquen VPH en pacientes con cáncer gástrico. Se incluyeron 30 estudios, 1917 casos y 576 controles.	Análisis de datos.  El método usado para la identificación del ADN fue PCR e hibridación in situ.	La prevalencia de VPH combinada fue de 28%. El VPH16 se detectó 3 veces más frecuente que el VPH18.  El VPH podría desempeñar un papel potencial en la patogénesis de CG

## 6. LINFOCITOS T Y CÁNCER GÁSTRICO

La interacción del microambiente tumoral y el sistema inmune juegan un papel crucial en el desarrollo y la progresión del cáncer (54). En un estudio sobre la importancia de los Linfocitos T y la supervivencia global de pacientes con cáncer colorrectal y gástrico después de la cirugía, se evaluó la influencia de los parámetros de inmunidad celular (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup>) mediante inmunofluorescencia, los resultados sugieren que niveles más altos del número absoluto de subconjuntos de linfocitos antes de la cirugía tiene un efecto beneficioso sobre la supervivencia general de pacientes con cáncer gástrico y colorrectal en Etapa III (17).

Las T reguladoras son generalmente consideradas inmunosupresoras y bloqueadoras de una efectiva inmunidad antitumoral, por lo tanto asociada a un mal resultado en varios tipos de tumores (21). En un estudio de casos y controles, evaluaron el número absoluto de células T reguladoras (Tregs; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) como marcador potencial de la enfermedad, en la sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico y colorrectal; los números absolutos de Tregs se calcularon con base en el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup> de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> y los números absolutos de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> por microlitro. El número absoluto de Tregs fue significativamente menor en los pacientes con cáncer gástrico que en los controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas para el cáncer gástrico frente a cáncer colorrectal o cáncer colorrectal frente a los controles (55). Sin embargo, Kim et al. en 180 pacientes con CG evaluaron el subconjunto de linfocitos infiltrantes de tumor por inmunohistoquímica contra CD3, CD4, Foxp3 y granzima B, encontrando una alta proporción de Foxp3/CD4 como factor pronóstico desfavorable para la supervivencia general (SG) usando análisis univariado y multivariado. Concluyeron que una relación más alta de células T regs/células T colaboradoras se asocia con un pronóstico desfavorable y un patrón de recidiva locoregional en el cáncer gástrico (54).

## 7. LINFOCITOS Y VPH

Un mediador principal de la eliminación viral mediada por inmunidad es la respuesta de las células T CD8+. Las células T CD8+ se consideran altamente eficaces contra patógenos intracelulares tales como virus, que se unen y lisan las células infectadas, y secretan IFN $\gamma$ , que tiene una gama de efectos antivirales. Las células T CD8 + tienen un papel directo en la eliminación de VPH (56).

Se han realizado estudios donde relacionan a la población de Linfocitos T con VPH positivo. Un estudio en biopsias de 218 pacientes diagnosticados con carcinoma de células escamosas orofaríngeas, donde se investigó los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en relación a VPH positivo. El VPH se analizó por PCR, 139 muestras positivas se analizaron para la expresión CD3, CD4, CD8 y Foxp3 por inmunohistoquímica. Concluyeron que las biopsias positivas a VPH presentaron una mayor infiltración de células T CD4 y CD8 pero no de células T reguladoras Foxp3, en comparación con las biopsias negativas al virus (57).

Spencer et al, realizaron un estudio comparando la distribución de los genotipos del VPH (37 genotipos evaluados) y las respuestas inmunes de las subpoblaciones de linfocitos T entre las poblaciones de europeos americanos, afroamericanos e hispanoamericanos, con resultados anormales de Papanicolaou. Encontrando diferencias estadísticamente significativas para los VPH tipo 55, 58 y 83 entre las poblaciones estudiadas. Sin embargo, no hubo diferencia en las subpoblaciones de células T entre estos grupos raciales / étnicos (58).

## **CAPÍTULO 2**

### **III. MARCO METODOLÓGICO**

#### **8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El CG, es la tercera causa de mortalidad y el quinto cáncer más frecuente a nivel mundial. Cada año hay 1 033 701 nuevos casos y 782 685 muertes por este tipo de cáncer a nivel mundial. Adicionando que México tiene una incidencia de 6.8 casos por cada 100,000 habitantes.

Se ha reportado que el 20% de todos los cánceres están relacionados a algún agente infeccioso, sobre todo a las infecciones virales. El VPH se ha involucrado en cáncer anal, oral y cáncer faríngeo, lo que sugiere un papel del virus en la patogénesis del cáncer de otras secciones del tracto digestivo. Siendo los genotipos VPH16 y VPH18 responsables de la mayoría de los cánceres causados por VPH a nivel mundial, especialmente el VPH16.

Existe evidencia que establece vínculos causales entre la infección con este virus y el CG, pero su papel, aun no es bien definido. El sistema inmunológico juega un papel muy importante en el desarrollo y control del cáncer, siendo los linfocitos T, las células centrales para detección y eliminación de las células infectadas por virus.

Por lo que surge la siguiente pregunta de investigación.

#### **Pregunta de investigación**

¿Cuáles genotipos del virus del papiloma humano y subpoblaciones de Linfocitos T (CD4 + Y CD8 +) se encuentran presentes en las biopsias de pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados?

## **9. HIPÓTESIS:**

Están presentes diversos genotipos del virus del papiloma humano y subpoblaciones de Linfocitos T, en biopsias de pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados.

## **10. OBJETIVOS**

### **11.1 Objetivo general**

Determinar la presencia de los genotipos de VPH y subpoblaciones de Linfocitos T en las biopsias de pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados.

### **11.2 Objetivos específicos**

Determinar la presencia de los genotipos de VPH presentes en biopsias de pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados.

Determinar la expresión de subpoblaciones de linfocitos T en las biopsias de pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados.

## **11. METODOLOGÍA**

### Descripción de la muestra

Estudio descriptivo, transversal, ambilectivo, homodémico y de escrutinio que se realizó en el laboratorio de Inmunología en la Facultad de Medicina y en el Centro de Detección Biomolecular (CDB), pertenecientes a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP); en el periodo comprendido entre agosto 2017 a julio 2019.

La muestra está conformada por bloques de parafina de pacientes con cáncer gástrico, verificado por histología, del Departamento de Cirugía del Hospital Universitario (que se encuentran en el banco de muestras del Laboratorio de Inmunología de la BUAP) en el periodo 2017-2018.

## **12.1 DISEÑO Y TIPO DE MUESTREO**

### **Tamaño de la muestra**

Se incluyeron al estudio 34 muestras.

### **Tipo de muestreo**

Muestreo por conveniencia.

## **12.2 DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN**

### **Criterios de inclusión**

Muestras de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico.

Se incluirán muestras de pacientes de todas las edades.

### **Criterios de exclusión**

Muestras en las que no esté diferenciado el estadio.

Bloques de parafina dañados.

### **Criterios de eliminación**

Pérdida del tejido durante el procesamiento

Falta de datos de los pacientes (estadio, tipo histológico)

## **12.3 VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN**

Las variables de estudio son: biopsias incluidas en parafina de pacientes con cáncer gástrico, genotipos del VPH y linfocitos T.

Las variables descriptivas: edad, sexo, histología y estadio del tumor.

La descripción de estas variables antes mencionadas puede encontrarse en el apartado de anexo (2-4)

Cuadro de definiciones conceptuales (Anexos 3).

Cuadro de definiciones operacionales (Anexos 4).

## 12.4 ESTRATEGIA DE TRABAJO

1. Se recolectaron las muestras de pacientes en base a los criterios de selección, siguiendo las pautas bioéticas (Anexo 5).
2. Obtención de los cortes. Los especímenes obtenidos fueron manipulados por un técnico experimentado en histología del Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina (titular la Dra. Nora Fernández Tamayo), quien se encargó de realizar los cortes pertinentes en un micrótopo. De cada bloque de parafina se obtuvieron cortes de 4  $\mu\text{m}$  en laminillas previamente preparadas con poli-L-lisina al 1% y en tubos de eppendorf de 1.5 ml.
3. Detección del VPH en muestras de pacientes con cáncer gástrico embebidas en parafina. Las muestras incluidas en parafina se desparafinaron (xilol y gradientes de etanol) y se realizó la extracción del ADN con el Kit High Pure Template de Roche. Se realizó la medición de la concentración de DNA con el nanofotómetro (calidad, pureza y cantidad de DNA). Se realizó PCR para la  $\beta$ -globina con los oligos PC04 y GH20 (268pb) para determinar la integridad del ADN. El ADN extraído se amplificó con los pares de cebadores: MY09/11 por medio de PCR. En resultados negativos se realizó PCR con los cebadores GP5+GP6+ con 2  $\mu\text{l}$  del producto de MY09/11, para su análisis se hizo electroforesis con gel de agarosa al 2% (anexo 7).
4. Identificación de Linfocitos T en muestras de pacientes con cáncer gástrico embebidas en parafina. Se desparafinó la muestra en estufa bacteriológica a 60 °C durante una hora, con xilol y gradientes decrecientes de etanol, se realizaron lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS), se activó el tejido con Tripsina 0.25 % (Gibco®), se aplicó el anticuerpo primario anti CD4 y CD8 (Biosciens) y aplicación del anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a fluoresceína, se montó de la muestra y selló con barniz (anexo 6). Las preparaciones fueron evaluadas en un microscopio ZEISS AXIOOBSERVER en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente por el Dr. Juan Carlos Flores Alonso.

5. Se realizó el llenado en una base de datos para posteriormente realizar su análisis.

## 12.5 MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se reunieron 34 muestras en bloques de parafina de pacientes con cáncer gástrico.

### - **Determinación se subpoblaciones de linfocitos T.**

Las muestras se analizaron por medio de la técnica Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y directa (IDF). Primero se desparafinaron las muestras, se activó el tejido con Tripsina, se aplicó el anticuerpo anti-CD4 acoplado a fluoresceína (IDF) y anti-CD8 como primer anticuerpo (IFI); y como anticuerpo secundario IgG de ratón acoplado a fluoresceína. Se realizó el montaje de la muestra y se selló con barniz (anexo 6).

### - **Determinación de VPH**

Se extrajo el ADN por el Kit de Roche en las muestras embebidas en parafina. Para analizar la integridad del ADN se realizó Polymerase Chain Reaction (PCR) para el gen  $\beta$ -globina con los oligos PC04 y GH20 (268pb). Se realizó la técnica Polymerase Chain Reaction (PCR) para el gen L1 del VPH. El ADN extraído se amplificó por dos sistemas de reacción usando dos pares de cebadores: MY09/MY11 y GP+5/GP+6. Para el análisis se realizó electroforesis con gel de agarosa al 2% (anexo 7).

Las medidas de bioseguridad que se tomaron en el proceso de las muestras, en laboratorio, con el equipo de bioseguridad, técnicas de laboratorio, fueron realizadas conforme el manual de bioseguridad en el laboratorio de la OMS. Donde reconoce que la seguridad y, en particular, la seguridad biológica son importantes cuestiones de interés internacional.

## 12.6 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos se recabaron y analizaron en SPSS. Los resultados de las variables cuantitativas se presentaron con medidas de tendencia central (promedio  $\pm$  desviación estándar) y los de las variables cualitativas se expresaron en porcentajes, empleando frecuencias, tablas de contingencia, Chi-cuadrada y gráficas.

## CAPÍTULO 3

### IV. ANÁLISIS DE DATOS

#### 12. RESULTADOS

Se estudiaron 39 muestras de pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados, que cumplieron con los criterios de inclusión, recabadas durante el periodo 2017-2018 en el departamento de Inmunología Experimental de la BUAP.

Los datos de los pacientes correspondientes a la edad, sexo, estadio clínico y el tipo histológico fueron obtenidos del expediente clínico de cada paciente. Se eliminaron 5 muestras por no contar con la información completa del paciente.

La edad promedio de la población estudiada fue de  $58.24 \pm 12.943$  con un límite de edad de 24 a 75 años (Figura 7). El 50% de las pacientes fueron mayores de 59 años, con predominio del sexo femenino 53% sobre el masculino.

**Edad de los pacientes con cáncer gástrico**

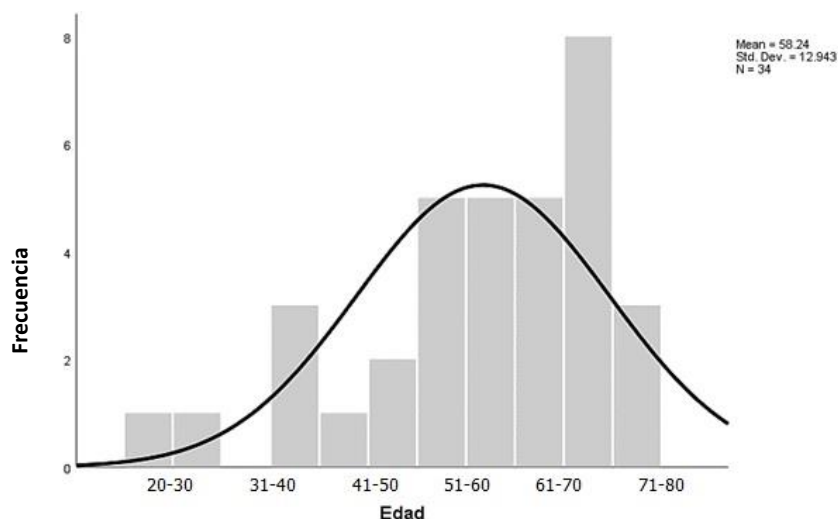
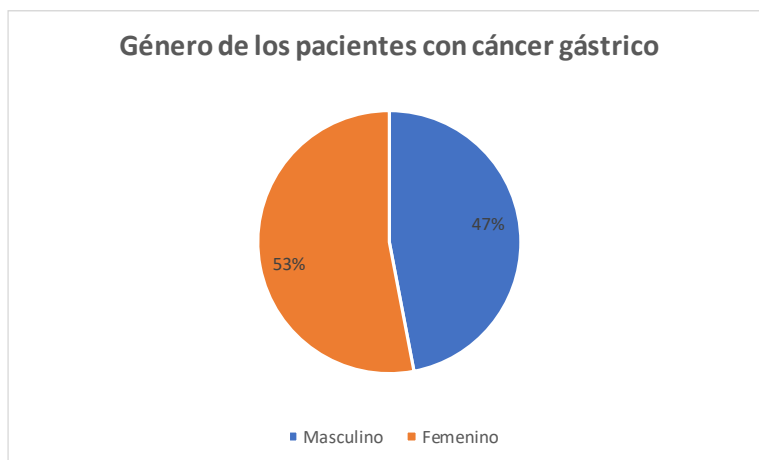


Figura 7. Frecuencia por edad de las pacientes, se puede observar, que, en la población estudiada, se tuvieron pacientes demasiado jóvenes y que la frecuencia más elevada se presentó en pacientes de 55-75 años.



*Figura 8. Frecuencia del género de los pacientes con cáncer gástrico, con predominio del sexo femenino sobre el masculino*

En este estudio se incluyeron biopsias de pacientes en estadios avanzados III y IV, el estadio clínico que encontramos con mayor frecuencia fue el IV (64.7%).

## CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LAS BIOPSIAS

Del total de pacientes estudiadas, el tipo histológico de cáncer que predomina es el tipo difuso (56%) respecto al tipo intestinal (44%) (Figura 9). Y el tipo histológico según el género, que predominó, fue el tipo difuso, tanto en género femenino como en masculino (Figura 10).

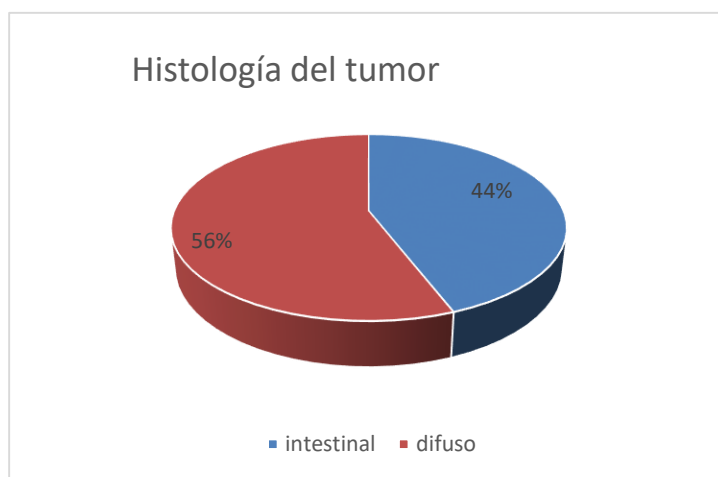


Figura 9. Distribución porcentual del tipo histológico de cáncer.

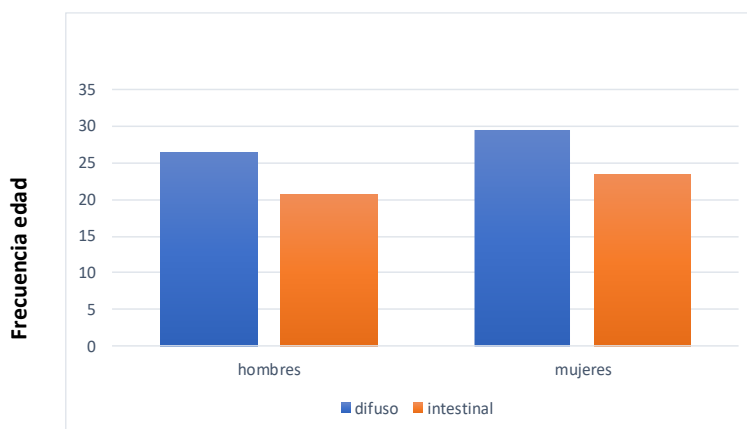


Figura 10. Distribución porcentual del tipo histológico de cáncer según el género.

La edad de los pacientes con CG tipo difuso es más frecuente en edades de 30 a 40 años y de 50 a 60, mientras que en los pacientes con tipo intestinal es más frecuente en edades de 60 a 70 años (Figura 11).

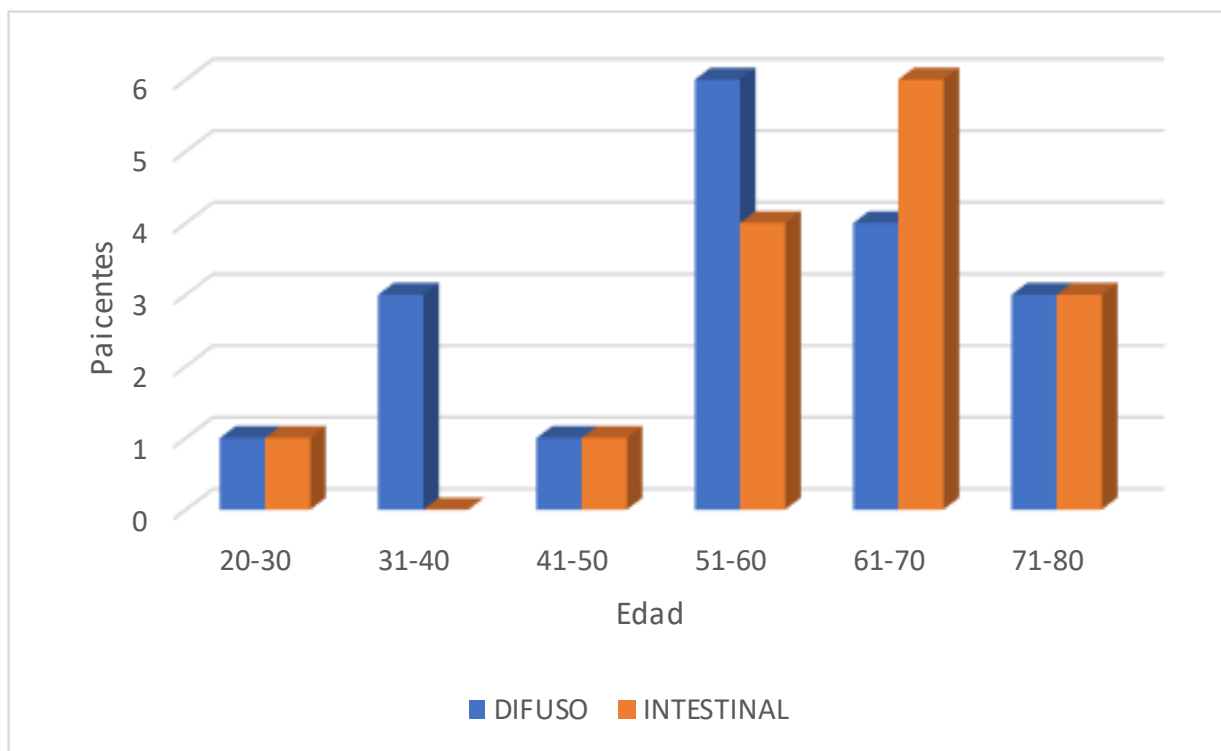


Figura 11. Distribución de la edad de los pacientes con cáncer gástrico tipo difuso e intestinal

## IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS PAPILOMA

Se realizó la extracción del ADN de los 34 cortes de parafina de los pacientes estudiados por medios del Kit High Pure Template de Roche. La calidad del ADN y la ausencia de inhibidores de PCR fueron evaluados por PCR con los oligonucleótidos (GH20-PC04) del gen constitutivo  $\beta$ -globina (amplicón: 248pb), de las cuales la amplificación del producto fue claramente visible en 24 muestras (70.58%) lo que indica que la integridad del ADN era adecuada para el análisis molecular de VPH.

En las muestras positivas para el gen constitutivo  $\beta$ -globina se amplificó un fragmento de la región L1(amplicón:450 pb) del genoma viral con los oligonucleótidos MY09/11(amplicón: 450pb) por la técnica PCR, se obtuvieron resultados negativos (Figura 12).

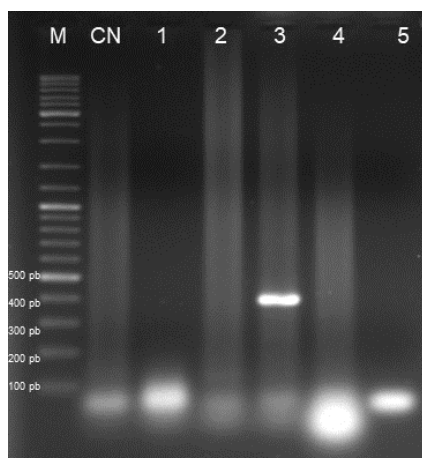


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio del producto de amplificación del gen L1 con los oligonucleótidos MY09/11

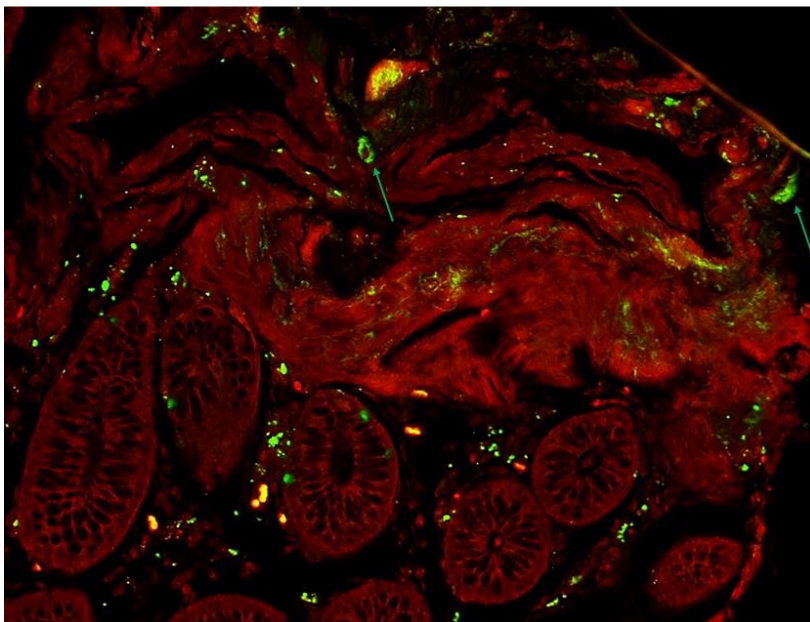
M	Marcador de peso molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix)
CN	Control negativo
Carril 1	Muestra VPH 06/18 con resultado negativo
Carril 2	Muestra VPH 08/18 con resultado negativo
Carril 3	ADN del control positivo para VPH
Carril 4	Muestra VPH 09/18 con resultado negativo
Carril 5	Muestra VPH 10/18 con resultado negativo
Banda de 450pb:	Amplificación del gen L1. Indica la presencia del VPH

Del producto de la primera PCR se realizó una PCR anidada con los oligonucleótidos internos GP5-GP6 (amplicón: 150 pb) a partir de 2 µl del producto de PCR de MY09/MY11 para aumentar la sensibilidad, del cual se encontró VPH en un paciente (4.1%).

## IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T

### EXPRESIÓN DE CD4+

Fueron revisadas las biopsias, la identificación de los Linfocitos cooperadores se llevó a cabo por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa, utilizando el anticuerpo anti-CD4 acoplado a fluoresceína, tras la excitación del fluorocromo se emite una luz verde para identificar el linfocito. La mayoría de las biopsias presentaron un bajo número de la expresión de CD4+ y CD8+ (figura 13). Se presentó la expresión de la proteína CD4+ en un 14.7% de las 34 muestras (tabla 3)

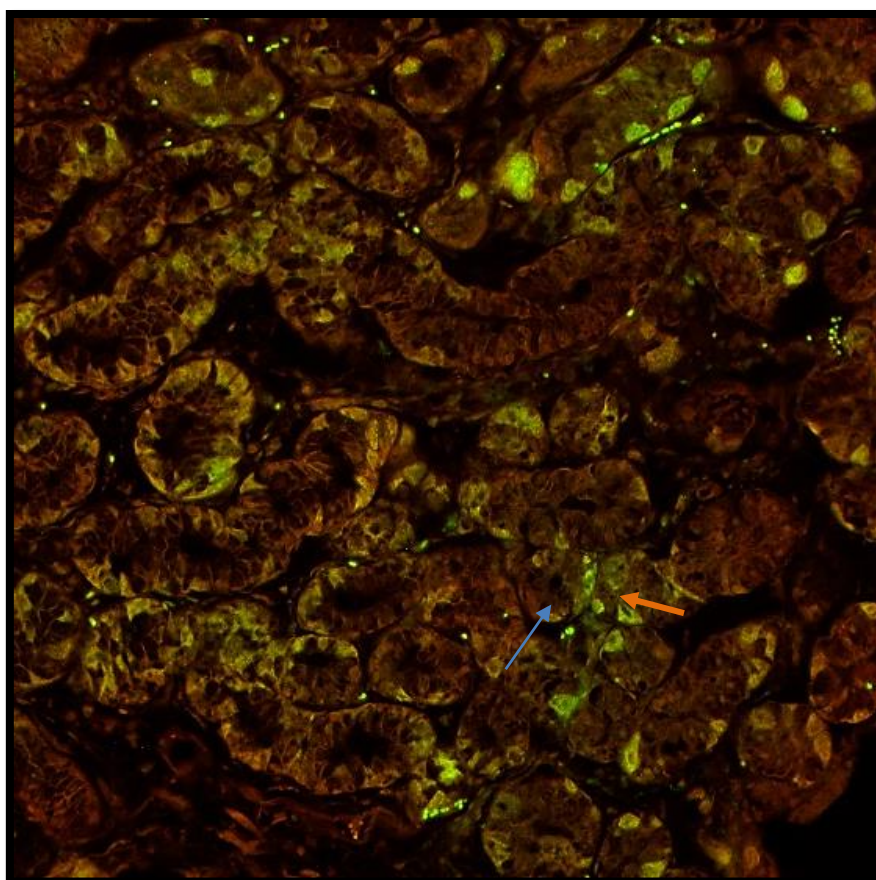


*Figura 13. Microfotografía de inmunofluorescencia directa con escasa expresión de la proteína CD4+(flecha), se observa en el citoplasma el marcador del CD4, lo que indica que el linfocito no se encuentra activado. Paciente con tipo histológico intestinal en estadio IV.*

## EXPRESIÓN DE CD8+

La expresión de la proteína CD8+ en linfocitos T Citotóxicos se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. La expresión de CD8+ en los linfocitos citotóxicos se presentó en el 29.4% de las muestras (Tabla 3) (Figura 14).

De los pacientes que presentaron muestras con CD8+ positivos de acuerdo al tipo histológico, 4 presentaron tipo difuso y 4 intestinal, de acuerdo al estadio, la mitad fue estadio III y la otra mitad IV, tanto en tipo difuso como intestinal.



**Figura 14.** Fotomicrografía de la expresión del marcador CD8 en linfocitos T citotóxicos por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico tipo intestinal y estadio III. Sección de parafina, teñida por IFI con Moab anti-CD8. Los linfocitos CD8 se revelan en amarillo fluorescente en el epitelio glandular. Flecha naranja expresión en la superficie células, Flecha azul, expresión en el citoplasma de la célula. (40X).

## EXPRESIÓN DE CD8+ Y CD4+ EN LINFOCITOS DE ACUERDO A LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

Se realizó la técnica de inmunofluorescencia para identificar linfocitos citotóxicos y cooperadores, mediante la evaluación de la expresión de CD4+ y CD8+ en las 34 muestras, de los cuales fueron positivos 5 y 8, respectivamente, la evaluación de las laminillas se realizó bajo cegamiento de los datos clinicopatológicos (Cuadro 5).

<b>LINFOCITOS</b>	<b>CD8</b>	<b>%</b>	<b>CD4</b>	<b>%</b>
Positivos	8	23.52%	5	14.70%
Negativos	26	76.47%	29	85.29%
Total muestras	34	100%	34	100%

*Cuadro 5. Porcentaje de Linfocitos positivos estudiados, en las biopsias de pacientes con cáncer gástrico*

De los pacientes que presentaron muestras con CD4+ positivos de acuerdo al tipo histológico, 2(5.88%) fueron tipo difuso y 3(8.82%) tipo intestinal. No hay asociación entre las variables CD8 y el tipo histológico( $P=0.14$ ); y entre CD4 y el tipo histológico( $P=0.59$ ) (Cuadro 6).

LINFOCITOS	CD8 n(%) P=0.14		CD4 n(%) P=0.59	
	Positivo n=8	Negativo n=26	Positivo n=5	Negativo n=29
Clasificación histológica				
Difuso	4(11.76)	15(44.11)	2(5.88)	17(50)
Intestinal	4(11.76)	11(32.35)	3(8.82)	12(35.29)

Cuadro 6. Porcentaje de Linfocitos positivos estudiados, en las biopsias de pacientes con cáncer gástrico por clasificación histológica. Chi cuadrada para identificar asociación entre variables, punto crítico de 3.84.

De acuerdo al estadio, 4 pacientes fueron estadio IV y uno estadio III, el estadio tipo III fue difuso (Tabla 5). No hay asociación entre las variables CD8 y el estadio clínico( $P=0.99$ ); y entre CD4 y el estadio clínico( $P=0.60$ ) (Cuadro 7).

LINFOCITOS	CD8 n(%) P=0.99		CD4 n(%) P=0.60	
	Positivo n=8	Negativo n=26	Positivo n=5	Negativo n=29
Estadio clínico				
III	4(11.76)	8(23.52)	1(2.94)	11(32.35)
IV	4(11.76)	18(52.94)	4(11.76)	18(52.94)

Cuadro 7. Porcentaje de Linfocitos positivos estudiados, en las biopsias de pacientes con cáncer gástrico por estadio clínico. Chi cuadrada para identificar asociación entre variables, punto crítico de 3.84.

### 13. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, la edad promedio de los pacientes con CG fue de 58 años, esto concuerda con reportes previos, el diagnóstico de CG ocurre mayormente en sujetos de edades avanzadas (mayores de 60 años), el 50% de nuestra población presentaron una edad mayor de 50 años, probablemente por una mayor acumulación de mutaciones en los genes encargados del mantenimiento y la reparación celular (10).

Respecto al sexo, nuestros resultados no concuerdan con lo reportado en la literatura ya que existe una disparidad específica de sexo en la incidencia de cáncer gástrico, las tasas de incidencia son 2 veces más altas en hombres que en mujeres en todo el mundo, sin embargo, en nuestra población se encontró una frecuencia de 53% en mujeres, tal vez porque no fue una población aleatoria (8)(10). Sin embargo, concuerda con el estudio de Díaz et al (59), en población mexicana, reporta que las mujeres jóvenes tienen más probabilidades de sufrir adenocarcinoma gástrico.

El estadio que encontramos en los pacientes principalmente es el IV con una frecuencia del 64.7%, debido a que la mayoría de los casos de cáncer gástrico se presentan en etapas avanzadas por el inicio tardío y síntomas inespecíficos (60)

En la población en estudio, el CG de tipo difuso se presenta a una edad más temprana que el tipo intestinal, esto concuerda con el estudio de Vargas et al (14), realizó un estudio descriptivo a población de Perú, donde los pacientes con cáncer gástrico tipo intestinal presentaron una edad promedio mayor que las que los que tuvieron el tipo difuso,

En este estudio evaluamos la frecuencia de VPH en CG, varios tipos de cánceres están relacionados con infecciones y múltiples estudios han reportado muestras de CG positivas a VPH de alto potencial oncogénico, sin embargo, la frecuencia difiere en varios estudios (26)(61). La asociación entre el VPH y el CG se ha reportado elevada en áreas con alta incidencia de esta enfermedad maligna.

La vía de transmisión del virus es oral, cabe destacar que la incidencia de cánceres de cabeza y cuello asociados al VPH ha aumentado en los países desarrollados debido a los cambios en las prácticas sexuales (50). Además, la mayoría de los cánceres gástricos son causados por *H. pylori*; esta bacteria secreta ureasa, una enzima especial que convierte la urea en amonio, que reduce la acidez para hacer el ambiente gástrico más básico, haciendo más hospitalario y facilitando la supervivencia a agentes infecciosos como el virus del papiloma humano y el Epstein-Barr, pero en los estadios estudiados(avanzados) ya no se reporta esta bacteria (4)(61).

En este estudio se identificaron 24(70.5%) bandas que amplificaron el gen  $\beta$ -globina en 34 muestras de parafina para realizar la detección del virus. Se encontró evidencia del 4.1% ADN del VPH en tumores de cáncer gástrico en las muestras evaluables. Sin embargo, en población asiática reportan una mayor frecuencia de VPH en CG (26)

En estudios de varios autores, la incidencia del VPH en pacientes es muy variable, dependiendo de la técnica de detección seleccionada, esta disparidad entre los estudios puede estar relacionada en parte con la variación en los métodos de detección viral(ISH, PCR), así como los métodos de recolección y conservación de las muestras, además a la diversidad geográfica y etnia en la población (32)(61). Además, las nuevas tecnologías emergentes para las pruebas de ADN del VPH son más sensibles y tienen mayor especificidad y permiten la detección de infecciones múltiples por VPH. Sin embargo, las técnicas son costosas, requieren mucho trabajo, requieren una infraestructura y personal capacitado. En comparación, la inmunodetección, y tecnologías como la hibridación in situ, Southern blot y dot blot hibridación entre otros, cuentan con varios factores que limitan su uso, incluyendo baja sensibilidad y especificidad, generalmente requieren mucho tiempo de procesamiento, técnicos capacitados y demandan una gran variedad de reactivos y equipos de laboratorio (4)(62).

La variabilidad de los datos en los estudios puede ser el resultado del uso no solo de varios métodos de detección de VPH, sino también de varios procedimientos de

recolección del material de estudio y sitios, varios métodos de protección contra la contaminación viral y diferencias geográficas (32).

En nuestro estudio molecular, se aplicaron cebadores del gen L1 para detectar el ADN del VPH en el cáncer gástrico, pero solo una muestra no genotificable fue positiva para el VPH. El uso de PCR para la identificación del gen L1 del VPH permite la identificación de los tipos más conocidos de VPH, además, la fuerza inherente de la metodología basada en PCR radica en su capacidad para detectar cantidades muy pequeñas del ADN del VPH y que generalmente se mantiene cuando el genoma viral se integra a la célula. Souza et al (58), en 2018, utilizando la técnica PCR y los mismos cebadores, en 302 pacientes con adenocarcinoma, encontraron VPH en el 3% de sus muestras, no fue significativa, sin embargo, destacan que las encontraron en pacientes jóvenes (< 55 años), probablemente indicando una vida con mayor actividad sexual, que puede incrementar la posibilidad de la infección por VPH. Además, según el TNM, el VPH se encontró con mayor frecuencia en tumores menos agresivos, con el 63% de las muestras de VPH clasificadas como T1 o T2 (58). Es importante mencionar que en sus muestras positivas no se observó la expresión de E6 y E7, como estas proteínas generalmente se expresan al comienzo de la infección y reflejan la persistencia del virus en el organismo del huésped, esto puede ser una indicación de que la presencia del virus en el estómago de los pacientes solo fue temporal (58).

Más aún, cabe destacar que otros estudios que utilizaron PCR para E6 y E7, que son genes que se mantienen durante el proceso de transformación maligna, también mostraron que no hay asociación entre el VPH y CG. Otros estudios de China en los que se detectó ADN del VPH en tumores de cáncer gástrico informaron hallazgos similares (63).

En Irán Fakhraei et al (6), realizaron un estudio en 100 muestras en carcinoma gástrico, utilizaron los cebadores GP5+/GP6+ para detectar VPH y para determinar el tipo de genotipo utilizaron el kit HPV HCR genotype-EPh PCR (AmpliSens); encontrando VPH en un 3.3% de VPH (tipos 16,18 y 45). Al igual que éste estudio, no se confirmó la asociación entre VPH y cáncer gástrico.

Adicionando el estudio de Kamangar et al (64). informaron la relación entre el estudio serológico de VPH16 y CG en China: sus resultados no mostraron una correlación significativa, al igual que nuestro estudio. A pesar de que la técnica PCR y los estudios serológicos parecen ser los métodos más precisos para detectar la exposición al VPH en los estudios epidemiológicos (64). Desafortunadamente, los resultados de los estudios de PCR no han sido consistentes: estos han encontrado evidencia de presencia de VPH en los tejidos tumorales que varían de 0 a 67% (64).

Xu et al (49), utilizando la técnica de hibridación in situ, encontraron el VPH en el 68% de las muestras de CG examinadas e incluso en el 20%(10/50) de tejido de la mucosa gástrica normal. Otro estudio, realizado por Snietura et al, con la técnica PCR cuantitativa en 84 muestras, todos los casos fueron considerados negativos (32). Cabe recalcar, que la incidencia del VPH en pacientes con carcinomas del tracto alimentario es muy variable, dependiendo de la técnica seleccionada (32). Actualmente, la PCR se usa con mayor frecuencia debido a su alta sensibilidad, pero su desventaja es su baja especificidad (32).

Una limitación de nuestro estudio es la proporción de casos con ADN degradado, cabe mencionar que la calidad y cantidad de ADN extraído a partir de tejidos embebidos en parafina destacan como factores limitantes para la realización de pruebas moleculares. Como en el estudio de Koshiol et al (63), de 144 muestra, se pudieron analizar solo 108 casos. De estos, todos fueron negativos para el ADN del VPH. A pesar de esta limitación, se tuvo un riguroso esfuerzo por prevenir la contaminación del ADN en el procesamiento y pruebas.

Por otra parte, la inmunidad de las células T que responden ante el tumor es un componente muy importante, ya que su desequilibrio o disfunción conducen a un resultado grave. Así bien, las células TCD8 desempeñan un papel muy importante en las infecciones virales, así como el cáncer, pero las células TCD4 son necesarias para apoyar la función de las células TCD8. Además, las células TCD4 ejercen funciones efectoras directas, inducen respuestas optimas de células B y ayudan a la inmunidad innata (41). En este estudio encontramos en las muestras de CG que el conjunto de

linfocitos en general es baja la expresión del número de estas células, ya que solo se observó la presencia del 23.5% y 14.7% de CD8+ y CD4+, respectivamente, en pacientes con CG.

Por lo tanto, la presencia de un bajo número de estas células probablemente se asocia con una inmunidad tumoral deteriorada, lo que a su vez resulta en la progresión del tumor, observado en nuestro estudio, con una baja expresión en estadios avanzados. (38). Cabe mencionar según investigaciones recientes, la inmunidad de las células T puede tener un papel importante en el progreso y pronóstico del CG, pero su función se ve afectada por la ubicación, la categoría, la molécula relacionada y la interacción entre las células, y algunos efectos aún son controversiales (65). De hecho, varios estudios han demostrado que un número bajo de linfocitos infiltrantes de tumores como CD4+ y CD8+ están asociadas con un mal pronóstico en algunos tipos de cáncer (38). Lo cual concuerda con Kamphorts et al (41), menciona que durante las infecciones crónicas y el cáncer, las células T pierden progresivamente la función y se agotan. Sin embargo, las respuestas efectivas de las células T son necesarias para controlar las infecciones virales y los tumores (41).

Además, varios estudios recientes han demostrado que hay un cambio en las expresiones de los subconjuntos de linfocitos T en el microambiente inmune de los pacientes con cáncer gástrico. Los linfocitos T no solo reflejan el estado del microambiente del tumor, sino que también se relacionan estrechamente con el pronóstico del paciente (67).

Asimismo, muchos estudios informan un beneficio de supervivencia asociado con la presencia de TIL(38). Esto sugiere que los TIL son efectivos para retrasar la progresión del tumor, a pesar de ser antagonizados por la pérdida de antígenos tumorales, la secreción de citocinas inhibitorias o la regulación negativa de las principales moléculas del complejo de histocompatibilidad (38).

Adicionando que en éste estudio donde la mayor parte de muestras se encontraron en estadios avanzados, confirma, que los estadios avanzados del TNM

pueden afectar el progreso y el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico (65). Así mismo, como menciona Xu et al (69), los linfocitos T no solo reflejan el estado del microambiente del tumor, sino que también se relacionan estrechamente con el pronóstico de los pacientes.

## 14. CONCLUSIÓN

En conclusión, los agentes infecciosos como el VPH desempeñan un papel causal en diversas neoplasias malignas humanas, a la fecha no hay estudios que se enfoquen en el papel del VPH en cáncer gástrico en México; sin embargo, en el presente estudio no se pudo confirmar la presencia del genoma del VPH en esta población. Se han realizado pocos estudios sobre este tema a nivel mundial y los resultados existentes no son concluyentes. Además, la asociación entre el VPH y el cáncer gástrico no se puede confirmar con los resultados actuales y se requieren investigaciones adicionales.

Por los resultados obtenidos en este estudio, con relación a las subpoblaciones de linfocitos T, concluimos que, en los pacientes con cáncer gástrico, estadios avanzados, la respuesta inmunológica se encuentra muy deteriorada con expresiones de las subpoblaciones de Linfocitos T muy bajas e inactivas (expresión del CD8 en el citoplasma). El control del desarrollo final del tumor depende de la interacción del sistema inmunológico y las células tumorales, por tal motivo, se deben explorar estrategias inmunológicas que proporcionen células T funcionales, ya que, son necesarias para la activación de la respuesta inmunológica, tanto celular, como humoral para controlar tanto las infecciones virales y el desarrollo tumoral.

## **CAPÍTULO 4**

### **15. PERSPECTIVA**

Se propone, que es necesario realizar este estudio con una población mayor de pacientes de ambos sexos, tipo de cáncer y de todas las edades, incluyendo todos los estadios de malignidad, para verificar, desde que momento las células tumorales, han desarrollado un mecanismo de evasión inmunológica y ver si, se puede contrarrestar. Al mismo tiempo, se podrá verificar si fueron infectados con el VPH en algún estadio temprano.

## 16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
2. Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. *Lancet*. 2016;388(10060):2654–64.
3. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Gastroenterol Rev*. 2019;14(1):26–38.
4. Cândido ACL, de Lima Filho JL, Martins DBG, Mendes CM, Vieira JRC, Ferraz AAB. Association of human papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction in gastric carcinomas in Brazil. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. 2013;35(1):1–6.
5. National Cancer Institute. Stomach (Gastric) Cancer Prevention. 2017. p. <https://www.cancer.gov>.
6. Fakhraei F, Haghshenas MR, Hosseini V, Rafiei A, Naghshvar F, Alizadeh-Navaei R. Detection of human papillomavirus DNA in gastric carcinoma specimens in a high-risk region of Iran. *Biomed Reports*. 2016;5(3):371–5.
7. Lee JS, Won HS, Sun DS, Hong JH, Ko YH. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(32):1–8.
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
9. Santos E. Current approaches to gastric cancer in Peru and Mexico. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(5):55–55.
10. Delgado N, Casas J, Torres J. Factores de riesgo asociados a adenocarcinoma gástrico de patrones histológicos de tipo intestinal y difuso en población adulta del occidente de México. *Gac Med Mex*. 2017;153:173–8.
11. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):251–61.

12. Correa P, Potter A, Professor W. Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. *Rev Colomb Cir.* 2011;26:111–7.
13. Petrovchich I, Ford JM. Genetic predisposition to gastric cancer. *Semin Oncol.* 2016;43(5):554–9.
14. Rodríguez-Vargas B, Arévalo-Suarez F, Monge-Salgado E, Montes-Teves P. Características hitopatológicas y endoscópicas del cáncer gástrico diagnosticado en un hospital nacional del Callao, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2013;30:12–7.
15. Estadificación del cáncer - National Cancer Institute. p. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico->
16. Secretaria de Salud. Diagnóstico y Tratamiento Adenocarcinoma Gástrico en Pacientes Adultos, México. 2010;
17. Milasiene V, Stratilatovas E, Norkiene V. The importance of T-lymphocyte subsets on overall survival of colorectal and gastric cancer patients. *Medicina (Kaunas).* 2007;43(7):548–54.
18. Yusefi AR, Bagheri Lankarani K, Bastani P, Radinmanesh M, Kavosi Z. Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(3):591–603.
19. Balakrishnan M, George R, Sharma A, Graham DY, Malaty HM. An Investigation into the Recent Increase in Gastric Cancer in the USA. *Dig Dis Sci.* 2018;63(6):1613–9.
20. Yang F, Kuai J, Li G, Fang X-J, Gao B-Q. In vitro-activated tumor-specific T lymphocytes prolong the survival of patients with advanced gastric cancer: a retrospective cohort study. *Onco Targets Ther.* 2016;3763.
21. Liu K, Yang K, Wu B, Chen H, Chen X, Chen X, et al. Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated With Prognosis of Gastric Cancer. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(39):1631.
22. Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. [General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53 Suppl 2(244):S166-71.

23. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol.* 2017;28(10):2386–98.
24. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30:55–70.
25. Olga L. Rincón, Pareja R. L., Jaramillo SABH. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical : una relación compleja. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2007;58(3):202–12.
26. Zeng Z, Luo F, Zou L, He R, Pan D, Chen X, et al. Human papillomavirus as a potential risk factor for gastric cancer: a meta-analysis of 1,917 cases. *Onco Targets Ther.* 2016;9:7105–14.
27. Flores-Miramontes MG, Torres-Reyes LA, Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Piña-Sánchez P, Cortés-Gutiérrez E, et al. Prevalencia de genotipos de VPH en México y en el mundo detectados mediante Linear Array. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53(33):S122–30.
28. Institute NC. HPV and Cáncer. 2015. p. <https://www.cancer.gov>.
29. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9–22.
30. Santana-Davila R, Bhatia S, Chow LQM. Harnessing the Immune System as a Therapeutic Tool in Virus-Associated Cancers. *JAMA Oncol.* 2017;3(1):106–12.
31. Türkay DÖ, Vural Ç, Sayan M, Gürbüz Y. Detection of human papillomavirus in esophageal and gastroesophageal junction tumors: A retrospective study by real-time polymerase chain reaction in an institutional experience from Turkey and review of literature. *Pathol - Res Pract.* 2016;212(2):77–82.
32. Snietura M, Waniczek D, Piglowski W, Kopec A, Nowakowska-Zajdel E, Lorenc Z, et al. Potential role of human papilloma virus in the pathogenesis of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(21):6632–7.
33. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;47:2–13.
34. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Euro Surveill.* 2013;18(4):20382.

35. Candeias SM, Gaipil US. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016;16(1):101–7.
36. Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res.* 2013;62(9):823–34.
37. Procaccio L, Schirripa M, Fassan M, Vecchione L, Bergamo F, Prete AA, et al. Immunotherapy in Gastrointestinal Cancers. *Biomed Res Int.* 2017;8(3):474–84.
38. Gooden MJM, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2011;105(1):93–103.
39. Zhang R, Li F, Li H, Yu J, Ren X. The clinical significance of memory T cells and its subsets in gastric cancer. *Clin Transl Oncol.* 2014;16(3):257–65.
40. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(4):689–713.
41. Kamphorst AO, Ahmed R. CD4 T-cell immunotherapy for chronic viral infections and cancer. *Immunotherapy.* 2013;5(9):975–87.
42. Rosendahl Huber S, van Beek J, de Jonge J, Luytjes W, van Baarle D. T Cell Responses to Viral Infections Opportunities for Peptide Vaccination. *Front Immunol.* 2014;5.
43. Matsueda S, Graham DY. Immunotherapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(7):1657–66.
44. Sant AJ, McMichael A. Revealing the role of CD4 + T cells in viral immunity: Figure 1. *J Exp Med.* 2012;209(8):1391–5.
45. Steinbach A, Riemer AB. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *Int J cancer.* 2018;142(2):224–9.
46. Zhang J, Burn C, Young K, Wilson M, Ly K, Budhwani M, et al. Microparticles produced by human papillomavirus type 16 E7-expressing cells impair antigen presenting cell function and the cytotoxic T cell response. *Sci Rep.* 2018;8(1):2373.

47. Matsueda S, Graham DY. Immunotherapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(7):1657–66.
48. Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res.* 2017;231:21–33.
49. Beltrão M, Wanderley MSO, de Santana NA, Brunaska D, de Lima Filho JL. Site of infections associated with human papillomavirus. *Arch Gynecol Obstet.* 2015;291(3):481–91.
50. Tashiro H, Brenner MK. Immunotherapy against cancer-related viruses. *Cell Res.* 2017;27(1):59–73.
51. Ding G-C, Ren J-L, Chang F-B, Li J-L, Yuan L, Song X, et al. Human papillomavirus DNA and P16(INK4A) expression in concurrent esophageal and gastric cardia cancers. *World J Gastroenterol.* 2010;16(46):5901–6.
52. Ma T-Y, Liu W-K, Chu Y-L, Jiang X-Y, An Y, Zhang M-P, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of gastric carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19(12):1090–6.
53. Omrani-Navai V, Alizadeh-Navaei R, Yahyapour Y, Hedayatizadeh-Omran A, Abediankenari S, Janbabaei G, et al. Human papillomavirus and gastrointestinal cancer in Iranian population: A systematic review and meta-analysis. *Casp J Intern Med.* 2017;8(2):67–75.
54. Kim H-I, Kim H, Cho HW, Kim SY, Song KJ, Hyung WJ, et al. The ratio of intra-tumoral regulatory T cells (Foxp3+)/helper T cells (CD4+) is a prognostic factor and associated with recurrence pattern in gastric cardia cancer. *J Surg Oncol.* 2011;104(7):728–33.
55. Szczepanik AM, Siedlar M, Sierzega M, Goroszeniuk D, Bukowska-Strakova K, Czupryna A, et al. T-regulatory lymphocytes in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2011;17(3):343–8.
56. Zhang J, Burn C, Young K, Wilson M, Ly K, Budhwani M, et al. Microparticles produced by human papillomavirus type 16 E7-expressing cells impair antigen presenting cell function and the cytotoxic T cell response. *Sci Rep.*

- 2018;8(1):2373.
57. Oguejiofor K, Hall J, Slater C, Betts G, Hall G, Slevin N, et al. Stromal infiltration of CD8 T cells is associated with improved clinical outcome in HPV-positive oropharyngeal squamous carcinoma. *Br J Cancer*. 2015;113(6):886–93.
  58. Souza CRT de, Almeida MCA, Khayat AS, Silva EL da, Soares PC, Chaves LC, et al. Association between *Helicobacter pylori*, Epstein-Barr virus, human papillomavirus and gastric adenocarcinomas. *World J Gastroenterol*. 2018;24(43):4928–38.
  59. Diaz Orea MA, Muñoz Perez V, Gómez Conde E, Castellanos Sánchez VO, Gonzalez Lopez R, Flores Alonso JC, et al. Expression of Cytokines Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-10 and Transforming Growth Factor  $\beta$  in Gastric Adenocarcinoma Biopsies Obtained from Mexican Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(2):577–82.
  60. Yu PC, Long D, Liao CC, Zhang S. Association between density of tumor-infiltrating lymphocytes and prognoses of patients with gastric cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(27).
  61. Rosal C, Souza T De, Carolini M, Almeida A, Khayat AS, Lucena E, et al. Association between *Helicobacter pylori*, Epstein-Barr virus, human papillomavirus and gastric adenocarcinomas. 2018;24(43):4928–38.
  62. Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian J Med Res*. 2009;130(3):222–33.
  63. Koshiol J, Wei WQ, Kreimer AR, Ren JS, Gravitt P, Chen W, et al. The gastric cardia is not a target for human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(4):1137–9.
  64. Kamangar F, Qiao Y-L, Schiller JT, Dawsey SM, Fears T, Sun X-D, et al. Human papillomavirus serology and the risk of esophageal and gastric cancers: Results from a cohort in a high-risk region in China. *Int J Cancer*. 2006;119(3):579–84.
  65. Wei M, Shen D, Mulmi Shrestha S, Liu J, Zhang J, Yin Y. The Progress of T Cell Immunity Related to Prognosis in Gastric Cancer. *Biomed Res Int*. 2018;1–6.

66. Tribunal Internacional de Nüremberg. Universidad de Navarra Centro de Documentación de Bioética. El "Código" Nüremb. 2007;5-6.
67. WMA General Assembly. Declaración de Helsinki: recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica en seres humanos. Boletín la Of Sanit Panam. 1990;108(5-6):626--9.
68. Espinoza L. Las herramientas moleculares. Vol. 71. 2005. 517-39 p.
69. Xu RH, Wu J, Chen M, Zou X, Liu SL. Clinical research progress of cell immunity in gastric cancer. 2019 23;41(5):321-325

## ANEXOS

### Anexo 1. Clasificación o escalas de la Enfermedad

Estadificación TNM del American Joint Committee on Cancer

Clasificación para Carcinoma de Estómago

Tumor primario (T)

TX	No puede determinarse tumor primario
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión a la lámina propia
T1	El tumor invade lámina propia o submucosa
T2	El tumor invade muscular propia o subserosa †
T2a	El tumor invade muscular propia
T2b	El tumor invade subserosa
T3	El tumor penetra serosa (peritoneo visceral) sin invasión a estructuras adyacentes
T4	El tumor invade estructuras adyacentes (bazo, colon transverso, hígado, diafragma, páncreas, pared abdominal, glándula adrenal, riñón, intestino delgado y retroperitoneo. La extensión intramural a duodeno o esófago se clasifica por la profundidad de invasión mayor a alguno de esos sitios, incluyendo el estómago).

Ganglios linfáticos regionales (N)

NX	No pueden determinarse ganglios regionales
N0	No hay metástasis linfáticas regionales
N1	Metástasis en 1 a 6 ganglios linfáticos regionales
N2	Metástasis en 7 a 15 ganglios linfáticos regionales
N3	Metástasis en más de 15 ganglios linfáticos regionales

Metástasis a distancia (M)

MX	No pueden determinarse metástasis a distancia
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Grado histológico (G)

GX	No puede determinarse el grado
G1	Bien diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Poco diferenciado
G4	Indiferenciado

## Agrupamiento por etapas

Etapa 0	Tis	N0	M0
Etapa IA	T1	N0	M0
Etapa IB	T1	N1	M0
Etapa II	T2a/b	N0	M0
	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
	T3	N0	M0
Etapa III A	T2a/b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Etapa III B	T3	N2	M0
Etapa IV	T4	N1-3	M0
	T13	N3	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1

Diagnóstico y Tratamiento Adenocarcinoma Gástrico en Pacientes Adultos, México Secretaria de Salud; 2010 (16).

## Anexo 2. Variables y escalas de medición

- Variable dependiente:

Biopsias de pacientes con cáncer gástrico; estadios III y IV.

- Variable independiente:

Expresión de genotipos de VPH.

Poblaciones de linfocitos T.

**Tabla de variables**

Variable	Tipo de variable	Escala de medición	Valor	Instrumento
VPH	Cualitativa	Nominal	Tipo de VPH	Técnica PCR
Linfocitos T	Cualitativa	Nominal	Cd4+ Cd8+	Técnica IFI

Variables descriptivas				
Variable	Tipo de variable	Escala de medición	Valor	Instrumento
Estadio clínico	Cualitativa	Ordinal	Tipo I,II,III Y IV	Reporte histopatológico

Variables demográficas				
Variable	Tipo de variable	Escala de medición	Valor	Instrumento
<b>Edad</b>	Cuantitativa	Continua	Años	Expediente clínico
<b>Género</b>	Cualitativa	Nominal dicotómica	Mujer Hombre	Expediente clínico

### Anexo 3. Definiciones conceptuales

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL
VPH	Grupo de más de 200 virus relacionados pertenecientes a la familia de los <i>Papillomaviridae</i> .
Subpoblaciones de linfocitos t Cáncer gástrico/estadio	Células de la inmunidad celular.  Tipo I para el tumor con crecimiento sobresaliente, Tipo II con crecimiento superficial, Tipo III con crecimiento de excavación y Tipo IV para crecimiento infiltrante con extensión lateral.
Edad	Tiempo transcurrido entre la fecha de nacimiento y la fecha actual.
Genero	Características fenotípicas que diferencian al hombre de la mujer.

## Anexo 4. Definiciones operacionales

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>
VPH	El tipo de VPH será evaluado mediante técnica de PCR.
Subpoblaciones de linfocitos t	Linfocitos T presentes en tejido.
Cáncer gástrico/estadio	El estadio de las muestras será tomado de los datos histopatológicos.
Edad	Expediente clínico
Sexo	Expediente clínico

## Anexo 5. Bioética

Los procedimientos fueron sometidos a revisión y aprobación por los Comités de investigación y bioética institucionales. Se registró el proyecto de investigación y se le asignó el número 566 en la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

Se siguieron los lineamientos estipulados en:

- Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud.
- Principios básicos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Entre las incorporaciones más relevantes de la última revisión pueden destacarse las siguientes: 1) el aumento de las exigencias para investigaciones hechas sin consentimiento informado, que deben ser la excepción; 2) el deber de declarar los conflictos de interés; 3) el refuerzo del derecho de los participantes en una investigación a disponer del mejor tratamiento disponible probado, incluso si es un integrante del grupo control, de manera que el uso de placebo debe limitarse a los casos en que no haya ningún tratamiento disponible para la situación que se va a investigar; y 4) el deber de publicar tanto los resultados negativos como los positivos, o de lo contrario asegurar su disponibilidad pública, así como citar la fuente de financiación, afiliaciones institucionales y cualquier posible conflicto de intereses (66)(67).
- El Informe Belmont identifica tres principios éticos básicos: respeto por las personas o autonomía, beneficencia y justicia.
- Decreto de la comisión Nacional de Bioética (CNB)
- Principios éticos aplicados a la Epidemiología
- Guía nacional para la integración de funcionamiento de los comités de Ética en la Investigación.

Descripción de las técnicas de medición de las variables relevantes.

## **Anexo 6. Determinación de linfocitos T**

### **Inmunofluorescencia Indirecta**

#### **Obtención de cortes.**

De cada bloque de parafina, se obtuvieron cortes de 4µm sobre laminillas cubiertas con poli-L-lisina al 1%.

#### **Preparación de laminillas con poli-L-lisina al 1% para que el tejido se una a la laminilla.**

1. Se colocaron las laminillas con alcohol ácido\* durante 5 minutos y se dejaron secar.
2. Se colocaron las laminillas con Poly-l-lisina durante 5 minutos.
3. Se secaron las laminillas en la estufa durante una hora a 60°C.

\*Preparación de alcohol ácido (100 ml).

- 70 ml etanol al 70%.

- 30 ml de agua desionizada

- ácido clorhídrico al 1%

#### **Determinación se subpoblaciones de linfocitos T.**

### **Inmunofluorescencia indirecta**

1. Se desparafinaron las muestras a trabajar en estufa bacteriológica a 60 °C por una hora.
2. Se colocó la sección de tejido en xilol
  - Xilol 1 por 5 minutos
  - Xilol 2 por 5 minutos

3. Se rehidrató la sección de tejido en una serie de 100%, 100%, 96%, 80% y 70% de gradientes de etanol por 5 minutos cada uno.
4. Se realizaron 3 lavados en Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x por 5 minutos y se desechó el sobrenadante después de cada baño.

\*Preparación de Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (10X) (PBS) (500 ml)

- 40 g de cloruro de sodio

- 1 g de cloruro de potasio

- 1 g de fosfato de potasio monofásico

- 5.75 g de fosfato de sodio difásico

- 500 ml de agua desionizada

5. Activación de tejido: se aplicó 25  $\mu$ l de tripsina en la laminilla previo secado alrededor del tejido, y quedó cubierto el tejido. Se colocó en cámara húmeda (para la preparación de la cámara húmeda se colocó papel filtro y se agregó agua destilada o agua desionizada) durante 30 minutos a 37 °C.
6. Se realizaron 3 lavados en PBS 1x por 5 minutos.
7. Se aplicó el anticuerpo monoclonal (anti-CD8), se cubrieron las preparaciones y se mantuvieron en cámara húmeda durante 24 horas.
8. Se realizaron 3 lavados en PBS 1x por 5 minutos.
9. Al día siguiente, se aplicó el segundo anticuerpo, anti-IgG de ratón, acoplado a fluoresceína, con el que se cubrieron las preparaciones por 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
10. Se realizaron 3 lavados en PBS 1x por 5 minutos.
11. Se montó el tejido con un cubreobjetos y se selló con barniz.

En el caso de la aplicación del anti-CD4(IFD) la única excepción fue la aplicación del anticuerpo secundario, siguiendo con los lavados y el montaje de la muestra.

## Anexo 7. Determinación de VPH

Protocolo para extracción de ADN en tejidos embebidos en parafina, por KIT de extracción High Pure PCR Template Preparation (ROCHE).

### Desparafinación

Los pasos describen el procedimiento para la desparafinación de un máximo de 10  $\mu\text{m}$  de grosor de la sección de tejido fijada en formalina, embebida en parafina en un tubo de reacción de 1.5 ml.

1. A una sección máxima de 10  $\mu\text{m}$  en un tubo de reacción de 1.5 ml, se agregó 800  $\mu\text{l}$  de xilol, se incubó durante 5 minutos, y vortexeó brevemente en varios intervalos.
2. Se agregaron 400  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y vortexeó poco tiempo. Se centrifugó por 2 minutos a una velocidad máxima (16000 x g) y decantó el sobrenadante, teniendo cuidado de no eliminar la pastilla.
3. Se agregó 1 ml de etanol absoluto y vortexeó brevemente. Se centrifugó por 2 minutos a una máxima velocidad (16000 x g) y decantó el sobrenadante, teniendo cuidado de no eliminar la pastilla.
4. Se secó el tubo con una toalla de papel para deshacerse del etanol. Se secó la pastilla de tejido durante 10-20 minutos a +56 °C (tubo abierto).

### Extracción de ADN

Los siguientes pasos describen la extracción de ADN por un máximo de 10  $\mu\text{m}$  de grosor de la sección fijada en formalina, embebida en parafina.

1. A la pastilla de tejido se agregaron 180  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis de tejido y 70  $\mu\text{l}$  de proteinasa K, se vortexeó por 30 segundos, se giró hacia abajo poco tiempo y se incubó 60 minutos a +56 a una velocidad de 600 rpm. (\*el lisado se veía claro, si las partículas aun eran visibles se extendía el tiempo de incubación por una hora).
2. Se incubó por 60 minutos a +90 °C con una velocidad de 600 rpm. Se dejó secar de +15 a 25 °C. y giró hacia abajo poco tiempo.
3. Se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de Binding Buffer, se mezcló por pipeteo hacia arriba y hacia abajo 3 veces para obtener una solución homogénea (se incubó 10 min. de +15 °C a 25 °C).

4. Se adicionaron 100  $\mu$ l de isopropanol y mezcló por pipeteo hacia arriba y hacia abajo 3 veces.
5. Se preparó una columna con filtro dentro de un tubo de recolección. Se pipeteo el lisado dentro del tubo (volumen aproximado de 550  $\mu$ l y centrifugó a 8 000 rpm por 1 min.
6. Se desechó el tubo de colección por uno nuevo, ensambló el tubo de filtro con un nuevo tubo de recolección.
7. Se adicionaron a la columna 500  $\mu$ l de Wash Buffer I, se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min, se desechó el tubo de colección y se ensambló el tubo de filtro con un nuevo tubo de recolección.
8. Se agregaron 500  $\mu$ l de Wash Buffer II, se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min, se desecho el tubo de colección, se ensambló el tubo de filtro con un nuevo tubo de recolección.
9. Se agregó 500  $\mu$ l de Wash Buffer II, se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min, se desechó el tubo de colección, se ensambló el tubo de filtro con un nuevo tubo de recolección y se centrifugó durante 1 minuto a 16 000 rpm.
10. Usando un tubo nuevo previamente rotulado se agregó 25-50  $\mu$ L de Elution Buffer e incubó 5 minutos +15 °C a +25 °C. Se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min 7 seg.
11. Se midió la concentración en el nanofotómetro, para cuantificar la extracción de material genético se realizaron mediciones espectrofotométricas con proporciones 260/280 y 260/230 para la determinación de pureza.
12. Se conservó la muestra a -20°C.

### **Amplificación**

Para verificar la calidad y excluir las muestras con ADN no amplificable, todas las muestras fueron analizadas con un control interno mediante PCR con iniciadores para el gen  $\beta$ -globina, se utilizaron los primers GH20 and PCO4 (primers GH20 forward 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3', PCO4 reverse 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC -3') por 35 ciclos (94°C por 30 s, 55°C por 45s, 72°C por 45 s). La separación de los

fragmentos de ADN resultantes de la amplificación se identificó por la presencia del control interno  $\beta$ -globina, aquellas que fueron negativas se realizó una nueva extracción.

Análisis de los productos de amplificación

Para detectar la presencia de ADN viral se realizó PCR con los primers MY09 y MY11. Aquellas muestras que amplificaron se descartaron como negativas para este procedimiento. Para rectificar nuestra muestra se realizó PCR con los primers GP6+ y GP5+.

Secuencia del primer GP6+ y GP5+ (6)

Primer	Sequence (5' to 3')
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
GP6+	GAAAATAAACTGTAAATCATATT

### Visualización de PCR

Los fragmentos obtenidos en el PCR se analizaron con electroforesis en gel de agarosa al 2%, que permite separar estos fragmentos de acuerdo al tamaño de cada uno.

La agarosa forma una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, en la cual pasan los fragmentos de ADN, "jalándolos" a través de corriente eléctrica, hacia el polo positivo, ya que la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato (P<sup>-</sup>). Los fragmentos más pequeños pasarán primero a través de la red de agujeros, mientras que los más grandes se irán retrasando y atorando en los hoyos; de esta manera los fragmentos de tamaños similares migrarán a ritmos similares. Si hay muchos fragmentos de un mismo tamaño se agruparán todos juntos, por lo que podremos verlos formando lo que llamamos una banda en el gel.

En el laboratorio se utiliza una cámara de electroforesis, una fuente de poder, un transiluminador de luz UV y equipo de fotografía para guardar la imagen del gel.

Para empezar, se prepara el buffer de corrida, el cual tendrá el pH requerido y los iones necesarios para que fluya la corriente y pueda migrar el ADN, se utiliza el buffer TAE (Tris Acetatos EDTA)

## **Gel de agarosa**

Dependiendo del tamaño de los fragmentos que esperamos se utiliza una concentración de agarosa mayor o menor para obtener agujeros menos o más grandes y una mejor resolución de nuestras bandas, utilizamos una concentración al 2%. La agarosa se disolvió en el mismo buffer que utilizamos para la corrida, y se calienta hasta ebullición para disolver bien el polvo. Teniendo cuidado de retirarla del calor o del microondas en cuanto comienza a hervir, pues podría derramarse. La solución se agitó suavemente para evitar la formación de burbujas, y cuando se enfría un poco (aprox. 60°C) se vierte de una sola vez en el contenedor de geles al que ya le colocamos el peine para que se formen los pozos en donde se cargan las muestras.

Cuando se enfrió y solidificó se agregó el buffer necesario hasta cubrir el gel y después se retiró el peine con cuidado para no romper el fondo de los pozos.

### **Cargando el gel**

Con una pipeta, cada muestra se vierte en un pozo, mezclada previamente con 1 microlitro de colorante de corrida. Generalmente los colorantes de corrida llevan alguna sustancia espesa, como glicerol o sacarosa, que permite que la muestra caiga hacia el fondo del pozo, y los colorantes (como el xilen-cianol o azul de bromofenol) nos dan una idea de cómo van migrando los fragmentos (en un gel de agarosa al 1%, el azul de bromofenol migra junto con los fragmentos de 300 pb, y el xilen-cianol migra igual que los fragmentos de 4 kb). Y se cargó con 10 microlitros de muestra.

En un parafilm se depositan unas gotitas de colorante (las necesarias para el número de muestras que usemos) y después agregamos la gotita de la muestra a cargar sobre la gota de colorante. La punta de la pipeta se mete un poco en el pozo y lentamente se vacía la pipeta para cargar el gel. Un carril del gel siempre tiene un marcador de peso molecular como control para saber el tamaño de las bandas que tendremos. También se pone en el gel los controles negativo y positivo. Cuando el gel está listo se conectan los cables, lo más común es un cable rojo para conectarlo al polo positivo y uno negro en el negativo.

## Tinción del gel

Se utilizó bromuro de etidio, que es una molécula con dos propiedades importantes: se intercala en las bases del ADN y brilla con luz UV a una longitud de onda determinada (264-366 nm) con lo cual podemos observar las bandas de ADN en el gel. El bromuro de etidio es un mutágeno y es altamente tóxico, por lo cual se usan guantes y bata para su manejo. Al terminar se pone el gel en el transiluminador para verlo. (68)

## Microarreglos

Para el proceso de tipificación de las muestras con resultado positivos a VPH (utilizando los primer PGMY09/11). En esta investigación no fue necesario utilizar el kit de microarreglo HPV 3.5 (Chipron®), el cual brinda la posibilidad de identificar 32 tipos de papilomavirus humano, el fabricante clasifica como:

Grupo	Característica	Tipos de VPH
1	Tipos carcinogénicos para humanos	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
2 <sup>a</sup>	Probablemente cancerígenos para humanos	68
2B	Posiblemente cancerígenos para humanos	53, 66, 67, 70, 73, 82.
3	Tipos no clasificados como cancerígenos	6 y 11
No clasificados	Tipos no clasificados por IARC, OMS. 2011.	42, 44, 54, 61, 62, 72, 81, 83, 84, 90 y 91.

## Anexo 8. Hoja de control de las muestras incluidas en parafina

Folio		
Hay suficiente tejido en el bloque de parafina	SI	NO
Las laminillas cuentan con material representativo de la lesión	SI	NO
Las laminillas se encuentra rotas	SI	NO
Hay presencia de linfocitos en el tumor	SI	NO