

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DEL CÁNCER
DE CUELLO UTERINO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR
VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV)

MORELVA TORO DE MÉNDEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 11 de Setembre de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Juan García de Lomas Barrionuevo
- D^a. Belén Lloveras Rubio
- D. José Antonio López Guerrero
- D. Antonio Ferrández Izquierdo

Va ser dirigida per:

D. Antonio Llombart Bosch

©Copyright: Servei de Publicacions
Morelva Toro de Méndez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6635-6

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Patología

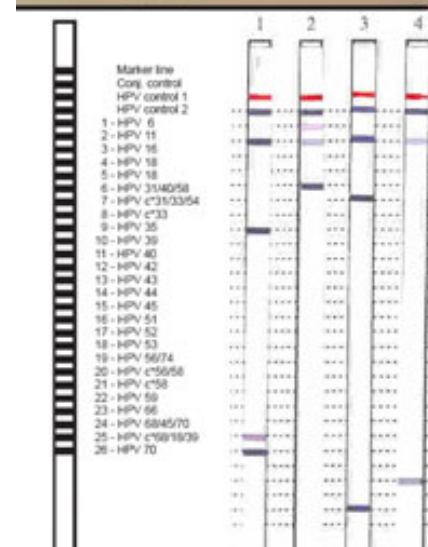
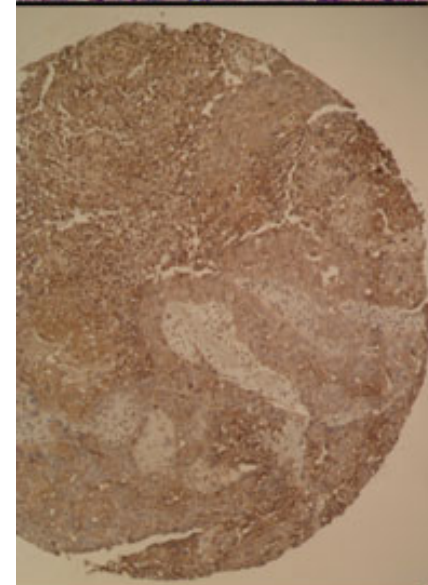
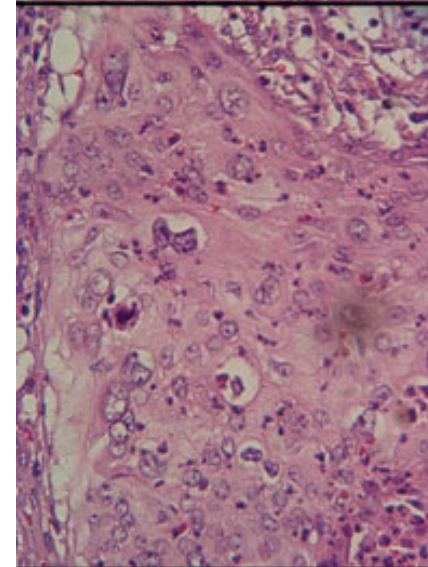
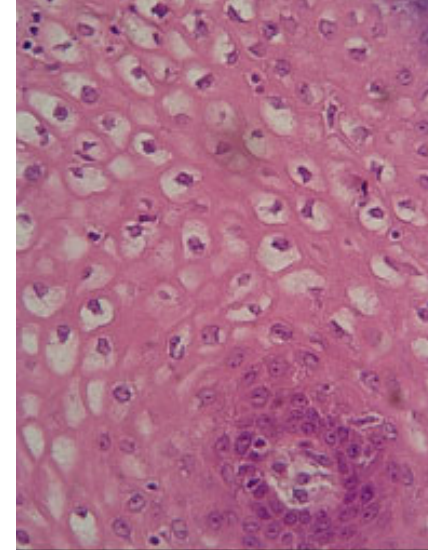
*Caracterización inmunofenotípica
del cáncer de cuello uterino
asociado a infección por
Virus Papiloma Humano (HPV).*

Presentada por:
Morelva Toro de Méndez.

Dirigida por el profesor:
Dr.D. Antonio Lombart-Bosch.

Valencia-España, 2006

TESIS DOCTORAL



AGRADECIMIENTOS.

*“Cuales quiera que hayan sido nuestros logros,
alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos”
Althea Gibson.*

El agradecimiento más que reconocer la calidad humana de los que nos rodean, es un sentimiento lleno de satisfacción porque indica que siempre hubo a nuestro alrededor las personas que fueron el empuje que necesitamos, día a día, para lograr lo que nos hemos propuesto...

por ello quiero expresar mi sentimiento de gratitud infinita hacia:

El profesor Dr. D. Antonio Llobart Bosch, en primer lugar por abrirme las puertas de este departamento, poniendo a mi disposición todos los recursos y sus sabios conocimientos, necesarios para que el proceso de formación caminase por el sendero de la calidad y excelencia como director del presente trabajo de tesis doctoral y en un segundo no menos importante lugar, por la confianza depositada al considerar mi deseo de trabajar en el apasionante mundo del estudio de la patología del cuello uterino.

La ilustre Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, por el apoyo institucional y financiero que ha permitido el desarrollo de mi formación doctoral; muy especialmente al personal que labora en la Oficina de Asuntos Profesorales (OAP), por la consideración y buen hacer en pro del bienestar y la seguridad de sus becarios.

Mis amigos y compañeros, de allá y de aquí...

Coromoto Herrera Labrador, entrañable amiga, nunca me imaginé que las circunstancias de la vida nos llevaría a fortalecer los lazos de esta hermosa amistad. Mi respeto y sentimiento fraternal, incondicionalmente, estarán contigo siempre.

Mercedes López de Sánchez y Morella Guillén Ferraro, compañeras de trabajo y amigas que me han concedido desinteresadamente su apoyo amistoso y solidaridad inestimable para el logro de esta meta maravillosa. Mil gracias.

Norys y Judith, por su amistad reflejada constantemente en cada palabra de aliento, cariño y amistad, a pesar del tiempo y la distancia.

Amparo Ruiz Saurí y Manuel Enciso Ripoll. Dios pone en nuestro camino amigos sinceros para ayudar a levantarnos cuando tropezamos. Ocuparán siempre un lugar especial en mi corazón...

María Jesús, Jaime y Silvia por saber escucharme, apoyarme y sobretodo por los momentos compartidos de alegrías y risas, que fueron un bálsamo para aquellos llenos de tristeza y desesperación...

José A. López, por su excelente calidad humana y sobretodo por su profesionalidad enmarcada en caballerosidad e inagotable paciencia.

Personal del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia:

El personal docente y médicos especialistas del Departamento de Patología, profesores Samuel Navarro, Carlos Monteagudo, David Ramos, Miguel Cerdá, Pilar Soriano, Jaime Ferrer, Amando Peydró, Antonio Pellín, Carmen Carda, Miguel Pérez, Rosa Noguera, , Concha López, Rosario Gil, Mariela Gregori, Robert Calahan y Javier Boix. A todos, un mensaje de respeto y agradecimiento

por ofrecerme sus conocimientos, una sonrisa, una palabra de apoyo y solidaridad. Muy especialmente deseo extender mi agradecimiento al profesor Antonio Ferrández Izquierdo porque además de ser un amigo incondicional, me ha entregado con humildad sus más preciados conocimientos en el área de Citopatología y Anatomía Patológica, en un ambiente lleno de cordialidad, caballerosidad y respeto. Mil gracias a todos.

El grupo de Residentes de Anatomía Patológica, de quienes he aprendido también cada día, a Empar, Miguel, Ana, Liria y Carmen; muy especialmente a Diego y Andrés, porque fueron excelentes compañeros durante los primeros meses de mi estancia en este departamento.

El personal de Técnicos de Laboratorios: Pilar, José Ballester, Richart, María José, José García, Augusto, Mamen, Elena, Carmen, Alejo, Laura, Cristina, Ángeles, Marta, Estela, Elisa, y al personal Administrativo y de Limpieza: María Ángeles, Evelyn, Alicia, Javier, Concha y a la siempre ocurrente Lola, por su buen hacer, calidad profesional y humana, por hacerme sentir en todo momento entre amigos y como en casa. Muy especialmente a Yolanda, Ana y Merche, por ser excelentes profesionales y compañeras, pero también por afanarse en darme un consejo oportuno, cariñoso y solidario, en todo momento. A todos simplemente gracias.

José Benaven por ofrecerme sus conocimientos en informática y su grata paciencia. No puedo dejar de agradecerles también a Sandra Ballester, Julia Cruz, María Dolores Sánchez, Beatriz Llombart, Rafa Benito y Coloma Marco, aunque hemos podido compartir solo poco tiempo, ha sido muy significativo para mí conocerles, recibir su cariño y amistad.

Este último lugar lo he querido apartar para manifestar mi amor y agradecimiento hacia mi gran familia, mis padres Simón y Blanca, mis hermanos Simón E, Ivan, Sandro y Simón A, a mi suegra Sra Félida y cuñados, porque desde la distancia, su corazón y bendiciones me han acompañado siempre, dándome la fortaleza y el ánimo que sólo el amor sincero puede conceder. Les quiero muchísimo...

A todas aquellas personas, que desde el anonimato, de una u otra forma participaron en el logro de esta meta.

A todos, Gracias.

A mi amado Luis

A mis adorados hijos Gerardo A, Luisana y Jorge L

A mi querido Simón Alberto

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACO	anticonceptivos orales
ASC-H	atypical squamous cell cannot exclude HSIL
ASCUS	atypical squamous cell of undetermined significance
Bax	BCL-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma2
BD	bien diferenciado
CDK	quinasas dependientes de ciclina
CDKI	inhibidores de kinasas dependientes de ciclina
CEA	antígeno carcinoembrionario
CIN	cervical intraepithelial neoplasia
CK	citoqueratinas
DAB	diaminobenzidina
E2F1	factor de transcripción de la vía proteica de retinoblastoma
EDTA	ácido etildiaminotetraacético
HPV	virus papiloma humano
HPVAR	virus papiloma humano de alto riesgo
HPVBR	virus papiloma humano de bajo riesgo
HSIL	squamous intraepithelial lesion
I	inmaduro
II	inmaduro e indiferenciado
LIBG	lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
LIE	lesión intraepitelial escamosa
LIEAG	lesión intraepitelial de alto grado
LiPA	<i>line probe assay</i>
LSIL	squamous intraepithelial lesion
MD	moderadamente diferenciado

MDM-2	murine double minute2
NIC	neoplasia intraepitelial cervical
NICAG	neoplasia intraepitelial cervical de alto grado
NICBG	neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado
p16INK4a	inhibidor de CDK
p21WAF	inhibidor de la CDK
p27CIP1	inhibidor de CDK
p53	producto del gen <i>TP53</i>
PBS	fosfato tampón salino
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pRb	producto del gen <i>Retinoblastoma</i>
SIL	squamous intraepithelial lesion

INDICE.

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1.- CÁNCER DE CUELLO UTERINO	7
1.1 Incidencia. Prevalencia	7
1.2 Definición	9
1.3 Etiología	10
1.4 Historia natural	10
1.5 Carcinogénesis cervical	12
1.5.1 Aporte del papilomavirus (HPV) en el inicio de la carcinogénesis cervical	13
1.5.1.1 Infección por HPV	15
1.5.1.2 Persistencia de HPV de alto riesgo oncogénico con integración del genoma viral	16
1.5.1.3 Inducción a la transformación neoplásica por HPV e inmortalización celular	20
1.6 Cofactores asociados a la infección por HPV y su colaboración en la transformación neoplásica	23
1.6.1 Cofactores exógenos	25
1.6.2 Cofactores virales	28
1.6.3 Cofactores del huésped	30
1.6.4 Otros cofactores	32
2.- VIRUS PAPILOMA HUMANO	33
2.1 Importancia de la infección por Virus Papiloma Humano (HPV)	33
2.2 Definición, nomenclatura y clasificación	33
2.3 Organización genómica	36
2.4 Transmisión y adquisición	38
2.5 Ciclo viral	38
2.6 Prevalencia	40
2.7 Diagnóstico	42
2.7.1. Clínica	42
2.7.2 Citológico	42
2.7.3 Histopatológico	43
2.7.4 Molecular	44
2.7.4.1 Métodos de detección del ADN-HPV	45
2.7.4.2 Métodos de genotipificación del ADN-HPV	47

2.7.4.3 utilidad clínica del diagnóstico molecular del HPV	49
3.- BIOMARCADORES TUMORALES EN EL CÁNCER CERVICAL	50
3.1 Proliferación celular en el cáncer cervical	50
3.1.1 El crecimiento celular descontrolado es característico de las neoplasias	50
3.1.2 Proliferación celular en el cáncer de cuello uterino	51
3.2 El ciclo celular en el cáncer cervical	52
3.2.1 Proteínas reguladoras del ciclo celular normal. Ciclinas, kinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de la actividad kinasa	53
3.2.1.1 Ciclinas	54
3.2.1.1.1 Ciclina D	55
3.2.1.1.2 Ciclina E	55
3.2.1.1.3 Ciclinas A/B	56
3.2.2 Kinasas dependientes de ciclinas (CDK)	56
3.2.3 Inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (CDKI)	57
3.2.3.1 p16INK4a	57
3.2.3.2 p21WAF/CIP1/SDI1	58
3.2.3.3 p27KIP1	59
3.2.4 Productos de los genes supresores de tumor	60
3.2.4.1 La proteína supresora de tumor pRb	61
3.2.4.2 La proteína supresora de tumor p53	62
3.2.5 Virus papiloma humano y el ciclo celular del cáncer de cuello uterino	64
3.2.5.1 HPV y proteínas supresoras de tumor	65
3.2.5.2 HPV y ciclinas, kinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de la actividad kinasa	68
3.3 Marcadores de la apoptosis en el cáncer cervical	74
3.3.1 Muerte celular programada	74
3.3.2 Apoptosis en el cáncer cervical	77
3.4 Degradación de proteínas en el cáncer cervical. Sistema ubiquitina-proteosoma	81
3.4.1 Proteólisis por la vía ubiquitina-proteosoma	81
3.4.2 Activación del sistema proteolítico ubiquitina-proteosoma por los papilomavirus oncogénicos durante la carcinogénesis del cuello uterino	83
3.5 Sistemas de adhesión celular en el cáncer cervical	87
3.5.1 Moléculas de adhesión celular	87
3.5.2 Adhesión celular y cáncer cervical	89
3.6 Actividad telomerasa en el cáncer cervical	92
3.6.1 La telomerasa en la inmortalización de las células tumorales	92
3.6.2 Actividad de la telomerasa en el cáncer cervical	94

3.7 Otros biomarcadores tumorales en el cáncer cervical	96
3.7.1 Antígeno carcinoembrionario (CEA)	96
3.7.2 Citoqueratinas (CK)	97
MATERIAL Y MÉTODOS	99
1. Material	99
1.1 Muestra	102
1.2 Grupo control	103
2. Métodos	104
2.1 Preparación del material	104
2.2 Estudio Histopatológico. Tinción de hematoxilina-eosina (HE)	105
2.3 Estudio inmunohistoquímico	105
2.3.1 Fundamento	110
2.3.2 Tecnología de los Tissue Microarrays o micromatrices tisulares	108
2.3.3 Protocolo para la construcción de las micromatrices tisulares. Pasos de la tinción inmunohistoquímica. Controles. Reactividad	119
2.4 Estudio Molecular	119
2.4.1 Protocolo para cortar bloques de parafina para extracción de ADN-HPV	119
2.4.2 Protocolo para el aislamiento de AD-HPV a partir de cortes de los cortes de tejidos fijados en formalina tamponada 10% y fijados en parafina	120
2.4.3 Protocolos para amplificación, detección y genotipificación de ADN-HPV	121
2.4.3.1 Determinación de la calidad del ADN extraído	121
2.4.3.2 Visualización del producto amplificado por PCR-INF150 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%	122
2.4.3.3 PCR para amplificación de secuencia de ADN-HPV con los cebadores SPF10	123
2.4.3.4 Visualización del producto amplificado por PCR -SPF10 mediante electroforesis en gel de azarosa al 3%	124
2.4.3.5 Hibridación reversa en tiras para genotipificación de ADN-HPV	125
2.4.3.5.1 Protocolo para hibridación reversa mediante LiPA	127
2.4.3.5.2 Desarrollo del color	128
2.4.3.5.3 Interpretación de los resultados	129
2.5 Análisis estadístico	130
RESULTADOS	133
1.- Generalidades	133
1.1. Sobre material de estudio	133
2.- Hallazgos clinicopatológicos de los casos y controles	135

2.1. Características clinicopatológicas de los casos y controles	135
2.1.1. Edad	135
2.1.2. Características histopatológicas	137
2.1.2.1 Tamaño tumoral	137
2.1.2.2 Diagnóstico histopatológico	138
3.- Hallazgos inmunohistoquímicos. Frecuencias. Análisis bivalente. Correlaciones	141
3.1 Actividad proliferativa. Expresión de Ki-67	144
3.2. Reguladores del ciclo celular	149
3.2.1 Ciclina D1	149
3.2.2 Proteína pRb	153
3.2.3 Proteína p16INK4a	158
3.2.4 Proteína p21WAF1	164
3.2.5 Proteína p27CIP1	169
3.2.6 Ciclina E	174
3.2.7 Proteína p53	178
3.3 Marcadores de apoptosis	183
3.3.1 Proteína MDM-2	183
3.3.2 Proteína Bax	189
3.3.3 Proteína Bcl-2	194
3.4 Expresión de las moléculas de adhesión celular	198
3.4.1 Cadherina-E	198
3.4.2 CD44s	205
3.4.3 CD44v3	211
3.5 Degradación de proteínas	219
3.5.1 Ubiquitina	219
3.6 Otros biomarcadores	224
3.6.1 Citoqueratinas (CK)	224
3.6.2 Antígeno carcinoembrionario (CEA)	229
3.7 Expresión de la Telomerasa	234
3.8 Reactividad inmunohistoquímica positiva correspondiente a los diferentes biomarcadores en los carcinomas epidermoides de diferentes grados de maduración	238
3.9 Reactividad inmunohistoquímica positiva correspondiente a los diferentes biomarcadores en los subtipos histológicos de adenocarcinoma cervical	241
3.10 Análisis de correlación	244
3.10.1 Representación gráfica de la correlación entre los biomarcadores	247
4.- Hallazgos en la detección y genotipificación de HPV	257
4.1 Infección por HPV: única y múltiple	259
4.2 Asociación de la inmunexpresión de biomarcadores en infección por HPV única y múltiple	267

DISCUSIÓN	267
1.- Generalidades	267
2.- En relación a los hallazgos clinicopatológicos	268
2.1 Edad	268
2.2 Diagnóstico histopatológico: tipos histológicos	270
2.3 Tamaño tumoral	271
3.- En relación a los hallazgos inmunohistoquímicos	271
4.- En relación a la detección y genotipificación del HPV	287
CONCLUSIONES	295
ANEXOS	299
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	303

INDICE DE TABLAS.

INTRODUCCIÓN

Tabla Nº 1. Cofactores más estudiados en relación al desarrollo de cáncer de cuello uterino	24
---	----

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla Nº 2. Anticuerpos evaluados en este estudio	118
---	-----

Tabla Nº 3. Protocolo para técnica de PCR-INF150. Se indica la composición de la <i>master mix</i> y las condiciones de la PCR	122
--	-----

Tabla Nº 4. Protocolo para técnica de PCR-SPF10. Se indica la composición de la <i>master mix</i> y las condiciones de la PCR	124
---	-----

RESULTADOS

Tabla Nº 5. Resumen de casos y controles	134
--	-----

Tabla Nº 6. Frecuencia de la inmunoreactividad de los biomarcadores en la serie de casos de cáncer de cuello uterino	142
--	-----

Tabla Nº 7. Frecuencia de la inmunoreactividad de los biomarcadores en la serie de tejido cervical benigno (grupo control)	143
--	-----

Tabla Nº 8. Expresión de Ki-67 en los casos de cáncer cervical y controles	144
--	-----

Tabla Nº 9. Expresión de Ki-67 en los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de reactividad celular	145
--	-----

Tabla Nº 10. Expresión de la ciclina D1 en los casos de cáncer de cuello uterino cáncer de cuello uterino y controles	149
---	-----

Tabla Nº 11. Expresión de la ciclina D1 de acuerdo al diagnóstico histopatológico	150
---	-----

Tabla Nº 12. Expresión de la pRb en los casos de cáncer de cuello uterino y controles	153
---	-----

Tabla Nº 13. Expresión de la pRb de acuerdo al diagnóstico histopatológico	154
--	-----

Tabla Nº 14. Expresión de la p16 en los casos de cáncer cervical y controles	158
--	-----

Tabla Nº 15. Expresión de p16de acuerdo al diagnóstico histopatológico	159
--	-----

Tabla Nº 16. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para p16	160
--	-----

Tabla Nº 17. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo a la localización celular de la expresión de p16	161
---	-----

Tabla Nº 18. Expresión de la p21 en casos de cáncer de cuello uterino y controles	164
---	-----

Tabla Nº 19. Expresión de la p21 de acuerdo al diagnóstico histopatológico	165
--	-----

Tabla Nº 20. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para p21	167
--	-----

Tabla Nº 21. Expresión de la p27 en casos de cáncer de cuello uterino y controles	169
---	-----

Tabla Nº 22. Expresión de la p27 de acuerdo al diagnóstico histopatológico	170
--	-----

Tabla Nº 23. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para p27	170
Tabla Nº 24. Expresión de la ciclina E en casos de cáncer de cuello uterino y controles	174
Tabla Nº 25. Expresión de la ciclina E de acuerdo al diagnóstico histopatológico	175
Tabla Nº 26. Expresión de la p53 en casos de cáncer de cuello uterino y controles	178
Tabla Nº 27. Expresión de la p53 de acuerdo al diagnóstico histopatológico	179
Tabla Nº 28. Reactividad inmunohistoquímica de los principales reguladores del ciclo celular en los tipos histológicos de cáncer cervical	182
Tabla Nº 29. Expresión de MDM-2 en casos de cáncer de cuello uterino y controles	183
Tabla Nº 30. Expresión de MDM-2 de acuerdo al diagnóstico histopatológico	184
Tabla Nº 31. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para MDM-2	184
Tabla Nº 32. Expresión de Bax en casos de cáncer de cuello uterino y controles	188
Tabla Nº 33. Expresión de Bax de acuerdo al diagnóstico histopatológico	189
Tabla Nº 34. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para Bax	189
Tabla Nº 35. Expresión de Bcl-2 en casos de cáncer de cuello uterino y controles	193
Tabla Nº 36. Expresión de Bcl-2 de acuerdo al diagnóstico histopatológico	194
Tabla Nº 37. Reactividad inmunohistoquímica de los componentes de la vía de la apoptosis en los tipos histológicos de cáncer cervical	197
Tabla Nº 38. Expresión de cadherina-E en casos de cáncer de cuello uterino y controles	198
Tabla Nº 39. Expresión de la cadherina-E de acuerdo al diagnóstico histopatológico	199
Tabla Nº 40. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para cadherina-E	200
Tabla Nº 41. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo a la localización celular de la expresión de cadherina-E	201
Tabla Nº 42. Expresión de CD44s en casos de cáncer de cuello uterino y controles	205
Tabla Nº 43. Expresión de CD44s de acuerdo al diagnóstico histopatológico	206
Tabla Nº 44. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para CD44s	206
Tabla Nº 45. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo a la localización celular de la expresión de CD44s	207
Tabla Nº 46. Expresión de CD44v3 en casos de cáncer de cuello uterino y controles	211
Tabla Nº 47. Expresión de CD44v3 de acuerdo al diagnóstico histopatológico	212
Tabla Nº 48. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para CD44v3	212
Tabla Nº 49. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo a la localización celular de la expresión de CD44v3	213

Tabla Nº 50. Reactividad inmunohistoquímica de las moléculas de adhesión celular en los tipos histológicos de cáncer cervical	218
Tabla Nº 51. Expresión de la ubiquitina en casos de cáncer de cuello uterino y controles	219
Tabla Nº 52. Expresión de la ubiquitina de acuerdo al diagnóstico histopatológico	220
Tabla Nº 53. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para ubiquitina	220
Tabla Nº 54. Expresión de la CK en casos de cáncer de cuello uterino y controles	224
Tabla Nº 55. Expresión de la CK de acuerdo al diagnóstico histopatológico	225
Tabla Nº 56. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para CK	225
Tabla Nº 57. Expresión de la CEA en casos de cáncer de cuello uterino y controles	229
Tabla Nº 58. Expresión de la CEA de acuerdo al diagnóstico histopatológico	229
Tabla Nº 59. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para CEA	230
Tabla Nº 60. Expresión de la telomerasa en casos de cáncer de cuello uterino y controles	234
Tabla Nº 61. Expresión de la telomerasa de acuerdo al diagnóstico histopatológico	235
Tabla Nº 62. Correlación entre los biomarcadores evaluados en este estudio	244
Tabla Nº 63. Resumen de los hallazgos relacionados con la detección y genotipificación de ADN-HPV en la serie de cáncer de cuello uterino	256
Tabla Nº 64. Distribución porcentual de la infección por HPV única y múltiple de acuerdo al grado de diferenciación de los carcinomas epidermoides	262
Tabla Nº 65. Distribución porcentual de la infección por HPV única y múltiple de acuerdo a los subtipos histológicos de los adenocarcinomas cervicales	263
Tabla Nº 66. Distribución de las combinaciones de HPV (infección múltiple) hallados en los	264
Tabla Nº 67. Expresión inmunohistoquímica de los diferentes biomarcadores en infección por HPV única y múltiple	265

INDICE DE FIGURAS.

Figura Nº 1. Modelo epidemiológico de la carcinogénesis cervical	12
Figura Nº 2. Modelo de carcinogénesis cervical iniciado por la infección persistente por papilomavirus humano de alto riesgo, propuesto por Steebergen et al, 2005, en el que se resumen los pasos más relevantes de este proceso multifactorial	23
Figura Nº 3. Árbol filogenético de los tipos de papilomavirus	35
Figura Nº 4. Esquema del genoma del HPV estructurado linealmente; los segmentos en azul representan los genes virales de expresión temprana (E) y los segmentos rosa a los genes de expresión tardía	38
Figura Nº 5. Esquema del ciclo vital del HPV y el desarrollo neoplásico del cuello uterino	40
Figura Nº 6. Coilocitos, signo patognomónico de la infección por virus papiloma humano en la citología cervicovaginal. 400X. Tinción de Papanicolaou	43
Figura Nº 7. Lesión del cuello uterino inducida por los papilomavirus humanos en la que observamos atípicos coilocitóticos, (LIEBG). 200X. HE	44
Figura Nº 8. Cebadores o primers más utilizados para la amplificación por PCR de los genes de HPV	48
Figura Nº 9. El ciclo celular en el cáncer de cuello uterino asociado a infección por HPV oncogénico	73
Figura Nº 10. Modulación de la apoptosis por la oncoproteína E6 de los papilomavirus oncogénicos. Tomado y modificado de Li et al, 2005	80
Figura Nº 11. Esquema de la degradación de proteínas mediante la vía de la ubiquitina-proteosoma. Fuente: MITCH WE, GOLDBERG AL. 1996.	86
Figura Nº 12. Degradación proteolítica de la p53 y pRb inducida por los HPV oncogénicos	86
Figura Nº 13. Función de la telomerase como enzima transcriptase reversa	93
Figura Nº 14. Diseño experimental	103
Figura Nº 15. Selección de las diferentes áreas de un caso de carcinoma epidermoide para incluir en la micromatriz tisular respectiva	108

Figura Nº 16. A. Bloques de las micromatrices tisulares de carcinoma epidermoide y adenocarcinoma de cuello uterino incluidos en este estudio. B. Micromatrices tisulares de los distintos casos incluidos en este estudio	110
Figura Nº 17. Productos obtenidos por PCR-INF150 que mide la calidad del ADN extraído a partir de las muestras de tejido de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio	123
Figura Nº 18. Productos obtenidos por PCR-SPF10 que indica la presencia de ADN viral en las muestras de tejido de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio	125
Figura Nº 19. Secuencia del proceso de hibridación reversa en tira (LiPA) para genotipificación de ADN-HPV en las muestras de cáncer de cuello uterino incluidas en nuestro estudio	129
Figura Nº 20. Posición de las diferentes sondas de oligonucleótidos a la que corresponde en las tiras de hibridación reversa (LiPA); esta plantilla se coloca sobre cada tira para conocer el genotipo viral, por coincidencia de la banda teñida en la tira con el número asignado a cada tipo de HPV	130
Figura Nº 21. Expresión de Ki-67 en cáncer de cuello uterino	147
Figura Nº 22. Expresión de Ki-67 en tejido cervical benigno	148
Figura Nº 23. Expresión de ciclina D1 en cáncer de cuello uterino	151
Figura Nº 24. Expresión de ciclina D1 en tejido cervical benigno	152
Figura Nº 25. Expresión de pRb en cáncer de cuello uterino	156
Figura Nº 26. Expresión de pRb en tejido cervical benigno	157
Figura Nº 27. Localización celular de la expresión de <i>p16INK4a</i> en cáncer de cuello uterino	162
Figura Nº 28. Expresión de <i>p16INK4a</i> en tejido cervical benigno	163
Figura Nº 29. Expresión de <i>p21WAF1</i> en cáncer de cuello uterino	166
Figura Nº 30. Expresión de <i>p21WAF1</i> en tejido cervical benigno	168
Figura Nº 31. Expresión de <i>p27CIP1</i> en cáncer de cuello uterino	171
Figura Nº 32. Expresión de <i>p27CIP1</i> en tejido cervical benigno	173
Figura Nº 33. Expresión de la ciclina E en cáncer de cuello uterino	176
Figura Nº 34. Expresión de la ciclina E en tejido cervical benigno	177
Figura Nº 35. Expresión de <i>p53</i> en cáncer de cuello uterino	180
Figura Nº 36. Expresión de <i>p53</i> en tejido cervical normal	181
Figura Nº 37. Expresión de MDM-2 en cáncer de cuello uterino	186
Figura Nº 38. Expresión de MDM-2 en tejido cervical benigno	187
Figura Nº 39. Expresión de Bax en cáncer de cuello uterino	190
Figura Nº 40. Expresión de Bax en tejido cervical benigno	192
Figura Nº 41. Expresión de Bcl-2 en cáncer de cuello uterino	195
Figura Nº 42. Expresión de Bcl-2 en tejido cervical benigno	196
Figura Nº 43. Localización celular de la expresión de cadherina-E en cáncer de cuello uterino	202

Figura Nº 44. Expresión de la cadherina-E en tejido cervical benigno	204
Figura Nº 45. Localización de la expresión de CD44s en cáncer de cuello uterino	209
Figura Nº 46. Expresión de CD44s en tejido cervical benigno	210
Figura Nº 47. Localización de la expresión de CD44v3 en cáncer de cuello uterino	215
Figura Nº 48. Expresión de la CD4v3 en tejido cervical benigno	217
Figura Nº 49. Expresión de la ubiquitina en cáncer de cuello uterino	222
Figura Nº 50. Expresión de la ubiquitina en tejido cervical benigno	223
Figura Nº 51. Expresión de CK en cáncer de cuello uterino	227
Figura Nº 52. Expresión de CK en tejido cervical benigno	228
Figura Nº 53. Expresión de CEA en cáncer de cuello uterino	232
Figura Nº 54. Expresión de CEA en tejido cervical benigno	233
Figura Nº 55. Expresión de la telomerasa en cáncer de cuello uterino	236
Figura Nº 56. Expresión de la telomerasa en tejido cervical benigno	237
Figura Nº 57. Genotipificación de DN-HPV en nuestras muestras de cáncer de cuello uterino mediante el método de hibridación reversa en tira (LiPA)	259
Figura Nº 58. Tiras de hibridación reversa (LiPA) mostrando infección múltiple por HPV 16/18/45	261

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1. Distribución porcentual de los casos de cáncer invasor de cuello uterino por grupos de edad (años)	135
Gráfico N° 2. Distribución porcentual de los tipos histopatológicos de cáncer invasor de cuello uterino por grupos de edad (años)	137
Gráfico N° 3. Distribución porcentual de los casos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al diagnóstico histopatológico	138
Gráfico N° 4. Distribución porcentual de los casos de carcinoma epidermoide de acuerdo al grado de diferenciación tumoral	139
Gráfico N° 5. Distribución porcentual del los casos de adenocarcinoma cervical de acuerdo al subtipo histológico	139
Gráfico N° 6. Correlación de la inmunexpresión de Ki-67 con otros biomarcadores	247
Gráfico N° 7. Correlación entre la inmunexpresión de los productos de los genes supresores de tumor, pRb/ p53, cony otros biomarcadores	248
Gráfico N° 8. Correlación entre la inmunexpresión de los inhibidores de kinasa dependiente de ciclinas (CDKI) y otros biomarcadores	249
Gráfico N° 9. Correlación entre la inmunexpresión de la ciclina D1 y otros Biomarcadores	250
Gráfico N° 10. Correlación entre la inmunexpresión de las moléculas de adhesión celular y otros biomarcadores	251
Gráfico N° 11. Correlación entre la inmunexpresión las citoqueratinas (CK) y otros biomarcadore	253
Gráfico N° 12. Correlación entre la inmunexpresión de la telomerasa y otros biomarcadores	254
Gráfico N° 13. Frecuencia de la infección por un solo tipo de HPV y por 2 ó más tipos virales	257
Gráfico N° 14. Distribución porcentual de los casos de infección única y múltiple de acuerdo a la edad	258

INDICE DE ANEXOS.

Anexo N° 1. Plantilla de los carcinomas epidermoides diseñada para la elaboración de las micromatrices tisulares	303
Anexo N° 2. Plantilla de los adenocarcinomas cervicales diseñada para la elaboración de las micromatrices tisulares	304
Anexo N° 3. Plantilla de los tejidos cervicales normales diseñada para la elaboración de las micromatrices tisulares	305
Anexo N° 4. Variables incluidas en este estudio	306

INTRODUCCIÓN.

Cáncer de cuello uterino en el mundo, en países desarrollados y en países subdesarrollados. Incidencia y mortalidad.

El cáncer de cuello uterino es la segunda causa de mortalidad en la población femenina a nivel mundial. Cada año se diagnostican cerca de 500.000 nuevos casos de cáncer cervical y más o menos la mitad de estas pacientes fallecen.

En numerosos países industrializados, los programas de pesquisa organizada apoyados en el uso de la citología cervicovaginal como herramienta de búsqueda y diagnóstico precoz de las lesiones cervicales precursoras e invasoras, han disminuido las tasas de mortalidad por esta neoplasia; sin embargo, en países pobres y en vías de desarrollo, no ha surtido el mismo efecto, por lo que son estas áreas geográficas las que sufren la mayor cantidad de muertes por cáncer cervical. Constituye entonces en estos países un problema de salud pública.

HPV como factor de riesgo más importante en el desarrollo de las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino.

El cáncer de cuello uterino está precedido por un espectro de lesiones preinvasoras conocidas como Lesión Intraepitelial Escamosa (Neoplasia Intraepitelial Cervical) ó *SIL (squamous intraepithelial lesion)*, que en el tiempo, evolucionan en grado de atipicidad hasta convertirse en la neoplasia de carácter invasor.

Estas lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino se han considerado una complicación de la infección persistente por Virus Papiloma Humano (*Human Papillomavirus HPV*) de alto riesgo oncogénico (HPVAR). Además, existen cofactores que en conjunto con las oncoproteínas virales, interfieren en la homeostasis de la célula e inician la transformación cuando alteran el sistema de regulación interna. Finalmente, este proceso preneoplásico termina con el surgimiento de un clon celular con numerosas alteraciones en el contenido genético que da origen al crecimiento tumoral, al principio

con características de *carcinoma in situ* para luego adquirir propiedades para invadir tejidos adyacentes y metastatizar como toda neoplasia maligna.

Actualmente, se analizan con interés e intensidad los beneficios y las desventajas que implica la inclusión de la detección y tipificación del ADN de los papilomavirus humanos, mediante métodos moleculares altamente sensibles, en los programas de pesquisa de cáncer de cuello uterino aplicados a grandes masas de población, para realizar, en conjunto con los hallazgos morfológicos proporcionados por la citología cervicovaginal, un diagnóstico precoz bien de la infección viral o de la existencia de una lesión clínicamente significativa para seguimiento y tratamiento eficaz, previniendo así la evolución hacia la enfermedad maligna.

Reflejo de las alteraciones moleculares iniciadas por el HPV mediante la expresión inmunohistoquímica de biomarcadores moleculares en este tipo de tumor.

Además de la detección y genotificación del ADN-HPV, en la actualidad se están validando una serie de biomarcadores tumorales que permitan identificar aquellas pacientes con infección por HPV y cuya presencia provoque alteraciones celulares que evolucionen a un cáncer. Dichos biomarcadores son de interés no sólo para complementar el diagnóstico histopatológico, también se está probando su uso en las mismas muestras citológicas que se utilizan para realizar el cribado de estas lesiones cervicales, lográndose hasta ahora el éxito en muchos de ellos como posibles marcadores de diagnóstico rápido y de pronóstico.

La necesidad de identificar biomarcadores cada vez más específicos, con un excelente valor predictivo positivo de displasia o carcinoma cervical, además de la presencia de ADN-HPV, que reduzcan el coste efectivo del estudio y con implicaciones terapéuticas inmediatas, ha impulsado el interés por conocer todos aquellos mecanismos moleculares (vías bioquímicas) por medio de los cuales las oncoproteínas de los HPVAR provocan la transformación celular, a través de la exploración del complejo proceso de interacciones entre las proteínas virales (E6 y E7) y los productos de los

principales genes celulares involucrados en el control de ciclo celular, apoptosis, diferenciación epitelial, adhesión celular y estabilidad cromosómica, mediante la expresión inmunohistoquímica de proteínas específicas.

Para seguir con esta línea y con la intención de aportar más datos al estudio y evaluación de marcadores de utilidad en el diagnóstico de esta neoplasia, nos planteamos los siguientes objetivos.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Caracterización inmunofenotípica del cáncer de cuello uterino con infección por Virus Papiloma Humano (HPV) asociada y su aplicación clínica.

Objetivos Específicos.

- Establecer el patrón de expresión inmunohistoquímica en biopsias de cáncer de cuello uterino de los siguientes biomarcadores: *marcador de proliferación celular: Ki-67; reguladores del ciclo celular: pRb, p16INK4a, ciclina D1, p21, p27, ciclina E; marcadores de apoptosis: p53, MDM-2, Bax, Bcl-2; moléculas de adhesión celular: CD44, CD44 v3, Caderina-E; marcadores de diferenciación: citoqueratinas y CEA. Ubicutina y Telomerasa.*
- Comparar la expresión inmunohistoquímica de estos biomarcadores en cáncer cervical con su expresión en tejido cervical benigno.
- Correlacionar la inmunoexpresión de estos biomarcadores con los tipos histológicos de cáncer cervical.
- Evaluar la expresión inmunohistoquímica de los diferentes biomarcadores en relación al grado de diferenciación y al subtipo histológico tumoral.
- Determinar la prevalencia de la infección por *HPV* en los casos de cáncer cervical estudiados.
- Establecer el (los) genotipo (s) de *HPV* más frecuente en los casos de cáncer cervical estudiados.
- Correlacionar la expresión inmunohistoquímica de los biomarcadores, tipos histológicos de cáncer cervical, grado de diferenciación tumoral y tipo de *HPV* asociado.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.- CÁNCER DE CUELLO UTERINO.

1.1 Incidencia. Prevalencia.

El cáncer cuello uterino representa uno de los principales problemas de salud pública que demanda una intervención prioritaria debido a sus elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. Es el segundo cáncer más común en la población femenina a nivel mundial y el más frecuente en países pobres y subdesarrollados (Bosch y de SanJosé, 2003).

El cáncer de cuello uterino representa el 9.8% de todos los cánceres humanos (Vizcaino et al, 2000). Cada año se diagnostican en el mundo alrededor de 465.000 nuevos casos de cáncer cervical y, de estos, cerca de la mitad fallecen en conjunto.

La incidencia mundial de cáncer cervical varía en las diferentes regiones geográficas del mundo, en un rango de 4.8 por 100.000 en Asia Occidental a un 44.3 por 100.000 en África Oriental (Globocan, 2000).

Más de 280.000 mujeres mueren cada año en el mundo a causa del cáncer cervical, cifra que representa la mitad de los casos de incidencia y, en muchas regiones geográficas, este cáncer afecta en forma desproporcionada a las mujeres de edad media, más pobres y vulnerables. Al menos el 80% de estas muertes se producen en los países pobres o en vías de desarrollo como África Sub-Sahariana, el Caribe y América Latina (Bosch y de SanJosé, 2003).

A manera general, las tasas crudas por edad muestran una tendencia baja de cáncer cervical en poblaciones de pacientes por encima de los 50 años de países desarrollados, aunque las pacientes entre 35 y 45 años son el grupo donde se encuentra el mayor número de casos de cáncer cervical diagnosticados. Mientras que en las mujeres jóvenes (entre 25 y 30 años) de países en desarrollo, la tendencia a aumentar en forma lineal. En los

países pobres y en vías de desarrollo, el cáncer de cuello uterino es el tumor más frecuentemente diagnosticado y los clínicos atienden regularmente a las pacientes con tumores en etapa avanzada e incurable.

El cáncer cervical, sin embargo, es una de las pocas neoplasias que puede prevenirse fácilmente por medio del cribado y erradicarse con tratamientos que requieren de tecnología relativamente sencilla, incluso en aquellas mujeres con alto riesgo de presentar la enfermedad. Cuando se detectan alteraciones de tipo precanceroso en el tejido cervical y son tratadas a tiempo y con éxito, es muy posible que la mujer no desarrolle cáncer invasor.

Esto ocurre precisamente en los **países desarrollados**, como Estados Unidos y países nórdicos de Europa, entre otros, donde los programas de pesquisa de cáncer de cuello uterino y lesiones precursoras están bien organizados, abarcando la población general y sobre todo la población con riesgo incrementado a desarrollar esta enfermedad tumoral. En estas poblaciones, es más frecuente el diagnóstico, seguimiento y tratamiento efectivo de lesiones cervicales preinvasivas y hallazgos citológicos atípicos (Bosch y de SanJosé, 2003).

En **España**, los tumores genitales representan una menor proporción que no sobrepasa el 16% de los tumores femeninos, lo cual indica la baja incidencia de cáncer cervical invasor, precedido por el cáncer de endometrio. La tasa anual de incidencia ajustada de cáncer de cuello uterino es de 7.2 por 100.000 mujeres/año y la tasa de mortalidad del 2.7 por 100.000 mujeres/año (Documento de consenso S.E.G.O, 2003)

La lenta evolución del cáncer de cuello uterino desde los estadios preinvasivos hasta los de cáncer en estadio clínico avanzado posibilita la detección precoz y el tratamiento eficaz de esta neoplasia. La lesión puede ser tratada mediante cirugía conservadora *in situ* que obtiene casi un 100 % de curaciones.

La detección de las etapas preinvasivas del cáncer cervical, displasias (NIC/LIE/SIL) y el carcinoma *in situ*, se efectúa mediante la citología

cervical exfoliativa (frotis Pap). Si esta prueba se realizara masivamente en la población de riesgo, se podría reducir significativamente la mortalidad.

1.2. Definición.

El cáncer cervical es un tumor epitelial no hormono-dependiente, que se propaga por extensión local e infiltración linfática. La invasión de la parte superior de la vagina, los parametrios, la vejiga y el recto es la forma más habitual de propagación (Blaustein, 1994).

Los casos de cáncer de cuello uterino primarios se originan a partir de los tejidos epiteliales que recubren la mucosa cervical, del epitelio escamoso poliestratificado plano o del epitelio glandular. Puede verse una variedad de subtipos histológicos, que varían en grado de diferenciación y características morfológicas.

El cáncer de cuello uterino de origen escamoso o tipo *epidermoide* surge de lesiones precancerosas bien definidas como lo son las lesiones intraepiteliales escamosas (LIE/*SIL*) o neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que constituyen un espectro de alteraciones no invasoras asociadas a la infección por virus papiloma humano. Abarcan desde las alteraciones displásicas leves y las propias de dicha infección viral, a nivel del tercio inferior del epitelio escamoso (LIE de bajo grado/*LSIL*) hasta aquellas alteraciones que ocupan la totalidad del espesor epitelial (LIE de alto/carcinoma *in situ*/*HSIL*), siempre confinadas al epitelio, con la membrana basal intacta.

El *adenocarcinoma* de cuello uterino surge de las células de reserva subcolumnares pluripotenciales del epitelio columnar endocervical y es el adenocarcinoma *in situ* el precursor inmediato del adenocarcinoma invasor del cérvix.

El carcinoma epidermoide es el tipo histológico más frecuentemente diagnosticado (Bosch y de Sanjosé, 2003; Clifford et al, 2003).

1.3. Etiología.

Las pruebas moleculares de detección de ADN, aplicadas en investigaciones epidemiológicas a nivel poblacional, han proporcionado de manera consistente suficiente evidencia de que el genoma de ciertos *papilomavirus humanos* está presente en más del 95% de los casos de cáncer cervical, estableciéndose de esta forma la relación **causal** entre la infección genital por HPV y el cáncer cervical, resumidas en los trabajos de Walboomers et al, 1999; Bosch y Muñoz, 2002; Bosch et al, 2002; Bosch y de SanJosé, 2003, Muñoz et al 2003, entre otros.

Entre el 2% y el 20% de la población femenina mundial incuba ADN-HPV oncogénico, demostrado por la detección de secuencias virales en muestras cervicales tisulares y celulares. Además se ha establecido que, bajo ciertas condiciones, estas infecciones virales persisten y son capaces de inducir el desarrollo de lesiones intraepiteliales de alto grado que progresan a cáncer invasor. De esta población, las pacientes cuya edad se encuentra sobre los 30 años podrían representar aquellas en las que ha fallado la eliminación del virus (persistencia viral) y se consideran, entonces, el grupo con relativo alto riesgo de cáncer cervical (Monsonogo et al, 2004).

No obstante, todas estas investigaciones muestran ciertas limitaciones al momento de establecer comparaciones, debido a que incluyen población y métodos de muestreo variables así como métodos de diagnóstico diferentes y no estandarizados. A pesar de ello, la correlación geográfica entre la prevalencia de la infección por HPV y la incidencia de cáncer de cuello uterino es bastante elevada.

1.4 Historia natural.

La historia natural de la enfermedad neoplásica cervical asociada a la infección por HPV oncogénico constituye un excelente modelo de epidemiología molecular de la carcinogénesis.

Los principales pasos necesarios para el desarrollo de cáncer de cuello uterino incluye la infección por HPV, persistencia de la infección viral,

progresión a NIC y finalmente la invasión, como se esquematiza en la figura Nº 1 (Shiffman y Krüger-Kjaer, 2003).

Dentro de estos pasos, cabe la posibilidad de que ocurra la eliminación del virus en pacientes inmunocompetentes o la regresión espontánea de una condición precancerosa, ambos en un período de tiempo que no excede los dos años (Ho et al, 1998; Richardson et al, 2003).

La adquisición del virus ocurre durante el contacto sexual, los HPV son los agentes más comúnmente transmitidos mediante el coito (Burk et al, 1996). En dicha transmisión intervienen una serie de factores de riesgo, muchos de ellos precisamente de índole sexual, que serán detallados más adelante en el apartado de los cofactores asociados a la carcinogénesis cervical.

La persistencia de la infección por HPV depende también de la permisividad celular y de cofactores que cooperan con el virus para que este se replique y aumente la carga viral, siendo esto un evento crucial para el desarrollo del cáncer cervical. Es importante destacar, que la mayoría de las infecciones por HPV son *transitorias*, eliminándose espontáneamente, con intervención adecuada del sistema inmune, pero también puede pasar a un estado de *latencia* por un largo período de tiempo (Ho et al, 1998; Stubenrauch y Laimins, 1999).

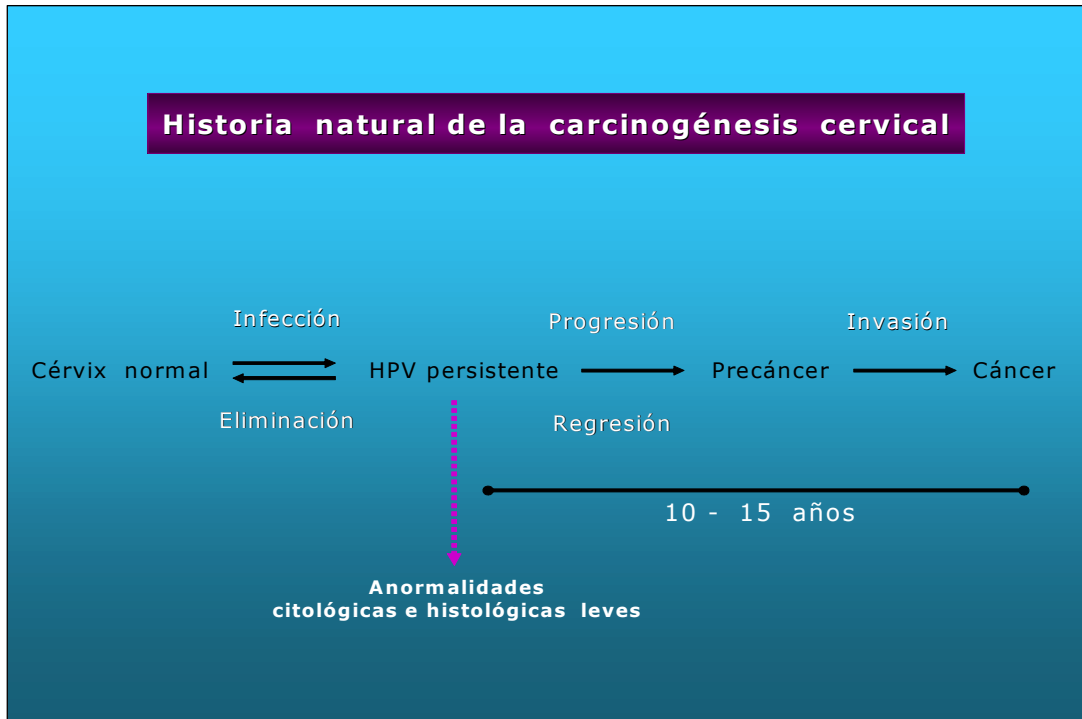


Figura N° 1. Modelo epidemiológico de la carcinogénesis cervical.

Durante la persistencia del HPV en el epitelio cervical, es posible que ocurra la integración del genoma viral en el celular, siempre y cuando se trate de un tipo viral oncogénico, de allí la relevancia de esta fase de persistencia. Como veremos más adelante, la habilidad de los HPV para integrarse al genoma celular es lo que le proporciona su potencial oncogénico (Scheurer et al, 2005).

Finalmente, el desarrollo de la neoplasia intraepitelial y la enfermedad invasora ocurren como consecuencia de las alteraciones genéticas y epigenéticas inducidas por los papilomavirus humanos oncogénicos.

1. 5 Carcinogénesis cervical.

El virus papiloma humano es considerado el carcinógeno inicial y directo causante de la transformación neoplásica de la superficie epitelial del cuello uterino. Las oncoproteínas de los HPV de alto riesgo oncogénico modulan la función de una variedad de proteínas celulares involucradas en el control del ciclo celular y la

replicación del genoma celular. Durante este proceso, los puntos de control más importantes son bloqueados funcionalmente por estas oncoproteínas virales, hecho que conduce a la acumulación de anormalidades genéticas y a una eventual transformación maligna. Sin embargo, el HPV no es suficiente para causar el desarrollo de la enfermedad invasora y metastásica. Además, se requiere de la acción de cofactores que durante todo el proceso influyen para que este evolucione y finalmente se establezca la lesión con potencial invasor. A continuación, se resume el proceso de carcinogénesis cervical iniciado por HPVVAR y los cofactores que se asocian para completar la transformación maligna de la mucosa cervical.

1.5.1 Aporte del papilomavirus humano (HPV) en el inicio de la carcinogénesis cervical.

La mayoría de los tumores humanos (si no todos) están regidos por un conjunto diferenciado de principios genéticos y bioquímicos, en los que la alteración de un número limitado de vías celulares sería suficiente para inducir la transformación maligna de una variedad de células, las cuales “adquieren capacidades” que las caracterizan como fenotipo maligno, entre ellas, crecimiento descontrolado sin inhibición, evasión de la apoptosis, inmortalización, estimulación mitógena independiente y angiogénesis (Hanahan y Weinberg, 2000; Hahn y Weinberg, 2002; Brocchetta y Carbone, 2004) .

La relación entre el HPV y el origen del cáncer de cuello uterino se sospechó por primera vez hace más de 30 años (zur Hausen, 2002). El ADN de genotipos específicos de HPV se ha encontrado en prácticamente todos los cánceres cervicales (Walboomers et al, 1999; Muñoz et al, 2003). Los oncogenes de HPVVAR que se expresan en las células neoplásicas cervicales están implicados en su transformación e inmortalización y se requieren para el mantenimiento del fenotipo maligno (McMurray et al, 2001).

Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en población general, en mujeres jóvenes sexualmente activas y en pacientes con diagnóstico de cáncer cervical confirmado han permitido establecer, a nivel mundial, que la infección por HPV transmitida sexualmente es el principal factor de riesgo para el cáncer cervical y juega un papel central en el proceso de

carcinogénesis (Palefsky y Holly, 1995; zur Hausen, 2002; Muñoz et al, 2003).

Se han propuesto modelos de carcinogénesis donde se podría reconocer fácilmente la acción de HPVAR como carcinógeno, ya que la expresión continuada de sus oncogenes a través del tiempo puede conferirle a la célula infectada capacidad fenotípica maligna (Scheffner y Krüjer Kjaer, 2003; Steembergen et al, 2005). Esto explicaría, por tanto, el riesgo elevado de desarrollar lesión neoplásica cervical como resultado de la infección persistente por HPVAR, en cooperación con una variedad de cofactores (Castellsagué et al, 2002).

El cáncer invasor de cuello uterino se desarrolla progresivamente en un curso de años o décadas. Se inicia con un espectro de cambios epiteliales de tipo hiperplásico provocados por el HPV, que avanzan en grado de alteración convirtiéndose en tejido con crecimiento displásico conocido actualmente como Lesión Intraepitelial Escamosa (*SIL*) hasta convertirse en una neoplasia invasora (Kurman et al, 1994).

La infección genital persistente por HPVAR contribuye al desarrollo de tumores malignos debido a que los productos de oncogenes virales tienen la capacidad de interrumpir la integridad de puntos críticos de control de la célula, convirtiéndola en una célula "iniciada" (Southern y Herrington, 2000; Stanley, 2001).

En el contexto de la carcinogénesis cervical existen dos interacciones clásicas notables aparte de la compleja gama de interacciones entre los productos de los oncogenes virales E6/E7, con una amplia y variada cantidad de proteínas de la célula huésped, difícil de resumir en una breve revisión. Por ello, a continuación se realizará una condensación, por pasos, de los eventos más importantes que conllevan a la transformación maligna de las células del cuello uterino infectadas de forma persistente con HPV de alto riesgo oncogénico.

1.5.1.1 Infección por HPV.

El ciclo de replicación del HPV se inicia con la entrada del virus al tejido de revestimiento facilitado probablemente por una leve abrasión o microtrauma, generalmente a nivel del introito vaginal. La partícula viral podría unirse a receptores de superficie específicos como las integrinas (Evander et al, 1997) o el heparan sulfato, a este último se unen específicamente los genotipos HPV 16/33 (Giroglou et al, 2001), entre otros.

Este virus se aloja en el núcleo de las células del estrato germinativo del epitelio cervical escamoso y/o metaplásico de la zona de transformación, de manera tal que pueda aprovechar la maduración y diferenciación epitelial para producir proteínas que le permitirán ensamblar nuevas partículas virales activamente (Frattini et al, 1996). A este nivel del estrato basal, el virus se mantiene en un bajo número de copias en forma episomal monomérica, no integrado (Thomas et al, 1999; Flores et al, 2000; Burd, 2003).

A medida que asciende el proceso madurativo de la célula, se expresan las proteínas virales tempranas E encargadas de la replicación y transcripción viral, específicamente E1, E2, E6 y E7. La amplificación del ADN viral así como la expresión de genes virales tardíos (L1/L2) sólo ocurre en las células epiteliales que alcanzan la diferenciación terminal de carácter vegetativo inducida por el virus (Frattini et al, 1995; Fehrmann et al, 2003).

Usualmente pueden detectarse bajos niveles de ARN mensajero viral en las células basales infectadas pero la transcripción viral, incluyendo las proteínas E6 y E7, está muy marcada en los estratos epiteliales diferenciados (Stoler et al, 1992).

El estado físico del ADN-HPV dentro del núcleo de las células infectadas predice el curso biológico de la lesión cervical inducida por este virus. El ADN viral se encuentra en forma episomal en las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, mientras que en las de alto grado y en el cáncer

invasor, está integrado formando parte del genoma celular (Cullen et al, 1991; Park et al, 1997; Wang y Hildesheim, 2003).

Si la infección adopta un curso subclínico o latente, es muy probable que se trate una infección con un tipo viral de bajo riesgo oncogénico (HPV 6/11) que será dominada por la respuesta rápida de la inmunidad celular, desapareciendo espontáneamente sin provocar ningún tipo de evidencia clínica ni citológica (Moscicki et al, 1998; Stanley, 2001; Schiffman y Krüger Kjaer, 2003).

1.5.1.2 Persistencia HPV de alto riesgo oncogénico con integración al genoma celular.

La mayoría de las infecciones por HPV son transitorias y asintomáticas; está claro que sólo una pequeña fracción de pacientes tendrá una infección por HPV con carácter persistente, que evolucionará a neoplasia cervical (Ho et al, 1998; Moscicki et al, 1998).

Por lo tanto, la sola infección por HPV no es suficiente para causar la transformación celular y es necesaria la implicación de otros factores de tipo ambiental, relacionados con el virus e inclusive inherentes al mismo huésped, que en cooperación al HPV inducirán y darán origen al crecimiento neoplásico (Muñoz, 2000; Moscicki et al, 2001). Estos *cofactores* serán detallados más adelante.

La persistencia del HPV aunado a la existencia de cofactores favorecerán la integración del ADN-HPV al genoma celular (Scheurer et al, 2005)

La integración del ADN viral oncogénico al genoma celular es probablemente el evento crítico en la carcinogénesis cervical y este siempre precede al desarrollo de anormalidades cromosómicas (zur Hausen, 1994; Klaes et al, 1999; Wang y Hildesheim, 2003; Pett et al, 2004).

La replicación del genoma HPV como una molécula episomal ocurre durante el ciclo vital normal del virus. En las lesiones de alto grado y en el cáncer invasor, el ADN-HPV está unido mediante enlace covalente al ADN

cromosomal de la célula huésped (Cullen et al, 1991; Daniel et al, 1995; Klaes et al, 1999), lo cual sugiere que la integración de los genes virales incrementa la progresión de la neoplasia preinvasiva a la invasiva.

La integración del ADN-HPV al genoma celular ocurre en cualquier sitio con fragilidad cromosomal, es decir, no existe un locus específico de integración (Mincheva et al, 1987). Sin embargo, sí se conoce que la secuencia genómica del HPV se interrumpe a nivel del fragmento de lectura abierta E2 (Jones et al, 1995; Furumoto e Irahara, 2002). La interrupción del gen viral E2 conlleva a una sobreexpresión de forma descontrolada de los oncogenes E6/E7 debido a una mayor estabilidad por la fusión célula-virus (Klaes et al, 1999; Thierry et al, 2004).

La expresión conjunta de **E6/E7** de HPVVAR es suficiente para inducir la inmortalización de los keratinocitos humanos en el cultivo celular y podría cooperar con los oncogenes celulares para proporcionarle a la célula ventaja para el crecimiento descontrolado, evasión de la apoptosis e inducción de la transformación maligna (Southern y Herrington, 2000).

La primera de las interacciones entre el virus y la célula que lo hospeda es la unión directa y el secuestro físico del producto del gen supresor de tumor *Retinoblastoma*, la proteína **pRb** por parte de la oncoproteína **E7-HPVAR**, impidiendo que esta proteína desempeñe la función crucial de regular la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S (Storay et al, 1988; Werness et al, 1990).

E7 se une e induce la degradación de pRb, cuya unión es a través de uno de los tres dominios bien conservados: CR1, CR2 ó CR3 (Longworth y Laimini, 2004). Esta proteína E7, por su estructura, frecuentemente tiende a unirse con la proteína pRb, pero de igual forma podría unirse a otros miembros de esta misma familia, como la p107 y la p130 (Dyson et al, 1989; Longworth y Laimins, 2004).

Normalmente en su estado hipofosforilado, la pRb se une de manera específica al factor de transcripción E2F-DP1. Enviadas las señales exógenas

para que la célula se divida, el complejo CDK4/6-ciclina D1 fosforila a la pRb y se libera el E2F-DP1, promoviendo el aumento de la transcripción de las ciclinas y de otras proteínas que se requieren para la transición de la fase G1 a la S (Shirodkar et al, 1992).

El principal objetivo de E7 es activar el gen de transcripción E2F-DP1 para así favorecer la replicación viral. La unión entre la pRb y E7-HPV da lugar a la liberación de E2F-DP1 y como consecuencia a la progresión no regulada a través del ciclo celular (Berezutskaya et al, 1997). La otra función importante de la oncoproteína E7 es mediar la degradación rápida de la pRb por la vía de la ubiquitina-proteosoma (Wang et al, 2001; Fiedler et al, 2004).

Este producto viral oncogénico interactúa, además, con otras proteínas celulares a fin de favorecer el curso normal del ciclo viral mediante el control de la proliferación celular.

El reclutamiento físico de la pRb por la oncoproteína E7 interrumpe la relación funcional entre la pRb y la histona-diacetilasa (HDAC-1/2). De esta forma, se prolonga la vida de los keratinocitos indiferenciados, se incrementa la transcripción del factor de transcripción E2F2 y se le proporciona estabilidad a la forma episomal del HPV (Tewari et al, 2000; Longworth y Laimins, 2004 a,b; Longworth y Laimins, 2005).

La consecuencia de la interrupción entre la pRb y las HDAC1/2 es la expresión aberrante del gen Notch-1, que se encarga de conducir al cáncer cervical, ya que determina la progresión de las células inmaduras a un estado más diferenciado a nivel de la zona de transformación, donde las células de reserva se diferencian a columnares o a metaplásicas por determinación de Notch-1 (Weubnaster, 1997; Motoyama et al, 2004). Los niveles de Notch-1 se elevan a medida que avanza el grado de neoplasia intraepitelial, para alcanzar niveles máximos en el estado invasor (Daniel et al, 1997).

Por otra parte, E7-HPVVAR es capaz de interactuar con otras proteínas reguladoras del ciclo celular como las ciclinas A y E (Tommasino et al, 1993; Martin et al, 1998) y los inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas p21 y p27 (Zerfass-Thome et al, 1996; Jones et al, 1997). La pérdida del control en la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular se ve reflejada por un incremento de la p16INK4a (Sahebali et al, 2004).

El producto del oncogen **E6** es una proteína de su mismo nombre, que se asocia a una proteína celular compleja, la *AP-E6*. Este complejo, a su vez, se une al producto del gen supresor de tumor *TP53* que es la principal diana de E6 para provocar su inactivación funcional (Hubbert et al, 1992; Longwort y Laimins, 2004) e inducir su degradación proteolítica por la vía rápida de la ubiquitina-proteosoma (Wang et al, 2001). Como consecuencia, se inactiva la vía de la inducción de la apoptosis, ya que además se inactivan otros genes pro-apoptosis como Bax y Bak (Thomas y Banks, 1999b; Li et al, 2005).

Cuando las células sufren un daño en el ADN, la p53 activa la transcripción de genes como *p21WAF1/CIP1* provocando un retraso en el avance hacia la fase S mientras se repara el ADN. Simultáneamente, la p53 podría inducir la apoptosis mediante la activación de genes tales como Bax. La inactivación de p53 entonces resulta en la desregulación del ciclo celular y permite que ocurran mutaciones en las células cervicales (Spitkosvsky et al, 1996).

La oncoproteína E6 se considera una proteína multifuncional porque es capaz de interactuar con varias proteínas celulares y cumplir diferentes funciones como inmortalización de células epiteliales humanas, transformación celular, activación transcripcional y modulación de la apoptosis (Li et al, 2005).

En resumen, se requiere la expresión continua de los oncogenes virales E6 y E7 de los HPVVAR para mantener el fenotipo maligno (Doobar, 2005). La demostración de la inactivación de los productos de los genes supesores de tumor, pRb y p53, ha proporcionado una explicación básica de cómo los

HPVAR inducen la transformación neoplásica de las células cervicales (Howley et al, 1991).

1.5.1.3 Inducción a la transformación neoplásica por HPVAR e inmortalización celular. Alteraciones genéticas y epigenéticas.

El surgimiento del cáncer invasivo de cuello uterino es una complicación rara que ocurre después de un largo período de persistencia viral. El bloqueo funcional de la pRb y p53, junto a otros muchos reguladores del ciclo celular, conducen a la inestabilidad genética por acúmulo de aberraciones en los cromosomas celulares constituyendo el inicio del proceso multifactorial de la carcinogénesis cervical (Trunk et al, 2005).

Las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado del cuello uterino exhiben un patrón de expresión indicativo de transformación inducido por la producción no regulada de oncoproteínas de los papilomavirus humanos. La activación de los oncogenes E6 y E7 de HPVAR integrado sin represión, a nivel de las células basales inmaduras proliferativas, como ocurre en dichas lesiones de alto grado, encabezan y desatan la cascada de alteraciones que caracterizan el inicio del proceso de transformación neoplásica (Klaes et al, 1999; zur Hausen, 2001; Pett et al, 2004), ya que la integración viral da como resultado un ADN inestable.

Los resultados de recientes estudios han proporcionado mayor conocimiento acerca de los pasos que podrían contribuir a la transformación maligna seguida de la infección por HPVAR. Estos pasos incluyen *eventos genéticos* y *eventos epigenéticos* adicionales a la infección viral para que efectivamente surja la enfermedad cervical (Steenbergen et al, 2005).

Todas las alteraciones que suceden progresivamente entre la infección inicial con un HPVAR y el desarrollo de una lesión intraepitelial no tendrían mayor importancia si esto no resultase en la inmortalización celular.

Al quedar sin efecto el sistema de reparación de errores en las secuencias de ADN, la célula precancerosa es incapaz de eliminar el virus y también se

ve imposibilitada para corregir los errores intrínsecos acaecidos. De este modo va acumulando alteraciones genéticas, a lo que se suma la condición de que esta célula no puede "morir", convirtiéndose en una célula "inmortalizada" con ADN en progresiva decadencia, un ente neoplásico con capacidad invasora y metastásica (Brocchetta y Carbone, 2004).

Los modelos de carcinogénesis cervical en los que interviene el HPV muestran un fenotipo neoplásico que se adquiere por una vía de inducción secuencial obtenida a partir de fenotipos transformados, inmortalizados y con crecimiento independiente (Hahn y Weinberg, 2002).

Las células con expresión de las oncoproteínas virales E6/E7 entran en un período de crisis en el que la mayoría de ellas muere, siendo un pequeño clon celular el que podría perpetuarse (Steenbergen et al, 2005). En este clon celular fundamentalmente se encuentra reactivada la telomerasa, a través de la inhibición del represor de la telomerasa NFX1-91 mediada por el complejo E6-E6AP (Kelly et al, 2005; Li et al, 2005) para compensar el acortamiento del telómero durante las divisiones celulares. Así, se le otorga a la célula la posibilidad de proliferar indefinidamente y el estado de inmortalización necesario para el crecimiento maligno (Kim et al, 1994; Ngan et al, 2002; Brocchetta y Carbone, 2004; Cheung et al, 2004).

La reactividad de la telomerasa ocurre en un elevado porcentaje de carcinomas invasores cervicales y en un menor número de las LIEAG (Snijders et al, 1998) luego de la infección viral.

Paralelamente, como resultado de la inestabilidad genética, van ocurriendo las modificaciones cromosómicas que se requieren para la progresión del fenotipo potencialmente maligno (zur Hausen, 1994). Para evaluar estas alteraciones cromosómicas se ha efectuado el análisis tanto en líneas celulares transfectadas con HPV 16 y 18 como en lesiones cervicales de pacientes infectadas con HPV oncogénico (Steenbergen et al, 1996; Larson et al, 1997).

A través de estos análisis, se han detectado alteraciones específicas en el componente cromosómico que involucran tanto a las de tipo estructural como numéricas. Igualmente, se ha descubierto la pérdida de heterocigocidad (*LOH*) de alelos en los brazos cromosómicos (Steenbergen et al, 1998; Heilmann y Kreienberg, 2002; Wani y Fair, 2003).

Stenbergen y colaboradores en 1998 demostraron mediante la técnica de *CGH* (*comparative genomic hybridization*) aplicada a células transfectadas con HPV 16 y 18 en cultivos de monocapa, que hay pérdida clonal de alelos, particularmente en los cromosomas 3p, 11p y 13q, como cambios citogenéticos más comunes en las células inmortalizadas por HPV. Antes, Salinas-Toledo y cols en 1997 informaron el hallazgo de aberraciones cromosómicas como la pérdida de los cromosomas 4, 6q y 10p y la ganancia aleatoria de los cromosomas 3q, 5q, 11q, 14q, 16, 20 y 22q en líneas de cultivos celulares.

Cottage y cols en 2001 encontraron nuevas anomalías cariotípicas numéricas incluyendo pérdida de los cromosomas 15, 18 y 19 y reordenamientos estructurales de los cromosomas 1, 5, 8q, 10 y 20. Y más recientemente, Huang y cols (2005) evaluaron 28 tumores cervicales, 8 vulvares y 7 líneas celulares mediante *CGH* y encontraron un patrón consistente con cambios genéticos representado por ganancias de los cromosomas 1q, 3q (notablemente amplificado), 5p y 8q y pérdida de cromosoma 2q, 3p, 4p y 11p, hallazgos que les permitieron sugerir que pueden existir lesiones genéticas durante la progresión de tumores genitales, basados en la iniciación e integración del genoma viral.

Finalmente, estas investigaciones en las que se obtuvieron una diversidad de alteraciones genéticas demuestran que realmente el cáncer cervical está acompañado de la infección por HPV oncogénico, el cual genera la acumulación de una gama de aberraciones cromosómicas que contribuyen al crecimiento neoplásico con carácter invasor, consecuencia de la alteración de los mecanismos reguladores vitales del ciclo celular e inducida por este virus.

En cuanto a los eventos epigenéticos, la *metilación del ADN* es la principal modificación epigenética en humanos y se ha demostrado que el 85% de las células malignas están hipermetiladas en comparación con las células normales (Esteller, 2002). Al respecto se han realizado investigaciones para detectar este tipo de alteración en el cáncer cervical. La metilación aberrante de genes supresores de tumor (hipermetilación del promotor) podría ocurrir en hasta un 60% de los tumores cervicales, entre otros la hipermetilación de p16INK4a (Narayan et al, 2003; Widschwendter et al, 2004). Este campo es actualmente estudiado con interés para el hallazgo de nuevas dianas terapéuticas y de diagnóstico.

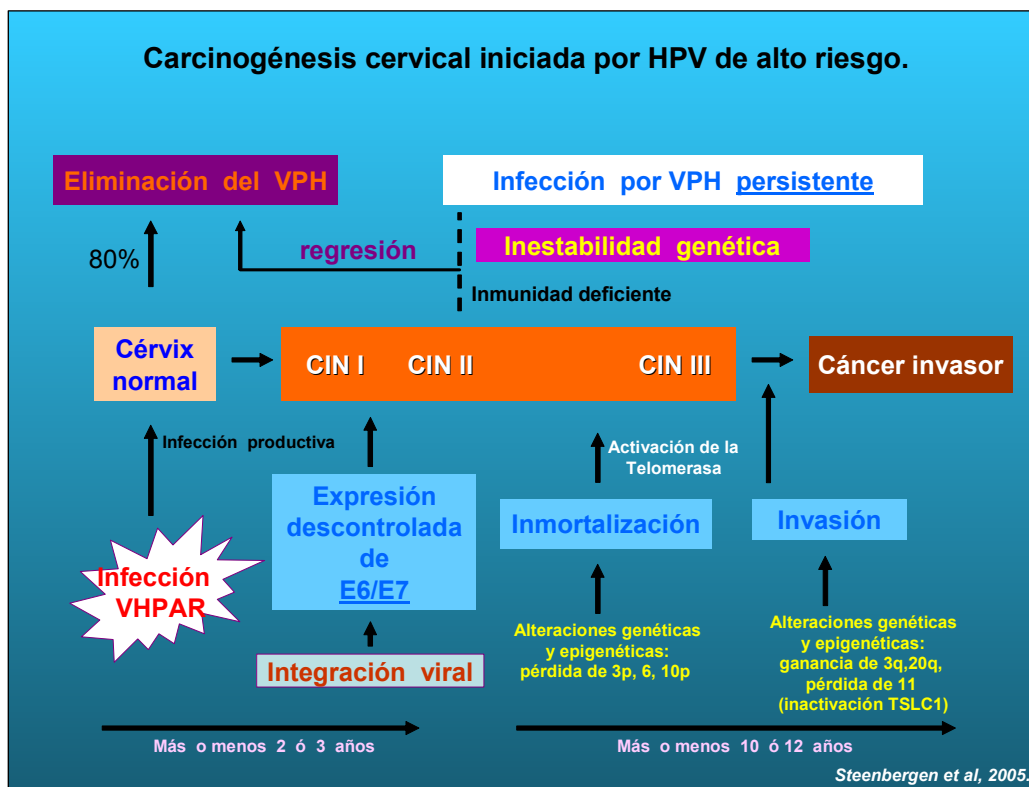


Figura Nº 2. Modelo de carcinogénesis cervical iniciado por la infección persistente por papilomavirus humano de alto riesgo, propuesto por Steebergen et al, 2005, en el que se resumen los pasos más relevantes de este proceso multifactorial.

1.6 Cofactores asociados a la infección por HPV y su colaboración en la transformación neoplásica cervical.

Para que se desarrolle el cáncer invasor en el cuello uterino es necesario que actúen factores adicionales a la infección por HPV, por lo que se dice

que el HPV es una causa necesaria pero insuficiente para desarrollar la neoplasia invasora (Galloway y McDougall, 1996; Bareman y Koutsky, 2005).

El largo período de latencia entre la infección primaria por HPV y el surgimiento del cáncer cervical sugiere la existencia de cofactores adicionales que podrían estar involucrados en el desarrollo tumoral (Mougin et al, 2001).

Estudios realizados en mujeres con infección por HPV y con lesión cervical *in situ* e invasiva (Cavalcanti et al, 1996; Shah et al 1997) y estudios de casos de carcinoma invasor y controles (Daling et al, 1996; Chaouk et al, 1998; Chichareon et al, 1998; Ngelangel et al, 1998) han identificado una variedad de *cofactores*, unos más firmes e independientes que otros y relacionados entre sí o no, los cuales podrían actuar en la vía previa al estado invasor, es decir, en el período comprendido entre la existencia de un epitelio sano, sin lesión y surgimiento del carcinoma *in situ*; de igual forma otros podrían actuar en el tiempo comprendido entre carcinoma *in situ* y carcinoma invasor (Thomas et al, 2001b).

Tabla N° 1. Cofactores más estudiados en relación al desarrollo de cáncer de cuello uterino.

EXÓGENOS	actividad sexual (inicio precoz de la actividad sexual, promiscuidad, HIV y otras infecciones genitales), uso de anticonceptivos orales (ACO), tabaco, dieta.
VIRALES	genotipo de HPV, variantes de HPV, carga viral, persistencia, integración del HPV e infección múltiple.
DEL HUÉSPED	edad, gestación y paridad, trauma cervical, factores genéticos, inmunidad.

A continuación se citan resumidamente los avances alcanzados en la evaluación y efecto de los cofactores más relevantes involucrados en el proceso multifactorial de la carcinogénesis cervical, iniciada y promovida por

los papilomavirus humanos oncogénicos. De igual forma, se añade alguna información sobre aquellos menos estudiados.

1.6.1 Cofactores exógenos.

La mayoría de los factores de riesgo más comúnmente relacionados con el carcinoma cervical están relacionados con el tema **sexual**, por lo que el cáncer cervical podría considerarse una enfermedad de transmisión sexual, cuyas características epidemiológicas serían todas aquellas relacionadas con este tópico. El cáncer de cuello uterino es raro en mujeres vírgenes (Chaouki et al, 1998; Winer et al, 2003).

La **iniciación de la actividad sexual a edades muy tempranas** (antes de los 18 años) se ha postulado como un factor de riesgo para las LIEAG y el cáncer invasor. Estas pacientes desarrollan un epitelio metaplásico con la consecuente ectopia y exposición de la zona de transformación a agentes infecciosos, variaciones de pH y a otros cofactores, haciendo al cérvix más vulnerable y susceptible a la acción de carcinógenos (Hildesheim et al, 2001; Green et al, 2003).

La prevalencia de la infección por HPV incrementa con el **número de parejas sexuales** y con el número de nuevas parejas sexuales, lo cual apoya la definición de que el cáncer cervical es una enfermedad de transmisión sexual. Este es un factor independiente de otros factores como edad, uso de ACO, raza y otras características de comportamiento sexual (Green et al, 2003; Shin et al, 2003). Las paciente monógamas muestran bajos porcentajes de prevalencia de infección por HPV (de Sanjose et al, 2003).

Thomas et al (2001c) destacan que las trabajadoras sexuales en Bangkok son un reservorio de HPV oncogénicos y el cáncer cervical en mujeres monógamas se desarrolla, en parte, como resultado de la transmisión del virus de las prostitutas a sus maridos.

La influencia del uso de anticonceptivos orales (**ACO**) ha sido controversial; sin embargo, cada vez se encuentra mayor asociación de estos con el desarrollo de lesión cervical en subgrupos específicos de mujeres (Hildesheim et al, 2001; Green et al, 2003).

Un estudio realizado por Hildesheim et al, 2001 reportó un mayor riesgo de cáncer cervical en aquellas usuarias de ACO por más de 5 años consecutivos de hasta 3 veces más, en comparación con mujeres que nunca los habían usado. Señalaron, además, que el mecanismo asociado es la influencia de las hormonas en la progresión hacia la lesión invasora mediante la promoción para la integración del ADN-HPV en el genoma celular y el estímulo de la transcripción de las oncoproteínas de HPV E6/E7 y por consiguiente la persistencia viral.

La **multiparidad** ha sido consistentemente hallada en estudios de casos-controles asociadas a carcinoma cervical *in situ* e invasor (Castellsagué y Muñoz, 2003). Las pacientes que han tenido más de 3 hijos podrían tener un mayor riesgo de desarrollar neoplasia *in situ* en comparación con las mujeres nulíparas o con menos de 2 hijos (Muñoz et al, 2002; Green et al, 2003). Esto quizás se debe a la influencia de hormonas endógenas durante la gestación y al trauma cervical que ocasiona cada parto, así como a que la zona de transformación está expuesta durante mucho más tiempo al exocérvix. A todo ello se aúna la paridad a edades muy tempranas, el estado nutricional de la paciente y el estatus de la inmunidad (Hildesheim et al, 2001).

Las mujeres infectadas con HPV E6/E7 que han tenido un promedio de 7 hijos tienen una asociación más directa con el desarrollo de carcinoma epidermoide que con adenocarcinoma o carcinoma adenoescamoso, según los hallazgos de Muñoz et al, 2002.

Un factor de riesgo independiente, frecuentemente identificado en pacientes con cáncer cervical y lesiones precancerosas de alto grado determinado a partir de estudios de casos y controles, es el uso del **tabaco**. Las mujeres jóvenes fumadoras, sexualmente activas, tienen mayor riesgo de desarrollar

carcinoma *in situ* asociadas a HPV de alto riesgo, sobre todo del tipo 16 (Ho et al, 1998b; Ylitalo et al, 1999; Winer et al, 2003). La presencia de derivados del cigarrillo (nicotina y cotinina) en el moco cervical apoya esta aseveración (Prokopczyk et al, 1997).

Según Castellsagué y Muñoz (2003), los estudios de casos y controles llevados a cabo para estudiar los efectos del tabaco muestran una asociación moderada y estadísticamente significativa con el cáncer cervical (OR entre 2-5 en pacientes HPV positivas), implicando un alto riesgo para el desarrollo de esta neoplasia *in situ* e invasiva.

Además de la acción de sinergismo entre el HPV y el cigarrillo en la neoplasia cervical, los carcinógenos químicos relacionados con el cigarrillo podrían ejercer un efecto mitogénico directo sobre el ADN causándole daño. Por otro lado, la exposición al tabaco podría afectar la respuesta inmune local efectiva ante a infección viral ya que disminuye el número de células de Langerhans (Barton et al, 1989; Castellsagué y Muñoz, 2003).

A esto se añade que las mujeres fumadoras tienen menos probabilidad de controlar una infección por HPV en comparación con aquellas que nunca han fumado.

Se ha observado una fuerte asociación en el consumo de tabaco y la multiparidad (Hildesheim et al, 2001).

Las **infecciones cervicales** asociadas, causadas por otros agentes infecciosos diferentes al HPV como el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2) y *Chlamydia trachomatis*, podrían actuar en conjunto con el papilomavirus humano e incrementar el riesgo para cáncer invasor (Smith et al, 2002; Castle y Giuliano, 2003).

Según Risser y cols (2005), las adolescentes padecen de infecciones genitales tan comunes como las clamidias, tricomonas, HSV-2 (e inclusive el tipo 1) y por supuesto el HPV, constituyendo en conjunto con otros cofactores, riesgos para desarrollar una lesión cervical.

Se han propuesto varios mecanismos por medio de los cuales la existencia de co-infecciones a nivel del cérvix podrían contribuir en el proceso de transformación epitelial al crear un microambiente más favorecedor para la acción del HPV; las infecciones de transmisión sexual inducen un estado inflamatorio crónico en el que los metabolitos oxidativos, especialmente el óxido nítrico, provocan inclusive daño genotóxico (Smith et al, 2002; Castle y Giuliano, 2003).

Además, la condición inflamatoria disminuye la respuesta inmune celular local mediante la inhibición de la producción de interleukinas en un ambiente oxidativo; la presencia de oxígeno reactivo influye en la replicación del HPV (aumentando la carga viral), en la transcripción de las oncoproteínas E6/E7 y en la proliferación celular y apoptosis (Castle y Giuliano, 2003).

Los microorganismos como el HSV-2 producen ulceraciones en la mucosa que permiten una mejor penetración del HPV hacia las células inmaduras y posteriormente promueven la persistencia viral al disminuir la funcionalidad de las células presentadoras de antígeno (Castle y Giuliano, 2003).

1.6.2 Cofactores virales.

Como se ha indicado, la infección por HPV es común en mujeres jóvenes sexualmente activas (Ho et al, 1998a) y con frecuencia estas infecciones desaparecen espontáneamente gracias a una respuesta inmune celular efectiva y este control de la infección viral es reflejada en la ausencia de alteraciones citológicas (Ferenczy y Franco, 2001).

Tanto la mujer como el hombre pueden ser portadores y vehículos asintomáticos de la infección por **HPV** y su diseminación sería principalmente, por contacto sexual. Las fracciones de cáncer de cuello uterino atribuibles al HPV determinadas a partir de muchos estudios oscilan alrededor del 95-99% (Krüger-Kjaer et al, 2001; Muñoz et al, 2003; de Sanjosé, 2005).

Chichareon et al en 1998 llevaron a cabo un estudio de casos y controles en pacientes tailandesas con cáncer cervical y encontraron los siguientes resultados: el 95 % de las pacientes con carcinoma epidermoide y el 90 % de las que presentaban adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso tenían ADN-HPV. En el primer grupo, el tipo viral prevalente era el HPV16 (60%); por el contrario, en el segundo preveleía el HPV18 (60%). Los controles mostraron un 16% de positividad para el ADN-HPV.

Las mujeres infectadas con HPV oncogénicos (**HPVAR**: 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 y 59) tienen un mayor riesgo de desarrollar LIEAG y cáncer invasor si se comparan con aquellas infectadas por un tipo de HPVBR: HPV 6 u 11 (Chichareon et al 1998; Ylitalo et al, 2000; Schlecht et al, 2001; Muñoz et al, 2003).

La presencia de **variantes** de genotipos virales de alto riesgo como HPV16 o 18 constituyen un factor que contribuye a la persistencia y al desarrollo de LIE y cáncer de cuello uterino (Villa et al, 2000; Chang et al, 2002; Hildesheim y Wang, 2002; Calleja-Macias et al, 2004; Cruz et al, 2004).

Se ha demostrado que las variantes del genotipo viral 16 tienen propiedades diferentes en cuanto a potencial oncogénico. Así, tenemos que las variantes no europeas del HPV16 (AA) son más oncogénicas que las variantes europeas, pues las primeras contribuyen más a la persistencia e integración viral (del Refugio González-Losa et al, 2004; Gagnon et al, 2004; Evans y Cooper, 2004; Tornesello et al, 2004)

A pesar de la elevada prevalencia de esta infección viral, la enfermedad neoplásica cervical surge después de un largo período de **persistencia viral**, prerequisite para el desarrollo de LIEAG y carcinoma invasor (Richardson et al, 2003) siendo más pronunciado en pacientes mayores de 25 años (Krüger-Kjaer et al, 2002). La persistencia del virus favorece la **integración** del genoma a los cromosomas de las células infectadas (Acladios et al, 2002; Tjalma et al, 2005).

También podría tener influencia la **carga viral** elevada, sobre todo si la paciente presenta una citología anormal (Brisson et al, 1996; Ylitalo et al, 2000; Schlecht et al, 2003; Giuliano et al, 2004).

Se ha propuesto que la determinación de la carga viral podría ser usado como un marcador de progresión de lesiones intraepiteliales a lesiones clínicamente significativas (Dalstein et al, 2003)

Las infecciones por varios tipos de HPV o **infección múltiple** se pueden presentar en pacientes sin anomalías citológicas (Ho et al, 1998; Woodman et al, 2001; Molano et al, 2002) y con LIEBG e inmunosuprimidas por infección con HIV (Levi et al, 2002; van der Graaf et al, 2002; Cuschieri et al, 2005), favoreciendo quizás la persistencia viral y, por ende, aumentando el riesgo de progresión del proceso infeccioso. Se requieren más estudios que permitan aclarar la relevancia de las infecciones múltiples por HPV en la progresión de la lesión neoplásica cervical (Cuschieri et al, 2004).

1.6.3 Cofactores del huésped.

Las mujeres jóvenes sexualmente activas presentan las mayores tasas de prevalencia de la infección por HPV, alcanzando hasta un 43% (Ho et al, 1998; Cuschieri et al, 2004). A medida que avanza la edad se observa una disminución de la infección genital por HPV (9,2%) a nivel mundial (Bosch y de Sanjosé, 2003; Sheurer et al, 2005).

Los estudios de casos y controles llevados a cabo en diferentes regiones del mundo muestran un pico de prevalencia de infección por HPV en mujeres cuya edad está alrededor de los 25 años, luego se aprecia una disminución de las tasas de prevalencia en mujeres de 35 a 54 años y se encuentra un segundo pico después de los 55 años, que probablemente se debe a la reactivación de infecciones latentes (Herrero et al, 2000; Lazcano-Ponce et al, 2001; Molano et al, 2002; Schiffman y Castle, 2003; Castle et al, 2005; Clifford et al, 2005)

Independientemente de la edad y origen geográfico de la población estudiada, el HPV16 es el genotipo viral más prevalente (Clifford et al, 2005): entre mujeres de 23 a 31 años puede verse una incidencia de HPV16 de 24% (Laukkanen et al, 2003).

La infección por HPV es muy común pero también es transitoria debido quizás al desarrollo de una **respuesta inmune** de tipo específico efectiva que se encarga de controlar el virus, sobre todo si es de bajo riesgo (Steenbergen et al, 2005).

Caso contrario ocurre en aquellas pacientes infectadas con HPV16, el cual activa las células dendríticas y neutraliza la respuesta de inmunoglobulinas G (Yang et al, 2005). Además las proteínas de expresión temprana E6 y E7 de los virus oncogénicos inhiben a componentes específicos del sistema inmune innato, a las señales de interferon tipo I, a la expresión de proteínas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad de la superficie celular y son resistentes a las células NK (Woodworth, 2002).

Las pacientes inmunosuprimidas como ocurre en los casos de infección por **HIV** son más propensas a la infección por HPV y al desarrollo de LIE, en asociación con otros factores como la prostitución y la drogadicción (de Sanjosé et al, 2000; Levi et al, 2002).

Los **cambios hormonales** también influyen en el riesgo de desarrollo de neoplasia cervical, específicamente aquellos que ocurren en estado de gestación, responsables del aumento de la proliferación celular a nivel de la zona de transformación y de la ectopia con exposición de la zona de transformación al exocérnix durante un tiempo prolongado (Muñoz et al, 2002).

A nivel celular, los oncogenes virales transforman las células sólo en cooperación con los oncogenes celulares o con la exposición de esteroides humanos ya que estos virus requieren de la proliferación y diferenciación tisular inducida por estas hormonas para su replicación y expresión (McGlennen, 2000).

1.6.4 Otros cofactores.

Existen otras variables consideradas como posibles factores que podrían favorecer en un entorno el proceso de carcinogénesis y que merecen mayores estudios ya que las evidencias son menos consistentes entre los grupos de investigación.

El intervalo de realización de la **citología** para pesquisa de cáncer cervical y lesiones precursoras podría convertirse en un factor de riesgo (Chichareon et al, 1998). Aquellas pacientes con citologías anormales tienen mayor posibilidad de desarrollar una lesión neoplásica invasiva si la pesquisa no se realiza a tiempo.

El **status socioeconómico** y **nivel educativo** bajo también son variables discutidas que podrían intervenir en la carcinogénesis cervical; estas características quizás tendrían mayor influencia en poblaciones de alto riesgo económica y culturalmente menos favorecidas, con otros cofactores asociados como multiparidad, uso del cigarrillo y múltiples parejas sexuales (Chichareon et al, 1998; Ngelangel et al, 1998; Thomas et al, 2001a; Thomas et al, 2001b).

La **condición nutricional y dietética** se ha estudiado en relación a la influencia de este en el riesgo de desarrollo de la neoplasia cervical. Los resultados obtenidos son controversiales e inconsistentes e inclusive muchos informan no haber hallado asociación significativa entre el nivel sérico de micronutrientes y la lesión en cuello uterino (Castle y Giuliano, 2003).

Aunque autores como Ho et al, 1998b no hallaron ninguna asociación entre el desarrollo de LIEAG y niveles plasmáticos de micronutrientes (retinol, beta-carotenos, alfa-tocoferol y ácido ascórbico), otros como Hernández et al, 2004 y Piyathilake et al, 2004 aportan evidencias que indican que fuentes alimenticias ricas en tiamina, riboflavina, folatos y vitamina B12, C y E, carotenoides y retonoides podrían ejercer un efecto protector (actividad antioxidante) contra la carcinogénesis cervical. Estas evidencias coinciden con las comunicadas por García-Closas et al en el 2005 quienes señalan, además, que las evidencias con respecto a esta variable aún no son totalmente convincentes y que se necesitan más estudios para una evaluación adecuada.

2.- VIRUS PAPILOMA HUMANO.

2.1 Importancia de la infección por Virus Papiloma Humano (HPV).

La relación entre el origen del cáncer de cuello uterino y la infección genital por el virus *papiloma humano (HPV)* fue en principio una sospecha, hace más de 30 años (zur Hausen 2002).

El ADN de ciertos tipos específicos de HPV se ha aislado en casi todos los tumores malignos del cuello uterino. Los oncogenes de estos HPV se encuentran constantemente expresados en las células cervicales neoplásicas y están involucrados en la transformación e inmortalización de los keratinocitos siendo necesarios para la progresión hacia malignidad (Hawley-Nelson et al, 1989; Münger y Howley, 2002).

Los estudios epidemiológicos y moleculares han determinado que los HPV oncogénicos son el principal factor etiológico del cáncer de cuello uterino (Walboomers et al, 1999; Muñoz et al, 2003).

2.2 Definición, nomenclatura y clasificación.

Los papilomavirus se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal, siendo muy específicos de especie (mamíferos, aves, hombre) pero bastante semejantes en su estructura física y organización genómica. Hasta el presente, existen más de 200 tipos de papilomavirus humanos, de los cuales por lo menos 118 tipos virales se han aislado y caracterizado, mediante la secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN) de la región L1 del genoma viral, región bien conservada en todos los papilomavirus (revisado en De Villiers et al, 2004; Bernard, 2005).

El comité internacional de taxonomía de los virus (*International Committee on the Taxonomy of Virus, ICTV*) ha reconocido y separado oficialmente a los miembros de la antigua familia *Papovaviridae* en dos familias distintas (De Villiers, 2004):

- *Papillomaviridae*.
- *Polyomaviridae*.

Se define un nuevo *tipo* de HPV como un genoma completo en el que la secuencia del gen L1 es diferente en por lo menos el 10%, a la de cualquier otro tipo ya caracterizado.

Cuando existe una diferencia en la región L1 entre el 2-10% en algún tipo de HPV ya conocido, se trata entonces de un *subtipo*. Como ejemplo se citan que el HPV46 es un subtipo del HPV20 y el HPV55 es un subtipo del HPV44.

Las *variantes* de un tipo específico de HPV difieren en por lo menos el 2% del tipo viral aislado originalmente. Estas variantes de un mismo tipo viral muestran diferencias biológicas y patológicas de gran importancia clínica. El mejor ejemplo lo constituye el tipo HPV16, del cual se conocen cuatro variantes que se han estudiado ampliamente para determinar su distribución mundial y relación con la neoplasia cervical invasora: E(Europea), Asi(Asiática), AA(Asiática-Americana) y Af(Africana), según informaron Villa y cols en el 2000.

En la nueva taxonomía de los papilomavirus humanos, la alta relación filogenética entre los tipos de HPV se denomina "*genero*" (alfa-papilomavirus, en el que se incluyen los 2 principales tipos de HPV oncogénicos: HPV 16 y 18), beta-papilomavirus y gamma-papilomavirus). La menor relación filogenética comprende la "*especie*" (dentro del género están designadas con números), por ejemplo, el género alfa-papilomavirus incluye 15 especies: en la especie 7 se ubica el HPV18 y en la especie 9, el HPV16, según muestra el árbol filogenético de De Villiers et al, 2004 (Figura N° 3).

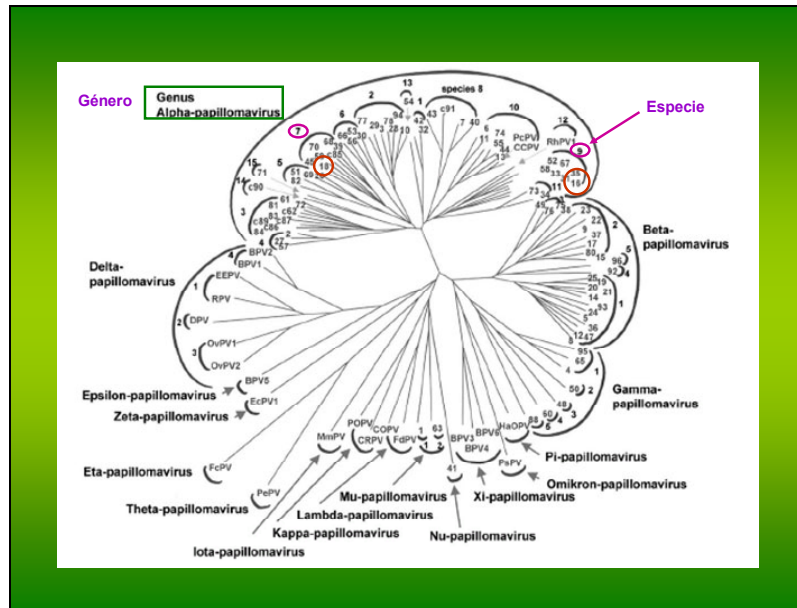


Figura N° 3. Árbol filogenético de los tipos de papilomavirus.

Por los menos 40, de los más de 100 tipos de HPV caracterizados, muestran marcado tropismo por la mucosa anogenital. Tales tipos se han clasificado, considerando diferentes aspectos, en conjunto con el resto de los papilomavirus que afectan al hombre.

La clasificación *biológica* que indica la afinidad de los papilomavirus humanos por un tejido en particular comprende a los siguientes (Richard et al, 1998; Wick, 2000):

1. Cutaneotróficos: típicamente encontrados en la población general y causantes de las verrugas en las manos y pies. También algunos de estos genotipos pueden encontrarse en pacientes inmunosuprimidos.
2. Mucosotróficos: que producen lesiones proliferativas tanto benignas como malignas, por lo que se clasifican a su vez en tipos de bajo y alto riesgo de acuerdo a su potencial oncogénico.

Los papilomavirus también se clasifican de acuerdo a su potencial oncogénico o relación con el cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras. Así tenemos que aquellos que se relacionan con el cáncer cervical invasor son de *alto riesgo* oncogénico (AR) y aquellos que se han aislado con mayor frecuencia de las lesiones intraepiteliales de bajo grado y

de los condilomas acuminados se denominan de *bajo riesgo* oncogénico (BR).

Los prototipos de HPVBR más comunes son los tipos 6 y 11, que se detectan con mayor frecuencia en verrugas genitales benignas y condilomas cervicales. Los HPV 16, 18, 31 y 45 son los tipos predominantemente encontrados en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG) y el cáncer de cuello uterino (Clifford et al, 2003), siendo el HPV16 el tipo más frecuentemente encontrado en los casos de cáncer invasor de cuello uterino del mundo (Bosch et al, 2002; Muñoz et al, 2003).

Los estudios *epidemiológicos* realizados a grandes escalas (Castle y Giuliano, 2003; Muñoz et al, 2003) han establecido de manera general una buena correlación entre la clasificación filogenético, el tropismo tisular y la habilidad de estos virus para provocar la transformación celular.

Recientemente, Muñoz y cols en el 2003 establecieron que existen papilomavirus con mucha probabilidad de tener potencial oncogénico que anteriormente se consideraban de riesgo intermedio. Se trata de los tipos virales HPV 26, 53 y 66. Otros HPV con riesgo intermedio encontrados más frecuentemente en lesiones precancerosas que en las de tipo invasor son HPV 35, 39, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 64 y 70.

2. 3 Organización genómica.

El virión del HPV está compuesto por un genoma de ADN, de doble cadena circular, con aproximadamente 7900 pares de bases (pb), desnudo, sin envoltura pero protegido por una cápside icosaédrica de más o menos 55 nm (Richard et al, 1998).

La cápside viral contiene 72 pentámeros de L1 y aproximadamente 12 moléculas de L2. Los genes E regulan la replicación viral y algunos de ellos (E6-E7) tienen potencial para provocar la transformación celular maligna (zur Hausen, 2000; Steenbergen et al 2005).

El genoma viral es circular, pero en línea se aprecia que posee 8 fragmentos de lectura abierta (secuencias) de expresión temprana, designadas con la letra **E**; 2 fragmentos de lectura abierta de expresión tardía en el ciclo viral (**L**) y una región de largo control (**URL**) no codificable. Los genes de la región L1 y L2 codifican las proteínas de la cápside mayor y menor respectivamente (Figura N° 4).

A continuación se especifican las funciones más importantes de cada uno de los genes del HPV en relación a la replicación, transcripción y habilidad transformante (zur Hausen, 2000; Saveria Campo, 2005):

La proteína **E1** se requiere para mantener el genoma viral y para su replicación.

La **E2** es una de las principales proteínas reguladoras de la transcripción viral que interactúa con sitios de unión específicos de la región LCR. Esta proteína ejerce un efecto tanto positivo como negativo sobre la transcripción.

Las funciones de la proteína **E4** no están completamente dilucidadas. Sin embargo parece que interrumpe la red de citoqueratina lo que se refleja en la formación del coilocito, que es considerada la célula patognomónica de esta infección y, además, es posible que regule la estabilidad del ARNm.

La **E5** es una proteína hidrofóbica asociada a la membrana celular, la cual parece que activa el receptor del factor de crecimiento epidérmico. También podría inhibir la expresión del gen supresor de tumor p21 afectando el control del ciclo celular (Tsai y Chen, 2003).

Las proteínas **E6 y E7** son las principales oncoproteínas de los HPV. Estas son capaces de unirse a la p53 y pRb, respectivamente, inhibirlas funcionalmente e inducir su degradación rápida por la vía de la ubiquitina-proteosoma (Dyson et al, 1989; Scheffner et al, 1990). Además, mantienen el episoma viral durante la infección productiva y es posible que E7

interrumpa el programa de diferenciación celular (Thomas et al, 1999; Flores et al, 2000).

Los genes **L1** y **L2**, como se mencionó antes, se encargan de codificar las proteínas mayor y menor de la cápside viral respectivamente.

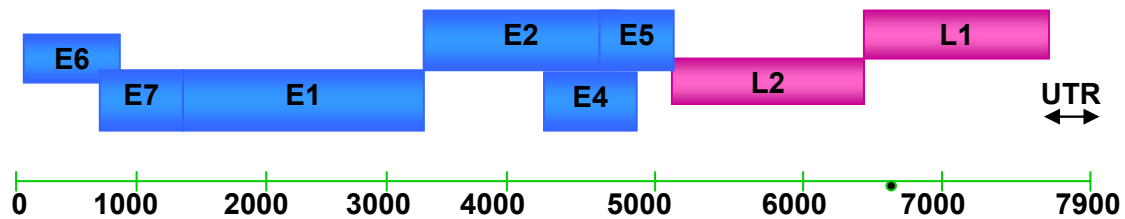


Figura Nº 4. Esquema del genoma del HPV estructurado linealmente. Los segmentos en azul representan los genes virales de expresión temprana (E) y los segmentos rosa a los genes de expresión tardía (L).

2.4 Transmisión y adquisición.

Las infecciones por HPV anogenitales son las más comunes transmitidas sexualmente. La naturaleza de la transmisión sexual de la infección por HPV ha sido comprobada al realizar estudios en pacientes vírgenes (Krüjer-Kjaer et al, 2001).

El contacto sexual con una pareja infectada es necesario para la transmisión, presumiblemente a través de un microtrauma de la mucosa, por ejemplo a nivel del introito vaginal (Schiffman y Krüjer-Kjaer, 2003).

2.5 Ciclo viral.

El ciclo de vida de los papilomavirus humanos está íntimamente relacionado con el programa de diferenciación del epitelio infectado, debido a que estos virus son epiteliotróficos (revisado en Longworth y Laimins 2004a).

Los papilomavirus infectan las células inmaduras de la capa germinativa del epitelio escamoso no queratinizante del cuello uterino, cuando la integridad de la barrera epitelial ha sufrido una microabrasión o cualquier otro trauma.

La zona de transición o zona de metaplasia escamosa inmadura es la más vulnerable a la acción viral.

El genoma viral se establece en el núcleo de las células epiteliales inmaduras en forma episomal, no integrado, en un bajo número de copias. Así permanece bien en estado de latencia o abandona la latencia y aprovecha la diferenciación celular propia del tejido epitelial (Richard,1998). De este modo, paralelo al proceso de maduración y diferenciación epitelial, los papilomavirus humanos expresan sus genes en forma secuencial: primero los genes E1 al E8 a nivel del estrato basal, encargados del control de la transcripción y replicación del virus y luego en las capas superficiales, los genes estructurales de expresión tardía, L1 y L2, que conformarán la cápside de la partícula viral infectiva (revisado en Fehrmann y Laimins, 2003; Doorbar, 2005).

Al alcanzar la superficie epitelial dentro de las células totalmente maduras, las partículas virales se encuentran en un número elevado de copias. Los HPV no son líticos, pero la expresión de la proteína viral E4 afecta a los filamentos intermedios para facilitar la liberación de los viriones que infectaran otras células epiteliales inmaduras. Este efecto citopático de E4 sobre la red de filamentos intracelulares la podemos observar manifestada en la conocida atipia coilocitótica, indicando que la infección es activa. Histopatológicamente, este hallazgo de atipia coilocitótica se clasifica como lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG) o displasia coilocítica (Blaustein, 1994).

Debido a que los HPV carecen de producción enzimática, la reproducción del genoma viral depende exclusivamente de la maquinaria de síntesis del ADN celular. Por lo tanto, los keratinocitos totalmente diferenciados son incapaces intrínsecamente de apoyar la transcripción de genes virales. El HPV entonces se ve obligado a expresar sus propias proteínas que le permitirán crear o mantener las vías que estimulan constantemente la proliferación celular.

Durante esta fase, es imprescindible que el virus sea persistente durante un largo período de tiempo, hasta que sufre un proceso de integración dentro del genoma celular, dando origen a una serie de acontecimientos que conducen a la alteración del medio regulador del ciclo celular, y a la acumulación de errores genéticos que son la base de la transformación tumoral de la mucosa cervical. Todas estas estrategias específicas serán detalladas más adelante en el apartado de la carcinogénesis cervical.

En la figura N° 5 se muestra esquemáticamente el ciclo vital del HPV tanto en lesiones intraepiteliales como en cáncer cervical (Goodman y Wilbur, 2003).

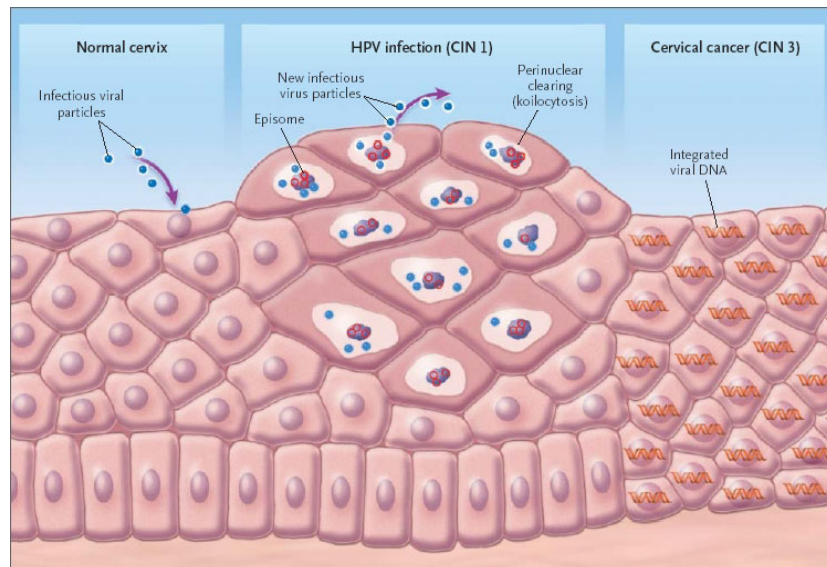


Figura N° 5. Esquema del ciclo vital del HPV y el desarrollo neoplásico del cuello uterino.

2.6 Prevalencia.

Según señala Koutsky en 1997, aunque es difícil estimar la prevalencia general de la infección por HPV, los ensayos moleculares demuestran que por lo menos el 15% de los adultos entre 18 y 28 años de edad sexualmente activos, tienen infección subclínica. La infección por este virus es entonces extremadamente común.

La infección genital por HPV es la más comúnmente diagnosticada entre mujeres jóvenes sexualmente activas (Sánchez-Alemán et al, 2002).

La prevalencia de la infección por HPV a nivel mundial se estima en un rango que oscila entre el 2% y 44%. La amplia variación podría deberse a las diferentes características de la población estudiada cuando se desea conocer la incidencia-prevalencia de esta infección y a la sensibilidad de los diferentes métodos de laboratorio empleados para la detección del ADN-HPV (Bosch y de Sanjosé, 2003). A manera general, más del 50% de las mujeres sexualmente activas se han infectado por uno o varios genotipos de HPV en algún momento de su vida. La mayor prevalencia de la infección por HPV se encuentra en el grupo de pacientes cuyas edades oscilan entre los 20 y 30 años (Kulasingam et al, 2002; Richardson et al, 2003; Cuschieri et al, 2004).

Como se ha indicado, gran parte de los estudios demuestran que el porcentaje de prevalencia de infección por HPV disminuye con la edad, apreciándose que la prevalencia vuelve a incrementarse por encima de los 55 años (Herrero et al, 2000).

La prevalencia media de infección por HPV oncogénico en mujeres de 30 años o más puede ser de hasta 9.2% (Bosch y de Sanjosé, 2003).

En España, se estima que la prevalencia de la infección por HPV en la población general oscila entre el 3% y el 6%, siendo una de las más bajas en Europa. Este dato coincide con la baja incidencia de cáncer cervical, que es una de las menores del mundo (documento de consenso de SEGO, 2003).

El HPV16 es el tipo viral más prevalente tanto en pacientes citológicamente normales (Ho et al, 1998) como en pacientes con LIE y carcinoma invasor (Muñoz et al, 2003). Esta prevalencia se repite a nivel mundial (Bosch y de Sanjosé, 2003).

La infección por múltiples tipos de HPV varía según las características de la población estudiada y el tipo de lesiones cervicales, si se trata de lesiones intraepiteliales o invasoras. En el caso de las LIE, la prevalencia de infección múltiple es mayor si se compara con la hallada en casos de cáncer cervical invasivo, aproximadamente 20% (Zehbe y Wilander, 1997; Ho et al, 1998; Muñoz et al, 2003; García-Cabezas et al, 2005). Esta variación depende precisamente de la población estudiada y, sobre todo, del grado de sensibilidad del ensayo de detección del ADN viral utilizado.

Las mujeres portadoras del HIV tienen elevada prevalencia de infección múltiple, a su vez que elevado porcentaje de lesiones intraepiteliales escamosas (Branca et al, 2004).

La infección múltiple por varios tipos de HPV se ha asociado con la persistencia de la infección (Ho et al, 1998; Woodman et al, 2001), lo cual implica un mayor riesgo de progresión de la enfermedad.

2.7 Diagnóstico.

2.7.1 Clínico.

La infección por papilomavirus humano se caracteriza clínicamente por presentarse como verrugas y condilomas acuminados (lesiones exofíticas) a nivel de los genitales externos y vagina o como condiloma plano (lesiones planas) en el cuello uterino (Weedon, 2002).

2.7.2 Citológico.

Las células epiteliales cervicales anormales incluyendo los efectos citopáticos de la infección por HPV pueden detectarse microscópicamente en frotis cervicovaginales teñidos con Papanicolaou (Meisel y Morin, 1997), los cuales constituyen la base de los programas de pesquisa de cáncer cervical y sus lesiones precursoras. Esta es la principal fuente de detección de pacientes de alto riesgo de progresión de la enfermedad (Cuschieri y Cubie, 2005).

El *coilocito* es la célula patognomónica de la infección por HPV, generalmente de tipo intermedio, aparece aislada o en grupos, con amplio citoplasma de bordes bien definidos, poligonal, bien diferenciado, cianófilo o eosinófilo y a veces queratinizado, con una gran vacuola clara alrededor de un núcleo atípico. Es frecuente la bi o multinucleación, con grados variables de hiperchromasia nuclear que van acompañados por variación en el tamaño y de la forma. Además, la cromatina puede estar distribuida uniformemente, verse "borrosa" o mostrarse densamente opaca. Así mismo, no puede reconocerse la presencia o no de nucleolos. El contorno de la membrana nuclear es irregular.

Cuando observamos coilocitos en la citología cervicovaginales se considera compatible con una lesión intraepitelial escamosa de bajo grado con signos clásicos de infección por HPV.

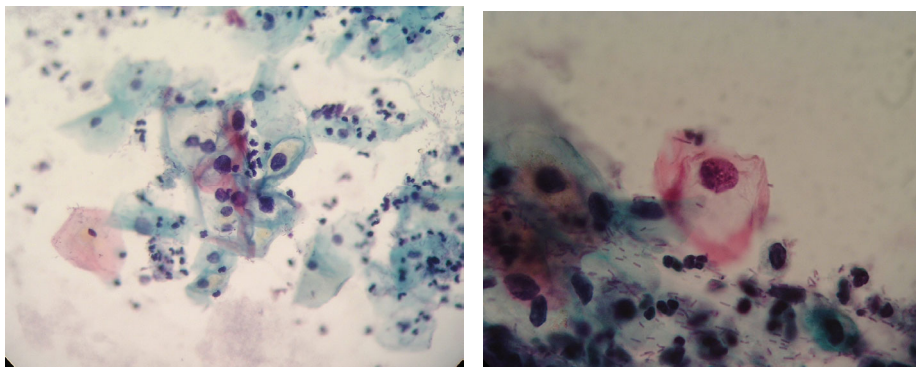


Figura Nº 6. Coilocitos, signo patognomónico de la infección por virus papiloma humano (LIEBG) en la citología cervicovaginal . Tinción de Papanicolaou. 20 y 40X.

2.7.3 Histopatológico.

El patrón histopatológico de la infección por HPV se caracteriza por la presencia de un epitelio escamoso maduro, con una marcada acantosis, hiperqueratosis, paraqueratosis e hiperplasia del estrato profundo. El componente celular exhibe el efecto citopático viral o atipia coilocitótica, de variable pero usual atipia nuclear leve. Las figuras mitóticas están presentes en el tercio basal y no son numerosas ni atípicas. El estroma presenta variaciones en el grado de infiltración inflamatoria (Meisels y Morin, 1997).

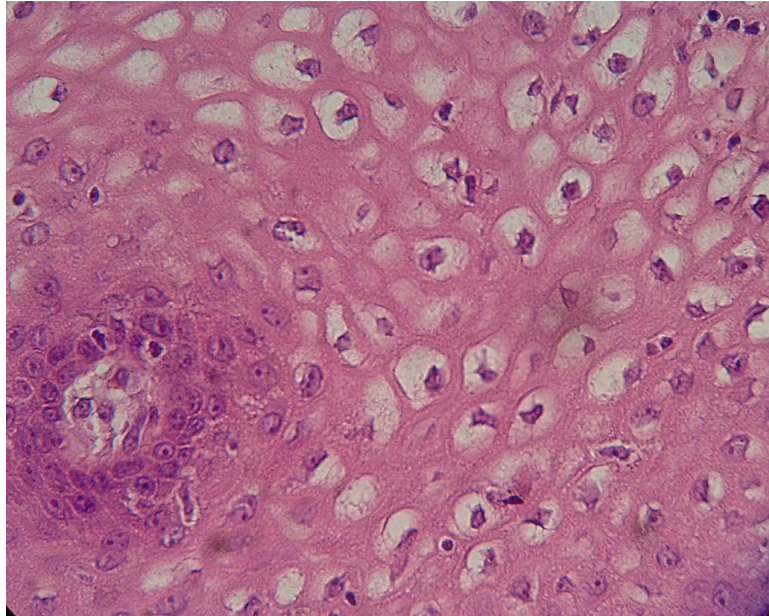


Figura Nº 7. Lesión del cuello uterino inducida por los papilomavirus humanos en la que observamos un epitelio escamoso con atípia coilocitótica (LIEBG). HE. 200X.

2.7.4 Molecular.

Hasta la aparición de las nuevas técnicas de detección de ácidos nucleicos, el diagnóstico de la infección por HPV se ha basado en la evaluación morfológica de los efectos citopáticos causados por el virus a partir de muestras provenientes de lesiones caracterizadas clínicamente, en la observación de las partículas virales a través de la microscopía electrónica y por métodos inmunohistoquímicos. Han sido los procedimientos de detección del ADN viral los que han permitido un avance en su diagnóstico (Stoler, 2000; Molijn et al, 2005)

Los papilomavirus humanos no crecen en cultivos celulares convencionales y los ensayos serológicos cuentan con exactitud limitada, por lo que la detección de estos virus se realiza mediante ensayos moleculares para el ADN-HPV. Existe una variedad de métodos moleculares para la detección, tipificación y cuantificación del ADN-HPV (Dillner, 1999; Iftner y Villa, 2003).

La incorporación de estas técnicas a los estudios epidemiológicos ha ofrecido la oportunidad de alcanzar un mejor entendimiento de los factores asociados al origen del cáncer de cuello uterino y de la historia natural de

las diferentes neoplasias; y ha permitido, además, predecir las proporciones de supervivencia en los casos de cáncer cervical ya diagnosticados.

2.7.4.1 Métodos de detección del ADN-HPV.

El ADN del HPV puede detectarse tanto a partir de muestras cervicales obtenidas por raspado como en biopsias de tejido.

Los primeros ensayos introducidos en el comercio no fueron utilizados ampliamente por la comunidad científica, debido a que no detectaban todos los genotipos oncogénicos de HPV y carecían de buena sensibilidad. Estos primeros ensayos (ViraPap y ViraType) para HPV se comercializaron a partir de los años 80s, e incluían en sus protocolos la utilización de fósforo radiactivo para el marcaje de las sondas. En este mismo período se introduce la Hibridación *in situ* (HIS) sobre tejido tumoral cervical (Hubbard, 2003).

La HIS se basa en el uso de sondas marcadas que hibridan específicamente con el ADN-HPV intracelular. Aunque su sensibilidad es limitada, permite localizar la infección viral en la muestra y también la co-localización con otros marcadores (Wick, 2000). De forma alternativa, el ADN-HPV puede aislarse directamente de muestras clínicas y detectarse por *Southern blot* o *por dot blot*. Sin embargo, tales métodos no son lo suficientemente sensibles, son muy laboriosos y no se han aplicado a grandes masas de poblaciones en programas de pesquisa.

La captura de híbridos (CH) es un método de amplificación de la señal basado en la hibridación del ADN-HPV diana en solución, con sondas de ARN marcadas (Lörincz, 1996). Los híbridos son capturados en placas con microporos y se detectan con un anticuerpo monoclonal específico y un sustrato quimioluminiscente, proporcionando así una medición semi-cuantitativa del ADN-HPV. Se usan dos *cocktails* diferentes de sondas, uno para HPV de bajo riesgo: 6,11,42,43 y 44 y otro que contiene sondas para 13 tipos de HPV de alto riesgo: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 y 68.

Este ensayo se ha estandarizado en muchos países y se usa ampliamente en estudios clínicos, además de que ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration (FDA)* de los Estados Unidos para utilizarse en la pesquisa de cáncer de cuello uterino de rutina. Entre las limitaciones que se le adjudican a esta prueba tenemos que distingue entre la infección por un tipo de HPV de alto y bajo riesgo, pero no permite la identificación de HPV específicos y pueden producirse reacciones cruzadas entre ambos *cocktails* de sondas. En la actualidad ya se está probando una nueva generación de captura de híbridos III automatizada (Iftner y Villa, 2003).

Entre los sistemas de amplificación de dianas, contamos con la reacción en cadena de la polimerasa o *PCR (polymerase chain reaction)*, mediante la cual se ha logrado la amplificación selectiva de secuencias específicas de ácidos nucleicos bajo síntesis enzimática, constituyendo una práctica sencilla para la detección de ADN-HPV. Permite la identificación de un solo tipo viral utilizando cebadores que se unen a secuencias específicas de este o a varios tipos de HPV, mediante cebadores (*primers*) generales o de consenso (Iftner y Villa, 2003)

Los cebadores de consenso o generales como *MY09/11* (Manos et al, 1989), *GP5+/6+* (de Roda Husman et al, 1995), *SPF10* (Kleter et al, 1998) permiten detectar una amplia variedad de genotipos virales realizando una sola *PCR*. Tales cebadores reconocen una región bien conservada de diferentes papilomavirus humanos como la región L1 del genoma viral. También se han desarrollado cebadores para amplificar las regiones genómicas E1, E6 y E7 de los HPV.

Actualmente, se están validando el uso y la aplicación en la rutina de laboratorio para la genotipificación de HPV, los cebadores de consenso *SPF10* que amplifican un pequeño fragmento (65 pares de base) de la región L1 de los HPV. Esto le confiere una alta sensibilidad al ensayo ya que discrimina entre un amplio espectro de alrededor de 43 tipos de HPV (Kleter et al, 1998, 1999), tanto en biopsias de tejido como en material celular de pacientes con lesiones premalignas y malignas del cuello uterino (van Muyden et al, 1999; Pirog et al, 2001; van Doorn et al, 2002;

La sensibilidad y especificidad de los procedimientos de laboratorio basados en *PCR* podría mostrar un amplio rango de variación, que depende principalmente de los cebadores utilizados, del tamaño del amplicón o producto obtenido, de las condiciones que rigen la reacción, el rendimiento de la DNA polimerasa usada en la amplificación, el espectro de DNA-HPV amplificado y también de la habilidad para detectar múltiples tipos de HPV (Ifner y Villa, 2003).

Para alcanzar el éxito en los ensayos moleculares, es imprescindible la obtención de una muestra adecuada de ADN viral a partir de material celular. Los raspados cervicales proporcionan una cantidad limitada de células epiteliales y si además estas células o algunas de ellas contienen pocas copias virales, podrían producirse errores dependientes de la muestra que repercuten en la sensibilidad del ensayo, sobre todo en el caso de que la infección existente se debiera a varios genotipos de HPV a la vez y que estos estuvieran presentes en diferentes cargas virales (Molijn et al, 2005).

De igual forma, el almacenamiento y transporte de la muestra es importante ya que se pueden obtener resultados falsos negativos causados por degradación promovida por endonucleasas endógenas. Debe evaluarse la integridad del ADN genómico en el espécimen y su idoneidad para el análisis molecular a través de la utilización de controles internos adecuados tales como la amplificación del gen beta-globina o cualquier otro gen que nos indique la presencia de material genómico adecuado.

2.7.4.2 Métodos de genotipificación del ADN-HPV.

La detección de secuencias de ADN-HPV se ha logrado mediante la metodología antes mencionada, haciendo uso de los cebadores específicos que identifican secuencias amplificadas del genoma viral y permiten su genotipificación exacta (Wick, 2000; Hubbard, 2003).

De acuerdo a los cebadores que se utilicen en la amplificación por *PCR*, se obtendrán productos con diferentes tamaños. La eficacia de la *PCR* que genera un producto pequeño es considerablemente alta en comparación con

aquella que amplifica regiones genómicas de mayor tamaño, como podemos deducir a través de la figura N° 8, de Molijn et al, 2005.

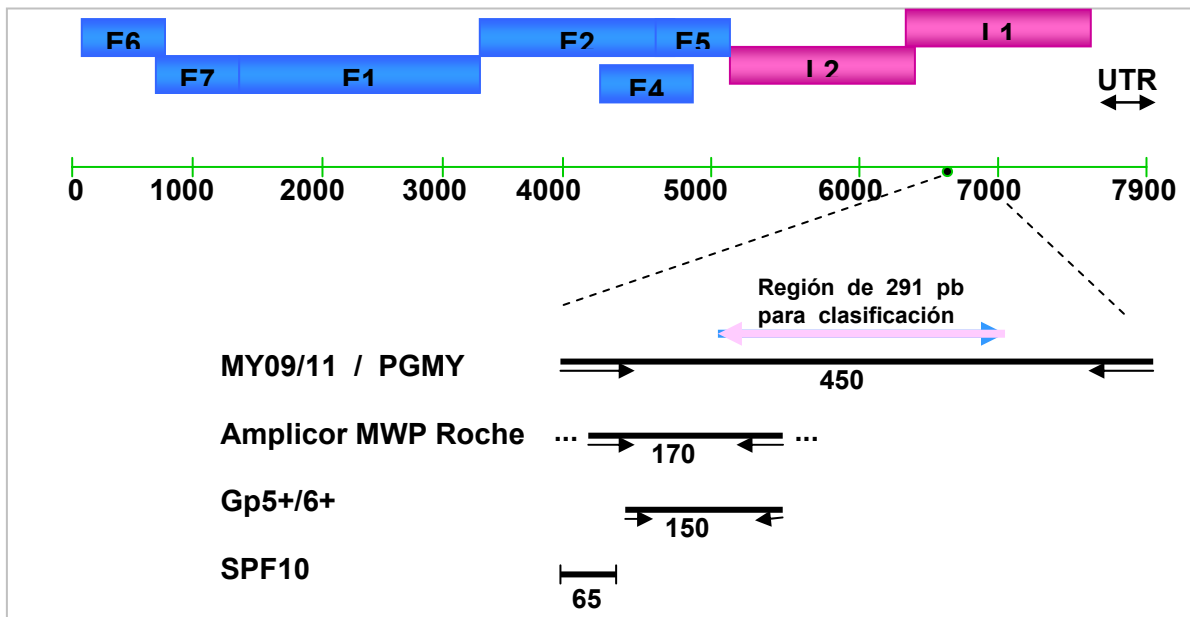


Figura N° 8. Cebadores o *primers* más utilizados para la amplificación por *PCR* de los genes de HPV.

Además de la *PCR* específica, existen variados métodos por medio de los cuales podemos identificar a los HPV involucrados en las lesiones cervicales. Uno de ellos, que se ha ido perfeccionado desde su introducción (Gravitt et al, 1998), es la genotipificación de ADN-HPV mediante hibridación reversa en tira, evaluada y validada en varias investigaciones, incluyendo material de biopsia y raspado cervical (Kleter et al, 1999; Melchers et al, 1999; Quint et al, 2001; Rubin et al, 2001; Perrons et al, 2002; Perrons et al, 2005). Este método alcanza una buena eficacia para la identificación de prototipos de HPV que se presentan como un único tipo viral o como infección múltiple.

Finalmente, con la intensión de encontrar pruebas cada día más sensibles y específicas pero que impliquen menos costo efectivo, más sencillez y prontitud en la obtención de los resultados, se están validando los *HPV DNA chips* o *HPV-DNA microarrays* para identificar los papilomavirus que afectan al humano (An et al, 2003; Choi et al, 2005; Lin et al, 2005) .

Estos chips consisten en fijar secuencias de oligonucleótidos de diferentes tipos específicos de HPV sobre una membrana de celulosa, incrustada en un cristal. Además, incluyen controles positivos y negativos así como una secuencia de un gen control (An et al, 2003; Choi et al, 2005). Tienen la característica hasta ahora de que constituyen un método sensible, rápido sencillo y económico (Lin et al, 2005).

2.7.4.3 Utilidad clínica del diagnóstico molecular del HPV.

Los métodos moleculares empleados para la detección y genotipificación del HPV permiten identificar a las pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer cervical invasor, es decir a aquellas con una lesión precancerosa y con riesgo de progresión. De igual forma, dichos métodos tienen utilidad en la elaboración de vacunas, estudios epidemiológicos y de la historia natural de la infección (Cuschieri y Cubie, 2005).

Los resultados del estudio *ALTS* (*The ALTS group, 2003*) en pacientes con ATIPIAS/LIE han encontrado que muchas de estas pacientes (sobre todo aquellas con atipias que no descartan una LIEAG, *ASC-H*, sistema Bethesda 2004) tienen asociado un tipo de HPVVAR y, por lo tanto, se consideran pacientes de alto riesgo a desarrollar una lesión clínicamente significativa (NIC 2 o más) entre un 30% y 40% en comparación con aquellas infectadas por un HPVBR (10%-15%). Por ello, sugieren que en el protocolo de manejo de pacientes con citologías atípicas se incluya el estudio molecular para detección y tipificación viral, como complemento a la evaluación citomorfológica y clínica para un mejor seguimiento clínico e implementación del tratamiento adecuado de acuerdo a cada caso.

La detección molecular del HPV proporciona un enfoque diferente para la pesquisa de cáncer cervical y el manejo de estas pacientes.

3.- BIOMARCADORES TUMORALES EN EL CÁNCER CERVICAL.

3.1 Proliferación celular en cáncer cervical.

Las células normales requieren de señales mitogénicas de crecimiento para pasar del estado de reposo a la proliferación activa. Por el contrario, las células tumorales generan sus propias señales de crecimiento, independientemente del microambiente celular normal que las rodea. Esta autonomía en el crecimiento le confiere a los tumores la gran capacidad para crecer de forma descontrolada haciendo caso omiso a los mecanismos antiproliferativos.

En el cáncer de cuello uterino, la proliferación celular se desencadena y persiste como consecuencia de la acción de los productos de los genes de los papilomavirus oncogénicos asociados al tumor sobre las principales vías de regulación de la proliferación celular.

3.1.1 El crecimiento celular descontrolado es característico de las neoplasias.

La proporción de células tumorales que se encuentra en el conjunto de proliferación se denomina fracción de crecimiento; en la fase inicial del crecimiento tumoral, la inmensa mayoría de las células transformadas forman parte de la fracción de crecimiento. A medida que el tumor va creciendo, las células malignas se mudan a la fase G0/G1 (Robbins, 2000).

Por lo tanto, el crecimiento tumoral es intenso en fases iniciales o subclínicas, para luego disminuir de manera tal que cuando se hace clínicamente detectable, la fracción de crecimiento puede estar bastante reducida.

La actividad proliferativa de un tumor se mide a través de la expresión inmunohistoquímica de diferentes antígenos, que sólo se expresan en células que se encuentren en fase proliferativa. Entre los antígenos que se han evaluado ampliamente en las neoplasias tenemos a Ki-67 y PCNA.

El antígeno Ki-67 se expresa exclusivamente en el núcleo de las células que se encuentran en fase de proliferación (G1, S, G2 y M) del ciclo celular y no se detecta en aquellas en fase G0, en reposo. La utilización del anticuerpo monoclonal *MIB-1* contra Ki-67 es considerada un medio sencillo, reproducible y confiable para evaluar en muestras de tejido, la fracción de crecimiento de las neoplasias malignas con relativa exactitud (Brown y Gatter, 1990).

La fracción de crecimiento tumoral es un factor que influye en el comportamiento de la neoplasia, por lo que la medición de este parámetro proporcionaría al clínico información de pronóstico y también sobre la respuesta tumoral ante la instauración de cualquier terapia (Suzuki et al, 2000; Liu et al, 2001).

3.1.2 Proliferación celular en el cáncer de cuello uterino.

Las determinaciones de la proliferación celular y las anomalías en el contenido nuclear de ADN se han evaluado ampliamente en lesiones precursoras y en tumores malignos del cuello uterino asociados a la infección por HPV, como un marcador adjunto de diagnóstico y pronóstico (Stoler, 2003).

La evaluación inmunohistoquímica del antígeno Ki-67/MIB-1 se utiliza para predecir la progresión de las neoplasias intraepiteliales del cuello uterino grados 1 y 2 hacia el carcinoma *in situ* y también, en el caso de cáncer cervical, para determinar el grado de agresividad tumoral y metástasis, demostrando tener en este último aspecto un valor pronóstico (Keating et al, 2001b; Kruse et al, 2003).

La expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el cáncer cervical muestra alteraciones cuantitativas cuando se compara con las encontradas en las lesiones intraepiteliales, siendo inclusive inferior en la neoplasia invasiva que en la intraepitelial (Dellas et al, 1997; Carrillo et al, 2003).

La actividad proliferativa se expande por todo el espesor del epitelio displásico, observándose mayor intensidad a medida que la lesión aumenta

en severidad. Por el contrario, en el epitelio cervical normal los índices proliferativos elevados se ubican a nivel del estrato profundo y parabasal, mientras que las capas superiores e intermedias no muestran reactividad (Hietala et al, 1998; Kruse et al, 2001).

La evaluación de la actividad proliferativa también ha sido medida considerando el grado de diferenciación tumoral. Pahuja y cols en el 2003 reportaron que el índice de crecimiento medido con Ki-67 y AgNOR fue mayor en un número significativo de carcinomas pobremente diferenciados en comparación con los carcinomas con buena o moderada diferenciación, siendo este hallazgo correlativo con la agresividad tumoral.

El análisis multivariable en muestras de tejido cervical también ha arrojado buena correlación entre la expresión de Ki-67, la infección cervical por HPV y otros biomarcadores relacionados con la regulación del ciclo celular como la proteína p16INK4a y el grado de neoplasia cervical, siendo estos resultados elevados para todos los parámetros evaluados junto con el aumento en el grado de severidad de la lesión cervical (Agoff et al, 2003).

En la evolución de la patología del cuello uterino, Ki-67 es considerado un marcador de proliferación celular que debe evaluarse en conjunto con otros biomarcadores específicos que permitan revelar la existencia de alteraciones en el ciclo celular de la neoplasia cervical, incluyendo el estatus de la infección por HPV, con la finalidad no sólo de acertar en cuanto a pronóstico de la lesión, sino también para determinar su utilidad en la pesquisa de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras.

3.2 El ciclo celular en el cáncer cervical.

La progresión normal del ciclo celular es estrictamente controlada por diferentes grupos de proteínas altamente conservadas que garantizan el estado de homeostasis celular.

El desarrollo de la neoplasia cervical puede verse favorecido por la inactivación de vías reguladoras por medio de las cuales las células de la mucosa cervical controlan sus procesos fisiológicos. Es muy probable que en la carcinogénesis multifactorial del cuello uterino participen inicialmente

oncoproteínas virales que interactúan con una gama de proteínas celulares reguladoras, alterando finalmente el equilibrio entre las células que se dividen y proliferan y aquellas que deben desaparecer oportunamente, iniciando de esta forma la transformación neoplásica.

El cáncer surgirá como consecuencia de la acumulación secuencial de una serie de mutaciones que conducen a la proliferación celular descontrolada.

3.2.1 Proteínas reguladoras del ciclo celular normal: Ciclinas, kinasas dependientes de ciclina e inhibidores de la actividad kinasa.

Las moléculas que regulan el ciclo celular son universales y muy bien conservadas. Distintas proteínas ejercen el control en la entrada y la progresión a lo largo de las fases del ciclo celular (Lodish et al, 2004; Alberts et al, 2004).

El ciclo celular es un proceso complejo, estrictamente coordinado, que asegura la replicación completa y exacta del ADN antes de la división celular. La interfase de una célula epitelial eucariota comprende las siguientes fases: fase G1, fase S, fase G2 y fase de mitosis o M, con la cual finaliza la división celular.

Las células en estado de proliferación activa se encuentran en ciclo celular, proceso en el que existen diferentes puntos de vigilancia para garantizar que la replicación completa ocurra sólo en células normales, sobre todo sin daños a nivel del ADN. El control del ciclo celular está a cargo de un sistema complejo de *ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas* (revisado en Pines, 1995; Pines, 1999a).

La progresión a través de cada fase del ciclo celular está regida por una serie de pasos de fosforilación coordinados que activan complejos proteínicos para iniciar eventos específicos tales como la replicación de ADN, segregación cromosómica y la división celular. Estos complejos consisten en subunidades catalíticas de kinasas dependientes de ciclinas (CDK) y una subunidad reguladora de activación conocida como *ciclina* (Pines, 1999b).

Hay varias kinasas y ciclinas que controlan las diferentes fases del ciclo celular. Cuando una CDK es activada por una ciclina, la célula progresa hacia la fase que regula esta CDK en particular. Al completarse la fase, se desactiva el complejo, finaliza esta parte y se activan otros eventos que dan lugar a que la célula avance hacia un nuevo estado.

Así como existe esta actividad reguladora positiva de los complejos de CDK-ciclina, las células también cuentan con mecanismos reguladores negativos directos que inhiben la actividad de las CDK, cuyos encargados son los inhibidores de kinasas dependientes de ciclina o *CDKI* (Morgan 1995, 1997).

3.2.1.1 Ciclinas.

La familia de las *ciclinas* (ciclina A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E1, E2, F, G1, G2, H, I, K, T1 y T2) presente en todas las células, están estructural y funcionalmente relacionadas. Llevan esta denominación debido a que cada una de ellas se sintetiza en un momento determinado del ciclo celular, lo cual está regulado transcripcionalmente de forma que un complejo CDK-ciclina funcional activa un factor de transcripción que, a su vez, activa la síntesis de la nueva ciclina. El nivel de la CDK permanece constante (revisado en Jonson y Walter, 1999; Alberts et al, 2004).

Las ciclinas controlan el ciclo celular por síntesis y destrucción periódica. Las ciclinas forman complejos con las kinasas dependientes de ciclinas (CDK-ciclina) que controlan la progresión del ciclo celular mediante la activación de una serie de proteínas por fosforilación. Cuando ya no se requiere el complejo CDK-ciclina, esta última se degrada y los niveles de concentración descienden.

Las ciclinas están agrupadas de acuerdo a la fase del ciclo celular en que actúan: las de la fase G1 incluye a la ciclina D y E, que se encargan de regular la transición de la fase G1/S. La ciclina A está involucrada en la fase S/G2 tardía; y en la fase M, la ciclina B. El resto de estas proteínas están asociadas a la transcripción y fosforilación de la ARN polimerasa II (revisado en Johnson y Walter, 1999) .

3.2.1.1.1 Ciclina D.

La ciclina D controla el avance de la fase G1 hacia la fase S del ciclo celular, junto con las ciclinas E y A. Existe en tres formas: D1, D2 y D3, dependiendo del linaje celular. En la células epiteliales, la formación del complejo CDK4-6/ciclina D1 actúa al inicio de la fase G1 y una de sus principales dianas es el producto del gen *Retinoblastoma*, que en su estado hipofosforilado libera al factor de transcripción E2F para dar inicio a la síntesis de proteínas (entre otras a la ciclina E) requeridas para entrar a la fase S y síntesis de ADN (Dowdy et al, 1993).

Por tanto, los niveles de expresión de la ciclina D1 están regulados por la pRb. Si la pRb se encuentra mutada o inactivada funcionalmente los niveles de la ciclina D1 serán mínimos (Müller et al, 1994; Lukas et al, 1994).

La inhibición de los complejos CDK4-6/ciclina D1 está a cargo por las proteínas inhibidoras de CDK: p15, p16, p21, p27, consideradas por ello supresoras de tumor. Las proteínas p15 y p27 inducen el detenimiento de la fase G1 en respuesta al factor de crecimiento transformante β (TGF- β). La proteína p16 inhibe a las CDK4 y 6 por unión competitiva con la ciclina D1; p15 también se une a CDK4.

3.2.1.1.2 Ciclina E.

La ciclina E se sintetiza hacia la fase G1 tardía y es indispensable para ingresar a la fase S. En las células normales, la expresión de ciclina E disminuye rápidamente a medida que la célula entra a la fase S. La ciclina E forma un complejo con la CDK2 que fosforila también a la pRb y otras proteínas afines, liberando al factor E2F, paso esencial para la transición hacia la fase de síntesis de material genético (Koff et al, 1991).

La regulación de la expresión de la ciclina E en parte está a cargo del TGF- β , el cual activa al inhibidor de kinasa p27. Tanto p27 como p21 interactúan e inhiben al complejo CDK2/ciclina E. De esta forma, pueden inducir el detenimiento de la fase G1 avanzada, cuando es requerido.

3.2.1.1.3 Ciclinas A/B.

La ciclina A forma el principal complejo de la fase S con CDK2, siendo necesario en la replicación del ADN. Este complejo interactúa con la p107 y E2F y es inhibido por la proteína p21. Al final de la fase S, la ciclina A se une con preferencia a la CDK1 permitiendo el avance hacia la fase G2. Además, parece intervenir en la iniciación de la mitosis, aunque la principal ciclina en esta fase es la ciclina B (MPF), que se encarga de catalizar la subunidad proteína kinasa CDC2 (CDK1) para promover la mitosis (Zerfass et al, 1995; Inocente et al, 1999).

3.2.2. Kinasas dependientes de ciclinas (CDK).

La progresión del ciclo celular requiere de la activación coordinada de varias kinasas dependientes de ciclina (CDK-ciclina), algunas de las cuales son activadas mediante la unión con su respectiva subunidad de ciclina para funcionar durante un determinado momento del ciclo celular. Se han identificado 9 CDK (CDK1-CDK9) que contienen aproximadamente 300 aminoácidos y muestran un 75% de homología en sus secuencias (revisado en Alberts et al, 2004).

Las integrantes de la familia de CDK cumplen funciones específicas una vez activadas. El principal mecanismo de activación ocurre con la unión a su subunidad de ciclina reguladora y la consecuente fosforilación a cargo de una kinasa de activación de CDK designada como CAK (Morgan, 1997).

Además de la unión a la ciclina, también existen otros niveles de regulación de la actividad kinasa durante el ciclo celular, que se pueden resumir en:

- La fosforilación de la CDK, que regula la actividad de estas proteínas positiva o negativamente (Arellano y Moreno, 1997).
- La vía de la proteólisis mediada por la ubiquitina, que dianiza ciclinas y CDK para su destrucción en el momento oportuno del ciclo celular. Esta irreversibilidad de la proteólisis garantiza la direccionalidad del ciclo celular (Pagano, 1997).

- La acción de las proteínas inhibidoras de kinasas dependientes de ciclinas (Cho et al, 2002).

3.2.3 Inhibidores de las kinasas dependientes de ciclinas (CDKI).

Las proteínas inhibidoras de CDK-ciclinas modulan la actividad del ciclo celular. Las CDKI están divididos en 2 grupos (revisado en Sherr, 2000):

1. *INK4* que inhiben los complejos CDK-ciclinas en las que están involucradas las CDK4, CDK6 y la ciclina D1 expresadas en la mitad de la fase G1; dentro de este grupo se incluyen la p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c y p19INK4d. Su principal función en el ciclo celular es prevenir la formación del complejo CDK4-6 con las ciclinas tipo D.
2. *WAF1/KIP/CIP1* que incluye a las proteínas p21WAF1/CIP1/SDI1, p27KIP1 y p57KIP2. La p21 es considerada el "inhibidor universal" ya que interactúa con varios complejos de CDK/ciclina a través del ciclo celular.

Los niveles de expresión de los CDKI están influenciados por la inducción del producto de genes supresores de tumor (p53) o por la degradación de proteínas (Alberts et al, 2004). La expresión de estos CDKI tiene en algunos tumores un significado pronóstico.

3.2.3.1 p16INK4a.

La p16INK4a es una fosfoproteína, producto del gen supresor de tumor *CDKN2* que, al igual que otras proteínas, se encarga de regular la progresión del ciclo celular al actuar como un inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas. Estas últimas tienen como función principal regular la actividad supresora de la pRb sobre el factor de transcripción E2F que estimula la expresión de genes requeridos en la fase S del ciclo celular (Serrano et al, 1993; Serrano, 1997).

Existe, entonces, una relación inversa entre la expresión de p16 y la presencia de pRb normal. La p16 se detecta cuando la pRb está mutada, deletada o inactivada y, se reduce o está ausente en células que

contienen pRb con actividad normal. Además, la acumulación intracelular significativamente elevada de la p16 ocurre como respuesta a los también niveles elevados de E2F libre, en ausencia de una pRb funcional (Kleif et al, 1996).

3.2.3.2 p21WAF1/CIP1/SDI1.

La p21WAF1 fue el primer CDKI identificado y es de naturaleza multifuncional. Tiene la propiedad de interactuar principalmente con la CDK2, aunque podría unirse también a otras CDK dependientes de ciclinas (Xiong et al, 1993).

La p21 es la principal diana transcripcional de la proteína supresora de tumor p53 en presencia de un daño en el ADN celular. En esta situación, es considerada un determinante crítico del detenimiento de la fase G1 que se produce en respuesta a dicho daño, con la finalidad de que este sea reparado. La paralización de la fase G1 inducida por p21 ocurre mediante dos vías: por inhibición de los complejos CDK/ciclina y por la inhibición de la síntesis de ADN al unirse al factor PCNA (el-Deiry et al, 1994).

La proteína p21 interactúa directamente con PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). Este factor prolonga la acción de la ADN polimerasa y es un componente de la maquinaria de reparación de ADN. Así, este CDKI logra bloquear la función que cumple PCNA en la replicación de ADN celular (Li et al, 1994).

Además, p21 es capaz de inhibir al factor de transcripción E2F independientemente de la pRb y, por tanto, la pérdida de la p21 representa también la pérdida de la inhibición de la proliferación celular (Jones et al, 1997).

Finalmente, la p21 tiene la capacidad de responder a otras señales independientes de las emitidas por la p53. Michieli et al, 1994, demostraron que la vía de la p21 puede inducirse en respuesta a mitógenos como los factores de crecimiento fibroblástico o epidérmico en células con p53 deficiente y en células normales. Esta proteína, además, ha sido implicada

en la diferenciación terminal y en el estado de reposo celular (Pines, 1994; Coffman y Studzinski, 1999; Aliouat-Denis et al, 2005).

3.2.3.3 p27KIP1.

La proteína p27KIP1 actúa inhibiendo a los complejos de proteínas kinasas dependientes de ciclina CDK2/4, considerada por ello una proteína supresora de tumor debido a su carácter de regulador negativo de la fase G1. La actividad de p27 se ve seriamente afectada en las células tumorales lo cual representa un mal pronóstico para el paciente con cáncer (Toyoshima y Huntten, 1994).

La p27 es una proteína multifuncional que interviene en una serie de eventos celulares de regulación entre los que se podrían mencionar (revisado en Sgambato et al, 2000):

- Es un regulador negativo del ciclo celular, al unirse al complejo CKD2/ciclina E.
- Regula la diferenciación celular ya que induce el estado de quiescencia celular o de reposo, por bloqueo y cese de la división mitótica.
- Tiene un efecto pro-apoptótico, que surge como un mecanismo homeostático en respuesta a la proliferación celular excesiva y descontrolada.

La regulación de la p27 ocurre mediante varios mecanismos (revisado en Slingerland y Pagano, 2000):

- Disminuye su expresión cuando la célula recibe señales mitogénicas. La tendencia en esta situación es la degradación rápida de la p27 por la vía de la ubiquitina-proteosoma.
- Cuando hay señales mitogénicas, se incrementa la actividad kinasa del complejo CDK2/ciclina E, el cual es capaz de fosforilar la p27 y que su degradación sea más intensa.
- Es posible que la actividad supresora de p27 se vea bloqueada por la interacción directa con oncoproteínas virales como la E7 de los papilomavirus oncogénicos.

- La sobreexpresión de protooncogenes como *ras* inducen la degradación de la p27 por la vía ubiquitina-proteosoma y la sobreexpresión de *c-myc* impide la formación del complejo p27-CDK2/ciclina E.
- Cuando la célula ha completado su diferenciación, la p27 se incrementa con la finalidad de detener la división celular al recibir señales intercelulares o también puede sobreexpresarse como mecanismo homeostático en aquellas neoplasias con proliferación celular descontrolada.
- Esta proteína es sintetizada en respuesta a la inhibición de contacto o por el factor de crecimiento tumoral (TGF- β) según Polyak et al, 1994.

La p27KIP1 es un inhibidor del ciclo celular que se incrementa fundamentalmente en respuesta a estímulos antimitogénicos. Esta proteína actúa en las fases G0 e inicio de G1 del ciclo celular para inhibir a las CDKs de esta fase, siendo su principal objetivo el complejo CDK2-ciclina E para suprimir la proliferación celular (Slingerland y Pagano, 2000).

En general, los niveles y actividad de la p27 son constantes durante todo el ciclo celular. La pérdida excesiva de p27 se eleva en tumores humanos agresivos y podría conferirles una ventaja de crecimiento.

Finalmente, la carencia de la fidelidad del progreso controlado del control del ciclo celular crea definitivamente una situación de inestabilidad genética, lo cual parece ser un factor contribuyente al desarrollo de las células malignas. Por tanto, el cáncer es considerado una enfermedad que se caracteriza por una regulación anormal del crecimiento y proliferación celular (Galloway y McDougall, 1996; Hanahan y Weiber, 2000).

3.2.4 Productos de los genes supresores de tumor.

La progresión del ciclo celular en forma armónica puede verse afectada por uno o varios factores que actuando en forma aislada o en conjunto llevan a la disregulación del mismo. En la transición de la fase G1/S es donde se producen las alteraciones con consecuencias más graves. A este nivel, se

pueden inactivar proteínas transcendentales, ya sea por mutación genética o por inactivación funcional, entre las cuales tenemos los productos de los genes supresores de tumor *TP53* y *RB* (revisado en Alberts et al, 2004).

El papel de los genes supresores de tumor en el desarrollo de las neoplasias malignas humanas ha sido motivo de innumerables estudios; más aún en aquellos donde se involucra la acción viral en el proceso de carcinogénesis, como es el caso del cáncer de cuello uterino donde la infección por HPV de alto riesgo oncogénico es factor protagónico, pues sus oncogenes E6 y E7 inactivan funcionalmente los productos de estos genes supresores de tumor, p53 y pRb respectivamente, alterando de tal forma los mecanismos de control celular que se permite el crecimiento y mantenimiento de la enfermedad maligna cervical (zur Hausen, 2000; Salcedo et al, 2002).

3.2.4.1 La proteína supresora de tumor pRb.

Las señales antiproliferativas podrían bloquear el crecimiento celular mediante diferentes mecanismos y muchas de ellas son canalizadas por el producto del gen *retinoblastoma*, la proteína pRb.

La proteína Rb es una fosfoproteína nuclear que interviene en el control de la división y diferenciación celular. Su función principal es la regulación de los factores de transcripción E2F. Esta proteína pRb presenta en su porción central una hendidura que le permite secuestrar al factor E2F, que transcribe genes cuyos productos son requeridos para la progresión del ciclo celular y conducir la maquinaria de replicación del material genético (revisado en Alberts et al, 2004).

La actividad de la pRb, cuya concentración a diferencia de las ciclinas permanece fija a lo largo del ciclo celular, es regulada en base a su estado de fosforilación. Así tenemos que la pRb se encuentra en dos estados de fosforilación: hipofosforilada e hiperfosforilada.

La pRb se encuentra en su forma activa cuando está hipofosforilada. De esta forma secuestra al factor de transcripción E2F, actuando como un freno

del ciclo celular a nivel de la fase G1 tardía. Por otro lado, si la célula recibe una señal para dividirse, el complejo CDK4-6/ciclina D1 fosforila a la pRb, la cual pasa a su forma inactiva (hiperfosforilada), liberando a E2F que se encargará de transcribir genes cuyos productos son necesarios para iniciar a la fase S.

Muchos tipos de cáncer humano se caracterizan por mostrar mutaciones o deleciones en el gen *Retinoblastoma*, lo que permite que la células avancen despreocupadamente hacia la fase S (Robbins, 2000).

La detección inmunohistoquímica de la pRb en tejido normal se hace más fuerte a medida que las células adquieren mayor madurez y diferenciación, para luego disminuir o presentar reacciones no detectables (Salcedo et al, 2002).

3.2.4.2 La proteína supresora de tumor p53.

El producto del gen supresor de tumor *TP53*, la proteína p53 que es una fosfoproteína nuclear cuya principal función es controlar la progresión del ciclo celular mediante la vigilancia de la integridad del genoma. La concentración de la p53 normal o tipo "silvestre" en células normales es baja pero su nivel puede sufrir un rápido incremento cuando se detecta algún tipo de daño que afecta al ADN celular y por tanto a la integridad del genoma (revisado en Sidransky y Hollstein, 1996).

El gen *TP53* es la diana más frecuente de las alteraciones genéticas en el cáncer humano. Cerca del 50% de los tumores malignos humanos contienen mutaciones en este gen (Robbins, 2000).

La p53 cumple diversas funciones como punto de control del ciclo celular a nivel de la fase G1/S y luego en la fase G2/M; por tanto, su actividad es crítica como supresor de tumor. Esta proteína supresora de tumor es miembro principal de la maquinaria del proceso de muerte celular programada o apoptosis (Sidransky y Hollstein, 1996).

La primera vía de acción de la p53 es la supresión del crecimiento de células genéticamente dañadas con elevado potencial neoplásico a cargo de la p53 normal. Ocurre mediante dos mecanismos a saber: a) impide la proliferación de células con material genético defectuoso, al actuar como factor de transcripción en las fases G1/S y posteriormente en G2/M (el-Deiry et al, 1994; Innocente et al, 1999); b) estimula el detenimiento del ciclo celular mediante la inducción del inhibidor del complejo CDK/ciclina, la proteína p21WAF1 (el-Deiry et al, 1994).

La segunda vía de acción de la p53 ocurre si el daño en el ADN es irreparable promoviendo la salida del ciclo celular cuando activa a otros genes que, a su vez, se encargan de poner en marcha la maquinaria que dará como resultado el fenómeno de muerte celular programada o apoptosis, eliminando a la célula alterada de la población general de forma permanente (revisado en Haupt et al, 2003). Este aspecto será tratado con detalle más adelante.

La actividad del producto del gen supresor de tumor *TP53* está regulada fundamentalmente por el producto del gen *MDM-2*, el cual forma un complejo con la p53 y bloquea su función (Momand et al, 1992).

MDM-2 es una proteína ubiquitina ligasa E3 cuya función es ejercer control sobre la p53, inhibiendo la actividad transcripcional de esta proteína supresora de tumor, favoreciendo su salida del núcleo y estimulando su degradación por la vía de la ubiquitina-proteosoma (Haupt et al, 1997; Chene, 2003).

La unión del CDKI p19ARF para formar complejo con MDM-2 afecta su actividad ubiquitina ligasa, permitiendo así la estabilización de p53 fosforilada (Honda y Yasuda, 1999). Además, la p53 ejerce un autocontrol induciendo la expresión de MDM-2 minutos después de que esta proteína supresora de tumor ha sido inducida (Haupt et al, 1997).

La combinación del estudio de la inmunexpresión de las proteínas supresoras de tumor p53 y pRb con el estudio de otros biomarcadores que

reflejen el proceso de carcinogénesis como por ejemplo: otras proteínas reguladoras del ciclo celular o particularmente, la infección de la mucosa cervical con papilomavirus humano, constituye en la actualidad el objetivo de diversas investigaciones con la finalidad de comprender mejor dicho proceso, aclarar incógnitas y aportar métodos que permitan predecir la capacidad de progresión de las lesiones implicadas y, en otros casos, su pronóstico.

3.2.5 Virus papiloma humano y el ciclo celular del cáncer de cuello uterino.

Debido a que el genoma los papilomavirus no codifica enzimas que le permitan replicarse de forma independiente, estos virus sí que expresan genes cuyos productos (**E5, E6 y E7**) tienen como dianas los principales puntos de vigilancia del ciclo celular, constituidos por una serie de proteínas reguladoras a las que bloquean funcionalmente, alterando así la maquinaria celular para su propio beneficio, tanto a nivel de las fases G1/S así como G2/M (zur-Hausen, 2000).

Las células malignas muestran típicamente anomalías en los mecanismos que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia (Hanahan y Weinberg, 2000; Malumbres et al, 2002). El papilomavirus humano oncogénico estimula la progresión celular descontrolada evadiendo los sistemas reguladores celulares e induciendo la replicación de ADN celular anormal con acumulación de anomalías genéticas (revisado en: Galloway y McDougall, 1996; Southern y Herrington, 2000; Clarke y Chetty, 2001; Cho et al, 2002).

El virus papiloma humano (HPV) es considerado el carcinógeno inicial y directo causante de la transformación neoplásica de la superficie epitelial del cuello uterino. Los HPV de alto riesgo oncogénico modulan la función de una variedad de proteínas celulares involucradas en el control del ciclo celular y la replicación del genoma celular (Clarke y Chetty, 2001).

Durante el proceso de la carcinogénesis cervical, los puntos de control más importantes a nivel de la fase G1 inicial son bloqueados funcionalmente por las oncoproteínas virales E6 y E7, hecho que conduce, con el tiempo, a la acumulación de anormalidades genéticas y a una eventual transformación maligna (Galloway y McDougall, 1996).

3.2.5.1 HPV y proteínas supresoras de tumor.

Las oncoproteínas virales E6 y E7 tienen la habilidad de controlar el ciclo celular mediante la inactivación funcional de las proteínas supresoras de tumor **p53** y **pRb**, respectivamente (Southern y Herrington, 2000).

La oncoproteína viral **E6** tiene como diana principal la proteína supresora de tumor **p53** (zur-Hausen, 2000). La inactivación y degradación por ubiquitinización de p53 mediada por E6-HPVAR, traería como consecuencia la superación de los sistemas reguladores impuestos en G1 y G2 con la progresión del ciclo celular de forma descontrolada con ADN dañado; el bloqueo de la muerte celular programada; el impedimento de la actividad transcripcional del inhibidor de kinasa dependiente de ciclina (p21WAF1) por parte de este supresor de tumor; y, finalmente, la inducción de anormalidades cromosómicas numéricas; todo ello en sincronización con la inactivación de la pRb/E7 (Hickman et al, 1994; Hickman et al, 1997; Giannoudis y Herrington, 2000).

Es posible también, aunque en un pequeño porcentaje de carcinomas cervicales, que el gen *TP53* esté mutado y este evento parece no estar relacionado con la presencia o ausencia de la infección por HPV (Tommasino et al, 2003).

La expresión inmunohistoquímica de p53 en el tejido cervical neoplásico depende de si este gen está mutado, si el producto está presente en su forma "silvestre" o si ha sido degradado por inducción E6 de papilomavirus. Encontramos, entonces, heterogeneidad en la expresión de esta proteína, con ausencia de expresión, niveles muy bajos o por el contrario, con sobreexpresión inmunohistoquímica en comparación con el tejido cervical

normal (Helland et al, 1993; Benjamín et al, 1996; Hunt et al, 1996; Avall-Lundqvist et al, 1997; Troncote et al, 1998; Tsuda et al, 2003; Horner et al, 2004).

La falta de control del ciclo celular por parte de la p53 también afecta dichas actividades en las fases G2/M, provocando anomalías cromosómicas numéricas y estructurales lo que indica su importancia en el mantenimiento de la integridad genómica (Thomas y Laimins, 1998).

Dellas y cols (1997) analizaron el patrón de expresión de p53 y su proteína reguladora MDM-2 en la neoplasia cervical y detectaron sobreexpresión de ambas proteínas.

La acumulación de p53 y la expresión de MDM-2 son más altas en carcinomas que en lesiones precancerosas del cuello uterino, existiendo además una correlación inversa entre la proliferación tumoral incrementada y la expresión de MDM-2 en carcinomas invasores.

Es posible que se encuentren diferentes fenotipos tumorales que demuestran la frecuente expresión aberrante de MDM-2 en la neoplasia cervical. Por ejemplo, en el caso de estar asociado un HPV, la lesión cervical mostrará inmunoreactividad negativa para p53 al igual que para MDM-2. Si se trata de inestabilidad genética, la expresión de p53 será importante pero con negatividad para la proteína MDM-2. Si existen mutaciones en el gen *TP53* o amplificaciones del gen *MDM-2* encontraremos otros fenotipos de expresión inversa (Dellas et al, 1997).

Skomedal y cols (1999) refieren que MDM-2 inclusive podría proteger a la proteína p53 de la degradación inducida por HPV, con lo cual es posible que la expresión de p53 en lesiones cervicales asociadas a HPV esté aumentada.

Lo anterior permite, entonces, deducir que es posible encontrar variaciones en la inmunoreactividad de MDM-2 y p53 en tejido cervical neoplásico, constituyendo un reflejo directo de la variedad de mecanismos biológicos de

carcinogénesis y progresión tumoral originados a partir de diferentes factores etiopatogénicos.

Es posible que MDM-2 también interactúe con la proteína supresora de tumor pRb, con lo cual, además de inhibir la función supresora de p53, también tiene efecto sobre la pRb, favoreciendo más aún el desarrollo y crecimiento neoplásico (Xiao et al, 1995).

MDM-2 es una proteína ubiquitina ligasa E3 cuya función es ejercer control sobre la p53, inhibiendo la actividad transcripcional de esta proteína supresora de tumor, favoreciendo su salida del núcleo y estimulando su degradación por la vía de la ubiquitina-proteosoma (Haupt et al, 1997; Chene, 2003).

La unión de p19ARF a MDM-2 afecta su actividad ubiquitina ligasa, permitiendo así la estabilización de p53 fosforilada (Honda y Yasuda, 1999). Además, la p53 ejerce un autocontrol induciendo la expresión de MDM-2 minutos después de que esta proteína supresora de tumor ha sido inducida.

La **pRb** puede estar expresada en células del cáncer humano y en el tejido normal, incluyendo el cuello uterino. La unión y degradación de pRb por **E7-HPV** es esencial para mantener la proliferación de las células cervicales malignas, con lo cual la pRb está más disminuida en las lesiones cervicales invasivas que en la intraepiteliales (Salcedo et al, 2002).

Sin embargo, Amortegui et al en 1995 reportan que la tinción de la pRb es más frecuentemente encontrada en LIE y en carcinomas cervicales comparada con el tejido cervical normal o con atipia reactiva, alcanzando valores tan elevados como el 93%.

La expresión de la oncoproteína E7 conduce a la suspensión de varias señales reguladoras de crecimiento negativas, incluyendo el detenimiento de la fase G1 mediado por la proteína p53, la inhibición del crecimiento mediado por el factor anti-crecimiento TGF- β y la entrada al estado de reposo (G0) de los keratinocitos suprabasales (Jones et al, 1997).

Además de la inactivación de la función de la pRb, E7-HPV es capaz de interactuar y provocar la interrupción de los complejos de CDK/ciclinas a nivel de las fases G1 y S del ciclo celular (Galloway y McDougall, 1996).

3.2.5.2 HPV y ciclinas, kinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de la actividad kinasa.

Otras vías reguladoras afectadas por la intervención de las oncoproteínas E6/E7 independientes de la vía de la pRb, incluye a los miembros de los complejos kinasas dependientes de ciclinas (fundamentalmente a las ciclinas de la fase G1) y a los inhibidores de estos complejos: p16, p21 y p27 (Cho et al, 2002).

La sobreexpresión de la **ciclina D1** es una de las alteraciones más comúnmente observadas en los tumores malignos humanos (Fu et al, 2004). Esta proteína muestra características de un oncogene humano. La ciclina D1 forma asociaciones físicas con muchos factores de transcripción así como con receptores nucleares: por ejemplo los estrogénicos, lo cual favorece la proliferación celular (Gladden y Diehl, 2005).

Los niveles de expresión inmunohistoquímica de la ciclina D1 en lesiones cervicales pueden estar significativamente bajos en carcinomas y adenocarcinomas con ADN-HPV positivo y considerados de mal pronóstico con posibilidades de recidiva (Cho et al, 1997; Bae et al, 2001; Cheung et al, 2001), aunque Nichols et al en 1996 reportaron elevados niveles de ARNm de ciclina D1 en cáncer cervical que no se asociaron a niveles semejantes de la proteína.

Tampoco se ha encontrado relación entre la expresión de la ciclina D1 y parámetros clinicohistopatológicos como, por ejemplo, el tipo histológico de cáncer cervical y la edad de la paciente (Skomedal et al, 1999).

La ciclina D1 y la proteína E7-HPV poseen una región de unión a la pRb similar, con lo cual la expresión de la ciclina D1 (innecesaria) puede verse

disminuida debido a dicha unión y al mantenimiento de factor E2F libre, con la constante proliferación celular (Kim y Zhao, 2005).

Los niveles de **ciclina E** (inducida por la liberación de E2F y requerida para la transición de la fase G1 a la S) y la CDK2 asociada se encuentran incrementados en las células cervicales premalignas y malignas con expresión de E7-HPV, ya que tienen un papel fundamental en la replicación del ADN (Duronio et al, 1996).

La expresión de la ciclina E muestra un patrón anormal cuando se trata de células tumorales. Los niveles de ciclina E tienden a disminuir a medida que la célula normal avanza en el ciclo y se intensifica la reducción cuando entra en fase S. En trabajos realizados por Cho et al, 1997 y Kim et al, 2000, el índice de expresión de la ciclina E se encontró incrementado con significancia estadística en casos positivos para HPV.

En líneas celulares derivadas de carcinomas y tumores humanos (cervicales, mamarios y prostáticos) el patrón de expresión tiende a ser anormal, debido a que al pasar hacia la fase S e inclusive en la fase G2, estas células incrementan la expresión progresiva de la ciclina E, relacionándose este hecho con un mal pronóstico (Erlandsson et al, 2003).

Los mecanismos puestos en acción por parte de las oncoproteínas de los HPV oncogénicos podrían contribuir en la expresión aberrante de la ciclina E en las lesiones cervicales. La liberación del factor E2F por acción de E7 sobre pRb conseguiría provocar el incremento de los niveles de la ciclina E y de la actividad proliferativa, en combinación con la acción bloqueante de E7/p21 (Cho et al, 2002).

Las lesiones cervicales escamosas y glandulares asociadas a HPV muestran una expresión incrementada de la ciclina E en comparación con el epitelio cervical normal. En este último, la detección de esta ciclina es muy leve correlacionada con la disminución de p21, p27 y con el incremento de E2F (Cho et al, 1997; Dellas et al, 1998).

La oncoproteína E7 de los HPVVAR tiene la capacidad de bloquear la actividad inhibidora de **p21(WAF1)** sobre la CDK así como la replicación del ADN dependiente del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), a través de la inhibición directa de la p21 cuando se une a ella por medio de la terminación carboxilo de la p21 (Funk et al, 1997; Jones et al, 1997).

En el cáncer cervical podemos encontrar niveles de expresión inmunohistoquímica de la p21 disminuidos o bien podría estar sobreexpresada. Skomedal et al, 1999b encontraron niveles elevados de p21 en lesiones cervicales, que se intensificaban a medida que la lesión avanzaba en severidad, coincidiendo con los hallazgos de Lie et al, 1999 y Bae et al, 2001.

Por el contrario, Kim et al, 1998, Huang et al, 2001 y Lu y cols en el 2005, encontraron que la p21 estaba disminuida en los casos de carcinoma invasor incluidos en sus respectivos estudios, al compararlos con el tejido cervical normal.

Del estado en que se encuentre la p21 en las células malignas dependerá su detección inmunohistoquímica. Así tenemos que esta proteína podría estar mutada (aunque es un hecho raro entre los carcinomas cervicales), o bloqueada por la oncoproteína E7-HPVAR o que sus dianas estén sobreexpresadas y que sea insuficiente para contrarestar la acción de esta última (Bae et al, 2001).

La oncoproteína E6 y también la E7 utilizan la vía ubiquitina-proteosoma para "marcar" a sus proteínas dianas p53 y pRb, respectivamente, inactivarlas y provocar su degradación rápida. De igual forma ocurre con la p21 que eleva sus niveles en respuesta a las señales de p53 aunque esté bloqueada, y es entonces degradada rápidamente mediante dicha vía (Scheffner y Whitaker, 2003).

En cuanto a la proteína inhibidora de CDK dependiente de ciclina **p27CIP1**, según Polyak et al 1994, podría ser secuestrada e invalidada para actuar

sobre el complejo CDK2/ciclina E en aquellas células con excesiva proliferación.

Es posible también que la p27 sea inactivada funcionalmente cuando se unen a ella oncoproteínas virales tales como E7 del HPV16. La habilidad de E7-HPV16 para esquivar ciertas formas que detienen la fase G0/G1 está mediada en parte por la unión física de esta oncoproteína viral a la p27 y la posterior inactivación de este inhibidor de la actividad kinasa (Zerfass-Thome et al, 1996).

Kim y cols en el 2000, realizaron una investigación para evaluar la expresión de p27 y la ciclina E sobre biopsias cervicales que incluyeron 45 carcinomas cervicales invasivos y 23 NIC, además de un grupo control (n=22) y reportaron que el índice de expresión de p27 fue significativamente más bajo (15.2%) en pacientes con infección por HPV que en aquellas pacientes sin infección. A medida que avanza el grado de la lesión, los niveles de p27 disminuyen: 65% en tejido normal, 32% NIC y 24,8% en carcinoma cervical, con lo cual concluyen que la p27 podría verse desregulada en cuanto a expresión en fases iniciales de la carcinogénesis cervical que precede al desarrollo tumoral invasivo.

Según Troncone et al, 1999, el cáncer cervical podría mostrar reducción de la expresión de p27 independientemente de la actividad proliferativa y estos cambios en la expresión podrían estar relacionados a la cinética no regulada en la carcinogénesis cervical.

Shiozawa et al, 2001, demuestran que la p27 cumple la función de unirse a CDK2, específicamente en tejidos provenientes de carcinomas invasores cervicales e, inclusive, la ciclina E también se encontraba formando parte del mismo complejo conservando su capacidad fosforilativa. Es posible que la función de p27 sea insuficiente y su degradación sea inducida por fosforilación a cargo del complejo CDK2/ciclina E.

Finalmente, Sgambato et al en 2000 concluyen que la p27 tiende a disminuir en presencia de un daño oxidativo en el ADN de las células malignas de la mucosa cervical y su expresión es menor a medida que el tumor es más indiferenciado. El *stress* oxidativo puede ocurrir por exposición a oxidantes ambientales o durante el proceso metabólico endógeno. El daño genotóxico ocasionado por *stress* oxidativo ha sido sugerido como un factor de riesgo para cáncer.

Actualmente se evalúa con intensidad e interés la expresión celular de la proteína reguladora **p16(INK4a)** mediante técnicas inmunohistoquímicas para determinar su valor como marcador de diagnóstico y pronóstico en las lesiones neoplásicas del cuello uterino, tanto en muestras de tejido como en citologías cervicovaginales compatibles con neoplasia intraepitelial cervical y carcinoma epidermoide, así como casos de adenocarcinoma endocervical y precursores asociadas a infección por HPV (von Knebel Doeberitz, 2001).

Los resultados de muchas investigaciones han permitido concluir que la inmunodetección de la p16 podría ser un marcador sensible y específico de lesiones cervicales clínicamente significativas asociadas a infección por HPV (Sano et al, 1998 a,b; Keating et al, 2001; Klaes et al, 2001; Bibbo et al, 2002; Schorge et al, 2004; Tringler et al, 2004; Trunk et al, 2004).

La proteína p16 es inactivada por varios mecanismos genéticos incluyendo mutaciones puntuales, deleciones homocigóticas e hipermetilación del promotor de p16. Estos eventos epigenéticos son raros en la neoplasia cervical (Kim et al, 1998).

Las bases moleculares de la expresión de p16 aún no están claras totalmente. Es posible que una mutación genética le confiere una vida media más larga o la interacción de la oncoproteína E7 con la pRb provoca un incremento de p16 al detectar niveles elevados de E2F (Giarre et al, 2001).

Todo lo anteriormente expuesto permite deducir que la transformación neoplásica de las células infectadas por los papilomavirus humanos oncogénicos requiere de la acción de estos virus durante cierto tiempo, lo cual permitiría la interferencia viral en la acción de las proteínas claves encargadas de la regulación del ciclo celular y eventos significativos como la apoptosis, estimulando a receptores para distintos factores de crecimiento y activando la telomerasa (detallada más adelante) responsable de la inmortalización celular.

A continuación, en la figura N° 9, se muestra en forma esquemática y resumida la interrelación entre las oncoproteínas virales E6/E7 con los sistemas reguladores del ciclo celular que conllevan al desarrollo de la neoplasia cervical invasora.

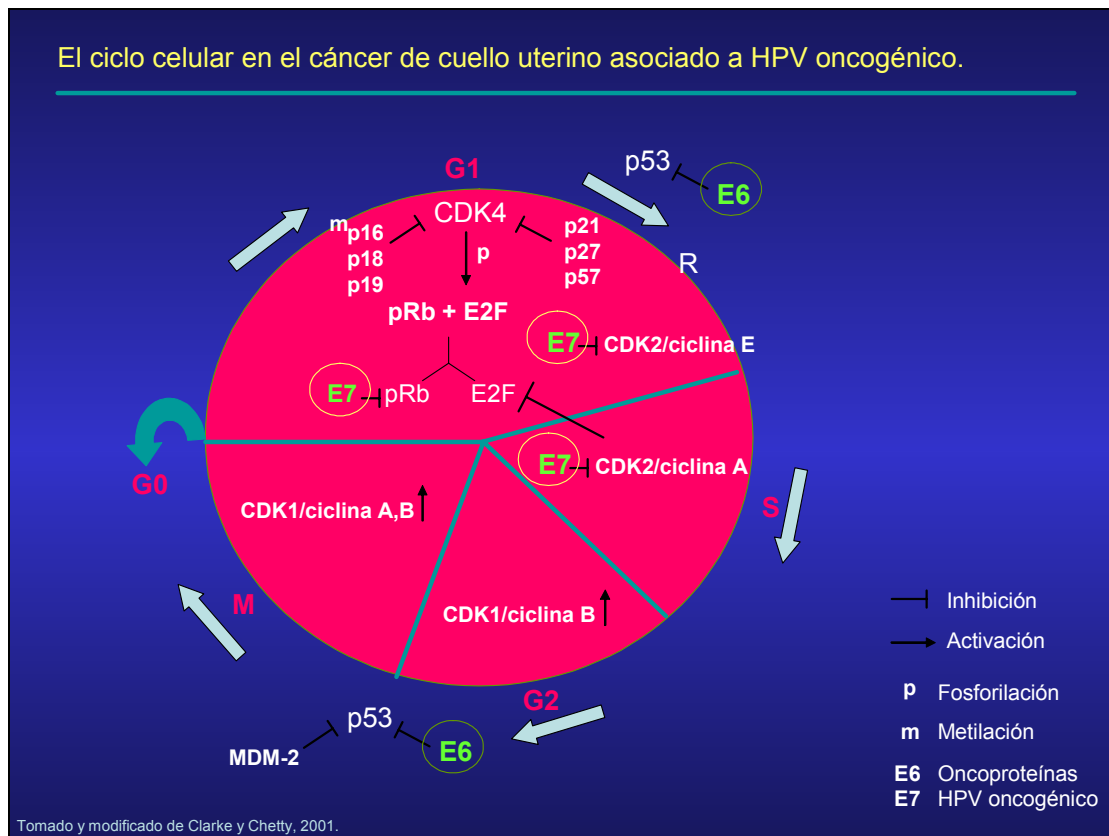


Figura N° 9. El ciclo celular en el cáncer de cuello uterino asociado a infección por HPV oncogénico.

3.3 Marcadores de la apoptosis en el cáncer cervical.

La muerte celular programada o apoptosis es un evento natural que ocurre para mantener el equilibrio entre las células que se producen y las que mueren. Por tanto, está involucrado en la regulación y mantenimiento de la población celular del tejido en condiciones fisiológicas y patológicas. También ocurre en respuesta a una injuria irreparable sobre el material genético.

Los defectos en la maquinaria apoptótica, incluyendo sus miembros sensores-efectores y su interrelación, podrían conllevar al surgimiento del cáncer, enfermedades autoinmunes, difusión y persistencia de infecciones virales y desordenes neurovegetativos.

Las células malignas gozan de excesiva supervivencia e inmortalización, lo que permite al tumor crecer, promover su progresión y finalmente producir metástasis. En el cáncer cervical, los papilomavirus humanos oncogénicos tienen la habilidad de interferir en las señales apoptóticas e incluso interrelacionarse con las proteínas apoptóticas para desequilibrar el proceso e impedir que las células mueran contribuyendo al avance de la condición neoplásica del tejido cervical.

3.3.1 Muerte celular programada: apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada es un evento fundamental tanto en las poblaciones celulares normales como en las neoplásicas. La apoptosis contribuye en el mantenimiento de la homeostasis y proliferación celular apropiada, al eliminar las células que han envejecido o que están en exceso, aquellas que poseen un potencial de transformación neoplásica debido a la existencia de material genético dañado y las células que están infectadas (Kerr et al, 1994).

La apoptosis se caracteriza morfológicamente por el rompimiento de la membrana plasmática; por la condensación y fragmentación de la célula y su núcleo; y, finalmente, por la formación de cuerpos apoptóticos (Robbins, 2000).

Un complejo balance entre la proliferación celular y la apoptosis mantiene la renovación celular normal. Los eventos genéticos conducen a un incremento en la proliferación y a una reducción de la apoptosis, que podría resultar entonces en el desarrollo de neoplasia.

La muerte celular ocurre cuando la célula recibe señales bien del medio extrínseco o desde su interior. Varias señales podrían disparar el inicio de la apoptosis y en general se presenta como parte de la regulación del ciclo celular (Haupt et al, 2003).

La apoptosis es un componente esencial en la respuesta celular al daño que sufra, como por ejemplo cuando se ve afectada por virus, los cuales desarrollan distintos mecanismos para la modulación de la apoptosis de la célula huésped. Los productos de los oncogenes virales podrían interferir tanto en los mecanismos efectores de la apoptosis como en los reguladores (Thomson, 2001).

La habilidad de las células tumorales para expandirse depende de las células anormales que se generan y de las células que a su vez mueran. Entre las alteraciones esenciales del cáncer, que en conjunto dictaminan el desarrollo tumoral, se presenta el hecho de un crecimiento celular excesivo, descontrolado y las alteraciones en el circuito de señalización que conlleva la apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2000).

La resistencia celular a la apoptosis puede adquirirse a través de una variedad de estrategias. La más común ocurre con la pérdida funcional (visto en aproximadamente el 50% de los cánceres humanos) del producto del gen supresor de tumor, la p53, considerado el principal regulador proapoptótico (Hanahan y Weinberg, 2000).

El gen *TP53* está involucrado en la regulación del crecimiento celular. La proteína p53 podría inducir la apoptosis en algunas células y podría reducir simultáneamente las funciones de algunos miembros antiapoptóticos de la familia de genes *Bcl-2* (Reed, 1994; Sidransky y Hollstein, 1996; Haupt et al, 2003)

La p53 podría inducir la apoptosis por cualquier mecanismo. Pero, a su vez, este proceso podría bloquearse por medio de la elevación de cualquier proteína antiapoptótica, especialmente la proteína *Bcl-2* (Waga et al, 1994).

La maquinaria apoptótica está conformada por miembros sensores (receptores de membrana, la proteína p53 y los miembros de la familia Bcl-2) y efectores: las caspasas (Fadeel et al, 1999; Borner, 2003).

Los miembros de la familia *Bcl-2* tienen como función principal mantener la integridad mitocondrial y controlar la liberación de las proteínas mitocondriales hacia el citosol (Reed, 1994; Borner, 2003). Este grupo abarca las proteínas que poseen una secuencia similar en 4 dominios llamados dominios de homología (BH) de Bcl-2 y está subdividido en dos grupos de genes que codifican las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xl, A1/BFL1 y MCL1 y las proteínas proapoptóticas Bax, Bak y Bok.

La proteína **Bax** puede formar homodímeros y también heterodímeros *in vivo* con otros miembros de la familia *Bcl-2*. La sobreexpresión de Bax implica la aceleración de la muerte celular programada ya que esta es necesaria para la liberación del citocromo c mitocondrial (Oltvai et al, 1993; Redd, 1994).

La proteína Bcl-2 ha surgido como un regulador crítico de la muerte celular programada en una variedad de contextos fisiológicos y patológicos, ya que actúa inhibiendo la apoptosis. Según Redd (1997) la proteína Bcl-2 posee una doble identidad, en el sentido de que puede ser una proteína formadora de canal en conjunto con Bax, que permite el flujo de iones como Ca^{+2} y proteínas como el citocromo c, a través de membranas intracelulares (mitocondrial, del retículo endoplásmico y de la envoltura nuclear).

Por otra parte, Bcl-2 es una proteína adaptadora y esto le permite interactuar con varias proteínas celulares (proteína quinasa Raf-1, CED-4 y la proteína de unión a p53: p53-EP, entre otras) con la consecuente inactivación funcional. La unión específica de Bcl-2 a la proteína p53-EP explicaría cómo la sobreexpresión de Bcl-2 podría interferir en el traslado de p53 desde el citosol al núcleo.

3.3.2 Apoptosis en el cáncer de cuello uterino.

El cáncer humano no sólo podría surgir por activación de oncogenes que promuevan y mantengan el crecimiento celular descontrolado como por ejemplo, la expresión del gen anti-apoptótico *Bcl-2* (Ryan et al, 1994), sino también por inactivación de genes que normalmente suprimen la proliferación en situaciones de estrés celular, como el gen supresor de tumor e inductor de la apoptosis, *p53* (Kerr et al, 1994). La carcinogénesis, entonces, dependerá no sólo de la habilidad para escapar al control del crecimiento sino también de la habilidad para prevenir la apoptosis.

La apoptosis ocurre espontáneamente en los tumores malignos. Se han reportado resultados contradictorios en relación al significado del papel de los eventos reguladores de la apoptosis de *p53/Bcl-2* en la carcinogénesis cervical (Pillai et al, 1999).

Considerando que la infección por HPV es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la neoplasia cervical, muchas investigaciones han evaluado el impacto de esta infección viral en los eventos involucrados en la regulación del ciclo celular, como la apoptosis, para obtener un mejor entendimiento de la carcinogénesis cervical asociada a HPV oncogénico.

Los papilomavirus humanos oncogénicos podrían modular el proceso de apoptosis y de las proteínas reguladoras apoptóticas por medio de la interacción directa de la oncoproteína viral E6-HPVAR con la *p53*, prolongando la expresión de *Bcl-2* y reduciendo la elevación de *Bax*. Pero, además, E6 interactúa con otras proteínas involucradas en la apoptosis como *Bak*, el receptor del factor de necrosis tumoral, *Fas* y *FasL* y proteínas reparadoras del ADN como *MGMT* (Li et al, 2005).

El mecanismo apoptótico es defectuoso en el proceso de transformación maligna del epitelio cervical y se ve reflejado en la evaluación inmunohistoquímica de la proteína *Bax* así como de otras proteínas proapoptóticas como las caspasas y *Bak*, las cuales se encuentran disminuidas en casos de carcinoma epidermoide comparados con lesiones

intraepiteliales de alto grado, según muestran los resultados de Cheung et al, 2002.

En varios tumores humanos, como los de origen mamario, colorectal, ovárico y en linfomas, se ha observado una asociación inversa entre los niveles de expresión de p53 y Bcl-2. Sin embargo, en el caso del cáncer de cuello uterino se reportan hallazgos controversiales al comparar la inmunodetección de estos biomarcadores. Se ha observado expresión incrementada tanto de p53 como de Bcl-2 (Tjalma et al, 2001; Giarnieri et al, 2001), pero también se han obtenido resultados opuestos en la expresión elevada de p53 y Bcl-2 disminuida (Bitiren et al, 2003).

Saegusa y cols en 1995 informan que obtuvieron una inmunoreactividad positiva (más del 10% de citoplasmas teñidos) de Bcl-2 en el 20% de los carcinomas epidermoides estudiados. Por el contrario, en los casos de neoplasia intraepitelial cervical, este parámetro alcanzó el 46% en NIC1/2 y el 75% en las NIC3, mientras que el tejido normal mostró un 58% de reactividad. Estos resultados les permitieron concluir que la alteración de las funciones de Bcl-2 puede ocurrir inicialmente en la carcinogénesis cervical para luego disminuir en la neoplasia invasora.

La inmunoreactividad elevada de Bcl-2 se ha observado en más del 60% de las neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (Saegusa et al, 1995; Brychtova et al, 2000) y también puede verse esta positividad, aunque con menor intensidad, en células malignas bajo condiciones de p53 inactiva (Liang et al, 1995). Esta característica le confiere a dichas células una ventaja selectiva para la supervivencia y, a su vez, favorece el proceso de transformación maligna asociado a la presencia de HPV. Por ello, podría atribuirse a Bcl-2 un carácter de marcador de evolución o progresión (Kurvinen et al, 1996; Ter Harmsel et al, 1996; Li et al, 2005).

Además, también podría ser considerado un marcador molecular para predecir el pronóstico de la enfermedad, por lo que es de gran utilidad clínica (Uehara et al, 1995; Giarnieri et al, 2000; Ozalp et al, 2002). En un estudio realizado por Aletra et al, 2000, en carcinomas epidermoides de

diferentes grados de maduración resultó que la proteína Bcl-2 se expresó más frecuentemente en los carcinomas bien diferenciados que en los pobremente diferenciados.

En lesiones cervicales *in situ* e invasoras de origen glandular también se observa expresión elevada de Bcl-2, como lo demuestran los estudios realizados por Dimitrakakis et al, 2000 y Ali-Fehmi et al, 2004.

Kokawa y cols en 1999, evaluaron la expresión conjunta de Bcl-2 y de Bax tanto en carcinomas epidermoides como adenocarcinomas endocervicales y concluyen que la expresión elevada de Bax con una disminución de Bcl-2 en adenocarcinoma endocervical se correlaciona con recurrencia y mal pronóstico, pues la renovación celular se incrementa. En los carcinomas epidermoides ocurre lo contrario: el desarrollo tumoral es más lento ya que los valores de inmunoexpresión de estos biomarcadores de apoptosis son menos acentuados que en los tumores cervicales de origen glandular.

En resumen, el patrón de expresión de Bcl-2 en lesiones del cuello uterino es variable. Aunque en la literatura predomina el hecho de que las neoplasias intraepiteliales escamosas muestran una positividad para Bcl-2 que se va incrementando a medida que la lesión aumenta en severidad, tanto aquellas de origen glandular como escamoso, para los casos de cáncer cervical la variabilidad de patrones de expresión es más acentuada. Por esto, se precisan más estudios para aclarar su utilidad clínica en cuanto a marcador de evolución y de pronóstico. En la figura N° 10, se ilustra esquemáticamente un resumen de la modulación de las proteínas apoptóticas por la oncoproteína E6HPVAR.

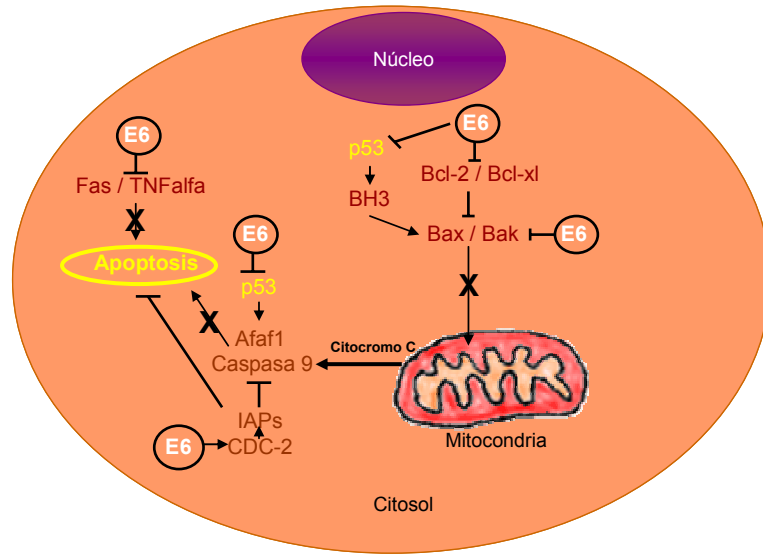


Figura Nº 10. Modulación de la apoptosis por la oncoproteína E6 de los papilomavirus oncogénicos. Tomado y modificado de Li et al, 2005.

3.4 Degradación de proteínas en el cáncer cervical. Sistema ubiquitina-proteosoma.

Todos los eventos de máxima importancia para la supervivencia y homeostasis celular son regulados, en parte, por el mantenimiento apropiado de los niveles de las proteínas intracelulares involucradas, las cuales son continuamente degradadas y remplazadas. La célula cuenta con una maquinaria proteolítica de alta selectividad, estrictamente regulada.; Mientras que la síntesis de nuevas proteínas es un proceso lento, la degradación de estas por medio del sistema ubiquitina-proteosoma no lisosomal es, por el contrario, muy rápida.

La oncogénesis cervical inducida por los papilomavirus humanos de alto riesgo está medida por la alteración de la proteólisis a través de la vía ubiquitina-proteosoma, utilizada por las oncoproteínas virales E6 y E7 fundamentalmente para "marcar" los productos de los genes supresores de tumor p53 y pRb respectivamente, con la única finalidad de que sean degradadas en forma rápida, dejando a la célula desprovista de sus principales puntos de control antiproliferativos, reparadores del daño genómico e inductores de la apoptosis.

3.4.1 Proteólisis por la vía ubiquitina-proteosoma.

La remoción rápida de enzimas y proteínas reguladoras de acción limitada es esencial para el control del crecimiento y el metabolismo celular. Una vía rápida de degradación de proteínas intracelulares se inicia con la adición de múltiples monómeros de *ubiquitina*, seguida del reconocimiento y degradación de la proteína-sustrato específica por parte de la organela *proteosoma 26S* (Pagano, 1997).

La proteólisis no lisosómica mediada por la vía ubiquitina-proteosoma incluye a una variedad de proteínas celulares generalmente de vida media corta, dentro de las cuales se incluyen, entre otras, las ciclinas (D1y E), los inhibidores de kinasa dependientes de ciclinas (específicamente la p27KIP1), los productos de los genes supresores de tumor (p53 y pRb), los factores de transcripción (E2F) y receptores de membrana. También son degradadas por esta vía aquellas proteínas mutadas que podrían afectar la homeostasis celular (Rolfe et al, 1997; Scheffner, 1998).

Aparte de la degradación de proteínas, la ubiquitina es considerada un mecanismo que interviene en los procesos de señalización celular tanto fisiológicos como patológicos, implicados en muchas funciones celulares no proteolíticas como la transcripción de genes, reparación del ADN y tráfico intracelular. Este mecanismo de señalización funciona de la misma manera que la fosforilación proteínica (Haglund y Dikic, 2005).

Las proteínas que deben degradarse (sustrato) son ubiquitinizadas durante una reacción dependiente de ATP. A tales proteínas se van añadiendo varias moléculas de ubiquitina (enzima polipeptídica de 76 aminoácidos) en cadena, unidas covalentemente a la proteína-sustrato; el sustrato poliubiquitinizado o "marcado" de esta forma es reconocido por el complejo multiproteínico proteosoma 26S de forma cilíndrica, que cataliza la ruptura de las proteínas-sustrato hasta conseguir pequeños péptidos de 6 a 12 aminoácidos (Hochstrasser, 1995; Mitch y Goldberg, 1996).

El proceso secuencial de ubiquitinización es multienzimático. Se inicia con la activación de la molécula de ubiquitina en su terminación carboxilo cuando se añade la enzima **E1**. La ubiquitina-E1, a su vez, es transferida a una o varias enzimas de conjugación a la ubiquitina llamadas **E2**. Finalmente, el grupo carboxilo de la ubiquitina se acopla al grupo amino de la proteína-sustrato, por las ligasas de ubiquitina **E3**. De esta forma, se van añadiendo moléculas de ubiquitina formando una cadena y esta modificación del sustrato sirve para su reconocimiento y degradación.

El miembro del sistema ubiquitina E3 se considera el más importante en el paso del reconocimiento de la proteína específica destinada a la degradación, debido a que es el que se une directamente al sustrato. Esta selectividad se debe a que las células contienen una variedad de E2 y E3 que son específicas para diferentes tipos de proteínas (revisado en Mitch y Goldberg, 1996).

De estas enzimas ligasas E3 celulares se ha logrado clonar la **E6-AP**, que fue descubierta en el curso de la caracterización del mecanismo por el cual la oncoproteína E6 de los papilomavirus humanos relacionados con el cáncer

cervical desactivar a la proteína supresora de tumor p53; de allí su designación *E6-associated protein* (Scheffner et al, 1993; Scheffner, 1998).

La figura N° 11 muestra en forma esquemática el proceso de ubiquitinización y degradación proteosómica de las proteínas.

3.4.2 Activación del sistema proteolítico ubiquitina-protesoma por los papilomavirus oncogénicos durante la carcinogénesis del cuello uterino.

Muchos tumores humanos mantienen activado el sistema proteolítico ubiquitina-protesoma, con la consecuente degradación rápida de numerosas proteínas que conllevan al característico descontrol en la proliferación celular de las neoplasias (Pagano, 1997).

En el proceso de carcinogénesis del cuello uterino, la integración del genoma de ciertos HPV oncogénicos, como los tipos HPV 16 y 18, al genoma de la célula que lo hospeda, permite la expresión continua pero sin control de los oncogenes virales E6 y E7 (zur Hausen, 2000).

Debido a que los virus son incapaces de replicarse por sí solos, se ven obligados a interactuar con proteínas celulares específicas que les permiten reprogramar a las células hospedero de acuerdo a sus necesidades y para su propio beneficio.

Entre dichas interacciones, existe la unión covalente de oncoproteínas virales a la ubiquitina y a otras proteínas relacionadas a esta, para modificar e inducir la degradación de las proteínas celulares que les convenga. Algunas oncoproteínas inclusive son blanco del sistema ubiquitina-protesoma y aprovechan esta situación para unirse directamente a las proteínas celulares específicas, atrayendo el efecto de este sistema hacia las propias proteínas celulares, y doblegando a la célula para su beneficio. El mejor ejemplo es el HPV (revisado en Scheffner y Whitaker, 2003).

Los HPVVAR 16 y 18 utilizan el sistema proteolítico celular ubiquitina-protosoma para dianizar a los productos supresores de tumor, p53 y pRb, provocando la degradación rápida de estas proteínas reguladoras. Esta habilidad viral se la proporcionan sus dos principales oncoproteínas, E6 y E7.

Para la propagación del HPV y la continua expresión de sus principales oncoproteínas, es necesario que la célula infectada sea conducida irreversiblemente hacia la fase de síntesis del ciclo celular. Para ello, se forma el complejo E7-HPVAR-pRb que deja libre al factor de transcripción E2F activo y sin restricciones. Esta interacción conduce a la degradación de la pRb mediada por la ubiquitina-protosoma (Boyer et al, 1996; González et al, 2001).

La oncoproteína E7-HPVAR recluta a la enzima ligasa-ubiquitina E3 para dianizar la pRb que, de esta forma, queda ubiquitinizada para posterior degradación ejecutada por el protosoma 26S.

Es posible también que E7 sirva como adaptador directo entre la pRb y el proteosoma 26S, de modo que la pRb es degradada más rápidamente sin previa ubiquitinización (Berezutskaya y Bagchi, 1997). Por tanto, la pRb puede verse inactivada y conducida a degradación rápida en aquellas células del epitelio cervical infectadas por HPVVAR.

En cuanto a la acción específica de la oncoproteína E6 sobre la proteína p53, es una interacción funcionalmente equivalente a la inactivación de p53 por mutación, lo cual indica que el complejo E6-HPVAR-p53 representa uno de los eventos más importantes de la carcinogénesis cervical, dada la interrupción de los puntos de control e inhibición de la apoptosis (Sheffner, 1998).

La oncoproteína E6 tanto de los papilomavirus de alto riesgo como de bajo riesgo oncogénico revelan gran afinidad por la p53, pero sólo los primeros conllevan a la degradación rápida de esta proteína supresora de tumor (Huibregtse et al, 1995; Traidej et al, 2000).

La oncoproteína E6 atrae a la enzima ligasa E6-AP para que le permita unirse a la p53, de forma que sea ubiquitinizada; así la p53 poliubiquitinizada es reconocida y degradada por el proteosoma 26S (Scheffner, 1998). Por tanto, la expresión inmunohistoquímica de p53 en células neoplásicas cervicales podría ser nula, si a esto se suma la acción reguladora de la proteína MDM-2.

La degradación de la p53 inducida por E6-E6AP es un logro significativo de los HPV para alcanzar la transformación maligna de las células epiteliales del cuello uterino, en conjunto con la inactivación y degradación de la proteína Rb.

La expresión inmunohistoquímica del epítipo ubiquitina ha sido poco estudiada a nivel de tejido cervical neoplásico. Sin embargo, ha tenido mayor aplicación en la evaluación de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson.

Si consideramos la acción proteolítica de las oncoproteínas E6 y E7 de los papilomavirus humanos oncogénicos sobre las proteínas supresoras de tumor p53 y pRb utilizando la vía de degradación ubiquitina-proteosoma, es deducible que la ubiquitina altamente conservada tanto en el núcleo como en el citosol, se encontrará inmunohistoquímicamente sobreexpresada en aquellas lesiones neoplásicas del cuello uterino asociadas a infección por HPV oncogénico.

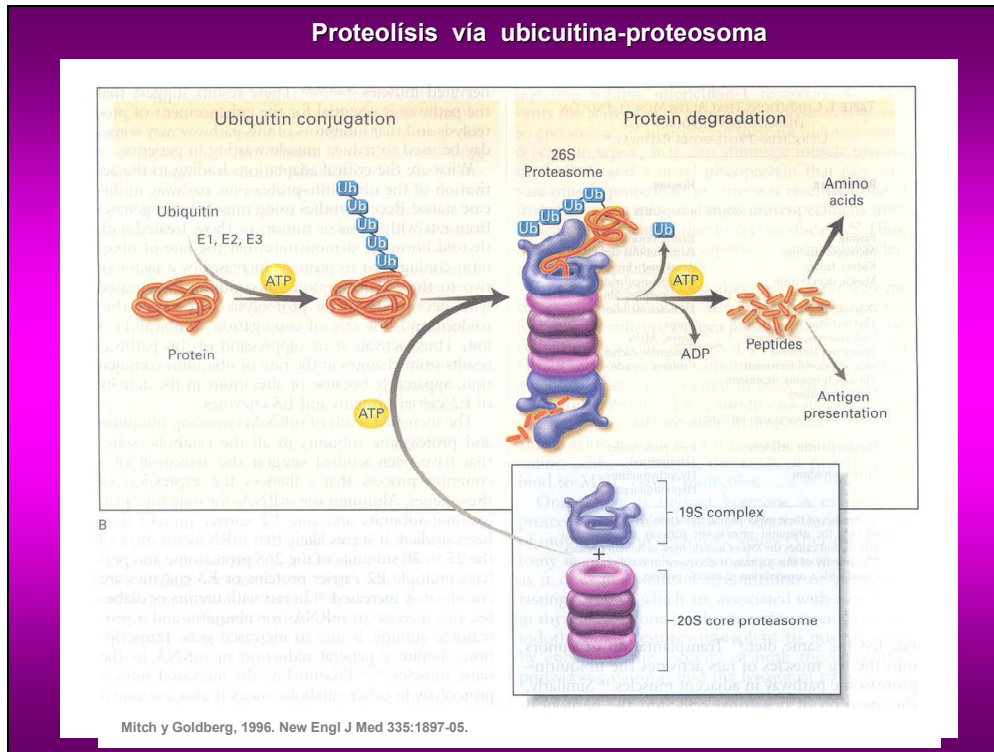


Figura N° 11. Esquema de la degradación de proteínas mediante la vía de la ubiquitina-proteosoma. Fuente: MITCH WE, GOLDBERG AL. 1996.

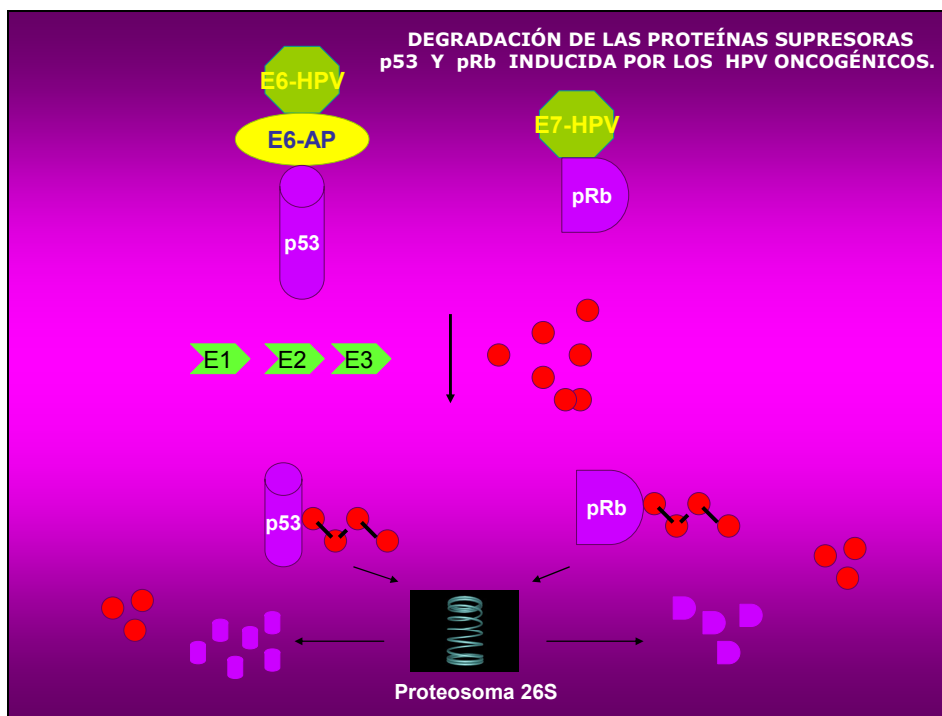


Figura N° 12. Degradación proteolítica de la p53 y pRb inducida por los HPV oncogénicos.

3.5 Sistemas de adhesión celular en el cáncer cervical.

Las células de los tejidos normales se reconocen entre sí y se adhieren específicamente, hecho de gran importancia en múltiples procesos biológicos tanto fisiológicos como patológicos.

La habilidad de las células malignas para crecer descontroladamente, migrar, invadir tejidos adyacentes y producir metástasis se asocia con frecuencia a una débil o ausente adhesión intercelular y de células-matriz extracelular. La falta o ausencia de expresión de las moléculas de adhesión celular en las células tumorales es característica y ocurre en relación a la pérdida de diferenciación tumoral lo cual le confiere un elevado potencial de invasión.

3.5.1 Moléculas de adhesión celular.

Las células homotípicas poseen la capacidad de reconocerse y relacionarse selectivamente entre sí durante la histogénesis. Esta forma de adhesión celular está mediada por diferentes tipos de moléculas con denominación común de moléculas de adhesión celular o CAMs, **cell adhesion molecules** (Geneser, 2000).

Las CAMs están involucradas en numerosos procesos biológicos de vital importancia como la embriogénesis, la reparación tisular, la diferenciación, el crecimiento, la comunicación y la movilización celular.

Las moléculas de adhesión cumplen dos funciones principales: la primera y principal es que se unen a ligandos específicos ubicados en otras células o en la matriz extracelular, facilitando las interacciones celulares y la migración de ellas por los diferentes tejidos; en segundo lugar, traducen señales reguladoras luego de la interacción con sus ligandos.

Dentro de la familia CAMs se encuentran los siguientes miembros: selectinas, integrinas, superfamilia de las inmunoglobulinas, proteínas de la matriz extracelular, CD44 y cadherinas. En esta revisión se enfocarán principalmente la cadherina E y la CD44.

Las **cadherinas** constituyen los principales componentes de la *zona adherens* y de los desmosomas. Son glicoproteínas transmembrana, monoméricas, que median la interconexión celular entre células del mismo

tipo, en presencia de iones de Ca^{++} , lo que permitiendo que el tejido al que pertenecen conserve su arquitectura y morfología, induciendo la diferenciación epitelial y suprimiendo la motilidad celular (revisado en Ivanov et al, 2001).

Dependiendo de las células que las poseen, se conocen bien por lo menos tres tipos de cadherinas: epitelial (E), placentaria (P) y neuronal (N). Estas moléculas de adhesión conservan un dominio extracelular, uno transmembrana aislado y otro citoplasmático altamente conservado. A este último se une la *catenina* (alfa, beta o gamma) que a su vez unirá a las cadherinas con el citoesqueleto. De esta forma se mantiene el fenotipo normal de las células epiteliales.

Las cateninas son proteínas que unen a las caderinas a los filamentos de actina del citoesqueleto y son esenciales para la adhesión mediada por las caderinas (Geneser, 2001).

Cuando las zonas de unión intercelular mediadas por la cadherina E están afectadas, se producen como resultado cambios en el fenotipo celular, incremento en la motilidad celular e incremento en la invasión celular (Chen et al, 1997; de Boer et al, 1999).

Otro miembro de las CAMs son las moléculas **CD44** (*cluster differentiation 44*), glicoproteínas ampliamente distribuidas a nivel transmembrana. Están compuestas por 20 exones de los cuales 10 exones varían entre el exon 5 (v1) y el exon 15 (v10), constituyendo una familia heterogénea de isoformas de CD44 (Tölg et al, 1993).

La forma más pequeña de CD44 es la CD44s (*standard*) que no contiene ninguno de los exones variables. Esta proteína se ha implicado en diferentes funciones celulares, tales como migración, proliferación, adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular.

Las CAMs muestran una fuerte expresión en los tejidos epiteliales normales sin excepción. En los tejidos neoplásicos, por el contrario, se ha observado

tendencia a la reducción o pérdida de la inmunoreactividad tanto en el caso de la cadherina E como en CD44 e isoformas, lo cual sugiere que los sistemas de adhesión celular alterados son una característica de las células con transformación maligna y de tumores con características histopatológicas agresivas, lo que contribuye en la liberación de las células malignas del tumor primario e invasión (Shiozaki et al, 1996; Hirohashi, 1998).

La distribución anormal, tanto de la cadherina E como de las CD44, es frecuentemente observada (es posible que esté ausente en las zonas de adhesión). De igual forma, podemos encontrar expresión disminuida en tumores indiferenciados "agresivos", con alto potencial de invasividad (Ivanov et al, 2001).

3.5.2 Adhesión celular y cáncer cervical.

Las células con potencial maligno poseen reducción en el contacto con las células vecinas y esta característica se refleja en la pérdida de la arquitectura que dará origen a la destrucción de la estructura histológica propia del crecimiento neoplásico (Hanahan y Weinberg, 2000).

Los tumores de tipo difuso están constituidos precisamente por múltiples células disociadas, que han perdido la polaridad y que se han infiltrado en el estroma subyacente de forma dispersa. Dichos tumores poseen gran potencial de invasión y metástasis. Por lo tanto, es lógico incluir en este fenómeno la pérdida del contacto intercelular dentro de los múltiples pasos de la carcinogénesis.

La pérdida o alteración en la adherencia celular también es vista en el cáncer cervical de origen escamoso y glandular y sus respectivas lesiones precursoras: las lesiones intraepiteliales escamosas y la neoplasia intraepitelial glandular (Vessey et al, 1995; Darai et al, 2000; Baleiro-Rodrigues y Lopes, 2004; Heatley, 2004; van de Putte et al, 2004).

La expresión alterada de la cadherina E en cáncer de cuello uterino podría ser uno de los factores responsables del proceso de invasión y metástasis

de estas neoplasias (Honda, 1992). La pérdida selectiva de la cadherina E podría generar desdiferenciación e invasividad de las células malignas cervicales, lo cual sugiere que esta actúa como un supresor de invasión y, por lo tanto, considerarse un parámetro útil de malignidad y marcador de menos diferenciación celular (Sun et al, 2000; Wu et al, 2000).

En las lesiones premalignas del cuello uterino (NIC/LIE), a medida que el grado de la lesión aumenta, la inmunotinción para la cadherina E se hace menos intensa, llegando a estar ausente en las lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) o carcinoma *in situ*. Según los hallazgos de Jeffers et al, 1997, y de Boer et al, 1999, en las LIEBG se observa una disminución leve de la expresión de la cadherina E. A manera general, el patrón de expresión de la cadherina E en estas lesiones es semejante al del epitelio escamoso normal. En cambio, en las LIEAG, encontraron una fuerte disminución de la cadherina E e inclusive hubo casos con pérdida total de expresión de cadherina E en las capas basales, que luego es restaurada en las capas suprabasales. Esta última observación también fue vista por Felix et al, 2002.

La localización de la cadherina E es un parámetro importante de determinar ya que podría estar relacionada con el grado de anormalidad de la lesión cervical, de forma que puede verse expresada a nivel citoplasmático, en lugar de su localización membranosa habitual, según Vessey y cols en 1995.

La cadherina E se expresa en los carcinomas escamosos maduros y bien diferenciados del cuello uterino (Wu et al, 2000) al igual que en los carcinomas de células pequeñas (Zarka et al, 2003). Los resultados de Jeffers et al, 1997 mostraron una expresión difusa de cadherina E en la mayoría de los casos de carcinoma invasivo cervical.

En los carcinomas cervicales más indiferenciados, la reacción inmunohistoquímica para la cadherina E está más reducida o simplemente puede ser ausente (Inoue et al, 1992; Sun et al, 2000; Wu et al, 2000; Carico et al, 2001).

En aquellos carcinomas de cuello uterino con positividad para ADN-HPV de alto riesgo se observa expresión reducida o ausente de la cadherina E, según Daniel y cols en 1999, implicando quizás a la integración de este virus al genoma celular en dicha alteración.

En resumen, durante el desarrollo de las lesiones cervicales ocurren alteraciones esenciales en la expresión de las CAMs, ya sean de carácter cualitativo (localización citoplasmática o membranosa) o alteraciones cuantitativas (cambios en la expresión) según Shimabukuro et al, 1997, Baleiro-Rodrigues y Lopes, 2004 y Rodríguez-Sastre et al, 2005.

3.6 Actividad telomerasa en cáncer cervical.

La estabilidad de la longitud del telómero, en las células humanas germinales y también en las células altamente proliferativas, se requiere para la supervivencia ilimitada y para el fenotipo inmortal de las células derivadas del cáncer.

Esta característica se logra a través de la expresión de la enzima telomerasa transcriptasa reversa (telomerase reverse transcriptase, TERT), la cual sintetiza repetidamente secuencias por transcripción reversa de un patrón de ARN, que se van añadiendo al telómero y a su vez, alargando la vida celular.

3.6.1 La telomerasa en la inmortalización de las células tumorales.

Entre las habilidades adquiridas por las células tumorales está el gran potencial que muestran para replicarse de forma ilimitada, potencial que les permite convertirse en un clon celular inmortalizado (Hanahan y Weinberg, 2000).

A medida que las células normales cumplen con su ciclo de vida y se van dividiendo, los extremos finales de los cromosomas o telómeros van sufriendo un progresivo acortamiento, marcando así cada mitosis. Este acortamiento se debe en parte a que la ADN polimerasa va perdiendo la capacidad de completar la replicación de la porción de ADN de 3' de los cromosomas durante la fase S (Counter et al, 1998). Como consecuencia de este acortamiento, los cromosomas de las células viejas tienden a fusionarse a nivel de sus telómeros y entonces causan desarreglos en el cariotipo que conllevan a la muerte de las células afectadas.

La **telomerasa** es una enzima especializada del tipo transcriptasa reversa que se encarga de conservar la integridad del telómero. Sintetiza secuencias repetidas de ADN al final de los extremos cromosómicos o telómeros, a expensas de un componente ARN que contiene un dominio complementario a la secuencia de ADN telomérico (Greider, 1996; Bryan y Cech, 1999), ver figura N° 13.

La telomerasa es un complejo de ribonucleoproteína constituida por dos subunidades: una subunidad patrón de ARN o **hTR** (*human telomerase RNA*) que posee una secuencia de nucleótidos que es complementaria al ADN telomérico; y la otra subunidad **hTERT** (*human telomerase reverse transcriptase*) segmento proteínico catalítico y fundamental para mantener y estabilizar el telómero (revisado en Harley, 2002). Aunque ambas subunidades proteicas pueden expresarse tanto en células normales como en células neoplásicas, la subunidad hTERT se expresa selectivamente en un pequeño grupo de células normales (*stem cells*) y también en líneas celulares derivadas tumor.

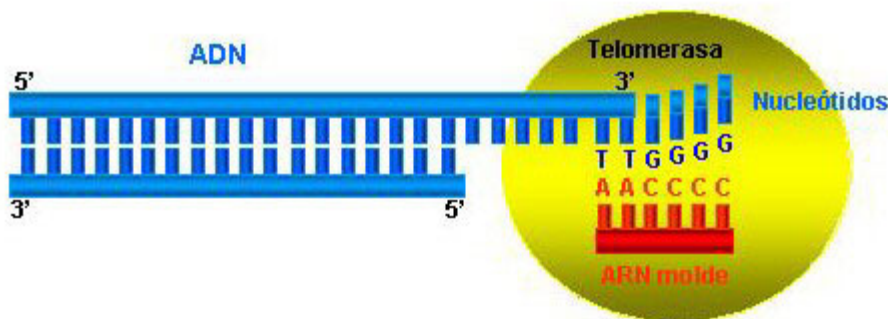


Fig Nº 13. Función de la telomerasa como enzima transcriptasa reversa.

La ausencia de la actividad de telomerasa en la mayoría de las células somáticas humanas provoca un progresivo acortamiento de los telómeros con cada división celular. Por el contrario las células malignas e inmortalizadas contienen niveles detectables de actividad de la telomerasa que mantienen la longitud de sus telómeros y un gran potencial proliferativo (Shay y Bacchetti, 1997).

El fragmento hTERT de la telomerasa está expresado en células somáticas normales, en muchos tumores primarios y en líneas celulares derivadas de tumor (placenta, hígado, próstata, entre otras) pero además en está expresada en una proporción significativa de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado y se va incrementando a medida que dichas lesiones muestran mayor anormalidad histopatológica, alcanzando niveles muy altos en la neoplasia invasora de origen escamosa y glandular, según lo mencionan Yashima et al, 1998; Yokohama et al, 1998; Jarboe et al, 2002; Wang et al, 2004.

Existen casos de cáncer cervical con niveles elevados de actividad telomerasa en los cuales se ha detectado la presencia de ADN-HPV 16 y 18 (Anderson et al, 1997) así como en LIE de AG con infección asociada por un HPVVAR (Yashima et al, 1998).

Un elevado porcentaje de todo tipo de células malignas muestran reactivación de la actividad de la ribonucleoproteína telomerasa (Shay y Bacchetti, 1997; Bryan y Cech, 1999). Este hecho permite que las células malignas se multipliquen de forma ilimitada.

3.6.2 Actividad de la telomerasa en el cáncer cervical.

Actualmente, se han llevado a cabo múltiples estudios para evaluar a la telomerasa como un posible marcador de neoplasia intraepitelial cervical, con gran utilidad como un adjunto al diagnóstico citológico para evaluar a aquellas pacientes con anomalías en células epiteliales del cuello uterino (Jarboe et al, 2002; Reesink-Peters et al, 2003; Bravaccini et al, 2005; Pinto-Tang et al, 2005).

La proteína E6 de los papilomavirus humanos oncogénicos induce la actividad telomerasa en las células neoplásicas cervicales (Stoppler et al, 1997; Veldman et al, 2003), predominantemente por medio del estímulo de la transcripción del gen *hTERT* (Gewin y Galloway, 2001; Oh et al, 2001). La oncoproteína E6 requiere de la cooperatividad de la E7 para llevar a cabo la inmortalización de los keratinocitos humanos infectados (Mantovani y Banks, 2001; Veldman et al, 2001).

El mecanismo por medio del cual E6-HPVVAR induce la activación de la telomerasa en las células con inestabilidad genómica parece involucrar al gen *myc*. La formación del complejo E6-*myc* provoca la expresión del gen *hTERT*, mediante la activación del promotor de este gen (Veldman et al, 2001; Fehrmann y Laimins, 2003).

La actividad de la oncoproteína E6-HPVVAR es relevante en el proceso de inmortalización celular y sugiere que otros genes celulares (*myc*) podrían

ser regulados por esta proteína viral, a favor del mantenimiento de la progresión celular e inmortalización (Veldman et al, 2003).

3.7 Otros biomarcadores tumorales en el cáncer cervical.

3.7.1 Antígeno Carcinoembrionario (CEA).

El Antígeno Carcinoembrionario (CEA) comprende una familia de glicoproteínas totalmente caracterizadas, agrupadas en el cromosoma 19q13.2. Fue descubierto en 1965 en extractos de carcinoma de colon, considerándose desde entonces un marcador tumoral de cáncer colorectal y otros cánceres humanos (revisado en Hammarstrom, 1999).

El CEA se ubica en la membrana celular, mostrando un patrón de expresión complejo en tejido normal y canceroso; sin embargo, está claro que es un excelente marcador de diferenciación epitelial.

Algunos años después de su descubrimiento, se encontró que el CEA podía medirse en el suero de pacientes con carcinoma colorectal y otros carcinomas como el cáncer de cuello uterino (Molina et al, 2003; Molina et al, 2005).

De igual forma, se ha medido en líneas celulares creadas a partir de carcinomas cervicales, mostrando elevados niveles de CEA (Isaka et al, 2004)

Además, se ha evaluado ampliamente en lesiones benignas, premalignas y malignas del cuello uterino tanto de origen escamoso y glandular, mediante técnicas inmunohistoquímicas; en principio, para comparar su expresión en tejido cervical neoplásico y no neoplásico (Speers et al, 1983; Bamford et al, 1983) encontrándose más frecuentemente expresado en lesiones neoplásicas invasoras que en tejido benigno.

Luego, se ha evaluado en lesiones cervicales variadas, observándose consistentemente fuerte expresión de CEA en carcinomas cervicales queratinizantes y no queratinizantes (van Nagell et al, 1982), en lesiones genitales asociadas a infección por HPV (Tolino et al, 1990) y en adenocarcinoma invasivo en asociación con expresión moderada o alta de Ki-67 (Cina et al, 1997).

También, ha tenido interés para evaluar el pronóstico de la enfermedad cervical de acuerdo a la localización de la expresión del CEA en la lesión neoplásica (Toki y Yajima, 1991).

Actualmente, se ha visto que la expresión de CEA muestra utilidad junto a otros marcadores inmunohistoquímicos para identificar el sitio de origen del tumor primario en mujeres con tumores pélvicos ginecológicos (Park et al, 2004) y para diferenciar el origen certero, endocervical o endometrial, del adenocarcinoma de cérvix, en casos donde exista confusión. En este sentido, CEA se expresa en un rango que oscila entre el 62% y el 96% de los adenocarcinomas endocervicales (Castrillon et al, 2002; McCluggage et al, 2002; Alkushi et al, 2003), en comparación con el adenocarcinoma endometrial que no supera el 27% (Castrillon et al, 2002)

3.7.2 Citoqueratinas(CK).

Las citoqueratinas constituyen el principal componente del citoesqueleto de las células epiteliales, donde forman un gran grupo de filamentos intermedios cuyo diámetro oscila entre 8 y 10 nm. En la especie humana forman una compleja familia codificada por, al menos, 20 genes diferentes, cuyo peso molecular varía entre 40 y 70 kDa (Steinert y Roop, 1988).

Las CK comprenden un grupo de 19 proteínas clasificadas en dos subgrupos, mediante el uso de anticuerpos monoclonales: la primera comprende proteínas básicas relativamente grandes (de 56 a 67 kDa), numeradas del 1 al 8; mientras que la segunda está constituida por proteínas más pequeñas, más ácidas y son numeradas del 9 al 19.

Las citoqueratinas de bajo peso molecular (40 kDa) se encuentran en epitelios simples y glandulares; las de peso molecular intermedio, en epitelios estratificados; y las de alto peso molecular (aproximadamente 67 kDa) en epitelios queratinizados. Los cambios patológicos podrían afectar la expresión de las distintas CK en dichos epitelios (Sawaf et al, 1991).

En general, cada tejido epitelial expresa, por lo menos, dos CK diferentes. Por ejemplo, las citoqueratinas 5 y 14 se expresan en todos los queratinocitos, la CK 1 y CK 10 son propias de los epitelios queratinizados,

la CK4 y CK13 las encontramos en los epitelios estratificados no queratinizados y las citoqueratinas 8 y 18, en los epitelios simples, aunque en estos la expresión de citoqueratina 19 es característica. No obstante, dependiendo de la complejidad del epitelio, el número y tipo de citoqueratinas presentes puede variar.

Los citoplasmas de las células escamosas y cilíndricas que componen la mucosa cervical normal, en presencia de anticuerpos monoclonales como AE1/AE3, han mostrado tinción positiva para la mayoría de las CK, por lo que son de utilidad para identificar las células tanto de epitelios simples como de los estratificados (Smedts et al, 1993a).

Los epitelios cervicales con lesiones premalignas y malignas conservan la expresión de CK, aunque el patrón podría ser más complejo de lo que se piensa, ya que su expresión podría estar relacionada con las características de diferenciación de la lesión así como con las células progenitoras de dichas lesiones (Suo et al, 1992; Smedts et al, 1993b).

Nair y cols en 1997 y Carrilho y cols en 2004, sugieren que existe un correlación significativa entre la expresión de ciertas CK y el grado de diferenciación de las lesiones neoplásicas del cuello uterino. Cuando la neoplasia muestra menor grado de diferenciación, las citoqueratinas se acumulan con menor intensidad en los citoplasmas celulares (Suo et al, 1992).

Por lo tanto, este biomarcador podría ser de utilidad cuando se desea evaluar el grado de diferenciación de la neoplasia cervical en combinación con otros marcadores del mismo tipo, como el CEA.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1.- MATERIAL.

1.1 Muestra.

El material para estudio consistió en la selección de casos de **cáncer invasor de cuello uterino** diagnosticados en el Servicio Anatomía Patología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, utilizando los archivos muertos y computarizados de este servicio. Se incluyeron dos grupos, el primero con los casos diagnosticados durante los años 2000 a 2005 y el segundo, con 15 casos de cáncer de cuello uterino diagnosticados entre los años 1969 y 1998, por encontrarse este material archivado y disponible. Estas muestras de tejido fueron fijadas con formalina tamponada al 10% e incluidas en parafina.

Una vez obtenido el listado de casos de cáncer cervical, se procedió a ubicar los bloques de parafina con el tejido neoplásico incluido, así como las correspondientes hematoxilinas originales que, en su momento, sirvieron para emitir el diagnóstico definitivo.

Las hematoxilinas de todos y cada uno de los casos de cáncer cervical fueron revaluadas con la finalidad de corroborar el diagnóstico original y para clasificar los casos de acuerdo al tejido epitelial que le dio origen, considerando los siguientes criterios histopatológicos (Blaustein, 1994):

1. **Carcinoma epidermoide:** neoplasia del cuello uterino originada a partir de las células que conforman el epitelio escamoso poliestratificado. Microscópicamente, las células neoplásicas forman cordones o lenguetas que infiltran el estroma subyacente, también pueden verse agrupadas en nidos o masas irregulares. Las células malignas son generalmente poligonales u ovaladas con citoplasma eosinófilo, queratinizado, con membrana celular bien delimitada. Los puentes intercelulares pueden o no ser visibles. En algunos casos, los núcleos exhiben relativa uniformidad; mientras que en otros, son completamente pleomórficos e hiperocrómicos. La cromatina es gruesa

e irregular. Las mitosis son muy comunes, incluyendo las formas atípicas.

A su vez, los carcinomas epidermoides fueron clasificados de acuerdo al grado de diferenciación tumoral, considerando los siguientes criterios histopatológicos de Broders (citado por Blaustein, 1994) con algunas modificaciones:

1.a. Carcinoma epidermoide bien diferenciado (BD): las células malignas se disponen en cordones, nidos o en masas sólidas, variando en tamaño y configuración. Exhiben amplio citoplasma denso y frecuentemente queratinizado, los núcleos centrales e hiperocrómicos, irregulares y con moderado grado de polimorfismo. Es característico, la formación de perlas córneas (estructuras compuestas por grupos de células escamosas queratinizadas que se organizan en nidos concéntricos). Las mitosis son infrecuentes.

1.b. Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado (MD): las células epiteliales malignas se disponen frecuentemente en nidos sólidos, conservando las características de epitelio estratificado. Sus células poseen queratinización individual pero sin formación de perlas córneas. Los citoplasmas son densos eosinófilos, con núcleos irregulares y discreto número de mitosis.

1.c. Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado o inmaduro (I): se observa predominio de células pequeñas con ausencia o escaso citoplasma no queratinizado, separadas por trabéculas, que recuerdan al epitelio escamoso, con pérdida de la diferenciación y maduración. Los núcleos son hiperocrómicos y marcadamente irregulares en forma y tamaño. Hay elevado número de mitosis, muchas de ellas son atípicas.

1.d. Carcinoma epidermoide inmaduro e indiferenciado (II): las alteraciones celulares mencionadas anteriormente son más acentuadas. Las células malignas son redondas, frecuentemente con ausencia de citoplasma y dispuestas en nidos aislados. No se observan trabéculas, ni

polarización. Los núcleos son hipercrómicos, marcadamente pleomórficos, con formas aberrantes y frecuentemente multinucleados. El índice mitótico es muy elevado y predominan las imágenes atípicas.

2. **Adenocarcinoma de cuello uterino:** esta neoplasia crece con un patrón sólido, a veces papilar; está constituida por células basales cilíndricas, seudoestratificadas e irregulares, con núcleos pleomórficos, hipercrómicos y nucléolo prominente o macronucléolos.

Los adenocarcinomas fueron subclasificados siguiendo los criterios histopatológicos que a continuación se describen (Blaustein, 1994):

2.a. Villoglandular: esta variante de adenocarcinoma de origen endocervical adopta patrón vellosos o glandular; está acompañada de todas las alteraciones a nivel nuclear y citoplasmático mencionadas anteriormente.

2.b. Papilar: adenocarcinoma constituido por elementos celulares glandulares con proyecciones papilares.

2.c. Endometrioides: neoformación epitelial glandular que adopta patrón tubular, atípico, irregular, con dilatación y tendencia a la solidificación.

3. **Carcinoma Adenoescamoso:** esta formación tumoral se incluye en la clasificación de otros tumores epiteliales del cuello uterino, que involucra tanto el epitelio escamoso estratificado como el cilíndrico columnar, con una mezcla de células escamosas y glandulares malignas.

La presencia de cualquier otro tipo histológico de cáncer cervical se identificó siguiendo los criterios establecidos en la bibliografía consultada.

Criterios de exclusión.

Fueron excluidos todos aquellos tumores que presentaran algunas de las siguientes características:

- Excesiva necrosis y hemorragia.
- Material tumoral insuficiente.
- Material tumoral mal preservado.
- No se encontró bloques de parafina correspondiente.

1.2 Grupo Control.

Se incluyeron también como grupo control, 22 casos de **tejido cervical normal** de pacientes con indicación de estudio histopatológico por enfermedad no neoplásica y cuyo resultado fue de benignidad o normal. Estos casos fueron utilizados para comparar con la reactividad inmunohistoquímica de los tumores cervicales.



Figura N° 14. Diseño experimental

2.- MÉTODOS.

A todos los casos de cáncer de cuello uterino seleccionados para este estudio así como a los tejidos cervicales normales (grupo control), se les aplicó el diseño experimental que se muestra como figura N° 14, el cual incluye evaluación histopatológica y estudio inmunohistoquímico. Se realizó también un estudio molecular para la detección y genotipificación de ADN-HPV pero sólo a los casos de cáncer de cuello uterino.

2.1. Preparación del material.

Se realizaron cortes de tejido de 3 micras, tanto de los casos de cáncer cervical como del tejido benigno, con la finalidad de corroborar los diagnósticos originales y clasificar las muestras de acuerdo a los criterios histopatológicos anteriormente detallados.

2.2. Estudio Histopatológico. Tinción de hematoxilina-eosina (HE).

La hematoxilina-eosina es la técnica de tinción histológica convencional, en la que se emplea la hematoxilina para teñir el núcleo de azul y la eosina, colorante ácido que tiñe el citoplasma de rojo a rosa. Ejecutamos los siguientes pasos:

1. Incubamos las muestras a 60°C aproximadamente 20 minutos antes de desparafinar.
2. Desparafinamos las muestras en xilol 5 minutos.
3. Realizamos pases por etanol (90°/80°/70°) para hidratar, de 2 a 5 veces en cada uno.
4. Hidratamos las muestras.
5. Realizamos la tinción nuclear con Hematoxilina de Harris, 5 minutos. Enjuagamos con agua destilada 2 minutos (en forma de zambullidas).
6. Para decolorar, sumergimos las muestras en ácido clorhídrico al 0,5% (un pase rápido). Lavamos con agua corriente y luego con hidróxido

- de amonio. Nuevamente realizamos un lavado rápido con agua corriente.
7. Para la tinción citoplasmática, sumergimos las muestras en eosina durante 4 minutos. Lavamos con agua corriente (inmersiones rápidas).
 8. Deshidratamos con pases en etanol (70°/80°/90°), aproximadamente de 30 segundos cada uno. Finalmente aclaramos con xilol, 1 minuto.
 9. Montamos con entellan y cubreobjeto.

2.3. Estudio Inmunohistoquímico.

2.3.1 Fundamento.

Las técnicas inmunohistoquímicas son técnicas de inmunolocalización de antígenos tisulares o celulares mediante su unión con anticuerpos específicos, que utilizan una enzima como "marcaje". Por este motivo, la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato de la enzima más una sustancia cromógena, lo que da lugar a un precipitado insoluble y coloreado. La enzima peroxidasa es el "trazador" más comúnmente utilizado y empleado en técnicas con anticuerpos marcados directa o indirectamente (Pardo-Mindán et al, 1997).

Cuando se trata de la técnica con anticuerpos marcados indirectamente, el anticuerpo secundario se une al primario que, a su vez, ya se ha unido al antígeno específico en estudio. La técnica ABC o complejo de avidina-biotina-peroxidasa, desarrollada por Hsu et al en 1981, introduce una forma hipersensible para amplificar la señal de la reacción, sobre todo cuando los antígenos se encuentran en tejidos en parafina.

2.3.2 Tecnología de los "tissue microarrays" o micromatrices tisulares.

Actualmente y cada vez con mayor aceptación, se está utilizando la tecnología de las micromatrices tisulares en el campo de la investigación,

debido a que permite el estudio de múltiples biomarcadores para conocer la patogenia y progresión de enfermedades como el cáncer.

Ofrece la ventaja de poder estudiar a la vez varias muestras de tumor con un alto nivel de estandarización. Además, sólo se requieren pequeñas cantidades de reactivos, mínimo personal de laboratorio y, muy importante, es un método que proporciona una extrema eficacia y coste efectivo.

Este método consiste en colocar cuidadosamente, a manera de cilindros, un número elevado de tejido tumoral en un único bloque de parafina, de forma simultánea, permitiendo así el procesamiento de todos los tumores bajo las mismas condiciones técnicas (Kononen et al, 1998; Shergill et al, 2004).

Hidalgo y cols en 2003, aplicaron esta metodología a 36 lesiones de cuello uterino obteniendo resultados satisfactorios. Lo recomiendan como una alternativa con una amplia utilidad por ser económico, eficaz y porque sirve para validar marcadores nuevos.

Para el presente estudio, construimos 6 micromatrices tisulares en la que incluimos todos los casos de cáncer de cuello uterino seleccionados. También construimos micromatrices con los tejidos cervicales normales, como se especifica a continuación y cuyas plantillas se muestran en los anexos N° 1, N° 2 y N° 3:

- 2 micromatrices tisulares, marcadas como A y B, cada una de ellas con áreas distintas del tumor, seleccionadas como se muestra en la figura N° 15, constituidas ambas por **carcinomas epidermoides**. Incluyen como testigos para orientarnos: 1 tumor vesical y 1 tejido de cuello uterino benigno y como controles positivos (de reactividad conocida): 1 tumor de mama, 1 linfoma y 1 tumor vesical.
- 2 micromatrices tisulares, marcadas como A y B, cada una de ellas con áreas distintas del tumor (ver figura N° 15), constituidas ambas por **adenocarcinomas endocervicales**. Incluyen como testigos para orientarnos: 1 tumor vesical y 1 tejido de cuello uterino benigno

y como controles positivos (de reactividad conocida): 1 tumor de mama, 1 linfoma y 1 tumor vesical.

- 1 micromatriz tisular de Exocérvis benigno (n=22).
- 1 micromatriz tisular de Endocérvis benigno (n=22).

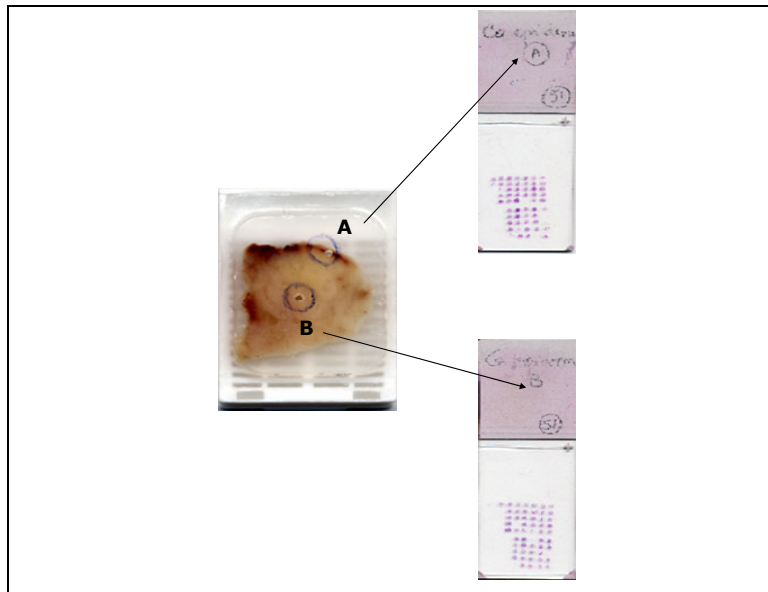


Figura Nº 15. Selección las diferentes áreas de un caso de carcinoma epidermoide para incluir en la micromatriz tisular respectiva.

Se construyeron por separado dos micromatrices de los tumores cervicales con la finalidad de evitar la pérdida definitiva de los discos de tejido tumoral, garantizando así su presencia en una micromatriz o en otra. Para las micromatrices de tejido benigno, se tomo de cada bloque la parte de exo y endocérvis.

2.3.3 Protocolo para la construcción de las micromatrices tisulares.

Previo a la construcción de la micromatriz tisular, se preparó el siguiente material:

1. Bloques de tejido cervical y sus respectivos cristales teñidos con HE, con el área tumoral identificada al microscopio. De igual

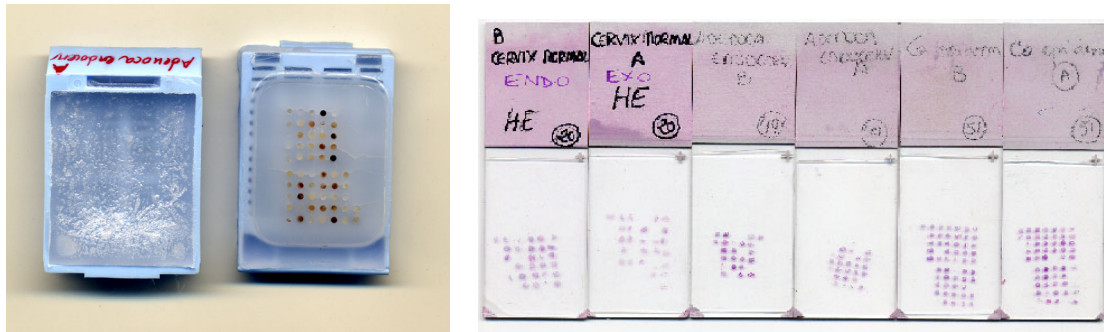
manera, para los casos que servirán como control positivo y los casos de tejido cervical normal.

2. Plantilla indicando la posición exacta de cada muestra de cáncer cervical, los testigos y los controles positivos.
3. Bloque receptor de parafina blanca.

Una vez preparado el material así como la puesta a punto de las medidas en los ejes X y Y en el instrumento (MTA-1 *Manual Tissue Arrayer*, Beecher Instruments, USA) utilizado para la construcción de micromatrices, procedimos a la construcción de las mismas, siguiendo los pasos que a continuación describimos:

1. Seleccionamos al microscopio 2 de las áreas más representativas de cada tumor de cuello uterino, en el extendido teñido con HE, marcándolas con un rotulador. Luego, enfrentamos el frotis de HE con el bloque correspondiente para marcar las mismas áreas sobre el bloque de tumor (figura N° 15).
2. Primero alisamos la superficie del bloque receptor antes de empezar a introducir los cilindros de tejido, desgastando un poco la parafina en el microtomo para que así todos los cilindros tuvieran el mismo ángulo. Colocamos el bloque receptor en la base del instrumento y lo aseguramos correctamente.
3. Elegimos el juego de agujas apropiado, en este caso de 1 mm de diámetro. Situamos a la izquierda la más gruesa que tomaría el cilindro de tejido del bloque donador y, a la derecha, la que haría el agujero en el bloque receptor.
4. Ajustamos a cero los micrómetros que fijarían la alineación de las filas y columnas de los cilindros, como se indicó previamente.
5. Hicimos primero el agujero en el bloque receptor, rotando el émbolo de aguja para profundizar aproximadamente 3 mm.

6. A continuación colocamos el bloque de tejido donador sobre el puente, cambiamos de aguja y tomamos el tejido tumoral o normal demarcado.
7. Retiramos el puente con el bloque donador y expulsamos el cilindro de tejido exactamente encima del agujero hecho en la parafina, sin hundirlo. Posamos encima del hueco un portaobjetos para alisar la superficie del cilindro y nivelarla con la parafina.
8. Cambiamos la medida del micrómetro a la siguiente posición para hacer el agujero con la aguja respectiva.
9. Comenzamos poniendo el tejido que sirvió de testigo de acuerdo a la ubicación en la plantilla. Así se operó sucesivamente hasta agotar todos los casos.
10. Una vez acabada la construcción de la micromatriz tisular, llevamos los bloques receptores a la estufa de 37°C durante 24 horas, lo cual permitió que la parafina de los cilindros de tejido se mezclara con la parafina del bloque receptor (figura N° 16. A).
11. Se realizaron 50 cortes de cada micromatriz tisular, de 3 micras de espesor y los recogimos en láminas con poli-lisina para posterior tinción con HE (figura N° 16. B) y pruebas de inmunohistoquímica.
12. Colocamos una lámina portaobjetos para proteger la micromatriz tisular y la almacenamos con los respectivos cortes realizados.



A

B

Figura Nº 16. **A.** Bloques de las micromatrices tisulares de carcinoma epidermoide y adenocarcinoma de cuello uterino incluidos en este estudio. **B.** Micromatrices tisulares de los distintos casos incluidos en este estudio: 2 de carcinoma epidemoide, 2 de adenocarcinomas, 1 de exocérvix y 1 de endocérvix.

La técnica de inmunohistoquímica requiere de tres pasos fundamentales. En primer lugar, se desparafinan los tejidos e hidratarlos; seguidamente, se expone el antígeno de interés (aquel que así lo requiera) para una mejor detección y, por último, se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo con el revelado de la misma.

Los anticuerpos evaluados en todos y cada uno de los tumores cervicales y controles incluidos en este estudio se especifican en la Tabla Nº 2.

A continuación se detallan los pasos de la técnica inmunohistoquímica empleada en este estudio, la cual está basada en la técnica avidina-biotina-inmunoperoxidasa original pero con modificaciones:

a. Pretratamiento.

a.1) Desparafinización e hidratación.

- Las micromatrices tisulares y controles negativos se colocaron por lo menos 12 horas en la estufa de 37°C, además de 30 minutos en estufa de 60°C el día de la aplicación de la técnica. Seguidamente, incluimos las muestras en xilol (3 cubetas), dejamos las muestras 20 minutos en el primer xilol y luego realizamos pases de 5 minutos en el resto.

- Para hidratar las muestras de tejido, las pasamos por alcoholes graduales (90°, 80° y 70°), dejándolas 5 minutos en cada uno.
- Terminamos esta fase, lavando con abundante agua de grifo para aclarar.

a.2) Recuperación del antígeno.

Para la recuperación antigénica empleamos soluciones tampón de acuerdo a los requerimientos de cada anticuerpo utilizado: o bien una solución tampón de *citrato* 0.01 mM pH 6.0 posteriormente diluido 1:10 en agua destilada o una solución tampón de *Tris-EDTA* 2mM pH 9.0 posteriormente diluido en agua destilada (ver Tabla N° 2 de anticuerpos). Una vez preparada la solución tampón para exponer el epítipo, usamos calor: olla o baño. Procedimos así:

- Enfriamos en cubeta grande dejando bajo agua de grifo, para luego enjuagar las micromatrices tisulares con agua destilada.
- Cerclamos las áreas del tejido con sigmacote (Sigma co) para evitar difusión de anticuerpo.

b. Inmunotinción.

Antes de la técnica de inmunotinción propiamente dicha, es necesario realizar dos pasos esenciales:

b.1) Bloqueo de la peroxidasa endógena.

- Cubriendo totalmente las muestras, aplicamos 300 µl de reactivo bloqueante de peroxidasa metanol-peróxido de hidrógeno al 3% (97 volúmenes de metanol y 3 volúmenes de agua oxigenada) e incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Frenamos el bloqueo y lavamos con agua destilada.

b.2) Bloqueo de la colágena tisular para evitar uniones inespecíficas.

- Cubrimos las muestras con 300 µl de una solución de suero de caballo al 20% (en 8 volúmenes de suero fisiológico 2 de suero de caballo) y dejamos durante 15 minutos a temperatura ambiente. Descartamos los excesos y no lavamos.

Una vez cumplidos estos pasos, procedemos a la inmunotinción. En este estudio revelamos la reacción antígeno-anticuerpo primario utilizando los siguientes reactivos: *LSAB+ System-HRP* y *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System* (DAKO cytomatic). Este kit de trabajo, basado en la técnica de avidina-biotina pero refinada, está constituido por reactivos marcados (*labelled streptavidin biotin, LSAB reagents*), como el anticuerpo secundario marcado con biotina que reaccionará con moléculas de estreptavidina conjugadas con varias de peroxidasa, de manera que, por una parte, pueden captarse con mayor sensibilidad las señales emitidas por antígenos presentes en bajas concentraciones o, por otra, puede incrementarse la intensidad de la tinción en casos donde la reacción no sea lo suficientemente evidente.

La reacción de color se desarrolló usando la solución de sustrato-cromógeno (*Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*), mediante la cual pudimos observar un precipitado marrón en el compartimiento celular ocupado por el antígeno.

b.3) Anticuerpo primario.

- Cubrimos toda el área conteniendo los círculos de tejido con 300 µl del anticuerpo recién diluido (ver tabla Nº 2) e incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Eliminamos el exceso de reactivo enjuagando 3 veces con PBS (tampón fosfato 0.1M ph 7.2 – 7.4).

b.4) Visualización.

- Para este paso utilizamos el kit de *LSAB+ System-HRP*, de DAKO Diagnostics siguiendo las condiciones de tiempo y temperatura propuestas por la casa comercial.
- Lavamos generosamente 3 veces con PBS.

b.5) Revelado.

- Utilizamos el kit *Solución de sustrato-DAB cromógeno (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System)* de DAKO Diagnostics.

-Por último, lavamos con abundante agua destilada.

b.6) Contratación con hematoxilina de Harris

-Sumergimos las muestras en hematoxilina de Harris durante 12 segundos.

-Lavamos con abundante agua de grifo hasta eliminar totalmente el exceso de colorante.

-Deshidratamos con alcoholes graduales (70°, 80° y 90°) y luego realizamos tres pases por xilol.

En el caso concreto de la inmunodetección de la telomerasa, después de poner el anticuerpo primario correspondiente, usamos el kit de detección EnVisión™, HRP (DAKO Cytomation, Dinamarca) de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial, resumidas a continuación. En primer lugar, aplicamos el reactivo bloqueante de peroxidasa endógena para EnVisión™ durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez llevada a cabo la reacción telomerasa/anti-telomerasa-44F12, en el tiempo de 1 hora, lavamos con PBS 3 veces. Seguidamente, incubamos las micromatrices tisulares durante 30 minutos con el anticuerpo secundario (EnVisión™) y lavamos de nuevo. Finalmente, colocamos la solución sustrato-DAB cromógeno (EnVisión™) durante 10 minutos, lavamos con agua destilada y continuamos con el resto del proceso.

Es importante detallar lo siguiente. Inicialmente el proceso de inmunotinción contra el antígeno telomerasa (1:50) se llevó a cabo siguiendo los pasos convencionales de la técnica contrastando con hematoxilina de Harris. Sin embargo, debido a que no obtuvimos resultados satisfactorios en los casos de neoplasia cervical en estudio, a pesar de que el control positivo (linfoma) mostró intensa reactividad (+++) para telomerasa, se realizó una segunda inmunotinción con el anticuerpo diluido 1:20, utilizando nuevamente EnVisión y contratación con hematoxilina de Harris. Finalmente, se efectuó una tercera vez pero contrastando con verde de metilo al 0.5%, debido a que encontramos núcleos con reactividad muy débil que se sospechó podría estar solapada por la contratación nuclear ya que se apreciaban tonalidades semejantes, de esta forma podríamos

confirmar los casos sin reactividad (verdaderos negativos) y reclasificar aquellos casos con reactividad dudosa (falsos negativos).

b.7) Montaje.

-Colocamos una lámina cubreobjeto con entellan sobre las muestras y dejamos secar.

c. Controles.

En cada inmunotinción incluimos como control negativo un corte de tejido cervical neoplásico, que fue procesado en las mismas condiciones que las micromatrices tisulares pero omitiendo el anticuerpo primario.

Los controles positivos estaban constituidos por tejido neoplásico con reactividad conocida ante los diferentes biomarcadores en estudio, procedentes de un tumor vesical, un tumor mamario y un linfoma. Estos controles fueron incluidos en cada micromatriz tisular.

d. Evaluación de la inmunoreactividad.

Se realizó un conteo celular abarcando todo el diámetro del disco tumoral como un todo (100%). Se consideró una reacción positiva ante el anticuerpo cuando la célula, tumoral o normal, mostró tinción marrón a nivel del compartimiento específico o diana para cada anticuerpo: nuclear, citoplasmática o membranosa, como se indica a continuación para cada marcador:

Membranosa: cadherina-E, CD44s, CD44v3.

Citoplasmática: cadherina-E, CD44s, CD44v3, CK, CEA, p16, Bax, Bcl-2 y ubiquitina.

Nuclear: p53, pRb, p16, p21, p27, MDM-2, telomerasa, Ki-67, ciclina D1, ciclina E y ubiquitina.

Todas las matrices tisulares fueron evaluadas, sin conocimiento de los datos clinicopatológicos, por un primer observador y posteriormente por un

patólogo experimentado. Los casos con discordancia, fueron revisados nuevamente, utilizando un sistema de monitor adaptado al microscopio, para la observación simultánea por ambos observadores y así acordar por consenso la inmunoreactividad definitiva.

En general, el porcentaje de células neoplásicas o normales con reactividad fue estimado considerando un mínimo de 100 células por disco tisular. La distribución de las células inmunoreactivas se efectuó mediante una escala semicuantitativa como se describe a continuación:

Negativo:	< del 5% de células reactivas.
+	de 5% a <25% de células reactivas.
++	de 25% a 50% de células reactivas.
+++	> del 50% de células reactivas.

Específicamente, para el caso de la evaluación de la inmunoreactividad de Ki-67 consideramos esta reacción como baja cuando observamos menos del 5% de las células teñidas.

Además, consideramos cualitativamente la intensidad de la tinción a nivel de cada segmento celular en determinados anticuerpos, mencionando la intensidad como: baja, moderada o alta, dependiendo de la palidez de la tinción o, por el contrario, de la observación de inmunoreactividad moderada o intensa.

Tabla N° 2. Anticuerpos evaluados en este estudio.

Anticuerpo	Dilución	Volúmen anticuerpo	Tampón para recuperación antigénica	Pretratamiento	Clon	Casa comercial
Ki-67	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	MIB-1	Dako
P53	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	DO-7	Novocastra
Bcl-2	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	124	Dako
Bax	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	Policlonal	Dako
MDM-2	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	1B10	Novocastra
p16	1:100	24 µl	Citrato 1/10	Autoclave	E6H4	Dako
p21	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	SX118	Dako
p27	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	SX53G8	Dako
Ciclina D1	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	SP4	NeoMarkers
E-Caderina	1:20	120 µl	Citrato 1/10	Autoclave	NHC-38	Dako
Citokeratina	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	AE1/AE3	Dako
pRb	1:200	8 µl	Tris-EDTA 1/200	Autoclave	1F8	NeoMarkers
Ciclina E	1:50	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	13A3	Novocastra
Telomerasa	1:20	48 µl	Citrato 1/10	Autoclave	44F12	Novocastra
CD44	1:20	120 µl	Citrato 1/10	Autoclave	F10-44-2	Novocastra
CD44 v3	1:20	120 µl	Citrato 1/10	Autoclave	3G5	R&D System
CEA	1:400	4 µl	-	-	Policlonal	Dako
Ubicultina	1:500	3 µl	-	-	Policlonal	Dako

2.4. Estudio Molecular.

Las técnicas de biología molecular se utilizan actualmente para amplificar y detectar regiones específicas del genoma de los HPV que permitan identificar posteriormente el tipo o los tipos virales asociados a la lesión neoplásica cervical, bien sea mediante la utilización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) específicas o bien por cualquier otro método actualmente utilizado para tal fin, como la hibridación *in situ* o los *microchips de ADN-HPV*, entre otros (Molijn et al, 2005).

Todas las muestras de cáncer de cuello uterino fueron procesadas para aislamiento, detección y genotipificación de ADN-HPV utilizando la técnica de *PCR-SPF10/LiPA*. No se incluyeron las muestras de tejido cervical benigno.

2.4.1. Protocolo para el corte de bloques de parafina para extracción de ADN-HPV.

Este protocolo fue cedido por el grupo de trabajo que desarrolla el proyecto *Retrospective International Survey of Human Papillomavirus Types in Cervical Cancer (RIS HPVTT)*.

a. Cortes con microtomo.

- Para cada muestra preparamos el siguiente material:
 - a) un bloque de parafina sin tejido incluido (bloque en blanco) por caso, que se cortó antes de cada muestra.
 - b) dos tubos Eppendorf de 1.5 ml rotulados con el código designadocular.
 - c) una cuchilla sin usar por caso.

- Seguimos estrictamente cada una de las siguientes recomendaciones:
 - a) Usamos guantes y los cambiamos regularmente.
 - b) Limpiamos el microtomo antes y después de cortar los bloques con desinfectante, luego con xilol y finalmente con etanol.
 - c) Usamos una cuchilla nueva para cortar cada bloque y su correspondiente bloque de parafina en blanco (sin tejido).

- Cortes de tejido.
 - a) Realizamos 5 cortes de 5 micras de espesor cada uno, por duplicado, y los colocamos en tubos Eppendorf de 1,5 ml previamente rotulados.
 - b) Retiramos el bloque, limpiamos como se indicó anteriormente, cambiamos la cuchilla, cortamos el bloque de parafina en blanco correspondiente, luego el siguiente bloque de tumor y así para todos los casos restantes.

2.4.2. Protocolo para el aislamiento de ADN-HPV a partir de los cortes de tejidos fijados con formalina tamponada al 10% e incluidos en parafina.

1. Desparafinamos previamente como se menciona a continuación:
 - Añadimos a los 5 cortes de 5 μ m, 1ml de xilol e incubamos, con agitación ocasional, durante 10-20 minutos a temperatura ambiente, con el fin de disolver la parafina.
 - Centrifugamos 10 minutos a 13400 rpm.
 - Al pellet, volvimos a añadir 1ml de xilol con agitación ocasional durante 10-20 minutos.
 - Centrifugamos una vez más durante 10 min a 13400 rpm.
 - Lavamos el pellet dos veces con 500 μ l etanol absoluto durante 1 minuto, agitando por inversión.
 - Finalmente, centrifugamos 10 minutos a 13400 rpm.
2. Resuspendimos el pellet en 500 μ l de solución de lisis (SDS 0.5%, Tris HCl 10mM pH8, NaCl 0.15M, EDTA 5mM).
3. Añadimos a cada tubo, 25 μ l de proteinasa K (0.5 mg/ml) e incubamos durante toda la noche a 55°C.
4. Para la extracción del ADN, añadimos 500 μ l de fenol equilibrado con Tris-HCl ph 8, en agitación ocasional durante 20 minutos.
5. Centrifugamos durante 15 minutos a 13400 rpm y recogimos la fase acuosa en otro tubo perfectamente rotulado.
6. Añadimos un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y dejamos actuar durante 1 hora.
7. Centrifugamos durante 15 minutos a 13400 rpm.

8. Recogimos la fase acuosa y añadimos un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico durante 30 minutos.
9. Precipitamos el ADN con 0.1 volúmenes de AcNa 3M pH5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío durante toda la noche a -20°C.
10. Centrifugamos 45 minutos a 13400 rpm.
11. Lavamos el precipitado (pellet) con etanol 70% frío.
12. Volvimos a centrifugar durante 20 minutos a 13400 rpm.
13. Secamos el pellet 10 minutos en estufa a 37°C.
14. Resuspendimos el pellet con agua bidestilada con la cantidad adecuada según el tamaño del pellet (5-30µl).
15. Almacenamos el ADN resuspendido a 4°C hasta su posterior utilización.

2.4.3. Protocolos para la amplificación, detección y genotipificación de ADN-HPV.

2.4.3.1 Determinación de la calidad del ADN extraído.

La calidad del ADN extraído de las muestras de tejido cervical incluidas en parafina fue comprobada con la amplificación del gen *INF* mediante el uso de los *primers* INF150 DR y DF, que generan un fragmento de 150 pb y cuyas secuencias son:

INF150DR: CTGGGATGCTCTTCGACCTC.

INF150DF: TCTTTTCTTTCCCGATAGGT.

La tabla Nº 3 muestra el protocolo diseñado para la técnica de *PCR-INF150*: mezcla común o *master mix*, componentes y cantidades relativas a una muestra (volumen unidad) y para varias muestras (volumen mezcla). Se indica, además, el protocolo de la reacción de amplificación en el termociclador.

En primer lugar, preparamos la *master mix* con los componentes respectivos, utilizamos una ADN polimerasa de las denominadas termoestables ya que se activa progresivamente en cada ciclo de amplificación (AmpliTaq DNA Gold polymerase, Perkin-Elmer, Inc).

Seguidamente, se alicuotó en los tubos dispuestos para cada muestra (24 μ l/tubo). Posteriormente, añadimos 1 μ l de ADN problema y preparamos dos tubos adicionales: un control positivo (C+) con ADN no tumoral de muestra ya testada y un control negativo (C-) sin ADN. Por último, la reacción de amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp [®] PCR system 2700, Applied Biosystem.

Tabla N^o 3. Protocolo para técnica de PCR-INF150. Se indica la composición de la *master mix* y las condiciones de la PCR.

Componentes		Volumen	Volumen	N ^o	Volumen Total	Unidad
<i>Master mix</i>		Unidad μ l	Mezcla	Casos		
ADN problema		1		16	25	μ l
Tampón 10X		2,5	40	TERMOCICLADOR		
Cl2Mg mM		1,5	24			
dNTPs 2,5 μ l		2	32			
DR Primer	INF150DR	0,33	5,28	T ^a °C	Tiempo	Ciclos
DF Primer	INF150DF	0,33	5,28	94	5' (desnaturalización inicial)	35
				94	1'30" (desnaturalización)	
				55	1'30" (cebado)	
				72	1'30" (elongación)	
Taq (U/ml)	GOLD	0,2	3,2	72	10' (extensión final)	
H2O bidestilada		17,14	274,24	72		
TOTAL		25	24		Taq (U)	13

2.4.3.2 Visualización del producto amplificado con PCR-INF150 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

a) Preparación del gel de agarosa al 2%.

- Preparamos el TBE 0.5% (Tris-ácido bórico 0.445M, EDTA 0,01M): 2000 ml de agua bidestilada más 100 ml TBE 10x.
- Disolvimos en el microondas 2 gr de agarosa en 100 ml TBE 0.5% durante 1 minuto a 800W.
- Dejamos enfriar y, antes que solidificar, añadimos 3.5 μ l de bromuro de etidio (10mg/ml).
- Vertimos el líquido en la cubeta del gel, previa colocación de los peines que formaron los pocillos donde colocamos las muestras y dejamos solidificar.
- Retiramos los peines y los topes (cinta adhesiva).

- Situamos el gel en la cubeta de electroforesis con los pocillos en el lado del ánodo y rellenamos con TBE 0.5% hasta cubrir completamente el gel.
- b) Preparación la muestra en el gel y electroforesis.
- Mezclamos 5 μ l de tampón de carga 6X con 25 μ l del producto amplificado y pasamos a cargar el pocillo con toda la mezcla.
 - Cargamos el primer pocillo del gel con 5 μ l del marcador de pesos moleculares (DNA ladder ready-load™ 0.1 μ g/ μ l, Invitrogen), señalado con la letra M en la figura N° 18.
 - Aplicamos una corriente de 125 mv. Dejamos correr hasta que el frente alcanzó las 2/3 partes del gel.
- c) Visualización en transluminador de luz ultravioleta.
- Si la muestra analizada contenía ADN, la banda esperada tenía aproximadamente un tamaño de 150 pb.

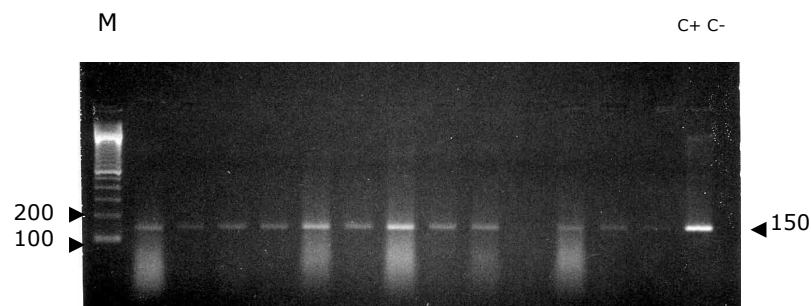


Figura N° 17. Productos obtenidos por *PCR-INF150* que mide la calidad del ADN extraído a partir de las muestras de tejido de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio. M: marcador de pesos moleculares de 100 pb; C+: control positivo; C-: control negativo.

2.4.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación de secuencia de ADN-HPV con los cebadores *SPF10*.

Se llevó a cabo la amplificación del segmento de ADN-HPV de la región L1, que genera un producto de amplificado de 65 pb, en todos los casos de cáncer cervical que presentaron una banda para el gen *INF*, lo cual indicó la existencia de ADN extraído de buena calidad. Para ello utilizamos la mezcla de 10 cebadores ***SPF10*** biotilizados (Innogenetics, Bélgica) siguiendo el protocolo sugerido por la casa comercial (Tabla N° 4).

En cada reacción de *PCR* se incluyeron controles positivos obtenidos a partir de muestras de cuello uterino previamente tipificadas, así como el control positivo proporcionado por la casa comercial. Los controles negativos estaban constituidos únicamente por *master mix* y 2 μ l de agua estéril.

Para la preparación de la *PCR* también se elaboró una *master mix*, utilizamos la misma ADN polimerasa termoestable del protocolo de *INF*. Después de alicuotar en los tubos dispuestos para cada muestra (40 μ l/tubo) añadimos 2 μ l de ADN problema, de C+ y C-, al tubo correspondiente. El protocolo de amplificación especificado en el termociclador se indica en la siguiente tabla:

Tabla N° 4. Protocolo para técnica de *PCR-SPF10*. Se indica composición de la *master mix* y condiciones de amplificación.

Componentes <i>Master mix</i>		Volumen Unidad μ l	Volumen Mezcla	N° Casos	Volumen Total	Unidad
ADN problema		2		8	50	μ l
Tampón 10X		5	40	TERMOCICLADOR		
Cl2Mg mM		4	32			
dNTPs 2,5 μ l		4	32			
Primer	SPF10	10	80	Tª °C	Tiempo	Ciclos
				94	9' (desnaturalización inicial y activación de la polimerasa)	40
				94	30" (desnaturalización)	
				52	45" (cebado)	
			72	45" (elongación)		
Taq (U/ml)	GOLD	0,3	2,4	72	5' (extensión final)	
H2O bidestilada		24,7	197,6	72		
TOTAL		50	48		Taq (U)	19,5

2.4.3.4 Visualización del producto amplificado con *PCR-SPF10* mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%.

Para visualizar el producto de amplificación de la *PCR-SPF10* seguimos los mismos pasos descritos en el apartado 2.4.3.2 para los productos de la *PCR-INF150*, con la diferencia de que para este caso, preparamos un gel de agarosa al 3% (mayor resolución), aplicamos 10 μ l del producto de la *PCR* en cada pocillo, mezclados con 2 μ l de tampón de carga 6X y empleamos una corriente de 130 mv. Si la muestra analizada contenía ADN de HPV, la

banda esperada tenía aproximadamente 65 pb, como se aprecia en la figura N° 18.

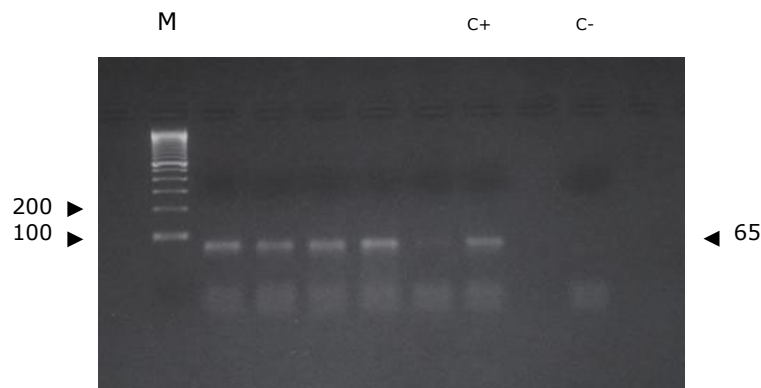


Figura N° 18. Productos obtenidos por *PCR-SPF10* que indican la presencia de ADN viral en las muestras de tejido de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio. M: marcador de tamaño; C+: control proporcionado por la casa comercial; C-: control negativo.

2.4.3.5 Hibridación reversa en tiras para genotipificación del ADN-HPV.

La genotipificación de los ADN-HPV amplificados con los cebadores *SPF10* se realizó mediante el kit de INNOLiPA (Innogenetics, Bélgica). Este kit incluye, además del sistema de *primers SPF10* y el C+, las tiras de hibridación reversa o *LiPA* con una cartilla de interpretación para determinar el tipo o los tipos de HPV presentes en las muestras cervicales. Entre los tipos de HPV que *LiPA* permite identificar se encuentran: 11 tipos de BR (6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 70, 74) y 14 tipos de AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68)

Debido a que este kit es de reciente utilización y que aún se encuentra en proceso de estandarización, se reflejan a continuación las instrucciones de la casa comercial para la correcta utilización del mismo y para minimizar al máximo las posibilidades de contaminación:

Manipulación de las tiras *LiPA*.

1. Las tiras han sido diseñadas para usarlas una sola vez.
2. No tocar las tiras con los dedos, usar guantes limpios y desechables cada vez.

3. Para la identificación de las tiras utilizar lápiz de grafito. No usar rotuladores. Escribir la identificación por encima de la línea de marcaje de la tira.
4. Colocar las tiras en las bandejas con la membrana hacia arriba (se indica la posición en la tira).
5. Durante los diferentes pasos de incubación, las tiras deben permanecer dentro de la misma bandeja.
6. Las tiras que no se utilicen deben protegerse de la luz y el calor.
7. Evitar que las tiras recién usadas se sequen completamente antes de su interpretación, cubriéndolas y almacenándolas.
8. Las tiras usadas deben almacenarse preferiblemente en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C).
9. No reutilizar las bandejas (canales individuales para las tiras).

Instrucciones para la incubación.

La hibridación y lavados deben realizarse exactamente a **49°C±0.5**, esta temperatura es la indicada para evitar FALSOS POSITIVOS (temperatura inferior) o FALSOS NEGATIVOS o muy débiles (temperatura superior).

1. Siempre mantener tapado el baño durante las incubaciones para evitar falsos negativos.
2. No debe usarse ventilador caliente para la hibridación y lavados.
3. La amplitud del movimiento generado tanto en el baño (hibridación y lavados) y el rotador (desarrollo del color) es crítica para alcanzar la máxima sensibilidad y tinción homogénea.
4. Para la hibridación y los lavados, las bandejas deben colocarse sobre una plataforma para baño. Ajustar el nivel del agua entre un tercio y un medio de la altura de la bandeja. Asegurarse de que las bandejas no flotan en el agua. El agua deberá estar en contacto directo con las bandejas.
5. Los pasos de incubación para el desarrollo del color deben realizarse entre los 20-25°C. Si la temperatura está por debajo de 20°C podrían obtenerse resultados muy débiles. Si la temperatura está por encima de 25°C podrían obtenerse señales de fondo y/ o falsos positivos.

6. Los tiempos específicos de incubación deben respetarse estrictamente.

2.4.3.5.1. Protocolo de hibridación reversa sobre tira (LiPA).

Antes de iniciar el proceso de la hibridación reversa en tira con los productos amplificados por *PCR-SPF10*, realizamos los siguientes pasos:

- a.- Calentamos el baño a 49°C.
- b.- Pre calentamos a 37°C la solución de hibridación y la solución de lavado.
- c.- Identificamos tantas tiras como casos a examinar con su respectivo número identificación e igualmente dispusimos del mismo número de canales o bandejas.

1. Con unas pinzas estériles tomamos el número de tiras para la prueba de acuerdo al número de muestras (1 tira por muestra) y rotulamos la tira con el número de identificación asignado a cada producto de *PCR-SPF10* sobre la línea de marcaje.
2. Colocamos en el baño de 49 °C tantos canales como muestras para genotipificación (1 canal por tira).
3. Colocamos 10 µl de solución de desnaturalización en la parte superior de cada canal y agregamos 10 µl del producto biotinilado amplificado, mezclamos cuidadosamente por pipeteo, varias veces. Incubamos a temperatura ambiente (20-25° C) durante 5 minutos.
4. Agitamos la solución de hibridación precalentada y agregamos cuidadosamente 2 ml a la mezcla anterior en cada canal. Mezclamos por agitación cuidadosamente.
5. Colocamos inmediatamente la tira en el canal respectivo cuidando de que se sumergiera completamente en la solución.
6. Colocamos los canales en el baño a 49°C, tapamos el baño para evitar la evaporación y dejamos incubando 1 hora.
7. Lavado:
 - Después de la hibridación, retiramos los canales del baño.
 - Aspiramos el líquido del canal con una pipeta. Agregamos 2 ml de solución de lavado astringente precalentada a cada

canal y enjuagamos por agitación de los canales entre 10 y 20 segundos a temperatura ambiente. Aspiramos la solución de cada canal.

- Añadimos de nuevo 2 ml de solución de lavado astringente precalentada e incubamos las tiras 30 minutos en el baño de 49°C.

2.4.3.5.2 Desarrollo del color.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, en un agitador orbital.

1. Lavamos las tiras 2 veces durante 1 minuto con 2 ml de Solución Rinse diluido 1:5 en agua destilada y aspiramos con la pipeta.
2. Agregamos 2 ml del Conjugado diluido 1:100 en solución de conjugado e incubamos durante 30 minutos mientras se agitaba. Aspiramos.
3. Lavamos 2 veces más durante 1 minuto con 2 ml de Solución de Rinse y luego 1 vez con 2 ml de Solución Sustrato Buffer. Aspiramos.
4. Añadimos 2 ml Sustrato diluido 1:100 en solución del sustrato e incubamos 30 minutos en agitación mientras se desarrollaba la reacción de color púrpura.
5. Detuvimos la reacción añadiendo 2 ml de agua destilada. Repetimos la operación mientras se agitaba por lo menos 3 minutos cada vez para retirar el exceso de líquidos.
6. Secamos las tiras en papel absorbente.
7. Comparamos las tiras con la cartilla de interpretación de resultados.

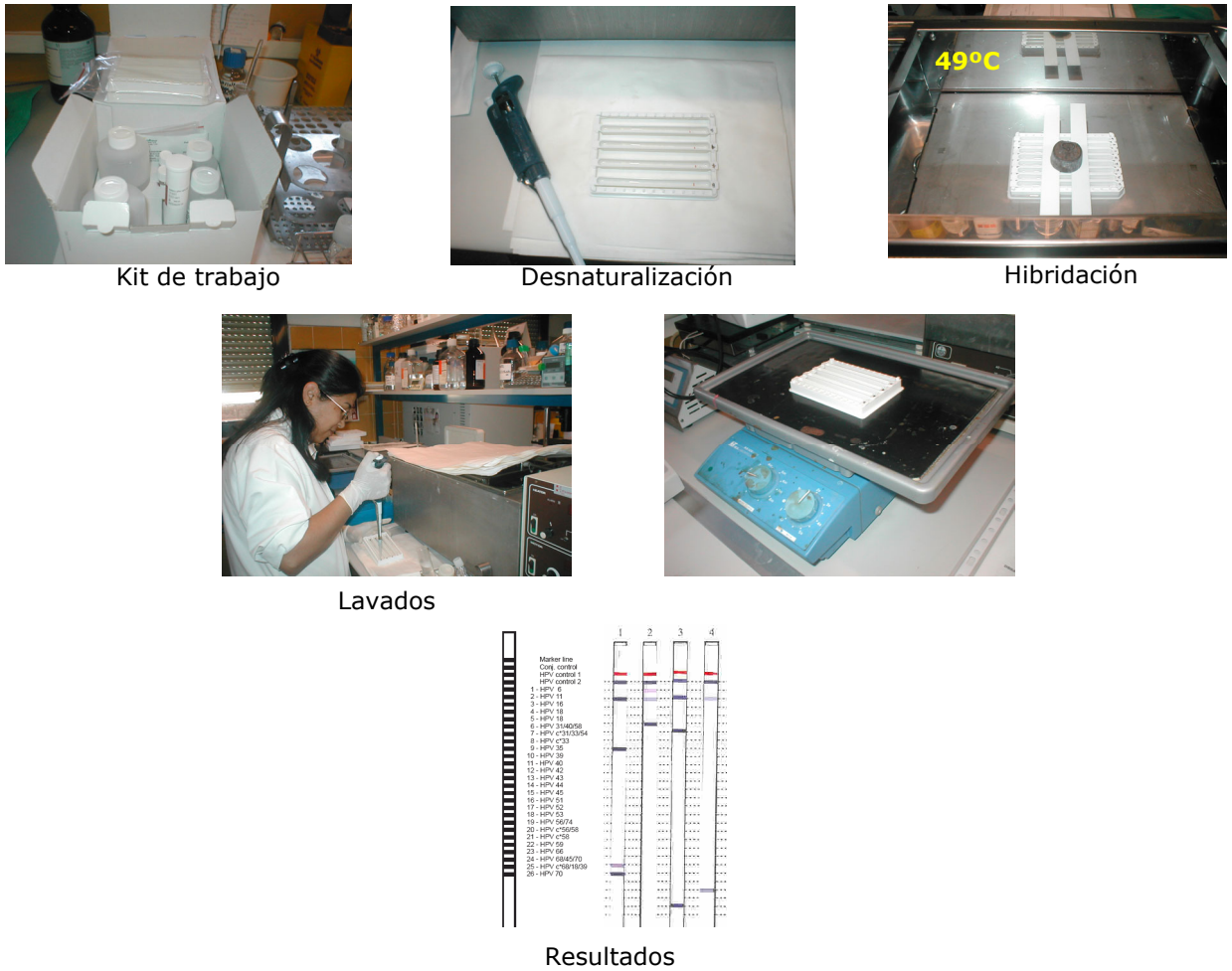


Figura N° 19. Secuencia del proceso de hibridación reversa en tira (*LiPA*) para genotipificación de ADN-HPV en las muestras de cáncer de cuello uterino incluidas en nuestro estudio.

2.4.3.5.3 Interpretación de los resultados.

Las tiras fueron interpretadas una vez secas usando la plantilla. Para la interpretación de los resultados se tuvieron en cuenta las siguientes instrucciones:

1. La primera línea es la línea del **Control del Conjugado** (inmediatamente después de la línea de marcaje). Esta línea controla la adición de reactivo de conjugado y la solución substrato durante el procedimiento de hibridación. Esta debería ser siempre **positiva** y debería tener aproximadamente la misma intensidad en cada tira durante el mismo ensayo.

2. Una muestra se consideró **HPV positiva** si por lo menos una de las líneas para tipos específicos o una de las líneas de control de HPV era positiva, independientemente de la intensidad de color de la línea, es decir, todo vestigio de color fue considerado positivo.
3. El **control positivo** contenía **HPV6** y debía reaccionar en el siguiente orden: control del conjugado y dos líneas con secuencia de HPV6.
4. Las muestras para las cuales se obtuvo un patrón de línea diferente a los especificados o que no mostraron ninguna línea específica (líneas 1 a 26) pero mostraron al menos una de las líneas de control de HPV positiva, se consideraron HPV positivo pero no tipificable: HPVX.

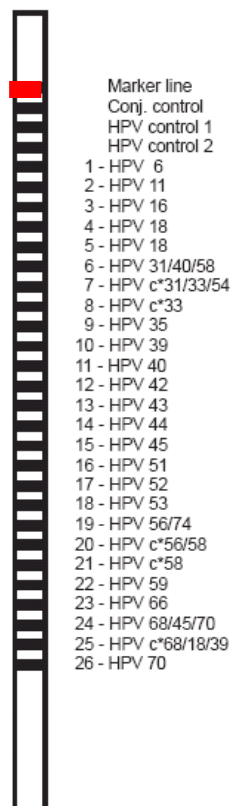


Figura N° 20. Plantilla con la posición de las diferentes sondas de oligonucleótidos a la que corresponde en las tiras de hibridación reversa (*LiPA*). Esta plantilla se coloca sobre cada tira para conocer el genotipo viral por coincidencia de la banda teñida en la tira con el número asignado a cada tipo de HPV.

2.5. Análisis estadístico.

Los datos fueron almacenados en una base de datos de Access para Microsoft Office, las variables incluidas se enumeran en el anexo N° 4.

Para el estudio estadístico empleamos variables binarias, reflejando la presencia/ausencia de una determinada característica histopatológica o categórica en función de la naturaleza de las variables analizadas. Con la finalidad de simplificar el análisis, recodificamos las siguientes variables agrupando los intervalos con menor número de casos: p53, Bcl-2, Bax, pRb, ciclina D1, ciclina E, p27, ubicuitina, CK, CD44s y CD44v3.

La asociación entre las diferentes variables se determinó utilizando el test de la *Chi-cuadrado* para determinar la homogeneidad o la tendencia lineal de la asociación en el caso de las variables ordinales. En las tablas 2x2, se calcula el estadístico exacto de *Fisher* cuando una tabla que no sea resultado de columnas o filas perdidas de una tabla mayor presente una casilla con una frecuencia esperada menor que 5. Para todas las restantes tablas 2x2 se calcula el *Chi-cuadrado* corregido de *Yates*.

En el caso de variables ordinales, aplicamos *el coeficiente de correlación de Pearson, r*, que es una medida de la asociación lineal entre dos variables, y *el coeficiente de correlación de Spearman*, que es una medida de la asociación entre los órdenes de los rangos. Los valores de ambos varían entre -1 (relación negativa perfecta) y +1 (relación positiva perfecta). Un valor de 0 indica que no existe relación lineal alguna.

Todos los tests empleados están incluidos en el paquete estadístico SPSS (versión 12.0). Se estableció el nivel de significación estadística a partir del 5% ($p=0.05$).

En todos los test se han tomado como límites de significación $p=0.05$, considerándose: no significativo $p>0.05$; significativo $p=0.05$; muy significativo $p<0.01$ y altamente significativo $p<0.005$

RESULTADOS.

1.- GENERALIDADES.

En primer lugar, presentaremos los resultados del análisis estadístico de algunos parámetros clinicopatológicos generales de nuestra serie de casos y controles, seguido de los hallazgos correspondientes a la expresión inmunohistoquímica de los biomarcadores seleccionados para este estudio y, finalmente, los resultados relacionados con la presencia y diferentes genotipos de HPV asociados específicamente a los tumores de cuello uterino. En cada apartado, se incluirá el estudio de frecuencias y análisis bivariante para culminar con el estudio de correlación hallado entre las variables estudiadas.

1.1 Sobre el material de estudio.

La búsqueda computarizada de casos de cáncer de cuello uterino diagnosticados en el Servicio Anatomía Patología del Hospital Clínico Universitario de Valencia entre los años 2000-2005, arrojó un número igual a 173 tumores cervicales, de los cuales 85 eran carcinomas *in situ*, motivo por el cual fueron excluidos. Además se excluyeron 22 casos debido a las siguientes causas: presencia de material tumoral insuficiente, necrosado, mal preservado o por no encontrarse material archivado. Por lo tanto, la serie de tumores de cuello uterino incluida en este estudio quedó conformada por 66 casos de carcinoma invasor de cuello uterino diagnosticados entre 2000-05 más 15 casos diagnosticados entre 1969 y 1998, lo que suma un total de **81 carcinomas cervicales**.

Los 44 tejidos cervicales benignos (grupo control: 22 exocérvix y 22 endocérvix) se seleccionaron al azar y fueron registrados e informados en este servicio durante el año 2005.

En la Tabla N° 5, presentamos la descripción de todos los casos de cáncer de cuello uterino y los controles de tejido cervical benigno incluidos en este estudio.

Tabla N° 5. Resumen de los casos y controles incluidos en este estudio.

Parámetro	Cáncer de cuello uterino	Controles
Número de muestras	81	44 22 exocérvix 22 endocérvix
Diagnóstico histopatológico (Tipo histológico)		
Carcinoma epidermoide	62 (76.5%)	
Adenocarcinoma	19 (23.5%)	
Edad		
Rango	28-79 años	36-75 años
Media (x)	50.67±13.62 años	51.82±10.86 años
Mediana	49 años	47.50 años
Grado de diferenciación tumoral en carcinoma escamoso:	62	
Bien diferenciado (BD)	13 (21%)	
Moderadamente diferenciado (MD)	27 (43.5%)	
Inmaduro (I)	14 (22.6%)	
Inmaduro e indiferenciado (II)	8 (12.9%)	
Subtipos histopatológicos de adenocarcinoma cervical:	19	
Endocervical	8 (42.1%)	
Endometriode	5 (26.3%)	
Mucinoso	1 (5.3%)	
Papilar	2 (10.5%)	
Villoglandular	3 (15.8%)	
Tamaño tumoral:		
Rango	0,20 – 8 cm	
Media (x)	1,07 cm	
Mediana	1,00 cm	

2.- HALLAZGOS CLINICOPATOLÓGICOS. FRECUENCIAS. ANÁLISIS BIVARIANTE.

2.1 CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LOS CASOS Y CONTROLES.

2.1.1 Edad.

La edad de la paciente para cada caso de cáncer de cuello uterino se obtuvo a partir del informe histopatológico realizado originalmente en este servicio, dato que se recopiló en 58 casos. El rango de edad de las pacientes fue de 28 a 79 años, con un valor promedio de 50,67 años y una mediana de 49 años. El siguiente gráfico muestra la distribución porcentual de los carcinomas cervicales por intervalos de edad.

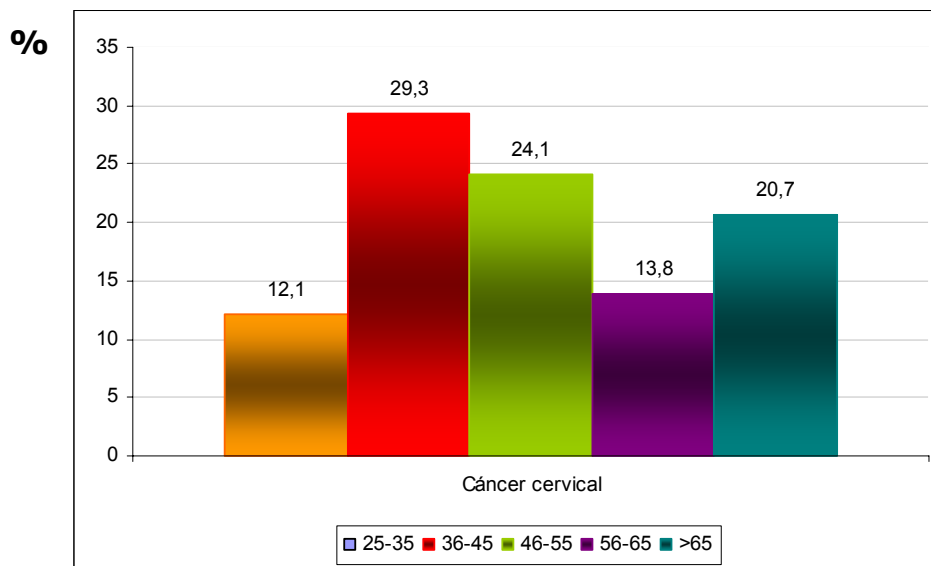


Gráfico Nº 1. Distribución porcentual de los casos de cáncer invasor de cuello uterino por grupos de edad (años). n=58.

Apreciamos que el mayor número de pacientes con cáncer invasor de cuello uterino se encontró en el intervalo de edad comprendido entre los **36 y 55 años**. Este cantidad incluye el grupo de 36 a 45 años con 17 casos (29.3%) en plena edad reproductiva y el grupo de los 46 a 55 años con 14 casos (24.1%). Luego, vemos que disminuye el número de casos en el intervalo comprendido entre los 56 y 65 (13.8%) para luego volver a elevarse a

partir de los 65 con 12 casos que representan un 20.7%, es decir, nos encontramos con un segundo pico de edad.

Por lo tanto, la mayor proporción de pacientes se encontró en el intervalo de edad comprendido entre los 36 y 55 años, que representa el 53.4%.

El grupo control se encontraba en el rango de edad comprendido entre los 36 y 75 años, con una edad promedio igual a 51.82 años y mediana igual a 47.50 años.

Cuando comparamos la edad de las pacientes con cáncer de cuello uterino con la edad de las pacientes cuyos tejidos sirvieron de controles nos encontramos con grupos muy semejantes, sin diferencias significativas entre ellos ($p=0.725$). La edad promedio para las pacientes con tumor fue de 50.67 ± 13.62 y para los controles 51.82 ± 10.86 (tabla N° 3).

Ahora bien, si consideramos la edad de las pacientes de acuerdo al tipo histológico de cáncer cervical (gráfico N° 2), encontramos la siguiente distribución sin diferencias importantes ($p=0.778$): la edad de las pacientes con carcinoma epidermoide osciló entre los **36 y 55 años** (agrupando las dos proporciones de casos más altas); en cambio, con los adenocarcinomas cervicales, la mayor proporción de casos se encontraba en dos grupos de pacientes diferentes, un grupo cuya edad estaba entre los **36 y 45 años** y otro correspondiente a las **mayores de 65 años**. La mitad de las pacientes (7/14) con adenocarcinoma cervical eran mujeres jóvenes en edad reproductiva.

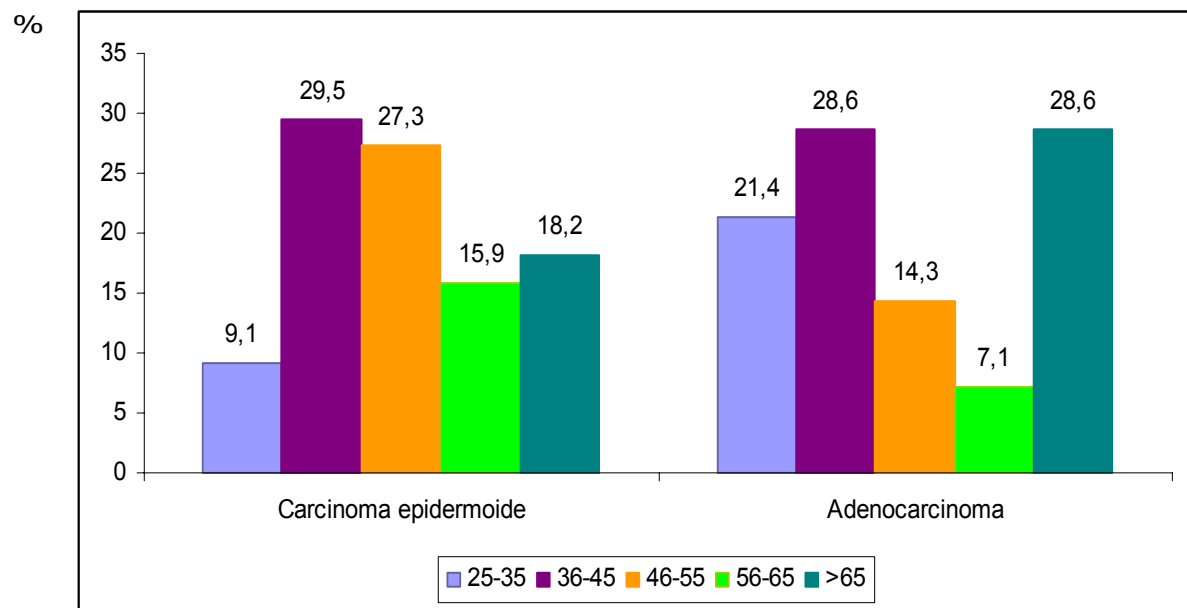


Gráfico N° 2. Distribución porcentual de los tipos histopatológicos de cáncer invasor de cuello uterino por grupos de edad (años).

2.1.2 Características histopatológicas.

2.1.2.1 Tamaño tumoral.

El dato correspondiente al tamaño de la pieza, sólo de tipo tumoral, se obtuvo del informe histopatológico macroscópico, encontrando así que nuestra serie de tumores de cáncer de cuello uterino mostró un tamaño predominantemente pequeño, con un rango de 0,20 cm hasta 8 cm, con un valor promedio de 1,46 cm y de mediana igual a 1 cm (tabla N° 5).

2.1.2.2 Diagnóstico histopatológico.

Los casos de cáncer de cuello uterino se clasificaron siguiendo los criterios de Blaustein (1994), obteniéndose la siguiente distribución:

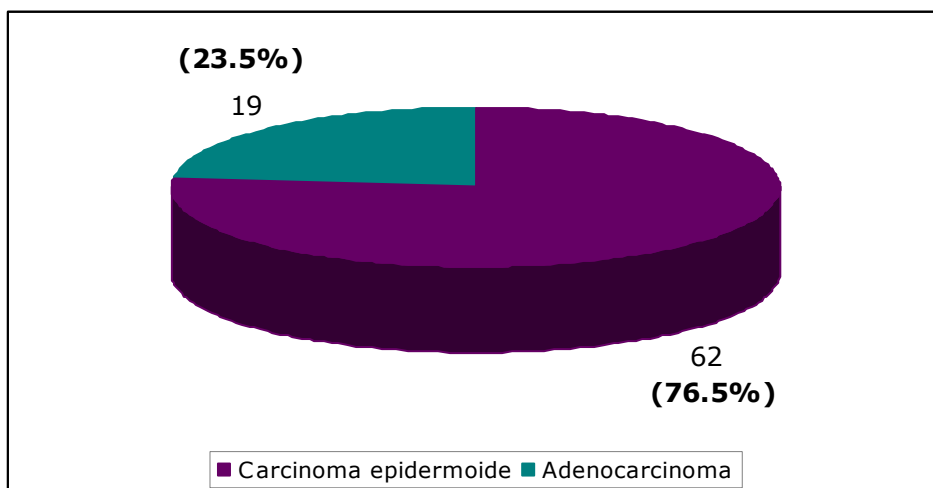


Gráfico N° 3. Distribución porcentual de los casos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al diagnóstico histopatológico. n=81.

Como se aprecia en la gráfica anterior, 62 tumores cervicales se encuentran en la categoría diagnóstica de carcinoma epidermoide **(76.5%)** y 19 en el tipo histológico de adenocarcinoma **(23.5%)**.

Si consideramos los diferentes grados de diferenciación tumoral en los carcinomas epidermoides obtenemos la siguiente distribución, que se ilustra con el gráfico N° 4. En la población de carcinoma epidermoide de cuello uterino de este estudio predomina el grupo de tumores moderadamente diferenciados (MD) **(43.5%)**, seguido de los bien diferenciados (BD) (21%). El grupo de los carcinomas con menos diferenciación quedó conformado por 22.6% de los inmaduros (I) más el 12.9% de los inmaduros e indiferenciados (II).

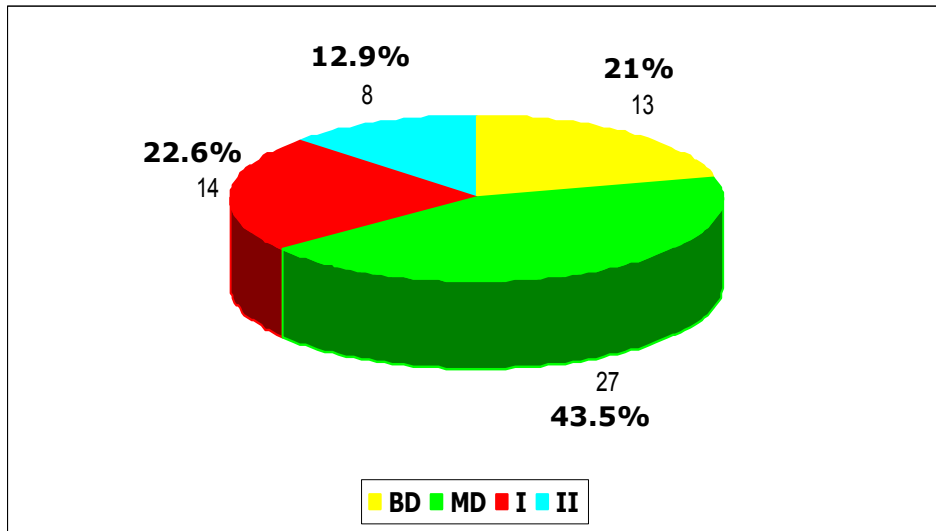


Gráfico N° 4. Distribución porcentual de los casos de carcinoma epidermoide de acuerdo al grado de diferenciación tumoral. n=62. BD: bien diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; I: inmaduro; II: inmaduro e indiferenciado.

Por otra parte, considerando los subtipos histológicos en los casos de adenocarcinoma cervical obtenemos el siguiente gráfico:

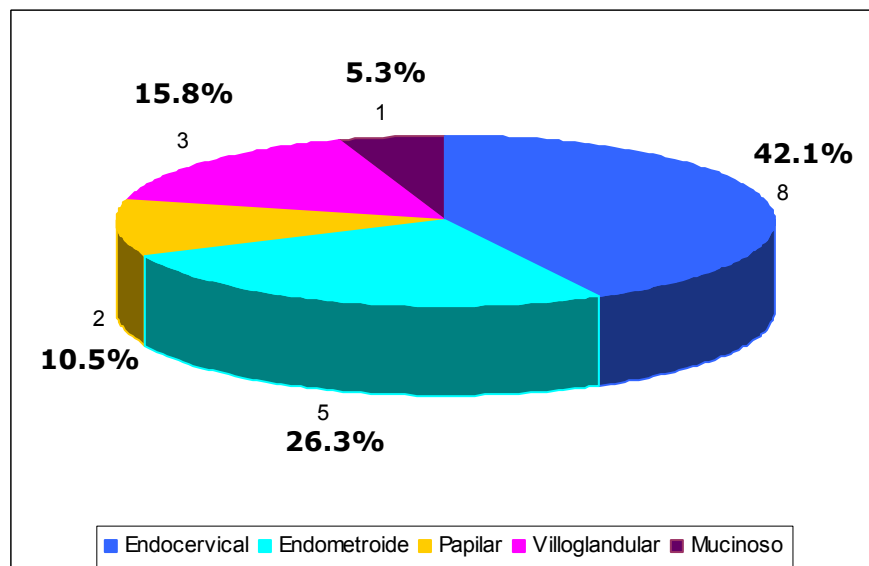


Gráfico N° 5. Distribución porcentual del los casos de adenocarcinoma cervical de acuerdo al subtipo histológico. n=19.

La mayor proporción de adenocarcinomas pertenece al tipo endocervical (42.1%), seguido de los adenocarcinomas endometrioides (26.3%); los tipos villoglandular y papilar alcanzaron porcentajes el 15.8% y 10.5%, respectivamente; el 5.3% restante representa a un tipo mucinoso.

Así pues, el tipo histológico de cáncer de cuello uterino encontrado con mayor frecuencia en este estudio fue el carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado, diagnóstico que representa cerca de la mitad de la población tumoral estudiada (43.5%); el adenocarcinoma de tipo endocervical resultó el más frecuente en este subgrupo (42.1 %).

El diagnóstico histopatológico correspondiente a los 22 controles de cuello uterino consistió en: 1 cuello uterino normal, 16 con diagnóstico de metaplasia escamosa, 2 con cervicitis crónica, 2 con cervicitis quística y 1 con hiperplasia cervical quística.

3.-HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS. FRECUENCIAS, ANÁLISIS BIVARIANTE, CORRELACIONES.

La evaluación de la respuesta inmunohistoquímica de los casos y controles se realizó basándonos en la escala semicuantitativa previamente establecida para este fin. Además, se realizó en determinados anticuerpos, una apreciación cualitativa de la intensidad de la tinción, que varió entre núcleos pálidos hasta núcleos intensamente teñidos. Lo mismo se hizo para el citoplasma o la membrana celular.

Los casos y controles en los cuales no fue posible realizar la evaluación inmunohistoquímica (no valorable, NV) se debieron a que la presencia de las células tumorales en el disco tisular no alcanzaba al número mínimo de 100 células debido a que el círculo estaba desintegrado, porque estaba conformado sólo por estroma o simplemente habíamos perdido el tejido tumoral.

Todos los controles de reactividad conocida, tanto negativos como positivos, incluidos en las micromatrices tisulares respondieron a los anticuerpos como se esperaba. De igual forma lo hicieron aquellos utilizados como controles externos aparte de los anteriormente mencionados.

A continuación exponemos los hallazgos inmunohistoquímicos para cada biomarcador incluyendo el análisis de frecuencias y una breve descripción de lo observado durante el análisis, tanto para los casos de cáncer cervical como para los controles, ilustrados con microfotografías. Los apartados N° 3.8 y 3.9 contienen las tablas que resumen los hallazgos inmunohistoquímicos en los tipos histológicos de cáncer cervical separados de acuerdo al grado de diferenciación tumoral en el caso de los carcinomas epidermoides (**apartado N° 3.8**) y en los diferentes subtipos histológicos de adenocarcinoma cervical (**apartado N° 3.9**), que conforman el material de nuestro estudio.

A fin de tener una apreciación global de los hallazgos inmunohistoquímicos, en las siguientes tablas se resume por separado la frecuencia de la

inmunoreactividad del panel de biomarcadores evaluados en este estudio, para tumores y controles, resaltando el mayor porcentaje de reactividad, ya sea positiva o negativa:

Tabla Nº 6. Frecuencia de la inmunoreactividad de los biomarcadores en la serie de casos de cáncer de cuello uterino.

Biomarcador	Cáncer de cuello uterino	
	Positiva n(%)	Negativa n(%)
Ki-67	80(100)	-
Ciclina D1	25(32.1)	53(67.9)
pRb	24(30)	56(70)
p16	62(79.5)	16(20.5)
p21	42(52.5)	38(47.5)
p27	42(53.2)	37(46.8)
Ciclina E	6(7.7)	72(92.3)
p53	3(3.9)	74(96.1)
MDM-2	79(100)	-
Bax	52(67.5)	25(32.5)
Bcl-2	3(3.7)	78(96.3)
Cadherina-E	59(76.6)	18(23.4)
CD44s	70(90.9)	7(9.1)
CD44v3	79(97.5)	2(2.5)
Ubicuitina	79(98.7)	1(1.3)
CK	78(97.5)	2(2.5)
CEA	70(89.7)	8(10.3)
Telomerasa	41(52.6)	37(47.4)

Tabla N° 7. Frecuencia de la inmunexpresión de los biomarcadores en la serie de tejido cervical benigno (controles) incluida en este estudio.

Biomarcador	Controles	
	Positiva n(%)	Negativa n(%)
Ki-67	44(100)	-
Ciclina D1	37(100)	-
pRb	1(2.6)	37(97.4)
p16	9(20.5)	35(79.5)
p21	2(4.7)	41(95.3)
p27	15(36.6)	26(63.4)
Ciclina E	-	44(100)
p53	-	44(100)
MDM-2	22(50)	22(50)
Bax	-	44(100)
Bcl-2	-	44(100)
Cadherina-E	34(77.3)	10(22.7)
CD44s	36(81.8)	7(18.2)
CD44v3	36(81.8)	8(18.2)
Ubicultina	33(76.8)	10(23.2)
CK	44(100)	-
CEA	44(100)	-
Telomerasa	10(22.7)	34(77.3)

3.1 Actividad proliferativa. Expresión de *Ki-67*(*MIB-1*).

Para determinar la actividad proliferativa en nuestra serie de tumores y controles mediante la inmunexpresión del antígeno *Ki-67*, consideramos positivas aquellas muestras con tinción nuclear. Si estas mostraban menos del 5% de las células teñidas, la inmunoreactividad se consideró baja.

La expresión inmunohistoquímica de *Ki-67* pudo evaluarse en 80/81 de los casos de cáncer de cuello uterino de nuestra serie, los cuales revelaron diferentes porcentajes de inmunoreactividad, en 19(23.8%) casos fue de baja expresión y en el resto de los casos fue entre moderada y muy alta, 61(76.2%). Los 44 controles cervicales fueron valorables y la respuesta nuclear fue positiva para este anticuerpo en menos del 25% de las células epiteliales. Estos resultados se resumen en la tabla N° 8.

Tabla N° 8. Expresión de la *Ki-67* en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

<i>Ki-67</i>	Positivos	Negativos
	Nº(%)	Nº(%)
Casos	80(100%)	-
Controles	44(100%)	-

Al comparar la expresión de *Ki-67* en los tumores y controles, la diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.008$). El 100% de los tumores y controles fueron reactivos para *Ki-67*, pero los controles mostraron expresión en <25% de las células cervicales inmaduras, que más adelante se describe con detalle, y en cambio los tumores fueron desiguales (reactividad entre baja y muy alta).

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para *Ki-67* se resume en la tabla N° 9. 61 (76.3%) eran carcinomas epidermoides y 19 (23.8%) adenocarcinomas. En general, los casos demostraron heterogeneidad en la expresión de *Ki-67* que se detalla a continuación, destacando los intervalos que demuestran una actividad proliferativa entre moderada y alta, pero sin

diferencias significativas ($p=0.441$):

Tabla N° 9. Expresión de Ki-67 en los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de reactividad celular.

Expresión Ki-67	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)	Total N°
Menos del 5%(baja)	14(23%)	5(26.3%)	19
Entre 5 y menos 25%(moderada)	16(26.2%)	6(31.6%)	22
Entre 25 y menos 50%(alta)	19(31.1%)	6(31.6%)	25
Más de 50%(muy alta)	12(19.7%)	2(10.5%)	14
Total	61	19	80

$p= 0.441$

Aunque no hubo diferencias significativas entre los tipos histológicos de tumor y la expresión de Ki-67, se aprecia que los adenocarcinomas endocervicales tienen mayor actividad de proliferación celular que los carcinomas epidermoides. La figura N° 21 ilustra la expresión del indicador de proliferación celular en tumores cervicales invasores.

La actividad proliferativa en los carcinomas epidermoides de este estudio estaba incrementada. El 100% de ellos mostraron reactividad para Ki-67 aunque de forma heterogénea según la morfología. En todos los grados de diferenciación tumoral hubo desde baja expresión hasta muy alta expresión: la mayor reactividad fue en los carcinomas epidermoides BD (84.6%), seguido de los I (78.6%), MD (74.1%) y, con menos expresión de Ki-67, los II (71.4%). Este último grupo presentó mayor proporción de casos con menos del 5% de las células tumorales teñidas, con lo cual fue el que menos expresó el antígeno de proliferación celular, aunque sin diferencias significativas ($p=0.781$).

La expresión de Ki-67 en los adenocarcinomas cervicales fue del 100%, la mayor proporción de casos mostró tinción entre baja y moderada. Si agrupamos los casos en los que mostraron tinción en menos del 25% de las células tumorales y los que mostraron tinción en más del 25% de las células tumorales, tenemos los siguientes resultados: 57.89% (11/19) con

reactividad entre baja y moderada; 42.1% (8/19) con reactividad entre alta y muy alta, aunque sin diferencias significativas ($p=0.867$). Los adenocarcinomas endocervicales (42.1%) y los endometrioides (26.3%) fueron los que demostraron mayor actividad proliferativa.

La respuesta nuclear al anticuerpo MIB-1 en el tejido epitelial del exocérnix benigno estuvo limitada al estrato profundo del epitelio poliestratificado plano, tanto en las células basales como las parabasales. En los estratos intermedio y superficial predominó la negatividad ante este anticuerpo (figura N° 22a). Por el contrario, el tejido endocervical mostró reacción nuclear esporádica representativa de actividad proliferativa baja, algunos núcleos de las células del estroma se tiñeron con este anticuerpo (figura N° 22b).

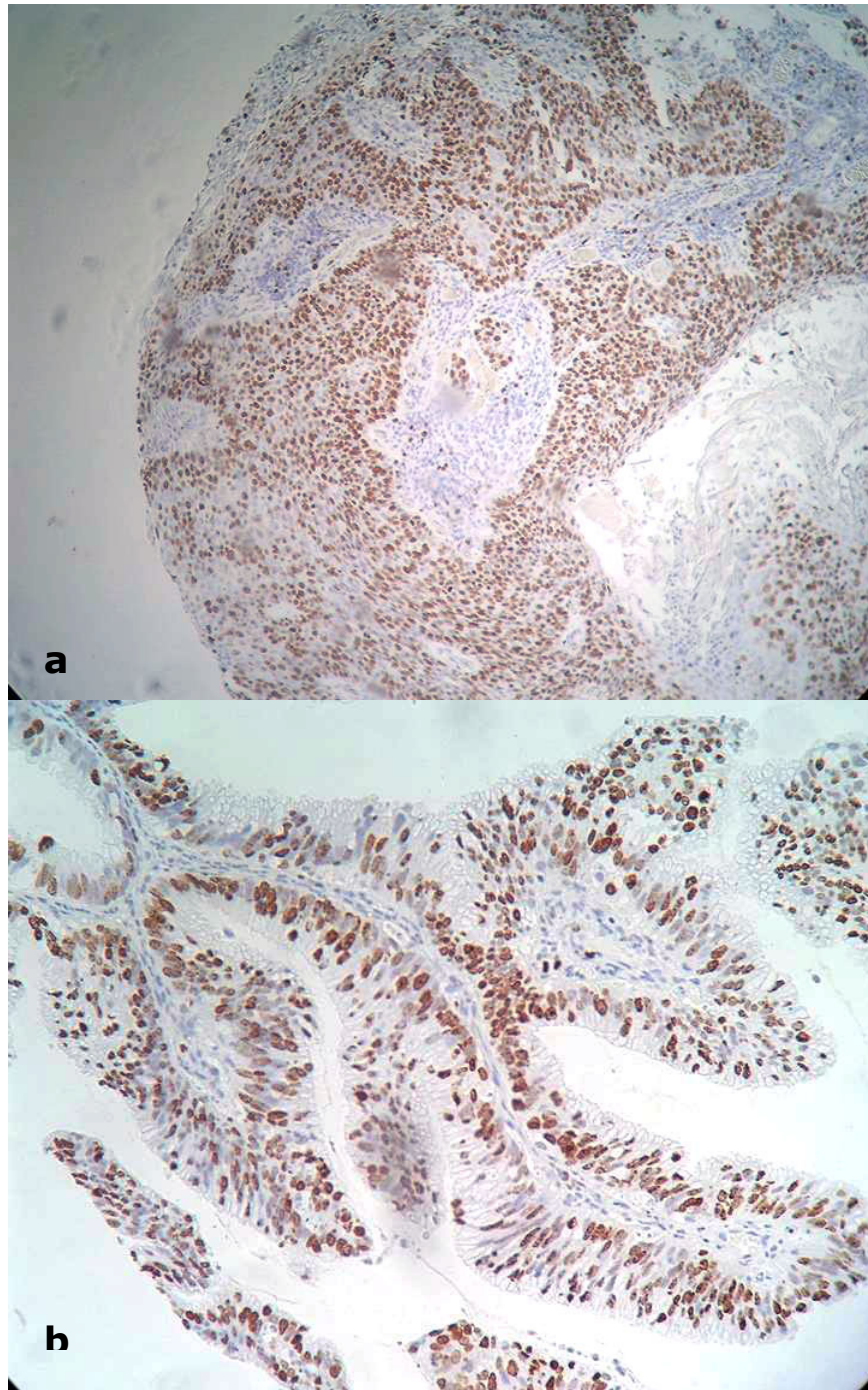


Figura N° 21. Expresión de Ki-67 en cáncer de cuello uterino: a carcinoma epidermoide (10x), b adenocarcinoma endocervical tipo villoglandular (40x).

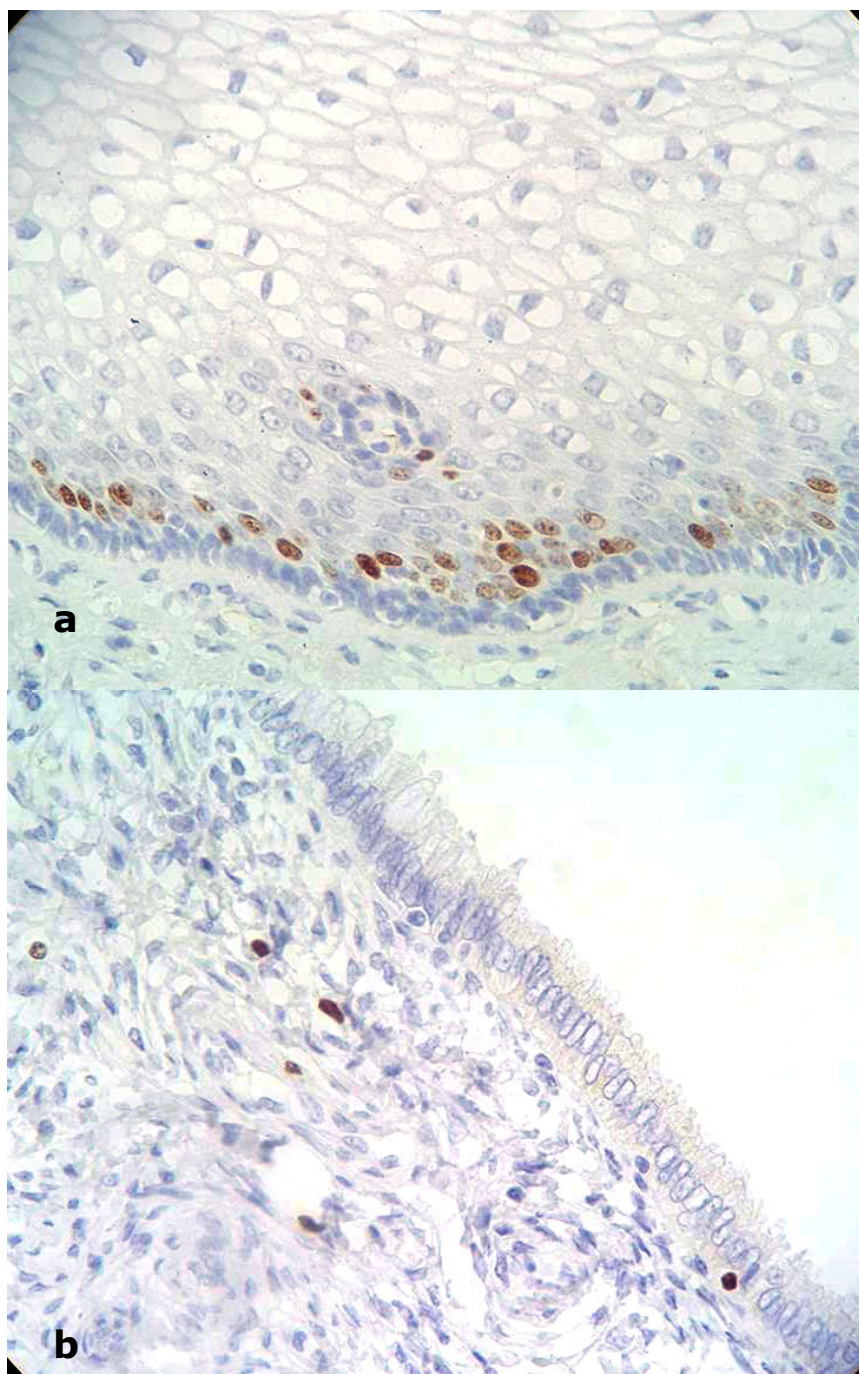


Figura Nº 22. a. Ki-67 en exocervix benigno. Los núcleos de las células maduras y bien diferenciadas son negativos ante el anticuerpo MIB-1. b Ki-67 con expresión focal en endocervix normal, se tiñen algunos núcleos del estroma (Ambas 20x).

3.2 Reguladores del ciclo celular.

3.2.1 CICLINA D1.

La expresión inmunohistoquímica de la ciclina D1 fue considerada positiva cuando observamos tinción densa a nivel del núcleo. Dicha evaluación pudo llevarse a cabo en 78/81 de los casos de cáncer de cuello uterino de nuestra serie; de estos 25(32.1%) revelaron inmunoreactividad para la ciclina D1 y **53(67.9%)** casos no mostraron ningún tipo de respuesta para este antígeno. De los 44 controles cervicales fueron valorables 37 y todos ellos fueron positivos para ciclina D1. Estos resultados se muestran en la tabla N° 10.

Tabla N° 10. Expresión de la ciclina D1 en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

Ciclina D1	Positivos	Negativos
	Nº(%)	Nº(%)
Casos	25(32.1%)	53(67.9%)
Controles	37(100%)	-

Al comparar la expresión de la ciclina D1 en los tumores y controles, la diferencia fue estadísticamente muy significativa ($p < 0.0002$), siendo los controles completamente positivos.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de la ciclina D1 de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 11. El 68.9% de los carcinomas epidermoides y el 64.7% de los adenocarcinomas resultaron negativos. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.750$).

Tabla N°11. Expresión de la ciclina D1 de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Ciclina D1			
Tipos Histológicos	Positivos Nº(%)	Negativos Nº(%)	Total
Carcinoma epidermoide	19(31.1%)	42(68.9%)	61
Adenocarcinoma	6(35.3%)	11(64.7%)	17
Total	25	53	78

$p= 0.750$

La mayor proporción de casos de carcinoma cervical (21/25) con reactividad positiva para la ciclina D1 mostraron tinción entre el 5-25% (+) de las células malignas. El patrón de tinción fue granular fino y difuso. No se apreció tinción citoplasmática (figura N° 23).

La inmunoexpresión de la ciclina D1 en los carcinomas epidermoides fue reducida (31.1%) y con porcentajes de positividad semejantes entre los grupos. Los más expresivos fueron los BD(38.5%) y los II(37.5%), disminuyendo la expresión en los I(30.8%) y MD(25.9%). No hubo diferencias significativas ($p=0.996$).

La ciclina D1 se expresó en el 50% tanto de los adenocarcinomas endocervicales como de los endometrioides y sin respuesta en los papilares, villoglandulares y en el mucinoso ($p=0.240$).

En el tejido benigno del exocérvix, la inmunorespuesta para la ciclina D1 dejó ver núcleos teñidos pero pálidos, dispersos en los 2/3 inferiores del espesor epitelial, fundamentalmente en el estrato basal y parabasal así como las células intermedias bajas. Cerca ya de la superficie epitelial, los núcleos de las células intermedias altas y superficiales así como los núcleos de las células del estroma, no mostraban coloración (figura N° 24. a). A nivel endocervical, también la tinción nuclear fue pálida al lado de núcleos completamente incoloros, observación que se ilustra en la figura N° 24. b.

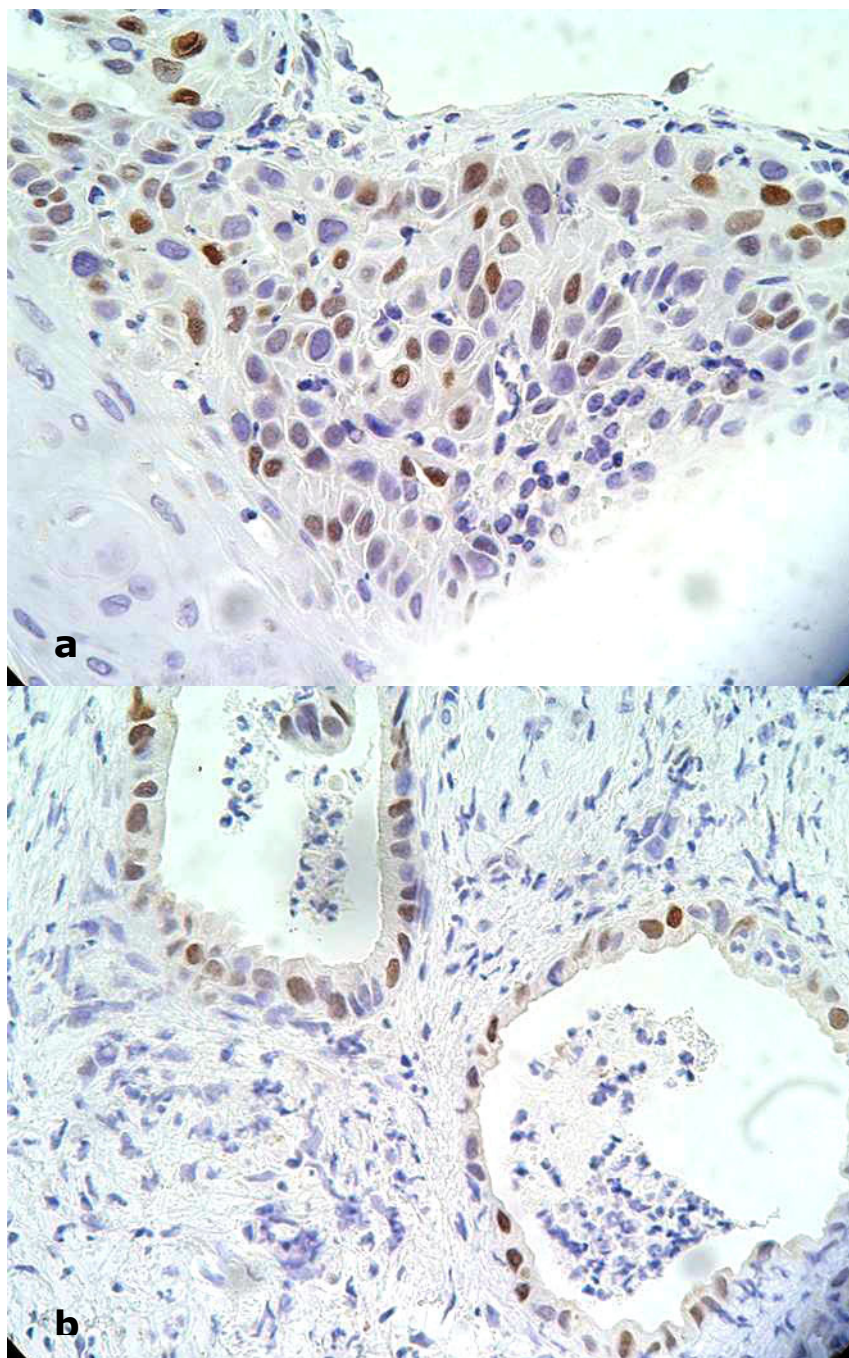


Figura Nº 23. Expresión de la ciclina D1 en cáncer de cuello uterino. a. Carcinoma epidermoide. b. Adenocarcinoma endocervical. (Ambas 40x).

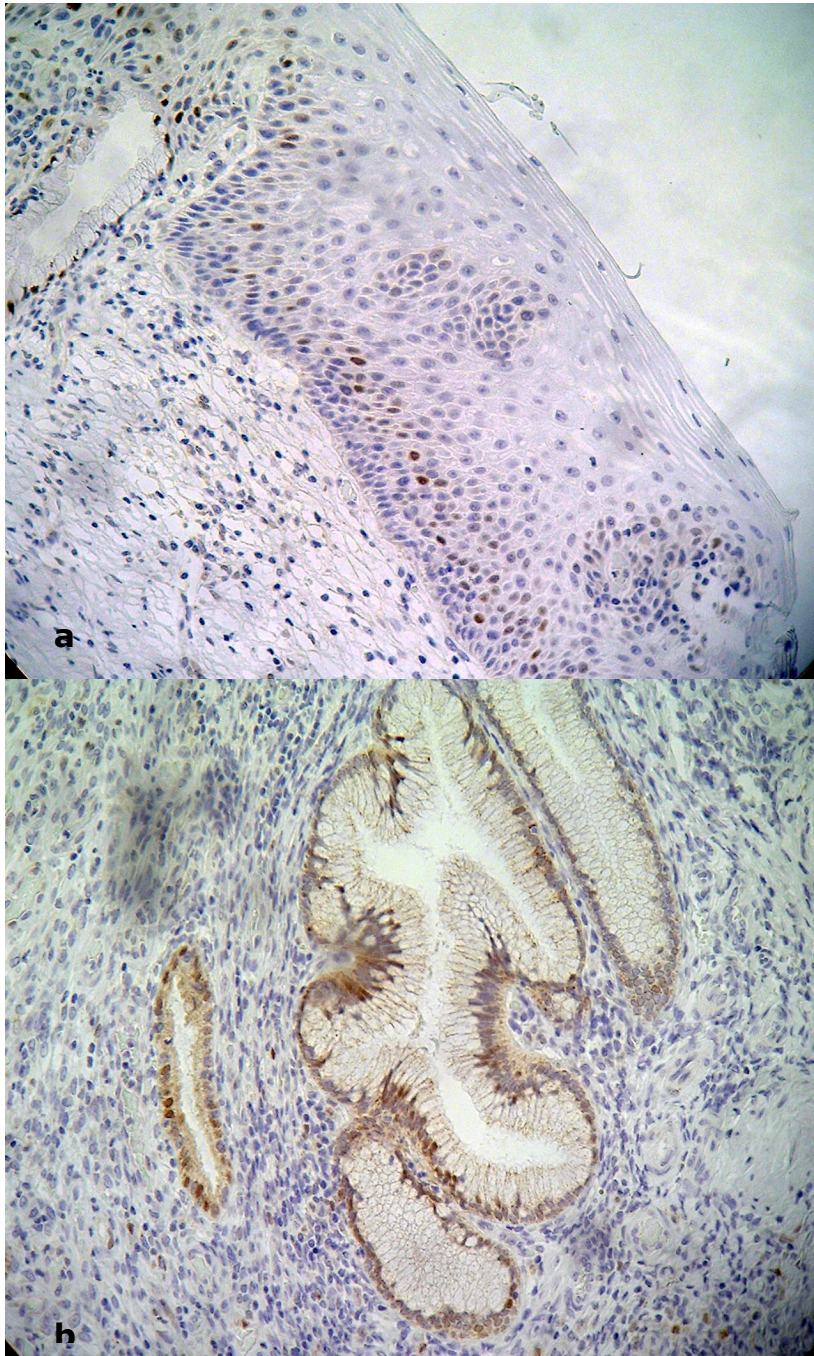


Figura Nº 24. Expresión de la ciclina D1 en tejido cervical benigno. a. En exocérnix se tiñen fundamentalmente núcleos del estrato basal y parabasal. b. En endocérnix, la tinción nuclear es focal al lado de núcleos incoloros. (Ambas 20x.)

3.2.2 PROTEÍNA pRb.

Durante la evaluación de la expresión inmunohistoquímica de la proteína pRb, se consideraron positivas sólo aquellas células con tinción nuclear. Dicha evaluación pudo llevarse a cabo en 80/81 de los casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio; de estos, el 30% reveló inmunoreactividad para la pRb y el 70% no mostró ningún tipo de respuesta para este antígeno. De los 44 controles cervicales fueron evaluados 38: 2.6% respondieron positivamente mientras que en el 97.4% no hubo respuesta, como se aprecia en la tabla N° 12.

Tabla N° 12. Expresión de la proteína pRb en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

pRb	Positivos	Negativos
	Nº(%)	Nº(%)
Casos	24(30%)	56(70%)
Controles	1(2.6%)	37(97.4%)

Al comparar la expresión de la pRb en los tumores y controles, la diferencia fue estadísticamente muy significativa ($p=0.001$), siendo los controles más frecuentemente negativos que los tumores.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de pRb de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 13. El 76.3%(61) correspondía a carcinomas epidermoides y el 23.8%(19) a adenocarcinomas. De los 56 casos de cáncer de cuello uterino que resultaron negativos, los carcinomas epidermoides alcanzaron el 65.6% y los adenocarcinomas el 84.2%, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.125$).

Tabla N° 13. Expresión de la pRb de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	pRb		Total
	Positivos Nº(%)	Negativos Nº(%)	
Carcinoma epidermoide	21(34.4%)	40(65.6%)	61
Adenocarcinoma	3(15.8%)	16(84.2%)	19
Total	24	56	80

$p= 0.125$

La mayoría de los casos de cáncer cervical (20/24) positivos para la pRb mostraron tinción entre el 5-25% (+) de las células malignas y sólo 4 casos mostraron ++ de reactividad. Se observó, además, que la distribución de la inmunotinción fue irregular, inclusive variando de un área a otra dentro de un mismo tumor (núcleos pálidos al lado de núcleos más densos). Hubo casos: 7 carcinomas epidermoides y 5 adenocarcinomas, que mostraron tinción únicamente a nivel citoplasmático, por lo que fueron incluidos dentro de los casos negativos para la expresión de la pRb. La reactividad positiva en los carcinomas cervicales para la pRb se ilustra en la figura N° 25.

La inmunoexpresión de la pRb en el carcinoma epidermoide estaba reducida (34.4%) y además era heterógena entre los distintos grupos de grado de diferenciación, aunque no encontramos diferencias significativas ($p=0.134$). Los BD 7/13(53.8%) y los I 5/14(35.7%) mostraron mayor expresión que los MD 8/27(29.6%) y los II 1/7(14.3%). En cuanto a la localización celular de la expresión de la pRb, tampoco hubo diferencias significativas, predominando la expresión nuclear ($p=0.464$). El 46.1% (6/13) de los BD expresaron la pRb en el núcleo (incluyendo los que la expresaron solo en núcleo mas los que mostraron expresión N/C), seguido del 35.7% (5/14) de los I, 29.6% (8/27) de los MD y 14.3% (1/7) de los II. Llamó la atención, que el 14.3%(1/7) de los II presentó tinción citoplasmática de la pRb semejante al 14.8%(4/27) de los MD.

El 25% de los adenocarcinomas endocervicales y el 20% de los

endometrioides revelaron respuesta nuclear ante el anticuerpo contra pRb; el resto de los casos fueron negativos y no hubo diferencias significativas ($p=0.358$). La localización de la inmunexpresión de la pRb en los diferentes subtipos histológicos de adenocarcinoma fue predominantemente citoplasmática y considerada negativa. La expresión a nivel nuclear se observó en el 25%(2/8) de los endocervicales y en el 20%(1/5) de los endometrioides ($p=0.936$).

La expresión inmunohistoquímica de la proteína pRb en la mucosa cervical benigna mostró expresión de intensidad moderada en los núcleos del estrato profundo, principalmente en las células con mayor actividad proliferativa y en algunos del estrato intermedio. Luego fue disminuyendo hasta desaparecer a medida que las células se acercan a la superficie epitelial (figura N° 26. a). Los núcleos de las células endocervicales adyacentes a la membrana basal tomaron la tinción levemente, lo cual también pudo verse en algunos casos a nivel citoplasmático (figura N° 26. b).

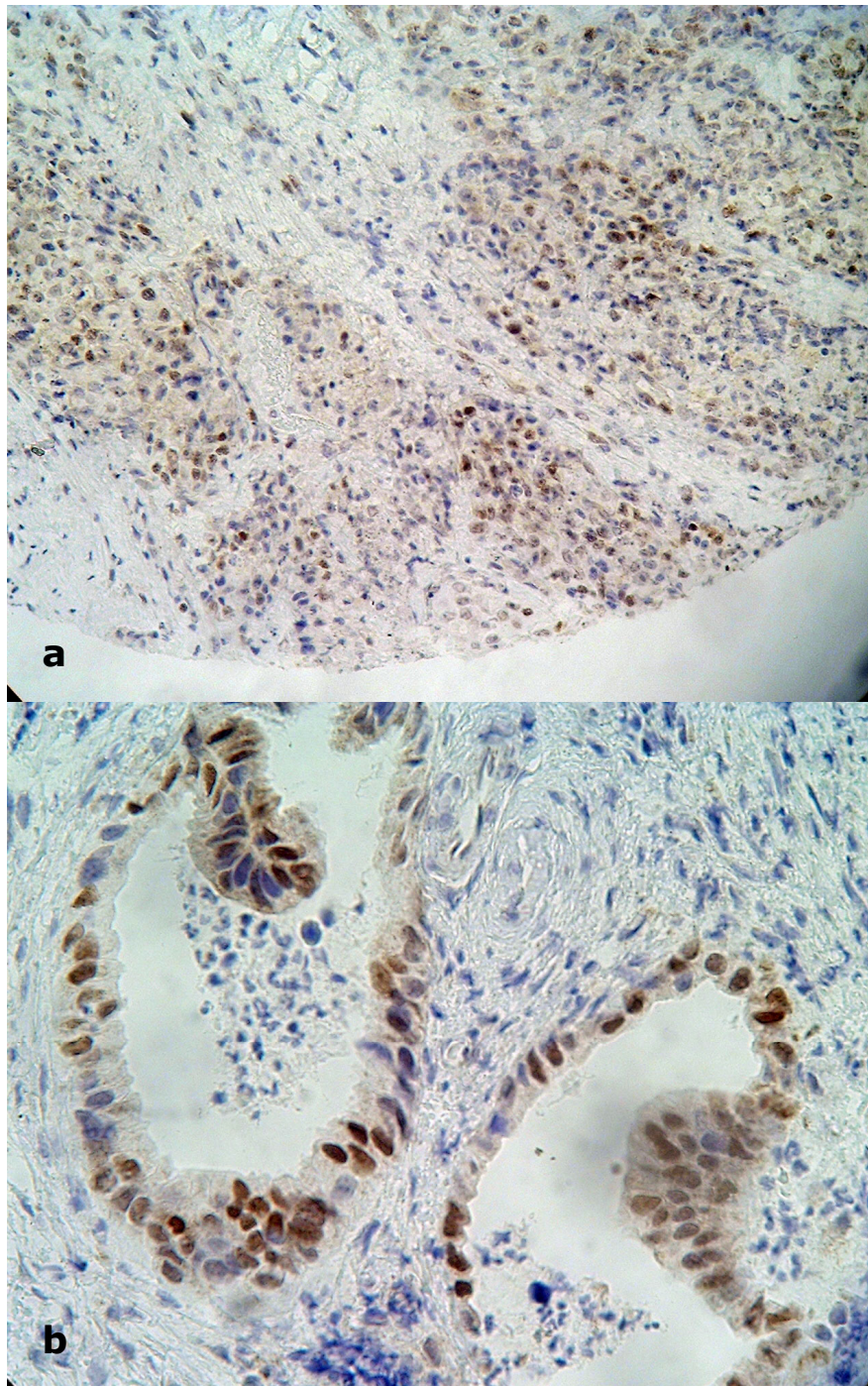


Figura N° 25. Expresión de pRb en cáncer de cuello uterino. a. Carcinoma Epidermoide. (20x). b. Adenocarcinoma endocervical (40x).

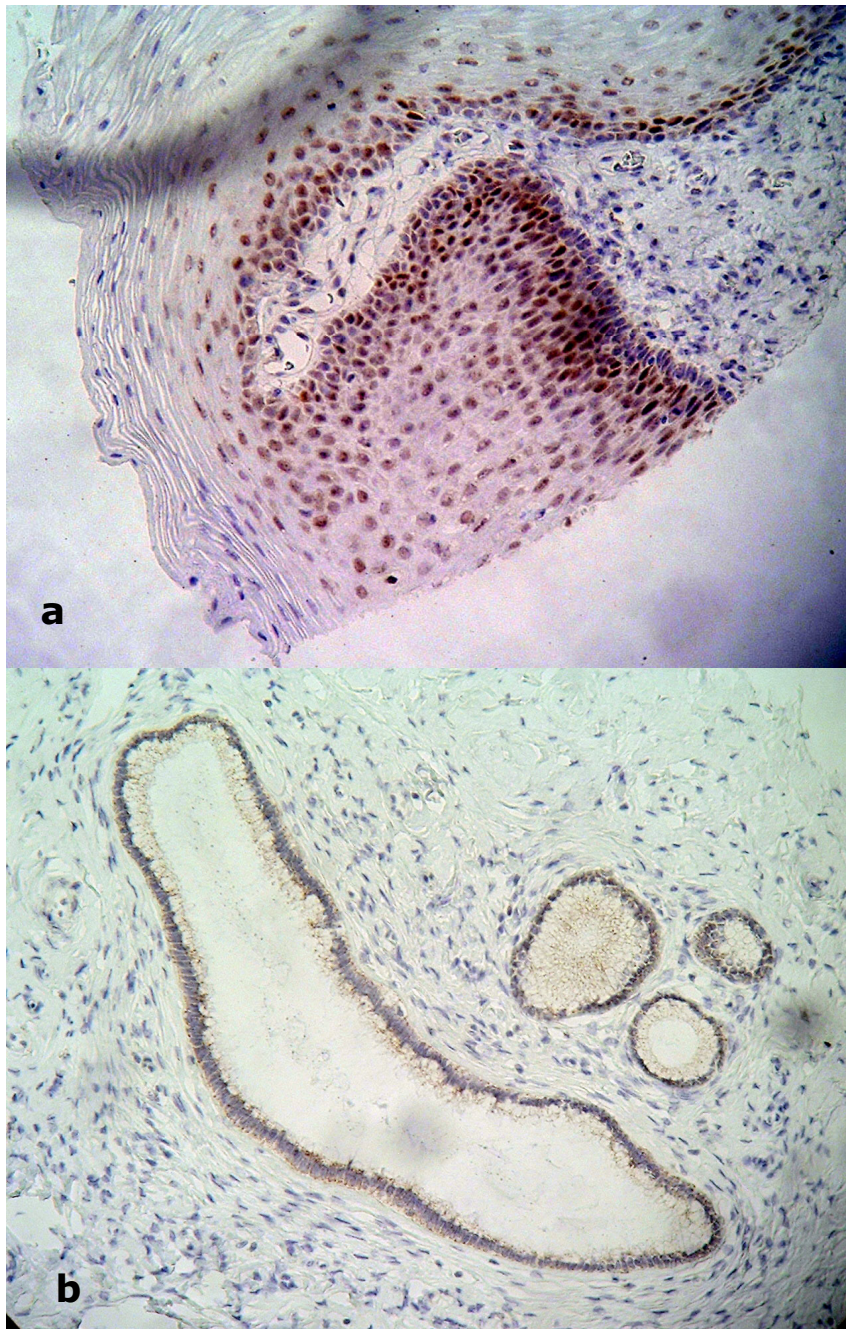


Figura N° 26. Expresión de la pRb en tejido cervical benigno. a. Los núcleos del estrato profundo y algunos del estrato intermedio muestran positividad. b. En el endocérnix se aprecia reactividad leve nuclear y citoplasmática, se tiñen algunos núcleos del estroma. (Ambas 20x).

3.2.3 PROTEÍNA p16INK4a.

Se consideró inmunoreactividad positiva contra la proteína p16 si los núcleos y/o citoplasmas celulares mostraban tinción. La evaluación de la inmunoexpresión de la p16 pudo llevarse a cabo en 78/81 de los casos de cáncer de cuello uterino. De los 78 casos, 62(79.5%) revelaron inmunoreactividad para la p16 y 16(20.5%) no mostraron ningún tipo de respuesta. Los 44 controles cervicales fueron evaluados para este anticuerpo y los porcentajes de reactividad positiva y negativa fueron coincidentalmente opuestos a los determinados en los tumores: 20.5% positivos y 79.5% negativos, como se aprecia en la siguiente tabla:

Tabla N° 14. Expresión de la proteína p16 en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

p16INK4a	Positivos	Negativos
	Nº(%)	Nº(%)
Casos	62(79.5%)	16(20.5%)
Controles	9(20.5%)	35(79.5%)

Al comparar la expresión de la p16 en los tumores y controles, la diferencia fue estadísticamente muy significativa ($p < 0.0001$) ya que los tumores sobrepresaron la p16 en comparación con los controles.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de p16 de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 15. 61(78.2%) casos eran carcinomas epidermoides y 17(21.8%) adenocarcinomas. 16 casos de cáncer de cuello uterino resultaron negativos: 18% carcinomas epidermoides y 29.4% adenocarcinomas, sin diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.874$)

Tabla N° 15. Expresión de la p16 de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	p16		Total
	Positivos Nº(%)	Negativos Nº(%)	
Carcinoma epidermoide	50(82%)	11(18%)	61
Adenocarcinoma	12(70.6%)	5(29.4%)	17
Total	62	16	78

$p= 0.874$.

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para la p16 (tabla N° 16) reveló que la menor proporción de casos de ambos tipos histológicos (22), mostraba tinción entre el 5-25% de las células (+): 19(31.1%) carcinomas epidermoides y 3(17.6%) adenocarcinomas. Por el contrario, 31 carcinomas epidermoides y 9 adenocarcinomas mostraron más del 25% (++/+++) de las células teñidas. Como se puede observar, en estos intervalos no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.874$). A pesar de ello, resalta que los adenocarcinomas mostraron mayor porcentaje de casos con +++ de reactividad (35.3%) que los carcinomas epidermoides (21.3%), lo que indica que la producción de la p16 es más acentuada en ese tipo histológico.

Tabla N° 16. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para la p16.

Expresión p16	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+	19(31.1%)	3(17.6%)
++	18(29.5%)	3(17.6%)
+++	13(21.3%)	6(35.3%)
Total	50	12

$p= 0.874$

De los 50 casos de carcinoma epidermoide, 48(78.7%) mostraron expresión de la p16 en el núcleo y 2(3.3%) en el citoplasma. Los 12 adenocarcinomas (70.6%) expresaron la p16 sólo a nivel nuclear. No se observaron diferencias significativas entre ambos tipos histopatológicos ($p=0.225$), como se aprecia en la tabla N° 17. No hubo casos con tinción en ambos compartimientos celulares. La figura N° 27 es un ejemplo de la localización celular de p16. En los carcinomas, la intensidad de la tinción nuclear fue entre moderada y marcada, mostrando inclusive irregularidad de la expresión dentro de un mismo tumor; en los citoplasmas se mostró clara y homogénea. En los adenocarcinomas fue menos intensa.

Tabla N° 17. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo a la localización celular de la expresión de p16.

Localización p16	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
Nuclear	48(78.7%)	12(70.6%)
Citoplasmática	2(3.3%)	-
Total	50	12

$p= 0.225$

No encontramos diferencias significativas ($p=0.776$) en la sobreexpresión de p16 en relación al grado de diferenciación tumoral de los carcinomas epidermoides. Sin embargo, la mayor proporción de casos con expresión de p16 (con células malignas teñidas entre el 5-50%) correspondió a 12/13 carcinomas epidermoides BD (92.3%), seguida de 12/14 carcinomas epidermoides I (85.7%). El 78.7%(48/61) de los carcinomas epidermoides mostró localización nuclear. Sólo en los tumores de mayor diferenciación se observó ubicación citoplasmática (BD 7.7%; MD 3.7%), sin que existieran diferencias importantes ($p=0.183$).

Hubo sobreexpresión de p16 en el 100% (1 caso) de tipo mucinoso al igual que los endometrioides, en el 75% de los adenocarcinomas endocervicales y en el 50% de los villoglandulares. Los de tipo papilar fueron negativos para esta proteína, sin diferencias significativas ($p=0.861$). En cuanto a la localización de la sobreexpresión de p16 fue a nivel nuclear en 70.6%(12/17) adenocarcinomas. Esta localización se observó en los 4/4 endometrioides (100%), en el mucinoso (100%), en 6/8 endocervicales (75%) y en 1/2 casos del tipo villoglandular (50%). No hubo diferencias significativas entre estos subtipos histológicos ($p=0.950$).

La inmunoreactividad para p16 en el tejido cervical benigno reveló las siguientes características: el exocérvix mostró algunos núcleos teñidos sobre todo en el estrato basal, con ausencia de reactividad en las capas superiores; a nivel del estroma encontramos tinción focal (figura N° 28 a). La tinción nuclear fue esporádica en las células endocervicales (figura N° 28. b). No se observó tinción citoplasmática.

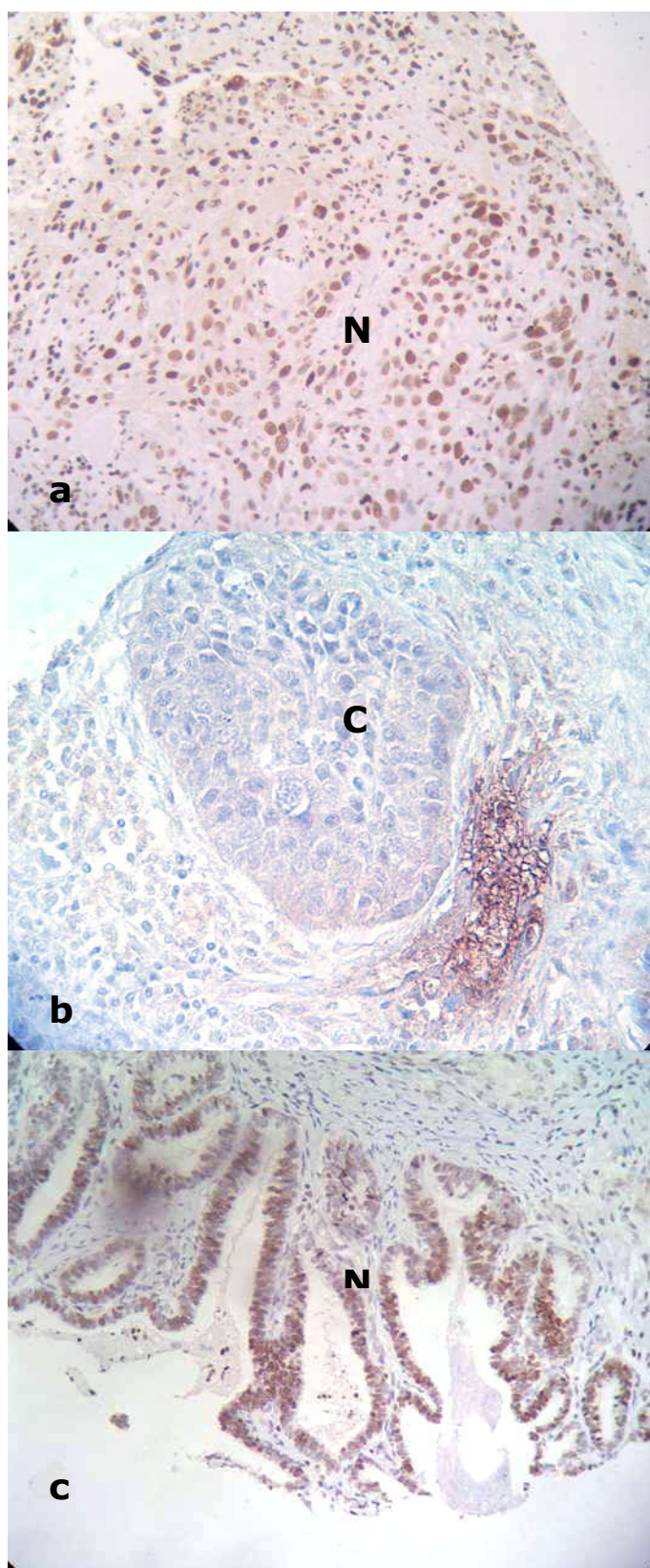


Figura N° 27. Localización celular de la expresión de la *p16INK4a* en: a y b. carcinoma epidermoide (40x). c. Adenocarcinoma endocervical (20x). N=nuclear, C=citoplasmática.

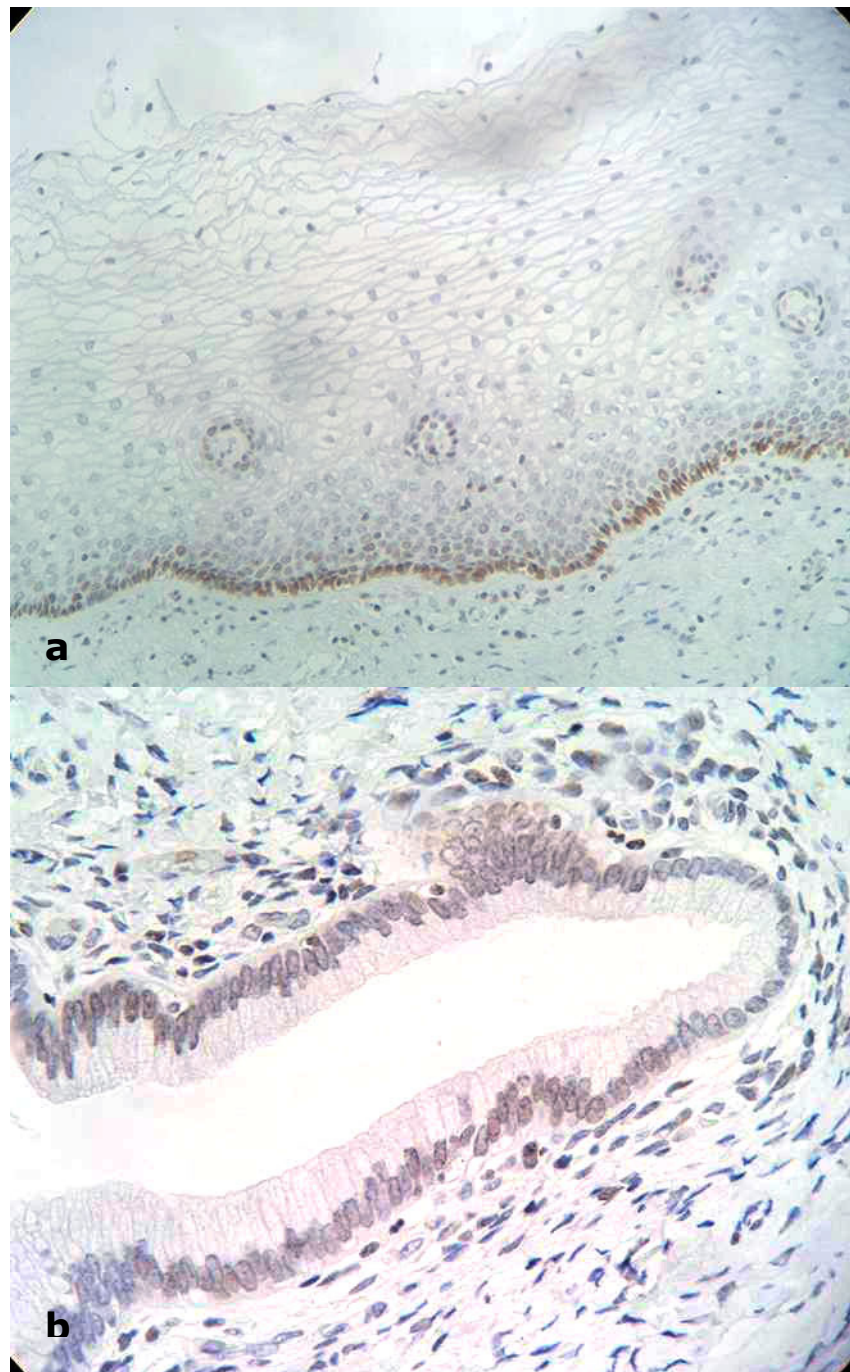


Figura Nº 28 a. Expresión de *p16INK4a* en exocervix benigno. Los núcleos del estrato basal son positivos (20x). b. En el endocervix benigno se aprecian algunos núcleos con tinción pálida positiva, también se tiñen núcleos en el estroma (40x).

3.2.4 **PROTEÍNA p21WAF1.**

Durante la evaluación de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p21, se consideraron positivos aquellos casos con tinción a nivel nuclear. Dicha evaluación pudo llevarse a cabo en 80/81 de los casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio; de estos, 52.5% revelaron inmunoreactividad para la p21 y 47.5% de los casos no mostraron ningún tipo de respuesta para este antígeno. De los 44 controles cervicales, fueron evaluados 43: el 4.7% respondió positivamente mientras que en el 95.3% no hubo respuesta. Estos resultados se muestran en la tabla N° 18.

Tabla N° 18. Expresión de la proteína p21 en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

p21	Positivos	Negativos
Casos	42(52.5%)	38(47.5%)
Controles	2(4.7%)	41(95.3%)

Al comparar la expresión de la p21 en los tumores y controles, la diferencia fue estadísticamente muy significativa ($p < 0.0001$) ya que los tumores sobrepresaron la p21 en comparación con los controles.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de p21 de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 19. De acuerdo al tipo histológico de tumor, observamos que hay una mayor expresión de la p21 en los casos de carcinoma epidermoide (60.7%) que en los adenocarcinomas (39.3%), y que es estadísticamente significativa ($p = 0.036$). En la figura N° 29 podemos apreciar la reactividad positiva para la proteína p21 en algunos de los casos de cáncer de cuello uterino de este estudio.

Tabla N° 19. Expresión de la p21 de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	p21		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	37(60.7%)	24(39.3%)	61
Adenocarcinoma	5(26.3%)	14(73.7%)	19
Total	42	38	80

$p=0.036$

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para la p21 (tabla N° 20), reveló que la mayor proporción de casos de ambos tipos histológicos (23) mostraba tinción entre el 5-25% de las células (+): 21(34.4%) carcinomas epidermoides y 2(10.5%) adenocarcinomas. Así mismo, entre el 25-50% (++) de las células teñidas se apreció en 16(26.2%) carcinomas epidermoides y 3(15.8%) adenocarcinomas. Como se puede apreciar, en ambos intervalos encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.036$), resaltando que predominan los casos con + de reactividad, es decir, pocas células expresan la p21.

La intensidad de la tinción para la p21 en los tumores cervicales fue entre moderada y marcada, con un patrón granular fino. Hubo tinción esporádica en núcleos del estroma (figura N° 29).

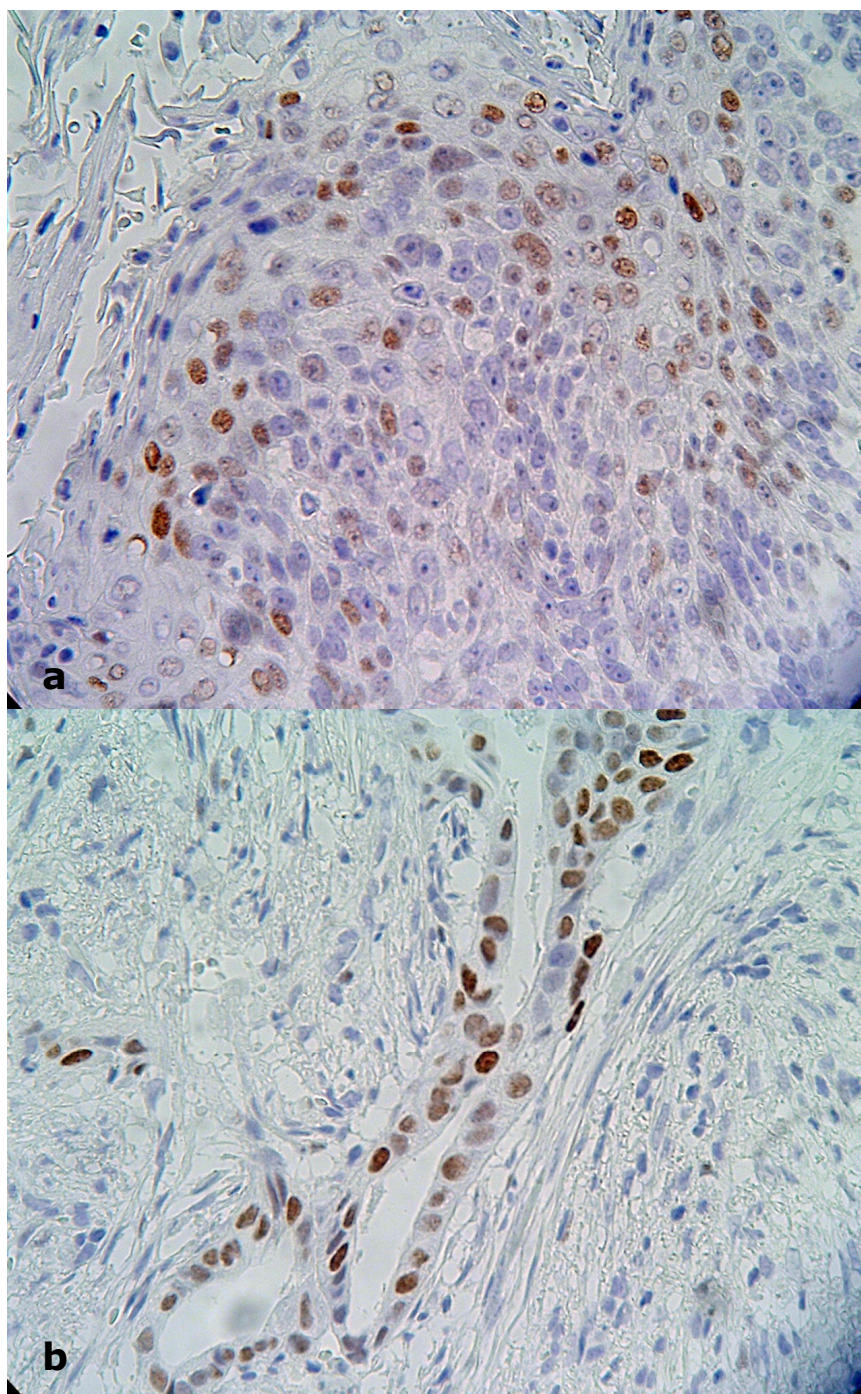


Figura N° 29. Inmunoexpresión de la p21WAF1 en cáncer de cuello uterino. a. Carcinoma epidermoide. b. Adenocarcinoma endocervical. (Ambas 40x).

Tabla N° 20. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para la p21.

Expresión p21	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+	21(34.4%)	2(10.5%)
++	18(29.5%)	3(17.6%)
Total	50	12

$p=0.036$

La sobreexpresión de la p21, entre el 5-50% de las células tumorales, fue mayor en los carcinomas epidermoides MD (74.1%) seguido de los I (57.1%) e II (42.9%), con lo cual a mayor indiferenciación podemos ver menor expresión de p21, aunque estas diferencias no fueron significativas ($p=0.226$). Los BD también mostraron menos expresión de p21 (46.2%).

La proteína p21 se expresó en proporciones semejantes entre los subtipos histológicos de adenocarcinoma sin diferencias significativas ($p=0.605$). Los endometrioides mostraron el mayor porcentaje de expresión, equivalente al 40%, seguidos de los villoglandulares con 33.3% y los endocervicales con 25%. Los papilares y el mucinoso no mostraron reactividad para esta proteína.

El epitelio escamoso benigno presentó núcleos teñidos esporádicamente para p21, los cuales se distribuyeron en el estrato germinal con leve intensidad, casi imperceptible (figura N° 30.a). La totalidad de los epitelios endocervicales normales y del estroma cervical carecían de reacción ante el anticuerpo frente a p21 (figura N° 30.b).

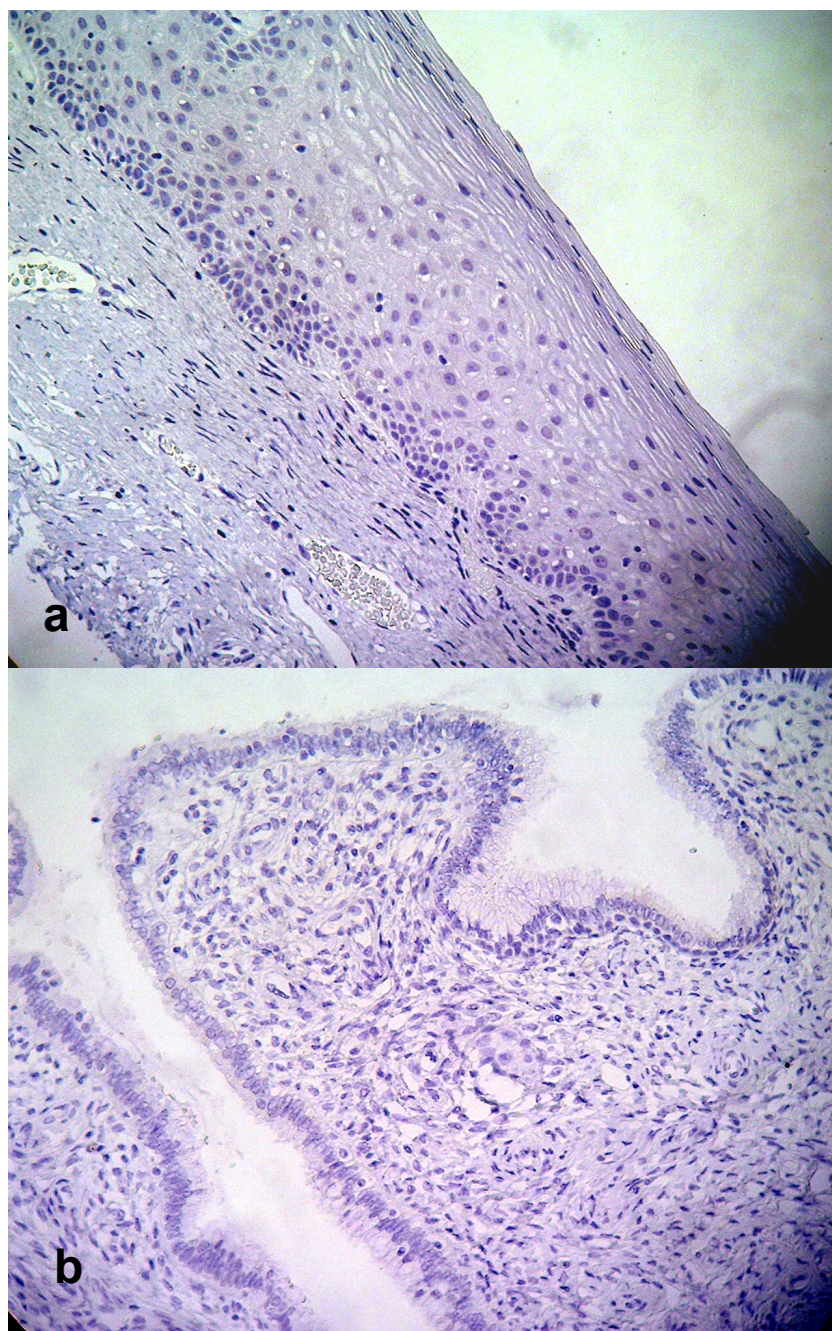


Figura N° 30. Expresión de *p21WAF1*. a. En exocervix benigno, los núcleos del estrato germinal son positivos. b. Endocervix normal negativo. (Ambas 20x).

3.2.5 **PROTEÍNA p27CIP1.**

Durante la evaluación de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p27, se consideraron positivos aquellos casos con tinción a nivel nuclear. Dicha evaluación pudo llevarse a cabo en 79/81 de los casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio; de estos, 53.2% revelaron inmunoreactividad para la p27 y 46.8% no mostraron ningún tipo de respuesta para este antígeno. De los 44 controles cervicales, fueron evaluados 41: el 36.6% respondió positivamente mientras que en el 63.4% no hubo respuesta, como se aprecia en la tabla N° 21.

Tabla N° 21. Expresión de la proteína p27 en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

p27	Positivos	Negativos
Casos	42(53.2%)	37(46.8%)
Controles	15(36.6%)	26(63.4%)

Al comparar la expresión de la p27 en los tumores y controles, la diferencia fue estadísticamente muy significativa ($p=0.006$) pues el porcentaje de negatividad en los controles fue mayor que en los tumores.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de p27 de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 22. Considerando el tipo histológico de tumor, observamos que la expresión de la p27 es muy semejante en los casos de carcinoma epidermoide (52.5%) con respecto a los adenocarcinomas (55.6%), con un valor de $p=0.852$. En la figura N° 31 podemos apreciar la reactividad positiva para la proteína p27 en algunos de los casos de cáncer de cuello uterino estudiados.

Tabla N° 22. Expresión de la p27 de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	p27		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	32(52.5%)	29(47.5%)	61
Adenocarcinoma	10(55.6%)	8(44.4%)	18
Total	42	37	79

$p=0.852$

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para la p27 (tabla N° 23), reveló que la mayor proporción de casos de ambos tipos histológicos (25) mostraba tinción entre el 5-25% de las células (+): 19(31.1%) carcinomas epidermoides y 6(33.3%) adenocarcinomas. Así mismo, más del 25% (++) de las células teñidas se estimó en 13(21.3%) carcinomas epidermoides y 4(22.2%) adenocarcinomas. Como se aprecia, en ambos intervalos no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.852$), resaltando que pocas células tumorales expresan la proteína p27.

Tabla N° 23. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para la p27.

Expresión p27	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+	19(31.1%)	6(33.3%)
++	13(21.3%)	4(22.2%)
Total	32	10

$p=0.852$

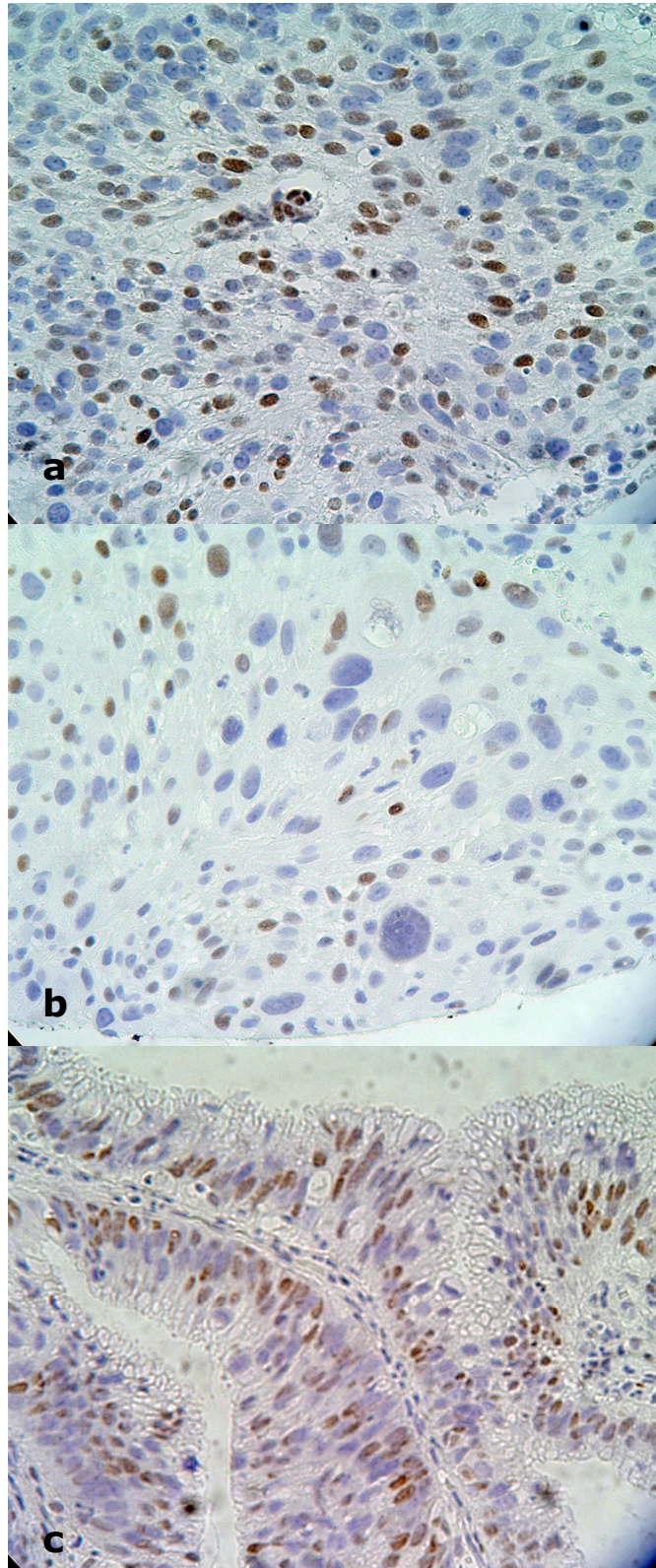


Figura N° 31. Expresión de la *p27CIP* en cáncer cervical. a y b. Carcinoma epidermoide (40x). c. Adenocarcinoma endocervical (20x).

Las células tumorales mostraron tinción con intensidad entre moderada y marcada. En los carcinomas epidermoides con poca diferenciación, la intensidad fue disminuyendo junto con las células teñidas. En el estroma se pudo apreciar algunos núcleos reactivos para p27 (linfocitos).

La p27 se expresó más en los carcinomas epidermoides MD(63%) seguido en igual proporción (57.1%) de los I y de los II. Hubo diferencia significativa ($p=0.035$) en comparación con los BD, los cuales mostraron tinción para la p27 en el 23% de los casos, es decir, a mayor diferenciación hay menor expresión de p27.

La expresión de la proteína p27 estaba incrementada entre los subtipos histológicos de adenocarcinoma, sin diferencias entre ellos ($p=0.821$). La distribución fue como sigue: 100% en el mucinoso, 62.5% los endocervicales, 50% para el subtipo papilar y para el villoglandular y, finalmente, con menos porcentaje de expresión, el subtipo endometriode (40%).

El epitelio escamoso benigno no mostró reactividad para p27 en los estratos cuyas células son inmaduras. Sin embargo, se pudieron apreciar núcleos dispersos densos a medida que el epitelio se hacía más diferenciado, sobre todo a nivel del estrato intermedio y con menor proporción en el superficial. También se observaron núcleos linfocitarios positivos a nivel del estroma (figura N° 32.a). En el endocérvix no hubo reacción ante este anticuerpo, aunque se observó tinción en los núcleos de los linfocitos (figura N° 32.b).

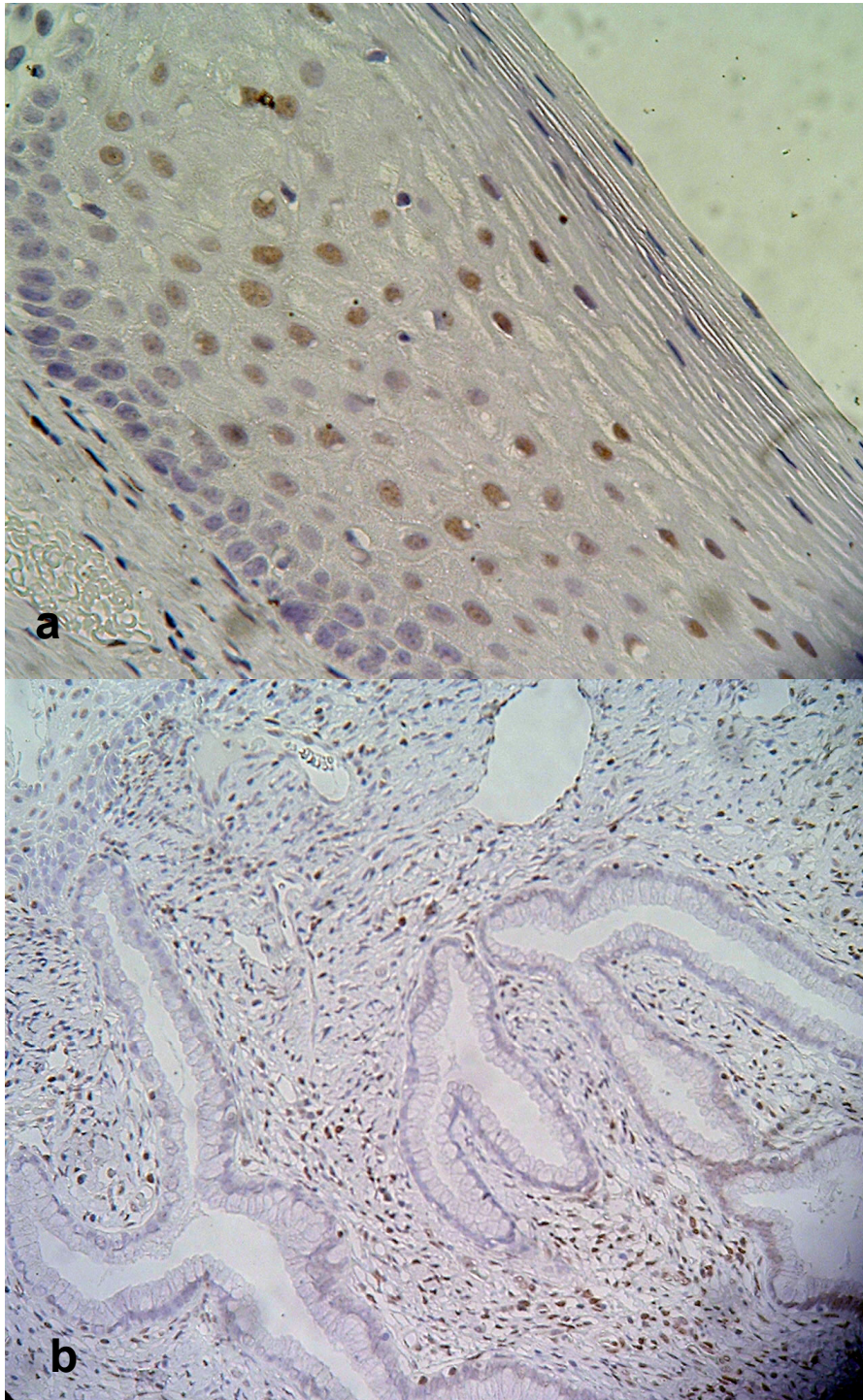


Figura N° 32. Expresión de *p27CIP1*. a. En exocérvis benigno, los núcleos de los estratos más maduros son reactivos (40x). b. Endocérvis normal negativo. En el estroma se observaron núcleos positivos (20x).

3.2.6 **CICLINA E.**

La expresión inmunohistoquímica de la ciclina E fue considerada positiva cuando observamos tinción marrón a nivel del núcleo. Dicha evaluación pudo llevarse a cabo en 78/81 de los casos de cáncer de cuello uterino de nuestra serie; de estos, 6 que representan el 7.7% revelaron inmunoreactividad para la ciclina E y 72(92.3%) no mostraron ningún tipo de respuesta para este antígeno. Los 44 controles cervicales fueron valorados y todos resultaron negativos para ciclina E, datos que resumimos en la siguiente tabla.

Tabla N° 24. Expresión de la ciclina E en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

Ciclina E	Positivos	Negativos
Casos	6(7.7%)	72(92.3%)
Controles	-	44(100%)

Al comparar la expresión de la ciclina E en los tumores y controles no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.060$) ya que el porcentaje de negatividad fue semejante entre ambos.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de la ciclina E de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 25: 60(76.9%) eran carcinomas epidermoides y 18(23.1%) adenocarcinomas. 72/78(92.3%) casos de cáncer de cuello uterino resultaron negativos y correspondieron al 90% de los carcinomas epidermoides y 100% de los adenocarcinomas. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.167$).

Tabla N° 25. Expresión de la ciclina E de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	Ciclina E		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	6(10%)	54(90%)	60
Adenocarcinoma	-	18(100%)	18
Total	6	72	78

$p=0.167$

La inmunoreactividad para la ciclina E predominó en nuestra serie de tumores del cuello uterino, sobre todo en los de origen glandular que en su totalidad no respondieron a este anticuerpo. La figura N° 33 muestra uno de los pocos casos de carcinoma epidermoide con inmunoreactividad positiva (+) para la ciclina E y un adenocarcinoma totalmente negativo.

La expresión de la ciclina E en los carcinomas epidermoides de este estudio no mostró diferencias significativas entre los grupos de distintos grados madurativos ($p=0.417$). Los BD presentaron mayor expresión de la ciclina E (16.7%) seguidos de los II (12.5%) y MD (11.5%). Curiosamente los I no mostraron ningún tipo de reacción contra la ciclina E.

La ausencia de la inmunoexpresión de la ciclina E en los adenocarcinomas cervicales fue la característica principal.

La mucosa cervical benigna, tanto exo como endocervical, no manifestó ninguna reacción para la ciclina E (figura N° 34).

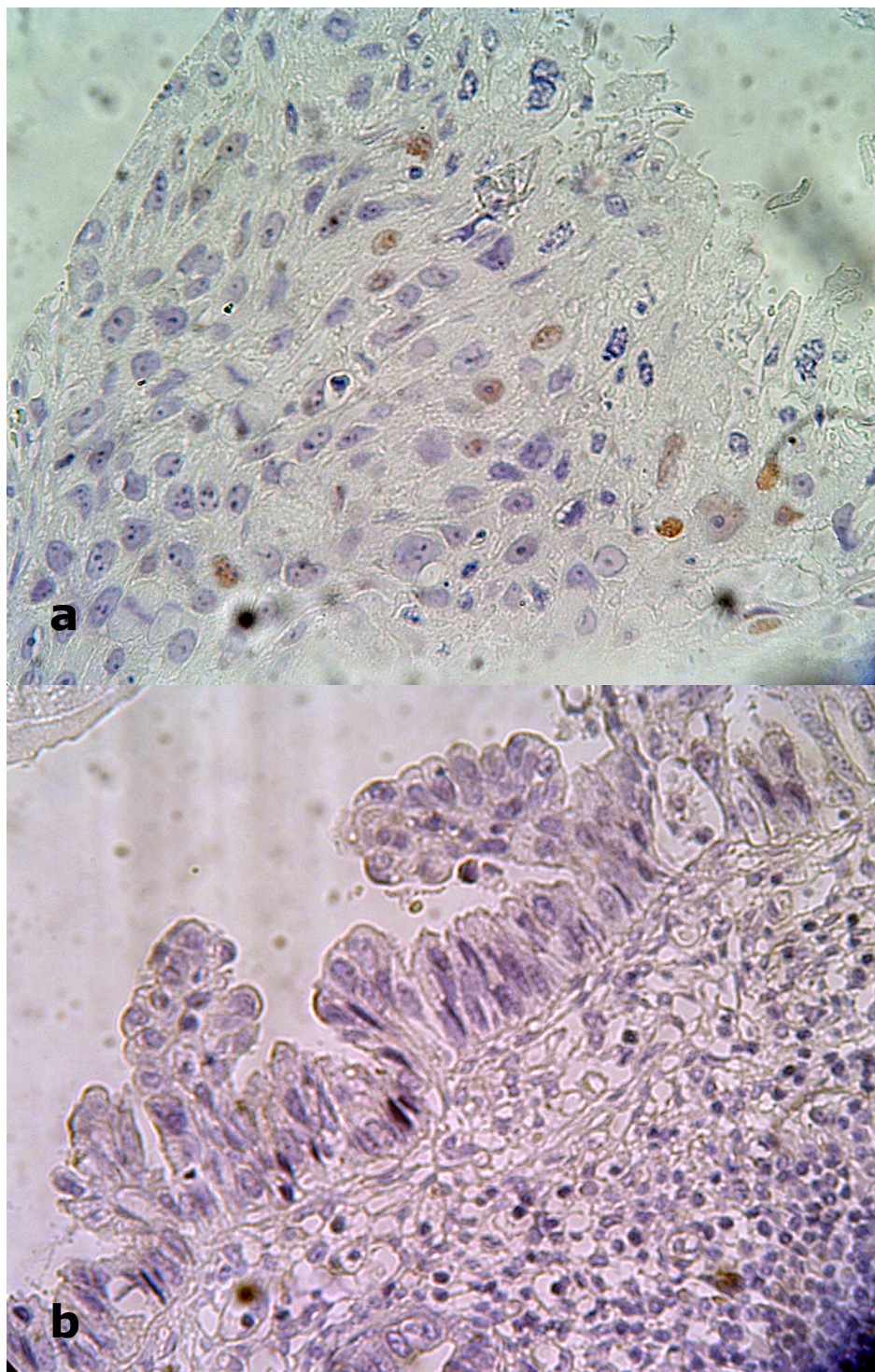


Figura Nº 33. Expresión de la ciclina E en cáncer cervical. a. Carcinoma epidermoide con reactividad (+). B. Adenocarcinoma endocervical tipo papilar en el que no se aprecia inmunoreactividad. (Ambas con 40x).

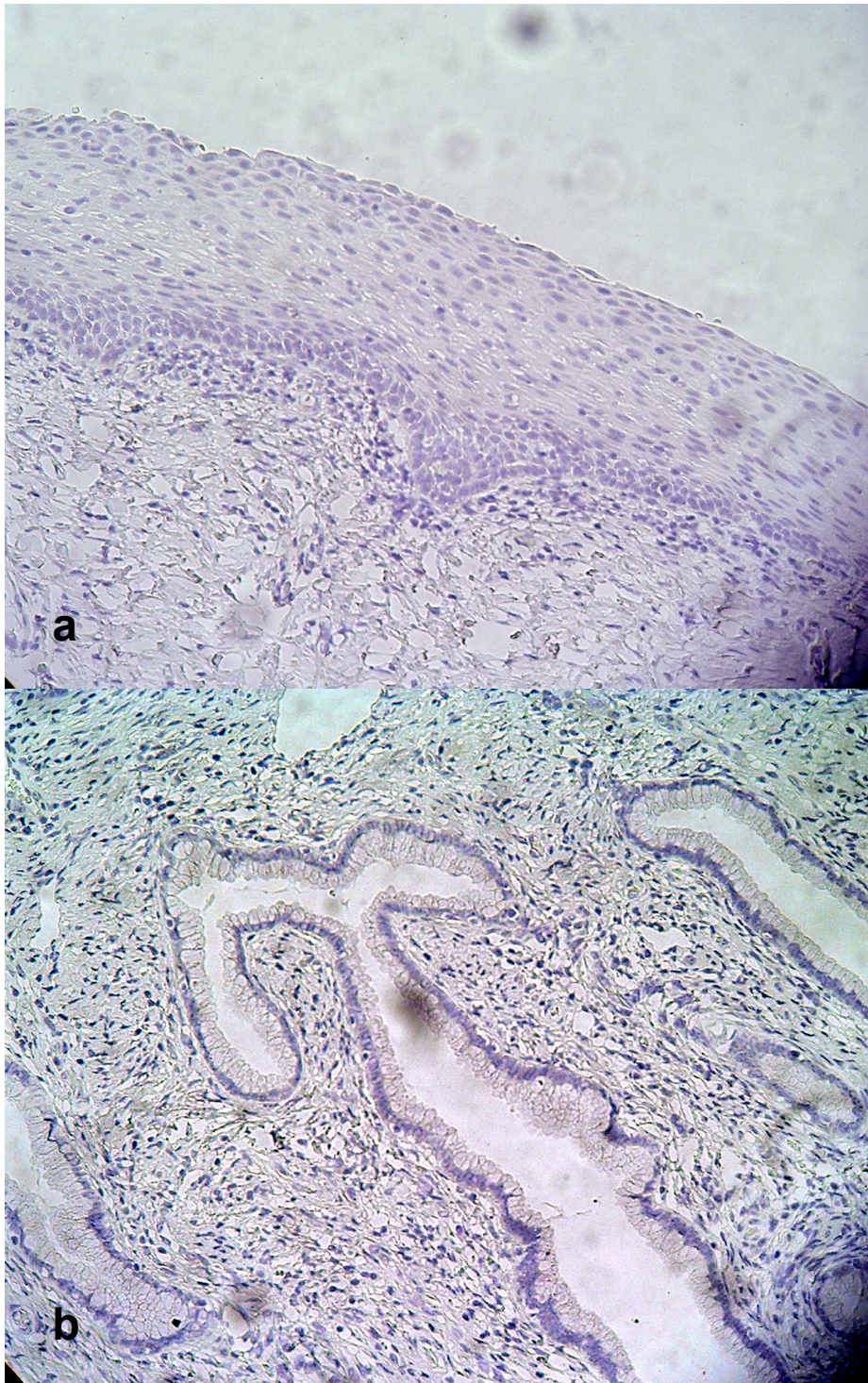


Figura N° 34. Expresión de la ciclina E en tejido cervical benigno, tanto exocérvix (a) como endocérvix (b) son negativos. (Ambas 20x).

3.2.7. **PROTEÍNA p53.**

La expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 se consideró positiva sólo en aquellas células con tinción nuclear. Esta evaluación pudo llevarse a cabo en 77/81 de los casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio; de estos, el 3.9% reveló inmunoreactividad para la p53 y el 96.1% casos no mostró ningún tipo de respuesta para este antígeno. Los 44 controles cervicales fueron evaluados y ninguno respondió ante el anticuerpo contra p53, como se aprecia en la tabla N° 26.

Tabla N° 26. Expresión de la proteína p53 en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

p53	Positivos	Negativos
Casos	3(3.9%)	74(96.1%)
Controles	-	44(100%)

Al comparar la expresión de la proteína p53 en los tumores y controles no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.188$) ya que la inmunoexpresión en ambos estaba marcadamente reducida.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de p53 de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 27. 77.9%(60) eran carcinomas epidermoides y 22.1%(17) adenocarcinomas. De los 74 casos de cáncer de cuello uterino que resultaron negativos, el 96.7% correspondió a carcinomas epidermoides y el 94.1% a adenocarcinomas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.157$).

Tabla N° 27. Expresión de la p53 de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	p53		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	2(3.3%)	58(96.7%)	60
Adenocarcinoma	1(5.9%)	16(94.1%)	17
Total	3	74	77

$p= 0.157$

Los casos con inmunoreactividad para la p53 mostraron más del 25% de las células teñidas: 2 carcinomas epidermoides con +++ de reactividad y un adenocarcinoma con ++. La intensidad de los núcleos teñidos varió entre moderada e marcada (figura N° 35).

La expresión de la p53 estuvo marcadamente reducida o ausente en todos los carcinomas epidermoides. Sólo dos casos fueron inmunoexpresivos (15.4%) y curiosamente de tipo BD. Las diferencias estaban bastante cerca de la significancia ($p=0.053$).

La expresión de p53 también se mostró bastante reducida en los diferentes subtipos histológicos de adenocarcinoma sin diferencias importantes entre ellos ($p=0.393$). Sólo un adenocarcinoma endocervical (12.5%) fue positivo para p53.

Tanto el epitelio escamoso como el glandular benigno carecían de inmunoreactividad para p53, ni a nivel epitelial ni del estroma subyacente (figura N° 36).

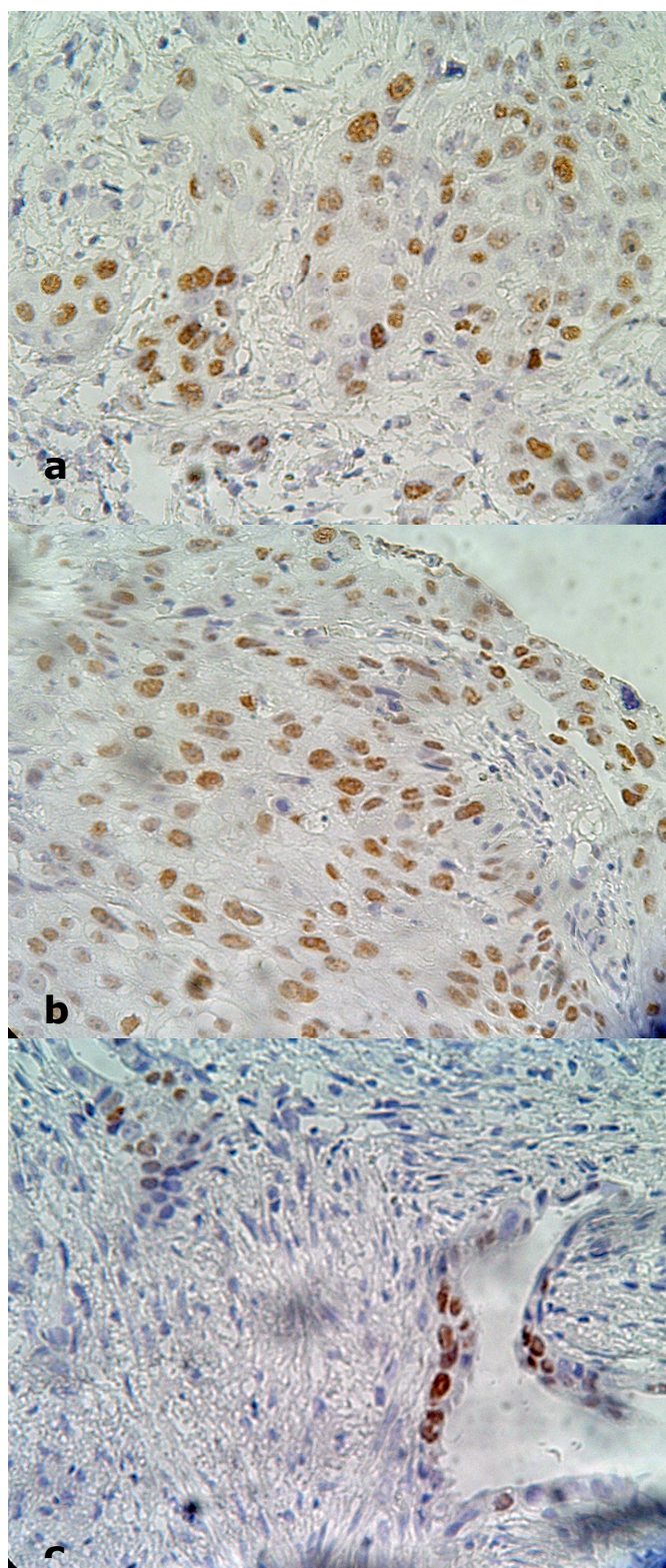


Figura Nº 35. Expresión de la *p53* en cáncer de cuello uterino. a. y b. Carcinoma epidermoide (40x). c. Adenocarcinoma endocervical (20x).

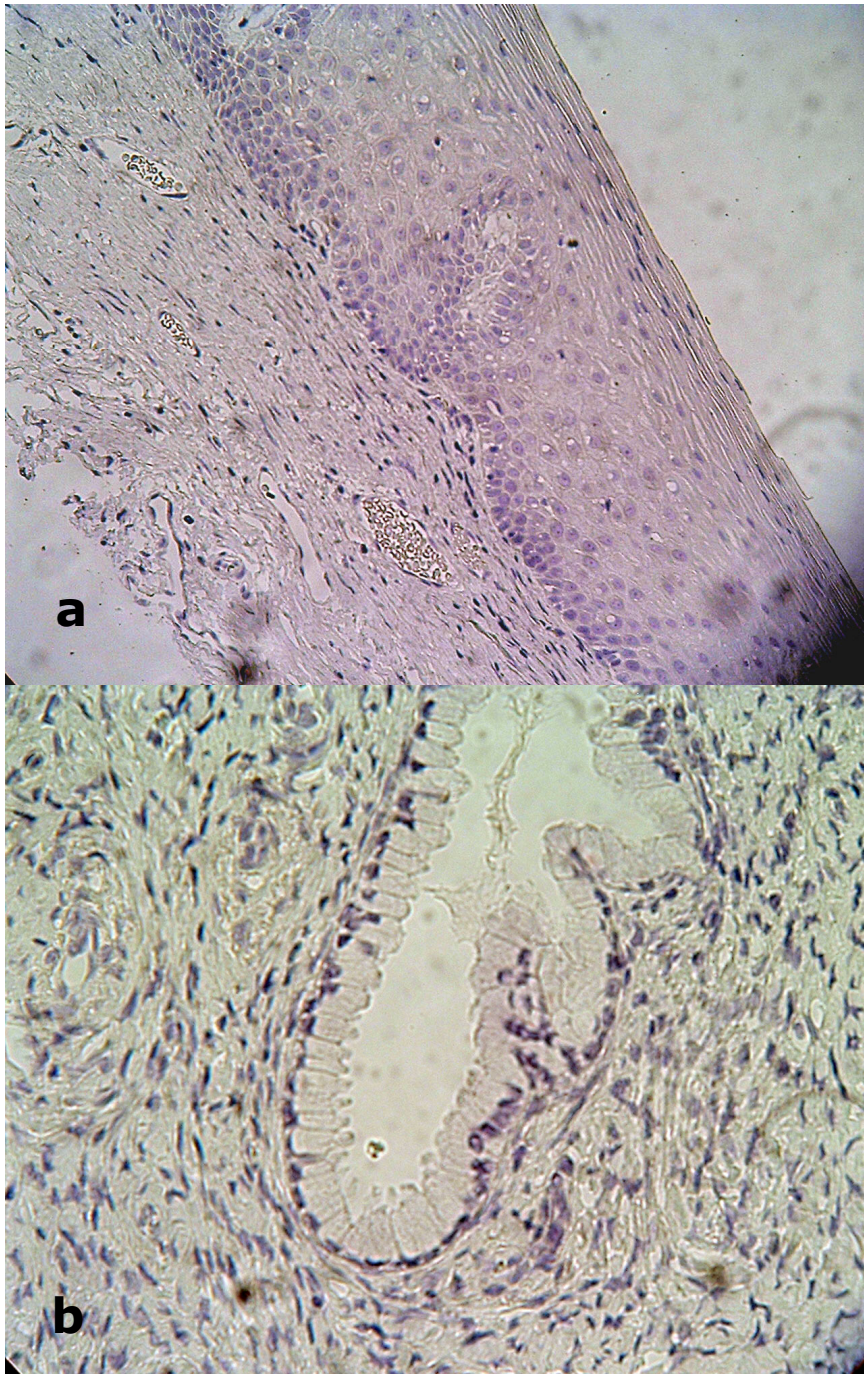


Figura N° 36. Expresión de la *p53* en tejido cervical benigno. a. exocervix, (20x). b. endocervix (40x), ambos fueron negativos.

La siguiente tabla resume la inmunopositividad ante los anticuerpos utilizados contra los principales reguladores del ciclo celular en los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino.

Tabla N° 28. Reactividad inmunohistoquímica de los principales reguladores del ciclo celular en los tipos histológicos de cáncer cervical.

Reguladores	Carcinoma		Total
	epidermoide	Adenocarcinoma	
<i>pRb</i> (<i>p</i> =0.125)	21/61(34.4%)	3/19(15.8%)	24/80(30%)
<i>p16INK4a</i> (<i>p</i> =0.874)	50/61(82%)	12/17(70.6%)	62/78(79.5%)
<i>p21WAF1</i> (<i>p</i> = 0.036)	37/61(60.7%)	5/19(26.3%)	42/80(52.5%)
<i>p27CIP1</i> (<i>p</i> =0.852)	32/61(52.5%)	10/18(55.6%)	42/79(53.2%)
<i>Ciclina D1</i> (<i>p</i> =0.750)	19/61(31.1%)	6/17(35.3%)	25/78(32.1%)
<i>Ciclina E</i> (<i>p</i> =0.167)	6/60(10%)	0/18(0%)	6/78(7.7%)
<i>p53</i> (<i>p</i> =0.157)	2/60(3.3%)	1/17(5.9%)	3/77(3.9%)

3.3 Marcadores de apoptosis.

3.3.1 PROTEÍNA MDM-2.

La expresión inmunohistoquímica de la proteína MDM-2 se consideró positiva sólo en aquellas células con tinción nuclear. Esta evaluación pudo llevarse a cabo en 79/81 de los casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio, mostrando en su totalidad reacción inmunohistoquímica para este antígeno. El 50% de los controles mostró respuesta ante el anticuerpo contra MDM-2 y el otro 50% fue negativo, como se aprecia en la siguiente tabla.

Tabla N° 29. Expresión de la proteína MDM-2 en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

MDM-2	Positivos	Negativos
Casos	79(100%)	-
Controles	22(50%)	22(50%)

Al comparar la expresión de MDM-2 en los tumores y controles encontramos diferencias muy significativas ($p < 0.0001$), pues el 100% de los tumores sobrepresaron esta proteína frente a la mitad de los controles.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de MDM-2 de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 30, en la que destaca la reactividad positiva en todos los casos de cáncer de cuello uterino, de los cuales 77.2% fueron carcinomas epidermoides y 22.8% adenocarcinomas.

Tabla N° 30. Expresión de la MDM-2 de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	MDM-2		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	61(100%)	-	61
Adenocarcinoma	18(100%)	-	18
Total	79	-	79

$p= 0.232$

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para la MDM-2 (tabla N° 31), reveló que la mayor proporción de casos de ambos tipos histológicos (45) mostraba tinción en más del 50% (+++) de las células malignas: 57.4% carcinomas epidermoides y 55.6% adenocarcinomas. A este intervalo le siguió el correspondiente a los casos con tinción entre el 25 y 50% (++) de las células: 37.7% para carcinomas epidermoides y 27.8% para adenocarcinomas. Finalmente, un reducido grupo de casos mostró una tinción celular entre el 5 y <25% (+): 4.9% y 16.7% de los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas, respectivamente. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los intervalos ($p=0.232$).

Tabla N° 31. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para la MDM-2.

Expresión MDM-2	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+	3(4.9%)	3(16.7%)
++	23(37.7%)	5(27.8%)
+++	35(57.4%)	10(55.6%)
Total	61	18

$p= 0.232$

A manera general, los carcinomas cervicales presentaban núcleos teñidos con un patrón granular fino, predominantemente pálido, que en determinados casos permitía ver un reforzamiento de la membrana nuclear (figura nº 37. a). Los núcleos de los adenocarcinomas eran un poco más intensos que los vistos en los tumores de tipo epidermoide. En el estroma también se apreció respuesta para MDM-2 en los núcleos de los linfocitos, que inclusive mostraban mayor intensidad en la tinción que la observada en las células epiteliales (figura Nº 37).

La sobreexpresión (reactividad +++) de MDM-2 fue mayor en los carcinomas epidermoides con mayor grado de diferenciación tumoral, BD(61.5%) y MD(69.2%), que en los pobremente diferenciados, I(57.1%) e II(12.5%), es decir, la asociación es inversa: a mayor indiferenciación menor expresión de MDM-2 ($p=0.022$). Sin embargo, a pesar de su menor grado de diferenciación, el 62.5% de los II mostró ++ de reactividad. Todos los adenocarcinomas cervicales mostraron sobreexpresión de MDM-2 sin diferencias significativas entre los subtipos histológicos ($p=0.523$).

La evaluación de la inmunoexpresión positiva de MDM-2 en el tejido cervical benigno reveló que el epitelio exocervical mostró tinción nuclear con moderada intensidad. Estos núcleos se encontraban dispersos en todos los estratos de epiteliales, con mayor número en la capa profunda; también en el estroma subyacente se podían ver numerosos núcleos teñidos (figura Nº 38. a). El tejido endocervical mostraba tinción de leve a moderada en los núcleos glandulares y del estroma (figura Nº 38. b).

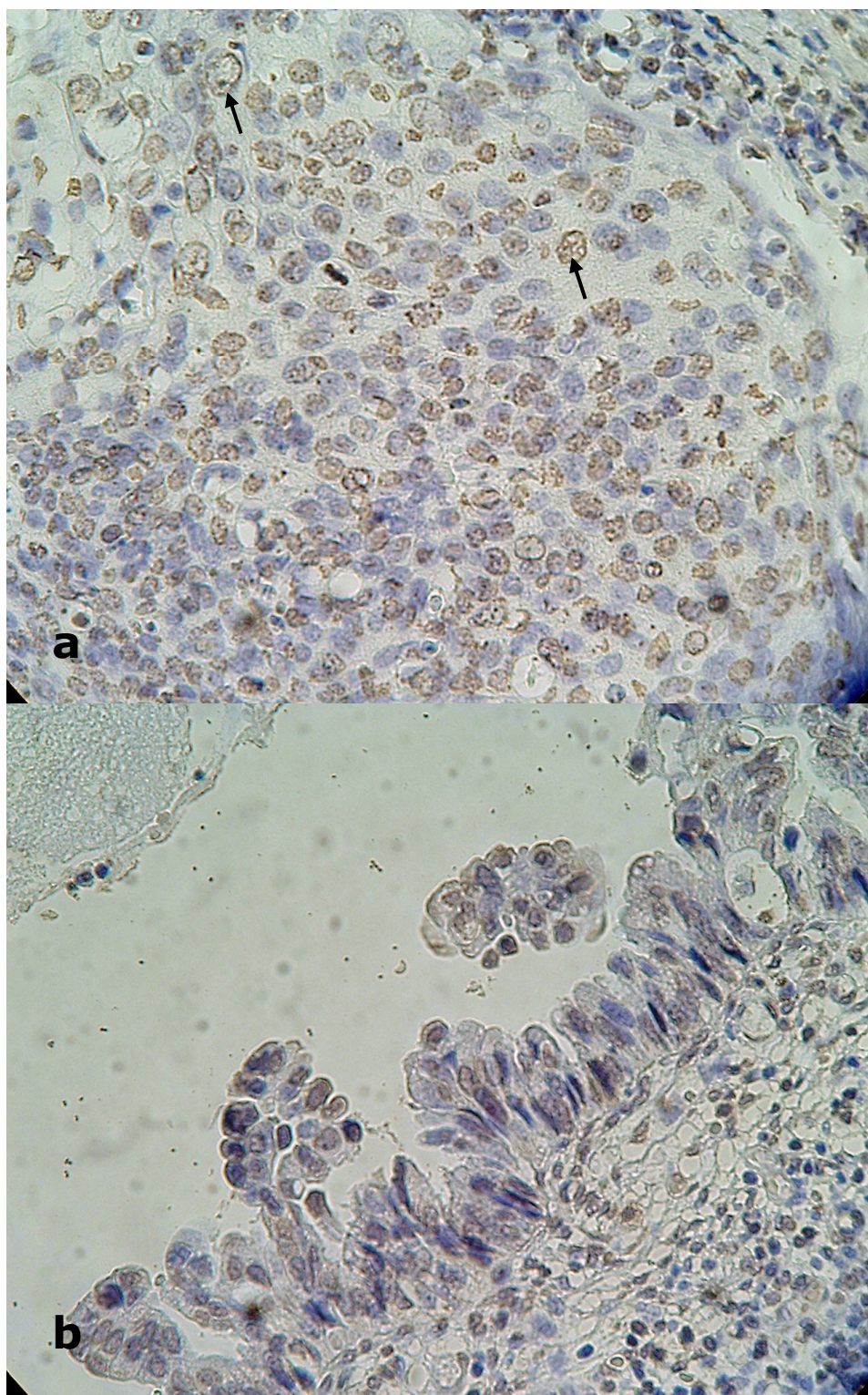


Figura N° 37. Expresión de MDM-2 en cáncer cervical. a. Carcinoma epidermoide con núcleos pálidos y reforzamiento nuclear (flecha). b. Adenocarcinoma endocervical tipo papilar inmunoreactivo para MDM-2. (Ambas 40x).

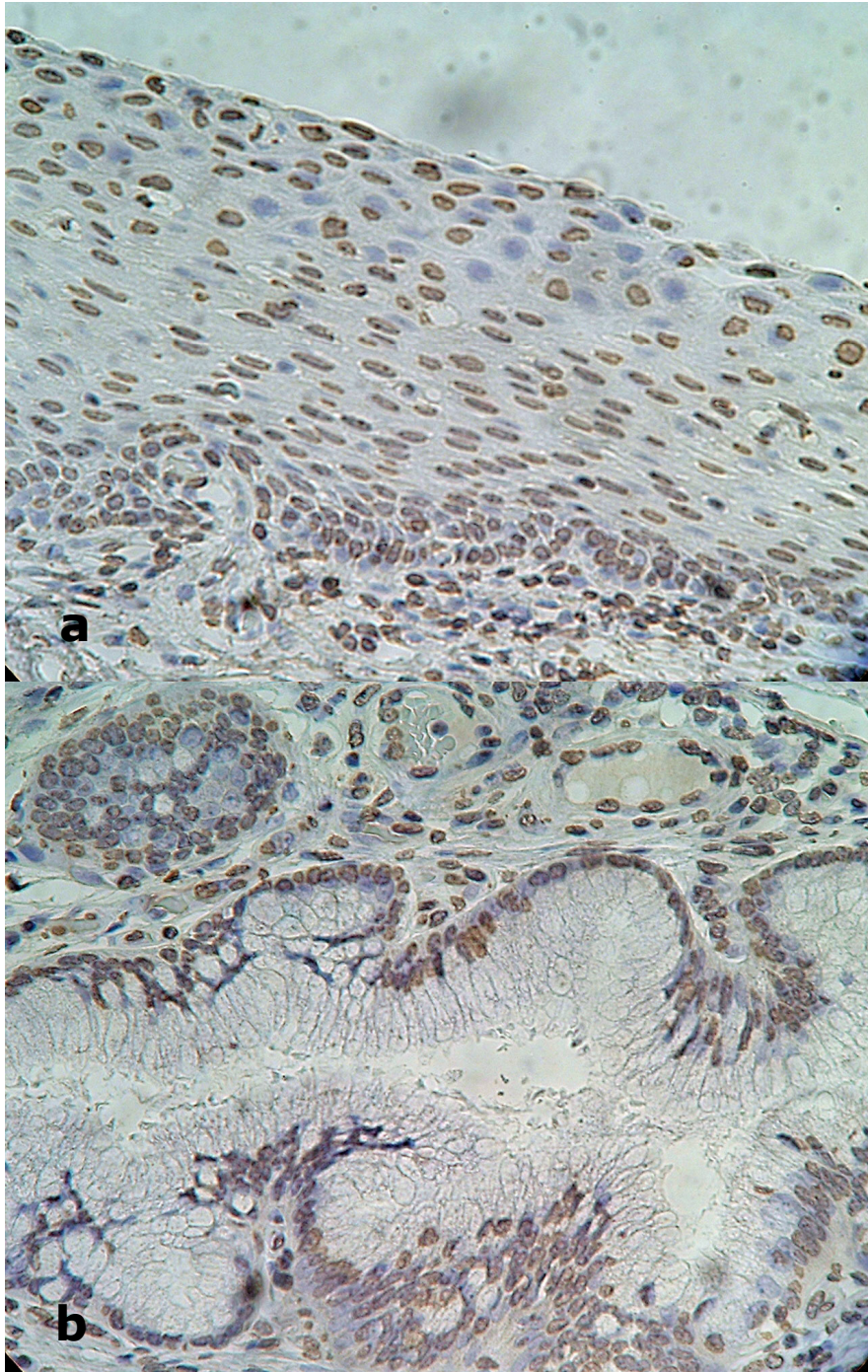


Figura N° 38. Expresión de MDM-2 en el epitelio cervical benigno. a. Exocérvix. b. Endocérvix. En los dos observamos núcleos teñidos en el estroma y endotelio vascular. (Ambas 40x).

3.3.2 **PROTEÍNA BAX.**

Para la evaluación de la expresión inmunohistoquímica de Bax, consideramos positivos los casos que mostraron tinción citoplasmática. Esta evaluación pudo llevarse a cabo en 77/81 de los casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio. De los 77 casos, 52(67.5%) revelaron inmunoreactividad para este anticuerpo y 25(32.5%) fueron negativos. Los 44 controles cervicales fueron evaluados y en su totalidad no mostraron reacción para Bax, como se aprecia en la siguiente tabla.

Tabla N° 32. Expresión de la proteína Bax en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

Bax	Positivos	Negativos
Casos	52(67.5%)	25(32.5%)
Controles	-	44(100%)

Al comparar la expresión de la proteína Bax en los tumores y controles encontramos diferencias muy significativas ($p < 0.0003$), pues ningún control expresó esta proteína, mientras que más de la mitad de los tumores sí mostraron inmunoreactividad.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de Bax de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 33. 60(77,9%) fueron carcinomas epidermoides y 17(22.1%) adenocarcinomas. Del total de casos evaluados, destaca que 52(67.5%) resultaron positivos para Bax y correspondieron a 36(60%) carcinomas epidermoides y a 16(94.1%) adenocarcinomas, con diferencias significativas ($p = 0.008$).

Tabla N° 33. Expresión de Bax de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos Histológicos	Bax		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	36(60%)	24(40%)	60
Adenocarcinoma	16(94.1%)	1(5.9%)	17
Total	52	25	77

$p = 0.008$

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para la Bax (tabla N° 34), reveló que la mayor proporción de casos de ambos tipos histológicos (29) mostraba tinción entre el 5-25% de las células: 22(36.7%) para los carcinomas epidermoides y 7(41.2%) para los adenocarcinomas, mientras que la tinción en más del 25% de las células malignas se apreció en 14(23.3%) de los carcinomas epidermoides y 9(52.9%) adenocarcinomas. En estos intervalos encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.013$). La figura N° 39 muestra la expresión de Bax en algunos de los casos de esta serie.

Tabla N° 34. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para Bax.

Expresión Bax	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+	22(36.7%)	7(41.2%)
++ /+++	14(23.3%)	9(52.9%)
Total	36	18

$p=0.013$

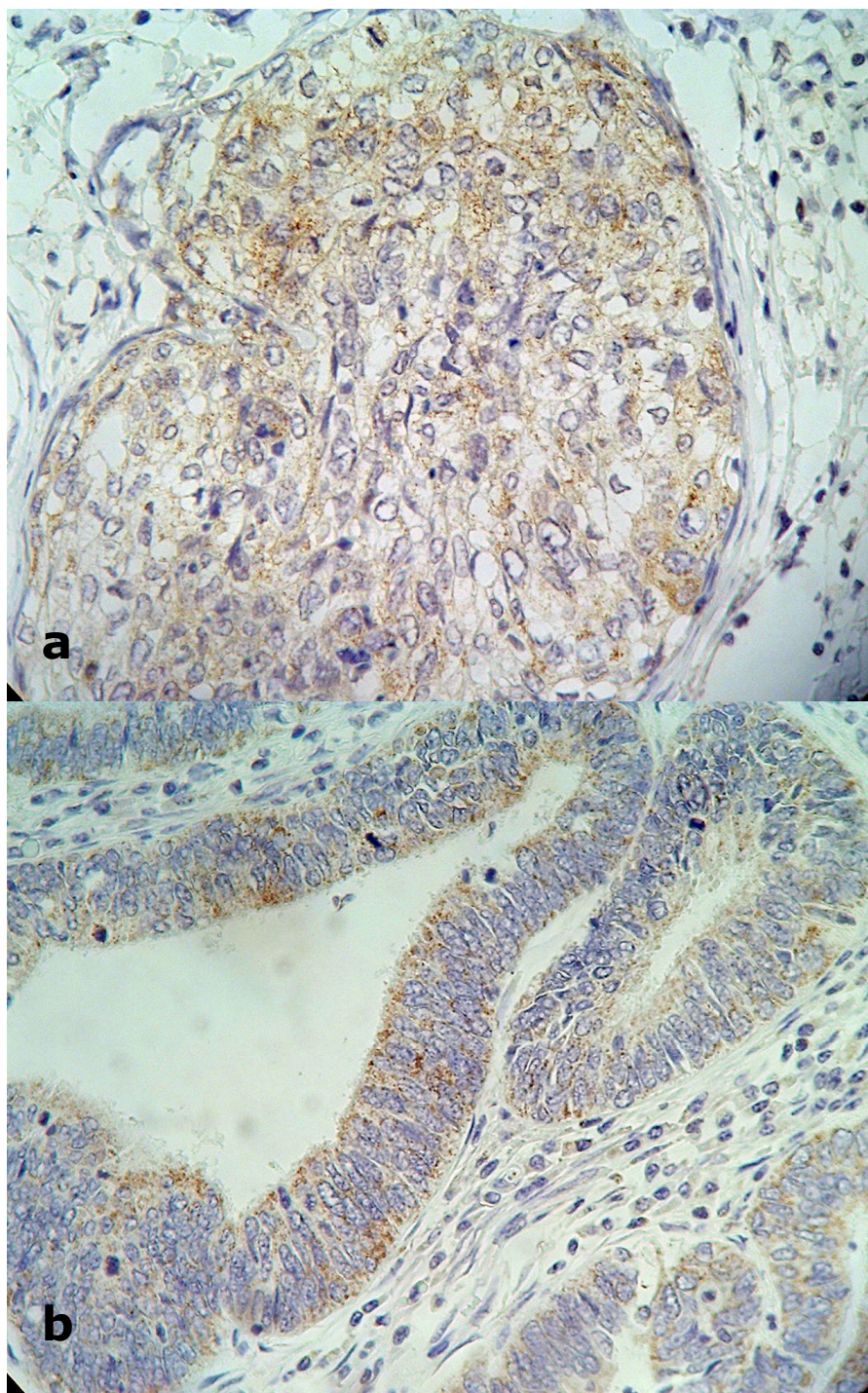


Figura N° 39. Expresión citoplasmática de Bax en cáncer de cuello uterino. a. Carcinoma epidermoide. b. Adenocarcinoma endocervical. (Ambas 40x).

La intensidad de la tinción citoplasmática varió entre leve y moderada con un patrón de tinción tipo puntillado fino, que en las células endocervicales malignas se concentraba hacia los bordes apicales y basales.

Aunque no encontramos diferencias significativas ($p=0.401$), la proteína Bax aumentó su nivel de expresión a medida que los tumores de origen epidermoide eran más indiferenciados: mayor expresión de Bax a menor diferenciación. Así, los carcinomas epidermoides I(64.3%) e II(71.4%) fueron los que tuvieron mayor reactividad, seguidos de los MD(57.7%) y finalmente de los BD(53.8%).

La sobreexpresión de Bax se observó en todos los subtipos histológicos de adenocarcinoma cervical, siendo los villoglandulares los que menos expresaron dicha proteína (50%), con diferencia estadísticamente significativa ($p=0.043$).

El tejido cervical benigno, tanto escamoso como el glandular, se presentó negativo ante el anticuerpo contra la proteína Bax, al igual que el estroma cervical (figura N° 40).

Por lo tanto, nuestros casos de cáncer cervical mostraron sobreexpresión de la proteína Bax (67.5%) en comparación con el tejido cervical normal (0%), hallazgo que además es significativamente evidente en los adenocarcinomas cervicales.

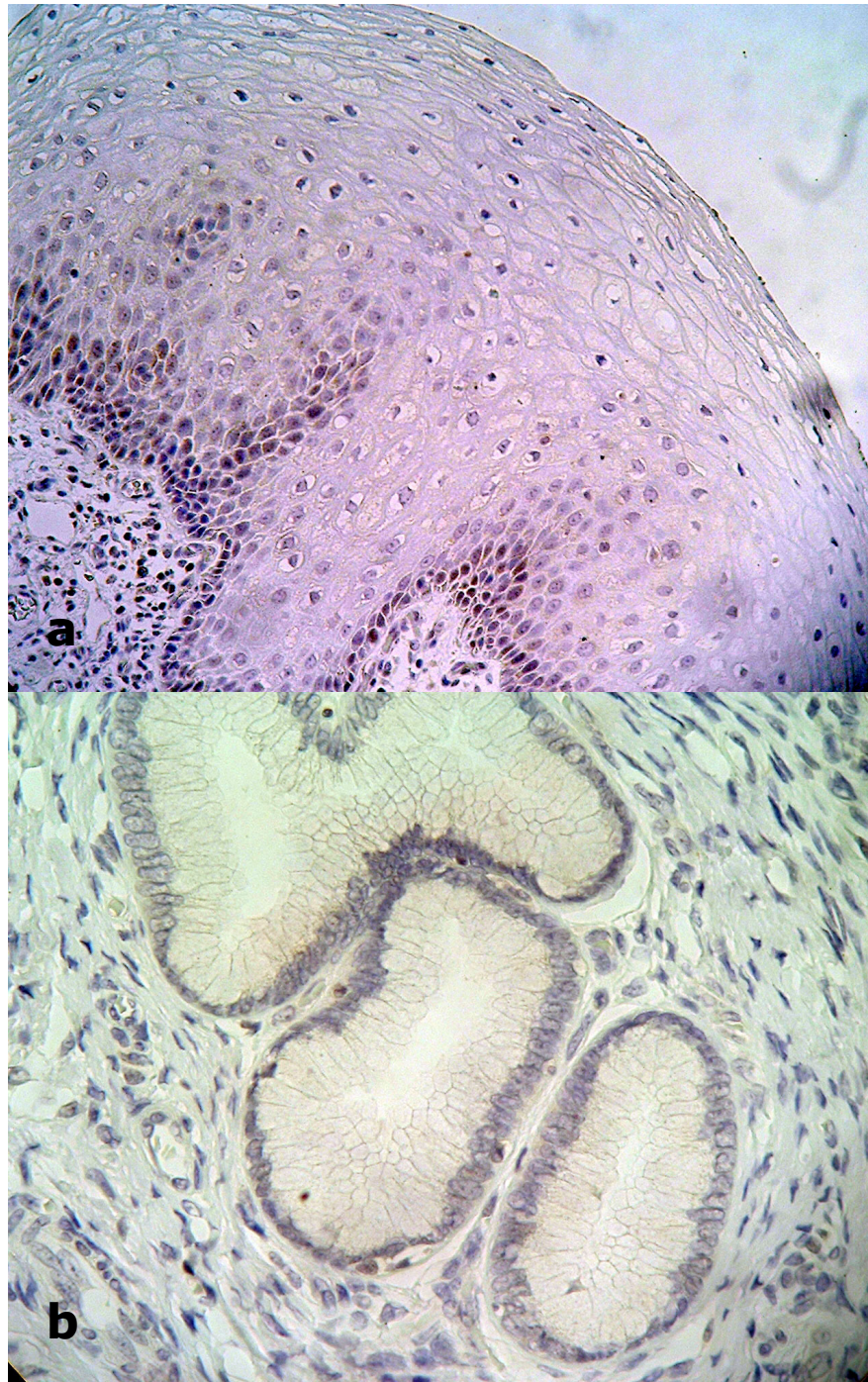


Figura N° 40. Expresión de Bax en la mucosa cervical benigna. a. Exocérnix (20x). b. Endocérnix (40x). No se aprecia tinción ni epitelial ni estromal.

3.3.3 PROTEÍNA BCL-2.

La presencia de células con inmunotinción citoplasmática para la proteína antiapoptótica Bcl-2 fue considerada positiva. Los 81 casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio fueron evaluados para la expresión de esta proteína. Hemos encontrado que de los 81 tumores cervicales, 78(96.3%) no revelaron inmunoreactividad para esta molécula y sólo 3(3.7%) casos fueron positivos. Los 44 controles cervicales fueron evaluados para este anticuerpo y en su totalidad no revelaron inmunoreactividad para Bcl-2, como se aprecia en la siguiente tabla.

Tabla N° 35. Expresión de la proteína Bcl-2 en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

Bcl-2	Positivos	Negativos
Casos	3(3.7%)	78(96.3%)
Controles	-	44(100%)

Al comparar la expresión de la proteína Bcl-2 en los tumores y controles no encontramos diferencias significativas ($p=0.434$) pues ningún control expresó esta proteína y en los tumores un mínimo porcentaje tuvo la misma respuesta.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de Bcl-2 de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 36. 62(76.5%) eran carcinomas epidermoides y 19(23.5%) adenocarcinomas. Del total de casos evaluados, destaca que 78(96.3%) casos de cáncer de cuello uterino resultaron negativos para Bcl-2 y correspondieron a 60(96.8%) carcinomas epidermoides y 18(94.7%) adenocarcinomas. Los casos con inmunoreactividad fueron igual a 3(3.7%), siendo 2(3.2%) carcinomas epidermoides y 1(5.3%) adenocarcinomas. Estas discretas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.685$).

Tabla N° 36. Expresión de Bcl-2 de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	Bcl-2		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	2(3.2%)	60(96.8%)	62
Adenocarcinoma	1(5.3%)	18(94.7%)	19
Total	3	78	81

$p= 0.685$

La intensidad de la tinción citoplasmática fue predominantemente leve, casi imperceptible, con un patrón de tinción tipo puntillado muy fino que en las células endocervicales malignas tendía a concentrarse hacia los bordes laterales o basales (figura N° 41).

La expresión marcadamente reducida de Bcl-2 (3.2%) caracterizó nuestra serie de tumores epidermoides, sin diferencias importantes entre ellos ($p=0.272$), sólo se expresó en 2 casos de tipo II (14.3%).

Bcl-2 reveló reducida inmunoexpresión entre los subtipos histológicos de adenocarcinoma endocervical, sin diferencias significativas entre ellos ($p=0.346$): 1 adenocarcinoma endocervical (12.5%) fue positivo para Bcl-2.

El tejido cervical benigno, tanto escamoso como el glandular, carecía totalmente de respuesta ante el anticuerpo contra la proteína Bcl-2, al igual que el estroma cervical (figura N° 42).

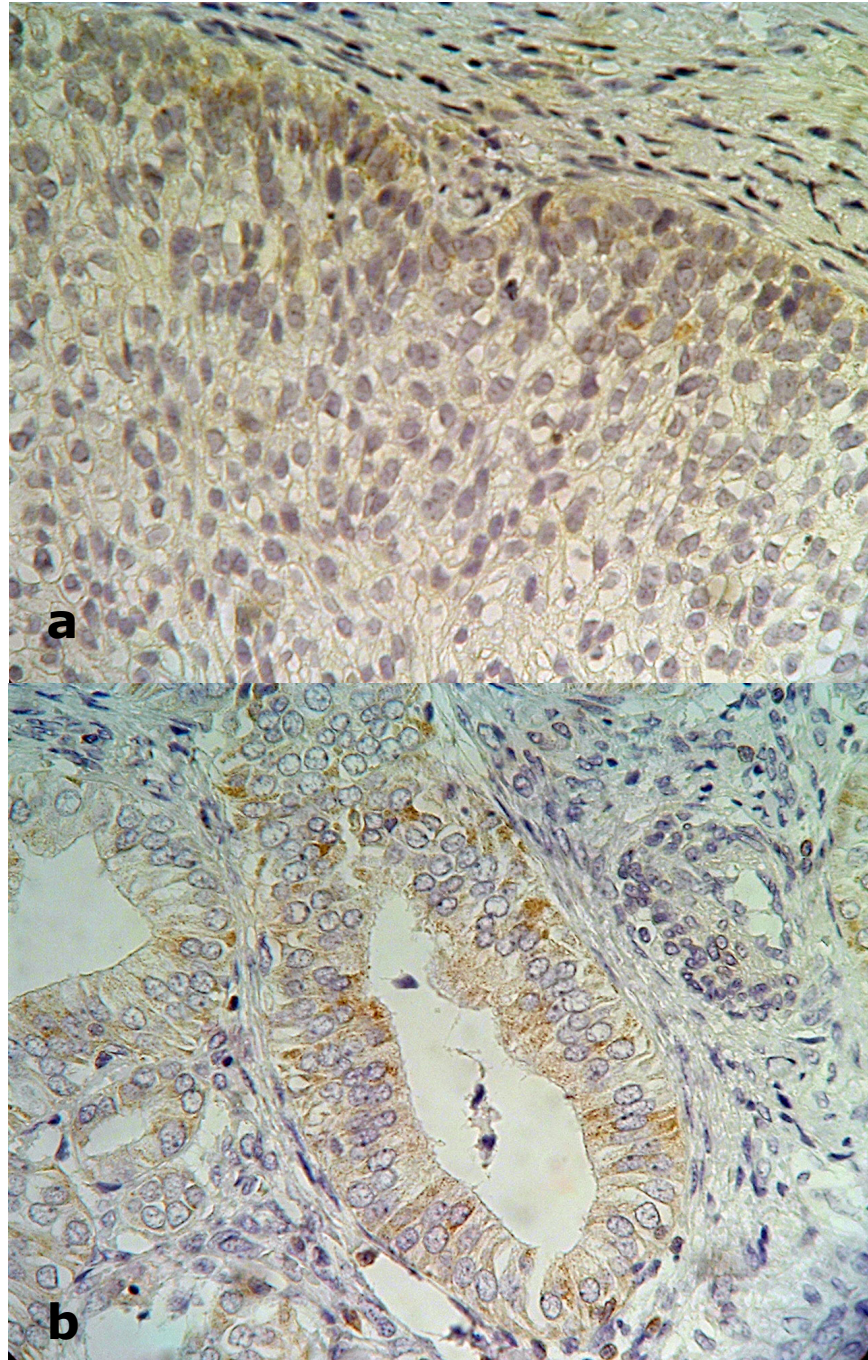


Figura N° 41. Expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en cáncer de cuello uterino. a. Carcinoma epidermoide con tinción citoplasmática sutil. b. Adenocarcinoma endocervical con tinción citoplasmática granular fina. (Ambas 40x).

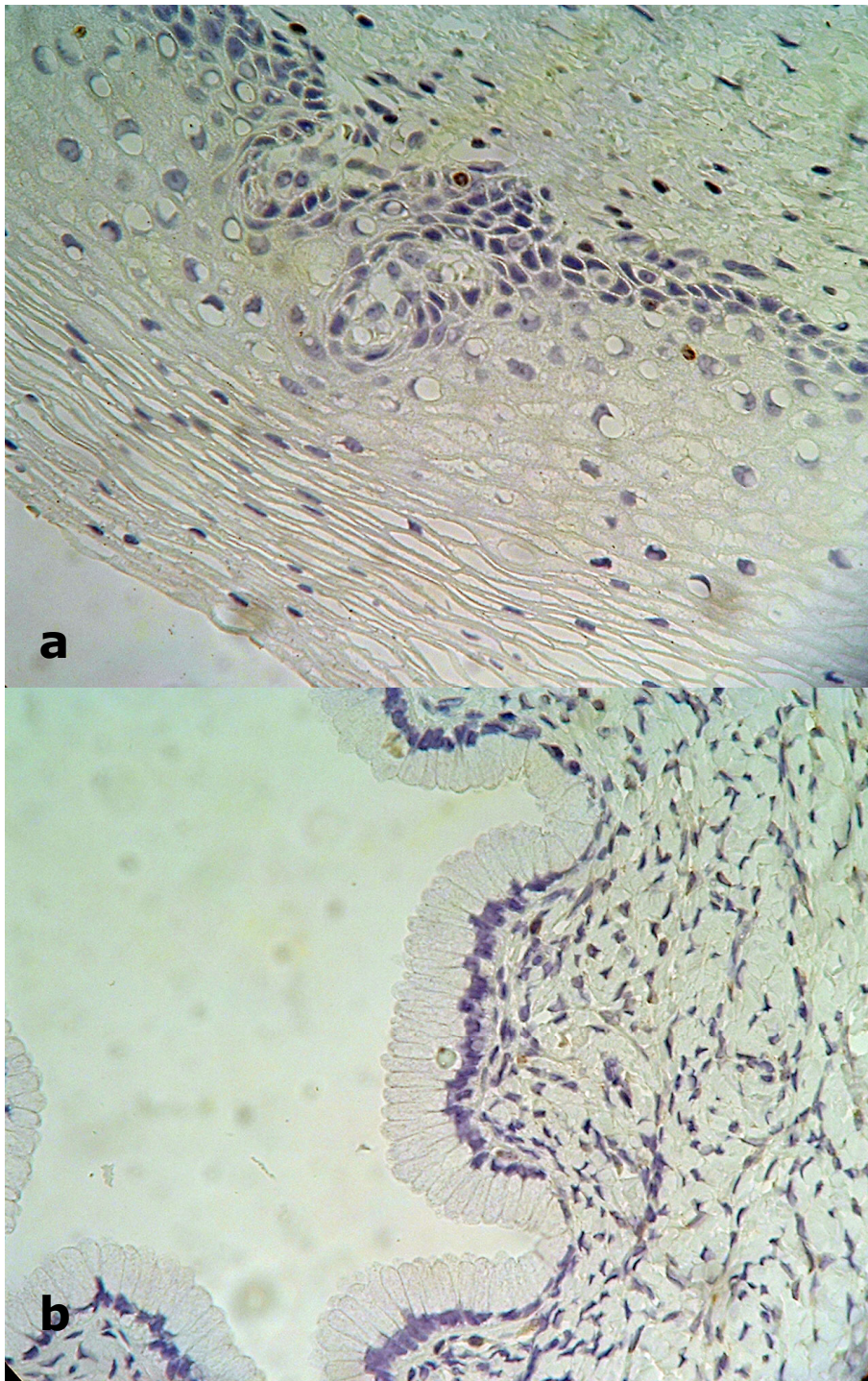


Figura Nº 42. Expresión de Bcl-2 en el epitelio cervical benigno: a. Exocérnix. b. Endocérnix. En ambos ausencia total de inmunorrespuesta. (Ambas 40x).

En la siguiente tabla se resumen los hallazgos de reactividad inmunohistoquímica positiva correspondiente a los componentes de la vía de la apoptosis en los tipos histológicos de cáncer cervical.

Tabla N° 37. Reactividad inmunohistoquímica de los componentes de la vía de la apoptosis en los tipos histológicos cáncer cervical.

Tipos histológicos	<i>p53</i> (<i>p</i> =0.157)	<i>MDM-2</i> (<i>p</i> =0.232)	<i>Bax</i> (<i>p</i>=0.008)	<i>Bcl-2</i> (<i>p</i> =0.685)
Carcinoma epidermoide	2/60(3.3%)	61/61(100%)	36/60(60%)	2/62(3.2%)
Adenocarcinoma	1/17(5.9%)	18/18(100%)	16/17(94.1%)	1/19(5.3%)
Total	3/77(3.9%)	79/79(100%)	52/77(67.5%)	3/81(3.7%)

3.4 Expresión de las moléculas de adhesión celular.

La expresión inmunohistoquímica de las moléculas cadherina-E, CD44s y CD44v3 involucradas en la adhesión celular fue considerada positiva cuando observamos tinción marrón a nivel de la membrana celular, a nivel del citoplasma o en ambos compartimientos celulares. En cada caso se indicó la localización específica de cada proteína y se siguió la escala semicuantitativa propuesta para determinar el porcentaje de células teñidas (apartado 2.3.3 d).

3.4.1 CADHERINA-E.

La evaluación de la inmunoexpresión de la cadherina-E pudo llevarse a cabo en 77/81 de los casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio. De los 77 casos, 59(76.6%) revelaron inmunoreactividad para la cadherina-E a nivel de la membrana celular, en el citoplasma o en ambos compartimientos celulares y 18(23.4%) no mostraron ningún tipo de respuesta. Los 44 controles cervicales fueron evaluados para este anticuerpo: 77.3% respondieron positivamente mientras que 22.7% lo hicieron negativamente, como se aprecia en la siguiente tabla.

Tabla N° 38. Expresión de la proteína cadherina-E en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

Cadherina-E	Positivos	Negativos
Casos	59(76.6%)	18(23.4%)
Controles	34(77.3%)	10(22.7%)

Al comparar la expresión de la cadherina-E en los tumores y controles, encontramos que la inmunoreactividad de los 34 controles se presentó en menos del 50% de las células escamosas. Por el contrario, en los tumores la tinción fue irregular pues estos mostraron diferentes grados de reactividad y sobre todo diferente localización de expresión proteica (como se describe más adelante), lo cual creó diferencias muy significativas entre los tumores y controles ($p < 0.0000$).

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de la cadherina-E de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 39. El 77% de los carcinomas epidermoides y el 75% de los adenocarcinomas tuvieron reactividad positiva. Los 18 casos restantes resultaron negativos, distribuidos de la siguiente manera: 23% eran carcinomas epidermoides y 25% adenocarcinomas.

Tabla N° 39. Expresión de cadherina-E de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	Cadherina-E		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	47(77%)	14(23%)	61
Adenocarcinoma	12(75%)	4(25%)	16
Total	59	18	77

La distribución detallada de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para la cadherina-E (tabla N° 40), reveló que la mayor proporción de casos de ambos tipos histológicos (45) mostraba tinción entre el 5-50% de las células (+/++): 13(21.3%) con + y 20(32.8%) con ++ para los carcinomas epidermoides y 9(56.3%) con + y 3(18.8%) con ++ para los adenocarcinomas, mientras que más del 50% (+++) de las células teñidas se apreció en el 14(23%) de los carcinomas epidermoides pero en ningún caso de adenocarcinoma. Precisamente, como consecuencia de esta heterogeneidad en la respuesta ante el anticuerpo contra la cadherina-E, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tipos histológicos ($p=0.034$)*, tabla n° 50. Los adenocarcinomas mostraron mayor proporción de casos con menos del 25% de las células teñidas (56.3%) que los carcinomas epidermoides (21.3%), lo que sugiere que la cohesividad celular está reducida en los adenocarcinomas.

Tabla N° 40. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para la cadherina-E.

Expresión Cadherina-E	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+	13(21.3%)	9(56.3%)
++	20(32.8%)	3(18.8%)
+++	14(23.0%)	-
Total	47	12

$p= 0.034$

En los 47 casos de carcinoma epidermoide, la expresión de la cadherina-E se localizó en la *membrana* de 5 casos (8.2%), en el *citoplasma* de 9 casos (14.8%) y en *ambas localizaciones* en 33 casos (54.1%). Para el grupo de los adenocarcinomas (12), la proporción de casos con localización de cadherina-E a nivel citoplasmático fue de 10 casos (62.5%) y en membrana/citoplasma fue de 2 casos (12.5%). Como se puede ver en la tabla N° 41, la localización fue significativamente diferente entre ambos tipos histopatológicos ($p<0.000$). La figura N° 43 es un ejemplo de la localización celular de cadherina-E en cáncer cervical.

Cuando la tinción se localizaba a nivel de la membrana de las células de origen escamoso, la intensidad era más llamativa que cuando se presentaba en el citoplasma, en cuyo caso se mostraba homogénea y clara.

La tinción de la membrana en los adenocarcinomas era más marcada en los bordes laterales que en la porción basal, quedando libre la apical. La tinción citoplasmática era menos intensa y homogénea. Estas observaciones corresponden a los 2 casos con expresión tanto nuclear como citoplasmática.

Tabla N° 41. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo a la localización celular de la expresión de cadherina-E.

Localización Cadherina-E	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
Membranosa	5(8.2%)	-
Citoplasmática	9(14.8%)	10(62.5%)
Membranosa/citoplasmática	33(54.1%)	2(12.5%)

$p < 0.000$

La localización de la expresión de la cadherina-E entre tumores y controles mostró diferencias muy significativas ($p < 0.001$) debido a que en los controles se situó fundamentalmente a nivel de membrana (sólo algunas células del estrato profundo mostraron tinción citoplasmática), en cambio en los tumores fue variable, pero con tendencia citoplasmática.

La sobreexpresión de la cadherina-E fue significativamente variable entre los grupos de carcinoma epidermoide ($p < 0.006$), los II fueron los menos expresivos (25%), por lo que a mayor indiferenciación menor cohesividad celular. Aunado a ello, las células muy inmaduras e indiferenciadas con expresión de la cadherina-E mostraban una localización con tendencia citoplasmática muy significativa ($p = 0.004$), ya que aunque la tinción se apreciaba tanto en membrana como en el citoplasma, era predominante en este último, en comparación con el resto de los carcinomas epidermoides. Los BD al igual que los II perdieron la expresión de la cadherina-E en membranas, a diferencia del resto de los tumores que, aunque bajo, mostraron cierto número de casos con tinción únicamente a nivel de membrana. En los carcinomas epidermoides I fue predominantemente citoplasmática y cuando se observó sólo en membrana, esta ocurrió en áreas con cierto grado de diferenciación dentro del mismo tumor. En los MD, la localización predominante fue en ambos compartimientos celulares (65.4%).

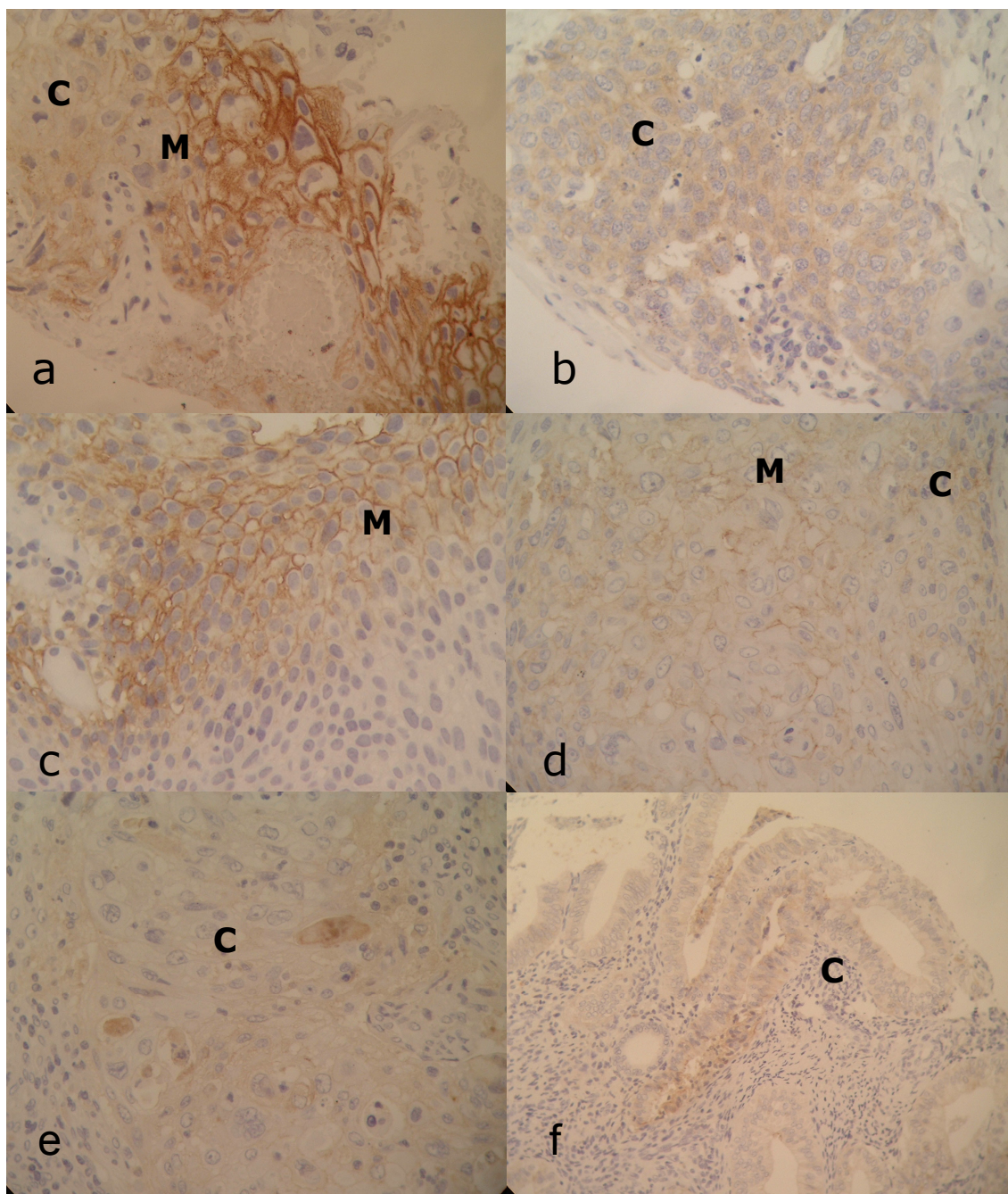


Figura Nº 43. Localización de la expresión de la cadherina-E en carcinoma epidermoide (a,b,c,d,e) (40x) y adenocarcinoma endocervical (f) (20x). M=membranosa, C=citoplasmática.

La inmunoreactividad de la cadherina-E en los diferentes subtipos histológicos de adenocarcinoma cervical fue del 100% de reactividad en los endometrioides, en el mucinoso y en el villoglandular, seguidos del 62.5% de los endocervicales y el 50% de los papilares ($p=0.766$). La localización de la sobreexpresión de cadherina-E fue predominantemente citoplasmática con la siguiente distribución: los endometrioides y el mucinoso mostraron tinción citoplasmática en el 100% de los casos y los endocervicales en el 62.5%; en cambio la tinción tanto membranosa como citoplasmática fue en el 100% de los villoglandulares y el 50% de los papilares ($p=0.064$).

La cadherina-E se expresó intensamente en el epitelio escamoso del exocérnix benigno con una apariencia granular fina, a nivel del estrato intermedio fundamentalmente y menos en el profundo, para desaparecer progresivamente en el estrato superficial. La tinción en las células basales y parabasales fue predominantemente citoplasmática y ocasionalmente membranosa. Estas imágenes se invirtieron en las células intermedias, donde la expresión membranosa fue predominante y circunferencial (figura N° 44. a). En las células endocervicales normales hubo también expresión de la cadherina-E en las membranas, con tendencia a la porción basal o alrededor del núcleo y ocasionalmente en el citoplasma. Las células de reserva fueron negativas para la cadherina-E (Han et al, 2000); el estroma subyacente no mostró tinción (figura N° 44. b).

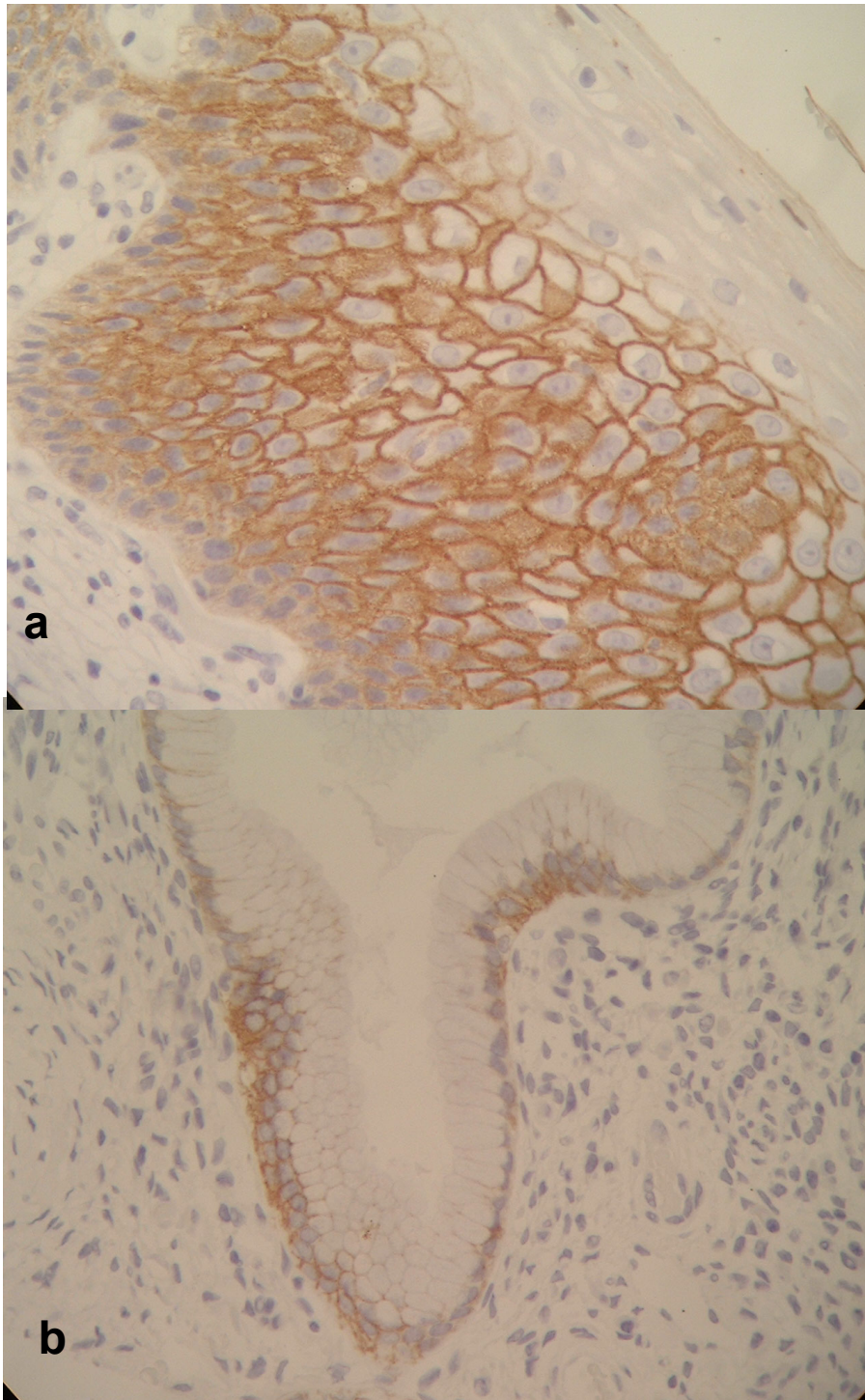


Figura N° 44. Expresión de la cadherina-E en el epitelio cervical benigno.
a. Exocervix (20x). b. Endocervix (40x). M=membranosa, C=citoplasmática

3.4.2 CD44s

La evaluación de la inmunexpresión de CD44s pudo llevarse a cabo en 77/81 de los casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio. De los 77 casos, 70(90.9%) revelaron inmunoreactividad para CD44s a nivel de la membrana celular, en el citoplasma o en ambos compartimientos celulares y 7(9.1%) no mostraron ningún tipo de respuesta para el antígeno CD44s. Los 44 controles cervicales fueron evaluados para este anticuerpo: 81.8% respondieron positivamente y 18.20% negativamente, como se aprecia en la tabla N° 42.

Tabla N° 42. Expresión de la proteína CD44s en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

CD44s	Positivos	Negativos
Casos	70(90.9%)	7(9.1%)
Controles	36(81.8%)	8(18.2%)

Al comparar la expresión de la CD44s en los tumores y controles, encontramos que la inmunoreactividad de los 36 controles fue en menos del 50% de las células escamosas. Por el contrario, en los tumores la tinción se presentó irregular, ya que estos mostraron diferentes grados de reactividad y sobre todo diferente localización de expresión (como se describe más adelante), lo cual generó diferencias muy significativas entre los tumores y controles ($p < 0.0000$).

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de CD44s de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 43. 59(98.3%) eran carcinomas epidermoides y 11(64.7%) adenocarcinomas. 7 casos de cáncer de cuello uterino resultaron negativos y correspondieron a 1(1.7%) carcinoma epidermoide y a 6(35.3%) adenocarcinomas. Estas diferencias son estadísticamente muy significativas ($p < 0.000$). El déficit de esta proteína en los adenocarcinomas evidencia la falta de cohesividad celular marcada en este tipo de tumores.

Tabla N° 43. Expresión de CD44s de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	CD44s		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	59(98.3%)	1(1.7%)	60
Adenocarcinoma	11(64.7%)	6(35.3%)	17
Total	70	7	77

$p < 0.000$

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para CD44s (tabla N° 44), reveló que la mayor proporción de casos de ambos tipos histológicos (50) mostraba tinción entre el 5-50% de las células (+/++): 66.7%(40) para los carcinomas epidermoides y 58.8%(10) para los adenocarcinomas. De igual forma, más del 50% (+++) de las células teñidas se apreció en el 31.7%(19) de los carcinomas epidermoides y sólo en el 5.9%(1) de los adenocarcinomas, intervalo en el que encontramos diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0.000$).

La tinción en membrana tenía un aspecto de puntillado grueso marrón y en el citoplasma se observó una apariencia granular fina, homogénea. La intensidad de la tinción varió entre moderada y marcada.

Tabla N° 44. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para CD44s.

Expresión CD44s	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+/++	40(66.7%)	10(58.8%)
+++	19(31.7%)	1(5.9%)
Total	59	11

$p < 0.000$

De los 59 casos de carcinoma epidermoide, la expresión de la CD44s se localizó a nivel membranoso en 3(5%), a nivel citoplasmático en 20(33.3%) y tanto en el citoplasma como membrana en 36(60%). Para el grupo de los adenocarcinomas (11), el número de casos con localización de CD44s a nivel citoplasmático fue de 3(29.4%) y en membrana/citoplasma de 6(35.3%). La localización fue significativamente diferente entre ambos tipos histopatológicos ($p < 0.000$), como se puede ver en la tabla N° 45. La figura N° 45 es un ejemplo de la localización celular de CD44s en cáncer cervical.

Tabla N° 45. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo a la localización celular de la expresión de CD44s.

Localización CD44s	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
Membranosa	3(5%)	-
Citoplasmática	20(33.3%)	5(29.4%)
Membranosa/citoplasmática	36(60.%)	6(35.3%)

$p < 0.000$

La comparación de la localización de la expresión de la CD44s entre tumores y controles mostró que en los tumores existe una ubicación de esta proteína evidentemente con tendencia citoplasmática, mientras que en el 81.2% de los controles correspondientes a los inmunopositivos, era membranosa ($p=0.003$).

Aunque las diferencias no fueron significativas ($p=0.330$), los II revelaron menos expresión de la CD44s (85.7%) en comparación con los BD, MD e I (en las áreas tumorales con cierto grado de diferenciación) que expresaron esta molécula en el 100% de los casos, indicando que a mayor diferenciación mayor expresión de CD44s.

La localización celular citoplasmática de CD44s prevaleció en los carcinomas epidermoides I (57.1%) e II (42.9%), mientras que la localización tanto en membrana como en citoplasma fue en el 42.9% y 28.9%, respectivamente; por lo tanto, a mayor indiferenciación es más evidente la localización anormalmente citoplasmática y, por ende, es menor la cohesividad celular.

Los carcinomas epidermoides I carecían de tinción membranosa y el 14.3% de los II mostró tinción sólo en membranas. Los MD (80.8%) mostraron mayor expresión citoplasmática combinada con la membranosa, sin embargo, no hubo casos con tinción sólo a nivel de membrana. Los BD (84.6%) combinan la expresión entre la citoplasmática (30.8%) y la membranosa/citoplasmática (53.8%) con lo cual, igualmente la localización tiende a ser citoplasmática, de estos mismos el 15.4% mostró tinción membranosa de CD44s. Todas estas diferencias no demostraron ser estadísticamente significativas ($p=0.070$).

La reactividad para el antígeno CD44s fue más evidente en los casos de adenocarcinoma endocervical y endometriode (75%), seguido del 50% de los papilares y villoglandulares ($p=0.606$). La localización de la expresión de CD44s fue con tendencia citoplasmática en un 64.7% (11/17 adenocarcinomas cervicales); el 50% de los endocervicales(4), papilares(1) y villoglandulares(1) mostraron tinción sólo a nivel de citoplasma, mientras que en el 75% de los endometrioides(3) y el 25% de los endocervicales(2) fue tanto en citoplasma como en membrana. El adenocarcinoma mucinoso no expresó la CD44s. Estos datos no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p=0.479$).

En el epitelio escamoso benigno se observó intensa inmunoexpresión de CD44s, siendo más notoria en el estrato espinoso para ir desapareciendo progresivamente en el superficial. La apariencia de la tinción de membrana era granular fina pero bastante intensa. En el estroma subyacente, los citoplasmas de los fibroblastos y de las células endoteliales eran inmunoreactivos (figura N° 46. a).

Las células del epitelio glandular normal mostraron en general tinción intensa, tanto en la porción basal como en la apical. Sin embargo, en algunas se apreció una fina línea marrón que bordeaba toda la célula. Los citoplasmas eran negativos. Las células del estroma del endocérvix teñido con CD44s mostraron tinción citoplasmática, en algunos casos de mayor intensidad que las células epiteliales (figura N° 46. b).

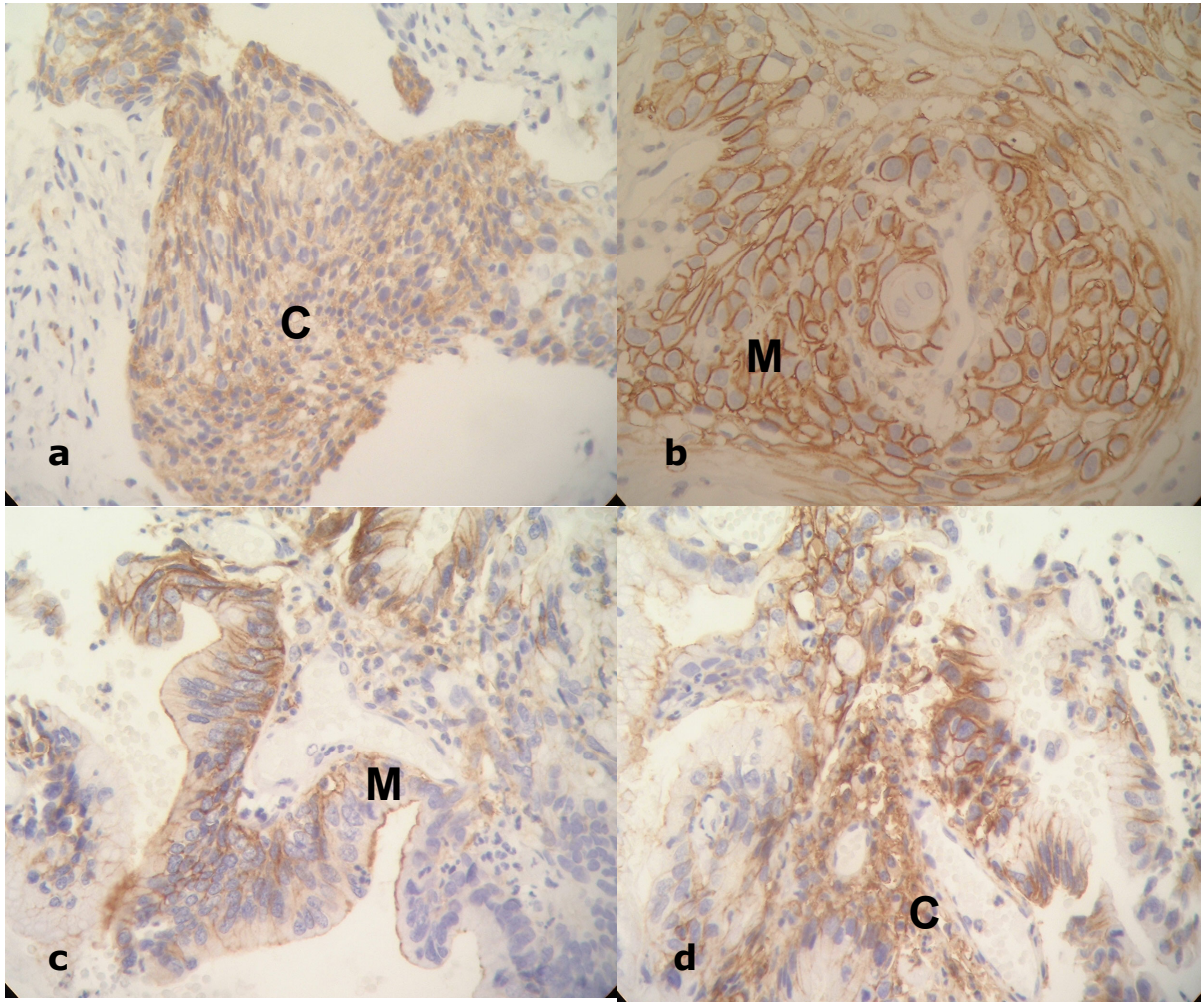


Figura N° 45. Localización de la expresión de CD44s en cáncer de cuello uterino. a y b. Carcinoma epidermoide (20x, 40x). c y d. Adenocarcinoma endocervical (20x). M= membranosa, C= citoplasmática.

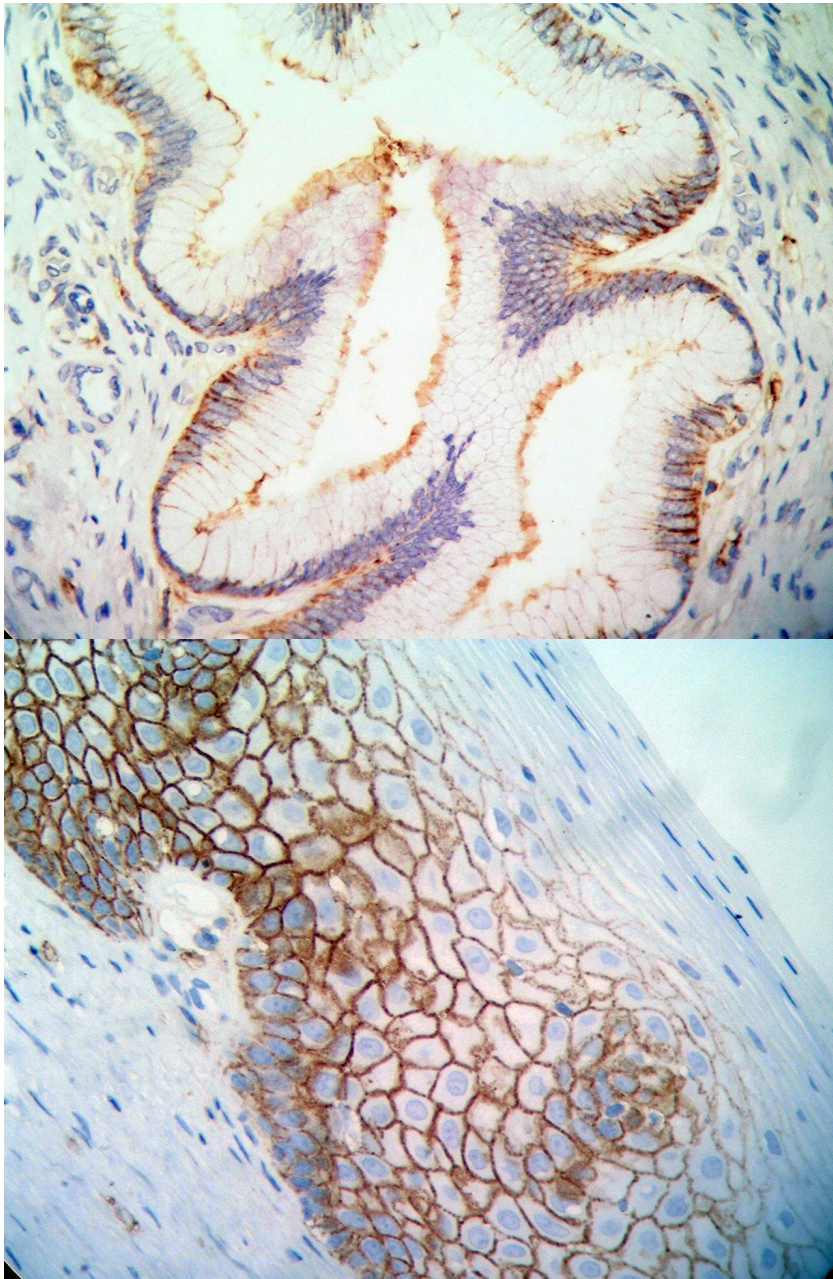


Figura N° 46. Expresión de CD44s en el tejido cervical benigno. a. Exocérnix. b. Endocérnix, ambas a nivel de membrana (Ambas 40x).

3.4.3 CD44v3.

La evaluación de la inmunorespuesta ante el anticuerpo contra CD44v3 pudo llevarse a cabo en el 100% de los tumores cervicales incluidos en este estudio. De los 81, 79(97.5%) revelaron inmunoreactividad para CD44v3 y 2(2.5%) no mostraron ningún tipo de respuesta para el antígeno CD44v3. Los 44 controles cervicales también fueron totalmente evaluados para este anticuerpo: 81.8% con positividad y 18.20% con negatividad, como se aprecia en la tabla N° 46.

Tabla N° 46. Expresión de la proteína CD44v3 en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

CD44v3	Positivos	Negativos
Casos	79(97.5%)	2(2.5%)
Controles	36(81.8%)	8(18.2%)

Al comparar la expresión de la CD44v3 en los tumores y controles, encontramos que la inmunoreactividad de los 36 controles fue en menos del 50% de las células escamosas. Por el contrario, en los tumores la tinción se presentó irregular ya que estos mostraron distintos grados de reactividad y diferente localización de expresión proteíca, lo cual creó diferencias muy significativas entre tumores y controles ($p < 0.0004$).

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de CD44v3 de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 47. 60(96.8%) eran carcinomas epidermoides y 19(100%) adenocarcinomas. Los 2 casos negativos para CD44v3 eran del tipo carcinoma epidermoide.

Tabla N° 47. Expresión de CD44v3 de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

CD44v3			
Tipos histológicos	Positivos	Negativos	Total
Carcinoma epidermoide	60(96.8%)	2(3.2%)	62
Adenocarcinoma	19(100%)	-	19
Total	79		81

$p= 0.230$

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para CD44v3 (tabla N° 48), reveló que la mayor proporción de casos de ambos tipos histológicos (49), mostraba tinción entre el 5-50% de las células (+/++): 62.9%(39) para los carcinomas epidermoides y 52.6%(10) para los adenocarcinomas. Más del 50% (+++) de las células teñidas se apreció en el 33.9%(21) de los carcinomas epidermoides y el 47.4%(9) adenocarcinomas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.230$).

La tinción en membrana tenía un aspecto de puntillado grueso marrón y en el citoplasma se observó una apariencia granular fina, homogénea. La intensidad de la tinción varió entre moderada (si era citoplasmática) e intensa (si era membranosa).

Tabla N° 48. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para CD44v3.

Expresión CD44v	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+/++	39(62.9%)	10(52.6%)
+++	21(33.9%)	9(47.4%)
Total	60	19

$p= 0.230$

De los 60 casos de carcinoma epidermoide, la expresión de la CD44v3 se manifestó a nivel citoplasmático y a nivel citoplasmático/membranoso en una misma proporción para ambas localizaciones: 30(48.4%). Para el grupo de los adenocarcinomas (19), la proporción de casos con localización de CD44v3 a nivel citoplasmático (89.5%) fue mayor que la proporción de casos con localización tanto citoplasmática como membranosa (10.5%), siendo estadísticamente muy significativa entre ambos grupos histopatológicos ($p < 0.006$), como se puede ver en la tabla N° 49. La tendencia tumoral es a tener localización citoplasmática de CD44v3 y esta característica es más notoria en los adenocarcinomas cervicales. Ningún caso de cáncer cervical mostró tinción sólo a nivel membranoso. La figura N° 47 es un ejemplo de la localización celular de CD44v3 encontrada en este estudio.

Tabla N° 49. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo a la localización celular de la expresión de CD44v3.

Localización CD44v3	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
Citoplasmática	30(48.4%)	17(89.5%)
Membranosa/citoplasmática	30(48.4%)	2(10.5%)

$p=0.006$

Cuando comparamos la localización celular de la CD44v3 entre tumores y controles encontramos que difirió muy significativamente ($p=0.002$) ya que en el 81.8% correspondiente a los controles positivos la ubicación era predominantemente en membrana, mientras que en los tumores no observamos expresión de esta proteína únicamente a nivel de membrana.

La expresión de la CD44v3 fue elevada entre los carcinomas con distintos grados de diferenciación. Sin embargo, fue significativamente ($p=0.008$) diferente ya que en los II se expresó en el 75% de los casos, mientras que en el resto se expresó en el 100%, es decir, la asociación es inversa: a mayor indiferenciación menor expresión de CD44v3. Con respecto a la localización de la expresión de esta proteína, prevaleció la tendencia

citoplasmática, de forma independiente o combinada con expresión membranosa. La localización sólo citoplasmática la encontramos en el 42.9% de los I y el 50% de los II, mientras que tanto membranosa como citoplasmática en el 57.1% y 25%, respectivamente. En los MD, el 48.1% mostró CD44v3 en citoplasma y el 51.9% en membrana/citoplasma. Los BD mostraron localización fundamentalmente citoplasmática (53.8%) seguido de la combinación membrana/citoplasma (46.2%). Estos datos no alcanzaron a ser significativamente diferentes ($p=0.063$).

La inmunoexpresión de CD44v3 ocurrió en el 100% de los subtipos histológicos de adenocarcinoma cervical. El 52.6% de los casos mostró expresión de esta proteína en menos del 50% de las células malignas (reactividad +/+++). El 100% de los villoglandulares y el mucinoso mostró esta expresión; seguido de los endometrioides (60%), los papilares (50%) y los endocervicales (25%). El resto de casos presentó reactividad +++, distribuidos en el siguiente orden: 75% de los endocervicales, 50% de los papilares y 40% de los endometrioides. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0.012$), debido a que entre ellos la inmunoreactividad fue bastante heterogénea.

En cuanto a la localización de la expresión de CD44v3, esta fue predominantemente citoplasmática en 17/19 (89.5%) de los adenocarcinomas cervicales. La distribución de los casos con tinción solo a nivel citoplasmático es como sigue: el 100% de los papilares, villoglandulares y mucinoso, seguido del 87.5% de los endocervicales y el 80% endometrioides. Los casos con tinción tanto en citoplasma como en membrana (2/19) correspondieron a 1(12.5%) endocervical y 1(20%) endometrioide. No hubo diferencias importantes ($p=0.688$).

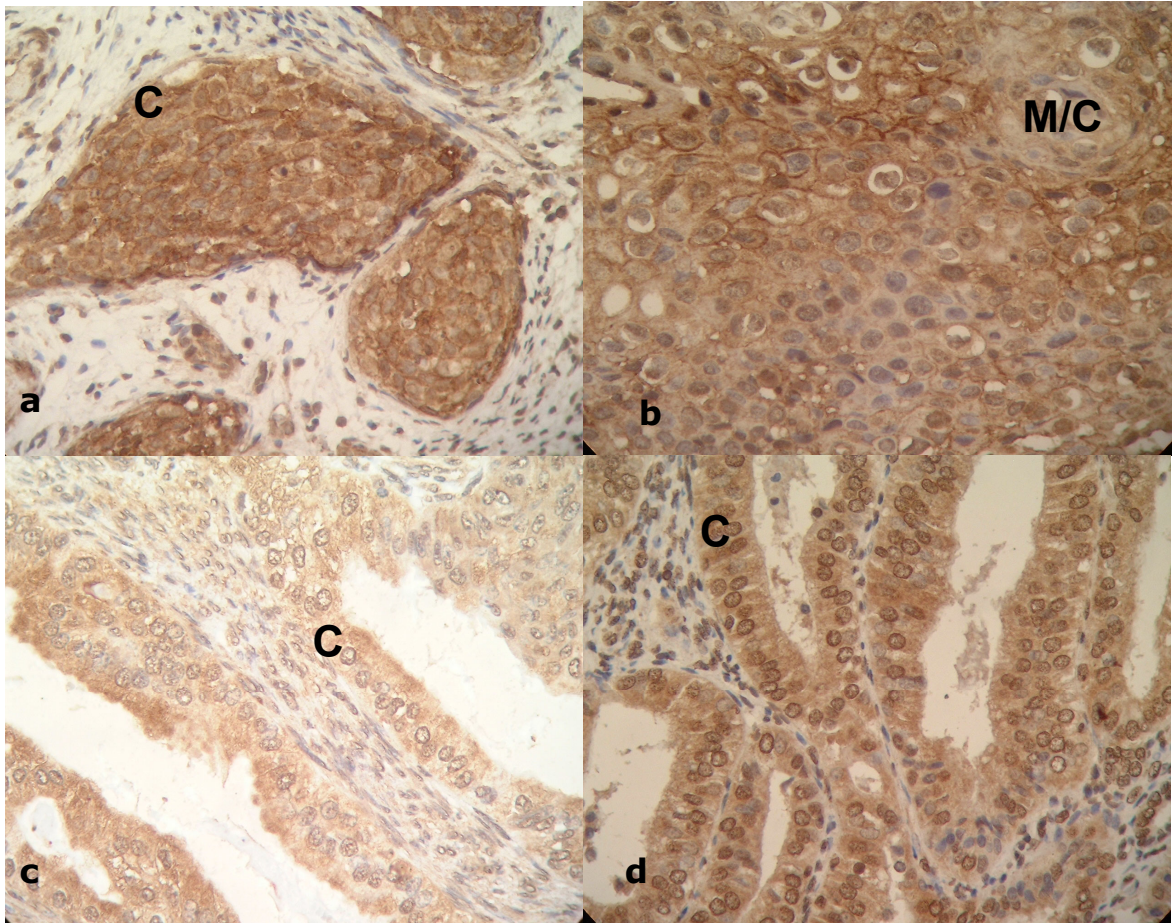


Figura N° 47. Localización de la expresión de CD44v3 en cáncer de cuello uterino. a y b. Carcinoma epidermoide(20x, 40x). c y d. Adenocarcinoma endocervical (20x, 40x). M=membranosa, C=citoplasmática.

En el epitelio escamoso benigno se observó inmunoexpresión membranosa de CD44v3 a nivel algunas células del estrato profundo, siendo más marcada en el estrato espinoso y desapareciendo progresivamente en las células intermedias altas y en el estrato superficial. La apariencia de la tinción de membrana era granular fina pero bastante intensa. En el estroma subyacente, los citoplasmas de los fibroblastos y de las células endoteliales mostraron inmunoreactividad (figura N° 48. a).

Las células del epitelio glandular normal mostraron en general tinción intensa de membrana tanto en la porción basal como en la apical. Sin embargo, en algunas se apreció una fina línea marrón que bordeaba toda la célula. Los citoplasmas eran negativos. Las células del estroma del endocérnix, sobre todo las endoteliales, mostraron tinción citoplasmática con mayor intensidad que las células epiteliales (figura N° 48. b).

Por lo tanto, aunque la expresión de la cadherina-E, CD44s y CD44v3 en esta serie de carcinomas cervicales es equiparable al tejido normal, muestra una localización predominantemente citoplasmática, lo cual sugiere que existe una retención de estas proteínas de adhesión en los citoplasmas de las células cervicales malignas, en lugar de la habitual ubicación membranosa.

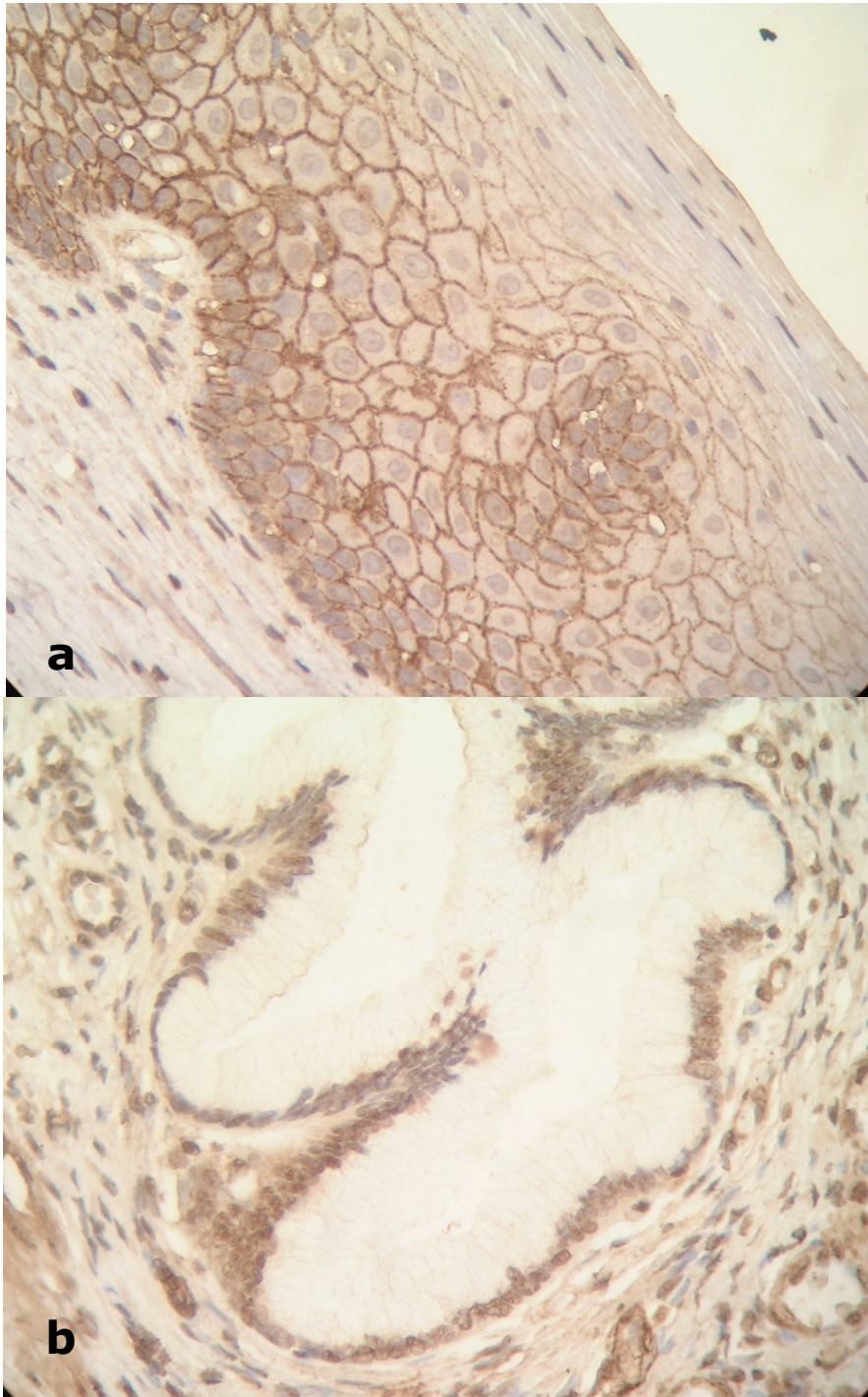


Figura N° 48. Expresión de CD44v3 en el tejido cervical benigno. a. Exocérvix. b. Endocérvix, ambas a nivel de membrana. (Ambas 40x).

La siguiente tabla resume los hallazgos de reactividad inmunohistoquímica positiva correspondiente a las moléculas de adhesión celular en los tipos histológicos de cáncer cervical.

Tabla N° 50. Reactividad inmunohistoquímica de las moléculas de adhesión celular en los tipos histológicos de cáncer cervical.

Tipos histológicos	<i>Cadherina-E</i> (<i>p</i> =0.034)*	<i>CD44s</i> (<i>p</i> <0.000)	<i>CD44v3</i> (<i>p</i> =0.230)
Carcinoma epidermoide	47/61(77%)	59/60(98.3%)	60/62(96.8%)
Adenocarcinoma	12/16(75%)	11/17(64.7%)	19/19(100%)
Total	59/77(76.6%)	70/77(90.9%)	79/81(97.5%)

3.5 Degradación de proteínas.

3.5.1 UBICUITINA.

Durante la evaluación de la inmunexpresión de la proteína ubiquitina, consideramos positivas las células con tinción tanto nuclear como citoplasmática. Para este antígeno logramos evaluar 80 casos de cáncer cervical, de los cuales 79(98.7)% mostraron sobreexpresión de ubiquitina y sólo 1 caso fue negativo. De los 44 controles evaluamos 43 y en 10(23.30%) no hubo respuesta para ubiquitina. Estos resultados se detallan en la tabla N° 51:

Tabla N° 51. Expresión de la ubiquitina en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

<i>Ubicuitina</i>	Positivos	Negativos
Casos	79(98.7%)	1(1.3%)
Controles	33(76.8%)	10(23.2%)

Al comparar la expresión de la ubiquitina en los tumores y controles encontramos diferencias muy significativas ($p < 0.0007$), demostrando que la degradación de proteínas es más intensa en los tumores que en los controles.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de la ubiquitina de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 52. 61(76.3%) eran carcinomas epidermoides y 19(23.8%) adenocarcinomas. Estos últimos fueron 100% reactivos y los carcinomas epidermoides alcanzaron una positividad del 98.4%, sin diferencias significativas ($p = 0.620$).

Tabla N° 52. Expresión de la ubicuitina de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Ubicuitina			
Tipos histológicos	Positivos	Negativos	Total
Carcinoma epidermoide	60(98.4%)	1(1.6%)	61
Adenocarcinoma	19(100%)	-	19
Total	79	1	80

$p= 0.620$

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para ubicuitina (tabla N° 53), reveló que la mayor proporción de casos de ambos tipos histológicos (56) mostraba tinción en más del 50%de las células (+++): 68.9%(42) para los carcinomas epidermoides y 73.7%(14) para los adenocarcinomas, mientras que la tinción entre 5 y 50%(+/++) de las células se apreció en el 29.5%(18) de los carcinomas epidermoides y el 26.3%(5) de los adenocarcinomas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.620$).

Tabla N° 53. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para la ubicuitina.

Expresión Ubicuitina	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+/++	18(29.5%)	5(26.3%)
+++	42(68.9%)	14(73.7%)
Total	60	19

$p= 0.620$

Los carcinomas cervicales mostraron tinción tanto en el núcleo como en el citoplasma. En muchos de ellos era más evidente la tinción nuclear que la citoplasmática, indicando que la degradación de proteínas es constante y en ambos compartimientos celulares. La intensidad de la tinción fue moderada o marcada. En el estroma también se apreció reactividad frente a la ubiquitina celular (figura N° 49).

La sobreexpresión de la ubiquitina en los carcinomas epidermoides no mostró diferencias significativas ($p=0.879$): el 100% de los BD, MD e II fueron positivos para esta proteína así como el 92.9% de los I.

La ubiquitina estaba sobreexpresada en el 100% de los subtipos histológicos de adenocarcinoma cervical sin diferencias importantes entre ellos ($p=0.329$). La mayor proporción de casos 14/19(73.7%) expresó esta proteína en más del 50% de las células malignas (reactividad +++).

En el epitelio poliestratificado plano benigno se tiñeron los núcleos celulares del estrato profundo fundamentalmente y en algunos del espinoso, con intensidad entre moderada y leve. También se observó tinción pálida en el citoplasma de las células escamosas. La tinción en el estroma fue más evidente en los endotelios vasculares. En el epitelio glandular normal, la tinción fue nuclear e intensa y focalmente citoplasmática. Se tiñeron los núcleos y citoplasmas de las células del estroma (figura N° 50).

Incluimos un control positivo especial para comparar la inmunotinción de la ubiquitina que correspondió a tejido endometrial no gestante, el cual resultó principalmente con tinción citoplasmática y en algunos núcleos con marcada intensidad.

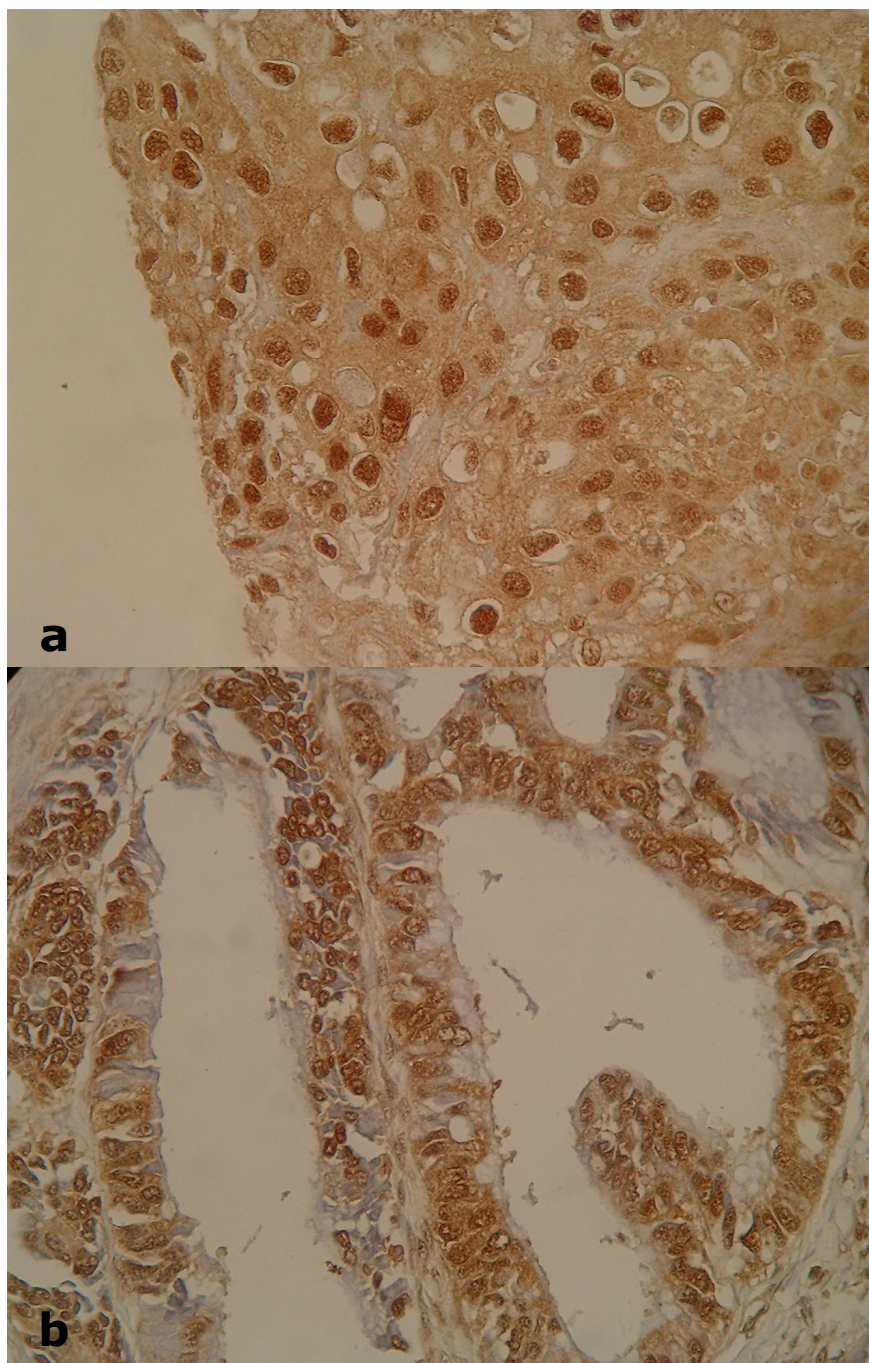


Figura Nº 49. Expresión de la ubiquitina en cáncer cervical. a. Carcinoma epidermoide. b. Adenocarcinoma endocervical. En ambos casos se aprecia que la inmunorrespuesta ocurre tanto en núcleos como en citoplasmas. (Ambas 40x).

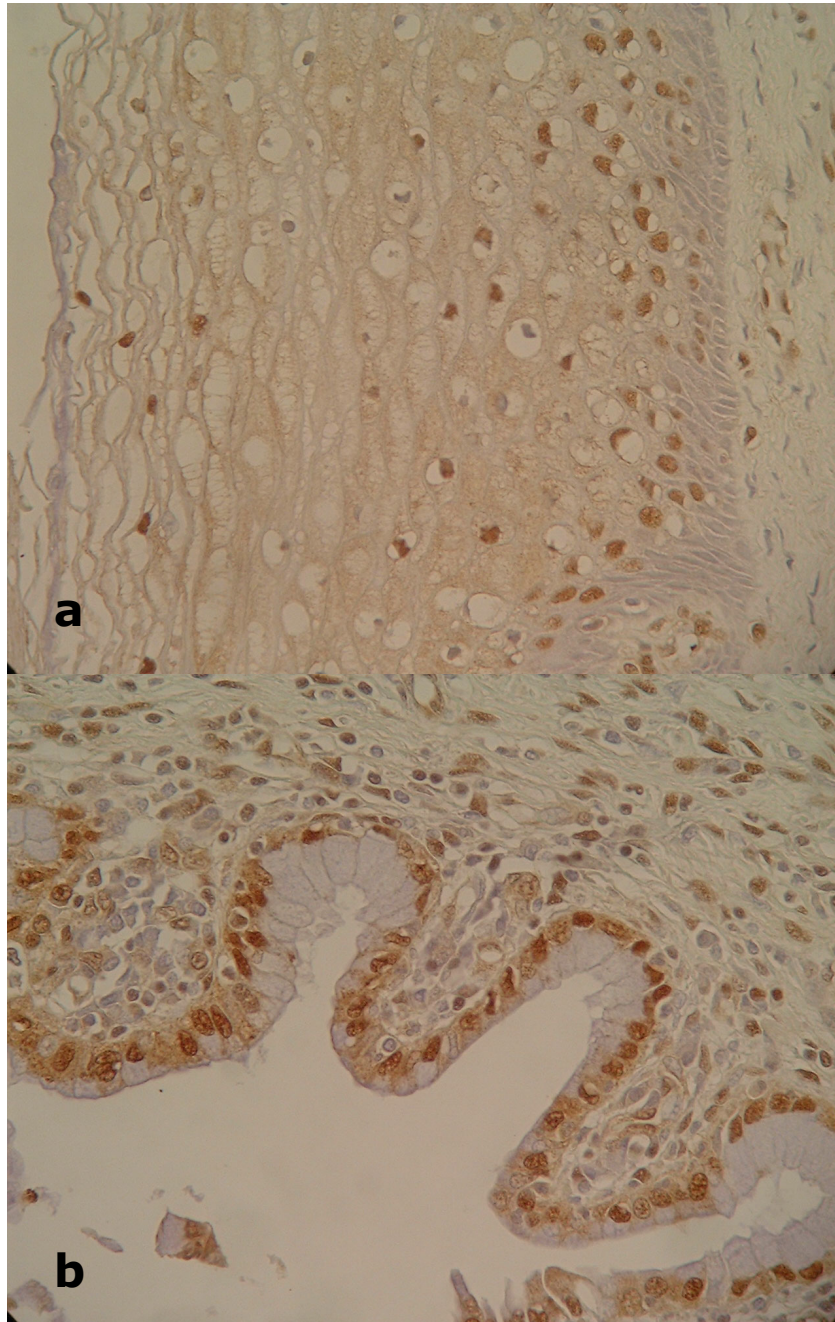


Figura N° 50. Expresión de la ubiquitina en tejido cervical benigno. a. Exocérvix, básicamente con tinción nuclear. b. Endocérvix, con tinción nuclear pero también focal a nivel citoplasmático. Se aprecian núcleos teñidos en el estroma. (Ambas con 40x)

3.6 Marcadores de diferenciación.

3.6.1 CITOQUERATINA (CK).

Para la evaluación de la expresión inmunohistoquímica de la CK (pancitoqueratina), consideramos positivas a las células con tinción citoplasmática en respuesta a los epítopes detectados por los anticuerpos AE1 (CK 10, 13, 14, 15, 16 y 19) y AE3 (CK 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8). Frente a estos antígenos pudimos evaluar 80 casos de cáncer cervical, de los cuales el 97.5% mostraron expresión de CK y sólo el 2.5% fue negativo. Los 44 controles fueron evaluados respondiendo todos (100%) positivamente al anticuerpo contra CK. Estos resultados se detallan en la tabla N° 54.

Tabla N° 54. Expresión de la CK en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

CK	Positivos	Negativos
Casos	78(97.5%)	2(2.5%)
Controles	44(100%)	-

Al comparar la expresión de la CK entre los tumores y controles, encontramos que la inmunoreactividad marcada de los 44 controles fue en menos del 25% de las células escamosas. Por el contrario en los tumores la tinción se presentó irregular ya que estos mostraron diferentes grados de reactividad, lo cual creó diferencias muy significativas entre tumores y controles ($p < 0.0008$).

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de la CK de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 55. 61(76.3%) eran carcinomas epidermoides y 19(23.8%) adenocarcinomas. La expresión positiva fue muy semejante entre ellos: 96.8% para carcinoma epidermoide y 100% para adenocarcinoma ($p = 0.628$).

Tabla N° 55. Expresión de la CK de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	CK		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	59(96.8%)	2(3.2%)	61
Adenocarcinoma	19(100%)	-	19
Total	78	-	80

$p= 0.628$

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para CK (tabla N° 56), reveló que la mayor proporción de casos de ambos tipos histológicos (40), mostraba tinción en más del 50% de las células (+++): 52.5%(32) para los carcinomas epidermoides y 42.1%(8) para los adenocarcinomas, mientras que la tinción entre el 5 y 50% (+/++) de las células teñidas se apreció en el 44.3%(27) de los carcinomas epidermoides y el 57.9%(11) de los adenocarcinomas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.628$).

Tabla N° 56. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para CK.

Expresión CK	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+/++	27(44.3%)	11(57.9%)
+++	32(52.5%)	8(42.1%)
Total	60	19

$p= 0.628$

La figura N° 51 ilustra la expresión de la CK en algunos de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de este estudio.

La expresión de las CK fue marcadamente elevada en los carcinomas epidermoides. La mayor proporción de casos con reactividad ++/+++ se concentró en los BD (84.6%), seguido de los MD con el 57.7%. En los tumores con menos diferenciación, la tinción ocurrió focalmente o en un menor número de células malignas con tinción leve: los II mostraron elevada reactividad pero esta fue de + (87.5%) al igual que los I en el 57.1%. Inclusive, en algunos tumores observamos, además, que existían áreas totalmente negativas dentro del mismo tumor correspondiendo a un menor grado de diferenciación. Esta heterogeneidad generó diferencias muy significativas ($p < 0.001$) entre ellos, por lo cual a mayor indiferenciación notamos menor expresión de CK.

La CK reveló inmunoexpresión elevada en todos los subtipos histológicos de adenocarcinoma cervical sin diferencias significativas entre ellos ($p = 0.913$). Los villoglandulares (100%) y los endocervicales (75%) mostraron + de reactividad.

El epitelio escamoso benigno mostró tinción intensa para CK en las capas intermedias y superficiales, siendo negativa o muy leve la respuesta en el estrato indiferenciado. Todos los controles de tejido endocervical presentaron positividad citoplasmática para la CK con marcada intensidad (figura N° 52).

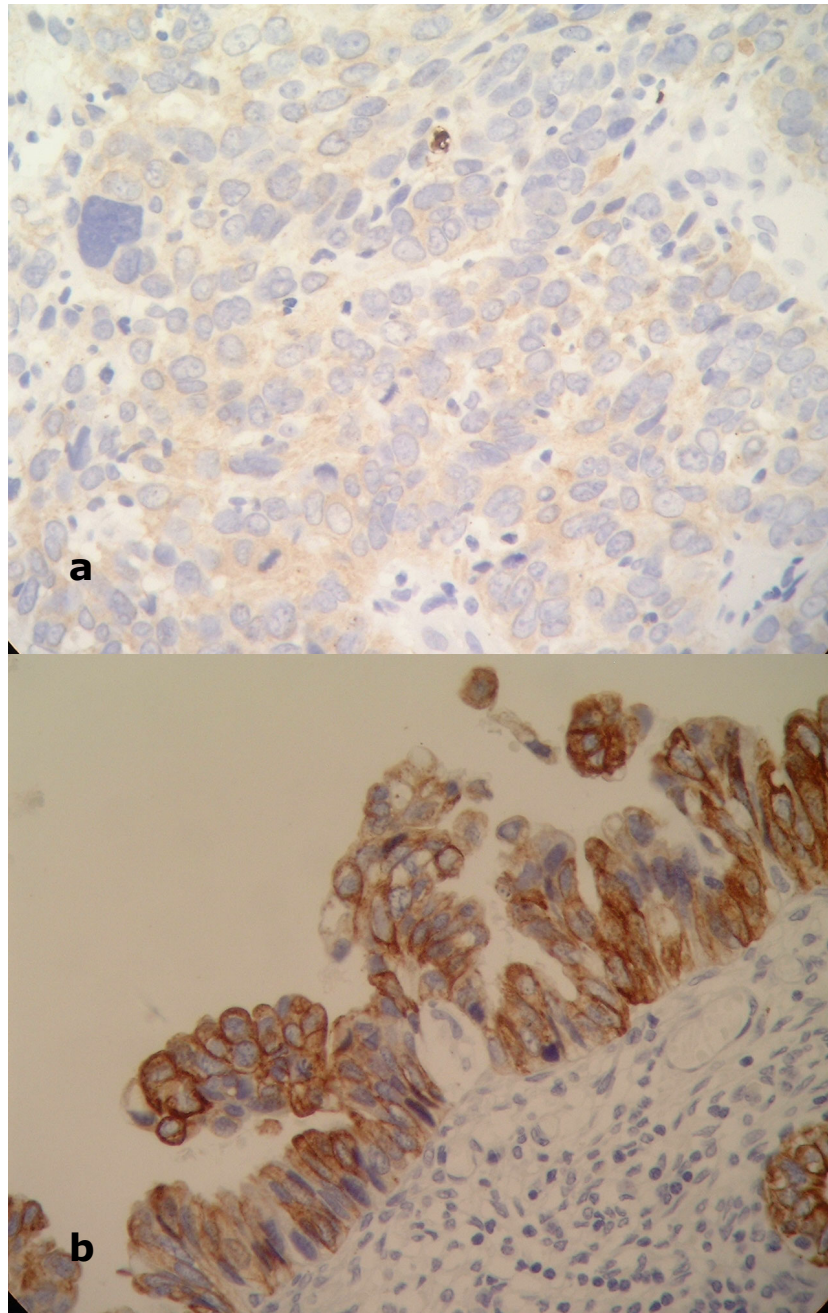


Figura N° 51. Expresión de CK en cáncer de cuello uterino. a. Carcinoma epidermoide II. B. Adenocarcinoma papilar. (Ambas 40x).

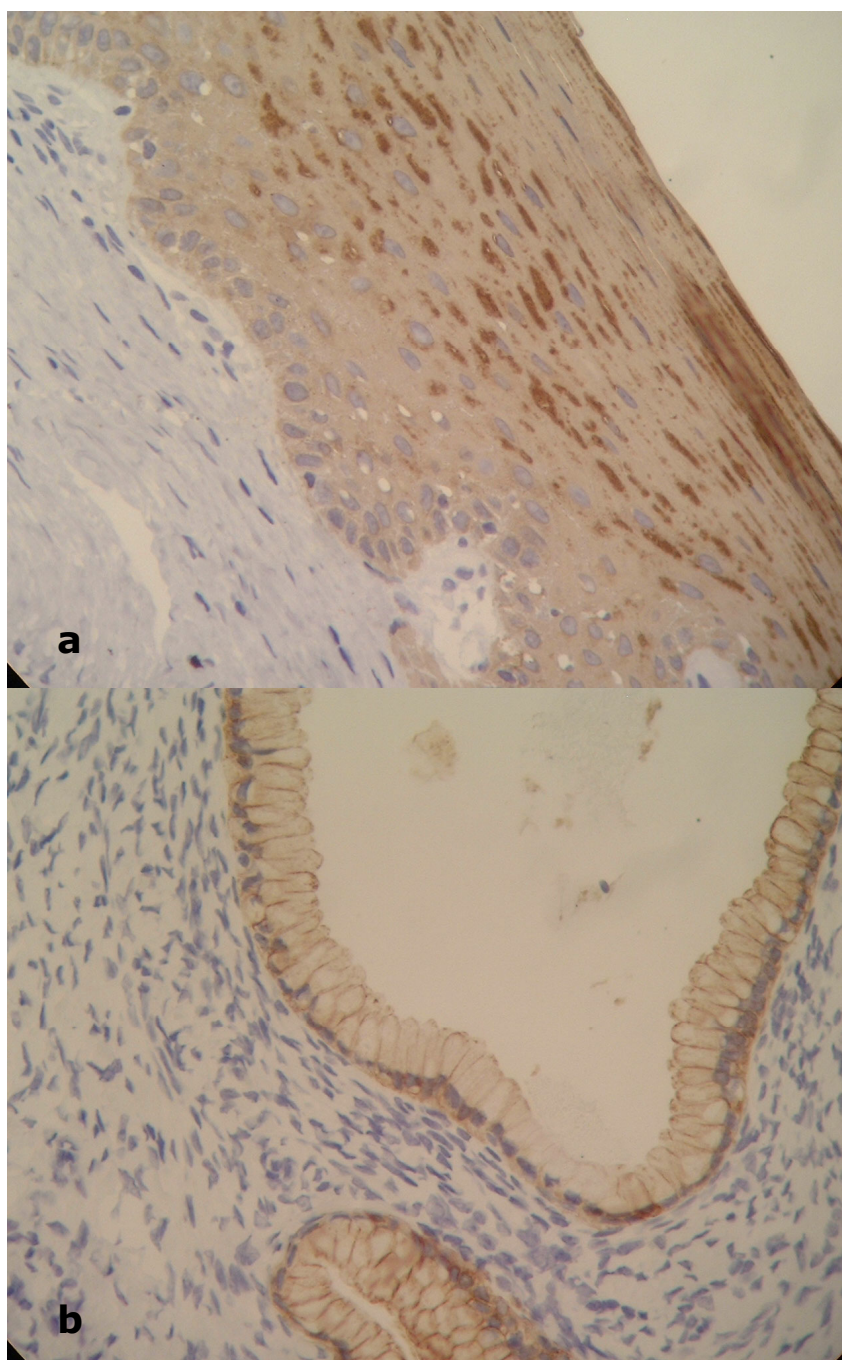


Figura N° 52. Expresión de la CK en tejido cervical benigno. a. Exocérvix con expresión intensa en las capas diferenciadas. b. Endocérvix con respuesta citoplasmática positiva (Ambas con 40x).

3.6.2 ANTÍGENO CARCINOEMBRINARIO (CEA).

La inmunoreactividad ante el anticuerpo seleccionado para detectar el antígeno carcinoembrionario CEA se consideró positiva cuando observamos tinción a nivel de los citoplasmas celulares. La evaluación para este antígeno se pudo realizar en 78/81 casos de cáncer de cuello uterino, de los cuales el 89.7% mostró expresión de CEA y el 10.3% fue negativo. Todos los controles fueron evaluados y expresaron CEA en las áreas de mayor grado de diferenciación, como se describirá más adelante. Estos resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla N° 57. Expresión de la CEA en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

CEA	Positivos	Negativos
Casos	70(89.7%)	8(10.3%)
Controles	44(100%)	-

Al comparar la inmunoexpresión de CEA entre los tumores y controles no se encontraron diferencias importantes ($p=1.000$), ya que ambos mostraron sobreexpresión.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de la CEA de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 58. 61(78.2%) eran carcinomas epidermoides y 17(21.8%) adenocarcinomas.

Tabla N° 58. Expresión de la CEA de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Tipos histológicos	CEA		Total
	Positivos	Negativos	
Carcinoma epidermoide	53(86.9%)	8(13.1%)	61
Adenocarcinoma	17(100%)	-	17
Total	70	8	78

$p= 0.398$

La distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células malignas teñidas para CEA se resume en la tabla N° 59. Destaca que la mayor proporción de casos de cáncer cervical (58/78), incluyendo ambos tipos histopatológicos, expresan esta proteína en más del 25% de las células malignas, siendo más evidente en los adenocarcinomas, aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.398$).

Tabla N° 59. Distribución de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de acuerdo al porcentaje de células teñidas para CEA.

Expresión CEA	Carcinoma N°(%)	Adenocarcinoma N°(%)
+	7(11.5%)	-
++	26(42.6%)	4(23.5%)
+++	20(32.8%)	8(47.1%)
Total	60	19

$p= 0.398$

La figura N° 53 ilustra la expresión de la CEA en algunos de los tipos histológicos de cáncer de cuello uterino de este estudio.

Los carcinomas epidermoides respondieron intensamente ante el anticuerpo contra CEA. Las áreas con mayor grado de diferenciación correspondieron a las más intensas. La reactividad focal se pudo apreciar en aquellos casos de carcinoma con menor grado de diferenciación. También nos encontramos con casos en los que en el mismo tumor presentaba áreas teñidas intensamente pero, a la vez, áreas con menor o ausencia de tinción. Esta expresión heterogénea no fue significativa ($p=0.403$). La mayor expresión se apreció en los MD (92.3%) seguido de los II (87.5%), los BD (84.6%) y los I (78.6%).

La inmunoexpresión del CEA en los diferentes subtipos histológicos de adenocarcinoma no mostró diferencias significativas ($p=0.371$) pues se expresó en todos los casos, aunque la mayor proporción de estos

9/17(52.9%) mostró tinción en menos del 50% de las células malignas. Sólo los papilares (100%) mostraron tinción en más del 50% de las células tumorales.

El tejido cervical benigno escamoso mostró reacción para el anticuerpo contra CEA en todos los estratos celulares siendo más marcado en el intermedio y superficial. En la capa profunda la tinción fue más leve e inclusive podía mostrar ausencia focal. El borde apical de las células endocervicales normales destacó por su reactividad intensa; los bordes laterales citoplasmáticos también se tiñeron pero con menos intensidad. Estas características se ilustran en la figura N° 54.

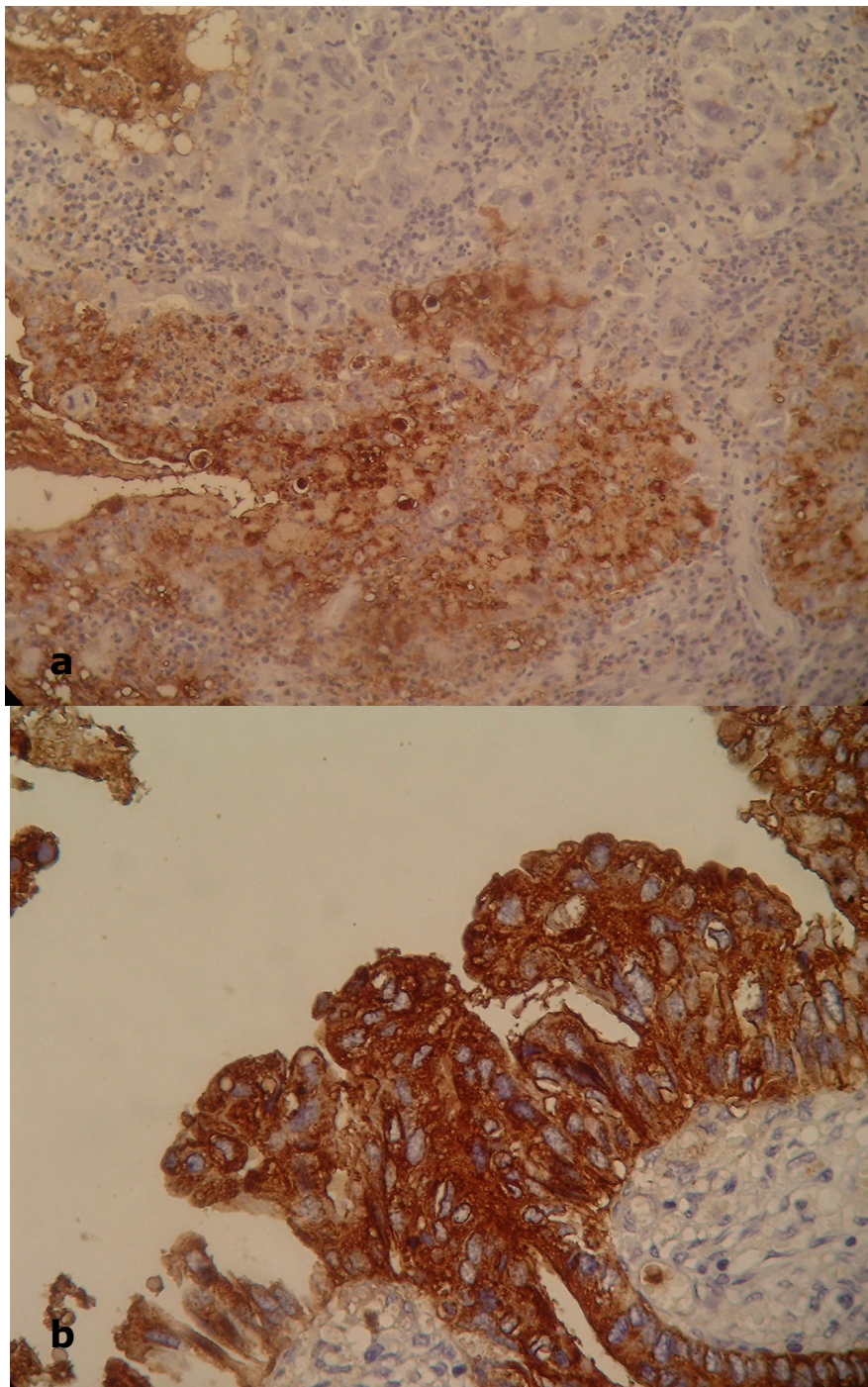


Figura N° 53. Expresión de CEA en cáncer cervical. a. Carcinoma epidermoide inmaduro (40x). b. Adenocarcinoma papilar (20x). En ambos casos se aprecia inmunoreactividad intensa

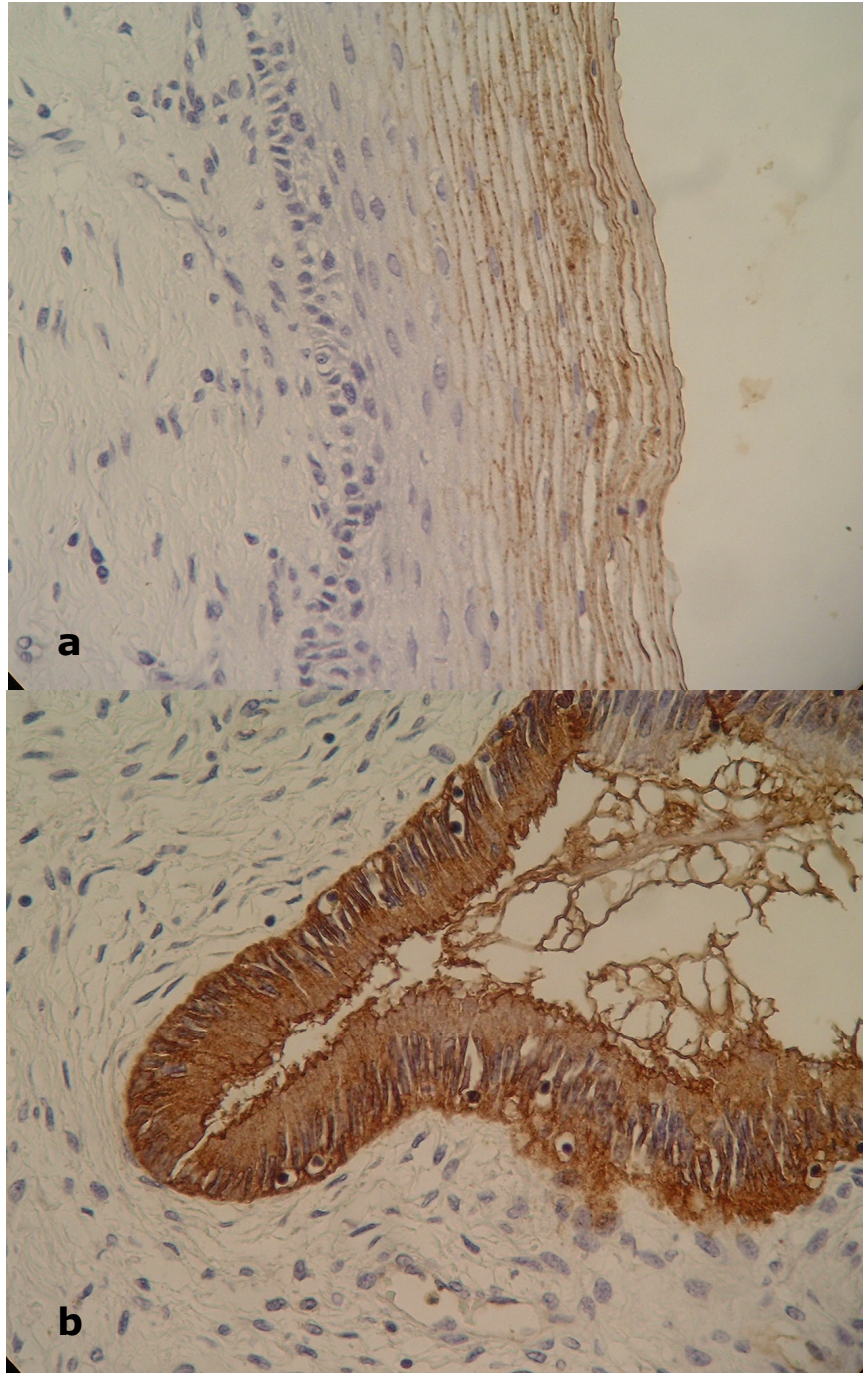


Figura Nº 54. Expresión de la CEA en tejido cervical benigno. a. Exocérvis con expresión en las capas diferenciadas. b. Endocérvis intensamente teñido (Ambas 40x).

3.7 TELOMERASA.

Dado a que en la literatura no encontramos referencias que describieran el posible patrón de tinción inmunohistoquímica a obtener en cáncer de cuello uterino, utilizamos como control positivo interno la tinción *nuclear* en los linfocitos, además de un control positivo externo correspondiente a un linfoma. La contratinción con colorante citoplasmático verde de metilo al 0.5% nos permitió confirmar los casos negativos y reclasificar los casos con reactividad dudosa. Los controles positivos y negativos, internos y externos incluidos en esta oportunidad, mostraron la reactividad esperada.

Se pudieron evaluar 78/81 casos de cáncer cervical, de los cuales 41(52.6%) fueron inmunoreactivos y 37(47.4%) no mostraron reactividad ante el anticuerpo frente a la telomerasa (tabla N° 60). Los controles fueron evaluados en su totalidad: 10(22.7%) positivos y 34(77.3%) negativos.

Tabla N° 60. Expresión de la telomerasa en los casos de cáncer cervical y controles incluidos en este estudio.

Telomerasa	Positivos	Negativos
Casos	41(52.6%)	37(47.4%)
Controles	10(22.7%)	34(77.3%)

La comparación de la inmunoexpresión de la telomerasa entre los tumores y controles mostró diferencias muy significativas ($p < 0.0007$), pues la expresión de esta enzima fue mayor en los tumores.

La distribución de los carcinomas cervicales con o sin expresión de la telomerasa de acuerdo al diagnóstico histopatológico se muestra en la tabla N° 61, donde apreciamos que ambos tipos de tumores muestran expresión positiva en porcentajes muy semejantes ($p = 0.595$).

Tabla N° 61. Expresión de la telomerasa de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

Telomerasa			
Tipos histológicos	Positivos	Negativos	Total
Carcinoma epidermoide	32(52.5%)	29(47.5%)	61
Adenocarcinoma	9(52.9%)	8(47.1%)	17
Total	41	37	78

$$p= 0.595$$

La respuesta al anticuerpo contra la telomerasa fue netamente nuclear y nucleolar. El patrón de tinción se caracterizó por tener la apariencia de un puntillado muy fino, homogéneo y pálido (figura N° 55. a). Tanto los núcleos de las células tumorales como los núcleos de linfocitos del estroma mostraron reactividad, aunque estos últimos se observaron intensamente teñidos. El nucleolo se tornó de un color marrón-grisáceo, que le hacía destacar dentro del núcleo (figura N° 55. b). En general, la intensidad de la tinción fue pálida, sólo en unos pocos casos fue un poco más intensa.

La inmunoexpresión de la telomerasa se observó en porcentajes semejantes entre los carcinomas epidermoides con diferente grado de diferenciación; fue mayor en los II(62.5%), seguido de los MD(55.6%) y en igual proporción para los BD e I (46.2%), sin diferencias significativas ($p=0.667$).

Los adenocarcinomas cervicales mostraron sobreexpresión con diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p=0.028$). Se presentó en el 100% de los villoglandulares y en el único caso del mucinoso, seguido de los subtipos histológicos endometriode y papilar en igual proporción (50%). Los endocervicales mostraron la menor expresión (28.6%).

En algunos casos, se observó tinción ocasional en los núcleos celulares (menos del 10% de las células) del estrato proliferativo del epitelio escamoso cervical benigno. No hubo respuesta nuclear en los estratos maduros. La tinción en el estroma fue esporádica (figura N° 56. a). Algunos

núcleos dispersos glandulares y en estroma se encontraron teñidos (figura N° 56. b)

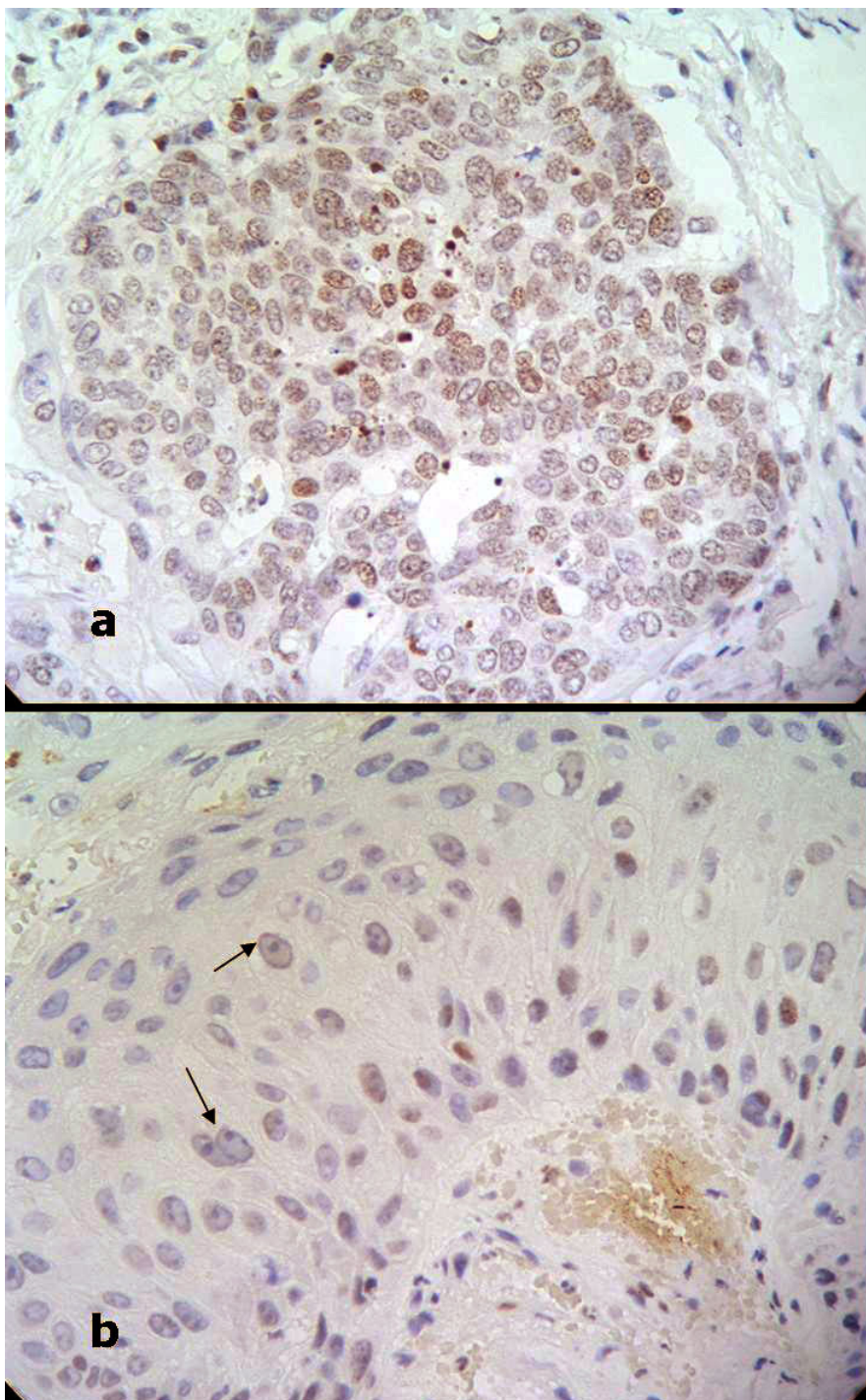


Figura N° 55. Expresión de la telomerasa en cáncer cervical. a y b. Carcinoma epidermoide con patrón de expresión puntiforme fino. Respuesta nuclear y nucleolar, las flechas señalan los nucléolos que destacan por su tinción marrón-grisácea pálida. (Ambas 40x HE).

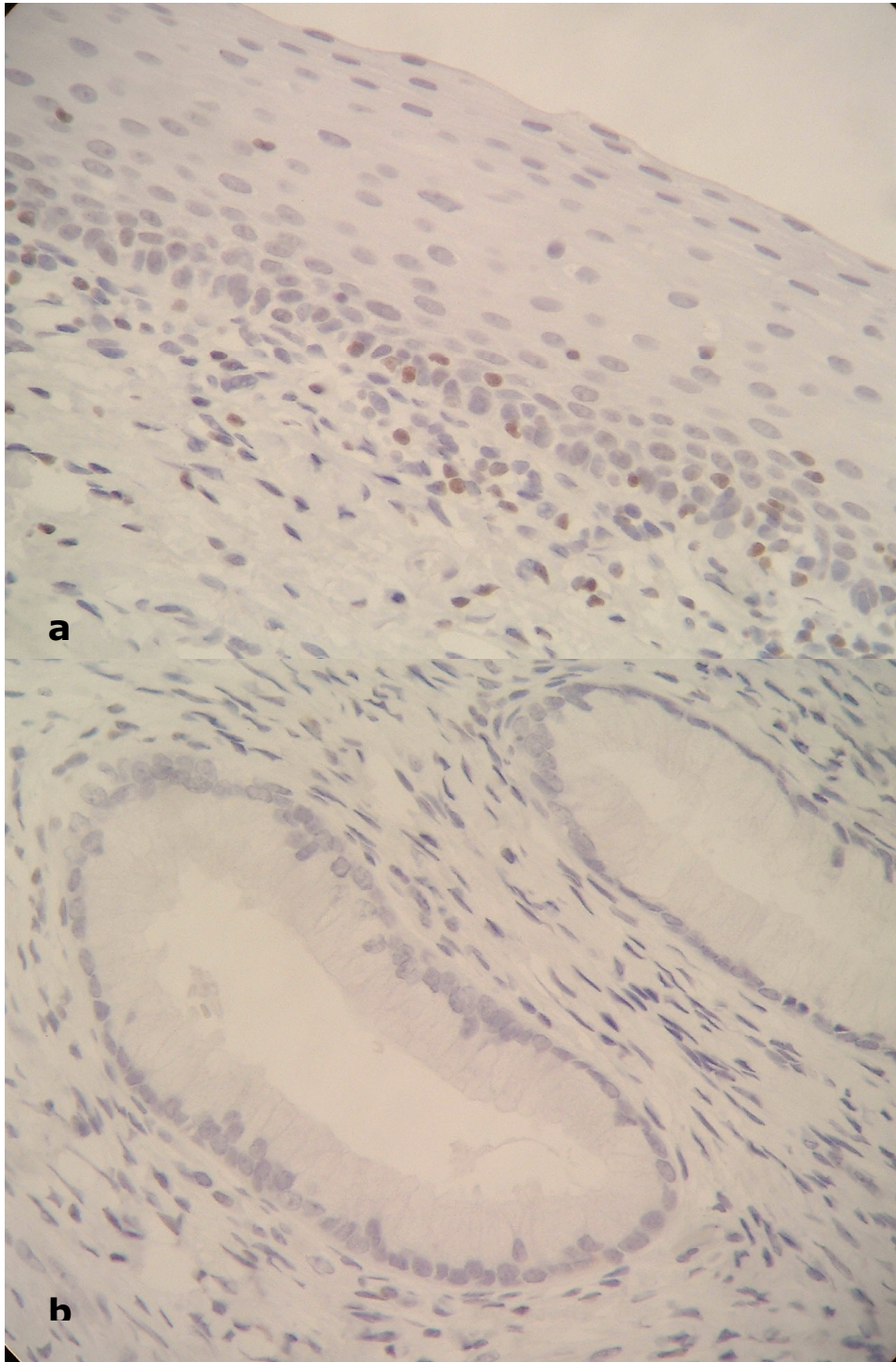


Figura Nº 56. Expresión de la telomerasa en tejido cervical benigno. a. Exocérvix, con algunos núcleos de células proliferativas teñidos, al igual que en el estroma. b. Endocérvix, con tinción nuclear muy esporádica. (Ambos 40x HE).

3.8 Reactividad inmunohistoquímica correspondiente a los diferentes biomarcadores en los carcinomas epidermoides de diferentes grados de maduración.

Biomarcador	BD(%)	MD(%)	I(%)	II(%)	Valor "p"
pRb					
<5% (-)	48.2	70.4	64.3	85.7	0.134
>5% (+)	53.8	29.6	35.7	14.3	
pRb					
Localización					0.464
Negativa	46.2	55.6	57.1	71.4	
Núcleo	38.5	29.6	28.6	14.3	
Citoplasma	7.7	14.8	7.1	14.3	
N/C	7.7	-	7.1	-	
p16INK4a					
<5%	7.7	22.2	14.3	28.6	0.776
5-<25%	53.8	18.5	35.7	28.6	
25-50%	15.4	40.7	21.4	28.6	
>50%	23.1	18.5	28.6	14.3	
p16INK4a					
Localización					0.183
Negativa	7.7	22.2	14.3	28.6	
Núcleo	84.6	74.1	85.7	71.4	
Citoplasma	7.7	3.7	-	-	
p21WAF1					
<5%	53.8	25.9	42.9	57.1	0.226
5-<25%	7.7	40.7	50	28.6	
25-50%	38.5	33.3	7.1	14.3	
>50%	-	-	-	-	
p27CIP1					
<5%	76.9	37	42.9	42.9	0.035
5-<25%	15.4	48.1	21.4	14.3	
>25%	7.7	14.8	35.7	42.9	
Ciclina D1					
<5% (-)	61.5	74.1	69.2	62.5	0.996
>5% (+)	38.5	25.9	30.8	37.5	
Ciclina E					
<5% (-)	83.3	88.5	100	87.5	0.417
>5% (+)	16.7	11.5	-	12.5	
p53					
<5% (-)	84.6	100	100	100	0.053
>5% (+)	15.4	-	-	-	

<5% negativa; 5-<25% +; 25-50% ++; >50% +++.

Biomarcador	BD(%)	MD(%)	I(%)	II(%)	Valor "p"
p53					
<5% (-)	84.6	100	100	100	0.053
>5% (+)	15.4	-	-	-	
MDM-2					
<5%	-	-	-	-	0.022
5-<25%	7.7	-	-	25	
25-50%	30.8	30.8	42.9	62.5	
>50%	61.5	69.2	57.1	12.5	
Bax					
<5% (-)	46.2	42.3	35.7	28.6	0.401
>5% (+)	53.8	57.7	64.3	71.4	
Bcl-2					
<5% (-)	100	100	85.7	100	0.272
>5% (+)	-	-	14.3	-	
Biomarcador					
	BD(%)	MD(%)	I(%)	II(%)	Valor "p"
Ubiquitina					
<5%	-	-	7.1	-	0.879
5-50%	23.1	38.5	28.6	12.5	
>50%	76.9	61.5	64.3	87.5	
CK					
<5%	-	3.8	7.1	-	0.001
5-<25%	15.4	38.5	57.1	87.5	
>25%	84.6	57.7	35.7	12.5	
CEA					
<5%	15.4	7.7	21.4	12.5	0.403
5-<25%	-	15.4	7.1	25	
25-50%	46.2	42.3	50	25	
>50%	38.5	34.6	21.4	37.5	
Telomerasa					
<5% (-)	53.8	44.4	53.8	37.5	0.667
>5% (+)	46.2	55.6	46.2	62.5	

Biomarcador	BD(%)	MD(%)	I(%)	II(%)	Valor "p"
Cadherina-E					
<5%	23.1	7.7	21.4	75	0.006
5-<25%	15.4	15.4	50	-	
>25-50%	30.8	50	14.3	12.5	
>50%	30.8	26.9	14.3	12.5	
Cadherina-E Localización					
Negativa	23.1	7.7	21.4	75	0.004
Membrana	-	11.5	14.3	-	
Citoplasma	7.7	15.4	28.6	-	
M/C	69.2	65.4	35.7	25	
CD44s					
<5%	-	-	-	14.3	0.330
5-50%	53.8	73.1	78.6	42.9	
>50%	46.2	26.9	21.4	42.9	
CD44s Localización					
Negativa	-	-	-	14.3	0.070
Membrana	15.4	-	-	14.3	
Citoplasma	30.8	19.2	57.1	42.9	
M/C	53.8	80.8	42.9	28.6	
CD44v3					
<5%	-	-	-	25	0.008
5-50%	46.2	66.7	71.4	62.5	
>50%	53.8	33.3	28.6	12.5	
CD44v3 Localización					
Negativa	-	-	-	25	0.063
Citoplasma	53.8	48.1	42.9	50	
M/C	46.2	51.9	57.1	25	

M/C= membrana/citoplasma

Biomarcador	BD(%)	MD(%)	I(%)	II(%)	Valor "p"
Ki-67					
<5%	15.4	25.9	21.4	28.6	0.781
5-<25%	38.5	25.9	14.3	28.6	
25-50%	7.7	37	50	14.3	
>50%	38.5	11.1	14.3	28.6	

<5% baja; 5-<25% moderada; 25-50% alta; >50% muy alta.

3.9 Reactividad inmunohistoquímica correspondiente a los diferentes biomarcadores en los subtipos histológicos de adenocarcinoma cervical.

Biomarcador	Endocervical(%)	Mucinoso(%)	Endometriode(%)	Papilar(%)	Villoglandular(%)	Valor "p"
pRb						
<5% (-)	75	100	80	100	100	0.358
>5% (+)	25	-	20	-	-	
pRb Localización						
Negativa	37.5	100	80	100	33.3	0.936
Núcleo	25	-	20	-	-	
Citoplasma	37.5	-	-	-	66.7	
p16INK4a						
<5%	25	-	-	100	50	0.861
5-<25%	25	-	25	-	-	
25-50%	-	100	25	-	50	
>50%	50	-	50	-	-	
p16INK4a Localización						
Negativa	25	-	-	100	50	0.950
Núcleo	75	100	100	-	50	
p21WAF1						
<5%	75	100	60	100	66.7	0.605
5-<25%	12.5	-	20	-	-	
25-50%	12.5	-	20	-	33.3	
>50%	-	-	-	-	-	
p27CIP1						
<5%	37.5	-	60	50	50	0.821
5-<25%	50	100	20	-	-	
>25%	12.5	-	20	50	50	
Ciclina D1						
<5% (-)	50	100	50	100	100	0.240
>5% (+)	50	-	50	-	-	
Ciclina E						
<5% (-)	100	100	100	100	100	-
>5% (+)	-	-	-	-	-	
p53						
<5% (-)	87.5	100	100	100	100	0.393
>5% (+)	12.5	-	-	-	-	

<5% negativa; 5-<25% +; 25-50% ++; >50% +++.

Biomarcador	Endocervical(%)	Mucinoso(%)	Endometrioide(%)	Papilar(%)	Villoglandular(%)	Valor "p"
p53						
<5% (-)	87.5	100	100	100	100	0.393
>5% (+)	12.5	-	-	-	-	
MDM-2						
<5%	-	-	-	-	-	0.523
5-<25%	12.5	-	-	-	33.3	
25-50%	50	-	25	-	-	
>50%	37.5	100	75	100	66.7	
Bax						
<5% (-)	-	-	-	-	50	0.043
>5% (+)	100	100	100	100	50	
Bcl-2						
<5% (-)	87.5	100	100	100	100	0.346
>5% (+)	12.5	-	-	-	-	

Biomarcador	Endocervical(%)	Mucinoso(%)	Endometrioide(%)	Papilar(%)	Villoglandular(%)	Valor "p"
Ubiquitina						
25-50%	25	-	20	-	66.7	0.329
>50%	75	100	80	100	33.7	
CK						
5-<25%	75	-	40	-	100	0.913
>25%	25	100	60	100	-	
CEA						
5-<25%	12.5	100	50	-	50	0.371
25-50%	50	-	-	-	-	
>50%	37.5	-	50	100	50	
Telomerasa						
<5% (-)	71.4	-	50	50	-	0.028
>5% (+)	28.6	100	50	50	100	

Biomarcador	Endocervical(%)	Mucinoso(%)	Endometrioides(%)	Papilar(%)	Villoglandular(%)	Valor "p"
Cadherina-E						
<5%	37.5	-	-	50	-	0.766
5-<25%	37.5	100	100	-	100	
>25%	25	-	-	50	-	
Cadherina-E Localización						0.064
Negativa	37.5	-	-	50	-	
Citoplasma	62.5	100	100	-	-	
M/C	-	-	-	50	100	
CD44s						
<5%	25	100	25	50	50	0.606
5-50%	75	-	50	50	50	
>50%	-	-	25	-	-	
CD44s Localización						0.479
Negativa	25	100	25	50	50	
Citoplasma	50	-	-	50	50	
M/C	25	-	75	-	-	
CD44v3						
5-50%	25	100	60	50	100	0.012
>50%	75	-	40	50	-	
CD44v3 Localización						0.688
Negativa	-	-	-	-	-	
Citoplasma	87.5	100	80	100	100	
M/C	12.5	-	20	-	-	

M/C= membrana/citoplasma

Biomarcador	Endocervical(%)	Mucinoso(%)	Endometrioides(%)	Papilar(%)	Villoglandular(%)	Valor "p"
Ki-67						
<5%	25	-	20	50	33.3	0.867
5-<25%	25	-	40	50	33.3	
25-50%	37.5	100	20	-	33.3	
>50%	12.5	-	20	-	-	

<5% baja; 5-<25% moderada; 25-50% alta; >50% muy alta.

3.10.- ANÁLISIS DE CORRELACIÓN.

Se realizó una correlación de *Chi-cuadrado de Pearson* entre los diferentes biomarcadores para determinar las posibles asociaciones en relación a la inmunoreactividad. Para este análisis y en todos los biomarcadores, se estableció un punto de corte de positividad superior al 5% de células teñidas. Los resultados del contraste estadístico se resumen en la siguiente tabla, en la que sólo se muestran las correlaciones estadísticamente significativas:

Tabla Nº 62. Correlación entre los biomarcadores evaluados en este estudio.

Biomarcadores	Valor de "p"
pRb / CEA	0.050
p16 / Ki-67	0.003
p16 / p21	0.046
p21 / Ki-67	0.023
p27 / Ki-67	0.032
p27 / p16	0.027
p27 / p21	0.003
p27 / telomerasa	0.037
MDM-2 / p16	0.013
Bax / p27	0.015
Bcl-2 / p27	0.039
CK / p27	0.022
CK / Bax	0.007
CK / Bcl-2	0.009
CEA / p53	0.015
Telomerasa / Ki-67	0.012
Telomerasa / p16	0.004
Telomerasa / MDM-2	0.002
Telomerasa / CD44v3	0.025
Cadherina-E / MDM-2	0.000
Cadherina-E / CD44v3	0.013
CD44s / CD44v3	0.000
CD44v3 / p16	0.007
CD44v3 / CK	0.009
Ubicuitina / Ki-67	0.007
Ubicuitina / localización cadherina-E	0.026
Ubicuitina / CD44v3	0.012
Cadherina-E / CD44s	0.000
CD44s / pRb	0.009
p21 / ciclina D1	0.000
Ciclina D1 / pRb	0.027
Ciclina D1 / CEA	0.000
p53 / ciclina D1	0.011
Cadherina-E / ciclina D1	0.001

El análisis de correlación realizado entre los biomarcadores con evaluación inmunohistoquímica arrojó los siguientes hallazgos: observamos que existe correlación entre un buen número de biomarcadores que en general nos permiten establecer las alteraciones moleculares que pueden estar involucradas y dar origen al desarrollo de la neoplasia cervical invasora.

El elevado índice de proliferación celular de esta serie de tumores cervicales, representado por un incremento en los niveles de expresión del antígeno **Ki-67**, mostró correlación con todos los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina: p16 ($p < 0.003$), p21 ($p = 0.023$), p27 ($p = 0.032$), los cuales se encontraban incrementados, así como con la marcada degradación proteica representada por la sobreexpresión de la ubiquitina ($p < 0.007$) y la supervivencia celular prolongada por la telomerasa activada ($p = 0.012$). Estas correlaciones se muestran en el gráfico N° 6.

Destaca la correlación existente entre **las proteínas supresoras de tumor pRb y p53** con la inmunoreactividad reducida de la ciclina D1 ($p = 0.027$) y la sobreexpresión de CEA ($p = 0.050$). La pRb disminuida se correlacionó, además, con la sobreexpresión de la proteína CD44s ($p < 0.009$). Con respecto al CEA la correlación es inversa: a medida que las proteínas supresoras de tumor disminuyen este aumenta. Con la ciclina D1, la correlación es lineal pero negativa: al disminuir D1 también disminuyen la p53 ($p = 0.011$) y la pRB ($p = 0.027$). Estas correlaciones se muestran en el gráfico N° 7.

Encontramos correlación existente entre los niveles incrementados de los diferentes inhibidores de CDK dependientes de ciclina: **p16, p21 y p27**, fundamentalmente y de manera interesante entre ellos mismos: p16/p21 ($p = 0.046$); p16/p27 ($p = 0.027$); p21/p27 ($p = 0.003$) o en el caso específico de la p27 con la sobreexpresión de Bax ($p = 0.015$), y la reducción de Bcl-2 indicando una correlación inversa ($p = 0.039$). La p16 incrementada también se correlaciona con los niveles elevados de MDM-2 ($p = 0.013$). Estas correlaciones se muestran en el gráfico N° 8.

La reducida inmunoexpresión de la **ciclina D1** se correlacionó con la sobreexpresión de p21 ($p < 0.000$), CEA ($p < 0.000$) y de la cadherina-E ($p < 0.001$), así como con la ya mencionada presencia de niveles disminuidos de p53 y pRb. Estas correlaciones se muestran en el gráfico N° 9.

Las **moléculas de adhesión celular** muestran una excelente correlación entre ellas mismas y con otros biomarcadores. La CD44v3 está bastante asociada con la sobreexpresión de la cadherina-E ($p = 0.013$) así como con p16 ($p < 0.007$), ubiquitina ($p = 0.012$), telomerasa ($p = 0.025$) y CK ($p = 0.009$). CD44s reveló asociación con la cadherina-E ($p < 0.000$), con CD44v3 ($p < 0.000$) y con la inmunoreactividad disminuida de la proteína pRb ($p < 0.009$). También hubo correlación entre la cadherina-E y los niveles elevados de MDM-2 ($p < 0.000$). Estas correlaciones se muestran en el gráfico N° 10.

Una correlación también fue observada entre la marcada degradación de proteínas reflejada en la sobreexpresión de la **ubiquitina** específicamente con la localización citoplasmática de la cadherina-E ($p = 0.026$), además de las ya mencionadas con otras proteínas celulares (ver gráfico N° 10).

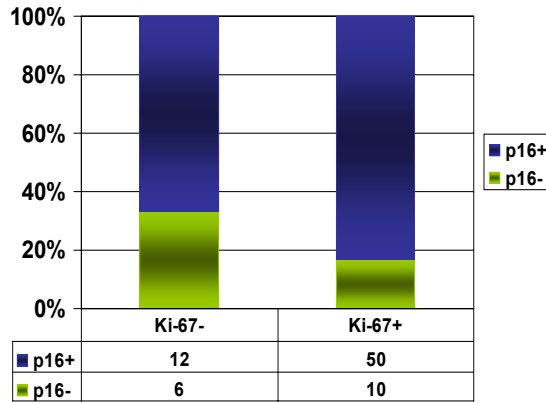
Las **CK** incrementadas se correlacionaron con la sobreexpresión de p27 ($p = 0.022$), Bax ($p = 0.007$) y con la reducción de Bcl-2 ($p = 0.009$). Estas correlaciones se muestran en el gráfico N° 11.

Finalmente, la sobreexpresión de la **telomerasa** se correlacionó con la sobreexpresión de p16 ($p = 0.004$), p27 ($p = 0.037$) y con MDM-2 ($p = 0.002$), es decir, con miembros reguladores del ciclo celular, así como con la proteína de adhesión celular CD44v3 ($p = 0.025\%$), como se aprecia en los gráficos N° 10 y N° 12.

A continuación, se muestran las gráficas correspondientes a las correlaciones de los diferentes biomarcadores con reactividad inmunohistoquímica estadísticamente significativas y que fueron detalladas con anterioridad.

3.10.1. Representación gráfica de la correlación entre los biomarcadores evaluados en este estudio.

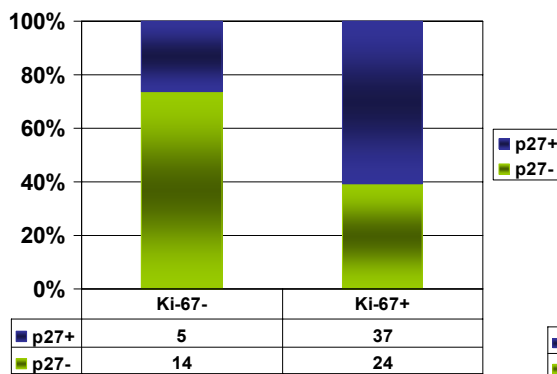
Gráfico N° 6. Correlación de la inmunexpresión de Ki-67 con otros biomarcadores.



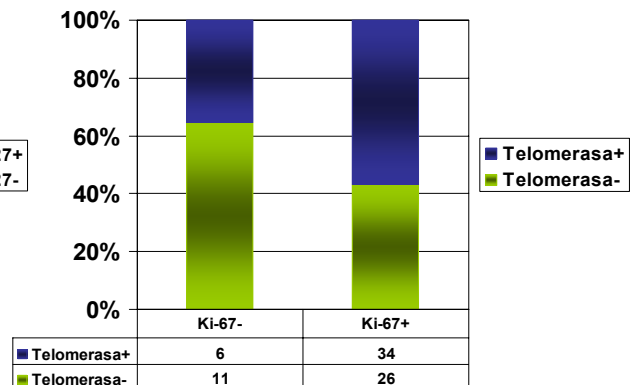
$p=0.003$



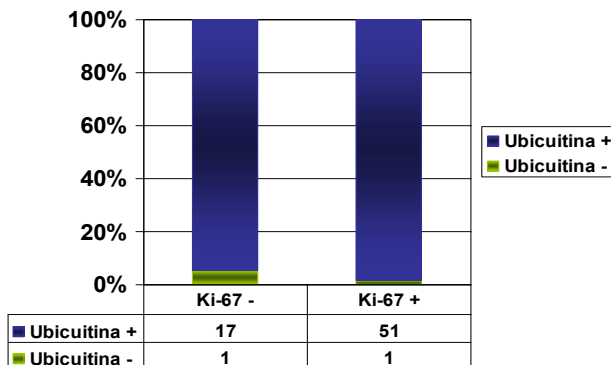
$p=0.023$



$p=0.032$



$p=0.012$



$p=0.007$

Gráfico N° 7. Correlación entre la inmunoexpresión de los productos de los genes supresores de tumor, pRb/p53, con otros biomarcadores.

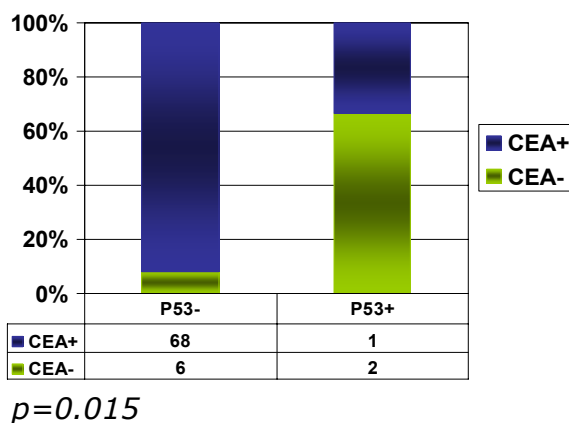
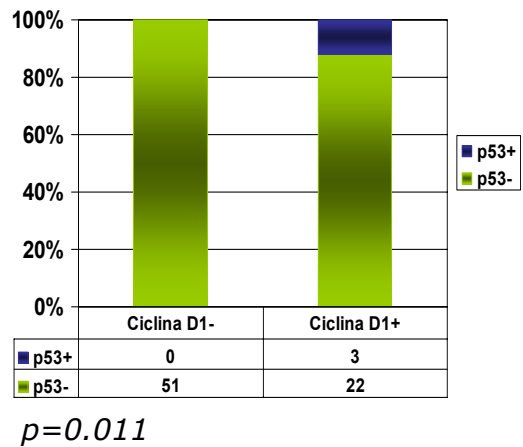
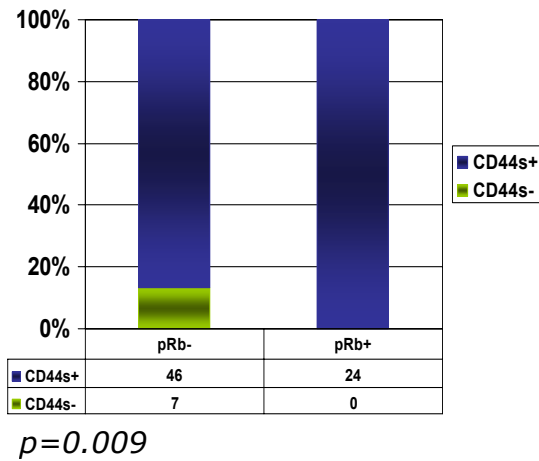
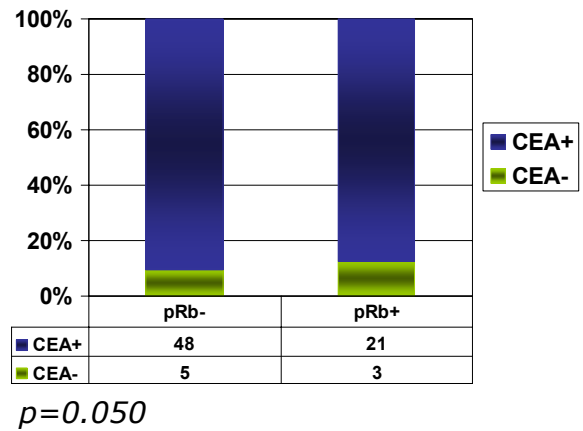
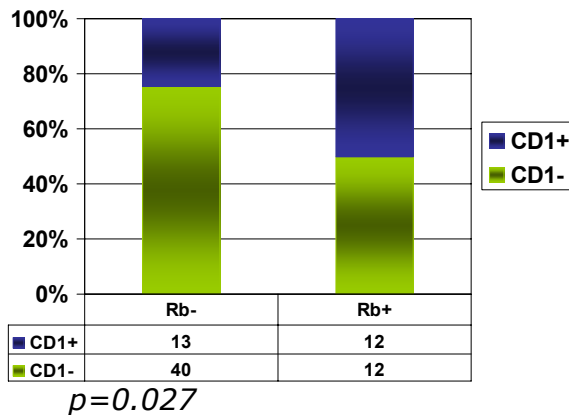
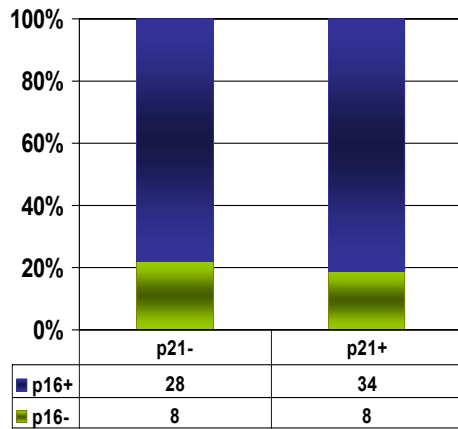
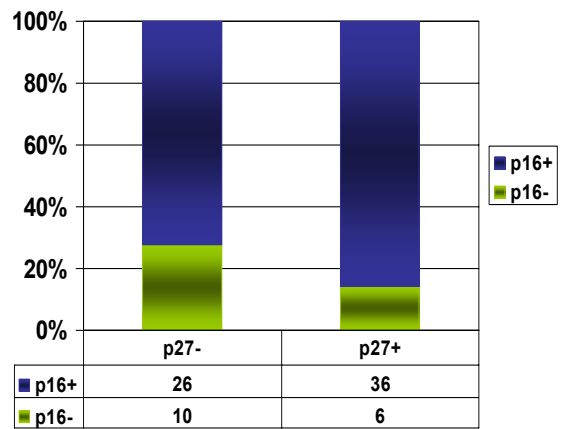


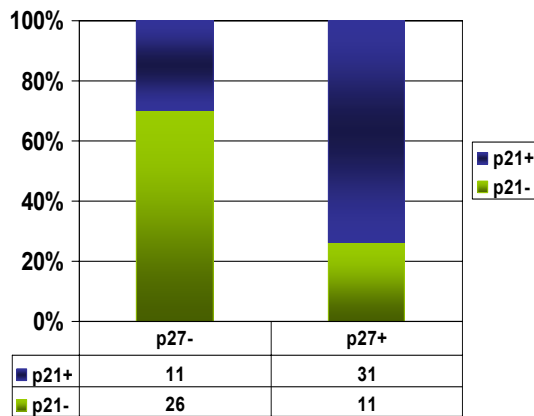
Gráfico N° 8. Correlación entre la inmunexpresión de los inhibidores de kinasa dependiente de ciclinas (CDKI) y otros biomarcadores.



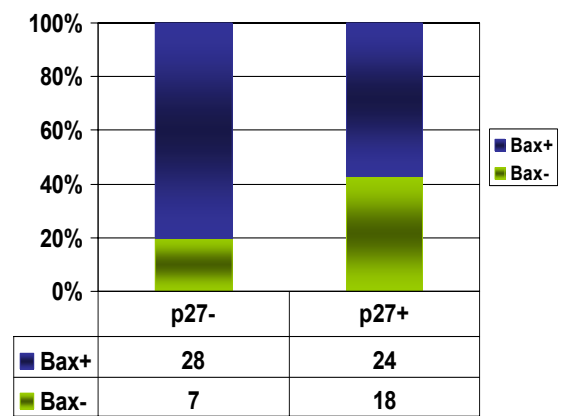
$p=0.046$



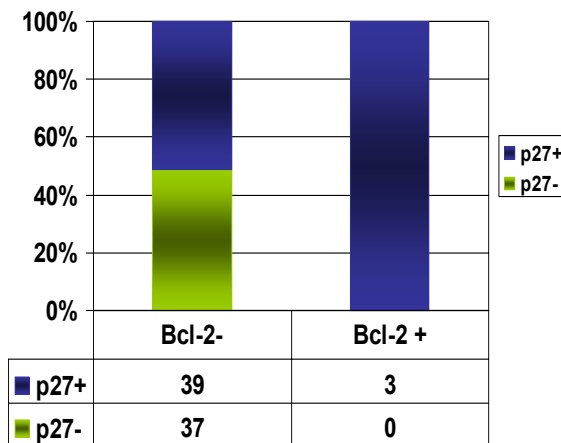
$p=0.027$



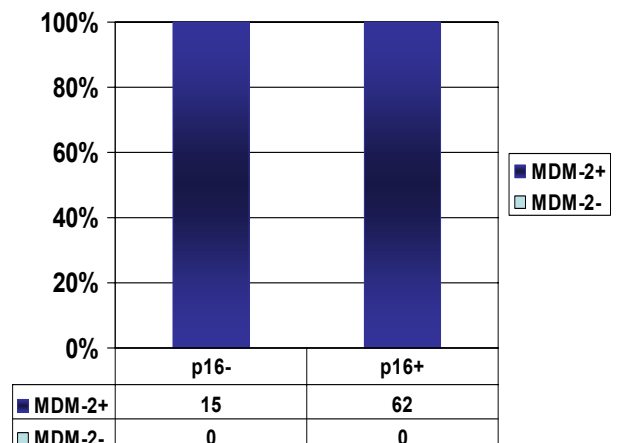
$p=0.003$



$p=0.015$

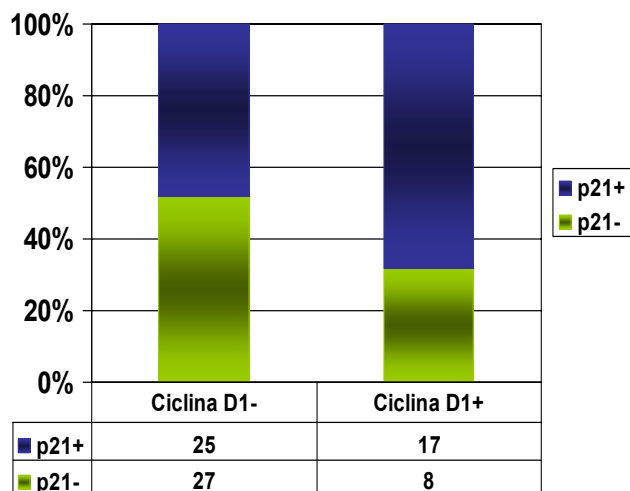


$p=0.039$

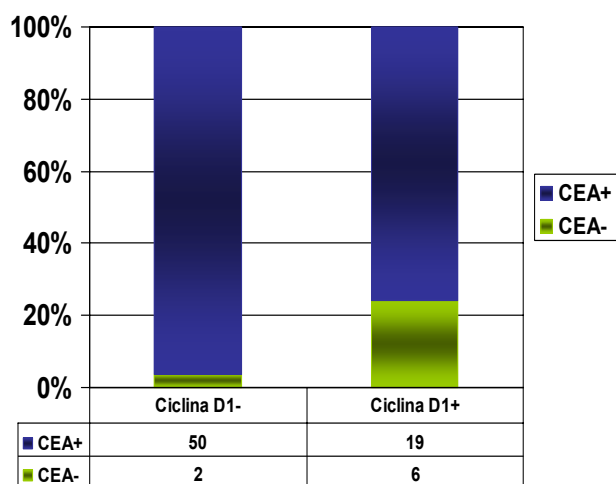


$p=0.013$

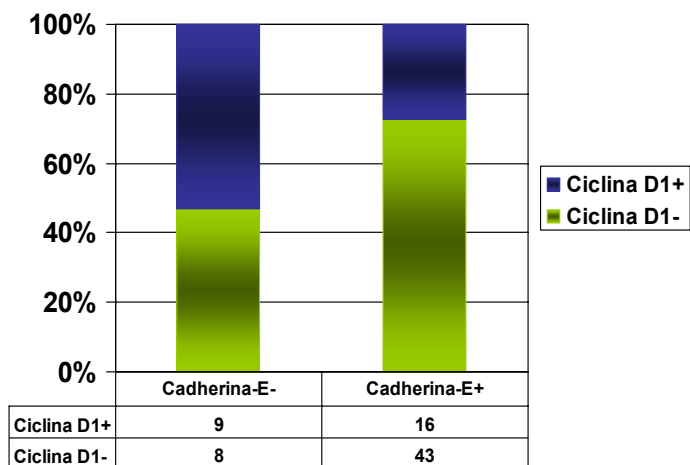
Gráfico N° 9. Correlación entre la inmunoexpresión de la Ciclina D1 y otros biomarcadores.



$p < 0.000$

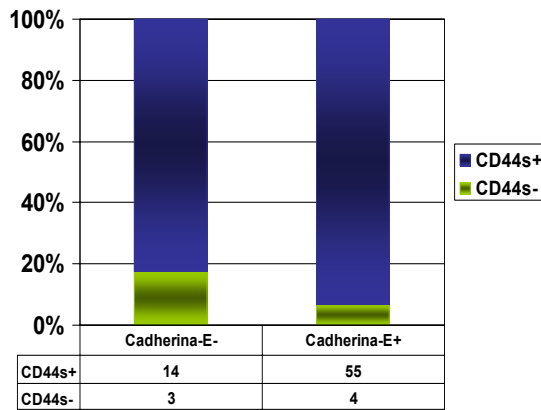


$p < 0.000$

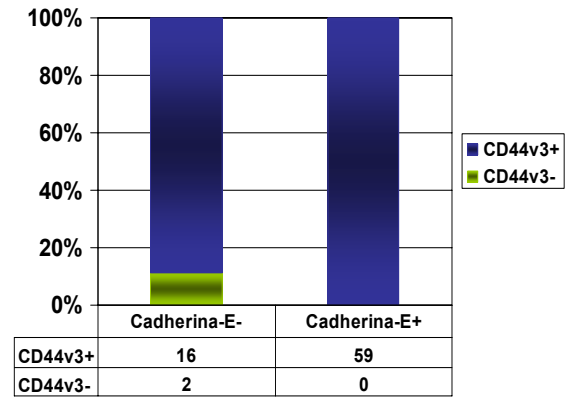


$P = 0.001$

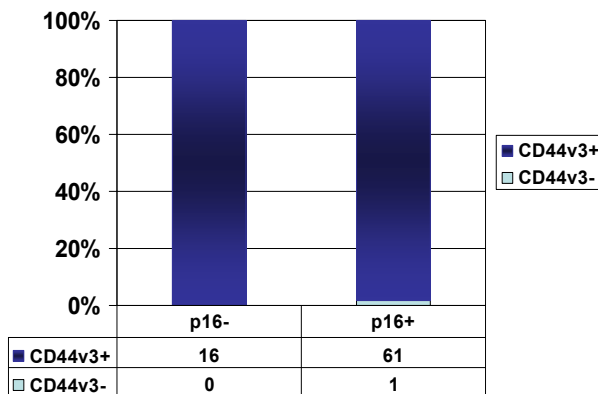
Gráfico N° 10. Correlación entre la inmunoexpresión de las moléculas de adhesión celular y otros biomarcadores.



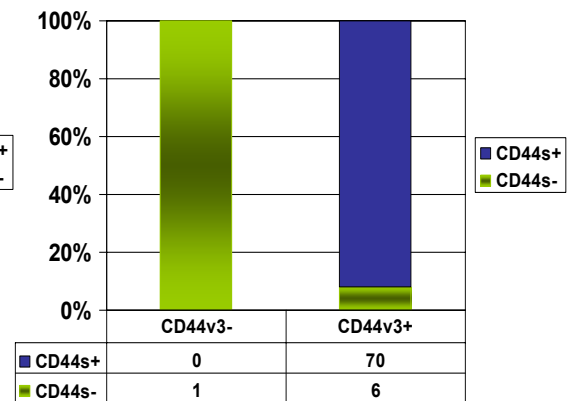
$p < 0.000$



$p = 0.013$

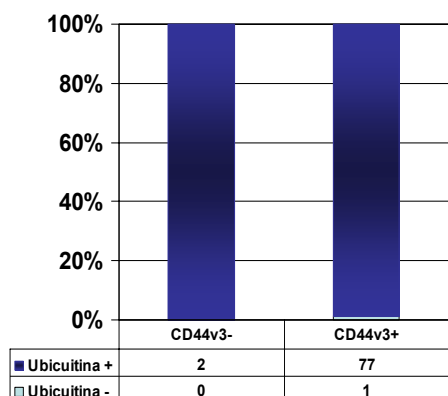


$p = 0.007$

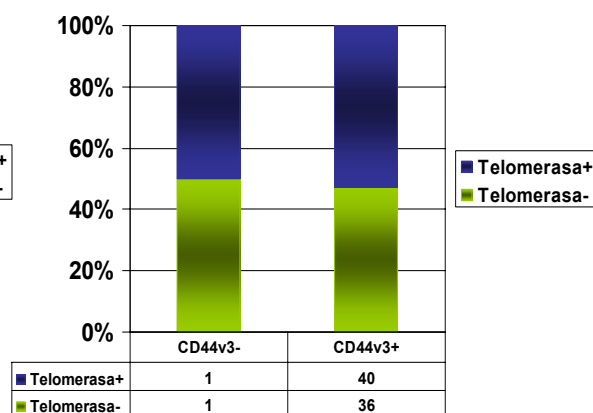


$p < 0.000$

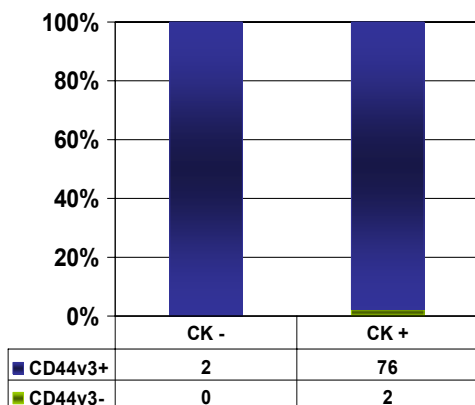
Gráfico Nº 10. Correlación entre la inmoexpresión de las moléculas de adhesión celular y otros biomarcadores. *Continuación.*



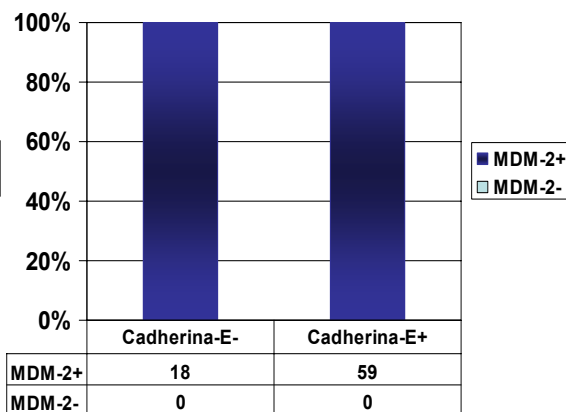
$p=0.012$



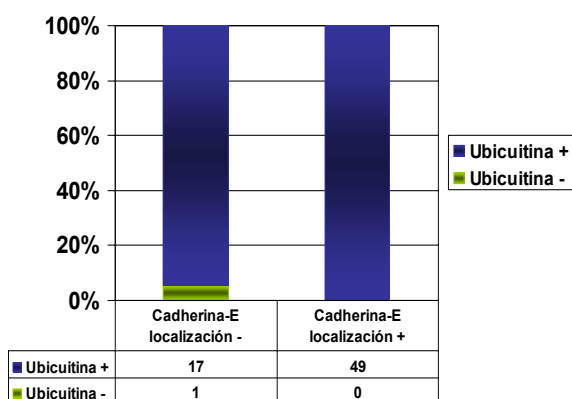
$p=0.025$



$p=0.009$

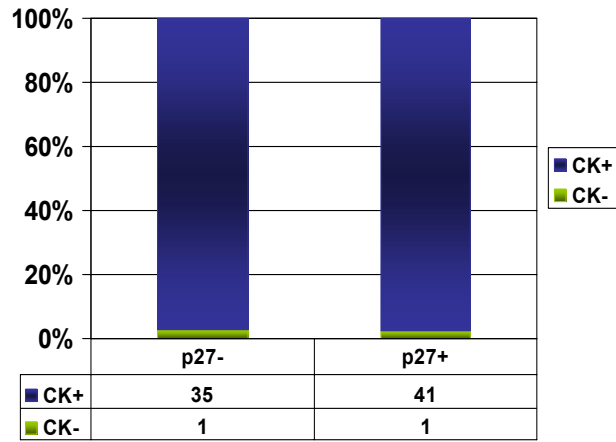


$p<0.000$

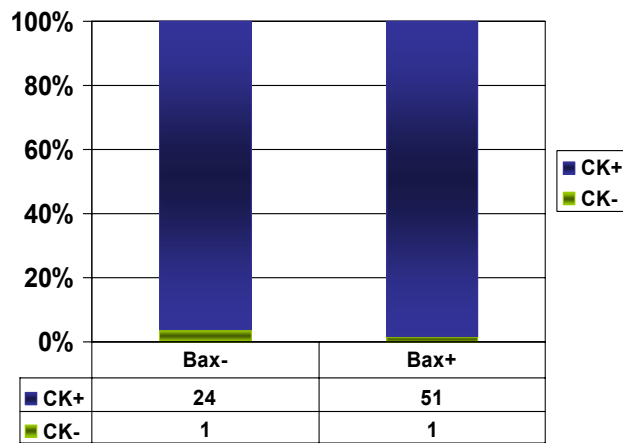


$p=0.026$

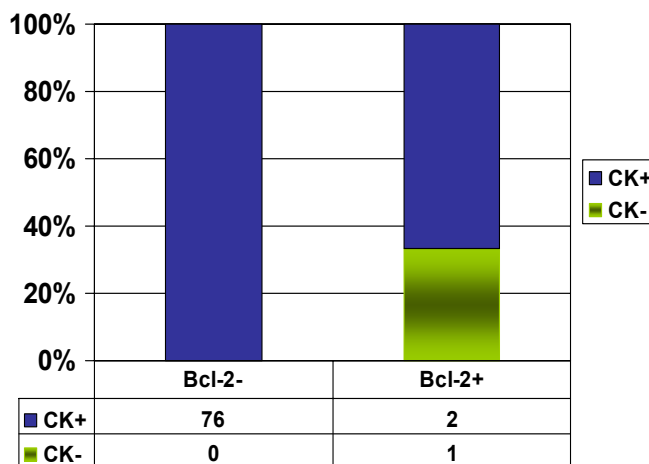
Gráfico N° 11. Correlación entre la inmunexpresión las citoqueratinas (CK) y otros biomarcadores.



$p=0.022$

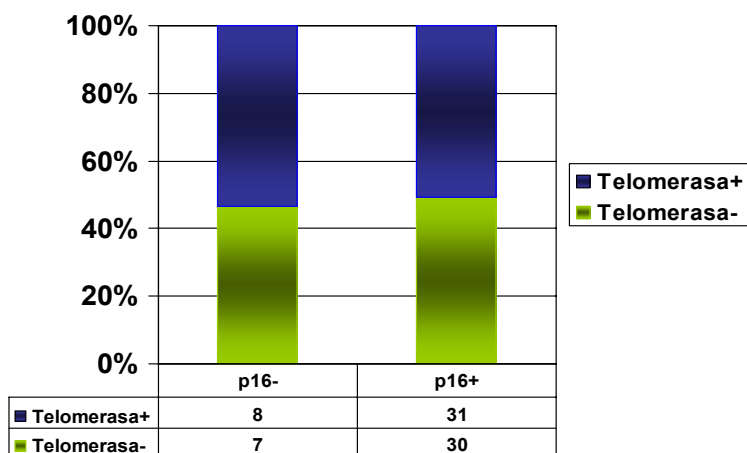


$p=0.007$

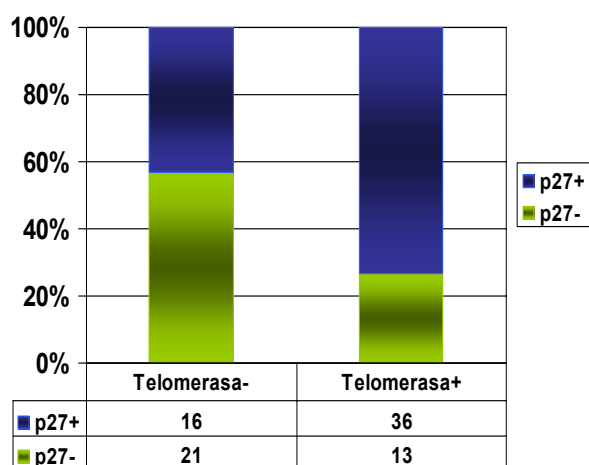


$p=0.009$

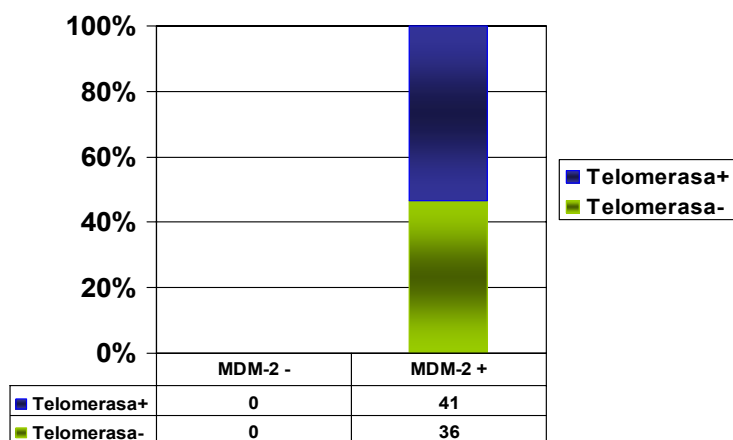
Gráfico N° 12. Correlación entre la inmunoexpresión de la telomerasa y otros biomarcadores.



$p=0.004$



$p=0.037$



$p=0.002$

4. DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE ADN-HPV.

Sólo los casos de cáncer de cuello uterino incluidos en este estudio fueron sometidos a evaluación molecular para la detección y genotipificación del ADN-HPV. De los 81 tumores de cuello uterino, en 3(3.7%) no se logró amplificar el gen *INF* por lo que fueron excluidos del proceso de genotipificación; a los 78(96.3%) casos restantes, se le realizó *PCR-SPF10* logrando amplificarse las secuencias de ADN-HPV presentes en estas muestras y, por lo tanto, considerándose HPV positivas.

De los 78 carcinomas de cuello uterino, 19(24.4%) eran adenocarcinomas y 59(75.6%) eran carcinomas epidermoides.

46/78(59%) de los carcinomas cervicales ADN-HPV positivos revelaron infección única y 32/78(41%) estaban infectados por dos o más tipos diferentes de HPV.

Los 46 casos con infección por un solo tipo de HPV se reparten así: 43/78(55.13%) con HPV16 (33 carcinomas epidermoides y 10 adenocarcinomas cervicales); 1/78(1.28%) con HPV18 e igual valor para 1 caso con HPV58 y 1 caso con HPV X.

De acuerdo al tipo histológico, presentaban infección única 35/59(59.3%) carcinomas epidermoides y 11/19(57.9%) adenocarcinomas cervicales, e infección múltiple 24/59(40.7%) y 8/19(42.1%), respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0.914$).

La distribución de los tipos específicos entre los tipos histológicos se indica a continuación: en los carcinomas epidermoides (35/59), el HPV16 infectó a 33/59(55.9%), el HPV58 se encontró en 1/59(1.7%) y 1 caso con HPV X (1.7%). En los adenocarcinomas cervicales, predominó el HPV16 detectado en 10/19(52.6%) seguido del HPV18 hallado en 1/19(5.3%).

Todos estos hallazgos se especifican en la siguiente tabla resumen:

Tabla N° 63. Resumen de los hallazgos relacionados con la detección y genotipificación de ADN-HPV en la serie de cáncer de cuello uterino de este estudio.

Casos de cáncer cervical ADN-HPV positivos:

Cáncer cervical	Infección única	Infección múltiple
78	46(59%)	32(41%)

Frecuencia de los tipos específicos de HPV (infección única), n=46/78:

Tipo viral	Nº(%)
HPV16	43(55.13%)
HPV18	1(1.28%)
HPV58	1(1.28%)
HPV X	1(1.28%)

Distribución de la infección única y múltiple de acuerdo al tipo histológico n=78:

Tipo histológico	Infección única	Infección múltiple
Carcinoma epidermoide	35/59(59.3%)	24/59(40.7%)
Adenocarcinoma cervical	11/19(57.9%)	8/19(42.1%)
Total	46	32

p=0.914

Frecuencia de los tipos específicos de HPV en los tipos histológicos.

Tipo histológico	HPV16	HPV18	HPV58	HPV X
Carcinoma epidermoide n=35/59	33(55.9%)	-	1(1.7%)	1(1.7%)
Adenocarcinoma cervical n=11/19	10(52.6%)	1(5.3%)	-	-
Total	43	1	1	1

4.1 Infección por HPV: única y múltiple.

El 59% de los carcinomas de cuello uterino (46/78) presentó infección por un tipo específico de HPV y en el resto de los casos que corresponden al 41% (32/78) encontramos secuencias de ADN de 2 o más genotipos de HPV/infección múltiple, en variadas combinaciones. Esta frecuencia se muestra en el siguiente gráfico

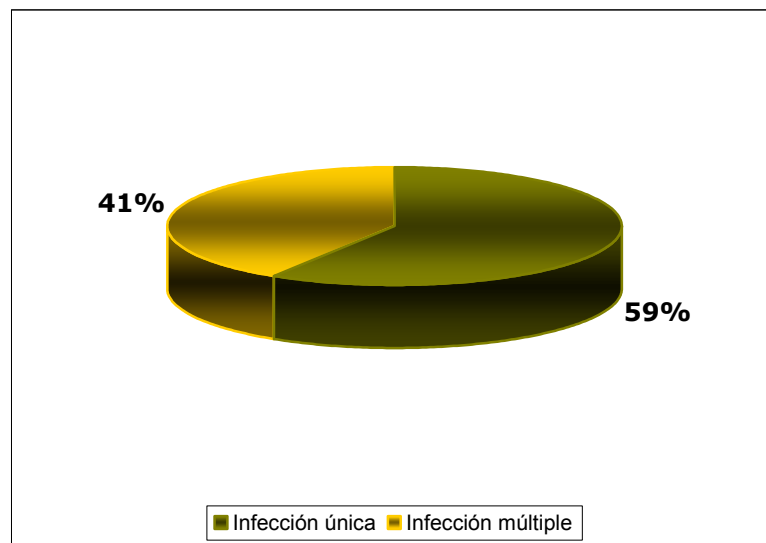


Gráfico N° 13. Frecuencia de la infección por un solo tipo de HPV y por 2 o más tipos virales, n=78.

En la distribución de los casos de infección por HPV única y múltiple en relación a los diferentes intervalos de edad observamos que las pacientes cuya edad estaba por debajo de los 35 años tenían infección única (21.2%), sin presentarse ningún caso de infección múltiple. La mayor proporción de infección con un tipo viral específico se presentó entre los 36 y 45 años (27.3%), seguido de las pacientes mayores de 65 años (24.2%). A su vez, la proporción más alta de casos de infección múltiple la encontramos en el intervalo de edad comprendido entre los 36 y 55 años (68.2%), justo el de mayor prevalencia de cáncer cervical. El siguiente intervalo de edad fue el de las pacientes mayores de 65 años (18.2%). Estas observaciones se ilustran en el gráfico N° 14. No encontramos ninguna diferencia importante ($p=0.419$).

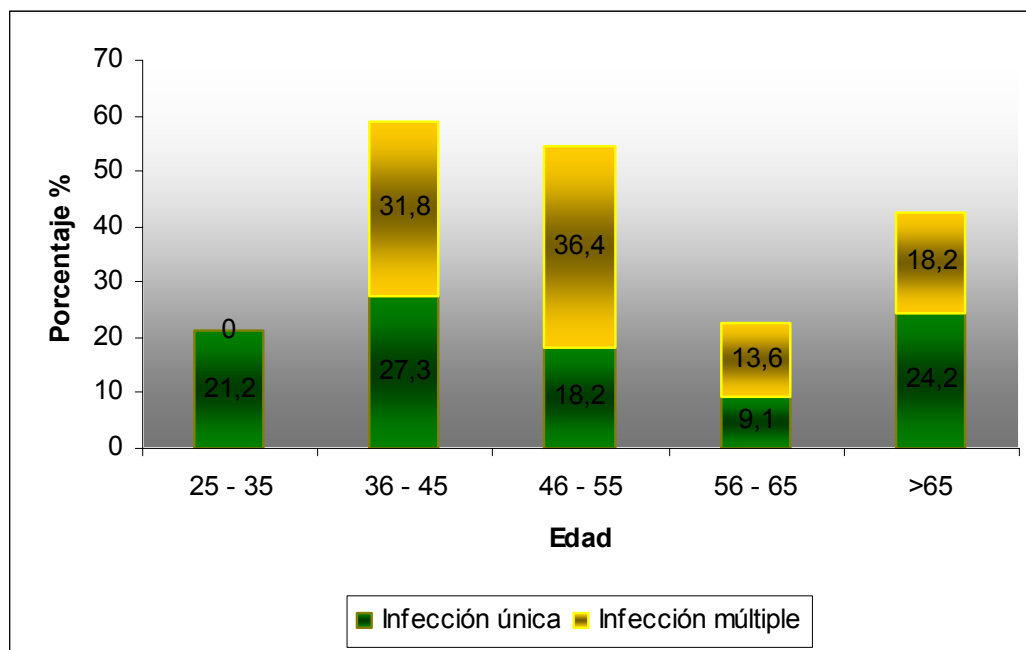


Gráfico N° 14. Distribución porcentual de los casos de infección única y múltiple de acuerdo a la edad.

La distribución del número de infecciones por HPV únicas y múltiples de acuerdo al tipo histológico de cáncer de cuello uterino reveló que tanto una como otra se presentan sin diferencias importantes entre los tipos de cáncer cervical ($p=0.914$). Sin embargo, una mayor proporción de casos de infección múltiple (24/32) se encuentra entre los carcinomas epidermoides (ver tabla N° 63).

En la figura N° 57, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en una de las tandas de genotipificación de ADN-HPV en esta serie de casos de cáncer de cuello uterino (A) y varias tiras-*LiPA* seleccionadas para visualizar la ubicación de la hibridación con infección por HPV, única y múltiple.

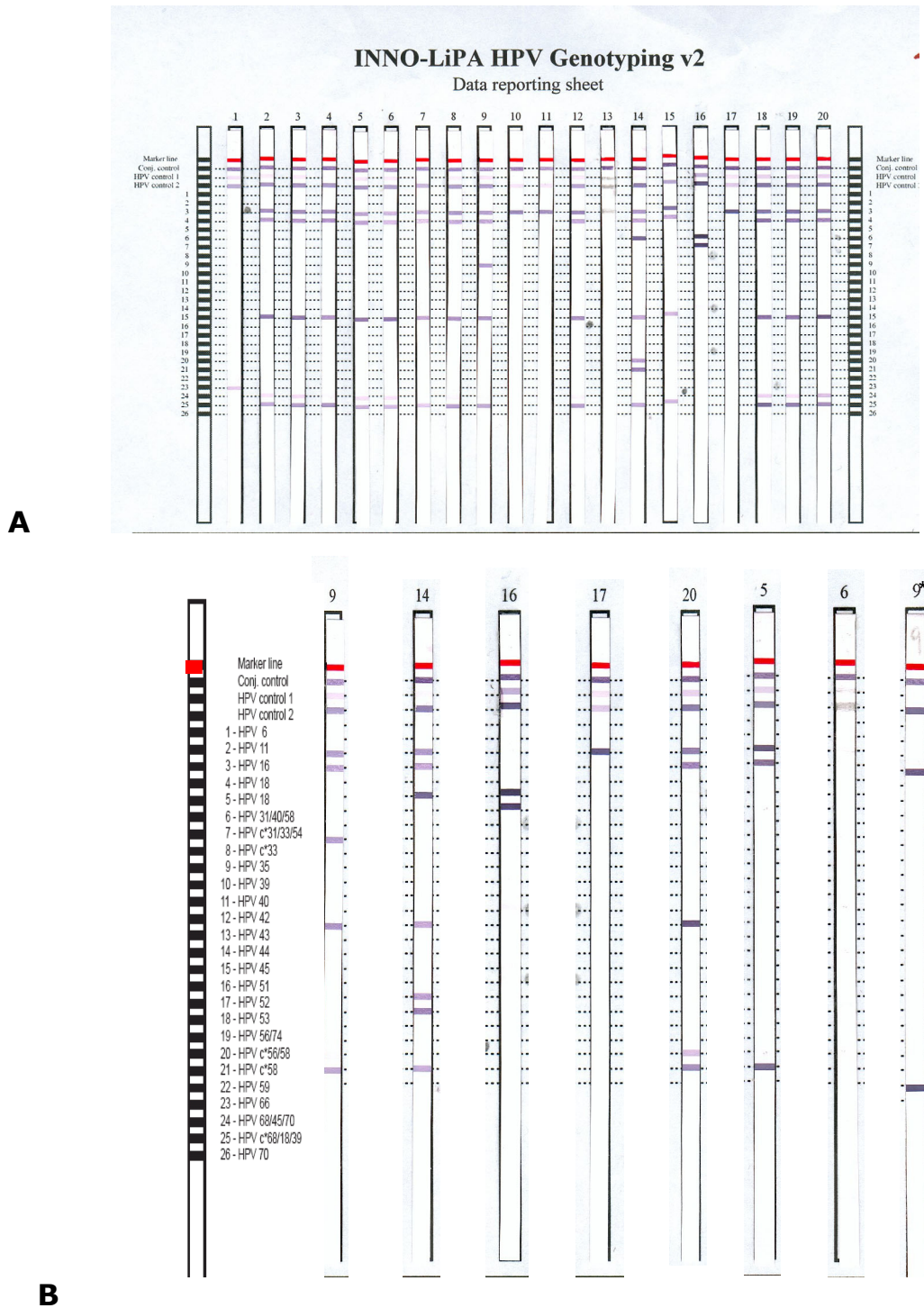


Figura N° 57. A. Genotipificación de ADN-HPV en las muestras de cáncer de cuello uterino evaluadas mediante el método de hibridación reversa en tira (*LiPA*). B. Amplificación de una selección de tiras para visualizar la ubicación de la hibridación del ADN-HPV: tira 9 HPV16/18/35/45, tira 14 HPV16/18/45/58, tira 16 HPV31/33/44, tira 17 HPV16, tira 20 HPV16/18/31/45, tira 5 HPV16/18, tira 6 HPV X, tira 9* HPV18.

Al realizar la interpretación de las tiras *LiPA* utilizadas para la genotipificación de los papilomavirus humanos presentes en los casos de cáncer de cuello uterino, consideramos positivo todo vestigio de coloración sobre las diferentes líneas (oligonucleótidos) en la tira y observamos los siguientes detalles:

1. la línea de marcaje para el conjugado fue efectivamente positiva en todos los casos.
2. la línea correspondiente al control 1 de HPV siempre fue menos intensa (rosa pálido) que la línea del control 2 de HPV, cuya intensidad varió entre negro y gris oscuro.
3. cuando la línea de control 2 de HPV era de color negro (púrpura muy intenso), las líneas correspondientes al o los HPV presentes en las muestras también eran muy oscuras.
4. cuando la línea de control 2 de HPV era clara, también las líneas de los genotipos virales presentes en las muestras eran bastante claras e inclusive podían variar de tonalidad si estaban presentes a la vez varios tipos virales (infección múltiple). Al revisar la electroforesis de los productos amplificados con el cebador *SPF10* de estos casos, se encontró que la banda también era más clara. Este hallazgo podría estar relacionado con la cantidad de secuencia viral presente en las muestras (carga viral).
5. los casos con infección múltiple que involucran los genotipos virales HPV 16/18/45 (figura N° 58), son un ejemplo de la variedad de tonos de la coloración en las tiras hibridadas que, igualmente, podrían estar relacionados con la carga viral de los diferentes genotipos en cada muestra. Así tenemos, que en las tiras 4 y 18 la intensidad de color fue igual para los tres genotipos hallados. Por el contrario, en la tira 6, la línea que identifica al HPV45 fue más intensa que la línea correspondiente al HPV16 y esta, a su vez, más intensa que la línea del HPV18. En cambio, en la tira 14, la línea más intensa fue para el HPV18 y en menor intensidad encontramos los tipos HPV16 seguido del HPV45. Por lo tanto, en presencia de una infección múltiple, la tira *LiPA* reflejó si un tipo viral predominaba (línea oscura con líneas más claras), si los tipos virales estaban en la misma "proporción" (las líneas mostraban más o menos la misma intensidad de color) o si un

tipo predominaba y los otros estaban en la misma "proporción" entre ellos.

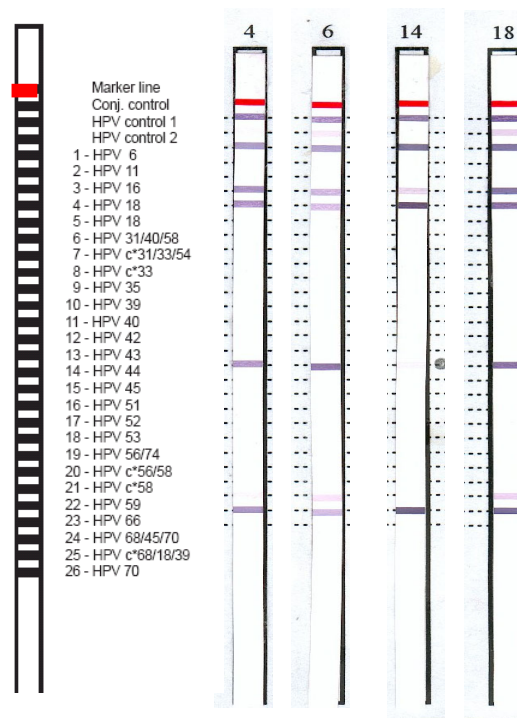


Figura N° 58. Tiras de hibridación reversa (*LiPA*) mostrando infección múltiple por HPV 16/18/45.

- En casos de infección única, como por ejemplo la presentada en la figura N° 57. B tira 17, pudimos ver claramente el tipo viral presente en las diferentes muestras (en la electroforesis de los productos de la *PCR-SPF10*, las bandas eran nítidas). En algunos casos, el tipo viral presente mostraba una línea de hibridación de tonalidad pálida, posiblemente relacionada con una baja carga viral (figura N° 57. B tira 6).

La distribución de los genotipos específicos de HPV identificados en los 46/78 carcinomas cervicales como **infección única** se muestra en la tabla N° 63. El genotipo viral más frecuentemente encontrado fue el **HPV16 (55.13%)**, mientras que los genotipos **HPV18** y **HPV58** se encontraron en igual proporción (**1.28%**). Un caso (1.28%) mostró la presencia de ADN-HPV en la línea de control 1 de HPV en su respectiva tira; sin embargo, no se produjo hibridación con ninguna de las líneas de oligonucleótidos

específicos para los 25 tipos virales, con lo cual fue designado como un HPV desconocido (**HPV X**).

Estos tipos virales se distribuyen de la siguiente manera según el tipo histológico de cáncer cervical: HPV16 en 33 carcinomas epidermoides y 10 adenocarcinomas cervicales; HPV18 en 1 adenocarcinoma papilar, HPV58 en 1 carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado y el HPV desconocido (X) en un carcinoma epidermoide inmaduro.

La **infección múltiple** por HPV se distribuye de acuerdo al tipo histológico de cáncer de cuello uterino de la siguiente forma: en 24 carcinomas epidermoides y 8 adenocarcinomas cervicales, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grados de diferenciación ($p=0.497$), así como entre los subtipos histológicos ($p=0.311$), tal y como se detalla en las tablas N° 64 y 65.

La distribución del número de infecciones por HPV únicas y múltiples en el carcinoma epidermoide de acuerdo al grado de diferenciación tumoral deja ver que tanto una como otra se presentan sin diferencias importantes ($p=0.497$), aunque los carcinomas epidermoides I (69.2%) mostraron infección única con mayor frecuencia, seguidos de los BD y los MD. Los carcinomas epidermoides II (62.5%) presentaron infección múltiple predominantemente, como se muestra a continuación:

Tabla N° 64. Distribución porcentual de la infección por HPV única y múltiple de acuerdo al grado de diferenciación tumoral de los carcinomas epidermoides, n= 59.

Infeción por HPV		
Carcinoma epidermoide (grado de diferenciación)	Única% (N°)	Múltiple % (N°)
BD (13)	61.5 (8)	38.5 (5)
MD (25)	60 (15)	40 (10)
I (13)	69.2 (9)	30.8 (4)
II (8)	37.3 (3)	62.5 (5)

$p=0.497$

La distribución del número de infecciones por HPV únicas y múltiples en los diferentes subtipos histológicos de adenocarcinoma no muestra diferencias significativas ($p=0.311$). Los adenocarcinomas endocervicales constan de una mayor proporción de casos con infección múltiple (62.5%), aunque en los otros adenocarcinomas predominó la infección única, sobre todo en los de tipo papilar y mucinoso, como se aprecia en la siguiente tabla:

Tabla N° 65. Distribución porcentual de la infección por HPV única y múltiple de acuerdo al subtipo histológico de los adenocarcinomas cervicales, $n= 19$.

<i>Infección por HPV</i>		
Adenocarcinoma cervical (subtipos histológicos)	Única % (N°)	Múltiple % (N°)
Endocervical (8)	37.5 (3)	62.5 (5)
Endometriode (5)	60 (3)	40 (2)
Papilar (2)	100 (2)	-
Villoglandular (3)	66.7 (2)	33.3 (1)
Mucinoso (1)	100 (1)	-

$$p=0.311$$

Las combinaciones de HPV conformando las infecciones múltiples se muestran en la tabla N° 66. Destaca la co-infección **HPV16/18/45** que se encuentra en 12/32 casos, seguido de 4 casos con la combinación **HPV 16/18** y 2 casos con HPV **16/18/45/66**; el resto de los casos mostraron variedad en la combinación de distinto tipos virales, tanto de bajo riesgo como de alto riesgo.

En dicha tabla, además notamos lo siguiente:

1. 2 casos señalados con * no presentaron co-infección con ninguno de los 2 HPV más comunes: HPV 16 o 18.
2. En 26 casos, encontramos secuencia viral de HPV18, con lo cual la frecuencia real de este tipo viral es mayor que la reportada cuando se informa como un tipo único específico.
3. De igual forma, el HPV16 es fijo en la mayoría de las co-infecciones.

4. Existe la presencia de HPVBR como el HPV6 y el HPV44 (Muñoz et al, 2003).
5. El HPV45 se presenta en un número considerable de casos casi con la misma frecuencia del HPV18.
6. Se detectaron también otros tipos de HPV diferentes a HPV 16/18: HPV 31, 33, 39, 45, 51, 52, 58, 68 y 70 (Muñoz et al, 2003).
7. El HPV66, considerado como posiblemente oncogénico (Muñoz et al, 2003) se detectó en 3 casos combinado con los HPV 16 y/o 18.

Tabla N° 66. Distribución de las combinaciones de genotipos de HPV (infección múltiple) hallados en los casos de cáncer de cuello uterino de este estudio.

Genotipos virales	N° de casos
HPV 16 / 18	4
HPV 16 / 66	1
HPV 33 / 52 *	1
HPV 16 / 18 / 45	12
HPV 16 / 18 / 66	1
HPV 16 / 39 / 45	1
HPV 6 / 16 / 68	1
HPV 31 / 33 / 44 *	1
HPV 6 / 16 / 18 / 31	1
HPV 16 / 18 / 35/ 45	1
HPV 16 / 18 / 45 / 51	2
HPV 16 / 31 / 33 / 44	1
HPV 16 / 18 / 31 / 45	1
HPV 16 / 18 / 45 / 58	1
HPV 16 / 18 / 45 / 66	1
HPV 16 / 18 / 45 / 70	1
HPV 16 / 18 / 31 / 39 / 45 / 68 / 70	1
Total	32

4.2 Asociación de la inmunexpresión de biomarcadores en infección por HPV única y múltiple.

A manera general, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la inmunexpresión del panel de biomarcadores estudiados entre la infección por HPV única y múltiple. Sin embargo podemos apreciar en la siguiente tabla que en la infección múltiple ocurren cambios más llamativos que en la única, como por ejemplo que las proteínas de la vía supresora de la pRb están más alteradas, que la inmunexpresión de Bax es más acentuada, que la inmunexpresión de Bcl-2 es totalmente negativa y que CD44s se encuentra con mayor expresión al igual que el CEA.

Tabla N° 67. Expresión inmunohistoquímica de los diferentes biomarcadores en infección por HPV única y múltiple.

Biomarcador	Valor de "p"	Infección única (%)		Infección múltiple (%)	
		(-)	(+)	(-)	(+)
Ki-67	0.618		77.8		71.9
pRb	0.201	64.4		78.1	
Ciclina D1	0.071	58.1		78.1	
p16INK4a	0.699		76.7		81.2
Ciclina E	1.000		93.3		93.3
p27CIP1	0.216		52.8		47.2
p21WAF1	0.977		53.3		50
p53	0.763	95.3		96.8	
MDM-2	0.404		59.2		40.8
Bax	0.244		60.5		74.2
Bcl-2	0.144	93.5		100	
Cadherina-E	0.405		77.3		73.3
CD44s	0.824		88.4		93.5
CD44v3	0.835		97.8		96.9
Ubiquitina	0.305		97.8		100
Telomerasa	0.656		51.1		50
CK	0.226		97.8		96.8
CEA	0.247		84		96.8

DISCUSIÓN.

1. GENERALIDADES.

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar la expresión inmunohistoquímica de un panel de biomarcadores en muestras de cáncer de cuello uterino comparándolas con el tejido benigno (controles) para establecer su aplicación clínica, así como determinar los genotipos de HPV presentes en estos tejidos neoplásicos.

Estudiamos 81 carcinomas de cuello uterino registrados en el Servicio Anatomía Patología del Hospital Clínico Universitario de Valencia entre 1969 y 2005, de los cuales se disponía de material histológico archivado. Recabados los datos clínicos, analizadas las características histopatológicas, inmunohistoquímicas y efectuada la genotipificación de los HPV presentes en los tumores, realizamos un análisis de los hallazgos obtenidos entre las diferentes variables, así como la existencia de posibles correlaciones entre ellas.

La inmunoexpresión de los biomarcadores en el tejido neoplásico comparada con el tejido benigno confirmó que en la neoplasia cervical ocurre una diversidad de interacciones y mecanismos moleculares alterados que conllevan a la disregulación del ciclo y proliferación celular. Tales interacciones y mecanismos son muy probablemente inducidos por la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de los papilomavirus humanos de alto riesgo, bien sea para el mantenimiento del fenotipo maligno o bien durante todo el proceso de carcinogénesis.

La presencia del ADN-HPVAR en la serie de tumores estudiados, específicamente de los genotipos virales 16 y 18, ratifica las observaciones de otros investigadores, que indican que el HPV el agente causal e inductor del desarrollo de la neoplasia cervical invasiva tanto epidermoide como de origen glandular.

2. EN RELACIÓN A LOS HALLAZGOS CLINICOPATOLÓGICOS.

Edad.

La importancia de la neoplasia cervical viene dada principalmente por su alta morbi-mortalidad, a pesar de que es uno de los pocos tumores malignos con gran potencial de prevención secundaria. Esta neoplasia afecta cada día a más mujeres jóvenes y en edad reproductiva, sobre todo en países pobres y en vías de desarrollo, donde la carencia de programas de pesquisa bien organizados es el principal aliado de este flagelo que se ha convertido en un verdadero problema de salud pública.

Al igual que otras enfermedades de carácter crónico, las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino aumentan con la edad, tendencia que se aprecia claramente en estudios desarrollados en áreas geográficas específicas con alta prevalencia como América Central y del Sur (Lewis, 2004).

La mayor tasa absoluta de cáncer de cuello uterino recae sobre mujeres de mediana edad, principalmente en las áreas geográficas con elevada prevalencia. Los análisis de datos sobre mortalidad por neoplasia cervical en América Latina y del Caribe, por ejemplo, indican que las mujeres cuya edad está comprendida entre los 35 y 54 años conforman el grupo reiterado de defunciones anuales.

En este estudio, la mayor proporción de pacientes con cáncer cervical se encontraba en el grupo comprendido entre los 35 y 55 años de edad y, el 29.3% de estas contaban con 36 y 45 años. Según los datos arrojados por los principales estudios epidemiológicos en los que se incluyeron pacientes de distintas regiones geográficas, la mayor incidencia de casos de cáncer cervical se presentan entre los 25 y 30 años, para alcanzar un pico máximo entre los 45 y 50 años. Estas observaciones se notan más en países desarrollados con políticas de pesquisa bien implementadas. Sin embargo, en los países subdesarrollados se aprecia una tendencia de la incidencia de cáncer de cuello uterino que sigue una relación lineal con la edad, como

ocurre con la mayoría de los tumores de origen epitelial (Bosch y de Sanjosé, 2003; Lewis, 2004).

En esta serie de tumores de cuello uterino, encontramos un segundo pico de prevalencia en las pacientes mayores de 65 años, que corresponde fundamentalmente a adenocarcinoma cervical. Entre otras, esto se debe quizás a las siguientes causas: a que las pacientes sobre esta edad son excluidas de los programas de pesquisa voluntariamente o por el sistema; a que la citología cervicovaginal no es lo suficientemente sensible para el diagnóstico de lesiones cervicales glandulares; tampoco debe descartarse el estado de inmunosupresión. Este perfil de cáncer cervical con dos picos de prevalencia respecto a la edad se adapta al descrito para países desarrollados como España (de Sanjosé, 2005).

En este estudio, la edad media de diagnóstico de cáncer de cuello uterino fue de 50 años, sin diferencias significativas entre los dos tipos histológicos de cáncer cervical, aunque el tipo histológico prevalente fue el carcinoma epidermoide. Sobre nuestros casos de adenocarcinoma cervical, el mayor número de casos se presentó en pacientes cuya edad se encontraba por debajo de los 45 años, posiblemente asociado a factores de índole hormonal como el uso prolongado de ACO.

De manera general, la tendencia de mortalidad por cáncer de cuello uterino en España está aumentando en todos los grupos de edad según explica Llorca et al, 2005. La mayor incidencia de cáncer cervical ocurre en el intervalo de edad comprendido entre los 45-54 años, aunque los efectos de un buen cribaje han disminuido la mortalidad. El incremento en las tasas de mortalidad también ocurre en un porcentaje considerable en la pacientes mayores de 65 años, grupo en el que la mortalidad aumenta debido quizás a las causas anteriormente mencionadas, de acuerdo a los resultados de los análisis epidemiológicos realizados e informados por Bosch, 2004 en Oviedo y de Sanjosé, 2005 en Valencia. Aunque se piensa que los efectos de la pesquisa de cáncer cervical logran un buen resultado, Llorca et al (2005) por el contrario, defienden que la mortalidad por esta neoplasia en España

se está incrementando de manera importante en mujeres por debajo de los 50 años de edad.

Cabe mencionar, que la prevalencia a nivel mundial de la infección por HPV varía entre el 2 y 44%, rango en el que influye la edad de la población estudiada así, como de la sensibilidad de los ensayos moleculares utilizados para la detección del ADN viral. Aun así, la prevalencia de la infección por HPV es alta en mujeres jóvenes sexualmente activas cuya edad está sobre los 25 años, luego disminuye con la edad, para finalmente alcanzar un segundo pico de prevalencia después de los 55 años, según resumen Baseman y Koustsky en el 2005. En este estudio, la infección por HPV ya sea por un tipo específico o por varios tipos virales a la vez, se presentó sin diferencias significativas, entre todos los intervalos de edad, lo que concuerda con el patrón descrito.

Nuestra serie de cáncer de de cuello uterino pertenecía a pacientes cuya edad promedio era los 50 años, en un rango oscilante entre los 36 y 55 años, dato semejante a lo encontrado en la literatura, lo cual indica que este tumor se diagnóstica en pacientes cada vez más jóvenes. Este hecho ofrece la ventaja de aplicar a tiempo el tratamiento necesario y efectivo.

2.2 Diagnóstico histopatológico: tipos histológicos.

El tipo histológico de cáncer de cuello uterino prevalente en este estudio fue el carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado, mientras que el adenocarcinoma cervical alcanzó un porcentaje de prevalencia semejante al hallado en la literatura (Vizcaino et al, 1998, 2000; Bosch y de Sanjosé, 2003).

Aunque en la actualidad se estima que la prevalencia del adenocarcinoma cervical está aumentando, nuestros resultados coinciden con las cifras otorgadas a este tipo histológico de cáncer cervical, estimada entre el 20-25% (Vizcaino et al, 1998).

2.3 Tamaño tumoral.

Con respecto al tamaño tumoral, los tumores estudiados tenían una media de 1 cm y no encontramos ninguna asociación significativa con las variables estudiadas, lo cual sugiere que el comportamiento biológico de los tumores cervicales, así como la variedad de eventos moleculares implicados en la carcinogénesis, no se ven afectados por el tamaño macroscópico de la neoplasia tumoral.

3. EN RELACIÓN A LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

Partiendo de que el 96.3% de los tumores de cuello uterino de este estudio contiene ADN-HPV, suponemos que los hallazgos inmunohistoquímicos tienen relación directa o indirecta con la presencia del ADN viral.

El ciclo celular de las células eucariotas está regulado por la síntesis y destrucción periódica de las **ciclinas** asociadas a CDK. El entendimiento de cómo estas proteínas interactúan en dicha regulación ha proporcionado la información requerida para el descubrimiento de dianas que presentan alteraciones y que son la base del desarrollo del cáncer.

En este estudio, hemos evaluado la inmunoexpresión de las ciclinas D1 y E en el cáncer de cuello uterino, revelando niveles de expresión correspondientes a 32.1% y 7.7%, respectivamente; el 100% del tejido benigno expresó la ciclina D1 y el mismo fue negativo para la ciclina E. Por lo tanto, la expresión de la ciclina D1 está reducida pero la ciclina E se mostró ligeramente incrementada, sobre todo en los carcinomas que conservan cierto grado de diferenciación. Estos resultados coinciden con los reportados por Cho y cols (1997), Skomedal y cols (1999) y Quade y cols (1998).

Las oncoproteínas E6 y E7 de los HPV, específicamente el HPV16, tienen la habilidad de interactuar con numerosas proteínas celulares alterando así los mecanismos celulares que luego conllevan al desarrollo de la neoplasia maligna (zur Hausen, 2000). Las células cervicales neoplásicas infectadas y

con expresión de E7-HPVVAR mantienen a la pRb inactivada funcionalmente, con lo cual el complejo de CDK4-6/ciclina E para la fosforilación de la proteína supresora es prácticamente innecesario. La inducción de la transcripción de la ciclina E promueve la transición de la fase G1 a la S, pero además este complejo participa en el mantenimiento de la pRb en estado hiperfosforilado provocado previamente por CDK4-6/ciclina D1 (Johnson y Walter, 1999). Esta quizás sea la razón por la que en nuestro estudio encontramos bajos niveles de inmunoreactividad de la ciclina D1 y ligero incremento en la ciclina E.

El papel que desempeña la ciclina D1 en la carcinogénesis cervical no está del todo claro debido al hallazgo de resultados contradictorios acerca de la sobreexpresión de esta proteína en cáncer cervical. Dichos datos oscilan entre negativos (Nichols et al, 1996) o disminuidos (Cho et al, 1997; Skomedal et al, 2003) y el 28% encontrado por Bae et al, 2001 y 32% de Cheung et al, 2001 que coincide con los de este estudio (32.1%).

La inmunoexpresión reducida de ciclina D1 se correlacionó con la también reducida presencia de p53 y pRb y con la sobreexpresión de p21, cadherina-E y CEA, involucrando representantes de procesos celulares tan importantes como la regulación del ciclo celular, apoptosis y diferenciación celular.

La ciclina D1 está disminuida en las lesiones cervicales asociadas a HPVVAR (LIEAG/carcinoma epidermoide/ adenocarcinoma) comparada con el epitelio benigno. La ciclina E está ligeramente elevado, indicando que existe un estímulo proliferativo.

Las ciclinas se sintetizan, cumplen su función y son rápidamente degradadas por la vía ubiquitina-proteosoma, de manera tal que esta cinética celular acelerada hace prácticamente indetectable a estas proteínas en las células inmortalizadas por el HPVVAR. Esta quizás es la razón por la cual hemos encontrado en los tumores cervicales estudiados una expresión de la ciclina E no tan elevada como la hallada por van de Putte et al, 2004 (81.5%).

Los mecanismos desarrollados por las oncoproteínas de los HPVVAR podrían contribuir con la expresión aberrante de la ciclina E en las lesiones cervicales, específicamente los que conllevan a la liberación del factor de transcripción E2F, con incremento de la proliferación celular descontrolada en casos con áreas de diferenciación (Quade et al, 1998). Ello coincide con lo observado en los carcinomas epidermoides BD de este estudio, que expresaron esta proteína en el 16.7%.

También la literatura muestra datos contradictorios en la expresión de la ciclina E en el cáncer cervical. Los datos van desde ligeramente elevados con respecto al tejido sin lesión, como los hallados en este estudio (7.7%) y en los de Cho et al, 1997 (10.32%), hasta los muy elevados alcanzando el 81.5% de van de Putte et al, 2004.

Las células cervicales malignas con expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de los HPVVAR muestran expresión alterada de las ciclinas de la fase G1 del ciclo celular, la ciclina D1 está disminuida y la ciclina E ligeramente incrementada con respecto al tejido cervical benigno.

Otro de los defectos que ocurren en el ciclo celular y que contribuyen de manera activa en el proceso de carcinogénesis es la respuesta celular ineficiente de los **inhibidores de las CDK dependientes de ciclina (CDKI)**, quienes son importantes reguladores negativos de la progresión del ciclo celular. La expresión descontrolada de las oncoproteínas E6 y E7 tiene una implicación drástica en el descontrol del ciclo celular, debido a que su interacción directa o indirecta con los CDKI contribuye a la transformación celular.

Los carcinomas de cuello uterino asociados a HPVVAR muestran expresión alterada de los CDKI, como se aprecia en este estudio en comparación con el tejido cervical benigno. Además, nuestros resultados coinciden con los hallados en la literatura, aunque existe un amplio rango de valores de inmunoreactividad que oscila entre el 20% y el 89% (Skomedal et al, 1999; Troncone et al, 1999; Cheung et al, 2001; van de Putte et al, 2003), en lo que influye fundamentalmente el uso de anticuerpos policlonales, las

diferentes escalas de interpretación, así como también si se trata de una evaluación en carcinomas epidermoides o adenocarcinomas, pues en estos últimos es más elevada (Lu et al, 1998; Alisen et al, 2003).

La sobreexpresión de la p16 en la serie de tumores cervicales estudiada coincide con la reportada por Sano et al, 1998 a, b; Keating et al, 2001; Klaes et al, 2001 y Alfsen et al, 2003. La liberación del factor de transcripción E2F que conlleva a la excesiva proliferación celular podría ser el mecanismo por *feedback* negativo por el que se elevan los niveles de p16. Actualmente la expresión de p16 se estudia con interés en la lesiones cervicales preinvasivas, debido a que es considerado un buen marcador de las células transformadas por los HPV, tanto en muestras de tejido como en muestras celulares obtenidas a partir de neoplasias invasoras y preinvasoras escamosas y glandulares y, por lo tanto, un marcador de diagnóstico y pronóstico (von Knebel Doeberitz, 2004).

En este estudio, los carcinomas epidermoides mostraron mayor expresión de p21 que los adenocarcinomas ($p=0.036$), demostrando que la vía reguladora de la p53 está más alterada en los tumores de origen glandular, quizás debido fundamentalmente a la interacción directa de E7-HPV con la proteína p21 (Zerfass-Thome et al, 1996; zur Hausen, 2000). Es posible que también haya influido la naturaleza epitelial, ya que la p21 es una proteína que se encuentra implicada en la diferenciación epitelial y en nuestra serie de carcinomas predominan aquellos con diferenciación tumoral.

La sobreexpresión de p27 fue más evidente en los carcinomas epidermoides MD pero también en los tumores menos diferenciados. Según Troncone et al, 1999; Shiozawa et al, 2001 y Sgambato et al, 2004, la expresión de p27 en el epitelio cervical neoplásico está en función de la diferenciación celular. Es posible, que la expresión de p27 observada en los tumores I e II ocurra en las células de áreas con cierto grado de diferenciación. Además debemos considerar que, aunque hubo reacción, esta fue en menos del 25% de las células malignas. Así mismo, también debemos considerar que en nuestros tumores existe una intensa degradación de proteínas (sobreexpresión de

ubiquitina) y que la p27 es una diana constante para degradación inducida por la E7-HPV, junto a otras proteínas de vida media corta, lo cual podría explicar la baja reactividad en los tumores bien diferenciados que, además, son los que muestran mayor porcentaje de expresión de Ki-67, indicativo de proliferación sin inhibición adecuada.

Para replicarse, el HPV cumple un ciclo vital que depende de la diferenciación epitelial. Por ello, en algunos carcinomas epidermoides con diferenciación podemos ver áreas de condilomatosis (atipia coilocítica), indicando que este virus además de mantener el fenotipo maligno también se está replicando. En estos casos, la expresión de p27 podría estar disminuida, contrario a lo observado en todos los epitelios bien diferenciados, porque el virus necesita de la diferenciación pero, a su vez, controla el efecto anti-proliferativo de la p27, bien por inducción a la degradación rápida de esta proteína o acelerando la actividad proliferativa mediante la constante liberación del factor E2F y la transcripción de enzimas necesarias para la fase S (revelado por la sobreexpresión de Ki-67 en los carcinomas bien diferenciados vista en este estudio). En concreto, el HPV es capaz de permitir que el epitelio se diferencie para lograr su supervivencia episomal pero simultáneamente despliega y mantiene una variedad de mecanismos moleculares que impiden que las células funcionen correctamente y se mantengan transformadas.

Nuestros resultados revelan una correlación positiva entre los niveles aumentados de las proteínas reguladoras CDKI, coincidiendo con lo informado por Lu et al, 1998. Esta correlación indica que estas proteínas son una diana importante entre los mecanismos desarrollados por parte del HPV para lograr su permanencia en la célula transformada así como el fenotipo maligno. La expresión alterada de estas proteínas constituye un marcador de neoplasia cervical de utilidad clínica.

Además, también encontramos una correlación positiva estadísticamente significativa entre el incremento de la actividad proliferativa de los carcinomas cervicales de este estudio (sobreexpresión de Ki-67) y la inmunoreactividad de los CDKI, indicando que la ineficacia o insuficiente

actividad inhibidora de crecimiento tumoral por parte de los CDKI que se refleja en la elevada proliferación celular.

La sobreexpresión de los principales representantes de los inhibidores de CDK dependientes de ciclina: p16, p21 y p27 es una de las alteraciones que se mantienen constantes en el cáncer de cuello uterino que expresa las oncoproteínas de los papilomavirus humanos de alto riesgo.

Nuestra serie de tumores mostró una actividad proliferativa entre moderada y alta, sobre todo con mayor expresión de **Ki-67** en los tumores epidermoides bien diferenciados y los adenocarcinomas endocervicales y endometrioides, sin diferencias significativas, a pesar de que la mayoría de los tumores no sobrepasaban 1 cm de tamaño. Así pues, no necesariamente existe correlación entre la actividad proliferativa, tamaño tumoral y comportamiento biológico del tumor (van de Putte et al, 2004).

La expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en cáncer de cuello uterino y lesiones precursoras ha sido evaluada en innumerables estudios, cuyas conclusiones coinciden en que está incrementada en las LIEAG pero que va disminuyendo a medida que crece el tumor.

La actividad proliferativa de un tumor cervical puede variar de acuerdo al grado de diferenciación tumoral, de manera tal que es posible encontrar elevados niveles de expresión de Ki-67 en correlación con la menor diferenciación tumoral (Pahuja et al, 2003). Sin embargo, se ha reportado que la actividad proliferativa también se eleva en carcinomas con diferenciación tumoral, como ocurrió en este estudio y en concordancia con Troncone et al, 1999 y Shiozawa et al, 2001. En estas discrepancias, es posible que influya la acción de las oncoproteínas virales y el grupo tumoral estudiado.

Encontramos correlación entre la sobreexpresión de Ki-67 y todos los CDKI, así como con la telomerasa y la ubiquitina. Las CDKI están incrementadas pero es posible que sean insuficientes o innecesarias y no pueden evitar que la fracción de crecimiento decaiga. En las células inmortalizadas por E6-

HPV la proliferación celular continúa mientras que la degradación de proteínas reguladoras es controlada mediante la activación de la vía ubiquitina-proteosoma.

Considerando el interés que ha despertado la relación de la sobreexpresión de p16 en lesiones cervicales como indicador indirecto de infección por HPV, Agoff y cols en el 2003, sugieren que la correlación existente entre la sobreexpresión de p16 y Ki-67 en conjunto con la detección de HPV podrían combinarse para determinar si estos marcadores poseen utilidad clínica en cuanto a diagnóstico y pronóstico, sugerencia que compartimos basados en nuestros resultados.

En el cáncer de cuello uterino asociado a infección por HPV existe correlación entre la proliferación celular descontrolada, la ineficiente actividad supresora del detenimiento de esta proliferación celular, la inmortalización de la población celular maligna y la degradación intensa de proteínas claves en el control del ciclo celular.

Las vías supresoras de tumor (representadas por los productos de los genes *TP53* y *Retinoblastoma*) son las principalmente afectadas en las neoplasias malignas (Hanahan y Weinberg, 2000). La sobreexpresión de sus productos en la mayoría de los casos, ocurre como consecuencia de mutaciones que afectan a dichos genes. En las células del cáncer de cuello uterino, es posible encontrar sobreexpresión de las proteínas supresoras de tumor, aunque las mutaciones sean un evento de rara ocurrencia en dicha población maligna (Tommasino et al, 2003).

El producto del gen *TP53* actúa como un supresor de tumor controlando la transición hacia la fase S del ciclo celular. Este producto forma parte importante en la regulación del crecimiento celular, en la reparación del ADN y en la inducción de la apoptosis cuando el daño genético es irreparable. Además, su actividad induce la transcripción de otras proteínas incluyendo a MDM-2 y a la p21WAF1 (Sidransky y Hollstein, 1996).

La detección inmunohistoquímica incrementada de la proteína **p53** en el cáncer de cuello uterino podría ocurrir como consecuencia de una mutación en el gen que le da origen, debido a que la proteína mutada posee una vida media más larga que la variedad "salvaje" (Giarnieri et al, 2000).

En la mayoría de los estudios donde se ha evaluado la expresión de p53 en las lesiones del cuello uterino asociadas a la infección por HPV, se muestran resultados que coinciden con los presentados en esta investigación, donde la expresión de la p53 se encuentra bastante reducida.

La ausencia o baja expresión de la p53 se ha asociado a un mayor riesgo de progresión a cáncer, cuando se trata de lesiones precancerosas de alto grado en las que se encuentra involucrado un HPV (específicamente los tipos 16 y 18), lo cual sugiere que este patrón de expresión podría mantenerse en las células de la lesión invasora a fin de perpetuar el fenotipo maligno (Kurvinen et al, 1996; Wang et al, 2004b).

La expresión inmunohistoquímica de la p53 también depende del potencial maligno del HPV asociado. La proteína E6-HPVBR tiene la habilidad de unirse físicamente a la p53 "salvaje", estabilizándola pero no induciendo su degradación rápida, motivo por el cual es factible encontrar niveles elevados de expresión de p53 en las lesiones precancerosas de bajo grado. Por el contrario, la E6-HPV (HPV 16 y 18) se une a la p53 para "marcarla" y provocar que la proteína se convierta en una diana de la ubiquitina ligasa. Esto sugiere que la p53 se sintetiza en las lesiones cervicales ADN-HPV positivas, en respuesta al daño genético y a la elevada proliferación celular, pero se encuentra funcionalmente bloqueada, con niveles celulares muy bajos, debido a la degradación rápida a la que es sometida por el virus; esta situación favorece el desarrollo de cáncer (Hengstermann et al, 2001).

En este estudio hemos encontrado una elevada actividad degradativa que podría explicar la reducida inmunoexpresión de p53 presente en nuestros casos. Aunado a ello, la elevada expresión de MDM-2, principal regulador de los niveles celulares de p53, contribuiría aún más a la excesiva degradación de dicha proteína (Dellas et al, 1997). La sobreexpresión de MDM-2 en más

del 50% de las células tumorales prevaleció todos los carcinomas epidermoides y los adenocarcinomas cervicales, lo que sugiere que estos tipos histológicos de tumor tratan de conservar algunas propiedades de las células epiteliales normales. La positividad de este marcador en los carcinomas II se observó en áreas tumorales con algún grado de diferenciación.

La expresión alterada de la proteína supresora de tumor p53 y de MDM-2 es frecuente en los carcinomas invasores de cuello uterino asociados a HPV.

La apoptosis o muerte celular programada es un componente esencial en la respuesta celular al daño que sufra, como por ejemplo cuando se ve afectada por virus, los cuales desarrollan distintos mecanismos para la modulación de la apoptosis por parte de la célula huésped. Los productos de los oncogenes virales podrían interferir tanto en los mecanismos efectores de la apoptosis como en los reguladores (Thomson, 2001).

La familia de las proteínas involucradas en la apoptosis Bcl-2 cumple una función relevante en la regulación de este proceso. Estas proteínas, fundamentalmente Bcl-2/Bax forman homodímeros o heterodímeros para inducir o reprimir la apoptosis (Borner, 2003).

En este estudio, hemos encontrado que las células cervicales malignas ADN-HPV positivas muestran elevada inmunoreactividad para Bax y niveles muy bajos de Bcl-2.

El daño genético provocado por los HPV en las células cervicales conduce a la activación de una serie de mecanismos celulares con la intención de contrarrestar dicha alteración. Entre estos mecanismos, el principal es el incremento de la síntesis de p53 para reparar el daño genético y detener la proliferación celular descontrolada. A pesar de que p53 sea degradada rápidamente, las células reciben el efecto de p53 y, en respuesta, se incrementan los niveles de Bax para activar la apoptosis y simultáneamente se reducen los niveles de Bcl-2 (Miyashita et al, 1994). Posiblemente este mecanismo explique nuestros resultados. Aunque el fenotipo Bcl-2-

disminuido/Bax-elevado es considerado un indicador de mejor pronóstico durante la evaluación del cáncer cervical (Wootipoom et al, 2004), esta relación podría indicar que está ocurriendo una elevada muerte celular y por consiguiente también una elevada renovación celular que en este caso sería maligna y con pronóstico desfavorable (Kokawa et al, 1999).

Por lo tanto, en el cáncer de cuello uterino asociado a HPV, los marcadores de apoptosis se encuentran modulados por la acción de las oncoproteínas virales, que conllevan a la expresión anormal de las proteínas apoptóticas.

La inmunoreactividad de la **pRb** en nuestra serie de casos se encontró en el 30% de los carcinomas de cuello uterino estudiados, a diferencia del tejido control, en el que se encontraba a niveles mínimos (2.7%) como corresponde al proceso de diferenciación epitelial normal.

El producto del gen *Retinoblastoma* tiene como principal función regular la actividad de los factores de transcripción E2F, con el que constituye un complejo en su forma hipofosforilada, impidiendo la transcripción de genes necesarios para avanzar hacia la fase S. A su vez, la pRb está sujeta a regulación por parte del complejo CDK4-6/ciclina D1 que, por fosforilación, inactiva a pRb en presencia de señales mitóticas.

Las células del cuello uterino infectadas por un HPV muestran niveles de expresión de la pRb variables, que dependen de la interacción de la E7-HPV con esta proteína de forma semejante al complejo CDK/ciclina, previniendo el enlace entre la pRb y el factor E2F, con lo cual se desencadena el proceso proliferativo sin control que caracteriza a cualquier neoplasia.

El epitelio cervical benigno mostró niveles bajos de expresión de la pRb en la porción correspondiente a la capa basal proliferativa. Sin embargo, los carcinomas cervicales de este estudio mostraron una mayor expresión de pRb posiblemente como respuesta ante el elevado índice proliferativo ocasionado, a su vez, por la inactivación de la pRb por parte de la E7 viral.

Esta interacción entre proteínas celulares y virales conlleva a la expresión disminuida de la ciclina D1 (Salcedo et al, 2002; Fiedler et al, 2004), que se correlaciona significativamente con la expresión de pRb ($p=0.027$).

Los niveles de la pRb captados en el compartimiento citoplasmático sugieren la existencia de un mecanismo inducido muy probablemente por el HPV, que provoca el traslado de la proteína nuclear para la posterior degradación. Quizás es por ello que en la literatura se encuentran datos discrepantes en cuanto a la expresión de la pRb en el cáncer cervical, desde los muy bajos (Salcedo et al, 2002; Fiedler et al, 2004) hasta los muy elevados de Skomedal et al, 1999, pasando por los obtenidos en este estudio.

La expresión inmunohistoquímica alterada de las principales proteínas reguladoras del ciclo celular y supresoras de tumor, p53 y pRb se debe a la interacción directa de estas con las oncoproteínas de los HPV, las cuales inducen una serie de mecanismos que conllevan a la inactivación funcional de estas proteínas, seguidos de la degradación rápida por la vía de la ubiquitina-proteosoma. Las proteínas p53 y pRb pueden estar expresadas en las células cervicales malignas pero inactivadas por el HPV.

Nuestra serie de casos ha mostrado inmunoreactividad contra el antígeno **telomerasa** en el 52.6% comparado con el 22.7% de los casos control ($p<0.001$), a pesar de las dificultades que hemos encontramos para la correcta detección y valoración por medio de las técnicas de inmunohistoquímica.

La actividad de la telomerasa se ha detectado en un amplio rango de neoplasias malignas, considerándose su expresión un paso esencial en la transformación maligna de los tejidos humanos (Shay y Bacchetti, 1997; Bryan y Cech, 1999; Jarboe et al, 2002). Esta capacidad permite que las células malignas se multipliquen de forma ilimitada.

Actualmente, se han realizado múltiples estudios para evaluar la telomerasa como un posible marcador de neoplasia intraepitelial cervical, con gran

utilidad como un adjunto al diagnóstico citológico durante la evaluación de las pacientes con anormalidades en células epiteliales del cuello uterino asociadas a la infección por HPV (Jarboe et al, 2002, 2004; Reesink-Peters et al, 2003; Bravaccini et al, 2005; Pinto-Tang et al, 2005). Para ello, se ha utilizado fundamentalmente el método *telomeric repeat amplification protocol (TRAP)* que permite determinar la actividad de la telomerasa en lesiones de cuello uterino. Este método se basa en una amplificación de la enzima telomerasa mediante la técnica de *PCR* y su visualización electroforética, arrojando elevados niveles de expresión enzimática.

En este estudio, hemos encontrado un alto porcentaje de carcinomas cervicales con sobreexpresión de la telomerasa en comparación con el tejido cervical benigno, aunque por debajo de lo reportado en la literatura, donde hemos hallado datos que alcanzan hasta el 95% de expresión de esta enzima (Yashima et al, 1998; Yokohama et al, 1998; Wang et al, 2004). Estas diferencias se presentan fundamentalmente debido a que el método utilizado en estos estudios es más sensible para captar la reducida cantidad de telomerasa que se sintetiza en las células malignas, donde la detección cuantitativa está garantizada luego de una amplificación de secuencias enzimáticas.

A pesar de las ventajas que pueda ofrecer la aplicación de las técnicas moleculares, es posible también estimar la expresión de la telomerasa mediante inmunohistoquímica. La eficacia de la inmunodetección de la telomerasa depende del cumplimiento de condiciones referentes a la dilución mínima del anticuerpo y al revelado de la reacción antígeno-anticuerpo utilizando un método altamente sensible (EnVisión). Inclusive en casos dudosos, debido a que el patrón de inmunoreactividad es un puntillado muy fino y homogéneo es necesario utilizar una contratinción más bien citoplasmática, que permita una mejor observación y diferenciación de la tinción nuclear provocada por la expresión de la telomerasa.

En este estudio hemos encontrado también que el 53.8% de los carcinomas BD fueron negativos para la telomerasa mientras que los II mostraron positividad para este marcador en el 62.5%. Es posible que la heterogeneidad que pueda presentar un tumor influya sobre el análisis enzimático. Según explican Jorboe et al (2002), la actividad de la telomerasa podría estar relacionada con el grado de diferenciación tumoral. Así, los bien diferenciados tendrían menor expresión enzimática como lo podemos observar en nuestros resultados

En este estudio, hemos encontrado correlación significativa entre la inmunoexpresión de la telomerasa y Ki-67 ($p=0.012$), demostrando que la actividad proliferativa incrementada está asociada a las células con supervivencia prolongada. Así mismo, hemos hallado correlación con la expresión de p16 ($p<0.004$), que de forma indirecta demuestra que las células inmortalizadas por la expresión de E6 y E7 de los HPVVAR mantienen alteradas las principales vías de regulación del ciclo celular. La alternación en este caso está vinculada a la inactivación de la pRb.

También hallamos correlación entre la expresión incrementada de telomerasa y MDM-2 ($p<0.002$), que es el principal regulador de la proteína supresora de tumor p53.

De igual forma, hubo correlación entre p53 y las proteínas involucradas en la cohesividad celular, específicamente con la proteína CD44v3 ($p=0.025$), propiedad que se altera en el tejido neoplásico favoreciendo la metástasis del tumor.

Las células malignas del cuello uterino muestran elevado porcentaje de expresión de la telomerasa. Cuando esta enzima se estudia mediante métodos inmunohistoquímicos, es necesario considerar algunas condiciones técnicas para lograr su correcta detección y valoración.

En este estudio, hemos obtenido una sobreexpresión de la **ubiquitina** en la serie de cáncer cervical en comparación con el tejido cervical de control ($p<0.007$). El HPVVAR tiene como principal mecanismo activar la

degradación de proteínas para eliminar los principales controles del ciclo celular que protegen a la célula de alteraciones en la homeostasis interna, entre ellos la proteína supresora p53 (Kao et al, 2000; Hengstermann et al, 2001) y la proteína retinoblastoma (González et al, 2001). De igual forma, muchas otras proteínas celulares se convierten en dianas seguras de las oncoproteínas virales para su degradación.

La sobreexpresión de la ubiquitina en el cáncer cervical asociado a HPVAR conlleva a la degradación rápida de las proteínas celulares que intervienen en el control del ciclo celular, de manera tal que no sólo las proteínas están inactivadas sino que además sus niveles de expresión tienden a ser muy reducidos (Scheffner y Whitaker, 2003).

En este estudio hemos encontrado correlación de la inmunoreactividad de la ubiquitina con la elevada actividad proliferativa ($p < 0.007$) indicando una cinética tumoral activa. De igual modo, observamos correlación entre la sobreexpresión de ubiquitina y la expresión anormal de las moléculas de adhesión cadherina-E y CD44v3 (ver Gráfico N° 10), lo que muestra que estas proteínas, a pesar de que se sintetizan en forma activa en las células cervicales malignas, se localizan anormalmente en el citoplasma a fin de ser degradadas con rapidez, como parte de los mecanismos de transformación del HPVAR.

Las oncoproteínas de los HPVAR tienen la habilidad de activar la vía de degradación de la ubiquitina-proteosoma para eliminar los controles celulares y, así, inducir la transformación maligna del tejido cervical y mantener el fenotipo maligno.

Las células con potencial maligno poseen reducción en el contacto con las células vecinas y esta característica se refleja en la pérdida de la arquitectura que dará origen a la destrucción de la estructura histológica, propio del crecimiento neoplásico (Hanahan y Weinberg, 2000). La pérdida de la cohesividad celular es característica de las neoplasias; en este estudio hemos encontrado sobreexpresión de las **moléculas de adhesión celular**, no sólo respecto a la expresión sino también a la expresión con tendencia a

la localización citoplasmática inadecuada que sugiere la ineficacia para cumplir con la función de mantener el tejido epitelial íntegro.

Durante el desarrollo de las lesiones cervicales ocurren alteraciones sustanciales de carácter cualitativo (localización citoplasmática o membranosa) y alteraciones cuantitativas (cambios en la expresión) en las principales moléculas de adhesión celular cadherina-E y CD44 y sus isoformas de acuerdo a lo referido por Baleiro-Rodrigues y Lopes (2004). En este estudio el hallazgo más llamativo fue la disminución de la inmuoreactividad membranosa y el progresivo incremento de la tinción citoplasmática de dichas proteínas, relacionadas con la pérdida de diferenciación como consecuencia de la transformación neoplásica.

La sobreexpresión de las moléculas de adhesión estudiadas se correlacionó con la reducción de la ciclina D1 en el caso de la cadherina-E y, a su vez, esta se correlacionó con la expresión elevada de la CD44s y CD44v3 (ver gráficos Nº 9 y Nº 10). Esta última correlación le concede importancia a las moléculas CD44 como posibles marcadores de la pérdida de cohesividad celular para evaluar en las lesiones cervicales asociadas al HPV, en especial si consideramos que la localización de la expresión de la CD44v3, tanto en carcinomas epidermoides como en adenocarcinomas, muestra mayor alteración que la CD44s, lo cual podría conferirle a CD44v3 la propiedad de ser un posible mejor marcador de la pérdida de la cohesividad celular que CD44s.

La correlación observada entre la inmuoreactividad de las moléculas de adhesión con la ubicuitina sugiere que estas proteínas son retenidas en el citoplasma para su degradación, hecho que en este estudio se aprecia más en los carcinomas epidermoides II sobre todo con la CD44v3 (ver apartado 3.8).

También estas moléculas muestran buena correlación con otros biomarcadores como la p16, p27, telomerasa, Ki-67 y pRb. Esta última coincide con la observada por de Boer et al, 1999.

El cáncer de cuello uterino asociado a infección por HPV muestra alteraciones esenciales en la expresión de las moléculas de adhesión, ya sean de carácter cualitativo (localización citoplasmática o membranosa) o alteraciones cuantitativas (cambios en la expresión), demostrando que la alteración en la distribución celular de estas moléculas son un cambio importante que contribuye en el desarrollo y mantenimiento de la neoplasia cervical invasora.

La sobreexpresión del **CEA** en todos los casos de cáncer cervical de estudio no es ninguna novedad pues se trata de uno de los marcadores tumorales más expresado en las neoplasias humanas. Sí que ha llamado la atención y es de considerable valor clínico que este marcador se correlaciona significativamente con la reducida expresión de las proteínas supresoras de tumor p53 y pRb (ver gráfico N° 7) al igual que con la ciclina D1 (ver gráfico N° 9), de manera tal que su expresión revela también la alteración celular más característica de los carcinomas cervicales asociados a HPV: la pérdida de la actividad supresora de tumor.

Las **citoqueratinas** sobreexpresadas en todos los tumores cervicales de este estudio muestran además correlación significativa con variables como la p27 ($p=0.022$) que se relaciona con la diferenciación tumoral así como con la pérdida de la cohesividad celular (CD44v3) ($p<0.009$), que en cierta forma también tiene que ver con la diferenciación del tumor (Carrilho et al, 2004; Faleiro-Rodríguez y Lopes, 2004). CK también con los marcadores de apoptosis Bax y Bcl-2 (ver gráfico N° 11) sugiriendo quizás que la vía apoptótica alterada tiene relación con el grado de diferenciación tumoral. Para precisar esta relación y su importancia clínica es necesario realizar más estudios.

El cáncer cervical asociado a infección por HPV muestra excesiva inmunoreactividad de marcadores tumorales como el CEA que, al igual que las citoqueratinas, podrían servir de marcadores para evaluar el grado de diferenciación tumoral.

4. EN RELACIÓN A LA DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE HPV.

Un total de 78 carcinomas cervicales (96.3%) reveló la presencia de ADN-HPV. Este hallazgo coincide con la aseveración de que es posible detectar secuencias genéticas de este virus en el rango del 95-100% de la neoplasia cervical invasora cuando se utilizan métodos sensibles y estandarizados (Bosch y de Sanjosé, 2003).

En este estudio utilizamos el método *PCR-SPF10/LiPA* para amplificar un segmento de 65 pb del genoma viral y para la posterior genotipificación. Aunque este método se continúa validando en estudios que además utilizan *primers* tradicionales como MY09/11 (Garcia-Cabezas et al, 2005) e inclusive en comparación con la captura de híbridos (Perrons et al, 2005), tanto en raspados cervicales (Melchers et al, 1999; van Doorn et al, 2002) como en biopsias de cuello uterino (Kleter et al, 1999; Pirog et al, 2000; Perrons et al, 2002), ha demostrado tener una elevada sensibilidad para detectar la presencia de ADN-HPV, habilidad que hemos podido constatar sobre todo por el hecho de que hemos utilizado material archivado incluido en parafina.

En la eficacia de los métodos moleculares para la amplificación y detección de ADN-HPV, específicamente la técnica de *PCR*, tiene gran influencia el tamaño del segmento de ADN viral que se amplifique (amplio espectro). Así pues, mientras más pequeño es el fragmento genómico es más factible detectar bajas concentraciones de secuencias virales, en particular, a partir de tejido incluido en parafina, el cual se caracteriza porque frecuentemente el ADN puede sufrir daños que conllevan a la degeneración o fragmentación del mismo (Karlsen et al, 1994), haciendo más difícil la detección de ADN viral integrado.

La utilización de *primers* como el sistema *SPF10* ofrece la ventaja de detectar ADN viral, aunque este se encuentre en pocas cantidades (carga

viral baja), o integrado al ADN celular, mejorando de esta forma el diagnóstico molecular y epidemiológico de los papilomavirus humanos.

Nuestros resultados demuestran, una vez más, que una tasa mayor al 95% de los carcinomas de cuello uterino poseen secuencias de ADN-HPV, confirmando así su estrecha relación etiopatogénica con la carcinogénesis cervical.

En relación a los tipos virales más frecuentes, la evidencia epidemiológica y molecular indica claramente que ciertos tipos de papilomavirus humanos son la principal causa del cáncer invasor de cuello uterino (Walboomers et al, 1999; Clifford et al, 2003; Muñoz et al, 2003; Castellsagué et al, 2006). En este estudio, de los 78 carcinomas cervicales positivos para ADN-HPV, el 59% presentó infección por un tipo específico de HPV, fundamentalmente de alto riesgo oncogénico. Por el contrario, Muñoz et al 2003, informaron que el 91.9% de los carcinomas cervicales incluidos en su estudio se encontraban infectados por un solo tipo de HPV. Esta investigación incluyó a miles de mujeres de diferentes partes del mundo y en el diagnóstico molecular, aunque fue realizado siguiendo un mismo protocolo, no se usaron los mismos *primers* para la detección de ADN viral en todas las muestras cervicales. Es posible que la marcada diferencia con respecto a nuestros resultados se deba justamente a la diversidad de pacientes y a la utilización de diferentes métodos moleculares de amplificación del genoma viral.

El genotipo viral específico con mayor prevalencia encontrado en este estudio fue el HPV16 (55.13%), el cual, además, no sólo se detectó como tipo específico sino también en co-infección con otros tipos virales. Este hallazgo se asemeja bastante al reportado por Muñoz et al 2003, quienes encontraron una prevalencia de este virus igual a 58.9%, así como también al porcentaje hallado por Bosch et al 1995 (51%) y por Walboomers et al 1999 (49.9%), estudios en los que se utilizaron los *primers* generales MY09/11 y GP5+/6+ además de *primers* específicos. Kleter et al, 1999 y Perrons et al 2002, quienes al igual que nosotros utilizaron el sistema PCR-

SPF10/LiPA para la detección y genotipificación de HPV, también encontraron una mayor prevalencia de HPV16 en sus respectivos estudios

Por lo tanto, nuestros resultados confirman que, en nuestro medio, el HPV16 también es el tipo viral de alto riesgo más frecuentemente asociado al cáncer de cuello uterino cuando se presenta como infección única.

En cuanto al HPV18 que, después del HPV16, es el tipo de papilomavirus humano más frecuentemente encontrado en tumores cervicales (Vizcaino et al, 1998; Walboomers et al, 1999; Clifford et al, 2003), se aisló de un caso de adenocarcinoma papilar (1.28%) en igual proporción que los tipos HPV58 y HPVX. La gran mayoría de la literatura considera al HPV18 como el tipo viral más asociado al desarrollo de adenocarcinoma cervical, en un rango que oscila entre el 37-41% según establecen Clifford y cols en el 2003. La marcada diferencia de nuestros resultados con respecto a otros estudios podría deberse a que a las lesiones glandulares de nuestro estudio podían estar asociadas a una lesión de origen escamoso, en cuyo caso intervendrían otros tipos de HPV y, entre ellos, muy probablemente el tipo 16 que produce grandes cantidades de copias en estado episomal, haciéndolo más prevalente (Yamakawa et al, 1994). Sin embargo, esta hipótesis pareciera no sostenerse si se consideran los hallazgos de Chew et al en el 2005. Estos autores, luego de evaluar una cohorte de 55 pacientes con adenocarcinoma, a través de la técnica de microdissección laser para separar el tejido glandular neoplásico del resto de tejido epitelial y estromal evitando así la contaminación con displasia adyacente, encontraron que el HPV16 fue el tipo con mayor prevalencia en el adenocarcinoma de cuello uterino, lo cual coincide con nuestros resultados.

Es importante destacar, que en nuestra serie de casos de cáncer cervical, el HPV18 tiene una prevalencia real mayor en coinfección que la comunicada cuando se presenta como tipo específico o único, ya que como detallamos más adelante, el HPV18 es uno de los tipos virales fijos en varios casos de cáncer cervical con infección múltiple asociada.

En este estudio, hemos encontrado una baja prevalencia de HPVX en comparación con los datos de Muñoz et al 2003, cuyo porcentaje de HPV desconocido fue de 6.4%. Posiblemente, el uso del sistema *SPF10* permitió identificar un mayor número de tipos de HPV que en otros estudios, quizás debido a que se encontraban en un número mínimo de copias o a que el ADN viral estaba bastante degradado haciendo difícil su detección por medio del uso de otros *primers* generales.

Por lo tanto, el sistema sistema SPF10-LiPA reduce la prevelencia de tipos de HPV deconocidos (X) permitiendo de esta forma identificar y conocer la verdadera prevelencia de HPV específicos.

En relación al HPV58, considerado de alto riesgo oncogénico, aunque la prevalencia en este estudio fue equiparable a la del HPV18, es importante resaltar su presencia tanto en infección única como formando parte de las co-infecciones, sobre todo porque en países con elevadas tasas de cáncer de cuello uterino, como Brasil, existen estudios donde inclusive este tipo viral muestra variantes asociadas a lesión neoplásica (Marreco Cerqueira et al, 2003) o en la población femenina China, donde el HPV58 también es bastante frecuente junto al tipo 52 (Huang et al, 1997). Entre los tipos de HPVVAR con mayor frecuencia en el estudio de casos y controles realizado por Muñoz et al, 2003, precisamente el HPV58 fue hallado entre los más frecuentes tanto en las pacientes como en los controles.

Detallando un poco más la presencia de tipos específicos de HPV en relación a los tipos histológicos de cáncer cervical, el HPV16 fue el tipo con mayor prevalencia tanto en los carcinomas epidermoides (55.9%) como en los adenocarcinomas (52.6%). De acuerdo a Clifford et al (2003), el rango de prevalencia del HPV16 en el carcinoma epidermoide oscila entre el 46-63%, en cambio, la frecuencia con que se presenta el HPV16 en nuestros casos de adenocarcinoma está por encima del rango que establecen para este tipo histológico: 26-36%.

La gran mayoría de los estudios epidemiológicos muestran una mayor asociación del HPV18 con el adenocarcinoma cervical. Sin embargo en este

estudio, esta asociación la ocupa el HPV16 de una forma semejante a la informada por Castellsagué et al, 2006. Posiblemente estos dos tipos de virus tienden a existir en co-infección (yamakawa et al, 1994), estando uno de ellos en una carga viral menor que el otro, la cual no es detectada mediante el uso de otros *primers* generales, y que en este estudio ha sido posible determinar debido a la elevada sensibilidad del sistema de *SPF10*. Pirog et al 2000, explica que el epitelio glandular no favorece la infección productiva del HPV16 como ocurre en el epitelio escamoso debido a su naturaleza poliestratificada que está relacionada con la diferenciación epitelial. Así, este virus permanece en un número de copias bajo en las lesiones glandulares invasoras y prevalece el HPV18, razón por la cual este último es el tipo viral más frecuentemente detectado en la neoplasia glandular.

Nuestro estudio entonces coincide con los hallazgos de Pirog et al (2000) y Castellsagué et al (2006), quienes encontraron una mayor prevalencia de HPV16 (50% y 42.7%, respectivamente) en adenocarcinoma cervical seguido por el HPV18. Pirog et al (2000) utilizaron *SPF10* en 105 adenocarcinomas primarios y en el caso de Castellsagué et al (2006), en una recopilación de 8 estudios de casos-contróles llevados a cabo en 3 continentes en que evaluaron 167 adenocarcinomas, usaron el sistema de *primers* generales GP5+/6+.

Por lo tanto, el HPV16 además de ser el tipo viral más frecuente en cáncer de cuello uterino, se presenta indistintamente tanto en carcinomas epidermoides como adenocarcinoma cervical, constituyendo también en este último un factor de riesgo clave para su desarrollo.

La infección por múltiples tipos de HPV es un hallazgo común en pacientes con neoplasia cervical intraepitelial. En este estudio, el 41% de los carcinomas de cuello uterino presentó infección múltiple. El rango de prevalencia de la infección múltiple por HPV en cuello uterino es bastante amplio, pudiendo encontrarse entre el 0% (van Muyden et al, 1999) hasta más del 50% (Levi et al, 2002). Esta amplia variación podría ser influenciada por varios factores, entre los que no podemos dejar de

mencionar a las características epidemiológicas (factores de riesgo) de los grupos clínicos así como la metodología utilizada para la detección del ADN viral.

Las pacientes jóvenes con lesiones precancerosas tienden a ser el grupo con mayor prevalencia de infecciones múltiples (Perrons et al, 2002; Cuschieri et al, 2004; Clifford et al 2005). De igual forma, una elevada prevalencia de múltiples tipos de HPV se obtiene en estudios en los que se incluyen pacientes HIV positivas, alcanzando cifras de hasta 78% (Levi et al, 2002).

Es posible que la verdadera prevalencia de las infecciones múltiples haya sido subestimada, principalmente en estudios epidemiológicos, debido al uso de metodologías moleculares con baja sensibilidad para detectar ciertos tipos de HPV. Esta hipótesis, que compartimos, fue planteada por Muñoz et al 2003 y por Trottier y Franco, 2006.

La co-infección de varios tipos virales formando entre sí variadas combinaciones fue un hallazgo sorprendente en este estudio. Llama la atención la marcada presencia del HPV45, que es relevante por ser un tipo oncogénico, a pesar de que no se encontró en ningún caso como infección única. También es importante recalcar que la co-infección entre el HPV 16 y 18 se hace bastante evidente, con lo cual la prevalencia real de estos virus en esta serie de cáncer cervical es mayor que la estimada cuando se presentan como un tipo específico.

Finalmente, no podemos descartar la posibilidad de sobrestimar la prevalencia de la infección múltiple, sobre todo cuando usamos métodos de amplificación tan sensibles como la *PCR-SPF10*, por lo que consideramos conveniente realizar más estudios de índole comparativa para estandarizar estas técnicas moleculares en la detección y tipificación de ADN-HPV.

El papel que pudiera adjudicársele a las infecciones por múltiples tipos de HPV dentro del proceso de carcinogénesis cervical aún está por definirse. Sin embargo, lo que sí está claro es que la mayor prevalencia la encontramos en la población joven con enfermedad cervical neoplásica en

estadio inicial. Por ello, es posible que estas múltiples infecciones por HPVVAR tengan cierto grado de implicación durante el desarrollo de la neoplasia, período en el que ocurren toda esa serie de alteraciones celulares involucradas en la transformación maligna.

Por lo tanto, nuestros resultados nos permiten confirmar que el método PCR-SPF10/LiPA muestra una elevada sensibilidad para detectar la presencia del ADN-HPV, aportando información sobre si se trata de tipos virales tanto de alto riesgo como de bajo riesgo. Los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas cervicales de nuestra serie comparten un proceso de carcinogénesis en el que se involucra comúnmente la presencia del HPV oncogénico, reiterando así su designación como agente causal necesario de la neoplasia invasora del cuello uterino.

CONCLUSIONES.

Basándonos en los hallazgos inmunohistoquímicos y moleculares obtenidos tras el estudio de muestras de tejido de cáncer de cuello uterino fijadas con formalina e incluidas en parafina, hemos llegado a las conclusiones que exponemos a continuación:

1.- En nuestra serie de cáncer de cuello uterino, el tipo histológico prevalente fue el carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado, mientras que el adenocarcinoma cervical no superó el 25%, hallazgo semejante a lo encontrado en la literatura. La edad promedio de presentación de esta neoplasia maligna fue 50 años.

2.- El tejido epitelial cervical benigno incluido como grupo control, mostró inmunoreactividad frente a los diferentes biomarcadores compatible con lo esperado y hallado en la literatura, permitiéndonos realizar la comparación de los hallazgos inmunohistoquímicos a nivel del tejido neoplásico.

3.- La inmunoexpresión de los biomarcadores en el tejido neoplásico comparada con el tejido cervical benigno confirmó que en la neoplasia cervical maligna ocurre una diversidad de interacciones y mecanismos moleculares alterados que conllevan a la desregulación del ciclo y a la proliferación celular. Estas alteraciones aparentemente son inducidas por las oncoproteínas E6 y E7 de los papilomavirus humanos de alto riesgo.

4.- Las células cervicales malignas inmortalizadas por la expresión de los oncogenes de HPVAR muestran una serie de alteraciones en los principales mecanismos reguladores del ciclo celular, alteraciones que se ven reflejadas en la inmunoexpresión aberrante de las ciclinas de la fase G1 (principalmente de la ciclina D1) y de los principales reguladores de la actividad kinasa dependiente de ciclinas, los cuales intervienen de forma directa o indirecta en la proliferación celular descontrolada. Así mismo, manifiestan modulación de las proteínas inductoras y efectoras de la muerte celular programada, que conlleva a la activación masiva del circuito de

señalización apoptótica, como una de las consecuencias del rápido crecimiento de la población tumoral.

5.- El cáncer de cuello uterino se caracteriza, al igual que otras neoplasias humanas, porque presenta alteraciones de importancia en las vías supresoras de tumor, fundamentalmente debido a la inactivación funcional de las proteínas Retinoblastoma y p53, ocasionada por los efectos de la interacción directa de las oncoproteínas virales. Los papilomavirus humanos oncogénicos tienen la habilidad de inducir la degradación rápida de pRb y p53 así como de otras proteínas celulares a través de la activación de la vía ubiquitina-proteosoma, luego de bloquear su actividad.

6.- El epitelio neoplásico cervical con infección por tipos específicos de HPVAR muestra alteraciones de relevante utilidad clínica, en conjunto con el resto de alteraciones celulares ya mencionadas, como la localización predominantemente citoplasmática y anormal de las moléculas de adhesión celular, lo que favorece el crecimiento neoplásico y la metástasis tumoral.

7.- La persistencia del ADN-HPVAR, específicamente los genotipos virales 16 y 18, en la serie de tumores estudiados ratifica las observaciones de otras investigaciones, según las cuales es el HPV el agente causal necesario e inductor del desarrollo de la neoplasia cervical, tanto de origen epidermoide como glandular. Nuestros resultados demuestran, una vez más, que una tasa mayor al 95% de los carcinomas de cuello uterino posee secuencias de ADN-HPV, confirmando así su estrecha relación etiopatogénica con la carcinogénesis cervical.

8.- Nuestros resultados confirman que el HPV16 es también en nuestro medio el tipo viral de alto riesgo más frecuentemente asociado al cáncer de cuello uterino y que, además, se presenta indistintamente tanto en carcinomas epidermoides como adenocarcinoma cervical, constituyendo también en este último un factor de riesgo clave para su desarrollo.

9.- Nuestros resultados nos permiten ratificar que el método *PCR-SPF10/LiPA* muestra una elevada sensibilidad para detectar de forma rápida

y sencilla la presencia del ADN-HPV, aportando información sobre si se trata de tipos virales tanto de alto riesgo como de bajo riesgo. El sistema *PCR-SPF10/LiPA* reduce la prevalencia de tipos de HPV desconocidos (X), permitiendo de esta forma establecer la verdadera prevalencia de los genotipos virales específicos.

10.- Los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas cervicales comparten un proceso de carcinogénesis multifactorial en el que se involucra comúnmente la presencia del HPV oncogénico, recalcando así su designación como agente causal necesario de la neoplasia invasora del cuello uterino.

ANEXOS.

Anexo N° 1. Plantilla de los carcinomas epidermoides diseñada para la elaboración de las micromatrices tisulares.

CARCINOMA EPIDERMÓIDE. N= 62.

B02-13757-2	B02-9546-9	B02-8552	B02-16661-3	B02-1887-2	93B-234584-5	75C-26611-3	B03-12926	B03-15242-1	B03-16267	B03-5050-2	B05-13615 Ca vesical
B00-17079	B00-4340	B02-298	B02-913-4	B02-4400-F	74C-25343-2	73C-24622-5	B04-2443	B04-3403	B03-420	B03-16-1	B05-5518 Linfoma
B01-19696	B01-9768-5	B01-6830-22	B01-3757	B01-4489	74C-24896-2	70C-21031-2	B04-19768	B04-5744-4	B04-14475-6	B04-19196-5	B05-2263 Ca mama
B00-10937	B01-19835	B01-20949	B01-21049	B01-14107	69C-18577-3	98B-330953-5	B05-11869	B05-9496-6	B05-8411-8	B04-16984	B05-12882-3 Cérvix normal
B00-21233	B00-14210-7	B00-13423	B00-9796	B00-2326	93B-238922-7	81C-33603-2	B05-12127	B04-13443-1	B04-10109		
B00-7648	B00-9444	B00-14052	B00-1349	B00-4529	84B-86660-2	71C-21489-4	B03-10772-3				
B05-14666-6 Ca vesical	B05-13256-1 Cérvix normal										

TESTIGOS

Anexo N° 2. Plantilla de los adenocarcinomas cervicales diseñada para la elaboración de las micromatrices tisulares.

ADENOCARCINOMA ENDOCERVICAL. n=19.

B05-12484-8	B05-7922-2	B02-11616-5	B00-5644		B05-13615 Ca vesical
B03-18565-1	B03-19078	B03-22020-11	B04-1747	B04-14819-1	B05-3593 Linfoma
B00-8150	B00-18596	B01-9301-2	B02-3661-3	B02-9719	B05-2263-5 Ca mama
79C-30935-5	83B-85102-1	90B-197724-13	B00-2954-A	B00-3957-A	B05-13198-1 Endocérvix normal
B05-14666-6 Ca vesical	B05-13256-1 Cervix normal				

TESTIGOS

Anexo N° 3. Plantilla de los tejidos cervicales normales diseñada para la elaboración de las micromatrices tisulares.

CUELLO UTERINO SIN LESIÓN NEOPLÁSICA. n= 22

05B-15716-6	05B-12882-1	05B-13198-1	05B-12930-2	
05B-13469-2	05B-14118-1	05B-17181-1	05B-15620-1	
05B-7880-2	05B-8334-2	05B-9989-2	05B-12930-1	
05B-5085-1	05B-17180-1	05B-6160-1	05B-6426-2	05B-13256
05B-3887-1	05B-2137-2	05B-2615-1	05B-3083	05B-7786-5
05B-3896-1 EXOCÉRVIX ó ENDOCÉRVIX				

TESTIGO

Anexo N° 4. Variables estudiadas e incluidas en la base de datos Access.

Nº de biopsia

Edad

Tipo de muestra: 1 tumor 2 control

Mucosa cervical: 1 exocérvix 2 endocérvix

Edad

Tamaño tumoral

Diagnóstico histopatológico (tipo histológico)

Carcinoma epidermoide. Grado de diferenciación

Adenocarcinoma cervical. Subtipo histológico

Biomarcadores: p53, MDM-2, pRb, localización pRb, p16, localización p16, p21, p27, ciclina D1, ciclina E, Bcl-2, Bax, CEA, CK, telomerasa, ubiquitina, cadherina-E, localización cadherina-E, CD44s, localización CD44s, CD44v3, localización CD44v3.

Nº BM

Amplificación *INF150*

Amplificación *SPF10*

HPV

Tipo viral

Infección única

Infección múltiple

Tipos virales co-infección

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ACLADIOUS NN, SUTTON C, MANDAL D, HOPKINS R, ZAKLAMA M, KITCHENER H. 2002. Persistent human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer*, 98:435-439.

AGOFF SN, LIN P, MORIHARA J, MAO C, KIVIAT N, KOUSTKY L. 2003. p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki.67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol.*, 16:665-673.

ALANI RM, MÜNGER K. 1998. Human papillomavirus and associated malignancies. *J Clin Oncol.*, 16:330-337.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALKER P. 2004. *Biología molecular de la célula*. 4º e. Ediciones Omega. Barcelona-España.

ALETRA C, RAVAZOULA P, SCOPA C, KOUNELIS S, SOTIROPOULOU G, KOUROUNIS G, LADOPOULOS I, BONIKOS D. 2000. Expression of bcl-2 and bax in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol.*, 21:494-498.

ALI-FEHMI R, QURESHI F, LAWRENCE WD, JACQUES SM. 2004. Apoptosis, proliferation, and expression of p53 and bcl-2 in endocervical glandular intraepithelial lesions and invasive endocervical adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol.*, 23:1-6.

ALIOUAT-DENIS C-M, DENDOUGA N, VAN DEN WYNGAERT I, GOEHLMANN H, STELLER U, VAN DEN DE WEYER, VAN SLYCKEN N, ANDRIES L, KASS S, LUYTEN W, JANICOT M, VIALARD JE. 2005. p53-independent regulation of p21WAF1/CIP1 expression and senescence by CHK2. *Mol Cancer Res.*, 3:1-8.

ALKUSHI A, IRVING J, HSU F, DUPUIS B, LIU CL, RIJN M, GILSKS CB. 2003. Immunoprofile of cervical and endometrial adenocarcinomas using a tissue microarray. *Virchows Arch* 442:271-277.

AMORTEGUI AJ, MEYER MP, ELBORNE VL, AMIN RM. 1995. p53, retinoblastoma gene product, and cyclin protein expression in human papillomavirus DNA-positive cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Mod Pathol.*, 8:907-912.

AN HJ, CHO NH, LEE SY, KIM IH, MUN MS, KIM SH, KIM JEONG J. 2003. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method. *Cancer*, 97:1672-1680.

ANDERSON S, SHERA K, IHLE J, BILLMAN L, GOFF B, GREER B, TAMIMI H, MCDUGALL J, KLINGELHUTZ A. 1997. Telomerase activation in cervical cancer. *Am J Pathol.*, 151:25-31.

ARELLANO M, MORENO S. 1997. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol.*, 29:559-573.

AVALL-LUNDQVIST EH, SILFVERSWARD C, ASPENBLAD U, NILSSON BR, AUER GU. 1997. The impact of tumour angiogenesis, p53 overexpression and proliferative activity (MIB-1) on survival in squamous cervical carcinoma. *Eur J Cancer*, 33:1799-1804.

BAE DS, CHO SB, KIM YJ, WHANG JD, SONG SY, PARK CS, KIM DS, LEE JH. 2001. Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. *Gynecol Oncol.*, 81:341-347.

BALEIRO-RODRIGUES C, LOPES C. 2004. E-cadherina, CD44 and CD44v6 in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical study. *Pathobiology*, 71:329-336.

BAMFORD PN, ORMEROD MG, SLOANE JP, WARBURTON MJ. 1983. An immunohistochemical study of the distribution of epithelial antigens in the uterine cervix. *Obstet Gynecol.*, 61:603-608.

BARTON SE, HOLLINGWORTH A, MADDOX PH, EDWARDS R, CUZICK J, MCCANCE DJ, JENKINS D, SINGER A. 1989. Possible cofactors in the etiology of cervical intraepithelial neoplasia. An immunopathologic study. *J Reprod Med.*, 34:613-616.

BASEMAN JG, KOUTSKY LA. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.*, 32S:S16-S24.

BENJAMIN I, SAIGO P, FINSTAD C, TAKAHASHI H, FEDERICI M, RUBIN SC, BOYD J. 1996. Expression and mutational analysis of p53 in stage IB and IIA cervical cancers. *Am J Obstet Gynecol.*, 175:1266-1271.

BEREZUTSKAYA E, BAGCHI S. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26S proteasome. *J Biol Chem.*, 272:30135-30140.

BEREZUTSKAYA E, YU B, MOROZOV A, RAYCHAUDHURI P, BAGCHI S. 1997. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ.*, 8:1277-1286.

BERNARD HU, CHAN SY, MANOS MM, ONG CK, VILL LL, DELIUS H. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.*, 170:1077-1085.

BERNARD H-U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.*, 32S:1-6.

BIBBO M, KLUMP W, DECECCO J, KOVATICH A. 2002. Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4a antigen in Thin-Layer liquid-based specimens. *Act Cytol.*, 46 25-29.

BITIREN M, CAKMAK EA, GOCMEN A, INALUZ SS, SARI I, KARAKOK M, AYDIN A. 2003. The relationship between expression of p53/bcl-2 and clinicopathological criteria in cervix squamous cell carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.*, 24:411-412.

- BLAUSTEIN'S PATHOLOGY OF THE FEMALE GENITAL TRACT. 1994. Ed. Kurman R. 4^o edition. Sprigger-Verlag, New York. Pp: 279-326.
- BORNER, C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.*, 39:615-647.
- BOSCH FX, DE SANJOSE S. 2003. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causalita. *J Natl Cancer Inst Monograf.*, 31:3-13.
- BOSCH FX, LORINCZ A, MUÑOZ N, MEIJER CJLM, SHAH KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.*, 55:244-265.
- BOSCH FX, MUÑOZ N. 2002. The etiology of cervical cancer. *Virus Res.*, 89:183-190.
- BOYER SN, WAZER DE, BAND V. 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradación of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteosome pathway. *Cancer Res.*, 56:4620-4624.
- BRANCA M, COSTA S, MARIANI L, SESTI F, AGAROSSO A, DI CARLO A, GALATI M, BENEDETTO A, CIOTTI M, GIORGI C, CRISCUOLO A, VALIERI M, FAVALLI C, PABA P, SANTINI D, PICCIONE E, ALDERISIO M, DE NUZZO M, DI BONITO L, SYRJANEN K. 2004. Assessment of risk factors and human papillomavirus (HPV) related pathogenetic mechanisms of CIN in HIV-positive and HIV-negative women. Study design and baseline data of the HPV-PathogensISS study. *Eur J Gynaecol Oncol*, 25:689-698.
- BRAVICCINI S, SANCHINI MA, AMADORI A, MEDRI L, SARAGONI L, CALISTRI D, MONTI F, VOLPI A, AMADORI D. 2005. Potencial of telomerase expresión and activity in cervical specimens as a diagnostic tool. *J Clin Pathol.*, 58:911-914.
- BRISSON J, BAIRATI I, MORIN C, FORTIER M, BOUCHARD C, CHRISTEN A, BERNARD P, ROY M, MEISELS A. 1996. Determinants of persistent detection of human papillomavirus DNA in the uterine cervix. *J Infect Dis.*, 173:794-799.
- BROCCHETTA M, CARBONE M. 2004. Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: molecular mecahnisms of malignant transformation. *Oncogene*, 23:6484-6491.
- BROWN DC, GATTER KC. 1990. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 17:489-503.
- BRYAN TM, CECH TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Jun;11(3):318-24.
- COUNTER CM, HAHN WC, WEI W, CADDLE SD, BEIJERSBERGEN RL, LANSDORP PM, SEDIVY JM, WEINBERGRA.1998.Dissociationamonginvitrotelomeraseactivity,telomeremaintenance,andcellularirmortalization. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 95:14723-14728.
- BRYCHTOVA S, BRYCHTA T, KOTRSOVA L, PILKA R, TICHY M, TICHA V, KOLAR Z. 2000. Expression of Bcl-2 in dysplastic and neoplastic cervical lesions in relation to cell proliferation and HPV infection. *Neoplasma*, 47:143-147.

- BURD EM. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiol Reviews*, 16:1-17. population and relationship to European, African, and native American variants. *Virology*, 319:315-323.
- BURK RD, KELLY P, FELDMAN J, BROMBERG J, VERMUND SH, DEHOVITZ JA, LANDESMAN SH. 1996. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* 23:333-341.
- CALLEJA-MACIAS IE, KALANTARI M, HUH J, ORTIZ-LOPEZ R, ROJAS-MARTINEZ A, GONZALEZ-GUERRERO JF, WILLIAMSON A-L, HAGMAR B, WILEY DJ, VILLARREAL L, BERNARD H-U, BARRERA-SALDAÑA HA. 2004. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican
- CARBONE M, KLEIN G, GRUBER J, WONG M. 2004. Modern criteria to establish human cancer etiology. *Cancer Res*, 64:5518-5524.
- CARICO E, ATLANTE M, BUCCI B, NOFRONI I, VECCHIONE A. 2001. E-cadherina and alfa-catenin expresión during tumor progresión of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.*, 80:156-161.
- CARRILHO, C; GOUVEIA, P; CANTEL, M; ALBERTO, M; BUAR, J; DAVID, L. 2003. Characterization of human papillomavirus infection, p53 and ki-67 expression in cervix cancer of Mozambican women. *Pathol Res Pract.*; 199(5):303-11.
- CARRILHO C, ALBERTO M, BUANE L, DAVID L. 2004. Keratins 8, 10, 13, and 17 are useful markers in the diagnosis of human cervix carcinomas. *Hum Pathol*, 35:546-551.
- CASTELLSAGUÉ X, BOSCH FX, MUÑOZ N. 2002. Enviromental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research*, 89:191-199.
- CASTELLSAGUÉ X, MUÑOZ N. 2003. Co-factors in human papillomavirus carcinogenesis-Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monographs*, 31:20-28.
- CASTELLSAGUÉ X, DIAZ M, DE SANJOSE S, MUNOZ N, HERRERO R, FRANCESCHI S, PEELING RW, ASHLEY R, SMITH JS, SNIJDERS PJ, MEIJER CJ, BOSCH FX. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER MULTICENTER CERVICAL CANCER STUDY GROUP. 2006. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst.*, 98:303-15.
- CASTLE PE, GIULIANO AR. 2003. Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients-assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl cancer Inst Monogr.*, 31:29-34.
- CASTLE PE, SCHIFFMAN M, GRAVITT P, KENDALL H, FISHMAN S, DONG H, HILDESHEIM A, HERRERO R, BRATTI MC, SHERMAN ME, LORINCZ A, SHUSSLER JE, BURK R. 2002. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol.*, 68:417-423.
- CASTLE PE, SCHIFFMAN M, HERRERO R, HILDESHEIM A, RODRÍGUEZ AC, BRATTI MC, SHERMAN ME, WACHOLDER S, TARONE R, BURK RD. 2005. A prospective study of age trends in cervical

human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacoste, Costa Rica. *J Infect Dis.*, 191:1808-1816.

CASTRILLON DH, LEE KR, NUCCI MR. 2002. Distinction between endometrial and endocervical adenocarcinoma: an immunohistochemical study. *Int J Gynecol Pathol.*, 21:4-10.

CHAN SY, DELIUS H, HALPERN AL, BERNARD HU. 1995. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol.*, 69:3074-3083.

CHAOUKI N, BOSCH FX, MUÑOZ N, MIEJER CJ, EL GUEDDARI B, EL GAHAZI A, DEACON J, CASTELLSAGUÉ X, WALBOOMERS JM. 1998. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. *Int J Cancer* 75:546-554.

CHEN CL, LIU SS, IP SM, WONG LC, NG TY, NGAN HY. 2003. E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer.*, 39:517-23.

CHEN, H; PARADIES,, NE; FEDOR-CHAIKEN, M; BRACKENBURY, R. 1997. E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *J Cell Sci.*, 110 (Pt 3):345-356.

CHENE P. 2003. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3:102-109.

CHEUNG A, CHIU P, TSUN K, KHOO U, LEUNG B, NGAN H. 2004. Chromosome *in situ* hybridisation, Ki-67, and telomerase immunocytochemistry in liquid based cervical cytology. *J Clin Pathol.*, 57:721-727.

CHEUNG TH, CHUNG TKH, LO WK, YU MY, KRAJEWSKI S, REED JC, WONG YF. 2002. Apoptosis-related proteins in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.*, 86:14-18.

CHEUNG TH, YU MM, LO KW, YIM SF, CHUNG TK, WONG YF. 2001. Alteration of cyclin D1 and CDK4 gene in carcinoma of uterine cervix. *Cancer Letter*, 166:199-206.

CHEW GK, CRUICKSHANK ME, ROONEY PH, MILLER ID, PARKIN DE, MURRAY GI. 2005. Human papillomavirus 16 infection in adenocarcinoma of the cervix. *Br J Cancer.* 93:1301-1304.

CHICHAREON S, HERRERO R, MUÑOZ N, BOSCH FX, JACOBS MV, DEACON J, SANTAMARIA M, CHONGSUVIVATWONG V, MEIJER CJLM, WALBOOMERS JMM. 1998. Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case-control study. *J Nat Cancer Inst.*, 90:50-57.

CHO NH, KIM YT, KIM JW. 1997. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.*, 16:339-347.

CHO NH, KIM YT, KIM JW. 2002. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus-cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Medical Journal*, 43:722-728.

CHOI Y-D, JUNG W-W, NAM J-H, CHOI H-S, PARK C-S. 2005. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA chip and sequencing. *Gynecol Oncol.*, 98:369-375.

CHUNG TKH, CHEUNG TH, LO WK, YIM SF, YU MY, KRAJEWSKI S, REED JC, WONG YF. 2002. Expression of apoptosis regulators and significance in cervical cancer. *Cancer Lett.*, 180:63-68.

CINA SJ, RICHARDSON MS, AUSTIN RM, KURMAN RJ. 1997. Immunohistochemical staining for Ki-67 antigen, carcinoembryonic antigen, and p53 in the differential diagnosis of glandular lesions of the cervix. *Mod Pathol.*, 10:176-180.

CLARKE B, CHETTY R. 2001. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.*, 82:238-246.

CLIFFORD GM, GALLUS S, HERRERO R, MUNOZ N, SNIJDERS PJ, VACCARELLA S, ANH PT, FERRECCIO C, HIEU NT, MATOS E, MOLANO M, RAJKUMAR R, RONCO G, DE SANJOSE S, SHIN HR, SUKVIRACH S, THOMAS JO, TUNSAKUL S, MEIJER CJ, FRANCESCHI S. 2005. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*, 366:991-998.

CLIFFORD GM, SMITH JS, PLUMMER M, MUÑOZ N, FRANCESCHI S. 2003. Human papillomavirus types in cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British J Cancer*, 88:63-73.

COFFMAN FD, STUDZINSKI GP, 1999. Differentiation-related mechanisms which suppress DNA replication. *Exp Cell Res.*, 248:58-73.

COTTAGE A, DOWEN S, ROBERTS I, PETT M, COLEMAN N, STANLEY M. 2001. Early genetic events in HPV immortalised keratinocytes. *Genes, Chromosomes Cancer*, 30:72-79.

CRUZ MR, CERQUEIRA DM, CRUZ WB, CAMARA GNL, BRÍGIDO MM, SILVA EO, CARVALHO LGS, MARTINS CRF. 2004. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Men Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 99:281-282.

CULLEN AP, REID R, CAMPION M, LORINCZ AT. 1991. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol.*, 65:606-612.

CUSCHIERI KS, CUBIE HA, WHITLEY MW, SEAGAR AL, ARENDS MJ, MOORE C, GILKISSON G, MCGOOGAN E. 2004. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol.*, 57(1):68-72.

CUSCHIERI KS, CUBIE HA. 2005. The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *J Clin Virol.*, 32S:34-42.

CUSHIERI KS, CUBIE HA, WHITLEY AL, SEAGAR AL, ARENDS MJ, MOORE C, GILKISSON G, MCGOOGAN E. 2004. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol.*, 57:68-72.

DALSTEIN V, RIETHMULLER D, PRÉTET J-L, LE VAIL CARVAL K, SAUTIÈRE J-L, CARBILLET J-P, KANTELEIP B, SCHAAL J-P, MOUGIN C. 2003. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106:396-403.

DANIEL B, RANGARAJAN A, MUKHERJEE G, VALLIKAD E, KRISHNA S. 1997. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J Gen Virol.*, 78:1095-1101.

DARAĪ E, WALKER-COMBROUZE F, BÉNIFLA J-L, HÉNIN D, FELDMANN G, MADELENAT P, SCOAZEC J-Y. 2000. E-cadherin and CD44 expression in cervical intraepithelial neoplasia: comparison between HIV-positive and HIV-negative women and correlation with HPV status. *Gynecol Oncol.*, 76:56-62.

DAVIES R, HICKS R, CROOK T, MORRIS J, VOUSDEN K. 1993. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol.*, 67:2521-2528.

DE BOER, C; VAN DORST, E; VAN KRIEKEN, H; JANSEN-VAN RHIJN, C; WARNAAR, S; JAN FLEUREN, G; LITVINOV, S. 1999. Changing roles of cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix. *Am J Pathol.* 155:505-515.

DE SANJOSÉ S, ALMIRALL R, LLOVERAS B, FONT R, DÍAZ M, MUÑOZ N, CATALA I, MEIJER CJ, SNIJDERS PJ, HERRERO R, BOSCH FX. 2003. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis.*, 30:788-793.

DE SANJOSÉ S, VALLS I, PAZ CANADAS M, LLOVERAS B, QUINTANA MJ, SHAH KV, BOSCH FX. 2000. Human papillomavirus and human immunodeficiency virus infections as risk factors for cervix cancer in women prisoners. *Med Clin (Barc)*, 115:81-84.

DE SANJOSÉ S. 2005. Epidemiología de las infecciones por Virus Papiloma Humano (VPH) y sus lesiones asociadas. Seminario: HPV y Patología Cervical. Valencia-España, 25 de febrero.

DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZUR HAUSEN H. 2004. Classification of papillomavirus. *Virology*, 324:17-27.

DEL REFUGIO GONZÁLEZ-LOSA M, LAVIADA MIER Y TERAN MA, PUERTO-SOLIS M, GARCÍA-CARRANCA A. 2004. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *J Clin Virol.*, 29:95-98.

DELLAS A, SCHULTHEISS E, ALMENDRAL A, GUDAT F, OBERHOLZER M, FEICHTER G, MOCH H, TORHORST J. 1997. Altered expression of mdm-2 and its association with p53 protein status, tumor-cell-proliferation rate and prognosis in cervical neoplasia. *Int J Cancer*, 74:421-425.

DELLAS A, SCHULTHEISS E, ALMENDRAL AC, GUDAT F, OBERHOLZER M, FEICHTER G, MOCH H, TORHORST J. 1997. Altered expression of mdm-2 and its association with p53 protein status, tumor-cell-proliferation rate and prognosis in cervical neoplasia. *Int J cancer*, 74:421-425.

DELLAS A, SCHULTHEISS E, ALMENDRAL AC, GUDAT F, OBERHOLZER M, FEICHTER G, MOCH H, TORHORST J. 1997. Altered expression of mdm-2 and its association with p53 protein status, tumor-cell-proliferation rate and prognosis in cervical neoplasia. *Int J cancer*, 74:421-425.

DELLAS A, SCHULTHEISS E, LEIVAS MR, MOCH H, TORHORST J. 1998. Association of p27Kip1, cyclin E and c-myc expression with progression and prognosis in HPV-positive cervical neoplasms. *Anticancer Res.*, 18:3991-3998.

DEMERS GW, ESPLING E, HARRY JB, ETSCHIED BG, GALLOWAY DA. 1996. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. *J Virol.*, 70:6862-6869.

DiMAIO D, MATTOON D. 2001. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, 20:7866-7873.

DIMITRAKAKIS C, KYMIONIS G, DIAKOMANOLIS E, PAPASPYROU I, RODOLAKIS A, ARZIMANOGLIOU I, LEANDROS E, MICHALAS S. 2000. The possible role of p53 and Bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol.*, 77:129-136.

DOCUMENTO DE CONSENSO DE LA SEGO. 2003. www.aepcc.org/congreso/pdf/CONS-VPH.

DOORBAR J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J Virol.*, 32S: 7-15.

DOWDY SF, HINDS PW, LOUIE K, REED SI, ARNOLD A, WEINBERG RA. 1993. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*, 73:499-511.

DURONIO RJ, BROOK A, DYSON N, O'FARRELL PH. 1996. E2F-induced S phase requires cyclin E. *Genes&Development*, 10:2505-2513.

DYSON N, HOWLEY PM, MUNGER K, HARLOW E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243:934-937.

EL-DEIRY WS, HARPER JW, O'CONNOR PM, VELCULESCU VE, CANMAN CE, JACKMAN J, PIETENPOL JA, BURREL M, HILL DE, WANG Y. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 54:1169-1174.

ERLANDSSON F, WÄHLBY C, EKHOLM-REED S, HELLSTRÖM A-C, BENGTSSON E, ZETTENBERG A. 2003. Abnormal expression pattern of cyclin E in tumor cells. *Int J Cancer*, 104:369-375.

ESTELLER M. 2002. Alteracions in DNA methylation and chromatin. INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON CANCER. NEW TRENDS IN CANCER FOR THE 21ST CENTURY. Noviembre 10-13, Valencia-España.

EVANDER M, FRAZER IH, PAYNE E, QI YM, HENGST K, MCMILLAN NAJ. 1997. Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomavirus. *J Virol.*, 71:2449-2456.

EVANS MF, COOPER K. 2004. Human papillomavirus integration: detection by *in situ* hybridization and potential clinical application. *J Pathol.*, 202:1-4.

FADEEL B, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. 1999. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?. *Bio Biophys Res Comm.*, 266:699-717.

FEHRMANN F, KLUMPP D, LAIMINIS L. 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol.*, 77:2819-2831.

FEHRMANN F, LAIMINS LA. 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiation epithelial cells malignant transformation. *Oncogene*, 22:5201-5207.

- FELIX, JC; LONKY, NM; TAMURA, K; YU, KJ; NAIDU, Y; LAI, CR; LONKY, SA. 2002. Aberrant expression of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia correlates a false-negative Papanicolaou smear. *Am J Obstet Gynecol.*, 186:1308-1314.
- FERENCZY A, FRANCO E. 2001. Cervical-cancer screening beyond the year 2000. *Lancet Oncol.*, 2:27-32.
- FIEDLER M, MULLER-HOLZNER E, VIERTLER HP, WIDSCHWENDTER A, LAINCH PFISTER G, SPODEN GA, JANSEN-DURR P, ZWERSCHKE W. 2004. High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb-levels in cervical biopsies. *FASEB J*, 18:1120-1122.
- FLORES E, ALLEN-HOFFMANN L, LEE D, LAMBERT PF. 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol.*, 74:6622-6631.
- FRATTINI MG, LIM HB, LAIMINS LA. 1996. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:3062-3067.
- FUNKJO, WAGA S, HARRY JB, ESPLING E, STILLMAN B, GALLOWAY DA. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA HPV-16 E7 oncoprotein. *Gen Dev.*, 11:2090-2100.
- FURUMOTO H, IRAHARA M. 2002. Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. *J Med Invest.*, 49:124-133.
- GAGNON S, HANKINS C, TREMBLAY C, FOREST P, POURREAUX K, COUILLÉE F. 2004. Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *JID*, 190:1575-1585.
- GALLOWAY DA, MCDUGALL JK. 1996. The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Semin Cancer Biol.*, 7:309-315.
- GARCIA-CABEZAS MA, PERNA C, HARDISSON DA, BRIONES I, JIMÉNEZ-HEFFERNAN J, SUÁREZ A. 2005. Detection of HPV in tissue biopsies: a comparative study of two versions of INNO-LiPA systems and MY09/11 primers. *Virchows Archiv.*, 447:471. P755.
- GARCÍA-CLOSAS R, CASTELLSAGUÉ X, BOSCH FX, GONZÁLEZ CA. 2005. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer*, 117:629-637.
- GENESER F. 2000. Capítulo 5: De las células a los tejidos. *Histología*. 3º e. Editorial Médica Panamericana. Madrid. Pp:154-155.
- GEWIN L, GALLOWAY DA. 2001. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol.*, 75:7198-201.
- GIANNOUDIS A, HERRINGTON CS. 2000. Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer*, 89:1300-1307.

GIARNIERI E, MANCICNI R, PISANI T, ALDERISIO M, VECCHIONE A. 2000. Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax expression in invasive and *in situ* squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.*, 6:3600-3606.

GIARRE M, CALDEIRA S, MALANCHI I, CICCOLINI F,LEAO MJ, TOMMASIINO M. 2001. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol.*, 75:4705-4712.

GIROGLOU T, FLORIN L, SCHÄFER F, STREECK RE, SAPP M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol.*, 75:1565-1570.

GIULIANO AR, PAPPENFUSS M, DE GALAZ EM, FENG J, ABRAHAMSEN M, DENMAN C, DE ZAPIEN JG, NAVARRO HENZE JL, GARCIA F, HATCH K. 2004. Risk factors for squamous intraepithelial lesions (SIL) of the cervix among women residing at the US-Mexico border. *Int J Cancer*, 109:112-118.

GLADDEN AB, DIEHL JA. 2005. Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem.*, 96:906-913.

GONZÁLEZ SL, STREMLAU M, HE X, BASILE JR, MÜNGER K. 2001. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol.*, 75:7583-7591.

GOODMAN, A; WUILBUR, D. 2003. Case 32-2003: A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear. *N Engl J Med.*, 349:1555-1564.

GRACE B, SHALINI V, LEKHA S, DEVARAJ N, DEVERAJ H. 2003. Co-overexpression of p53 and Bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.*, 91:51-58.

GRAVITT PE, PEYTON CL, APPLE RJ, WHEELER CM, 1998. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization line blot detection method. *J Clin Microbiol.*, 36:3020-3027.

GREIDER CW.1996. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem.*, 65:337-65.

GUERRERO E, DANIEL RW, BOSCH X, CASTALLSAGUÉ X, MUÑOZ N, GILI M, VILADIU P, NAVARRO C, ZUBIRI ML, ASCUNCE N, GONZALEZ LC, TAFUR L, IZARZUGAZA I, SHAH KV. 1992. Comparison of ViraPap, Hybridization, and Polymerase Chain Reaction methods for Human Papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J Clin Microbiol.*, 30:2951-2959.

HAGLUND K, DIKIC I. 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.*, 24:3353-3359.

HAHN WC, WEINBERG RA. 2002. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.*, 347:1593-1603.

HAMMARSTRÖM S. 1999. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Sem Cancer Biol.*, 9:67-81.

- HAN AC, EDELSON MI, PRALTA SOLER A, KNUDSEN KA, LIFSCHITZ-MERCER B, CZERNOBILSKY B, ROSENBLUM NG, SALAZAR H. 2000. Cadherin expression in glandular tumors of the cervix. *Cancer*, 89:2053-2058.
- HANAHAHAN D, WEINBERG R. 2000. The hallmark of cancer. *Cell*, 100:57-70.
- HARLEY CB. 2002. Telomerase is not an oncogene. *Oncogene*, 21:494-502.
- HAUPT S, BERGER M, GOLDBERG Z, HAUPT Y. 2003. Apoptosis-the p53 network. *J Cell Sci.*, 116:4077-4085.
- HAUPT Y, MAYA R, KAZAZ A, OREN M. 1997. Mdm-2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387:296-299.
- HAWLEY-NELSON P, VOUSDEN KH, HUBBERT NL, LOWY DR, SCHILLER JT. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.*, 12:3905-3910.
- HEATLEY MK. 2004. E-cadherina and expresión in normal and neoplastic endocervical glandular epithelium. *Histopathology*, 45:201-202.
- HEILMANN V, KREIENBERG R. 2002. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Curr Womens Health Rep.*, 2:27-33.
- HENGSTERMANN A, LINARES LK, CIECHANOVER A, WHITAKER NJ, SCHEFFNER M. 2001. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells.
- HELLAND A, HOLM R, KRISTENSEN G, KAERN J, KARLSEN F, TROPE C, NESLAND JM, BORRESEN AL. 1993. Genetic alterations of the *TP53* gene, p53 protein expression and HPV infection in primary cervical carcinomas. *J Pathol.*, 171:105-114.
- HERNÁNDEZ BY, MCDUFFIE K, WILKENS LR, KAMEMOTO L, GOODMAN MT. 2003. Diet and premalignant lesions of the cervix: evidence of a protective role for folate, riboflavina, thiamine, and vitamin B12. *Cancer Causes Control*, 14:859-870.
- HERRERO R, HILDESHEIM A, BRATTI C, SHERMAN ME, HUTCHINSON M, MORALES J, BALMACEDA J, GREENBERG MD, ALFARO M, BURK RD, WACHOLDER S, PLUMMER M, SCHIFFMAN M. 2000. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.*, 92:464-474.
- HICKMAN ES, BATES S, VOUSDEN KH. 1997. Perturbation of the p53 response by human papillomavirus type 16 E7. *J Virol.*, 71:3710-3718.
- HICKMAN ES, PICKSLEY SM, VOUSDEN KH. 1994. Cells expression HPV16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced p53 activation. *Oncogene*, 9:2177-2181.
- HIDALGO A, PIÑA P, GUERRERO G, LAZOS M, SALCEDO M. 2003. A simple method for the construction of small format tissue arrays. *J Clin Pathol.*, 56:144-146.

HIETALA KA, KOSMA V-M, SYRJÄNEN K, SYRJÄNEN K, KELLOKOSKI JK. 1997. Correlation of MIB-1 antigen expression with transcription factors Skn-1, Oct-1, AP-2, and HPV type in cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol.*, 183:305-310.

HILDESHEIM R, HERRERO R, CASTLE PE, WACHOLDER S, BRATTI MC, SHERMAN ME, LORINCZ AT, BURK RD, MORALES J, RODRÍGUEZ AC, HELGESEN K, ALFARO M, HUTCHINSON M, BALMACEDA I, GREENBERG M, SCHIFFMAN M. 2001. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer*, 84:1219-1226.

HIROHASHI S. 1998. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol.*, 153:333-339.

HO GY, BIERMAN R, BEARDSLEY L, CHANG CJ, BURK RD. 1998a. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.*, 338:423-428.

HO GY, KADISH AS, BURK RD, BASU J, PALAN PR, MIKHAIL M, ROMNEY SL. 1998b. HPV-16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 78:281-285.

HONDA R, YASUDA H. 1999. Association of p19ARF with Mdm-2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J*, 18:22-27.

HONDA S. 1992. Immunohistochemical study on the expression of E-cadherina in normal tissues and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 44:517-523.

HORNER SM, DEFILIPPIS RA, MANUELIDIS L, DIMAIO D. 2004. Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent, telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol.*, 78:4064-4073.

HSU SM, RAINE L, FANGER H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.*, 29:577-580.

HUANG S, AFONINA I, MILLER BA, BECKMANN AM. 1997. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer*, 70:408-411.

HUANG FY, KWOK YK, LAU ET, TANG MH, NG TY, NGAN HY. 2005. Genetic abnormalities and HPV status in cervical and vulvar squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet.*, 157:42-45.

HUANG L-W, CHAO S-L, CHEN P-H, CHOU H-P. 2004. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *J Clin Virol.*, 29:271-276.

HUANG LW, CHOU YY, CHAO SL, CHEN TJ, LEE TT. 2001. p53 and p21 expression in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix: overexpression of p53 predicts poor disease outcome. *Gynecol Oncol.*, 83:348-354.

HUBBARD RA. 2003. Human Papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab med* 127:940-945.

- HUBBERT NL, SEDMAN SA, SCHILLER JT. 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol.*, 66:6237-6241.
- HUBERT P, CABERG J-H, GILLES C, BOUSARGHIN L, FRANZEN-DETROOZ E, BONIVER J, DELVENNE P. 2005. E-cadherina-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre) neoplastic lesions. *J Pathol.*, 206:346-355.
- HUIBREGTSE JM, SCHEFFNER M, BEAUDENON S, HOWLEY PM. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 92:2563-2567.
- HUNT CR, HALE RJ, BUCKLEY CH, HUNT J. 1996. p53 expression in carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol.*, 49:971-974.
- HUSNJAK K, GRCE M, MAGDI' C L, PVELI' C K. 2000. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*, 88:125-134.
- IFTNER T, VILLA LL. 2003. Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr.*, 31:80-88.
- INNOCENTE SA, ABRAHAMSON JLA, COGSWELL JP, LEE JM. P53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:2147-2152.
- INOUE, M; OGAWA, H; MIYATA, M; SHIOZAKI, H; TANIZAWA, O. 1992. Expression of E-cadherin in normal, benign, and malignant tissues of female genital organs. *Am J Clin Pathol.*, 98:76-80.
- ISAKA K, NISHI H, OSAKABE Y, MIYATA M, HOKAMURA M, NAKADA T, ITOKAZU O, TAKAYAMA M. 2004. Establishment of a HPV and p53-mutation-negative human cell line (CA) derived from a squamous carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Onclo.*, 92:15-21.
- IVANOV DB, PHILIPPOVA MP, TKACHUK VA. 2001. Structure and functions of classical cadherins. *Biochem.*, 66:1174-1186.
- JARBOE EA, LIAW K-L, THOMPSON LC, HEINZ DE, BAKER PL, MCGREGOR JA, DUNN T, WOODS JE, SHROYER KR. 2002. Analysis of telomerase as a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and carcinoma. *Oncogene*, 21:664-673.
- JARBOE EA, THOMPSON LC, HEINZ DE, MCGREGOR JA, SHROYER KR. 2004. Telomerase and human papillomavirus as diagnostic adjuncts for cervical dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol.*, 35:396-402.
- JEFFERS, MD; PAXTON, J; BOLGER, B; RICHMOND, JA; KENNEDY, JH; MCNICOL, AM. 1997. E-cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and *in situ* carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.*, 64:481-6.
- JEMAL A, MURRAY T, SAMUELS A, GHAFOR A, WARD E, THUN MJ. 2003. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin.*, 53:5-26.

JEON S, ALLEN-HOFFMANN BL, LAMBERT P. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.*, 69:2989-2997.

JOHNSON DG, WALKER CL . 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 39:295-312.

JONES DL, ALANI RM, MUNGER K. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 11:2101-2111.

JORBOE EA, THOMPSON C, HEINZ D, MCGREGOR JA, SHROYER KR. 2004. Telomerase and human papillomavirus as diagnostic adjuncts for cervical dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol.*, 35:396-402.

KAO WH, BEAUDENON SL, TALIS AL, HUIBREGTSE JM, HOWLEY PM. 2000. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *J Virol.*, 74:6408-6417.

KEATING, JT; CVIKO, A; RIETHDORF, S; RIETHDORF, L; QUADE, B; SUN, D; DUENSING, S; SHEETS, E; MUNGER, K; CRUM, C. 2001. Ki-67, Cyclin E and p16INK4 are complementary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 25(7): 884-891.

KELLY ML, KEIGER KE, LEE CJ, HUIBREGTSE JM. 2005. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *J Virol.*, 79:3737-47.

KERR JF, WINTERFORD CM, HARMON BV. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73:2013-2026.

KHLEIF SN, DEGREGORY J, YEE C, OTTERSON G, KAYE F, NEVINS J, HOWLEY P. 1996. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:4350-4354.

KIM N, PIATYSZEK M, PROWSE K, HARLEY C, WEST M, HO P, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266:2011-2015.

KIM Y-T, KYOUNG CHOI E, HOON CHO N, HUNG KO J, ICK YANG W, WOOK KIM J, HO LEE S. 2000. Expression of cyclin E and p27(Kip1) in cervical cancer. *Cancer Lett.*, 29:41-50.

KIM, YT; CHO, NH; PARK, SW; KIM, JW. 1998. Underexpression of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors in cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 71: 38-45.

KLAES R, WOERNER SM, RIDDER R, WENTZENSEN N, DUERST M, SCHNEIDER A, LOTZ B, MELSHEIMER P, VON KNEBEL DOEBERITZ M. 1999. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.*, 59:6132-6136.

KLAES, R; FRIEDRICH, T; SPITKOVSKY, D; RIDDER, R; RUDY, W; PETRY, U; DALLENBACH-HELLWEG, G; SCHMIDT, D; KNEBEL DOEBERITZ, M. 2001. Overexpression on p16INK4A as specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uterine. *Int J Cancer*, 92:276-284.

KLETER B, VAN DOORN L-J, SCHRAUWEN L, MOLIJN A, SASTROWIJOTO S, TER SCHEGGET J, LINDEMAN J, TER HARMSEL B, BURGER M, QUINT W. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.*, 37:2508-2517.

KLINGELHUTZ A, FOSTER S, MCDUGALL J. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380:79-82.

KOFF A, CROSS F, FISHER A, SCHUMACHER J, LEGUELLEC K, PHILIPPE M, ROBERTS JM. 1991. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell*, 66:1217-1228.

KOKAWA K, SHIKONE T, OTANI T, NAKANO R. 1999. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer*, 85:1799-1809.

KONONEN J, BUBENDORF L, KALLIONIEMI A, BARLUND M, SCHRAML P, LEIGHTON S, TORHORST J, MIHATSCH MJ, SAUTER G, KALLIONIEMI OP. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.*, 4:844-847.

KOUTSKY L. 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.*, 102:3-8.

KRÜGER-KJAER S, CHACKERIAN B, VAN DEN BRULE AJ, SVARE EI, PAULL G, WALBOMERS JM, SCHILLER JT, BOCK JE, SHERMAN ME, LOWY DR, MEIJER CL. 2001. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 10:101-106.

KRÜGER-KJAER S, VAN DEN BRULE JC, PAULL G, SVARE EI, SHERMAN ME, THOMSEM BL, SUNTUM M, BOCK JE, POLL PA, MEIJER CJLM. 2002. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ*, 325:572-578.

KRÜGER-KJAER S, CHACKERIAN B, VAN DEN BRULE AJ, SVARE EI, PAULL G, WALBOOMERS JM, SCHILLER JT, BOCK JE, SHERMAN ME, LOWY DR, MEIJER CL. 2001. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 10:101-106.

KRUSE A-J, BAAK JP, DE BRUIN PC, JIWAM, SNIJDERS W, BOODT PJ, FONS G, HOUBEN PWH, THE HS. 2001. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol.*, 193:48-54.

KU JL, KIM WH, PARK HS, KANG SB, PARK JG. 1997. Establishment and characterization of 12 uterine cervical-carcinoma cell lines: common sequence variation in the E7 gene of HPV-16-positive cell lines. *Int J Cancer*, 72:313-320.

- KULASINGAM SL, HUGHES JP, KIVIAT NB, MAO C, WEISS NS, KUYPERS JM, KOUTSKY LA. 2002. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA*. 288:1749-57.
- KURVINEN K, SYRJANEN K, SYRJANEN S. 1996. p53 and bcl-2 proteins as prognostic markers in human papillomavirus-associated cervical lesions. *J Clin Oncol*, 14:2120-2130.
- LAUKKANEN P, KOSKELA P, PUKKALA E, DILLNER J, LAARA E, KNEKT P, LEHTINEN M. 2003. Time trends in incidence and prevalence of human papillomavirus type 6, 11 and 16 infections in Finland. *J Gen Virol.*, 84:2105-2109.
- LAZCANO-PONCE E, HERRERO R, MUÑOZ N, CRUZ A, SHAH KV, ALONSO P, HERNANDEZ P, SALMERÓN J, HERNÁNDEZ M. 2001. Epidemiology of HPV infection among mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*, 91:412-420.
- LEVI J, KLETER B, QUINT W, FINK M, CANTO C, MATSUBARA R, LINHARES I, SEGURADO A, VANDERBORGHT B, NETO J, VAN DOORN L. 2002. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol.*, 40:3341-3345.
- LI R, WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B. 1994. Differential effects by the p21CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*, 6:534-537.
- LI T-T, ZHAO L-N, LIU Z-G, HAN Y, FAN D-M. 2005. Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World Gastroenterol* 11:931-937.
- LIANG XH, MUNGAL S, AYSCUE A, MEISSNER JD, WODNICKI P, HOCKENBERY D, LOCKETT S, HERMAN B. 1995. Bcl-2 protooncogene expression in cervical carcinoma cell lines containing inactive p53. *J Cell Biochem.*, 57:509-521.
- LIE AK, SKARSVAG S, SKOMEDAL H, HANGEN OA, HOLM R. 1999. Expression of p53, MDM-2, and p21 proteins in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and relationship to human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Pathol.*, 18:5-11.
- LIN H, MOH J-S, OU Y-C, SHEN S-Y, TSAI Y-M, CHANGCHIEN C-C, LIU JM, MA Y-Y. 2005. A simple method for the detection and genotyping of high-risk human papillomavirus using seminested polymerase chain reaction and reverse hybridization. *Gynecol Oncol.*, 96:84-91.
- LIU SS, TSANG BK, CHEUNG AN, XUE WC, CHENG DK, NG TY, WONG LC, NGAN HY. 2001. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer*, 37:1104-1110.
- LLORCA J, RODRÍGUEZ-CUNDIN P, DIERSSEN-SOTOS T, PRIETO-SALCEDA D. 2005. Cervical cancer mortality is increasing in Spanish women younger than 50. *Cancer Letter*, xx:1-5
- LEWIS MJ. 2004. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y del Caribe. Biblioteca Sede de la Organización Panamericana de la Salud. www.paho.org.

LODISH H, ARNOLD B, MATSUDAIRA P, KAISER CA, KRIEGER M, SCOTT MP, ZIPURSKY SL, DARNELL L. 2004. *Biología celular y molecular*. 5º e. Editorial Médica Panamericana. Madrid-España.

LONGWORTH MS, LAIMINS LA. 2004a. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:362-372.

LONGWORTH MS, LAIMINS LA. 2004b. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.*, 78:3533-3541.

LONGWORTH MS, WILSON R, LAIMINS LA. 2005. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J.*, 24:1821-1830.

LORINCZ AT. 1996. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res.*, 22:629-636.

LUKAS J, MÜLER H, BARTKOVA J, SPITKOVSKY D, KJERULFF AA, JANSEN-DÜRR P, STRAUSS M, BARTEK J. 1994. DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol.*, 125:625-638.

MALUMBRES M, ORTEGA S, HUNT SL, SOTILLO R, MARTÍN J, ODAJIMA J, MARTÍN A, DUBUS P, BARBACID M. 2002. Driving the cell cycle to cancer. In *NEW TRENDS IN CANCER FOR THE 21ST CENTURY*. Noviembre 10-13, Valencia-España.

MANOS MM, TING Y, WRIGHT DK, LEWIS AJ, BROKER TR, WOLINSKY SM. 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for detection of genital papillomavirus. *Cancer Cells*, 29:20-27.

MANTOVANI F, BANKS L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, 20:7874-7887.

MARTIN LG, DEMERS GW, GALLOWAY DA. 1998. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J Virol.*, 72:975-985.

MARRECO CERQUEIRA D, NOCETI DE LIMA CAMARA G, ROJAS DA CRUZ M, OLIVEIRA SILVA E, DE MACEDO BRÍGIDO M, GONCALVES DE SOUZA CARVALHO L, FERNANDES MARTINS CR. 2003. Variants of human papillomavirus types 53, 58 and 66 types in central Brazil. *Virus Genes*, 26:83-87.

MASUMOTO, N; FUJII, T; ISHIKAWA, M; SAITO, M; IWATA, T; FUKUCHI, T; SUSUMU, N; MUKAI, M; KUBUSHIRO, K; TSUKAZAKI, M; KUBUSHIRO, K; TSUKAZAKI, K; NOZAWA, S. 2003. p16INK4a overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Human Pathol.*, 34:778-783.

MCCLUGGAGE WG, SUMANTHI VP, MCBRIDE HA, PATTERSON A. 2002. A panel of immunohistochemical stains, including carcinoembryonic antigen, vimentin, and estrogen receptor, aids the distinction between primary endometrial and endocervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol.*, 21:11-15.

- MCGLENNEN RC. 2000. Human Papillomavirus oncogenesis. Clinics in laboratory medicine, 20:383-405.
- MCMURRAY HR, NGUYEN D, WESTBROOK TF, MCANCE DJ. 2001. Biology of human papillomaviruses. Int J Exp Path., 82:15-33.
- MEISELS A, MORIN C. 1997. Cytopathology of the uterus. 2^o edition. ASCP Theory and Practice of cytopathology. William W. Johnston, Series Editor. Pp: 227-243.
- MICHELIELI P, CHEDID M, LIN D, PIERCE JH, MERCER WE, GIVOL D. 1994. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. Cancer Res., 54:3391-3395.
- MINCHEVA A, GISSMANN L, ZUR HAUSEN A. 1987. Chromosomal integration sites of papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by *in situ* hybridization. Med Microbiol Immunol., 176:245-256.
- MITCH WE, GOLDBERG AL. 1996. Mechanisms of muscle wasting- The role of the ubiquitin-proteasome pathway. New Engl J Med., 335:1897-1905.
- MOLANO M, POSSO H, WEIDERPASS E, VAN DEN BRULE AJ, RONDEROS M, FRANCHESCHI S, MEIJER CJ, ARSLAN A, MUNÑOZ N, HPV STUDY GROUP. 2002. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. Br J Cancer, 87:324-333.
- MIYASHITA T, KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, WANG HG, LIN HK, LIEBERMANN DA, HOFFMAN B, REED JC. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. Oncogene, 9 : 1799 - 1805.
- MOLIJN A, KLETER B, QUINT W, DOOR L-J V. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. J Clin Virol., 32S:43-51.
- MOLINA R, FILELLA X, AUGE JM, BOSCH E, TORNE A, PAHISA J, LEJARCEGUI JA, ROVIROSA A, MELLADO B, ORDI J, BIETE A. 2005. CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA. Anticancer Res., 25:1765-1771.
- MOLINA R, FILELLA X, LEJARCEGUI JA, PAHISA J, TORNE A, ROVIROSA A, MELLADO B, ORDI J, PUIG-TINTORE LM, ALICARTE J, BIETE A, IGLESIAS J. 2003. Prospective evaluation of squamous cell carcinoma and carcinoembryonic antigen as prognostic factors in patients with cervical cancer. Tumour Biol., 24:156-164.
- MOMAND J, ZAMBETTI GP, OLSON DC, GEORGE D, LEVINE AJ. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell, 69:1237-1245.
- MONSONEGO J, BOSCH FX, COURSAGET P, COX JT, FRANCO E, FRAZER I, SANKARANARAYANAN RSCHILLER J, SINGER A, WRIGHT T, KINNEY W, MEIJER C, LINDER J. 2004. Cervical cancer control, priorities and new directions. Int J Cancer, 108:329-333.
- MORGAN DO. 1995. Principles of CDK regulation. Nature, 374:131-134.

MORGAN DO. 1997. Cyclin dependent kinases: engines, clocks and microprocessons. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 13:261-273.

MOROZOV A, SHIYANOV P, BARR E, LEIDEN JM, RAYCHAUDHURI P. 1997. Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21. *J Virol.*,71:3451-3457.

MOSCICKI AB, HILLS N, SHIBOSKI S, POWELL K, JAY N, HANSON E, MILLER SB, CLAYTON L, FARHAT S, BROERING J, DARRAGH TM, PALEFSKY J. 2001. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*, 285:2995-3002.

MOSCICKI AB, SHIBOSKI S, BROERING J, POWELL K, CLAYTON L, JAY N, DARRAGH TM, BRESCIA R, KANOWITZ S, MILLER SB, STONE J, HANSON E, PALEFSKY J. 1998. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr.*, 132:277-284.

MOTOYAMA S, LADINES-LLAVE C, VILLANUEVA SL, MARUO T. 2004. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.*, 50:9-19.

MOUGIN C, DALSTEIN V, PRETET JL, GAY C, SCHAAL JP, REITHMULLER D. 2001. Epidemiology of cervical papillomavirus infections. Recent knowledge. *Presse Med.*, 30:1017-1023.

MÜLLER H, LUKAS J, SCHNEIDER A, WARTHOF P, BARTEK J, EILERS M, STRAUSS M. 1994. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 91:2945-2949.

MÜNGER K, HOWLEY PM. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.*, 89:213-228.

MUÑOZ N, FRANCESCHI S, BOSETTI C, MORENO V, HERRERO R, SMITH JS, SHAH KV, MEIJER CJL, BOSCH FX. 2002. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 359:1093-1101.

MUÑOZ, N; BOSCH, XF; DE SANJOSÉ, S; HERRERO, R; CASTELLSAGUÉ, X; SHAH, K; SNIJDERS, P; MEIJER, C. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518-527.

NAIR SA, NAIR MB, JAYAPRAKASH PG, RAJALEKSHMY TN, NAIR MK, PILLAI MR. 1997. Cytokeratins and the evaluation of tumor differentiation in squamous lesions of the uterine cervix. *Gen Diagn Pathol.*, 143:15-22.

NAIR P, GANGADEVI T, JAYAPRAKASH PG, NAIR MB, NAIR MK, PILLAI MR. 1999b. Increased angiogenesis in the uterine cervix associated with human papillomavirus infection. *Pathol Res Pract.*, 95:163-169.

NAIR P, NAIR KM, JAYAPRAKASH PG, PILLAI MR. 1999a. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. *Pathol Oncol Res.*, 5:95-103.

NARAYAN G, ARIAS-PULIDO H, KOUL S, VARGAS H, ZHANG FF, VILLELA J, SCHNEIDER A, TERRY MB, MANSUKHANI M, MURTY VV. 2003. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer*, 2:24.

NGAN H, CHEUNG A, LIU S, LIU K, TSAO S. 2002. Telomerase assay and HPV 16/18 typing as adjunct to conventional cytological cervical cancer screening. *Tumor Biol.*, 23:87-92.

NGELANGEL C, MUÑOZ N, BOSCH FX, LIMSON GM, FESTIN MR, DEACON J, JACOBS MV, SANTAMARIA M, MEIJER CJLM, WALBOOMERS JMM. 1998. Causes of cervical cancer in the Philippines: a case-control study. *J Nat Cancer Inst.*, 90:43-49.

NICHOLS GE, WILLIAMS ME, GAFFEY MJ, STOLER MH. 1996. Cyclin D1 gene expression in human cervical neoplasia. *Mod Pathol.*, 9:418-425.

O'BRAIN K, COKKINIDES V, JEMAL A, CARDINEZ CJ, MURRAY T, SAMUELS A, WARD E. 2003. Cancer statistics for Hispanics, 2003. *CA Cancer J Clin.*, 53:208-226.

OH ST, KYO S, LAIMINS LA. 2001. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol.*, 75:5559-5566.

OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74:609-619.

OZALP SS, YALCIN OT, TANIR HM, DUNDAR E, YILDIRIM S. 2002. Bcl-2 expression in preinvasive and invasive cervical lesions. *Eur J Gynaecol Oncol.*, 23:419-422.

PAGANO M. 1997. Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB J.*, 11:1067-1075.

PAHUJA S, CHOUDHURY M, GUPTA U. 2003. Proliferative in squamous cell carcinoma of cervix: a comparative assessment by two markers. *Indian J Pathol Microbiol.*, 46:585-588.

PARDO-MINDÁN FJ, GUIUM, DE ÁLAVA E, RAMÓN Y CAJAL S. 1997. Métodos en patología. En: *Anatomía Patológica*. Ed. Pardo-Mindán, Mosby, Missouri. Pp:333-406.

PARK TW, ZIVANOVIC O, THEUERKAUF I, DURKOP B, HERNANDO JJ, SIMON M, BUTTNER R, KUHN W. 2004. The diagnostic utility of human papillomavirus-testing in combination with immunohistochemistry in advanced gynaecologic pelvic tumours: a new diagnostic approach. *Int J Oncol.*, 24:829-836.

PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P. 2001. Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN 2000. *Int J Cancer*, 94:153-156.

PERRONS CH, JELLEY R, KLETER B, QUINT W, BRINK N. 2005. Detection of persistent high risk human papillomavirus infections with hybrid capture II and SPF10/LiPA. *J Clin Virol.*, 32:278-285.

PERRONS CH, KLETER B, JELLEY R, JALAL H, QUINT W, TEDDER R. 2002. Detection and genotyping of papillomavirus DNA by SPF 10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. *J Med Virol.*, 67:246-252.

- PETT MR, ALAZAWI WOF, ROBERTS I, DOWEN S, SMITH DI, STANLEY MA, COLEMAN N. 2004. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.*, 64:1359-1368.
- PILLAI MR, JAYAPRAKASH PG, NAIR MK. 1999. Bcl-2 immunoreactivity but not p53 accumulation associated with tumour response to radiotherapy in cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 125:55-60.
- PINES J. 1994. p21 inhibits cyclin shock. *Nature*, 369:520-521.
- PINES J. 1995. Cyclins, CDKs and cancer. *Cancer Biol.*, 6:63-72.
- PINES J. 1999a. Checkpoints on the nuclear frontier. *Nature*, 397:104-105.
- PINES J. 1999b. Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol.*, 1:E73-79.
- PINTO-TANG J, CASTRO T, PREMOLI G. 2005. Detection of telomerase activity in cervical lesions by non-radioactive telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Invest Clin.*, 46:255-263.
- PIYATHILAKE CJ, HENAO OL, MACALUSO M, CORNWELL PE, MELETH S, HEIMGURGER DC, PARTRIDGE EE. 2004. Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomavirus. *Cancer Res.*, 64:8788-8793.
- POLYAK K, KATO JY, SOLOMON MJ, SHERR CJ, MASSAGUE J, ROBERTS MJ, KOFF A. 1994. p27/Kip1, a cyclin CDK inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Gen Dev.*, 8:9-22.
- PROKOPCZYK B, COX JE, HOFFMANN D, WAGGONER SE. 1997. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst.*, 89:868-873.
- QUINT W, SCHOLTE G, VAN DOORN L, KLETER B, SMITS P, LINDEMAN J. 2001. Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF10PCR and HPV genotyping. *J Pathol.*, 194:51-58.
- QUADE BJ, PARK JJ, CRUM CP, SUN D, DUTTA A. 1998. In vivo cyclin E expression as a marker for early cervical neoplasia. *Mod Pathol.*, 11:1238-1246.
- REED JC. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.*, 124:1-6.
- REED JC. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, 387:773-776.
- REESINK-PETERS N, HELDER MN, WISMAN GBA, KNOL AJ, KOOPMANS S, BOEZEN HM, SCHUURING E, HOLLEMA H, DE VRIES EGE, JONG S, VAN DER ZEE AGJ. 2003. Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol.*, 56:31-35.
- RICHARDSON H, KELSALL G, TELLIER P, VOYER H, ABRAHAMOWICZ M, FERENCZY A, COUTLEE F, FRANCO EL. 2003. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 12:485-90.

RICHARDSON H, KELSALL G, TELLIER P, VOYER H, ABRAHAMOWICZ M, FERENCZY A, COUPLÉE F, FRANCO E. 2003. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol, Biomark and Prev.*, 12:485-490.

RICHARDSON H, KELSALL G, TELLIER P, VOYER H, ABRAHAMOWICZ M, FERENCZY A, COUPLÉE F, FRANCO EL. 2003. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomark and Prev.*, 12:485-490.

RICHART, RM; MASOOD,S; SYRJANEN, KJ; VASSILAKOS, P; KAUFMAN, RH; MEISELS, A; OLSZEWSKI, W; SAKAMOTO, A; STOLER, MH; VOOIJS, GP; WILBUR, DC. 1998. Human papillomavirus. *Intrnational Academy of Cytology Task Force Summary. Diagnostic Cytology Towars the 21st century: an international expert conference and tutorial. Act Cytol.*, 42(1):50-58.

ROBBINS, 2000. *Patología estructural y funcional*. Ed. Cotran RS, Kumar V, Collins T. 6º e. McGraw-Hill Interamericana. Madrid-España.

RODRÍGUEZ-SASTRE M, GONZÁLEZ-MAYA L, DELGADO R, LIZANO M, TSUBAKI G, MOHAR A, GARCÍA-CARRANCÁ A. 2005. Abnormal distribution of E-cadherina and beta-catenina in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.*, 97:330-336.

ROLFE M, CHIU I, PAGANO M. 1997. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. *J Mol Med.*, 75:5-17.

RUBIN M, KLETER B, ZHOU M, AYALA G, CUBILLA A, QUINT W, PIROG E. 2001. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma. *Am J Pathol.*, 159:1211-1218.

RYAN JJ, PROCHOWNIK E, GOTTLIEB CA, APEL I, MERINO R, NUÑEZ G, CLARKE MF. 1994. c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 91:5878-5882.

SAEGUSA M, TAKANO Y, HASHIMURA M, SHOY, OKAYASU I. 1995. The posible role of of bcl-2 expression in the progresión of tumors of the uterine cervix. *Cancer*, 76:2297-2303.

SALCEDO M, TAJA L, UTRERA D, CHAVEZ P, HIDALGO A, PEREZ C, BENITEZ L, CASTAÑEDA C, DELGADO R, GARIGLIO P. 2002. Changes in retinoblastoma gene expresión during cervical cancer progresión. *Int J Exp Pathol.*, 83:275-286.

SALINAS-TOLEDO S, DÜRST M, LICHTER P. 1997. Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:3854-3859.

SÁNCHEZ-ALEMÁN MA, URIBE-SALAS F, CONDE-GONZÁLEZ CJ. 2002. La infección por el virus papiloma humano, un posible marcador biológico de comportamiento sexual en estudiantes universitarios. *Salud Pública Mex.*, 44:442-447.

SANO, T; OYAMA, T; KASHIWABARA, K; FUKUDA, T; NAKAJIMA, T. 1998a. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int.*, 48(8):580-585.

- SANO, T; OYAMA, T; KASHIWABARA, K; FUKUDA, T; NAKAJIMA, T. 1998b. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am j Pathol.*, 153:1741-1748.
- SAVERIA CAMPO M. 2005. Las proteínas de transformación esenciales del VPH: E5, E6 y E7. *HPVToday*, 7 (octubre):8-10.
- SCHEFFNER M, HUIBREGTSE JM, VIERSTRA RD, HOWLEY PM. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.*, 75:495-505.
- SCHEFFNER M, WHITAKER NJ. 2003. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Sem Cancer Biol.*, 13:59-67.
- SCHEFFNER M. 1998. Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation. *Pharmacol Ther.*, 78:129-139.
- SCHEURER ME, TORTOLERO-LUNA G, ADLER-STORTHZ K. 2005. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*, 15:727-746.
- SCHEURER ME, TORTOLERO-LUNA G, ADLER-STORTHZ K. 2005. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*, 15:727-746.
- SCHIFFMAN M, KRÚJER-KJAER S. 2003. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.*, 31:14-19.
- SCHLECHT NF, KULUGA S, ROBITAILLE J, FERREIRA S, SANTOS M, MIYAMURA RA, DUARTE-FRANCO E, ROHAN TE, FERENCZY A, VILLA LL, FRANCO EL. 2001. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*, 286:3106-3114.
- SCHLECHT NF, TREVISAN A, DUARTE-FRANCO E, ROHAN TE, FERENCZY A, VILLA LL, FRANCO EL. 2003. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 103:519-524.
- SCHORGE, J; LEA, J; ELIAS, K; RAJANBABU, R; COLEMAN, R; MILLER, D; ASHFAG, R. 2004. p16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet and Gynecol.*, 190:668-673.
- SERRANO, M. 1997. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Experimental cell research*, 237:7-13.
- SERRANO, M; HANNON, G; BEACH, D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 336:704-707.
- SGAMBATO A, CITTADINI A, FARAGLIA B, WEINSTEIN B. 2000. Multiple functions of p27Kip1 and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol.*, 183:18-27.
- SGAMBATO A, ZANNONI GF, FARAGLIA B, CAMERINI A, TARQUINI E, SPADA D, CITTADINI A. 2004. Decreased expression of the CDK inhibitor p27KIP1 and increased oxidative DNA damage in the multistep process of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol.*, 92:776-783.
- SHAY JW, BACCHETTI S. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997 Apr;33(5):787-91.

STOPPLER H, HARTMANN DP, SHERMAN L, SCHLEGEL R. 1997. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *J Biol Chem.*, 272:13332-13337.

SHERGILL IS, SHERGILL NK, ARYA M, PATEL HRH. 2004. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin.*, 20:707-712.

SHERR CJ. 2000. The pezcoller lecture: cancer cell cycles revised. *Cancer Res.*, 60:3689-3695.

STEINERT PM, ROOP DR. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann. Rev. Biochem.*, 57: 593-625.

SAWAF MH, OUHAYOUN JP, FOREST N. 1991. Cytokeratin profiles in oral epithelia: a review and a new classification. *J. Biol. Buccale.*, 19: 187-98.

SMEDTS F, RAMAEKERS F, LEUBE RE, KEIJSER K, LINK M, VOOIJS P. 1993a. Expression of keratins 1, 6, 15, 16, and 20 in normal cervical epithelium, squamous metaplasia, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *Am J Pathol.*, 142:403-412.

SMEDTS F, RAMAEKERS FC, VOOIJS PG. 1993b. The dynamics of keratin expression in malignant transformation of cervical epithelium: a review. *Obstet Gynecol.*, 82:465.

SUO Z, HOLM R, NESLAND JM. 1992. Squamous cell carcinomas, an immunohistochemical and ultrastructural study. *Anticancer Res.*, 12:2025-2031.

SHIMABUKURO K, TOYAMO-SORIMACHI N, OZAKI Y, GOI T, FURUKAWA K, MIYASAKA M, ASO T. 1997. The expression patterns of standard and variant CD44 molecules in normal uterine cervix and cervical cancer. *Gynecol Oncol.*, 64:26-34.

SHIN HR, LEE DH, HERRERO R, SMITH JS, VACARRELLA S, HONG SH, JUNG KY, KIM HH, PARK UD, CHA HS, PARK S, TOUZE A, MUÑOZ N, SNIJDERS PJ, MEIJER CJ, COURSAGET P, FRANCESCHI S. 2003. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Busan, South Korea. *Int J Cancer*, 103:413-421.

SHIOZAKI, H; OKA, H; INOUE, M; TAMURA,S; MONDEN, M. 1996. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cell. *Cancer*, 77(8 Suppl):1605-1613.

SHIOZAWA T, SHIOHARA S, KANAI M, KONISHI I, FUJII S, NIKAIDO T. 2001. Expression of the cell cycle regulator p27 (KIP1) in normal squamous epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Immunohistochemistry and functional aspects of p27 (KIP1)*. *Cancer*, 92:3005-3011.

SHIRODKAR S, DECAPRIO E, MORGAN JA, LIVINGSTON DM, CHITTENDEN T. 1992. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle regulated manner. *Cell*, 68:157-166.

SIDRANSKY D, HOLLSTEIN M. 1996. Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med.*, 47:285-301.

SKOMEDAL H, KRISTENSE GB, LIE AK, HOLM R. 1999. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM-2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol.*, 73:223-228.

SKOMEDAL H, KRISTENSE GB, LIE AK, HOLM R. 1999. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM-2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol.*, 73:223-228.

SLINGERLAND J, PAGANO M. 2000. Regulation of the CDK inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol.*, 183:10-17.

SMITH JS, HERRERO R, BOSETTI C, MUÑOZ N, BOSCH FX, ELUF-NETO J, CASTELLSAGUÉ X, MEIJER CJLM, VAN DEN BRULE AJC, FRANCESCHI S, ASHLEY R. 2002. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 94:1604-1613.

SNIJDERS PJ, VAN DUIM M, WALBOOMERS JMM, STEENBERGEN RDM, RISSE EKJ, HELMERHORST TJM, VERHEIJEN RH, MEIJER CJ. 1998. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res.*, 58:3812-3818.

SOLOMON D, NAYAR R. 2004. The Bethesda system for reporting cervical cytoogy. Definitions, criteria, and explanatory notes. 2º ed. Pp: 89-97.

SOTO Y, MUNÉ M, GOICOLEA A, MORALES E, SANTOYO JM, VALDÉS O, RAMÍREZ R, PIMENTEL T. 1998. Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de secuencias de Papillomavirs humano. *Rev Cubana Med Trop.*, 50:191-198.

SOUTHERN SA, HERRINGTON CS. 2000. Disruption of cell cycle control by human papillomavirus with special reference to cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 10:263-274.

SPEERS WC, PICASO LG, SILVERBERG SG. 1983. Immunohistochemical localization of carcinoembryonic antigen in microglandular hyperplasia and adenocarcinoma of the endocervix. *Am J Clin Pathol.*, 79:105-107.

SPITKOVSKY D, AENGENEYNDT F, BRASPENNING J, VON KNEBEL DOEBERITZ M. 1996. p53-independent growth regulation of cervical cancer cells by the papillomavirus E6 oncogene. *Oncogene*, 13:1027-1035.

STANLEY MA, 2000b. Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol.*, 52:45-59.

STANLEY MA. 2001a. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 15:663-676.

STEENBERGEN R, DE WILDE J, WILTING S, BRINK ATP, SNIJDERS P, MEIJER CJLM. 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol.*, 32S:7-15.

- STEENBERGEN R, HERMSEN M, WALBOOMERS J, MEIJER G, BAAK J, MEIJER C, SNIJDERS P. 1998. Non-random allelic losses at 3p, 11p y 13p during HPV-mediated immortalization and concomitant loss of terminal differentiation of human keratinocytes. *Int J Cancer*, 76:412-417.
- STEENBERGEN R, WALBOOMERS J, MEIJER C, VAN DER RAAIJ-HELMER L, PARKER J, CHOW L, BROKER TR, SNIJDERS PJ. 1996. Transition of human papillomavirus type 16 and 18 transfected human foreskin keratinocytes towards immortality: activation of telomerase and allele losses at 3p, 10p, 11q and/or 18q. *Oncogene*, 13:1249-1257.
- STEENBERGEN RDM, DE WILDE J, WILTING SM, BRINK AATP, SNIJDERS PJF, MEIER CJLM. 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol.*, 53:25-33.
- STOLER MH, RODHES CR, WHITBECK A, WOLINSKY SM, CHOW LT, BROKER TR. 1992. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasia. *Human Pathol.*, 23:117-128.
- STOLER MH. 2000. Advances in cervical screening technology. *Mod Pathol.*, 13:275-284.
- STOLER, MH. 2003. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia. Implications for diagnostic criteria and testing. *Arch Pathol Lab Med.*, 127:935-939.
- STOREY A, PIM D, MURRAY A, OSBORN K, BANKS L, CRAWFORD L. 1988. Comparison of the *in vitro* transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J.*, 7:1815-1820.
- STUBENRAUCH F, LAIMINS LA. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.*, 9:379-386.
- SUN H, LIU X, LI M. 2000. E-cadherin expression and its clinical significance in cervical cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 22:496-498.
- SUZUKI M, TSUKAGOSHI S, SAGA Y, OHWADA M, SATO I. 2000. Assessment of proliferative index with MIB-1 as a prognostic factor in radiation therapy for cervical cancer. *Gynecol Oncol.*, 79:300-304.
- TER HARMSEL B, SMEDTS F, KUIJPERS J, JEUNINK M, TRIMBOS B, RAMAEKERS F. 1996. BCL-2 immunoreactivity increases with severity of CIN: a study of normal cervical epithelia, CIN, and cervical carcinoma. *J Pathol.*, 179:26-30.
- THE ALTS GROUP, 2003: Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol.*, 183:1383-1392.
- THIERRY F, BENOTMANE MA, DEMERET C, MORI M, TEISSIER S, DESAINTE C. 2004. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Res.*, 64:895-903.
- THOMAS DB, QIN Q, KUYPERS J, KIVIAT N, ASHLEY RL, KOETSAWANG A, RAY RM, KOETSAWANG S. 2001b. Human papillomavirus and cervical cancer in Bangkok. II. Risk factors for *in situ* and invasive squamous cell cervical carcinomas. *Am J Epidemiol.*, 153:732-739.

THOMAS DB, RAY RM, KOETSAWANG A, KIVIAT N, KUYPERS J, QIN Q, ASHLEY RL, KOETSAWANG S. 2001a. Human papillomavirus and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 y 18 DNA. *Am J Epidemiol.*, 153:723-731.

THOMAS DB, RAY RM, KUYPERS J, KIVIAT N, KOETSAWANG A, ASHLEY RL, QIN Q, KOETSAWANG S. 2001c. Human papillomavirus and cervical cancer in Bangkok. III. The role of husbands and commercial sex workers. *Am J Epidemiol.*, 153:740-748.

THOMAS J, HUBERT W, RUESCH M, LAIMINS L. 1999a. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:8449-8454.

THOMAS JT, LAIMINS LA. 1998. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J Virol.*, 72:1131-1137.

THOMAS M, BANKS L. 1999. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol.*, 80:1513-1517.

THOMAS M, PIM D, BANKS L. 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, 18:7690-7700.

THOMAS M, PIM D, BANKS L. 1999b. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, 18:7690-7700.

THOMSON BJ. 2001. Virus and apoptosis. *Int J Exp Pathol.*, 82:65-76.

TJALMA WA, WEYLER JJ, BOGERS JJ, POLLEFLIET C, BAAY M, GOOVAERTS GC, VERMORKEN JB, VAN DAM PA, VAN MARCK EA, BUYTAERT PM. 2001. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet and Gynecol and Gynecol Reprod Biol.*, 97:223-230.

TJALMAWA, VAN WAES TR, VAN DEN EEDEN LE, BOGERS JJ. 2005. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 19:469-483.

TOKI T, YAJIMA A. 1991. Immunohistochemical localization of carcinoembryonic antigen (CEA) in squamous cell carcinoma of the uterine cervix: prognostic significance of localization pattern of CEA. *Tohoku J Exp Med.*, 165:25-32.

TÖLG C, HOFMANN M, HERRLICH P, PONTA H. 1993. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res.*, 21:1225-9.

TOLINO A, RONSISNI S, GALLO FP, DE CONCILIIS B, RICCIO S, MONTEMAGNO U. 1990. Carcinoembryonic antigen in genital infections caused by HPV. *Rev Fr Gynecol Obstet.*, 85:698-701.

TOMASSINO M, ACCARDI R, CALDEIRA S, DONG W, MALANCHI I, SMET A, ZEHBE I. 2003. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Human Mutation*, 21:307-312.

TOMMASINO M, ADAMCZEWSKI JP, CARLOTTI F, BARTH CF, MANETTI R, CONTORNI M, CAVALIERI F, HUNT T, CRAWFORD L. 1993. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene*, 8:195-202.

TORNESELLO ML, DURATURO ML, SALATIELLO I, BUONAGURO L, LOSITO S, BOTTI G, STELLATO G, GREGGI S, PICCOLI R, PILOTTI S, STEFANON B, DE PALO G, FRANCESCHI S, BUONAGURO F. 2004. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol.*, 74:117-126.

TOYOSHIMA H, HUNTEN T. 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-CDK protein kinase activity, is related to p21. *Cell.*, 78:67-74.

TRAIDEJ M, CHEN L, YU D, AGRAWAL S, CHEN J. 2000. The roles of E6-AP and MDM2 in p53 regulation in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 10: 17-27.

TRINGLER B, GUP C, SINGH M, GROSHONG S, SHROYER L, HEINZ D, SHROYER K. 2004. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol.*, 35:689-696.

TRONCONE G, MATTÍNEZ JC, PALOMBINI L, DE ROSA G, MUGICA C, RODRÍGUEZ JA, ZEPPA P, DI VIZIO D, LUCARIELLO A, PIRIS MA. 1998. Immunohistochemical expresión of mdm2 and p21WAF1 in invasive cervical cancer: correlation with p53 protein and high risk HPV infection. *J Clin Pathol.*, 51:754-760.

TRONCONE G, VETRANI A, DE ROSA G, GERBASIO D, PALOMBINI L. 1999. Cyclin dependent kinase inhibitor p27KIP1 expression in normal and neoplastic cervical epithelium. *J Clin Pathol.*, 52:880-887.

TRUNK M, DALLENBACH-HELLWEG G, RIDDER R, ULRICH K, IKENBERG H, SCHNEIDERV, VON KNEBEL DOEBERITZ M. 2004. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Act Cytol.*, 48:771-782.

TRUNK MJ, WENTZENSEN N, VON KNEBEL DOEBERITZ M. 2005. Molecular pathogenesis of cervical cancer and its first steps. *Patologue*, 26:283-290.

TSUDA H, HASHIGUCHI Y, NISHIMURA S, KAWAMURA N, INOUE T, YAMAMOTO K. 2003. Relation between HPV typing and abnormality of G1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol.*, 91:476-485.

UEHARA T, KUWASHIMA Y, IZUMO T, KISHI K, SHIROMIZU K, MATSUZAWA M. 1995. Expression of the proto-oncogene bcl-2 in uterine cervical squamous cell carcinoma: its relationship to clinical outcome. *Eur J Gynaecol Oncol.*, 16:453-460.

UNGER, E; DUARTE-FRANCO, E. 2001. Human papillomavirus. Into the new millennium. *Obstet Gynecol Clinics of North America*, 28:653-666.

VAN DE PUTTE G, KRISTENSEN GB, BAEKELANDT M, LIE AK, HOLM R. 2004. E-cadherina and catenins in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.*, 94:521-527.

- VAN DEN BRULE AJ, POL R, FRANSEN-DAALMEIJER N, SCHOULS LM, MEIJER CJ, SNIDERS PJ. 2002. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol.*, 40:779-787.
- VAN DER GRAAF Y, MOLIJN A, DOORNEWAARD H, QUINT W, VAN DOORN LJ, VAN DEN TWEEL J. 2002. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol.*, 156:158-164.
- VAN NAGELL JR Jr, HUDSON S, GAY EC, DONALDSON ES, HANSON M, POWELL DF, GOLDENBERG DM. 1982. Carcinoembryonic antigen in carcinoma of the uterine cervix: antigen distribution in primary and metastatic tumors. *Cancer*, 49:379-383.
- VELDMAN T, HORIKAWA I, BARRETT JC, SCHLEGEL R. 2001. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol.*, 75:4467-4472.
- VELDMAN T, LIU X, YUAN H, SCHLEGEL R. 2003. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *PNAS*, 100:8211-8216.
- VESSEY, CJ; WILDING, J; FOLARIN, N; HIRANO, S; TAKEICHI, M; SOUTTER, P; STAMP, GW; PIGNATELLI, M. 1995. Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol.*, 176:151-159.
- VILLA LL, SICHERO L, RAHAL P, CABALLERO O, FERENCZY A, ROHAN T, FRANCO EL. 2000. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.*, 81:2959-68.
- VIZCAINO AP, MORENO V, BOSCH FX, MUÑOZ N, BARROS-DIOS XM, BORRAS J, PARKIN DM. 1998. International trends in incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 75:536-545.
- VIZCAINO AP, MORENO V, BOSCH FX, MUÑOZ N, BARROS-DIOS XM, BORRAS J, PARKIN DM. 2000. International trends in incidence of cervical cancer: II. Squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 86:429-435.
- VOLGAREVA G, ZAVALISHINA L, ANDREEVA Y, FRANK G, KRUTIKOVA E, GOLOVINA D, BLIEV A, SPITKOVSKY D, ERMILOVA V, KISSELJOV F. 2004. Protein p16 as a marker of dysplastic alterations in cervical cells. *BMC Cancer*, 4:58.
- VON KNEBEL DOEBERITZ, M. 2001. Aspects of molecular pathogenesis of cervical cancer in establishing new tumor markers for early detection and diagnosis. *Zentralbl Gynakol.*, 123(4):186-191.
- VON KNEBEL DOEBERITZ, M. 2004. Molecular biomarker to identify HPV transformed cells in histological and cytological samples. II Curso avanzado de citología cervical y técnicas complementarias en el diagnóstico precoz del cáncer de cérvix uterino. Avilés, 8-9 de noviembre, Hospital San Agustín. Oviedo-España.

- WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 369:574-578.
- WALBOOMERS, J; JACOBS, M; MANOS, M; BOSCH, XF; KUMMER, A; SHAH, K; SNIJDERS, P; PETO, J; MEIJER, CH; MUÑOZ, N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.*, 189:12-19.
- WANG J, SAMPATH A, RAYCHAUDHURI P, BAGCHI S. 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene*, 20:4740-4749.
- WANG SZ, SUN J-H, ZHANG W, JIN S-Q, WANG H-P, JIN Y-S, QU P, LIU Y, LI M. 2004a. Telomerase activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Chinese med J.*, 117:202-206.
- WANG JL, ZHENG BY, LI X-D, ANGSTRÖN T, LINDSTRÖM MS, WALLIN KL. 2004b. Predictive significance of the alterations of p16INK4a, p14ARF, p53, and proliferative cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Ca Res.*, 10:2407-2414.
- WANI K, NAIR CK. 2003. Genetic alterations in cervical cancer. *Indian J Exp Biol.*, 41:789-796.
- WEEDON D. 2002. *Skin pathology*. 2^o ed. Churchill Livingstone, London. Pp: 704-705.
- WESNESS BA, LEVINE AJ, HOWLEY PM. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248:76-79.
- WICK MJ. 2000. Diagnosis of human papillomavirus gynecology infections. *Clinics in Lab Med.*, 20:271-287.
- WIDSCHWENDTER A, MULLER HM, FIEGL H, IVARSSON L, WIEDEMAIR A, MULLER-HOLZNER E, GOEBEL G, MARTH C, WIDSCHWENDTER M. 2004. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. *Clin Cancer Res.*, 10:565-571.
- WINER RL, LEE S-H, HUGHES JP, ADAM DE, KIVIAT NB, KOUTSKY LA. 2003. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.*, 157:218-226.
- WOODMAN CB, COLLINS S, WINTER H, BAILEY A, ELLIS J, PRIOR P, YATES M, ROLLASON TP, YOUNG LS. 2001. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 357:1831-1836.
- WOODWORTH CD. 2002. HPV innate immunity. *Front Biosci.*, 7:d2058-2071.
- WOOTIPOOM V, LEKHYANANDA N, PHUNGRASSAMI T, BOONYAPHIPHAT P, THONGSUKSAI P. 2004. Prognostic significance of Bax, Bcl-2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol.*, 94:636-642.
- WU, H; LOTAN, R; MENTER, D; LIPPMAN, SM; XU, XC. 2000. Expression of E-cadherin is associated with squamous differentiation in squamous carcinomas. *Anticancer Res.*, 20(3A):1385-1390.

- XIAO ZX, CHEN J, LEVINE AJ, MODJTAHEDI N, XING J, SELLERS WR, LIVINGSTON DM. 1995. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM-2. *Nature*, 375:694-698.
- XIAO ZX, CHEN J, LEVINE AJ, MODJTAHEDI N, XING J, SELLERS WR, LIVINGSTON DM. 1995. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM-2. *Nature*, 375:694-698.
- XIONG Y, HANNON GJ, ZHANG H, CASSO D, KOBAYASHI R, BEACH D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366:701-704.
- YAMAKAWA Y, FORSLUND O, TESHIMA H, HASUMI K, KITAGAWA T, HANSSON BG. 1994. Human papillomavirus DNA in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix detected by polymerase chain reaction (PCR). *Gynecol Oncol.*, 53:190-195.
- YANG R, WHEELER CM, CHEN X, UEMATSU S, TAKEDA K, AKIRA S, PASTRANA DV, VISCIDI RP, RODEN RB. 2005. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *Virology*, 79:6741-6750.
- YASHIMA K, ASHFAQ R, NOWAK J, VON GRUENIGEN V, MILCHGRUB S, RATHI A, ALBORES-SAAVEDRA J, SHAY JW, GAZDAR AF. 1998. Telomerase activity and expression of its RNA component in cervical lesions. *Cancer*, 82:1319-1327.
- YLITALO N, JOSEFSSON A, MELBYE M, SORENSEN P, FRISCH M, ANDERSEN PK, SPAREN P, GUSTAFSSON M, MAGNUSSON P, PONTEN J, GYLLENSTEN U, ADAMI HO. 2000a. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma *in situ*. *Cancer Res.*, 60:6027-6032.
- YLITALO N, SORENSEN P, JOSEFSSON A, FRISCH M, SPAREN P, PONTEN J, GYLLENSTEN U, MELBYE M, HO A. 1999. Smoking and oral contraceptives as risk factors for cervical carcinoma *in situ*. *Int J Cancer*, 81:357-365.
- YLITALO N, SORENSEN P, JOSEFSSON A, MAGNUSSON P, ANDERSEN PK, PONTEN J, ADAMI HO, GYLLENSTEN U, MELBYE M. 2000b. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma *in situ*: a nested case-control study. *Lancet*, 355:2194-2198.
- YOKOYAMA Y, TAKAHASHI Y, SHINOHARA A, LIAN Z, TAMAYA T. 1998. Telomerase activity in the female reproductive tract and neoplasms. *Gynecol Oncol.*, 68:145-149.
- ZARKA TA, HAN AC, EDELSON MI, ROSENBLUM NG. 2003. of the cervix: potential tumor suppressor role for N-cadherin. carcinomas of the cervix: potential tumor suppressor role for N-cadherin. *Int J Gynecol Cancer*, 13:240-243.
- ZEHBE I, WILANDER E. 1997. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. *J Pathol.*, 181:270-275.
- ZERFASS-THOME K, SCHULZE A, SPITKOVSKY D, FRIEDMAN V, HENGLEIN B, JANSEN-DÜRR P. 1995. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol.*, 69:6389-6399.

ZERFASS-THOME K, ZWERSCHKE W, MANNHARDT B, TINDLE R, BOTZJW, JANSEN-DURR P. 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27K1P1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, 13:2323-2330.

ZUR HAUSEN A, DE VILLIERS EM. 1994. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol.*, 48:427-447.
ZUR HAUSEN H. 1996. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1288:F55-F78.

ZUR HAUSEN H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.*, 92:690-698.

ZUR HAUSEN H. 2001. Oncogenic DNA viruses. *Oncogene*, 20:7820-7823.

ZUR HAUSEN H. 2002. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2:342-350.