



UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

**EVALUACION DE LA EXPRESION DE MARCADORES
CELULARES MEDIANTE TECNICAS
INMUNOHISTOQUIMICAS EN LESIONES DE CUELLO
UTERINO CAUSADAS POR VIRUS PAPILOMA
HUMANO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela
por el bachiller Miguel A. Rojas M.
como requisito parcial para optar
al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Pedro Michelli.

CARACAS – VENEZUELA
DICIEMBRE DE 2012



UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

**EVALUACION DE LA EXPRESION DE MARCADORES
CELULARES MEDIANTE TECNICAS
INMUNOHISTOQUIMICAS EN LESIONES DE CUELLO
UTERINO CAUSADAS POR VIRUS PAPILOMA
HUMANO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela
por el bachiller Miguel A. Rojas M.
como requisito parcial para optar
al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Pedro Michelli.
Cotutora: Dra. Elizabeth Merentes.

CARACAS – VENEZUELA
DICIEMBRE DE 2012

**Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Departamento de Biología Celular.**

VEREDICTO

Trabajo Especial de Grado titulado:

**EVALUACION DE LA EXPRESION DE MARCADORES CELULARES MEDIAN
TE TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS EN LESIONES DE CUELLO
UTERINO CAUSADAS POR VIRUS PAPILOMA HUMANO.**

Presentado por el Br. Miguel Antonio Rojas Mendoza, C.I. N° 3412577, ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología. Defendido públicamente el día Miércoles 5 de Diciembre de 2012 y aprobado por los miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias, quienes consideraron que dicho trabajo cumplió con los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos.

**Profesor Pedro Michelli.
Tutor.**

**Profesora Elizabeth Merentes.
Cotutora Académica.**

**Profesora María Correnti.
Jurado Principal.**

**Profesora Palmira Guevara.
Jurado Principal.**

EVALUACION DE LA EXPRESION DE MARCADORES CELULARES MEDIANTE
TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS EN LESIONES DE CUELLO UTERINO
CAUSADAS POR VIRUS PAPILOMA HUMANO

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de patología molecular del Instituto Anatomopatológico José Antonio O'Daly; Cátedra de Anatomía Patológica de la Escuela de Medicina Luis Razetti de la Universidad Central de Venezuela, bajo la dirección del Dr. Pedro Michelli y con asesoramiento académico de la Dra. Elizabeth Merentes (Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UCV).

Por: _____

Miguel Antonio Rojas Mendoza.

Tutor: _____

Dr. Pedro Michelli.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, FACULTAD DE CIENCIAS

2012.

INDICE

	Página
1.-) Indice -----	IV
2.-) Agradecimientos -----	V
3.-) Dedicatoria -----	VI
4.-) Resumen -----	1
5.-) Introducción (virus de papiloma humano, VPH) -----	2
6.-) Sistema de control del ciclo celular -----	7
7.-) Cáncer cervicouterino (CCU) y lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) -----	11
8.-) Actividad de las oncoproteínas virales E6 y E7 -----	14
9.-) Antecedentes -----	17
10.-) Objetivos -----	35
11.-) Materiales y Métodos -----	36
12.-) Técnicas Inmunohistoquímicas -----	38 - 41
13.-) Resultados -----	46
14.-) Discusión -----	51
15.-) Conclusiones -----	62
16.-) Bibliografía -----	63
17.-) Anexos: Fotografías y Tablas -----	73

AGRADECIMIENTOS

En breves líneas deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Pedro Michelli, al profesor Joseba Celaya y al profesor Marwan Aguilar por su valioso aporte en conocimiento y apoyo en la realización de este trabajo.

A mi cotutora de tesis de grado, Dra. Elizabeth Merentes quien colaboró con mi trabajo al ayudarme a tomar con su microscopio Olympus las fotografías de los cortes en láminas y veló por el cumplimiento del objetivo trazado de esta tesis.

A la Dra. Horbelys Guzmán por su invalorable ayuda al pasar en la computadora el manuscrito de mi trabajo especial de grado.

A la licenciada Valeria Bonetti quien me ayudó a verificar los resultados del análisis estadístico con su dominio de la computadora.

A la señora Lilia Córdova quien en algún momento colaboró con este trabajo al pasar en computadora parte del manuscrito de mi seminario II.

Al Dr. Ramón Hurtado del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Dr. Domingo Luciani, quien prestó amablemente parte de las biopsias con las cuales se realizó este trabajo.

A la históloga Sra. Yenny Pérez del Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño quien realizó gran parte de los cortes de las biopsias.

A la Dra. Livia Fernández del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño, quien prestó amablemente parte de las biopsias con las cuales se realizó este trabajo.

A todos los compañeros y compañeras de la Cátedra de Anatomía Patológica del Instituto Anatomopatológico J.A.O'Daly, Escuela de Medicina Luis Razetti de la Universidad Central de Venezuela.

A mis hermanos, especialmente Ynés del Carmen Rojas M. y Alcides de la Cruz Rojas M.

A los que olvidé mencionar.

DEDICATORIA

AL SER SUPREMO.

JESUCRISTO :

HECHO ESTÁ ; YO SOY EL ALFA Y LA OMEGA, EL PRINCIPIO
Y EL FIN; AL QUE TENGA SED, YO LE DARÉ DEL MANANTIAL
DEL AGUA DE LA VIDA GRATIS. ESTA SERÁ LA HERENCIA
DEL VENCEDOR : YO SERÉ DIOS PARA ÉL, Y EL SERÁ HIJO
PARA MÍ.

JUAN. APOCALIPSIS.

RESUMEN

Los papilomavirus son pequeños virus de ADN de doble hebra, cuyo efecto transformante resulta principalmente de la actividad de sus oncoproteínas E6 y E7. Las oncoproteínas virales E6 y E7 de los virus papiloma humano (VPHs) de alto riesgo, principalmente VPH 16 y VPH 18, se unen a varios reguladores celulares primordiales en el control de procesos biológicos como la apoptosis, proliferación celular, estabilidad cromosómica, transcripción de genes (oncogenes y genes supresores de tumor), diferenciación celular y la respuesta inmunitaria, promoviendo el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC).

El propósito fundamental de este estudio consistió en evaluar mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de las siguientes proteínas del ciclo celular : PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), cadherina E (marcador de adhesión celular) y p16 INK4a (proteína de supresión celular) en biopsias de lesiones cervicales de pacientes infectadas por VPH, determinada mediante inmunotinción de células diana con anticuerpos monoclonales anti cada marcador celular mencionado.

Los resultados de inmunotinción obtenidos indicaron que en todas las muestras evaluadas había un incremento en la expresión de PCNA y de p16 INK4a en zonas con lesión comparado con zonas sin lesión y una disminución en la expresión de cadherina E en zonas con lesión. El marcador celular p16 INK4a mostró un mejor comportamiento predictivo de la evolución de las lesiones que los otros dos, ya que en estas pacientes se apreció una estrecha relación entre la presencia de VPH, las lesiones desarrolladas en el área del cuello uterino afectada y los cambios en la expresión de estos biomarcadores celulares. El análisis estadístico de los resultados permitió clasificar dichas lesiones en lesiones de bajo y de alto grado histológico.

INTRODUCCIÓN

Virus de Papiloma Humano (VPH)

La familia Papillomaviridae está integrada por un grupo heterogéneo de virus especie animal específico. En su estudio realizado en 1933 sobre el papiloma del conejo salvaje cola de algodón, Shope describió el virus de papiloma, al cual clasificó como un virus filtrable con potencial para causar verrugas (Shope, 1933).

En seres humanos se han identificados más de 100 tipos distintos de virus de papiloma (VPH) de los cuales aproximadamente 40 son transmitidos sexualmente y pueden infectar la piel, la mucosa oral y los genitales. Los tipos específicos de VPH 16 y 18 han sido encontrados con mayor frecuencia (un 70%) en lesiones malignas y premalignas, mientras que en condilomas y papilomas se detectan generalmente los tipos 6 y 11 (en un 90%) (De Guglielmo Cróquer y col., 2010).

Los dos géneros de VPH más importantes son los papilomavirus Alpha (α) y los beta (β). La mayoría de los VPH que infectan áreas genitales pertenecen al género Alpha (Lizano - Soberón y col., 2009).

El diámetro de las partículas virales de VPH es de aproximadamente 55 nanómetros (nm). Las partículas completas contienen un genoma circular de ADN de doble hebra cerrado de 7.200 a 8000 pares de base, el cual está asociado a proteínas semejantes a histonas y encapsidado por 72 capsómeros proteicos (zur Hausen, 1996).

Los genomas de virus de papiloma se pueden dividir en tres regiones: una región reguladora de control larga (RCL), la cual cubre cerca del 10% del genoma; una región temprana (E) y una región tardía (L). Los genes L codifican para proteínas estructurales y la

región E codifica principalmente para funciones reguladoras involucradas en resistencia genómica, replicación de ADN y activación del ciclo lítico (zur Hausen, 1996).

La región temprana contiene la secuencia del marco abierto de lectura codificante de las proteínas estructurales de expresión temprana en el ciclo vital del virus llamadas E1, E2, E4, E5, E6 y E7.

La región tardía contiene los genes codificantes de las proteínas estructurales L1 (proteínas de la cápsida principal) y L2 (proteínas de la cápsida menor), que se expresan en las células superficiales y en conjunto forman la cápsida viral. La región no codificante, también denominada región larga de control (RCL) o región reguladora ascendente (URR, siglas de los vocablos del inglés: upstream regulatory region) consta de 400 a 1000 pares de bases, es la diana de varios factores transcripcionales asociados con la expresión tejido-específica, y presenta secuencias promotoras, intensificadoras (“enhancer”) y silenciadoras que regulan la replicación del ADN vírico (De Guglielmo Cróquer y col., 2010).

Ciclo de vida y transmisión de VPH.

El ciclo de vida del VPH sigue el programa de diferenciación de la célula hospedadora, el queratinocito. Los tipos de VPH de “bajo riesgo” (6, 11 y otros) forman viriones y tienden en general a desaparecer espontáneamente, mientras que los de “alto riesgo” (16, 18, etc) a persistir, al integrarse al genoma celular y transformar las células. Se supone que el virión VPH infecta tejidos epiteliales a través de micro abrasiones que le facilita el acceso a las zonas basales del epitelio donde en contacto con las células hospedadoras, se asocia con receptores localizados allí, como α -integrinas, heparina y lamininas (zur Hausen, 1996).

En trabajos dirigidos a conocer el proceso de infección por VPH de alto riesgo, utilizando partículas tipo virus, se ha evidenciado que durante la actividad sexual, el microtrauma del

epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, facilita la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de VPH, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápsida viral L1, a nivel de su extremo carboxiterminal. Dicho receptor ha sido asociado estructuralmente con Heparán Sulfato para los tipos virales 16 – 33 y con Alfa-6-integrina para VPH 6. Una vez unido el virus a la superficie celular, ocurre su internalización al citoplasma de la célula hospedadora mediante el proceso de endocitosis. En este evento han sido reconocido dos sistemas: el primero involucra un complejo proteico llamado clatrina, utilizado por los tipos 16 y 18; el segundo utiliza un grupo de proteínas principalmente caveolina, denominado endocitosis por caveolas, en el que participa el VPH 31 (Rivera y col., 2006).

Las superficies de la mayoría de las células están tachonadas con invaginaciones delgadas de la membrana en forma de frasco llamadas caveolas. Estas invaginaciones son la ubicación principal de proteínas de membrana de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Algunas de estas proteínas de anclaje de GPI funcionan para concentrar pequeñas moléculas e iones en el espacio secuestrado creado cuando las caveolas transitoriamente se cierran herméticamente desde el medio extracelular. Luego los ligandos concentrados fluyen en la célula a través de transportadores o canales embebidos en la membrana. Este proceso es llamado potocitosis.

La estructura y la distribución celular de las caveolas sugieren que ellas son un componente semipermanente de la superficie celular que puede ser movido a diferentes posiciones para satisfacer las demandas cambiantes de la célula (Anderson, 1993).

Posterior a la endocitosis, existe evidencia en modelos de infección por partículas virales tipo 11 y 16 que la capsida viral de 55 nm de diámetro experimenta degradación en el

citoplasma celular, a través de un proceso de reducción química que daña los puentes disulfuro que estabilizan la cápsida, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares de un diámetro aproximado de 39 nm, con lo que el genoma viral y las proteínas de la cápsida participan en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (Rivera y col., 2006).

Es posible definir una población viral no productiva, localizada en el estrato basal, en la cual se mantiene la replicación del ADN viral en un número de copias bajo (30-50 copias por célula infectada), en forma extracromosómica, llamados episomas que se estructuran en base a histonas y material genético. Se especula que durante esta etapa se aseguraría que el ADN viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmunitaria. Las células basales proliferantes migran a los estratos parabasal y espinoso, amplificándose la expresión de genes virales tempranos a través de la región no codificante (URR), las cuales permiten producir ADN a cientos de copias por célula, esta etapa en el ciclo viral es conocida como la fase vegetante, proliferante o productiva. En este proceso de replicación del ADN viral participan un grupo de proteínas entre las cuales se encuentran E1, E2 y la proteína viral mixta E1-E4 (Rivera y col., 2006).

Después de la transcripción de los genes tempranos E (lo que permite realizar una replicación del ADN inicial en 50-100 genomas virales/célula), el genoma viral se replica en promedio una vez por ciclo celular, cuando las células basales se dividen y los genomas virales se reparten en partes iguales entre las células hijas.

La transmisión de los virus papiloma humano es facilitada por superficies epiteliales escoriadas o ablandadas. Las infecciones anogenitales son transmitidas principalmente por

contacto sexual. El contacto oral genital puede conducir a infecciones en sitios orales por VPHs anogenitales (zur Hausen, 1996).

E1 corresponde a una proteína multimérica con actividad ATPasa y helicasa, capaz de reconocer sitios específicos en el ADN viral, llamadas regiones de origen de replicación (ori), formando un complejo de iniciación con la proteína E2, ciclinas (principalmente E), quinasas dependientes de ciclinas y ADN polimerasa α , en la región p68, participando además proteínas de la célula hospedadora.

E2 corresponde a una proteína dimérica que forma un complejo proteico con E1 mencionada anteriormente. En este proceso, E2 es fosforilada por quinasas en los residuos aminoacídicos de serina 298 y 301, regulando su unión con E1. Además E2 reprime al promotor P97 (VPH16) o P105 (VPH 18) ubicado próximo al gen TATA box, encargado de la transcripción de las proteínas E6 y E7, reduciendo de esta manera la síntesis de estas proteínas.

Un evento determinante en la transformación de las células infectadas es la integración del genoma viral al de la célula hospedadora, proceso que ocurre en el estrato espinoso y en el que destaca por su importancia, el ADN de los VPH de alto riesgo oncogénico. Durante este proceso se altera el marco abierto de lectura de ORF-E2 (del inglés, Open Reading Frame of E2) , perdiéndose el efecto inhibitorio sobre el promotor P97 o P105, que mantenía bloqueada la expresión de las proteínas E6 y E7, las que ahora pueden ser sintetizadas sin restricción vía factores de transcripción (Rivera y col., 2006). Se ha observado que en las verrugas benignas, el genoma de VPH se mantiene en una forma episomal, mientras que en los cánceres su genoma se encuentra integrado aleatoriamente en el genoma del hospedador (Kumar y col., 2008).

Sistema de control del ciclo celular.

En la mayoría de las células hay varios puntos de control durante el ciclo celular, en los cuales el ciclo puede ser detenido si los eventos previos no han sido completados: $G_1 \rightarrow S$; $G_2 \rightarrow M$, M (salida de metafase) $\rightarrow G_1$. El sistema de control del ciclo celular puede ser regulado por señales extracelulares de otras células. Estas señales, las cuales pueden promover o inhibir la proliferación celular, tienden a actuar por regulación de la progresión a través del punto de control G_1 . En G_1 se integran diversas señales para determinar si la célula debe entrar en el ciclo celular, salir del ciclo y diferenciarse, o bien si ha de morir. En el corazón del sistema de control del ciclo celular está una familia de proteínas quinasas conocidas como quinasas dependientes de ciclina (Cdks). Las proteínas ciclinas sufren una síntesis y degradación cíclica en cada ciclo celular. Los cambios cíclicos en los niveles de ciclina resultan en el ensamblaje y activación de los complejos ciclina-Cdk; esta activación a su vez desencadena los eventos del ciclo celular: replicación de ADN, mitosis y citoquinesis (Alberts y col., 2002; Kumar y col., 2008).

Los reguladores más importantes de las Cdks son las proteínas ciclinas. Hay cuatro clases de ciclinas, cada una definida por la etapa del ciclo celular en la cual ellas se unen a las Cdks y funcionan.

Tres de estas clases son requeridas en todas las células eucariotas:

1. Ciclinas G_1/S ; se unen a las Cdks al final de G_1 y comprometen a la célula en la replicación de ADN.
2. Ciclinas S; se unen a Cdks durante la fase S de síntesis y son requeridas para la iniciación de la replicación de ADN.
3. Ciclinas M; promueven los eventos de mitosis (Alberts y col., 2002).

Los efectos mejor entendidos de la actividad de G_1 -Cdk en células animales son mediados por una proteína reguladora de gen llamada E_2F , la cual se une a secuencias específicas de ADN en los promotores de muchos genes que codifican proteínas requeridas para la entrada en la fase S, incluyendo las ciclinas G_1/S y la ciclinas S. La función de E_2F es controlada principalmente por una interacción con la proteína retinoblastoma (Rb), un inhibidor del ciclo celular, la cual puede unirse a E_2F y al ser fosforilada por G_1 -Cdk se disocia de ella. RB fue el primer gen supresor tumoral descubierto. El producto del gen RB es una proteína (Rb) de fijación al ADN que se expresa en todas las células, bien sea en una forma hipofosforilada activa o bien hiperfosforilada inactiva.

La iniciación de la replicación del ADN requiere la actividad de los complejos ciclina E/CDK2, y la expresión de la ciclina E depende de la familia de transcripción E_2F . Al comienzo de la fase G_1 , la proteína Rb se encuentra en su forma activa hipofosforilada, y luego se une e inhibe a la familia E_2F de factores de transcripción, lo que impide la transcripción de la ciclina E. La proteína retinoblastoma hipofosforilada bloquea la transcripción mediada por la familia E_2F al menos de dos formas. Primero, secuestra la E_2F e impide que interaccione con otros activadores de la transcripción. Segundo, la proteína Rb recluta proteínas de remodelado de la cromatina (histona-desacetilasa e histona-metiltransferasas), que se unen a los promotores de los genes con respuesta a E_2F (como la ciclina E). Estas enzimas modifican la cromatina en los promotores y consiguen que el ADN no responda a los factores de transcripción (Kumar y col., 2008). Mientras que las ciclinas suscitan la respuesta de las quinasas dependientes de ciclina (Cdk o CDK), sus inhibidores (CDKI), muy numerosos, silencian las CDK y ejercen un control negativo sobre el ciclo celular. Existe una familia de CDKI formada por tres proteínas – p21[CDKN1A], p27[CDKN1B] y p57[CDKN1C]- que inhiben en general todas las CDK;

de manera diferente, la otra familia de CDKI presenta efectos selectivos sobre los complejos ciclina D/CDK4 y ciclina D/CDK6. Los cuatro miembros de esta última familia – p15(CDKN2B), p16(CDKN2A), p18(CDKN2C) y p19(CDKN2D)- en ocasiones son denominados proteínas INK4(A-D) (Kumar y col., 2008).

La proteína p53 (el guardián del genoma) es reguladora de genes. Esta proteína estimula la transcripción de varios genes, entre ellos el gen que codifica una proteína inhibidora de quinasa dependiente de ciclina (CDKI) llamada p21 (CDKN1A) , la cual se une a G1/S-Cdk y S-Cdk e inhibe sus actividades, por eso ayuda a bloquear la entrada en la fase S.

En células normales, p53 es altamente inestable, ya que interactúa con la proteína Mdm2 la cual actúa como una ubiquitin ligasa sobre la diana p53 promoviendo su destrucción por proteosomas (Alberts y col., 2002).

Merece destacarse que el locus del gen CDKN2A, también denominado INK4a/ARF, codifica la elaboración de dos proteínas: p16 INK4A y p14 ARF. Aunque las dos proteínas bloquean la progresión del ciclo celular, sus dianas son distintas. La proteína p16 (CDKN2A) inhibe la fosforilación de la proteína Rb (retinoblastoma) bloqueando el complejo ciclina D-CDK4; por otra parte, la proteína p14ARF activa la vía de la proteína p53 inhibiendo a Mdm2. En consecuencia, estas dos proteínas actúan como supresores tumorales y la delección de este locus (frecuente en muchos tumores) tiene efectos sobre la vía de la proteína Rb y también sobre la vía de la proteína p53. En numerosas neoplasias malignas humanas, los CDKI se encuentran a menudo mutados o “silenciados” (Kumar y col., 2008).

El Útero.

El útero es un órgano impar de pared muscular gruesa de unos 7,5 cm de longitud que está ubicado en la pelvis menor y que cumple la función biológica de captar el ovocito fecundado y de implantar y nutrir al embrión en desarrollo.

En esencia el útero está compuesto por el cuerpo uterino y el cuello uterino (cérvix), entre los cuales hay un segmento ístmico corto. La comunicación interna con la porción cervical se llama orificio interno del útero mientras que la desembocadura del cuello en la vagina recibe el nombre de orificio externo. La parte del cuello uterino que sobresale dentro de la vagina se conoce como porción vaginal (hocico de tenca).

La pared del cuerpo uterino se divide en tres capas: endometrio, miometrio y perimetrio.

Cuello Uterino.

La mucosa del cuello uterino (cérvix) tiene una superficie muy irregular en la parte interna (endocérvis) con pliegues en parte ramificados (pliegues palmeados y hendiduras) cuyas porciones profundas suelen llamarse glándulas.

El epitelio de la superficie y de las hendiduras es del mismo tipo y está compuesto por células cilíndricas altas productoras de moco. El cuello uterino carece de perimetrio (Welsch, 2009).

La porción vaginal (exocérvis) esta tapizada principalmente por un epitelio estratificado plano no queratinizado que a la altura del orificio externo se transforma de manera brusca en el epitelio simple cilíndrico del conducto cervical. Esta zona de transición también se conoce como zona de transformación. La región de contacto inmediato entre los dos epitelios diferentes se llama unión escamocolumnar (zona de “lucha de los epitelios”) (Welsch, 2009).

Cáncer cervicouterino (CCU) y lesiones intraepiteliales escamosas (LIE).

El diagnóstico temprano del carcinoma del cuello uterino humano ha enfocado considerable atención sobre una variedad de alteraciones histopatológicas del epitelio cervical. Una de tales alteraciones es el carcinoma “*in situ*”; ya que hay considerables evidencias que indican que esta lesión representa la etapa preinvasiva de carcinoma de células escamosas manifiesto, otras lesiones que se asemejan al carcinoma “*in situ*” han estado recibiendo atención como posibles precursores en la patogénesis de cáncer cervical. Es muy probable que esas lesiones representen etapas de un mismo proceso básico. Se ha considerado que este conjunto de alteraciones epiteliales formen un espectro que se extiende desde lesiones mínimas claramente benignas en un extremo hasta una incontrovertible malignidad. Ocupando la amplia porción media de este espectro están las alteraciones epiteliales, las cuales se han designado como hiperplasia epitelial atípica (A.E.H) que es el término que se aplica a un estado de indiferenciación o inmadurez del epitelio cervical en el cual células de un tipo basal o de un tipo inmaduro son llevadas desde su posición normal hacia la superficie con grados variables de atipismo (Figge y col., 1962).

Los resultados obtenidos por distintos investigadores en estudios realizados de epitelio cervical *in vitro* indicaban que la principal diferencia *in vitro* entre epitelio cervical normal y neoplasia intraepitelial cervical (displasia y carcinoma “*in situ*”) era de morfología. El epitelio normal crece como pavimentación tipo mosaico con contacto celular íntimo y una velocidad de crecimiento que es similar a la neoplasia intraepitelial. Displasia y carcinoma “*in situ*” difieren del epitelio normal principalmente por la carencia de contacto celular, capacidad migratoria y morfología celular variable y no se encontraban diferencias significativas entre los diversos grados de neoplasia intraepitelial aunque en algunas

pacientes ocasionales se observaba una forma de célula puntiaguda característica y ligera pleomorfia (Richart, 1963b).

Las observaciones clínicas y los estudios moleculares han establecido al virus papiloma humano (VPH) como un factor importante involucrado en la generación de neoplasias de células escamosas del tracto genital que identifican claramente el tipo de VPH como una variable principal predictiva para la anticipación del curso clínico de la lesión. Sin embargo, de hecho parecería que hay una serie de eventos discretos (se cree que vinculados) implicados en la historia natural de estas neoplasias del tracto genital y que usando criterios histológicos aplicados, es posible distinguir dos categorías de lesiones en el “espectro NIC” de la enfermedad. Una designación NIC, está asociada con un grupo heterogéneo de tipos de VPH que ocasionan una lesión cuya consecuencia se esperaría sea impredecible, basados en nuestra comprensión de las implicaciones clínicas de estos diversos tipos de VPH. La otra, la cual comprende los tipos de intermedio y alto riesgo de VPH los cuales corresponden a NIC 2 y NIC 3, se esperaría que se comporten como una lesión precursora. Científicamente parecería más sonoro pensar en términos de lesiones NIC de bajo grado (NIC 1, displasia leve) y lesiones de alto grado (NIC 2, displasia moderada y NIC 3, displasia severa/carcinoma “*in situ*”) más bien que considerar este espectro como un continuo (Richart, 1990; Lizano - Soberón y col., 2009).

Las NICs y el carcinoma “*in situ*” (CIS), que se limitan al epitelio sin traspasar la membrana basal, constituyen las lesiones precursoras de CCU. Cuando la lesión traspasa la lámina basal hacia el estroma del tejido se denomina carcinoma invasor (López y col., 2010).

Las designaciones de tres NIC 1-2-3 ordenadas en hilera puede ser útil en el manejo de algunas pacientes, en correlación de hallazgos citopatológicos e histopatológicos o en el reporte de resultados en el sistema de Bethesda 2001 (Solomon y col., 2002).

El cáncer de cérvix ocurre en dos formas predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinoma. El tipo histológico más comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está más frecuentemente asociado al VPH 16. Al respecto Sundström y col., 2010 realizaron un estudio en Suecia con un grupo de 2772 frotis cervicales de 515 mujeres con cáncer “*in situ*” (CIS), 315 con carcinoma invasor de célula escamosa (SCC) y controles individuales por duplicados para cuantificar los riesgos de oncogenicidad atribuibles a los diferentes tipos de VPH incluyendo los tipos 16 y 18, encontrando que la presencia de VPH 16 y 18 en los primeros frotis estaba asociada con riesgos incrementados de 8, 5 y 18, 6 veces para CIS y SCC respectivamente comparado con el grupo de mujeres negativo para VPH. La infección con otros tipos de VPH de alto riesgo en las primeras muestras también estaba asociada con riesgos incrementados tanto para CIS como para SCC. Además, los resultados obtenidos por estos investigadores aportaron evidencias tentativas que sugerían que a falta de VPH 16 y 18, los tipos de VPH de alto riesgo incrementan el riesgo de cáncer cervical futuro.

El adenocarcinoma es el segundo tipo histológico más común y aunque el VPH 16 también es el más frecuente, la proporción de los genotipos 18 y 45 aumenta significativamente en este tipo de tumores (Lizano-Soberón y col., 2009).

El adenocarcinoma (ADC) del cérvix es un tumor epitelial de la mucosa endocervical que se origina en el epitelio de revestimiento superficial; de allí puede o no extenderse y

sustituir el epitelio glandular. Los cambios preinvasivos tienen diversos grados que van desde las atipias reactivas hasta la displasia y el carcinoma “ *in situ* ” (Grases, 2010).

El cáncer cervical es el segundo tipo de cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo. La mayor parte de los casos se presenta en el mundo en desarrollo, donde en la mayoría de países es la principal causa de mortalidad por cáncer en las mujeres. En muchos países desarrollados, la incidencia del carcinoma de célula escamosa del cérvix ha estado disminuyendo por algún tiempo, aunque el adenocarcinoma de cérvix ahora está aumentando. Una corriente de investigación epidemiológica y con soporte de laboratorio ha identificado la infección con uno de los 15 tipos de VPH de alto riesgo u oncogénicos como una causa necesaria pero no suficiente del cáncer cervical. Aunque la mayoría de las mujeres en algún momento hayan sido infectadas con VPH, pocas progresarán a la enfermedad invasiva. Por consiguiente hay una necesidad continua por desarrollar marcadores estrechamente relacionados con la progresión de la enfermedad, más que aquellos aportados por el sólo análisis morfológico (coloración con hematoxilina – eosina) o el ensayo para la presencia de tipos de VPH de alto riesgo. La identificación de los factores virales y del hospedador que modulan el riesgo de la progresión de la enfermedad en mujeres infectadas con VPH requiere una comprensión más completa de la historia natural de la infección de VPH y su relación con la adquisición de anormalidades epiteliales (Woodman y col., 2007).

Actividad de las oncoproteínas virales E6 y E7.

Los papilomavirus son pequeños virus de ADN, de doble hebra, cuyo efecto transformante resulta principalmente de la actividad de sus oncoproteínas E6 y E7. Estas proteínas se

unen a varios reguladores celulares primordiales en el control de procesos biológicos como los siguientes: la apoptosis, proliferación celular, estabilidad cromosómica, transcripción de genes (oncogenes y genes supresores de tumor), diferenciación celular y la respuesta inmunológica entre otros (Lizano-Soberón y col., 2009).

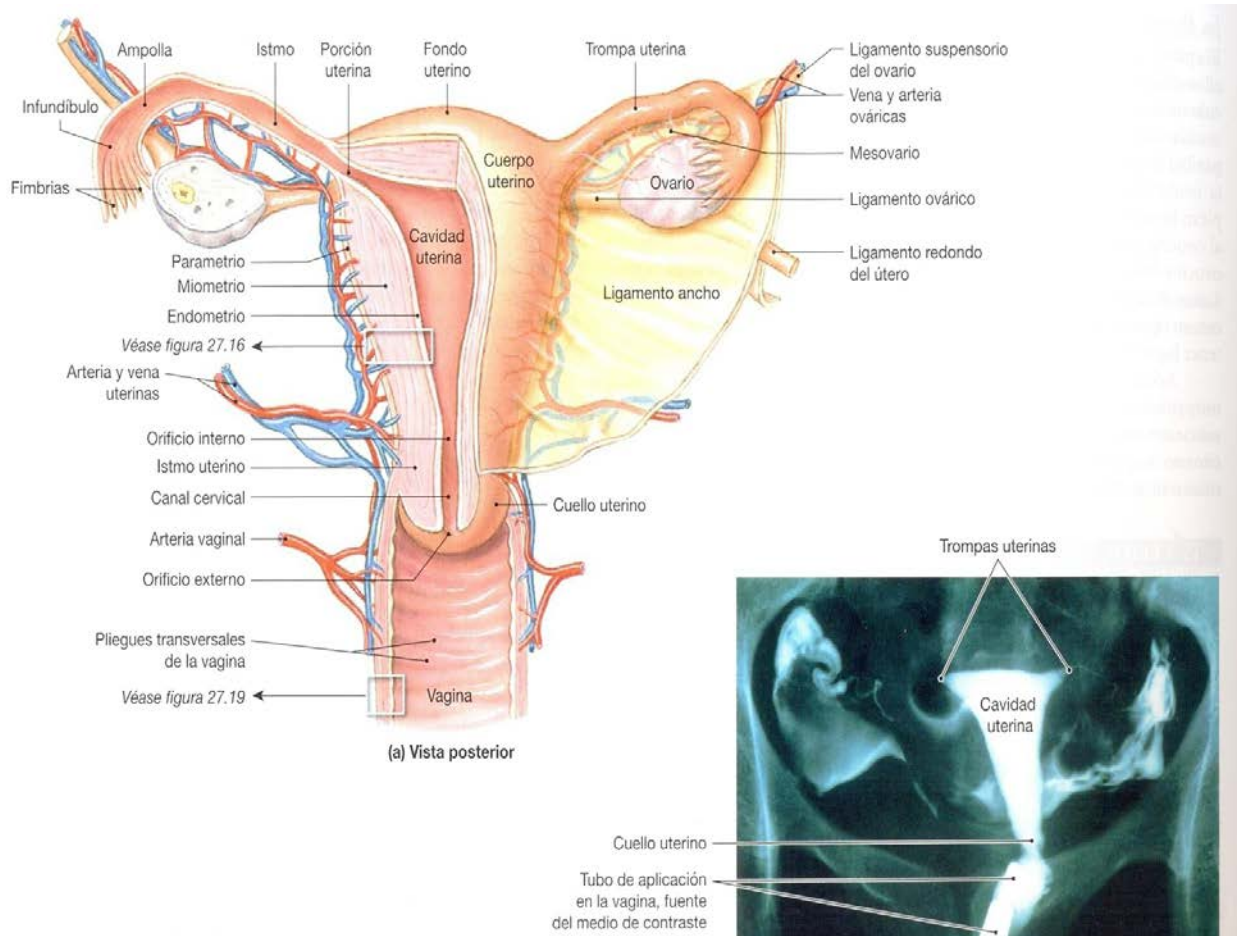
La proteína E7 se une a la proteína del retinoblastoma y desplaza los factores de transcripción E2F normalmente secuestrados por Rb, favoreciendo la progresión a través del ciclo celular. Es oportuno señalar que la proteína E7 de los tipos de VPH de alto riesgo tiene una mayor afinidad por Rb que E7 de tipos de VPH de bajo riesgo. La E7 también inactiva las CDKI, CDKN1A/p21 y CDKN1B/p27. Las proteínas E7 de los tipos de VPH de alto riesgo (tipos 16, 18 y 31) se unen y posiblemente también activan las ciclinas E y A. La proteína E6 muestra unos efectos complementarios. Se une y media en la degradación de p53 y BAX, un miembro proapoptosis de la familia BCL2; así mismo, activa la telomerasa. En analogía con E7, la proteína E6 de los tipos de VPH de alto riesgo muestra una mayor afinidad para p53 que la proteína E6 de los tipos de VPH de bajo riesgo (Kumar y col., 2008).

La proteína p53, es un factor transcripcional que estimula la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular y apoptosis. E6 puede unirse a p53 y mediar su degradación, proceso en el cual también participa la proteína celular asociada a E6 (E6-AP), que actúa como una ubiquitin ligasa. El análisis de tumores humanos ha revelado que p53 es de los genes comúnmente mutados.

Se sabe además, que la proteína E6 interfiere con el sistema inmunitario evitando el reconocimiento de células infectadas, facilitando así la supervivencia del VPH e impidiendo su eliminación (Tungteakkhun y Duerksen – Hughes, 2008; Lizano – Soberón y col., 2009).

También se ha reportado que la oncoproteína E6 puede inhibir la transcripción de genes que codifican para receptores que participan en la transducción de señales inducidas por el reconocimiento de patógenos como son los receptores tipo toll (TLR) (Lizano-Soberón y col., 2009).

La proteína E7 origina un complejo con la forma hipofosforilada de pRb e induce su degradación. La inactivación de pRb permite la activación constitutiva del factor de transcripción E2F (normalmente controlado por asociación con pRb) el cual puede activar genes que intervienen en la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular (Lizano-Soberón y col., 2009).



El Utero

ANTECEDENTES

Proteínas del ciclo celular en lesiones intraepiteliales cervicales.

Los resultados de numerosos trabajos científicos realizados en diversas partes del mundo indican que las infecciones por el virus de papiloma humano (VPH) afectan la expresión de proteínas del ciclo celular produciendo alteraciones en el epitelio cervical que promueven el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ya que las oncoproteínas propias del VPH interactúan con las proteínas que controlan la función del ciclo celular o que mantienen la organización celular normal en el tejido epitelial, entre las cuales están entre otras, incluidas en dicho ciclo, las siguientes: p53, p16 INK_{4a}, Ki67, ciclina D1, PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), E-cadherina y p63.

La integración del ADN viral en el ADN del hospedador ocasiona NIC 2, NIC 3 y carcinomas. Esta integración viral en el genoma del hospedador se asocia con la rotura del código de lectura abierta y pérdida de función de E2, que fisiológicamente regula E6 y E7, lo que desencadena una proliferación celular sin control, ya que la proteína E6 acelera la degradación de p53, mientras que E7 interfiere la vía de p16 INK_{4a}/CDK₄/ciclinaD1/pRb.

p53 es una fosfoproteína nuclear de 53 kDa, formada por 393 aminoácidos y 3 dominios. Su inactivación, bien sea inducida por E6-VPH o más raramente debida a mutaciones, conduce al desarrollo del carcinoma cervical (Veitía y col., 2009).

El guardián del genoma p53 frustra la transformación neoplásica por tres mecanismos interconectados: la activación de una parada temporal del ciclo celular (denominada quiescencia), la inducción de una parada permanente del ciclo celular (denominada senescencia) o el desencadenamiento de la muerte celular programada (denominada apoptosis) (Kumar y col., 2008).

La proteína p16 es un inhibidor de las ciclinas que participa en el punto de control G₁ del ciclo celular, junto con la proteína pRb y la ciclina D1. La proteína p16 se encuentra sobre-expresada en las lesiones cervicales asociadas a infecciones por las cepas de alto riesgo de VPH. Con frecuencia coinciden la sobre-expresión de p16 y la expresión de Ki67 hasta en los estratos superiores del epitelio (Lerma, 2005).

La unión específica de la proteína p16 INK_{4a} con las quinasas dependientes de ciclina CDK₄ y CDK₆, inhibe la actividad de fosforilación de los complejos CDK-ciclina D1 a través del complejo de proteína nuclear Rb/E2F. La vía ciclina D/CDK_{4,6}/p16 INK_{4a}/Rb/E₂F desempeña una función fundamental en el control del crecimiento celular a través de la integración con múltiples estímulos mitogénicos y no mitogénicos (Sano y col., 1998; Queiroz y col., 2006).

El diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) depende de la identificación de características morfológicas bien descritas en la biopsia cervical. Sin embargo, constantemente se ha demostrado que el diagnóstico histológico de NIC es afectado por proporciones significativas de disensión entre los patólogos. En años recientes se ha demostrado exitosamente que p16INK4a es un marcador sensible específico de carcinomas y lesiones NIC asociadas a VPH, por lo tanto se ha sugerido que la tinción para este biomarcador pudiera ayudar a identificar más precisamente lesiones NIC en secciones de tejido y por consiguiente reducir variaciones en la interpretación de lesiones cervicales. La utilidad de p16INK4a en reducir la variabilidad entre interobservadores, particularmente es su capacidad para detectar pequeños focos de NIC y la estrecha relación entre NIC e infección por VPH (Ordi y col., 2009).

p16INK4a es un biomarcador para infección de VPH transformante que pudiera actuar como aditamento en la evaluación citológica e histológica corriente de frotis y biopsias

cervicales, permitiendo la identificación de aquellas mujeres con resultados ambiguos que requieren referencia de colposcopia y tratamiento potencial (Tsoumpou y col., 2009). De hecho, el análisis de expresión de p16INK4a ha aportado información que es consistente con resultados de histopatología y podría complementar otras pruebas de detección de VPH en un procedimiento clínico de pronóstico con el fin de encontrar pacientes en riesgo de cáncer cervical (Andersson y col., 2006). Se ha encontrado que el grado de expresión de p16INK4a y de ki-67 se correlaciona con el grado de neoplasia cervical ($p < 0,001$) (Agoff y col., 2003).

En el año 2010, Missaoui y col., realizaron en Túnez un trabajo con el propósito de analizar la correlación entre la expresión de p16INK4a, la presencia de lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales (NIC), su grado y la infección por VPH. En dicho estudio se revisaron 87 muestras de cuello uterino, incluyendo 7 muestras de tejido normal, 17 lesiones benignas, 34 lesiones precancerosas, 22 muestras de carcinoma de células escamosas invasivo y 7 adenocarcinomas. Se usó la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la sobreexpresión de p16INK4a y se detectó infección de VPH mediante PCR. Los resultados obtenidos por los investigadores indicaron que no había inmunoreactividad de p16INK4a en tejido normal o en lesiones benignas; se encontró que la inmunoreactividad para p16INK4a era focal en NIC1, y se observó inmunoreactividad de p16INK4a fuerte, difusa y uniforme en el núcleo y en el citoplasma de todas las lesiones NIC 2 y NIC 3, como también en aquellos carcinomas invasivos de células escamosas y adenocarcinomas. Se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) entre sobreexpresión de p16INK4a, grado de lesión e infección por VPH de alto riesgo (Missaoui y col., 2010).

El antígeno Ki67 es una proteína nuclear grande (345 a 395 kDa) el cual es expresado durante todas las fases del ciclo celular, es decir G_1 , S, G_2 y M, de células en proliferación pero está ausente en células en reposo o en la fase G_0 ; por consiguiente esta proteína es un marcador de proliferación celular (Van de Putte y col., 2004a; Queiroz y col., 2006).

La ciclina D1 es una proteína de 36 kDa que participa en la regulación de transiciones a través de varias fases del ciclo celular por asociación con y activación de quinasas dependientes de ciclina (CDKs).

La sobreexpresión de las ciclinas D1, E, A y B1 ha sido observada en 13%, 22%, 24% y 18% respectivamente, de una serie de carcinomas cervicales (Lerma, 2005; Van de Putte y col., 2004a).

El antígeno nuclear de proliferación celular PCNA es una proteína multifuncional de 36 kDa. PCNA se relaciona con la proliferación celular, resaltando específicamente las células con replicación activa de ADN y es usado universalmente para evaluar la proliferación celular mediante inmunohistoquímica, sin embargo no distingue células displásicas o malignas proliferantes de células normales proliferantes (Wang y col., 2004).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) fue detectado inicialmente en células en proliferación mediante inmunofluorescencia indirecta usando suero autoinmune de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Independientemente Celis y col., usando electroforesis en gel en dos dimensiones, identificaron “ciclina” como una proteína nuclear asociada con células proliferantes o células en periodos cíclicos; luego se demostró que PCNA y ciclina son proteínas idénticas (Celis y col., 1984). Antígenos de reacción cruzada con PCNA pueden ser detectados en varias especies, indicando que esta es una proteína celular altamente conservada que cumple una función importante en el núcleo (Kurki y col., 1986). Esta proteína no está fosforilada y muy probablemente no está fuertemente unida al

ADN; está presente en pequeñas cantidades en células normales que no se dividen (incluyendo células senescentes y quiescentes) o tejidos, pero es sintetizada por células en proliferación, tanto normales como aquellas resultantes de la transformación. La síntesis de PCNA/ciclina fluctúa durante el ciclo celular con un incremento específico durante la fase S. La síntesis de PCNA/ciclina no es inhibida por afidocolina, sugiriendo que su síntesis no es desencadenada por la replicación de ADN (Ogata y col., 1987). Su estructura muestra una secuencia de 261 aminoácidos. Estudios experimentales sugieren que PCNA es necesaria para la replicación del ADN y la proliferación celular. El producto del gen PCNA es un co-factor de la ADN polimerasa delta (Mittal y col., 1993).

Durante la replicación del ADN, una forma de PCNA es localizada en los sitios de síntesis de ADN y puede ser detectada por inmunotinción en núcleos en la fase S con anticuerpos anti-PCNA después de la fijación apropiada de las células. Además, también se observó que después de la exposición de las células a la irradiación ultravioleta (UV), una forma de PCNA estrechamente unida podía ser detectada en todas las fases del ciclo celular. Esas observaciones sugerían que PCNA podría estar involucrada en la síntesis de reparación del ADN como también en su replicación (Shivji y col., 1992).

Desde hace varios años se ha examinado la actividad proliferativa de la displasia y del carcinoma “*in situ*” (CIS) en el cuello uterino mediante inmunotinción de PCNA y tinción de la región organizadora nucleolar argirofílica de unión a plata (AgNOR) y se demostró una diferencia significativa en el índice de marcaje de la inmunotinción de PCNA obtenida de las células displásicas en cada categoría histopatológica entre la displasia severa y CIS. No se observó diferencia significativa entre cada categoría de displasia. La frecuencia de las figuras mitóticas fue más alta en CIS, seguida en orden decreciente por displasias severa, moderada y leve y no estaba estrechamente correlacionada con la clasificación

histopatológica. Se observó una correlación íntima entre PCNA y los índices mitóticos en displasia severa y CIS; sin embargo, el número medio de los AgNORs en cada categoría de displasia y CIS no fueron significativamente diferentes y no hubo relación aparente con la clasificación histológica. No obstante, el índice de PCNA parecía ser un medio útil de evaluar actividad proliferativa en displasia y CIS y especialmente en distinguir CIS de displasia severa. Adicionalmente, el índice presente de PCNA sugería que una considerable alteración del comportamiento biológico que involucra cambios genéticos ocurre durante la progresión de la carcinogénesis desde la displasia severa a CIS (Kobayashi y col., 1994).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) está involucrado en un amplio rango de funciones en el núcleo. Sin embargo una cantidad sustancial de PCNA también está presente en el citoplasma, aunque su función es desconocida. A través de ensayos de inmunotransferencia y de espectrometría de masa, se ha podido demostrar que PCNA está asociado con varias oncoproteínas citoplasmáticas, incluyendo el factor de elongación, malatodeshidrogenasa y peptidil-propil isomerasa. Mas sorprendentemente PCNA también está asociada con seis enzimas glicolíticas que están involucradas en la regulación de los pasos 4-9 de la ruta de la glicólisis (Naryzhny y Lee, 2010).

En la actualidad se sabe que el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) de células eucariotas es una proteína accesoria de replicación que funciona en la replicación, reparación y recombinación del ADN. Además, se ha determinado que PCNA es un homotrímero, y que cada subunidad tiene dos dominios que le dan al complejo PCNA una forma de anillo con una seudosimetría doblada en 6. El anillo de PCNA es cargado sobre el ADN por una abrazadera cargadora dependiente de ATP llamada factor C de replicación (RFC). Una vez sobre el ADN, PCNA funciona como una abrazadera deslizante para

reclutar varias proteínas entre las cuales están la ADN polimerasa δ y ϵ , DNA ligasa I y el factor de reparación de ADN XPG entre otras (Freudenthal y col., 2011).

Las cadherinas son glicoproteínas transmembranas que facilitan la adhesión intercelular por mecanismos dependientes de calcio. La cadherina E es la más abundante y su dominio citoplasmático se conecta al citoesqueleto por medio de las cateninas (Lerma, 2005). Las moléculas adyacentes de cadherina E mantienen las células juntas; además la cadherina E puede transmitir señales anti crecimiento por secuestro de catenina- β . La cadherina E tiene un peso molecular de 120 kDa; es la cadherina más importante en los epitelios y hay evidencias de que la inactivación del complejo de adhesión cadherina-catenina desempeña una función en los pasos iniciales de invasión y metástasis (Van de Putte y col., 2004b).

Se ha reportado que la hipermetilación aberrante de islas GpC en la región promotora de cadherina E de varias líneas celulares de cáncer (Hela, C33A, Caski y C4I) y en 20 muestras de tejido de cáncer cervical (estadios IB, IIB, IIIB y IIA), junto con las alteraciones en la estructura de cromatina y de la actividad del factor de transcripción, puede inducir la supresión de la expresión de la cadherina E; además se ha descubierto que el uso de inhibidores de metilación (5-azadeoxicitidina y 5-azacitidina) o de oligonucleótidos antisentido de metiltransferasa, puede cambiar el estado de metilación de islas GpC, ocasionando la activación de algunos genes silenciados (Chen y col., 2003).

En contraposición a lo referente a la función de cadherina E, estudios experimentales han revelado que la adhesión célula-célula mediada por la cadherina E, promueve la sobrevivencia celular protegiendo las células tumorales de la quimioterapia y de la destrucción mientras permanecen en circulación como masas de células tumorales (Querzoli y col., 2010).

El gen p63 es un miembro de la familia del gen p53. La proteína p63 es necesaria para mantener una población de células epiteliales basales y es expresada en las células basales epiteliales de diferentes órganos, incluyendo la piel, el cuello uterino, el tracto urogenital y la próstata. p63 tiene una actividad fundamental en la embriogénesis y es esencial para el desarrollo de varios epitelios, de las extremidades y de las estructuras craneofaciales (Barbareschi y col., 2001). La proteína p63 es expresada en un alto porcentaje de carcinomas de células escamosas y en un bajo porcentaje de células no escamosas (Kaufmann y col., 2001).

Con el propósito de predecir la progresión de la neoplasia cervical, se evaluó la expresión de los marcadores celulares p16INK_{4a}, p14ARF, p53 y PCNA mediante la técnica inmunohistoquímica en secciones embebidas en parafina de 40 muestras de 17 pacientes con lesiones cervicales sucesivas de epitelio escamoso normal, inflamación del cuello del útero a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y cáncer de célula escamosa cervical (SCC) o de NIC a SCC. También se detectó simultáneamente mediante la técnica de PCR, ADN del virus de papiloma humano (VPH) y se tipificó de acuerdo a su secuencia de ADN. Los resultados indicaron sobre-expresión significativamente más alta de p16 INK_{4a} en NIC (75%) y SCC (75%) que en casos normales o inflamación del cuello uterino (12,5%; $p < 0,01$, $p < 0,005$ respectivamente). Aunque la expresión de p53 incrementó gradualmente con la progresión de las lesiones, su proporción positiva no fue significativamente diferente entre las lesiones premalignas y las malignas. La proporción positiva de expresión de p14ARF fue más alta en SCC (83 %) que en cérvix normal o inflamado (25 %; $p < 0,05$). La expresión de PCNA fue negativa en cérvix normal o inflamado, pero se observó una expresión incrementada de 63,2 % en NIC y de 100 % en SCC ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente). Las infecciones por VPH más

comunes en cáncer cervical, es decir, VPH 16 y VPH 18, fueron encontradas en 33 % del grupo normal o con inflamación, 81 % del grupo con NIC y en 75 % del grupo con diagnóstico de SCC (Wang y col., 2004).

Queiroz y col., 2006, evaluaron comparativamente la expresión de las proteínas del ciclo celular p16 INK_{4a}, ciclina D1, p53 y Ki67 en el epitelio de pacientes con cuello uterino normal y aquellas en varias etapas de carcinogénesis cervical, para detectar un conjunto de marcadores que pudieran ser útiles en la identificación de pacientes en alto riesgo de desarrollar cáncer invasivo. Entre las 50 muestras estudiadas habían 11 casos normales, 15 con NIC1, 10 con NIC 2 y 14 con NIC 3; 41 eran positivas por PCR para ADN de VPH y 20 eran VIH (virus de inmunodeficiencia humana) positivas. Como control positivo para p16 INK_{4a}, se usaron secciones de biopsias fijadas con formaldehído y embebidas en parafina, de carcinoma de células escamosas de cuello uterino invasivo; para ciclina D1, carcinoma lobulillar de mama; para p53, adenocarcinoma colónico y para Ki67, carcinoma de mama.

Como control negativo, se usó suero no inmune normal de la misma fuente (ratón) que los anticuerpos primarios. Todas las láminas (casos y controles) fueron sometidas al mismo proceso.

Para la evaluación comparativa de los cuatro (4) marcadores estudiados, la técnica estadística del análisis de correspondencia múltiple (MCA), (SPAD 3,5 – Systeme Portable pour l'Analyse de's Données), fue usada para determinar la asociación entre las varias categorías de marcadores (p16 INK_{4a}, ciclina D1, p53 y Ki 67) y su asociación con el grado histológico.

La prueba de Kruskal-Wallis (KW), pruebas de correlación estadísticas (software R 2.0.1) Univariada y Spearman, mostraron una diferencia significativa entre la expresión de las

proteínas del ciclo celular p16 INK_{4a}, ciclina D1, p53 y Ki67, y los diferentes diagnósticos histológicos ($p < 0,005$).

Análisis de correspondencia múltiple (MCA).

MCA es una técnica estadística apropiada para el estudio de asociaciones que ocurren entre las diversas categorías de un conjunto de variables cualitativas, ya que reduce la información a un espacio bidimensional en el cual hay un par de dimensiones (ejes factoriales) y permite la evaluación entre todas estas categorías. MCA mostró asociación positiva entre las expresiones de los marcadores p16 INK4a y Ki 67, y el grado histológico en contraposición con ciclina D1.

A través de los modelos de regresión logística univariada, ajustados para cada uno de los cuatro marcadores separadamente, se encontró con los porcentajes globales de los resultados correctos, que los grados histológicos pronosticados por el modelo, usando el marcador p16 INK4a, fueron aquellos que eran más equivalentes a los grados histológicos reales observados en la muestra. En este contexto, el segundo marcador con el mejor poder predictivo resultó ser el Ki 67, seguido por ciclina D1. El marcador p53 presentó el menor resultado predictivo (Queiroz y col., 2006).

Detección y tipificación del virus de papiloma humano.

Para detectar y tipificar el virus de papiloma humano (genotipos 6/11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), Sotlar y col., 2004, evaluaron un ensayo de PCR anidada múltiple (NMPCR, Nested Multiplex PCR) que combina cebadores de consenso de E6/E7 degenerados (variación en sólo algunas bases nucleotídicas) y cebadores tipo específicos incluyéndose plásmidos con ADN de VPH (control positivo) en 1.525 muestras de hisopados cervicales. Además evaluaron el desempeño del ensayo

MNPCR respecto a la PCR convencional con los iniciadores MY09-MY11 y GP5⁺-GP6⁺ y de la PCR anidada más MY/GP en 495 raspados cervicales, logrando detectar los genotipos de los 18 VPH investigados. Los resultados obtenidos fueron: 34,7% en ausencia de NIC; 94,2% para NIC 1/NIC 2 (NIC leve o moderada) y 97,8% para NIC 3 (displasia severa) con sensibilidades significativamente más altas ($p < 0,001$) que los ensayos MY09-MY11 y GP5⁺-GP6⁺ y sensibilidades comparables o igual a aquellos ensayos de MY/GP (“estándar de Oro”).

Antecedentes en la República Bolivariana de Venezuela.

Con el propósito de analizar ultraestructuralmente los cambios morfológicos de las células infectadas por el VPH en lesiones escamosas intraepiteliales (LIE), se estudiaron 56 muestras de cérvix obtenidas de pacientes de la consulta de patología de cuello uterino del ambulatorio “María Teresa Toro” del estado Aragua (Venezuela), que no habían recibido tratamiento y eran sugestivas de infección por VPH. A cada paciente se le tomó una muestra con hisopo de dacrón para el estudio molecular y una biopsia dirigida del epitelio cervical para la observación ultraestructural. Se utilizó la técnica PCR para la detección y tipificación de los virus, obteniéndose los siguientes resultados: las lesiones escamosas intraepiteliales fueron 83% de bajo grado (LIE gB) y 16% de alto grado (LIE gA). En el 23% de las muestras fue detectado el ADN viral y el 76% resultaron ADN negativas. Los VPH tipos 16, 6 y 11 fueron encontrados en LIE gB y los tipos 16 y 6 en LIE gA. El análisis ultraestructural mostró en LIE gA con ADN viral positiva la presencia de figuras mielínicas, gránulos de lipofucsina, cambios en las mitocondrias, células con alargamiento nuclear, núcleos hipercromáticos y envoltura nuclear interrumpida (Graterol y col., 2006).

En relación con la evolución de la neoplasia intraepitelial, el carcinoma cervical y la infección con el virus de papiloma humano (VPH), se evaluó la expresión de proteínas dependientes de genes en el epitelio cervical, en la lesión de NIC y en el carcinoma del cuello uterino (CC) a través de diversos estudios de inmunohistoquímica (IHQ), entre las cuales se incluyeron p53, p16 INK_{4a}, Ki67, ciclinas y otras como b-catenina, p21, p27, bcl2, c-Myc, Wnt y MCM (proteína mini cromosómica de mantenimiento). Se concluyó que la actividad transcripcional de diversos genes provoca alteraciones de la heterocigosis y pérdida de regiones cromosómicas que influyen en la sobre-expresión de proteínas o en la pérdida parcial de la expresión de algunas glicoproteínas en la superficie celular por la activación de genes del VPH (García-Tamayo y col., 2009).

Se ha reportado que la citología del cuello uterino en base líquida mejora la calidad de la muestra y que el material residual podría ser utilizado para realizar pruebas complementarias, como la detección del virus de papiloma humano (VPH) y estudio inmunocitoquímico de biomarcadores. Empleando esta técnica, se realizó un estudio en 67 pacientes que presentaban una citología anormal o patología cervical previa con el propósito de correlacionar la presencia de VPH y la inmunoexpresión de p16 INK_{4a} en las muestras citológicas en base líquida. La detección y genotipificación de VPH se realizó mediante PCR-Sp F10/LIPA (INNOLIPA Extra Amp) y para la inmunodetección de p16 INK_{4a} se utilizó el anticuerpo clon E₆H₄. Se encontró que la prevalencia general del VPH fue de 43,3% (29/67). El genotipo del VPH más frecuente fue el 16 (31,03%) y el 48,3% de los casos presentó infección múltiple. En el 35,8% de las muestras cervicales se detectó inmunoexpresión de la proteína p16 INK_{4a}, la cual estaba significativamente asociada ($p < 0,020$) a la presencia de VPH (Toro de Méndez y Fernández, 2011).

Frecuentemente el cáncer de cabeza y cuello ha sido asociado al abuso en el consumo de alcohol y tabaco, aunque existe un bajo porcentaje de casos que no presenta una historia de alcohol y/o tabaco conocida, motivo por el cual se ha considerado la exposición a otros factores de riesgo como podría serlo la infección por VPH en el desarrollo de este tipo de cáncer. Para determinar la posible relación existente entre la presencia de VPH y el cáncer de cabeza y cuello en seres humanos, se realizó un estudio con 30 muestras de biopsias de tumores de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello recolectadas en el Hospital Oncológico “Padre Machado” de Caracas, en las cuales se evaluó la infección por VPH mediante PCR, y se midió la expresión de p53 por inmunohistoquímica. Se encontró que el 40% (12/30) de las muestras resultaron positivas para la detección viral; de estas el 58% correspondía a VPH tipo 11 (de bajo riesgo oncogénico) siendo la cavidad bucal la localización anatómica más afectada por el virus. No se encontró asociación lineal entre la expresión de p53 y el grado de diferenciación del tumor, ni entre la presencia de VPH y el estadio del tumor (Veitía y col., 2009).

Dependiendo de su asociación con lesiones de alto grado o carcinomas invasores, usualmente los genotipos de VPH se agrupan en VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82) y bajo riesgo oncogénico (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, y 81). Los VPH de alto riesgo más frecuentes en cáncer cervicouterino (CCU) son los genotipos 16 que está asociado a 50%-60% de todos los cánceres y 18 que es observado en 15%-20%. Los genotipos de VPH de bajo riesgo más importantes son el 6 y 11, asociados principalmente al desarrollo de condilomas en hombres y en mujeres (López y col., 2010).

El cáncer de cuello uterino sigue siendo una de las primeras causas de mortalidad por cáncer en la mujer venezolana. En Venezuela hubo en total 1218 muertes por tumor

maligno del cuello del útero en el año 2008 (Anuario de Mortalidad 2008, Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2010).

Con la finalidad de determinar los genotipos y la frecuencia de infección por VPH, en un estudio realizado en el Centro Médico Dr. Rafael Guerra Méndez de Valencia (Venezuela), se incluyeron 200 pacientes de una consulta privada de ginecología y urología de los cuales 175 eran mujeres y 25 varones, con sospecha y/o diagnóstico de infección por VPH a la simple inspección, colposcopia, citología y/o biopsia. A todas las muestras se les realizó genotipificación de VPH por PCR. Las técnicas utilizadas para la obtención de células a fin de realizar la prueba de PCR en la mayor parte de las pacientes, fue el hisopado.

La detección de VPH resultó negativa en 9,75% de las mujeres y en 12% de los hombres (con edades comprendidas entre 15 y 34 años en un 70% sin discriminación de sexo). Se detectaron 15 tipos de VPH en el sexo femenino, de los cuales el 52,57% eran de alto riesgo. En los 85 hisopados de cuello uterino se encontraron 41 casos (43,53%) con VPH de alto riesgo (VPH-16, 31, 33, 35, 45, 51 y 53), y del total de los casos estudiados, 25 (29,41%) fueron negativos.

En los pacientes masculinos se encontraron cinco tipos diferentes de VPH, de los cuales el 24% eran de alto riesgo (VPH-45, 33, 35) y el 64% de bajo riesgo (VPH-6, 11) (Somogyi y col., 2010).

Con el propósito de describir los hallazgos citológicos, colposcópicos, histopatológicos y los resultados de la prueba de PCR para detectar infección por VPH, se realizó un estudio en un grupo de 187 mujeres atendidas en la consulta de ginecología del Hospital Universitario Dr. Ángel Larralde en Valencia (Venezuela) en el período enero 2006-diciembre 2007. Se determinó el grado de la lesión NIC en función de las características histológicas de diferenciación, maduración y estratificación de las células y de las

anomalías de los núcleos en una biopsia cervical. Los resultados indicaron que un 16,5% de las pacientes presentaron algún grado de NIC (NIC I, NIC II o NIC III) y 2,6% presentaron carcinoma epidermoide “*in situ*” o invasor. El 87,7% de las 65 pacientes a las que se les practicó la PCR resultaron positivas para VPH. Entre las 57 mujeres con infección por VPH el genotipo más frecuente fue el 6 con 31,6% seguido del 11 (21,1%). En el 43,9% de las pacientes se detectó presencia de tipos de VPH de alto riesgo oncogénico (16, 31, 33, 35, 45, 56 y 59) siendo más frecuente los genotipos 45, 35 y 33 (Araujo y col., 2010).

Genotipos de VPH presentes en los distintos grados de NIC.

Con el propósito de determinar los distintos genotipos de VPH y estimar la relación existente entre el genotipo y el grado de lesión, en un estudio de un grupo de 160 mujeres con citología cervical anormal, realizado en Bogotá (Colombia), se comparó la sensibilidad y el desempeño de la tecnología Luminex / BS GP5+/GP6+ (basado en PCR seguido de detección de productos biotinilados con 22 sondas de oligonucleótidos tipo específico acopladas covalentemente a distintos conjuntos de perlas de poliestireno marcadas con fluorescencia) con la sensibilidad del método no radiactivo de la línea inversa de transferencia (reverse line blot, RLB, emplea la prueba PCR con los iniciadores generales GP5+/GP6+ que incluye sondas de oligonucleótidos específicas para cada tipo viral con productos de PCR biotinilados detectables con estreptavidina-peroxidasa). Además se usó PCR múltiple. A todas las participantes incluidas en el estudio después de ser sometidas al examen de colposcopia se les practicó raspado y toma de biopsia en el sitio de localización de la lesión y se hizo el análisis histopatológico según el cual se clasificó el grado de la lesión.

Mediante la técnica Luminex x MAP uno o más tipos de VPH fueron detectados en el ADN aislado de los frotis cervicales. Los genotipos 16 y 18 (separados o combinados) fueron detectados en 80,5% de mujeres con diagnóstico histopatológico negativo; en 83,9% de lesiones de bajo grado (NIC I), en 91,8% de lesiones de alto grado (NIC II y NIC III) y en 100 % de cáncer de cuello uterino (CC). Además, también se detectaron en lesiones NIC I, NIC II y NIC III los genotipos 11 y 30, y en NIC I y NIC II, el genotipo 6 (de bajo riesgo). Otros genotipos de alto riesgo (31, 45, 51 y 52) también fueron detectados (separados o combinados) en lesiones NIC I, NIC II y NIC III o en pacientes con patología negativa (García y col., 2011).

Mediante aplicación de la técnica Reverse Line Blot (RLB) con productos de PCR biotinilados que permite la hibridación no radioactiva de estos productos con diferentes sondas de oligonucleótidos mediante un sistema de Miniblotter (MN45; Immunetics, Boston, MA, USA), se realizó la genotipificación (después de la detección de VPH por amplificación de un fragmento de 150 pb del gen L1 con partidores GP5+ y GP6+ biotinilados) en 235 biopsias de lesiones preneoplásicas de cuello uterino de la región de La Araucaria (Temuco, Chile). Para lesiones de bajo grado se detectó como infección única (IU) VPH 16, 45, 56, 11, 6 y 58, y como infección múltiple (IM) los tipos 16/11 (mayor frecuencia), 16/58, 16/42, 18/11, 56/6, 58/6 y 16/39/45.

En lesiones de alto grado se detectó como infección única (IU) los genotipos 16, 31, 18, 58, 35, 33 y 56. Como IM se detectaron los genotipos 18/51, 16/31, 45/35 y 11/58, siendo la IM de mayor frecuencia 18/51 (López y col., 2010).

La incidencia del cáncer cervical en Paraguay está entre las más altas del mundo. Ya que las infecciones por virus papiloma humano (VPH) son consideradas como la principal causa de lesiones intraepiteliales escamosas cervicales y cáncer cervical,

con la finalidad de estimar la probable relación existente entre el genotipo de VPH y dicha patología, se realizó un estudio para determinar la distribución de los genotipos de papilomavirus humano (VPH) en una muestra representativa de la totalidad de pacientes, de acuerdo con la severidad de la lesión. El grupo de pacientes seleccionados incluía 207 mujeres sin lesión intraepitelial escamosa; con lesión intraepitelial escamosa habían 164 con lesión de bajo grado y 74 con lesión de alto grado, y 41 pacientes con cáncer cervical. El tipo específico de VPH se determinó mediante la técnica PCR con los cebadores MY9/MY11 y GP5+/GP6+ correspondientes al péptido L1, seguida por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción y de hibridación de línea inversa de transferencia respectivamente. En total fueron detectados 12 tipos de VPH de alto riesgo y 24 de bajo riesgo, siendo el tipo de VPH 16 el más frecuente seguido por VPH 18 en cáncer cervical (14,6%), VPH 31 el más frecuente en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (14,9%), los tipos de VPH 58/42 en lesiones de bajo grado (9,1% cada uno) y los tipos de VPH 31/58 (2,4% cada uno) en mujeres sin lesiones intraepiteliales escamosas. Además se encontró que entre 285 muestras positivas (células de exfoliado o biopsias cervicales), 24% albergaba múltiples tipos de VPH, siendo esto más frecuente en mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas (30,8% en lesiones de bajo grado, 22,5% en lesiones de alto grado y 22,0% en cáncer cervical) que en mujeres sin lesiones (9,3%) (Mendoza y col., 2011).

En otro estudio realizado en Italia por Sandri y col. (2009) para evaluar la distribución de los diferentes genotipos de VPH de alto riesgo, se seleccionó un grupo de 199 mujeres con lesiones cervicales preinvasivas las cuales estaban recibiendo un tratamiento moderado. Las muestras cervicales fueron obtenidas mediante el uso de un cepillo cervical el cual se lava en un vial con solución preservativa y para llevar a cabo la identificación de los

genotipos individuales de VPH se aplicó una prueba de arreglo lineal de genotipificación de VPH en las muestras cervicales (amplificación por PCR, reacción de hibridación con sondas de captura y reacción de detección mediante conjugado de peroxidasa de rábano con avidina con afinidad por biotina). Se observó que los genotipos de VPH más frecuentes fueron VPH 16 (52,6%), VPH 51 (13,5%) y VPH 31 (10,9%); el VPH 18 fue encontrado en 7,3% de las pacientes. Respecto a la distribución de los distintos genotipos de acuerdo a la severidad de la lesión, se encontró una estrecha asociación entre el incremento en la severidad del diagnóstico histológico y la detección de los tipos de VPH de más alto riesgo carcinogénico, y en todas excepto una neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grado 3, se pudo detectar la presencia de al menos un tipo de VPH de alto riesgo, con más del 70% de las pacientes con NIC grado 3 portando el genotipo de VPH 16. No se encontró asociación entre la infección múltiple y la severidad de la lesión (Sandri y col., 2009).



Lesiones intraepiteliales del cuello uterino asociadas a HPV.

CATEGORIA DE RIESGO DEL HPV	COMPARACION DE LOS SISTEMAS DE CLASIFICACION		
	Richart 1961	Richart 1967	Bethesda
Bajo riesgo			L SIL
Bajo riesgo	Displasia leve	CIN I	
Alto riesgo	Displasia moderada	CIN II	H SIL
Alto riesgo	Displasia severa	CIN III	
Alto riesgo	Carcinoma in situ		

(* El condiloma viral plano se considera L-SIL y la cepa de HPV implicada en estas lesiones es de bajo riesgo).

Clasificación de las Lesiones NIC asociadas a VPH.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la expresión de marcadores celulares mediante técnicas inmunohistoquímicas en lesiones de cuello uterino causadas por virus de papiloma humano (VPH).

Objetivos Específicos:

1. Reconocer las características histológicas de muestras de lesiones de cuello uterino con la coloración hematoxilina / eosina y seleccionar las muestras para este estudio de acuerdo al grado histológico.
2. Evaluar mediante la técnica inmunohistoquímica la expresión de marcadores moleculares de proliferación celular (PCNA), de adhesión celular (Cadherina E) y de supresión celular (p16 INK_{4a}) en las muestras seleccionadas en el objetivo específico anterior.
3. Análisis estadístico.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 36 muestras obtenidas de las lesiones de cuello uterino de pacientes con bajo y alto grado histológico de la lesión, es decir, distribuidas así: 18 NIC I, 5 NIC II, 7 NIC III y 6 muestras de carcinoma invasor en cuello uterino (Ca inv cu).

Estas muestras procedían de los siguientes hospitales: Hospital Dr. Domingo Luciani (El Llanito, Petare), Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño (El Pescozón, Caracas) y Hospital Oncológico padre Machado (El Cementerio, Caracas).

Criterios de selección de las muestras.

- Se trabajó con biopsias de lesiones de cuello uterino clínicamente evidentes a la simple inspección de pruebas de citología con el microscopio óptico de cortes de tejido fijados en formol al 10 % e incluidos en parafina, colocados en láminas portaobjeto las cuales fueron coloreadas con hematoxilina/eosina (H/E).
- Previamente se había acordado evitar incluir en este estudio muestras de biopsias de pacientes en las siguientes condiciones: toma de contraceptivos orales, estado de gravidez o de parto reciente o con trauma de útero postparto, pero no se controló esa exigencia ya que en las historias de las pacientes de quienes procedían las biopsias, no se encontraron esos datos.
- Todas las pacientes cuyas biopsias fueron incluidas en este estudio, previamente habían firmado un consentimiento informado en el cual se especificaba la utilización de dichas biopsias con fines de investigación.
- De parte del Dr. Pedro Michelli (Tutor de este trabajo), se pasó comunicación por escrito a la respectiva Comisión de Bioética de cada hospital en los cuales se recolectaron las muestras de biopsias de las pacientes incluidas en este estudio.

Clasificación de las muestras según el grado histológico de la lesión.

La clasificación del grado de la lesión NIC se hizo en base a las alteraciones del patrón celular observadas en el epitelio cervical mediante coloración con hematoxilina – eosina (H/E). Según Richart, 1966, mientras en el epitelio normal los núcleos son equidistantes, uniformes y picnóticos, los núcleos en las lesiones NIC primarias (NIC I o leve) están dispersos alrededor del campo en una forma desorganizada y aunque algunas áreas pueden contener relativamente pocos núcleos, en la mayoría de las áreas estos están amontonados, y excepto en las displasias suaves, hay siempre un incremento total en la concentración nuclear (Richart, 1966).

A medida que el grado de apiñamiento nuclear incrementa, se encuentra una disminución concomitante en el número de células binucleadas y gigantes y una apariencia incrementantemente uniforme a medida que las células monomórficas de las zonas epiteliales más profundas comienzan a aparecer en la superficie, alteraciones que definen las lesiones NIC II y NIC III (displasia moderada y severa) o de alto grado (Richart, 1966).

Se trabajó con cortes de 0,4 μm de las muestras de biopsias fijadas en formol al 10% incluidas en parafina y coloreados con hematoxilina/eosina.

Como controles negativos (es decir, de tejidos sanos o “normales”) se consideraron las porciones sin lesión en los cortes de tejido epitelial cervicouterino. Como controles positivos se incluyeron en los ensayos cortes de biopsias con lesión de alto grado con fuerte reactividad positiva. Además, también se incluyeron como controles negativos, los mismos cortes sometidos al mismo procedimiento de la técnica inmunohistoquímica excepto que en lugar del anticuerpo monoclonal antimarcador a evaluar, se usó un anticuerpo monoclonal primario anti – neurofisina relacionada a la oxitocina de rata.

Se empleó la técnica inmunohistoquímica para estudiar la expresión de las siguientes proteínas celulares: PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), cadherina E y p16INK4a siguiendo los procedimientos explicados en la bibliografía (Mirhashemi y col., 2003; Van de Putte y col., 2004a; Wang y col., 2004; Queiroz y col., 2006).

Técnica inmunohistoquímica para evaluar expresión de PCNA y cadherina E.

Los marcadores celulares se ensayaron para cada biopsia de paciente con los cortes de tejidos montados (2 o más por paciente) en láminas portaobjeto sensibilizadas con polilisina L.

Los cortes se incubaron en una estufa a 60°C por al menos 30 minutos o a 37°C durante toda la noche.

Siguientes pasos sucesivos:

- Desparafinar – Hidratar: se dispuso una batería de 5 bandejas con xilol de grado técnico y 4 con alcohol isopropílico (grado técnico, 70%, 50% y 30%). Aun caliente, las láminas se sumergieron tres minutos en el primer xilol y el mismo tiempo en cada bandeja de la serie; a la salida del último alcohol se dejaron sumergidas en agua corriente por 10 minutos.
- Recuperación del antígeno: la recuperación se llevó a cabo en una vaporera. El amortiguador depende del anticuerpo primario; puede ser: citrato 0,1M pH 6,0, Dako pH 6,1 o pH 9,0. La solución tampón (amortiguadora) fue precalentada en el recipiente (estuche) contenedor de las láminas. Luego se calentaron las láminas cerca de 100 °C durante 30 minutos en la vaporera. Con algunos anticuerpos se requiere incubar toda la noche. La recuperación puede hacerse con una proteinasa (tripsina, pepsina o proteinasa K).

- Se dejó enfriar el estuche hasta temperatura ambiente, se lavaron las láminas sumergiéndolas en agua destilada por 5 minutos y se escurrieron bien sobre el borde de una servilleta.
- Bloqueo de las peroxidasas endógenas: se cubrieron los cortes con solución al 3% de peróxido de hidrógeno (se trabajó con mezcla de 367 ml de H₂O₂ al 3% + 133 ml de metanol de grado técnico). Se incubaron por 30 minutos.
- Se escurrió bien la solución de bloqueo y se lavaron los cortes 3 veces por tres minutos con buffer TBST (Tris Base, cloruro de Sodio y Tween 20; Tris 30,3 gr; NaCl 87,7 gr; Tween 20, 5 ml y H₂O – CSP, cantidad suficiente para 5 litros). Se escurrieron las láminas sobre servilletas.
- Anticuerpo primario: se cubrieron los cortes con suficiente dilución (200 µl) del anticuerpo monoclonal primario de ratón anti proteína (marcador celular) humana de Dako Cytomation, preparada según especificaciones del fabricante, usándose el diluyente recomendado (antibody diluyente DAKO, S3022 o Zymed Invitrogen 003218 o buffer fosfato salino, PBS). Se emplearon las siguientes diluciones: PCNA, 1 / 200; E-cadherina, 1/50 y p16 INK_{4a}, 1/200 (este reactivo de la marca CINtec, ya viene listo para ser usado). Se dejó incubar durante 16 horas.
- Se escurrió bien la dilución del anticuerpo primario y se lavaron los cortes tres veces por tres minutos con buffer TBST(o la solución suministrada por la casa comercial). Se escurrió bien tocando los bordes con servilletas.
- Anticuerpo secundario: se utilizó el sistema EnVision de DAKO (Dual Link System peroxidase, single reagent, ref K4061,200 µl). Se incubaron las láminas 2 horas en cámara húmeda oscura.

- Se escurrió bien la dilución del anticuerpo secundario y se lavaron los cortes tres veces por tres minutos con buffer TBST. Se escurrió bien tocando los bordes con servilleta.
- Cromógeno: se prepara según las instrucciones del fabricante. En el laboratorio de patología molecular se disponía del sistema UltraVision Plus Detection System Thermo Scientific TA-060-HDX, que se preparó así: dilución estándar de trabajo, 20 µl de Diaminobencidina (DAB) más 1 ml de substrato o una gota (40 µl aproximadamente) de DAB en 2 ml de substrato. El cromógeno se preparó justo antes de usarlo y se mantuvo protegido de la luz. Se aplicó suficiente dilución para cubrir el corte (unos 30 µl o más, siempre igual) y se dejó incubar por 10 minutos.
- Se lavó el cromógeno con abundante agua corriente por 5 minutos y luego se contrastó sumergiendo las láminas con los cortes en hematoxilina acuosa. Se lavó de nuevo con abundante agua corriente.
- Deshidratación: se dispuso una batería de cinco bandejas con alcohol isopropílico y 4 con xilol (grado técnico). Las láminas se sumergieron tres minutos en el primer alcohol y el mismo tiempo en cada bandeja de la serie. A la salida del ultimo xilol se montó el cubreobjetos con medio permanente (Merckoglas; flüssiges Deckglas für die Mikroskopie); después se observaron las laminas al microscopio óptico.
- Interpretación de los resultados: en principio, la lectura de los resultados se hizo por evaluación semicuantitativa (Mirhashemi y col., 2003) y de intensidad de la tinción; estimando en el primer modo (semicuantitativo) el porcentaje (%) positivo de células por conteo por campo a 400X del total de células diana en cada campo de cuatro (4) campos escogidos al azar. La intensidad de la reacción se evaluó

según el patrón de tinción para cada marcador mediante cruces de la siguiente manera: 1+, reacción débil; 2+, reacción moderada y 3+, reacción intensa.

Técnica inmunohistoquímica para evaluar expresión de p16INK4a.

Se incubaron las láminas con los cortes en una estufa a 60°C durante 40 minutos.

Siguientes pasos sucesivos:

- Desparafinar – Hidratar: se dispuso una batería de 3 bandejas (o cubetas) con xilol de grado técnico y 3 con alcohol isopropílico (grado técnico, de 95% y de 70%), más una bandeja (o cubeta) con agua destilada. Aun caliente, se sumergieron las láminas sucesivamente 3 minutos cada vez en Xilol I, II y III; luego 1 minuto en alcohol isopropílico técnico, 3 minutos cada vez en alcohol isopropílico de 95% y de 70% y después 7 minutos en agua destilada.
- Recuperación de epitopos. La recuperación se llevó a cabo en una vaporera. Se precalentó en un estuche de plástico la solución de recuperación durante 30 minutos (solución tampón Tris 100 mmol/Lt, EDTA 10 mmol/Lt y 15 mmol/Lt, azida de sodio, NaN₃, pH9). Luego se calentaron las láminas cerca de 100 °C durante 30 minutos en la vaporera.
- Se dejaron las láminas alcanzar la temperatura ambiente y se sumergieron durante 10 minutos en agua destilada.
- Bloqueo de las peroxidasas endógenas. Se cubrieron los cortes con 170 µl de solución bloqueadora durante 7 minutos (solución al 3% de peróxido de hidrogeno, con 15 mmol/Lt de azida de sodio).
- Se dejó escurrir la solución bloqueadora y se lavaron las láminas 3 veces 3 minutos cada vez (solución de lavado CINTec^R, número de catalogo 8557).

- Anticuerpo primario. Se cubrieron los cortes con 170 µl de anticuerpo monoclonal anti p16INK4a clon E6H4TM y para los controles negativos se usó el anticuerpo monoclonal anti - neurofisina relacionada con la oxitocina de rata o solamente PBS a pH 7,2 (0,02 M Na₂PO₄ y 0,15 M NaCl). Estos anticuerpos monoclonales fueron suministrados en solución tampón 50 mmol/l Tris con 15 mmol/l de azida de sodio pH 7,2. Se incubaron las láminas con los cortes en cámara húmeda oscura durante 16 horas.
- Se escurrió el anticuerpo primario y se lavaron los cortes tres veces por tres minutos cada vez con la misma solución de lavado.
- Anticuerpo secundario. Se cubrieron los cortes con 170 µl de una solución con un polímero conjugado con peroxidasa de rábano y anticuerpo de cabra antifragmentos Fab de anticuerpos de ratón (la solución contiene preservativos, proteínas estabilizantes y 5-bromo-5-nitro 1,3 dioxano). Se incubaron las láminas durante 2 horas en cámara húmeda oscura.
- Se escurrió el anticuerpo secundario y se lavaron los cortes 3 veces por 3 minutos cada vez con la solución de lavado.
- Cromógeno DAB (solución cromógena de 3,3'-diaminobenzidina). Solución substrato DAB tamponada pH 7,5 la cual contiene < 0,1% de peróxido de hidrógeno, estabilizantes, intensificadores y un agente microbicida. Se mezclaron 2 ml de substrato DAB con una (1) gota de DAB y se cubrieron los cortes con 200 µl de mezcla durante 10 minutos en cámara húmeda oscura.
- Se escurrió la solución del cromógeno y se lavaron los cortes 2 veces por 3 minutos cada vez agitando suavemente en cubeta con agua destilada.

- Contrastar con hematoxilina. Se sumergieron los cortes durante 2 minutos en solución acuosa de hematoxilina. Se lavaron los cortes con abundante agua de chorro durante 4 minutos y luego se sumergieron en agua destilada por 2 minutos.
- Deshidratación. Se sumergieron las láminas con los cortes sucesivamente por tres (3) minutos cada vez en tres (3) cubetas de vidrio con alcohol isopropílico de 70%, 95%, 100% (aquí 1 minuto) y luego sucesivamente durante 3 minutos cada vez en xilol III, II y I. A la salida del último xilol se montó el cubreobjeto con medio permanente (Merckoglas für die Mikroskopie).
- Interpretación de los resultados. Se procedió como en los casos de PCNA y de cadherina E.

Patrones de tinción característicos.

Para la evaluación de la expresión de los marcadores celulares ensayados, se tomaron en consideración las siguientes características:

Para PCNA; tinción nuclear nítida de color marrón (en capa basal, parabasal e intermedia).

Para cadherina E; tinción dorada, nítida e intensa en la membrana celular (en capa basal y parabasal).

Para p16 INK4a; color marrón castaño en el núcleo y en el citoplasma (en capas basal, parabasal e intermedia).

La interpretación de los resultados se hizo mediante evaluación semicuantitativa según el método descrito por Mirhashemi y col. (2003) y de intensidad de tinción, estimando en el primer modo (evaluación semicuantitativa) el porcentaje (%) positivo de células por conteo por campo a 400X del total de células diana en cada campo de cuatro campos escogidos al azar. La intensidad de la reacción se

evaluó considerando el patrón de tinción para cada marcador mediante cruces como se indica a continuación: +, reacción débil; ++, reacción moderada y +++, reacción intensa (evaluación cualitativa). Se evaluó la expresión de los marcadores celulares en zonas de tejido con lesión y en zonas de tejido sin lesión.

Análisis estadístico

Se hizo un análisis estadístico de los datos de porcentaje obtenidos para cada marcador celular, calculando la media y la varianza para cada grupo NIC según el grado histológico de la lesión, tanto para zonas de tejido con lesión como para zonas de tejido sin lesión. Luego se hizo la comparación de medias en distribución t de Student al nivel de significación aceptable de 0,05 con una probabilidad p de error al rechazar la hipótesis nula $< 0,05$ (dócima unilateral) o $p < 0,025$ (dócima bilateral) para lo cual fue necesario calcular los grados de libertad .

Para cada grupo histológico con lesión se comparó su media con la media del grupo histológico de grado inmediato inferior (o superior) para inferir si había o no diferencia estadísticamente significativa entre las medias de esos dos grados histológicos de la lesión en base a la probabilidad p del error al rechazar la hipótesis nula, obtenida de tablas mediante un valor t observado (calculado) y un valor t crítico tabulado dependiendo de los grados de libertad para las variables consideradas.

Además, se estimó si había o no había asociación entre los marcadores celulares evaluados para lo cual se aplicó el método estadístico de correlación, en el cual se calculó un coeficiente r de correlación que representa una medida del grado de asociación de dos variables; en este estudio su valor nos indicaría si existe o no existe una estrecha relación entre dos marcadores celulares.

Tipificación del virus papiloma humano (VPH).

La presencia de VPH en las muestras de biopsias fue diagnosticada en base a las alteraciones celulares características causadas por VPH (criterio histopatológico).

La tipificación de VPH en algunas muestras ya había sido realizada previamente mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en el laboratorio de patología molecular (Cátedra de anatomía patológica, escuela de Medicina Luis Razetti de la Universidad Central de Venezuela) o por secuenciación (CESAN-IVIC).

RESULTADOS

En este estudio se evaluó mediante la técnica inmunohistoquímica la expresión de los marcadores celulares PCNA, cadherina E y p16INK4a en cortes de biopsias de pacientes con lesiones de cuello uterino con edades comprendidas entre los 18 años y los 62 años de edad, y se analizó la probable relación existente entre la infección por los distintos tipos de VPH (aunque no en todas las muestras), el grado de lesión y los niveles de expresión de las tres (3) proteínas mencionadas del ciclo celular en el epitelio cervical.

La clasificación de las lesiones de NIC en el epitelio de cuello uterino de las pacientes incluidas en este estudio se hizo de acuerdo a las alteraciones del patrón celular observadas en el epitelio cervical descritas en la bibliografía y mencionadas en la sección de materiales y métodos (Richart, 1966; Richart, 1990), las cuales fueron reveladas en el procedimiento de coloración con hematoxilina – eosina (H/E) de cortes de biopsias de dichas pacientes colocadas en láminas portaobjeto . Estos resultados se muestran en las imágenes fotográficas de la figura 1, tomadas con un microscopio Olympus I X 50 de esos cortes en las láminas portaobjeto, a un aumento total de 100X y de 200X.

Los resultados del conteo celular (media de cuatro campos en porcentaje) para la expresión de los marcadores celulares PCNA, cadherina E y p16INK4a se encuentran en la tabla 1. Se trata de una evaluación semicuantitativa (% de células marcadas) y cualitativa a la vez (intensidad de la tinción), con un control positivo interno más los controles negativos correspondientes, en la cual se hace una comparación entre porcentaje de células marcadas y la valoración de la tinción mediante cruces.

En esta tabla 1, también se muestran los genotipos de VPH detectados en las diferentes clases de lesiones NIC y cáncer cervical.

Las muestras plfa 334-12 y 32(1)10 fueron usadas como controles positivos.

En lo concerniente a infección por VPH se observa que para la mayoría de las pacientes con lesión leve (NIC I) no se determinó el genotipo de VPH, pero hay cuatro pacientes infectadas por un genotipo de VPH (16, 68, 18, 35 y 66) de alto riesgo oncogénico; tres pacientes infectadas con VPH genotipos 6 y 11, una de ellas conjuntamente (infección múltiple) con los tipos 35 y 66 y otra conjuntamente con el genotipo 44; una paciente infectada con el genotipo 43. Los tipos de VPH 6, 11, 43 y 44 son de bajo riesgo oncogénico. Se observa que en lesiones NIC I los genotipos de VPH más frecuente son el 6 y el 11, y aparecen juntos.

En el caso de las pacientes con lesión moderada (NIC II) se observó que de las cinco pacientes del grupo, habían dos con infección múltiple por VPH de alto riesgo oncogénico, pero también en dos pacientes con NIC II se detectó solamente el genotipo de VPH 6 que es de bajo riesgo oncogénico. Sin embargo pudiera ser que VPH 6 estuviera acompañado de otro genotipo de alto riesgo.

En el caso de las pacientes con NIC III se observó que de las siete pacientes, una de ellas estaba infectada por VPH tipo 52 de alto riesgo y en cuatro pacientes se detectó infección múltiple de VPH (en una estaban presente los genotipos 51/58, en otra los genotipos 16/66/68; en otra los genotipos 35/66 y en la otra los genotipos 16/68/6/11) y aunque los genotipos 6 y 11 también se encontraban presente en una de ellas, es evidente que los genotipos de VPH más frecuentes son de alto riesgo oncogénico.

En el grupo de las seis pacientes con cáncer invasor se encontró que cuatro de ellas estaban infectadas por VPH con el genotipo 16 y una paciente estaba infectada con VPH tipo 59, todos estos genotipos son de alto riesgo oncogénico.

En lo referente a la magnitud (% positivo de células diana) o extensión (dada por la tinción) de la lesión, de los datos de la tabla 1 es obvio que en las zonas de tejido epitelial sin lesión es mucho menor comparada con las zonas con lesión para los marcadores PCNA y p16INK4a; este patrón se mantuvo para todos los grados de las lesiones. Para cadherina E ocurrió lo contrario, es decir es mucho mayor en las zonas sin lesión que en las zonas con lesión. La intensidad de la tinción para PCNA y p16INK4a es más fuerte en las zonas con lesión que en las zonas sin lesión. Para cadherina E la diferencia no es tan pronunciada aunque la inmunotinción es un poco más intensa en zonas sin lesión (la intensidad de la tinción se midió con cruces).

Cuando se consideraron los grados de lesión se observó que para el marcador p16INK4a en general el porcentaje positivo de células diana aumentó con el grado hasta llegar a ser prácticamente del 100% en cáncer invasor. Esta diferenciación no es tan clara en el caso de PCNA, al menos en todo este grupo estudiado.

En el caso de cadherina E, en general se observó una tendencia a la disminución en el porcentaje positivo de células diana a medida que el grado de la lesión aumentaba aunque la diferencia presentó variaciones en la tendencia entre los grados, por lo que la marcación de cadherina E no constituye un criterio de diferenciación del grado de lesión, lo que si se puede afirmar es que la inmunotinción de cadherina E disminuyó mas uniformemente en cáncer invasor.

Con relación a la forma de la inmunotinción resultante sobre las lesiones, las observaciones en el microscopio óptico de los resultados de los ensayos con cortes de

epitelio cervical colocados en láminas portaobjeto, así como de las ilustraciones de fotografías tomadas de esas láminas por la cámara de un microscopio marca Olympus IX50 a los aumentos de 100X y de 200X, mostraron que para el marcador PCNA (figura 2), la inmunotinción desde la capa basal hacia la capa parabasal es nuclear y diferencialmente extendida en toda la lesión pero en las lesiones leves (NIC I) la inmunotinción se presentó en la porción basal del epitelio.

Para el caso de cadherina E (figura 3), la inmunotinción (evaluada en las capas basal y parabasal) se presentó más clara y extendida en las zonas sin lesión y un poco focalizada y menos nítida en zonas con lesión debido a la escasa detección.

En el caso de la proteína p16INK4a (figura 4) se observó que para lesiones NIC I la inmunotinción aparecía focalizada (o escasa y aislada) en ciertas zonas del epitelio, y estaba presente en el núcleo y el citoplasma. En las lesiones de alto grado y en particular en carcinoma invasor, la inmunotinción para p16INK4a apareció difundida y extendida uniformemente sobre toda la lesión a partir de la capa basal hacia estratos superiores y reveló la lesión como un todo.

El análisis estadístico de los resultados considerando las pacientes en grupos según el grado de lesión, permitió apreciar con mejor perspectiva las diferencias existentes entre los grados de lesión, por esta razón se decidió hacer la comparación de las medias en base a la distribución t de Student de los porcentajes positivos de células diana correspondiente a cada marcador celular evaluado según el grado de lesión. Los datos obtenidos para PCNA, cadherina E y p16INK4a se muestran en la tabla 2, 3 y 4 respectivamente.

Para PCNA, los resultados de la tabla 2 indican que hay una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0033$) entre los grados de lesión NIC I y NIC II y que no hay

diferencia estadísticamente significativa entre los grados de lesión NIC II y NIC III ($p > 0,4173$), ni entre el grado NIC III y carcinoma invasor ($p > 0,1747$). Estos resultados sugieren que la inmunotinción para PCNA es diferente entre lesión de bajo y de alto grado.

Los resultados de la tabla 3 indican que la inmunotinción para cadherina E muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0018$) entre los grados de lesión NIC I y NIC II y que no hay diferencia significativa entre los grados NIC II y NIC III ($p > 0,3796$), ni entre NIC III y carcinoma invasor ($p > 0,0776$) Estos resultados sugieren que la inmunotinción para cadherina E es diferente entre lesiones de bajo y de alto grado.

Los datos de la tabla 4 para la inmunotinción correspondiente al biomarcador p16INK4a indican que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grados de lesión NIC II y NIC III ($p > 0,05$), ni entre NIC III y carcinoma invasor ($p > 0,10$). No se disponía de un número mínimo de datos para hacer inferencia con respecto al grado NIC I.

En vista de que los resultados de los ensayos realizados con las muestras de biopsias de este grupo de pacientes mostraban una tendencia hacia el incremento de la inmunotinción para PCNA y p16INK4a en las lesiones respecto a las zonas de epitelio sin lesión y una pérdida de la inmunoreactividad para cadherina E en las lesiones, con los datos obtenidos para estas proteínas se aplicó el método estadístico de correlación para determinar si había alguna asociación significativa entre la expresión de estos marcadores celulares en las lesiones, para lo cual se calculó el coeficiente de correlación r . Los resultados de este análisis de correlación se muestran en la tabla 5. Los valores obtenidos para r indicaron que no hay asociación

entre PCNA y cadherina E ($r = 0,08$), ni entre p16INK4a y cadherina E ($r = - 0,12$). Sin embargo, el coeficiente de correlación r de 0,51 obtenido para PCNA y p16INK4a sugieren un cierto grado de asociación entre la inmunotinción de estos dos biomarcadores.

DISCUSION

Las infecciones por virus papiloma humano (VPH) influyen en la expresión de proteínas del ciclo celular, produciendo alteraciones en el epitelio cervical que promueven el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical NIC.

En lo concerniente a la infección por VPH, de estas pacientes, se encontró que en aquellas con lesiones de cérvix de bajo grado (NIC I) se detectó la presencia de los genotipos de VPH de bajo riesgo oncogénico 43 como infección única (IU) y como infección múltiple (IM) los genotipos 6/11, 6/11/44; también en NIC I se detectó la presencia de los genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico 68, 18, 16 (probable) como infección única (IU) y como infección múltiple (IM), 6/11/35/66, es decir, mezclados con 6/11 que son de bajo riesgo. Esto coincide con los resultados de Graterol y col. (2006), quienes encontraron en lesiones de bajo grado (gB) los genotipos 6/11 conjuntamente con VPH 16; García y col. (20011) también detectaron en NIC I los genotipos 11, 30, 6 y 43, y los genotipos 16 y 18 que son de alto riesgo. Mendoza y col. (2011), detectaron los genotipos 58/42 en lesiones de bajo grado. Se presume que aquellas pacientes con lesiones cervicales NIC I, infectadas con los genotipos de VPH 68, 18 y 16

presentan mayor riesgo de sufrir una lesión NIC de alto grado que aquellas infectadas solamente con los genotipos de VPH de bajo riesgo.

En las dos pacientes de cinco, con lesiones cervicales moderadas (NIC II), se detectó como infección única de VPH el genotipo 6 de bajo riesgo; ya que NIC II es una lesión de alto grado, pudiera ocurrir que el grado histológico de la lesión, no fue bien diferenciado o bien que, en la lesión esté presente un genotipo de VPH de alto riesgo cuya carga no permitió su detección, o que la paciente presentaba un mayor grado de vulnerabilidad frente a esa carga mínima o frente a genotipos de VPH de bajo riesgo.

Como infección múltiple (IM), en otras dos pacientes se detectaron los genotipos 51/59, 58/68 de alto riesgo oncogénico. Al respecto, es oportuno señalar que Graterol y col. (2006), detectaron en lesiones de alto grado (gA) el genotipo 6 de VPH acompañado de VPH 16. Por otra parte, García y col. (2011) detectaron en lesiones NIC II, los genotipos 16, 18, 31, 45, 51, y 52 que son de alto riesgo oncogénico. Mendoza y col. (2011) detectaron el genotipo 31 de VPH en lesiones de alto grado; López y col. (2010), también detectaron en lesiones cervicales de alto grado los genotipos de VPH 16, 51 y 58 entre otros de alto riesgo oncogénico.

En las siete pacientes con lesiones cervicales severas (NIC III) se detectaron genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico, bien sea como infección única (IU) o combinados (IM), incluyéndose genotipos de alto riesgo con genotipos de bajo riesgo oncogénico. Como infección única se detectó en una paciente el genotipo 52. Los otros genotipos de VPH de alto riesgo detectados fueron 16/66/68, 35/66, 51/58 y 16/68/6/11 (6 y 11 de bajo riesgo). García y col. (2011) reportaron presencia en lesiones cervicales NIC III de los genotipos de VPH (separados o combinados)

16, 18, 31, 45, 51 y 52. López y col. (2010) reportaron como infección múltiple (IM) en lesiones de alto grado, presencia de los genotipos de VPH 18/51, 16/31, 45/35 y 11/58. Se observa la coincidencia con este trabajo de la presencia de los genotipos 16, 35, 51 y 58.

Con respecto a las pacientes con carcinoma invasor, en este estudio se encontró en una paciente, como infección única (IU), el genotipo 59 de VPH, y en otras cuatro pacientes se detectó el genotipo de VPH 16 que son genotipos de alto riesgo oncogénico. Entre los hallazgos de esta investigación, destaca la presencia del genotipo de VPH 16 detectado como el tipo más frecuente en lesiones de alto grado, lo cual coincide con los reportes de otros investigadores, entre los cuales se pueden citar los trabajos de Graterol y col. (2006), García y col. (2011), López y col. (2010), Mendoza y col. (2011).

Estas observaciones corroboran las evidencias aportadas por distintos investigadores respecto a la contribución de las infecciones por genotipos de VPH de alto riesgo al desarrollo del cáncer cervicouterino como consecuencia de su capacidad para integrarse en el genoma de las células hospedadoras y de poder así interferir con los mecanismos de control del ciclo celular.

La clasificación de las lesiones de NIC en el epitelio de cuello uterino de las pacientes incluidas en este estudio se hizo en base a las alteraciones observadas en el epitelio cervical, reveladas mediante la coloración con hematoxilina – eosina de cortes de biopsias de dichas pacientes colocados en láminas portaobjeto como se muestra en las imágenes fotográficas de la figura 1, tomadas a un aumento de 100X y de 200X con un microscopio invertido marca Olympus IX50. La imagen A corresponde al caso 680 – 11 (a 100X) con lesión NIC I en la cual se observa un

halo claro perinuclear, núcleos hipercromáticos agrandados y aumento del número de células en el estrato basal. La imagen B corresponde al mismo caso 680 – 11, a un aumento total de 200X. La imagen C corresponde al caso 1825 – 07 (a 100X) con lesión NIC II; en este caso se observa un incremento en el apiñamiento nuclear, forma y tamaño nuclear variados (pleomorfismo) y extensión de la lesión hacia el estrato parabasal, abarcando los 2/3 inferiores del epitelio, con pérdida de la maduración en esos 2/3 de epitelio. La imagen D corresponde al mismo caso 1825 – 07 con NIC II a un aumento total de 200X.

La imagen E ilustra el caso 4606 – 11 con lesión NIC III a un aumento total de 100X. En esta clase de lesión se observan núcleos hipercromáticos con forma homogénea y pérdida de maduración en todos los estratos; la lesión no traspasa la membrana basal. La imagen F corresponde al mismo caso 4606 – 11 con NIC III a un aumento de 200X.

En la imagen G se aprecian las características que describen al caso plfa 334 – 12 con carcinoma microinvasivo (a un aumento de 100X). La lesión sobrepasa la membrana basal y se extiende a la lámina propia; la lesión invade el estroma en pequeñas prolongaciones (microinvasión) y ocurre extensión glandular. La imagen H corresponde al mismo caso plfa 334 – 12 con carcinoma microinvasivo a un aumento total de 200X.

Estas observaciones concuerdan con la descripción de Richart de las lesiones de alto grado (NIC II y NIC III) quien reportó que a medida que el grado de apiñamiento nuclear incrementa, se encuentra una disminución concomitante en el número de células binucleadas y gigantes y una apariencia incrementantemente uniforme a

medida que las células monomórficas de las zonas epiteliales más profundas comienzan a aparecer en la superficie (Richart, 1966).

Respecto a los resultados de la evaluación de los marcadores celulares en epitelio de cuello uterino, se observó que en todas estas pacientes había un incremento en la expresión de PCNA y de P16INK4a en zonas con lesión comparado con zonas sin lesión.

La inmunotinción para PCNA en lesiones NIC I (figura 2, caso 680 – 11, imagen A correspondiente a un aumento total de 100X e imagen B a un aumento de 200X) aparecía de coloración marrón nítida, localizada en el núcleo celular y distribuída predominantemente en la capa basal. En lesión NIC II (figura 2, caso 42 (11) 10, imagen C a un aumento total de 100X e imagen D, a un aumento total de 200X) la inmunotinción para PCNA es nuclear, marrón intensa y estaba presente en los estratos basal y parabasal. En la lesión NIC III (figura 2, caso 4606 – 11, imagen E correspondiente a un aumento total de 100X e imagen F a un aumento de 200X) para PCNA se observó tinción nuclear marrón nítida en las capas basal, parabasal e intermedia. En cáncer invasor (figura 2, caso 41 (10) 10, imagen G correspondiente a un aumento total de 100X e imagen H a un aumento de 200X), para PCNA se observó tinción nuclear marrón nítida en toda la lesión.

En la literatura científica, se ha reportado que el porcentaje PCNA positivo de células epiteliales basales cervicales, era igual o menor al 16 % en todos los casos de epitelio escamoso normal, atrófico o metaplásico e igual o mayor al 18 % en todos los casos con displasia moderada o severa, y que la evaluación del porcentaje de células con tinción para PCNA podía distinguir todos los casos de displasia severa y moderada, y la mayoría de casos con condiloma, de epitelio escamoso

normales, atróficos o metaplásicos (Mittal y col., 1993). Por otra parte, también se ha reportado expresión PCNA negativo en cérvix normal o inflamado, y una expresión de PCNA incrementada en 63,2 % de lesiones NIC y en 100 % de cáncer de células escamosas ($p < 0,01$, y $p < 0,05$ respectivamente) (Wang y col., 2004). Actualmente se sabe que la proteína E7 de VPH puede unirse a la proteína retinoblastoma (Rb) alterando su función y a las ciclinas activándolas; ya que PCNA es una ciclina, el incremento en las lesiones de la expresión de PCNA sugiere un efecto promotor de lesión y de progresión hacia el cáncer cervical (Kumar y col., 2008).

Los resultados de la evaluación de cadherina E en las lesiones de cuello uterino indicaron que su expresión disminuía en las lesiones respecto a zonas sin lesiones. En lesiones NIC I (figura 3, caso 6899 – 10, imagen A correspondiente a un aumento total de 100X e imagen B, a un aumento total de 200X), se observó en la membrana celular tinción dorada nítida en las capas basal y parabasal. En lesiones NIC II (figura 3, caso 42 (11) 10, imagen C correspondiente a un aumento total de 100X e imagen D, a un aumento de 200X) se observó en la membrana celular tinción dorada nítida más abundante en la capa parabasal. En lesiones NIC III (figura 3, caso 4606 – 11, imagen E, a un aumento total de 100X e imagen F a un aumento de 200X) se detectó tinción dorada intensa en la capa parabasal y ausencia de tinción en la capa basal. En carcinoma microinvasivo (figura 3, caso plfa 334 – 12, imagen G, correspondiente a un aumento total de 100X e imagen H, a un aumento de 200X), se observó pérdida o muy poco marcaje para cadherina E en toda la lesión. Como ya se ha descrito, la disminución de cadherina E es marcada en lesiones NIC III y su expresión es mínima en el epitelio de cuello uterino con

carcinoma invasor, debido, en principio, a que la función de la cadherina E se pierde en todos los cánceres epiteliales por inactivación mutacional de los genes de cadherina E, por activación de los genes de catenina β o por expresión incontrolada de algunos factores de transcripción de los oncogenes SNAIL y TWIST, que codifican unos factores de transcripción cuya función principal es favorecer un proceso denominado “transición epitelio – mesénquima”. En esta transición, las células carcinomatosas o alteradas en el epitelio cervical hiporregulan o suprimen la expresión de cadherina E (Kumar y col., 2008). Sin embargo, en este estudio, la variación de cadherina E no diferenció con precisión los grados de lesión en las muestras de lesiones de cuello uterino.

Los resultados obtenidos para cadherina E en este trabajo concuerdan con los hallazgos de otros investigadores (Van de Putte y col., 2004b) quienes reportaron un descenso en la expresión de cadherina E (menor o igual a 50 % de células positivas) en cáncer de células escamosas cervicales.

Los resultados de la evaluación de la inmunotinción para p16 INK4a indicaron que su expresión en zonas con lesión aumentó progresivamente según el grado de la lesión. En lesiones leves o NIC I (figura 4, caso 46 (15) 10, imagen A, correspondiente a un aumento de 100X e imagen B a un aumento de 200X), se observó escaso marcaje nuclear en zonas con lesión (confinada al estrato basal). En lesiones NIC II (figura 4, caso 1825 – 07, imagen C, correspondiente a un aumento total de 100X e imagen D a un aumento de 200X), se observó marcaje nuclear y en el citoplasma en todo el epitelio. En lesiones NICIII (figura 4, caso 4606 – 11, imagen E, correspondiente a un aumento total de 100X e imagen F a un aumento de 200X), se observó marcaje nuclear y en el citoplasma en la lesión, al igual que en carcinoma

microinvasivo (figura 4, caso plfa 334 – 12, imagen G, correspondiente a un aumento total de 100X e imagen H a un aumento de 200X), donde la inmunotinción se difundió en toda la lesión. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de otros investigadores (Missaoui y col., 2010), quienes reportaron ausencia de inmunotinción para p16 INK4a en epitelio cervical normal o en lesiones benignas, inmuno reactividad focal en lesiones NIC I e inmunotinción para p16 INK4a uniformemente distribuída en núcleo y en citoplasma en lesiones NIC II, NIC III así como también en cáncer invasor de células escamosas en cuello uterino. Los resultados obtenidos en este trabajo para la sobreexpresión de p16 INK4a en lesiones de cuello uterino también apoyan los datos publicados en distintas revistas científicas, los cuales señalan la existencia de una estrecha asociación entre la expresión del marcador p16 INK4a y la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical (Wang y col., 2004; Queiroz y col., 2006). Adicionalmente, también se ha encontrado correlación entre el grado de expresión de p16 INK4a y el grado de neoplasia intraepitelial cervical ($p < 0,001$) y entre el grado de expresión de p16 INK4a y los genotipos de VPH de alto riesgo ($p < 0,001$) (Agoff y col., 2003).

Se ha determinado que p16 INK4a es un supresor tumoral, sin embargo, la unión de la proteína E7 de VPH de alto riesgo a p16 INK4a inactiva su acción inhibidora sobre las quinasas CDK 4, 6 las cuales pueden entonces hiperfosforilar la proteína retinoblastoma (Rb) ocasionando la liberación de factores transcripcionales E2F de oncogenes (Sano y col., 1998; Kumar y col., 2008).

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, en los ensayos de inmunohistoquímica realizados en este trabajo, también se incluyeron unos controles negativos, los cuales llevan anticuerpo monoclonal anti – neurofisina relacionada con

la oxitocina de rata en lugar del anticuerpo monoclonal primario anti- marcador celular evaluado, o solamente PBS (solución tamponada con fosfato). Los resultados obtenidos en estos controles negativos se muestran en la figura 5 y en la tabla 1. En la lesión NIC I (caso 2158 – 09, imagen A, correspondiente a un aumento total de 100X e imagen B a un aumento de 200X), no se observó marcaje alguno; tampoco se observó marcaje en lesión NIC II (caso 1825 – 07, imagen C, correspondiente a un aumento total de 100X e imagen D a un aumento de 200X), ni en lesión NIC III (caso 4606 – 11, imagen E, correspondiente a un aumento total de 100X e imagen F a un aumento de 200X). No se observó inmunotinción en carcinoma microinvasivo (figura 5, caso plfa 334 – 12, imagen G, correspondiente a un aumento total de 100X e imagen H a un aumento de 200X). Estos resultados indican el buen control en la estandarización de las técnicas inmunohistoquímicas con un bloqueo efectivo de las peroxidases endógenas en los tejidos, y en la evaluación específica con los anticuerpos monoclonales de la expresión de los marcadores celulares investigados.

De la comparación de los resultados obtenidos para la evaluación mediante las técnicas inmunohistoquímicas de la expresión de los marcadores celulares estudiados en este trabajo (PCNA, cadherina E y p16 INK4a) en los distintos grados de lesión de cuello uterino en estas pacientes, se deduce, que en el seguimiento de la evolución de la lesión intraepitelial cervical de estas pacientes infectadas por VPH, la evaluación de la expresión del marcador de supresión celular p16 INK4a, sería más adecuada que la evaluación de la expresión de PCNA o de cadherina E, aunque la evaluación de la expresión de cadherina E sería útil en la determinación aproximada del grado de avance de la lesión hacia un estado de malignidad o de cáncer invasor.

En lo referente al análisis estadístico, los resultados de comparación de medias de los grados de lesión en distribución t de Student para PCNA (tabla 2) indicaron que había una diferencia estadísticamente significativa entre los grados de lesión NIC I y NIC II pero que no había diferencia estadísticamente significativa entre los grados de lesión NIC II y NIC III, ni entre NIC III y cáncer invasor; de manera similar para cadherina E (tabla 3), se encontró que había una diferencia estadísticamente significativa entre los grados de lesión NIC I y NIC II pero no había diferencia significativa entre los grados de lesión NIC II y NIC III, ni entre NIC III y cáncer invasor.

La comparación de medias para p16 INK4a (tabla 4) indicó que no había diferencia estadísticamente significativa entre lesiones de alto grado.

De estos resultados se deduce en principio que las lesiones en el epitelio de cuello uterino de estas pacientes incluidas en este estudio, pueden clasificarse como lesiones intraepiteliales cervicales de bajo y de alto grado como fue establecido en el sistema Bethesda en el año 2001, el cual fue desarrollado para reportar los resultados de citología cervical como un sistema uniforme de terminología, proveyendo una guía clara para el manejo clínico de dichos resultados (Solomon y col., 2002).

La deducción de este análisis estadístico también concuerda con el punto de vista reportado en la bibliografía el cual sostiene que las lesiones intraepiteliales cervicales primarias deberían ser consideradas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) de bajo grado, y aquellas lesiones con características precursoras de cáncer, como “NIC de alto grado” (Richart, 1990).

Los resultados de correlación (tabla 5) indicaron ausencia de asociación entre los marcadores celulares PCNA y cadherina E ($r = 0,08$); ausencia de asociación entre

p16 INK4a y cadherina E ($R = -0,12$) y un cierto grado de asociación entre los biomarcadores PCNA y p16 INK4a ($r = 0,51$). Esta asociación podría explicarse en base a las funciones de ambas proteínas, ya que PCNA es una ciclina y p16 INK4a es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas CDK 4,6 como se mencionó anteriormente.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permitieron deducir las siguientes conclusiones:

1. Se produjo un aumento en la expresión de los biomarcadores PCNA y p16INK4a en las zonas con lesión frente a las zonas sin lesión del epitelio cervical.
2. Ocurrió una disminución de expresión de cadherina E en zonas con lesiones respecto a las zonas sin lesiones del epitelio cervical.
3. La comparación de medias en grupos por grado de lesión sugieren dos clases de lesiones en las muestras estudiadas: lesiones de bajo grado y lesiones de alto grado.
4. p16INK4a es un biomarcador útil para diferenciar grado de lesión y como aditamento en el pronóstico de la progresión de las lesiones cervicales.
5. Se encontró asociación entre los biomarcadores celulares PCNA y p16INK4a.
6. Destaca la presencia de VPH de bajo riesgo en lesiones de bajo grado y la presencia de VPH de alto riesgo en lesiones de alto grado y cáncer invasor.
7. Se aprecia la existencia de una estrecha relación entre la presencia de VPH, las lesiones desarrolladas en el área del cuello uterino afectada y los cambios en la expresión de los marcadores celulares.

BIBLIOGRAFIA

Agoff, S.N., Lin, P., Morihara, J., Mao,C., Kiviat, N.B., Koutsky, L.A. 2003. p16^{INK4a} Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia:A comparison with Ki-67 Expression and Detection of High – Risk HPV Types. *Mod. Pathol.* **16 (7)** : 665–673.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. Molecular Biology of The Cell. Cuarta edición. Garland Science. New York. E.U.A.

Anderson, R.G.W. 1993. Caveolae :Where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 10909 – 10913.

Andersson, S., Wangsa, D., Flores – Staino, C., Safari, H., Mints, M., Hjerpe, A., Hagmar, B. y colaboradores. 2006. Expression of p16^{INK4a} in relation to histopathology and viral load of “high - risk” HPV types in cervical neoplastic lesions. *Europ. J. Cancer.* **42** : 2815 – 2820.

Anuario de Mortalidad 2008. Gobierno Bolivariano de Venezuela. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas – Venezuela. Mayo de 2010.

Araujo, E., Barroso, S., Cendón, A., Muñoz, M., Ortunio, M., Cardozo, R., Guevara, H. 2010. Infección por virus de papiloma humano en mujeres : hallazgos paraclínicos. *Rev Obst. Ginecol Venez.* **70(2)**:82 – 89.

Barbareschi, M., Pecciarini, L., Cangi, M.G., Macri, E., Rizzo, A., Viale, G., Path, F.R.C. y colaboradores. 2001. p63, a p53 Homologue, is a Selective Nuclear Marker of Myoepithelial Cells of the Human Breast. *Am. J. Surg. Pathol.* **25(8)**:1054- 1060.

Celis, J.E., Bravo, R., Larsen, P.M., Fey, S.J. 1984. Cyclin : a nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leuk. Res.* **8(2)**:143 – 157.

Chen, C. – L., Liu, S.S., Ip, S. – M., Wong, L.C., Ng, T.Y., Ngan, H.Y.S. 2003. E- cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Europ. J. Cancer.* **39**:517 – 523.

De Guglielmo Cróquer, Z., Rodríguez Bermúdez, A., Avila Hernández, M., Veitía Monsalve, D., Fernández Beltrán, A., Correnti de Plata, M. 2010. Virus de Papiloma Humano y Factores de Riesgo en el Desarrollo de Cáncer Cérvico Uterino. *Rev Venez. Oncol.* **22(1)** : 32 – 38.

Figge, D.C., De Alvarez, R.R., Brown, D.V., Fullington, W.R. 1962. Long- range studies of the biologic behavior of the human uterine cervix. Atypical epithelial hyperplasia. *Am. J. Obst Gynec.* **84(5)** : 638 – 647.

Freudenthal, B.D., Brogie, J.E., Gakhar, L., Kondratick, C.M., Washington, M.T. 2011. Crystal Structure of SUMO – Modified Proliferating Cell Nuclear Antigen. *J. Mol. Biol.* **406**: 9 – 17.

García, D.A., Cid - Arregui, A., Schmitt, M., Castillo, M., Briceño, I., Aristizábal, F.A. 2011. Highly Sensitive Detection and Genotyping of HPV by PCR Multiplex and Luminex Technology in a Cohort of Colombian Women with Abnormal Cytology. *Open Virol. J.* **5** :70 – 79.

García – Tamayo, J., Molina, J., Blasco – Olaetxea, E. 2009. Importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. Revisión. *Invest. Clin.* **50** (2) : 1 – 12.

Grases, P. 2010. Adenocarcinoma del cuello uterino y sus lesiones preinvasivas. *Rev. Obstet. Ginecol.Venez.* **70**(2) : 112 – 115.

Graterol, I.J., Finol, H.J., Correnti, M. 2006. Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de cuello uterino. Tipificación y ultraestructura. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **26**(2) : 89 – 94.

Kaufmann, O., Fietze, E., Mengs, J., Dietel, M. 2001. Value of p63 and Cytokeratin - 5 / 6 as Immunohistochemical Markers for the Differential Diagnosis of Poorly Differentiated and Undifferentiated Carcinomas. *Am J.Clin.Pathol.* **116**: 823 –830.

Kobayashi, I., Matsuo, K., Ishibashi, Y., Bpharmsci, Kanda, S., Sakai, H. 1994. The Proliferative Activity in Dysplasia and Carcinoma In Situ of the Uterine Cervix Analyzed

by Proliferating Cell Nuclear Antigen Immunostaining and Silver-Binding Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Staining. *Human Pathol.* **25** (2) : 198 – 202.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Mitchell, R. N. 2008. Robbins Patología humana. Octava edición. Elsevier España, S.L. Barcelona (España).

Kurki, P., Vanderlaan, M., Dolbeare, F., Gray, J., Tan, E.M. 1986. Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) / Cyclin during the Cell Cycle. *Exp. Cell Res.* **166**: 209 – 219.

Lerma, E. 2005. Factores que intervienen en la diseminación del cáncer de cuello uterino. *Rev. Española Patol.* **38**(4) : 1 – 10.

Lizano - Soberón, M., Carrillo – García, A., Contreras – Paredes, A. 2009. Infección Por virus del Papiloma Humano : Epidemiología, Historia Natural y carcinogénesis. *Cancerología* **4**: 205 –216.

López, J., Ili, C.G., Brebi, P., García, P., Capurro, I., Guzmán, P., Suárez, E. y colaboradores. 2010. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas de cuello uterino. *Rev. Med. Chile.* **138**:1343 – 1350.

Mendoza, L. P., Arbiza, J., Paez, M., Kasamatsu, E., Castro, A., Giménez, G., Basiletti, J. y colaboradores. 2011. Distribution of Human Papillomavirus Genotypes

in Paraguayan Women According to the Severity of the Cervical Lesion. *J. Med. Virol.* **83**: 1351 – 1357.

Mirhashemi, R., Ganjei – Azar, P., Nadji, M., Lambrou, N., Atamdede, F., Averette, H.E. 2003. Papillary squamous cell carcinoma of the uterine cervix :an immunophenotypic appraisal of 12 cases. *Gynecol. Oncol.* **90**: 657 – 661.

Missaoui, N., Trabelsi, A., Hmissa, S., Fontanière, B., Yacoubi, M.T., Mokni, M., Korbi, S. y colaboradores. 2010. p 16^{INK4a} over expression in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in Tunisian women. *Pathol. Res Pract.* **206**:550 – 555.

Mittal, K.R., Demopoulos, R.I., Goswami, S. 1993. Proliferating Cell Nuclear Antigen (Cyclin). Expression in Normal and Abnormal Cervical Squamous Epithelia. *Am. J. Surg. Pathol.* **17(2)** : 117 – 122.

Naryzhny, S. N., Lee, H. 2010. Proliferating cell nuclear antigen in the Cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Letters.* **584**: 4292 – 4298.

Ogata, K., Celis, J.E., Tan, E.M. 1987. Proliferating Cell Nuclear Antigen : Cyclin. *Met. Enzymol.* **150**: 147 – 159.

Ordi, J., García, S., del Pino, M., Landolfi, S., Alonso, I., Quintó, Ll., Torné, A. 2009. p 16 ^{INK4a} Immunostaining Identifies Occult CIN Lesions in HPV – Positive Women. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **28**(1) : 90 – 97.

Queiroz, C., Correia Silva, T., Alves, V.A.F., Villa, L. L., Costa, M.C., Travassos, A.G., Araujo Filho, J.B. y colaboradores. 2006. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol - Res Pract.* **202**: 731 – 737.

Querzoli, P., Coradini, D., Pedriali, M., Boracchi, P., Ambroggi, F., Raimondi, E., La Sorda, R. y colaboradores. 2010. An immunohistochemically positive E – cadherin status is not always predictive for a good prognosis in human breast cancer. *Brit. J. Cancer.* **103** (**12**) : 1835 – 1839.

Richart, R.M. 1963 b. The Grow Characteristics *in vitro* of Normal Epithelium, Dysplasia and Carcinoma - *in situ* of the Uterine Cervix. *Cancer Res.* 662 – 669.

Richart, R. M., 1966. Colpomicroscopic Studies of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Cancer* **19** (**3**) : 395 – 405.

Richart, R.M., 1990. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obst. Gynec.* **75** (**1**) : 131 – 132.

Rivera, Z., R., Delgado, D.J., Painel P., V., Barrero P., R., Larrain H., A. 2006. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev. Chil. Obst. Ginecol.* **71 (2)** : 135 – 140.

Sandri, M. T., Riggio, D., Salvatici, M., Passerini, R., Zorzino, L., Boveri, S., Radice, D. y colaboradores. 2009. Typing of Human Papillomavirus in Women With Cervical Lesions : Prevalence and Distribution of Different Genotypes. *J. Med. Virol.* **81** : 271 – 277.

Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T., Nakajima, T. 1998. Immunohistochemical over expression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol. Int.* **48** : 580 – 585.

Shivji, M.K.K., Kenny, M.K., Wood, R.D. 1992. Proliferating Cell Nuclear Antigen Is Required for DNA Excision Repair *Cell.* **69** : 367 – 374.

Shope, R. E. 1933. Infectious papillomatosis of rabbits. *J Exp. Med.* **58** : 607 – 627.

Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S. y colaboradores. 2002. The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *J Am. Med. Assay.* **287 (16)** : 2114 – 2119.

Somogyi, I., Malpica Gracian, C. C., Alvarado, B., García, M. 2010. Virus del papiloma humano (VPH) detección y tipificación en la consulta privada. *Rev. Obst. Gynecol. Venez.* **70** (**3**) : 160 – 166.

Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S. y colaboradores, 2004. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42** (**7**) : 3176 – 3184.

Sundström, K., Eloranta, S., Sparén, P., Dahlström, L. A., Gunnell, A., Lindgren, A., Palmgren, J. y colaboradores. 2010. Prospective Study of Human Papillomavirus (HPV) Types, HPV Persistence, and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.* **19** (**10**) : 2469 – 2478.

Toro de Mendez, M., Fernández Izquierdo, A. 2011. Detección de virus papiloma humano (VPH) a partir de muestras celulares de cuello uterino en base líquida. Correlación con la inmunorreactividad de la proteína p 16 INK4a . *Invest. Clin.* **52** (**1**) : 3 – 14.

Tsoumpou, I., Arbyn, M., Kyrgiou, M., Wentzensen, N., Koliopoulos, G., Martin – Hirsch, P., Malamou – Mitsi, V. y colaboradores. 2009. p16 INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix : A systematic review and meta - analysis. *Cancer Treat. Rev.* **35** : 210 – 220.

Tungteakkhun, S, S. Duerksen - Hughes P.J. 2008. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Ach. Virol.* **153** : 397 – 408.

Van de Putte, G., Kristensen, G.B., Lie, A.K., Baekelandt, M., Holm, R. 2004a. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **92** : 40 – 46.

Van de Putte, G., Kristensen, G.B., Baekelandt, M., Lie, A.K., Holm, R. 2004b. E-cadherin and catenins in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol.Oncol.* **94** : 521 – 527.

Veitía, D., De Guglielmo, Z., Avila, M., Liuzzi, J., Correnti, M. 2009. Detección de VPH y expresión de p53 en carcinoma de cabeza y cuello. *Rev. Venez. Oncol.* **21** (3) : 123 – 131.

Wang, J. – L., Zheng, B. – Y., Li, X. – D., Ångström, T., Lindström, M.S., Wallin, K. – L. 2004. Predictive Significance of The Alterations of p 16INK4a, p14 ARF, p 53, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in the Progression of Cervical Cancer. *Clin. Cancer Res.* **10** : 2407 – 2414.

Welsch, U. 2009. Histología. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. S. A. Madrid. España.

Woodman, C. B. J., Collins, S. I., Young, L. S. 2007. The natural history of cervical HPV infection : unresolved issues. *Nature Rev.* **7** : 11 – 17.

zur Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Bioch. Bioph. Acta.* **1288** : F55 – F78.

ANEXOS

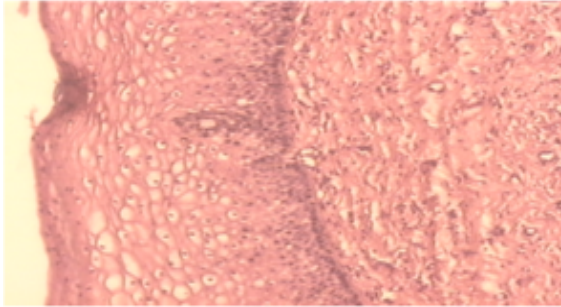


Imagen A. (100X).. 680-11 – NICI: Halo claro Perinuclear, núcleos agrandados en estrato Basal.

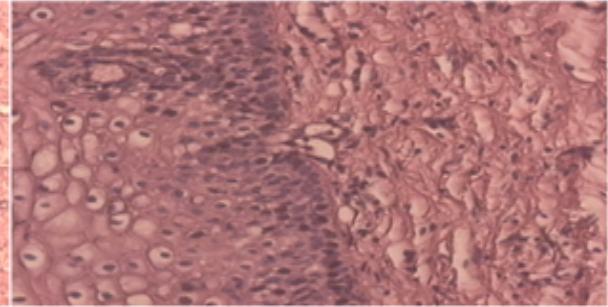


Imagen B.(200X). 680 – 11. NICI: Halo claro Perinuclear, núcleos agrandados en estrato Basal.

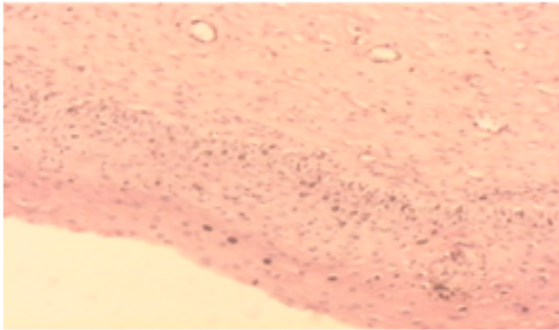


Imagen C (100X). 1825 – 07 – NICII: incremento de apiñamiento nuclear y extensión de la lesión hacia el estrato parabasal.

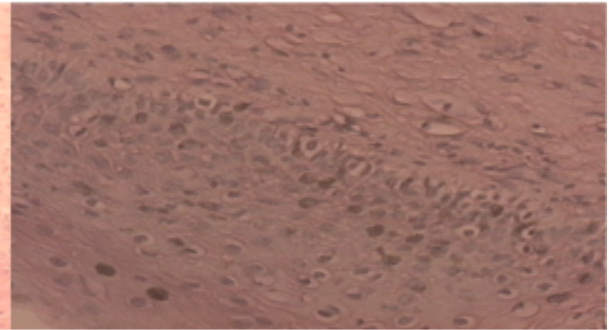


Imagen D (200X). 1825 – 07 – NICII: incremento de apiñamiento nuclear y extensión de la lesión hacia el estrato parabasal.

Figura 1. Cortes de epitelio de cuello uterino (coloración hematoxilina – eosina).

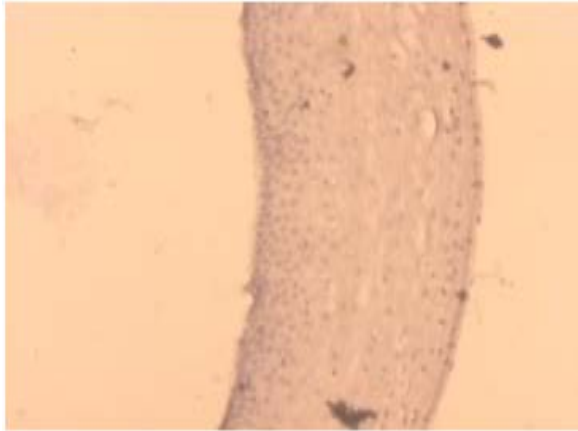


Imagen E (100 X). 4606 – 11. - NIC III : núcleos de forma homogénea y pérdida de maduración en todos los estratos.

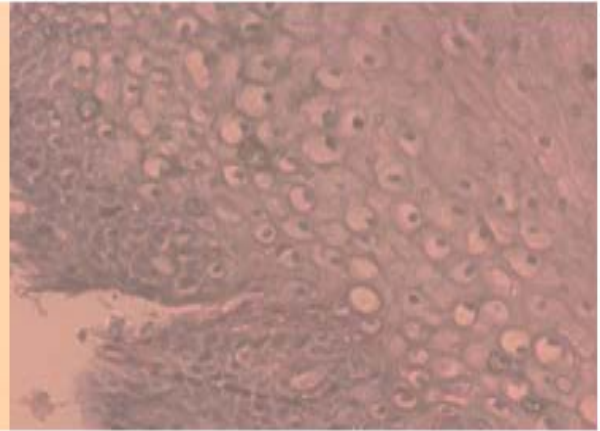


Imagen F (200 X). 4606 – 11. - NIC III : núcleos de forma homogénea y pérdida de maduración en todos los estratos.

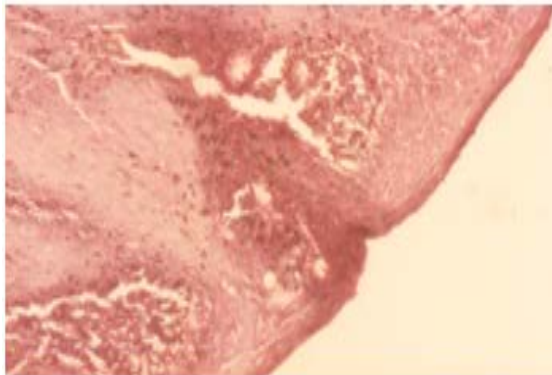


Imagen G (100 X). 334 – 12. - CMI: abarca todo el epitelio y la lesión traspasa la membrana basal.

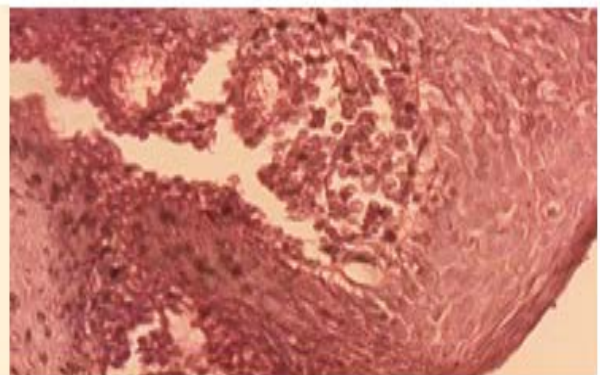


Imagen H (200 X). 334 – 12. - CMI : abarca todo el epitelio y la lesión traspasa la membrana basal.

- **Figura 1. Cortes de epitelio de cuello uterino (coloración hematoxilina – eosina).**

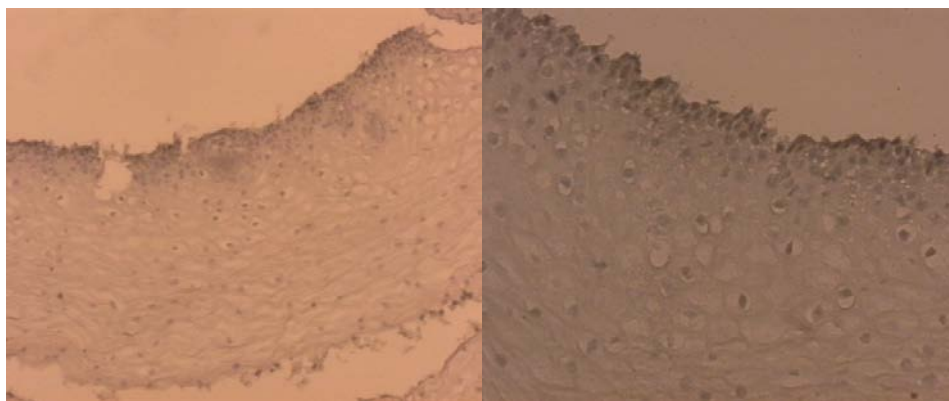


Imagen A (100x). 680 – 11. – NIC I : tinción nuclear marrón
nítida en la capa basal.

Imagen B (200X). 680 – 11. – NIC I : tinción nuclear marrón
nítida en la capa basal.

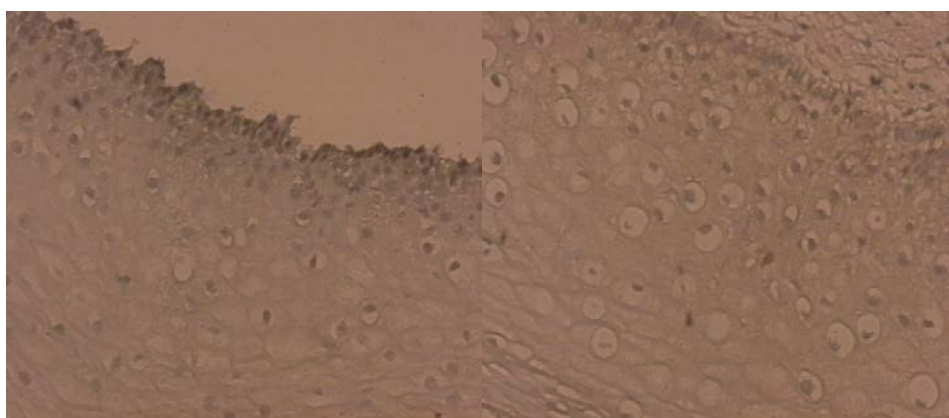


Imagen C (100X). 42(11)10. – NIC II : tinción nuclear marrón
intensa en estratos basal y parabasal.

Imagen D (200X). – NIC II : tinción nuclear marrón
nítida en estratos basal y parabasal.

Figura2.Ensayo de inmunohistoquímica para PCNA con cortes de epitelio cervical.
NIC:neoplasia intraepitelial cervical – caso : nº de biopsia y año de toma.

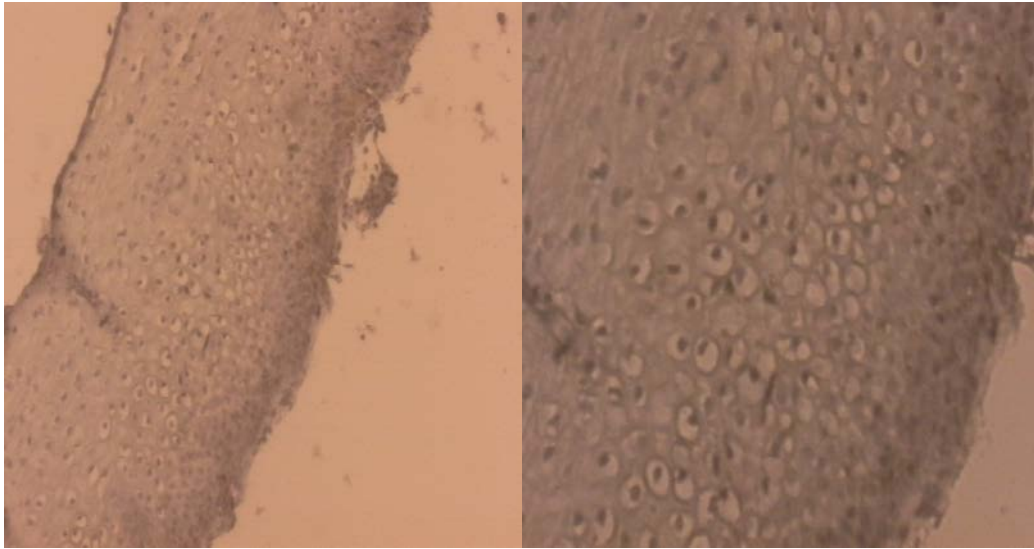


Imagen E (100X). 4606 – 11. – NIC III : tinción nuclear marrón nítida en capas basal, parabasal e intermedia.

Imagen F (200X). 4606 – 11. – NIC III : tinción nuclear marrón nítida en capas basal, parabasal e intermedia.

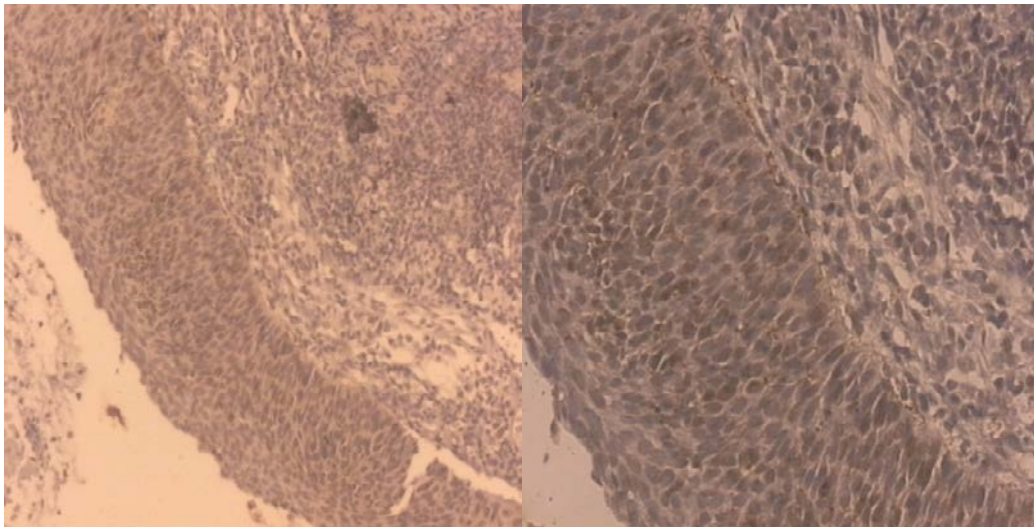


Imagen G (100X). 41(10)10. – Cáncer invasor : tinción nuclear marrón nítida en toda la lesión.

Imagen H (200X). 41(10)10. - Cáncer invasor : tinción nuclear marrón nítida en toda la lesión.

Figura 2. Ensayo de inmunohistoquímica para PCNA con cortes de epitelio cervical.
NIC : neoplasia intraepitelial cervical. - Caso : nº de biopsia y año de toma.

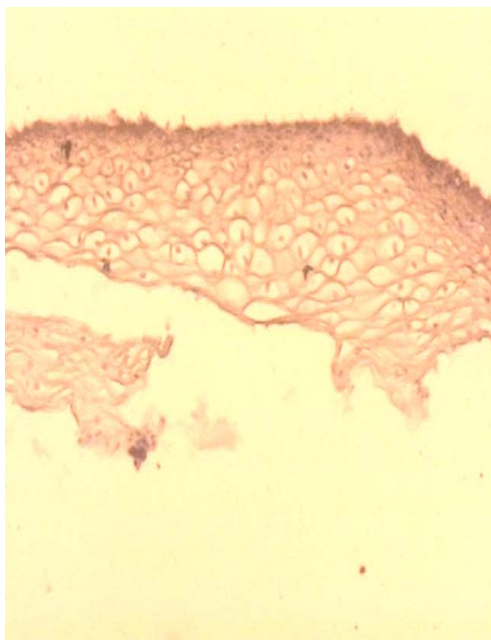


Imagen A (100X). 6899-10.- NIC I : tinción en la membrana celular dorada nítida en capas basal y parabasal..

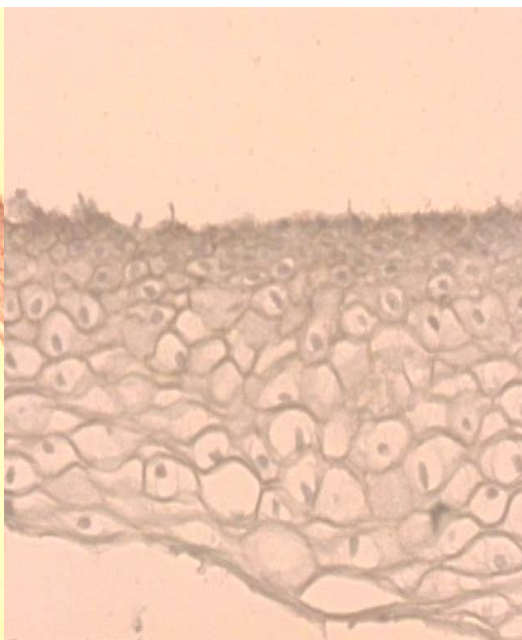


Imagen B (200X). 6899-10.- NIC I : tinción en la membrana celular dorada nítida en capas basal y parabasal.

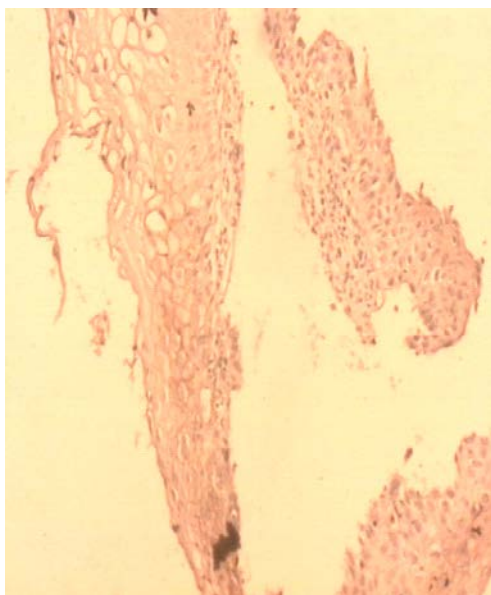


Imagen C (100X). 42 (11)10. NIC II : tinción en la membrana celular dorada nítida, más en capa parabasal.

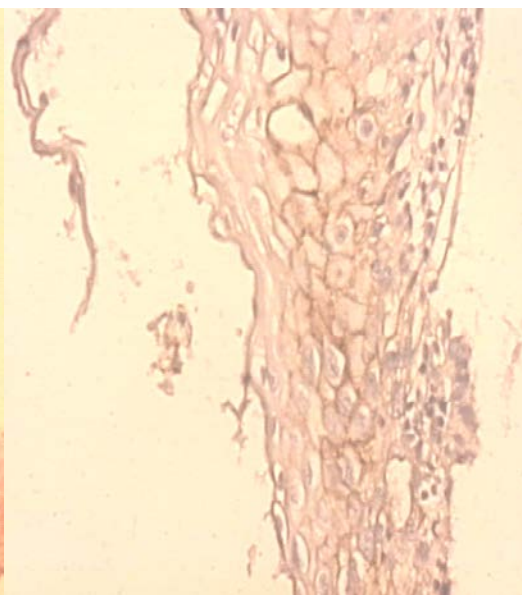


Imagen D (200X). 42 (11)10. - NIC II : tinción en la membrana celular dorada nítida, más en la capa parabasal.

Figura 3. Ensayo de inmunohistoquímica para cadherina E con cortes de epitelio cervical.
NIC : neoplasia intraepitelial cervical. - Caso : nº de biopsia y año de toma.

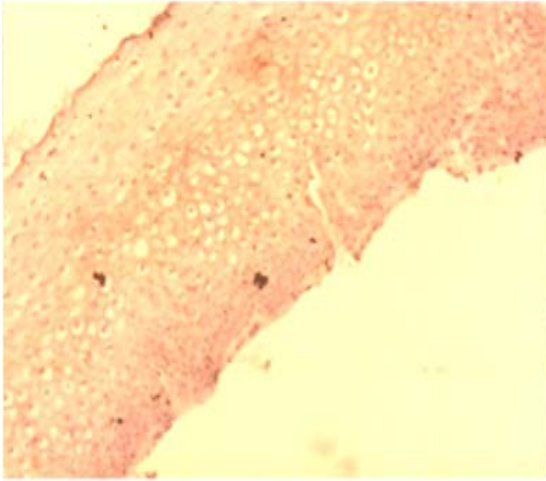


Imagen E (100X). 4606-11.- NIC III: tinción en la membrana celular dorada intensa en capa parabasal y ausencia en la capa basal.

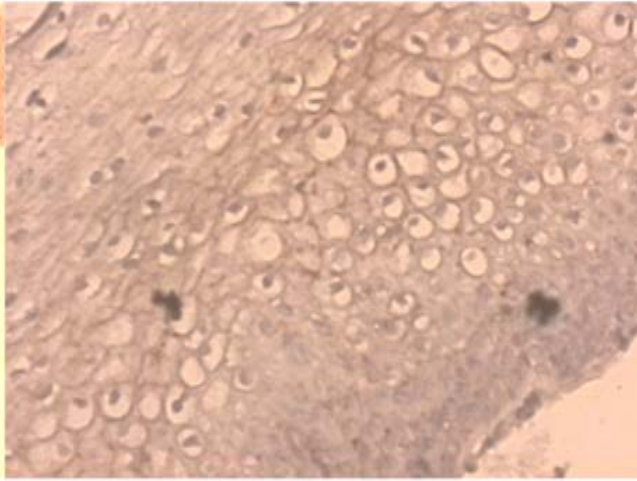


Imagen F (200X). 4606-11.- NIC III: tinción en la membrana celular dorada intensa en capa parabasal y ausencia en la capa basal.

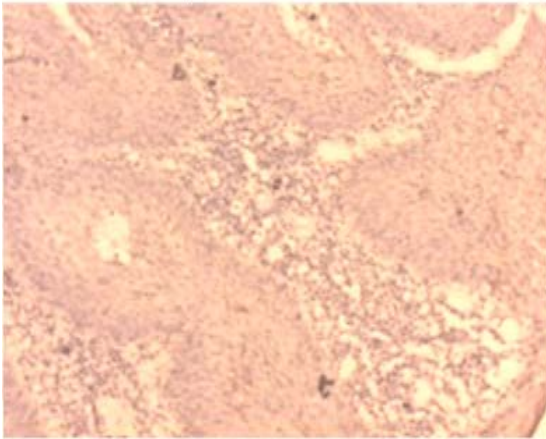


Imagen G (100X). plfa334-12.- CM invasivo: hay pérdida de cadherina E o muy poco marcaje en la lesión.

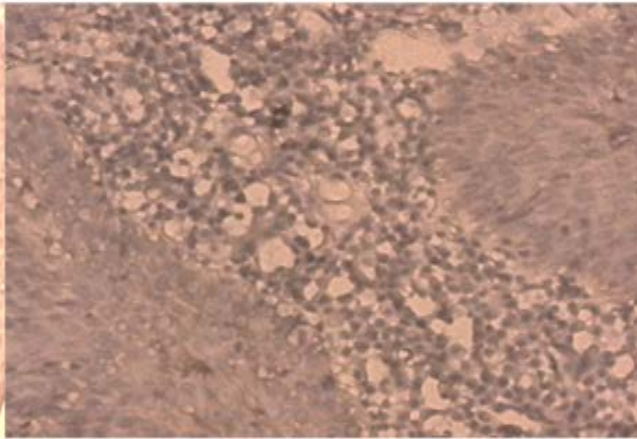


Imagen H (200X). plfa334-12.- Cáncer M invasivo: hay pérdida de cadherina E o muy poco marcaje en la lesión.

Figura 3. Ensayo de inmunohistoquímica para cadherina E con cortes de epitelio cervical. NIC: neoplasia intraepitelial cervical. - Caso: n° de biopsia y año de toma.

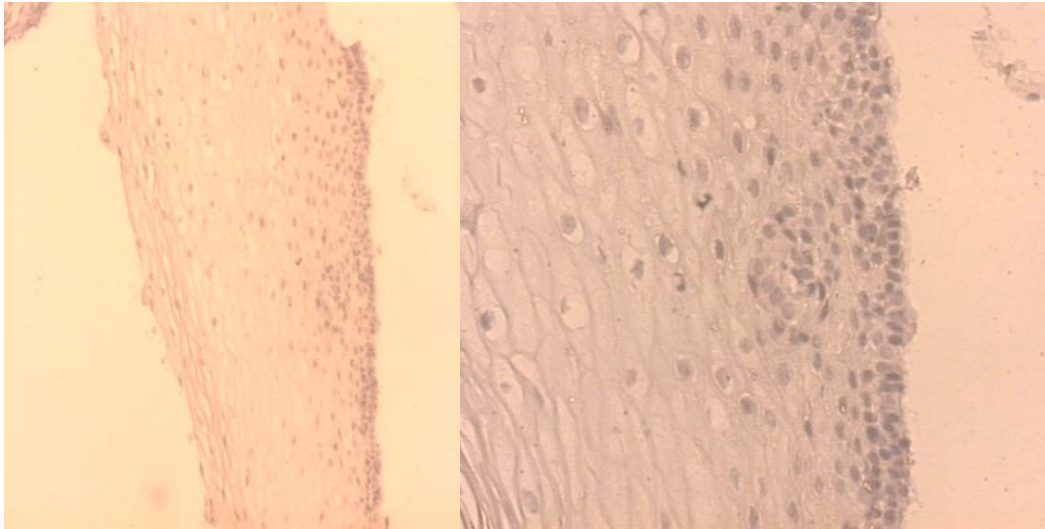


Imagen A (100X). 46 (15) 10. – NIC I : hay escaso marcaje en la zona de lesión (capa basal)

Imagen B (200X). 46 (15) 10. – NIC I : hay escaso marcaje en la zona de lesión (capa basal).

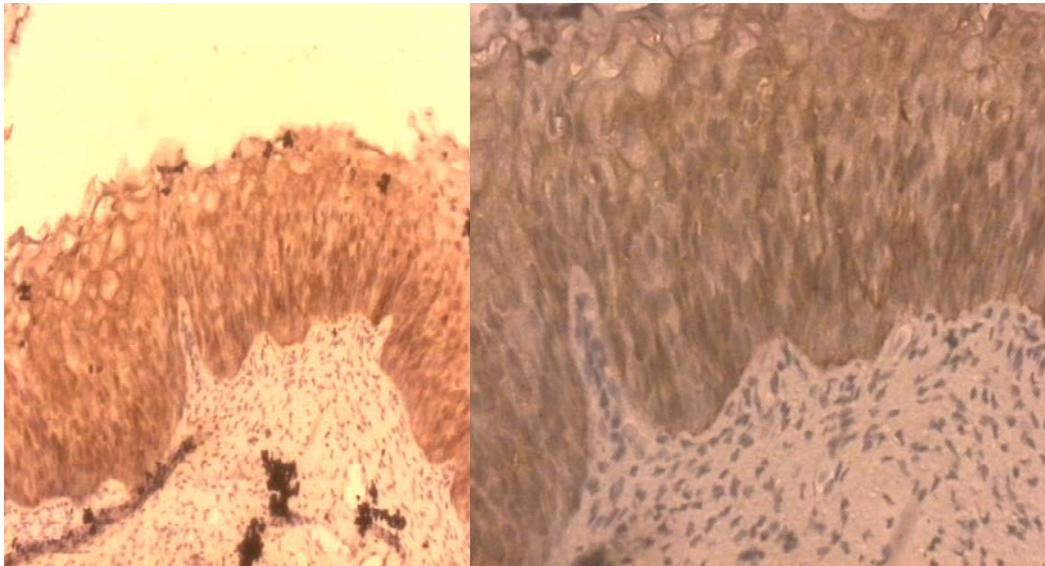


Imagen C (100X). 1825 – 07. – NIC II : hay marcaje nuclear y en el citoplasma en todo el epitelio.

Imagen D (200X). 1825 – 07. – NIC II : hay marcaje nuclear y en el citoplasma en todo el epitelio.

Figura 4. Ensayo de inmunohistoquímica para p16 INK4a con cortes de epitelio cervical.
NIC : neoplasia intraepitelial cervical. – Caso : nº de biopsia y año de toma.

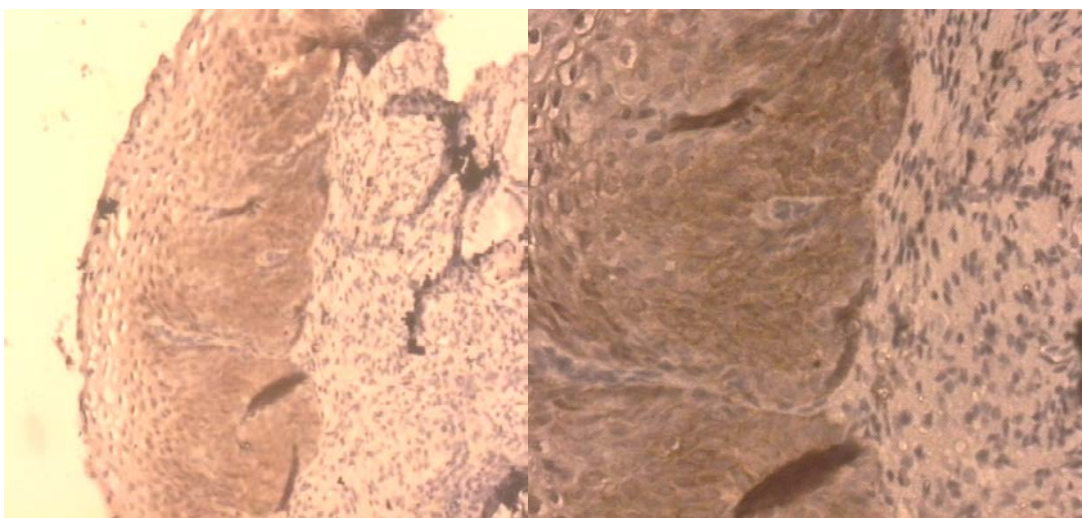


Imagen E (100X). 4606 – 11. – NIC III : hay marcaje nuclear y en el citoplasma en capas basal, parabasal e intermedia.

Figura F (200X). 4606 – 11. – NIC III : hay marcaje nuclear y en el citoplasma en capas basal, parabasal e intermedia.

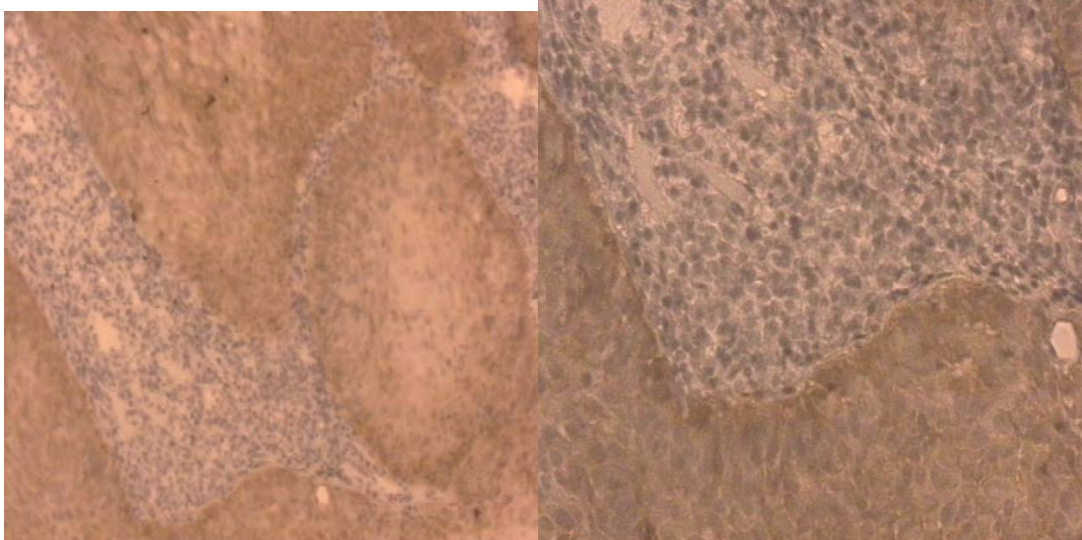


Imagen G (100X). plfa334 – 12. – C. microinvasivo : hay marcaje nuclear y en el citoplasma difundido.

Imagen H (200X). Plfa334 – 12. - : C . microinvasivo : hay marcaje nuclear y en el citoplasma difundido.

Figura 4. Ensayo de inmunohistoquímica para p16 INK4a con cortes de epitelio cervical.
NIC : neoplasia intraepitelial cervical. – Caso : nº de biopsia y año de toma.

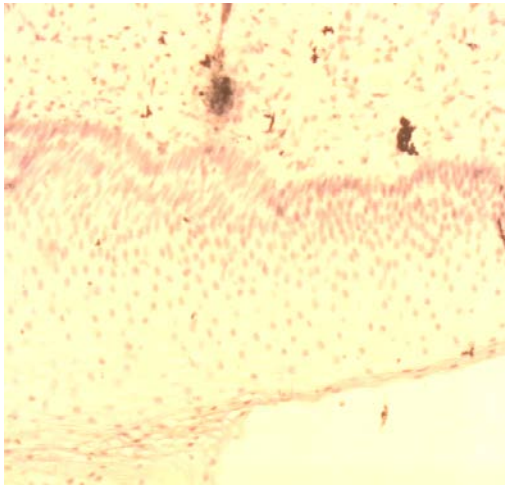


Imagen A (100X), 2158-09. - NIC I : no se observa marcaje alguno.

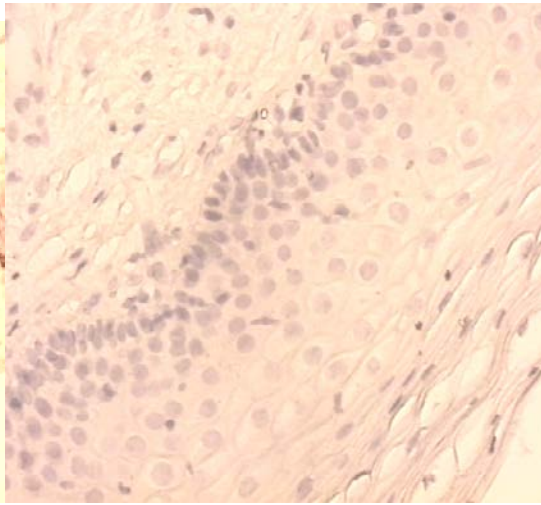


Imagen B (200X), 2158-09. - NIC I : no se observa marcaje alguno.

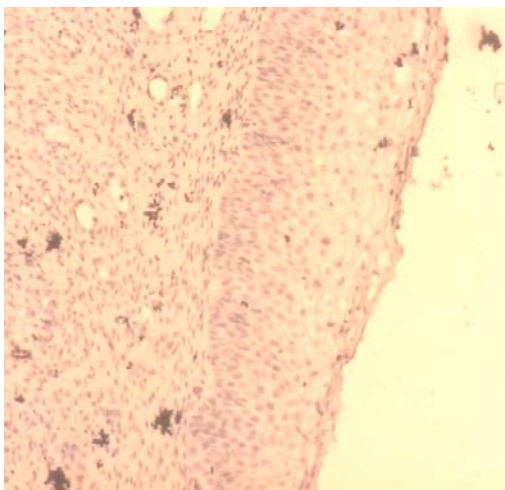


Imagen C (100X). 1825-07. - NIC II (con anti - neurofisisina de rata) : no se observa marcaje alguno.

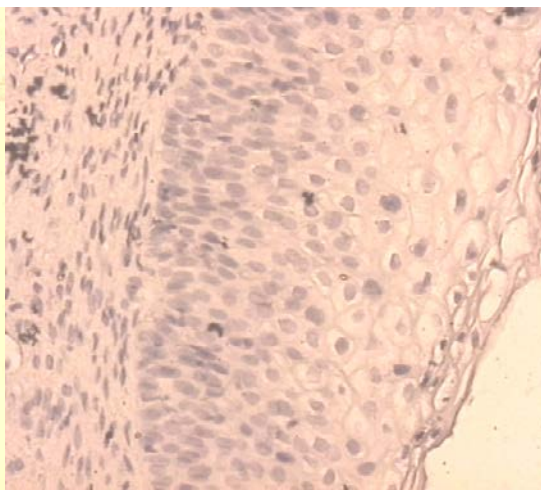


Imagen D (200X). 1825-07. - NIC II (con anti - neufisina de rata) : no se cbserve marcaje alguno.

Figura 5 . Ensayo de inmunohistoquímica con cortes de epitelio cervical. Controles negativos (sin anticuerpo primario o con anticuerpo anti - neurofisisina de rata).

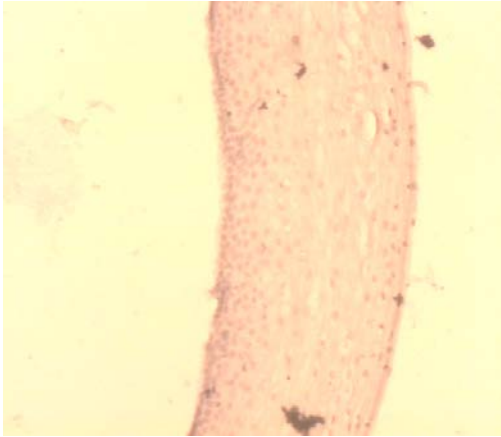


Imagen E (100X). - 4606 - 11. - NIC III (con anti - neurofisina de rata) : no se observa marcaje alguno.

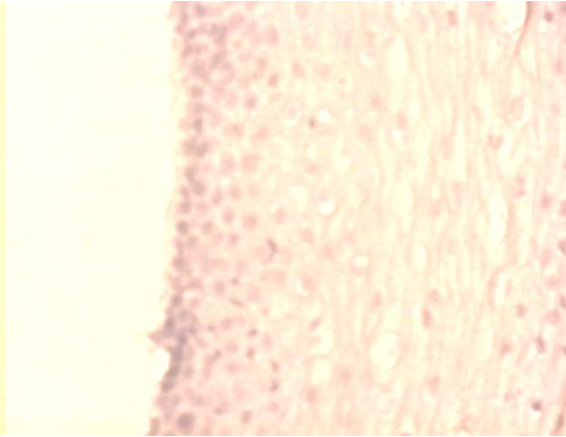


Imagen F (200X). - 4606 - 11. - NIC III (con anti - neurofisina de rata) : no se observa marcaje alguno.

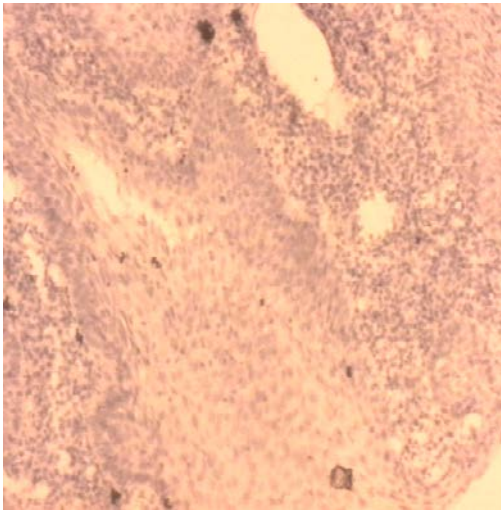


Imagen G (100X). - plfa334 - 12 (C. microinvasivo con anti - neurofisina de rata) : no se observa marcaje alguno.

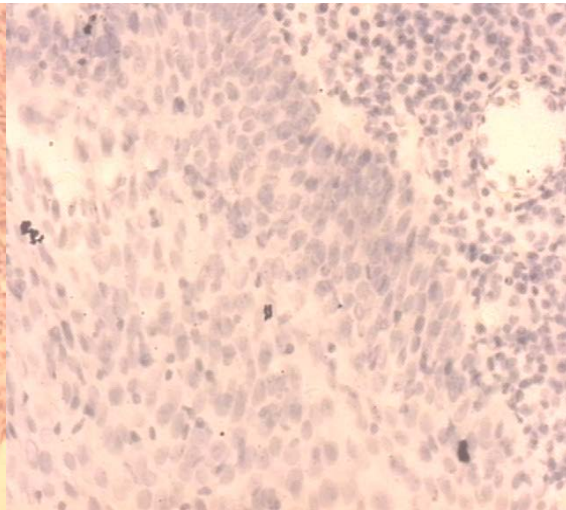


Imagen H (200X). - plfa 334 - 12 (C. microinvasivo con anti - neurofisina de rata) : no se observa marcaje alguno.

Figura 5. Ensayo de inmunohistoquímica con cortes de epitelio cervical. Cotroles Negativos (sin anticuerpo primario o con anti - neurofisina de rata).

TABLA 1
MEDIA DEL CONTAJE CELULAR PARA LA EXPRESIÓN DE MARCADORES (%)

Nº del paciente	VPH	Lesion	PCNA			E-Cadherina			p16 INK4a			Con antineurofina de rata (C-)	Sin ACP (C-)	
			Con Lesion	Sin Lesion		Con Lesion	Sin Lesion		Con Lesion	Sin Lesion				
Plfa334-12	NR	CMI (C+)	100,00	+++	8,89 +	7,25		87,97 ++	100,00	+++	0		0,00 (2,74)	
HOPM 32(1)10	16	Ca inv. (C+)	93,63	+++	21,42 +	3,57 +		62,73 ++	100,00	+++	2,70 +		0	
HMPC 6899-10	16	NIC I	76,13	+++	4,28 +	57,59	++	95,77 ++						0
HMPC 2530-10	NR	NIC I	56,33	++	29,11 ++	27,74	++	73,60 ++						0
HMPC 2091-10	NR	NIC I	84,97	+++	35,12 ++	39,71	++	80,65 ++						
HMPC 2276-09	NR	NIC I	71,73	++	29,49 ++	30,36	++	71,71 ++						9,85
HMPC 4489-10	NR	NIC I	73,27	++	23,96 ++	6,57	++	81,36 ++						3,07
HMPC 5353-10	NR	NIC I	94,94	+++	5,60 +	58,36		85,60						0
HMPC 680-11	68	NIC I	94,00	++	8,28 ++	16,07 +		80,21 ++						0
HMPC 6487-10	NR	NIC I	26,85	++	8,59 +	21,81 +		44,39 ++						0
HMPC 4332-11	NR	NIC I	56,05	++	29,06 ++	26,92	++	89,09 ++						0
HDL 2227-08	6/11	NIC I	91,59	+++	14,71 +	23,20	++	82,49 +++					0	
HDL 2406-11	43	NIC I	90,35	+++	9,64 +	77,77	+++	97,09 +++						3,19
HDL 2568-10	6/11;35/66	NIC I	92,38	+++	23,82 ++	33,42	++	95,29 +++					0	
HDL 2676-07	6/11; 44	NIC I	86,39	++	24,27 ++	77,28	++	96,25 +++					0	
HDL 57(26)10	NR	NIC I	98,16	+++	12,68 +	86,80	+++	89,76 +++						
HDL 2158-09	NR	NIC I	66,95	++	28,20 +	33,33	++	83,71 ++	9,29	++	0		0	0
HOPM 45(14)10	6/11	Cambios por VPH	62,86	++	2,92 +	37,18	+++	86,07 ++						
HOPM 39(8)10	18	Cambios por VPH	85,07	++	24,30 +	20,70	++	69,02 +++	62,71	++	0		0	
HOPM 46(15)10	NR	Cambios por VPH	28,57	++	14,77 ++	3,50 +		46,07 ++	3,84	+	1,93 +			0,14
HDL 309-08	6	NIC I -> NIC II	93,20	+	10,08 +	6,83 +		56,45 +++	36,93	++	5,64 +		0	
HDL 703-10	51; 59	NIC I -> NIC II	90,90	+++	9,05 ++	12,33 +		84,20 +++	31,12	++	3,18 ++			
HDL 1825-07	6	NIC II	87,54	+++	20,00 ++	18,29	+++	85,69 +++	100,00	+++	0		0	0
HDL 4046-09	NR	NIC II	98,75	+++	18,54 ++	20,77	+++	90,12 +++					0	
HOPM 42(11)10	58; 68	NIC II	85,05	+++	21,78 ++	23,78	++	65,05 ++	78,93	+++	10,73 +		0	
HDL 1600-09	NR	NIC II -> NIC III	84,08	+++	23,39 ++	20,83	++	87,08 ++	94,05	+++	-		0	0
HMPC 4606-11	NR	NIC III	77,26	+++	22,25 ++	46,44	+++	89,58 +++	98,56	+++	0		0	0
HDL 3708-11	51; 58	NIC III	100,00	+++	0	7,03 +		88,08 +++	100,00	+++	0		0	
Mtno. Inf.til 55/2	16; 66; 68	NIC III	100,00	+++	-	9,21	++	39,60 ++	100,00	+++	0			0
HDL 1049-06	35; 66	NIC I + NIC III	100,00	+++	-	11,20	++	48,26 ++	86,68	+++	8,02 ++		0	
HOPM 49(18)10	6/11; 16/68	NIC III							99,66	+++	0		0	
HOPM 47(16)10	52	NIC III	40,93		0,75	44,97		79,77						
HOPM 41(10)10	59	Ca inv	67,37	++	10,10 ++	21,12	++	70,92 ++	100,00	+++	0		0	
HOPM 48(17)10	16	Ca inv	73,03	++	21,42 ++	6,61	++	56,54 ++	100,00	+++	0		0	
HOPM 33(2)10	16	Ca inv	100,00	+++	16,55 ++	0	-	-	100,00		1,18 +		0	
HOPM 34(3)10	16	Ca inv	66,38	+++	-	0	-	-	97,83	+++	-		0	

NR: no realizado.

C+: control positivo.

C-: control negativo.

Ca inv: cáncer invasor.

Sin ACP: sin anticuerpo primario.

CMI: carcinoma microinvasivo.

NIC : neoplasia intraepitelial cervical.

TABLA 2 INMUNOTINCIÓN PARA PCNA (% de células)						
Media			Varianza		Comparación de medias en distribución t de Student (nivel de significación 0,05)	
Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	p
NIC I	74,26	18,27	461,03	105,52	NIC II- NIC I	<0,0033
NIC II	91,09	15,89	28,06	34,79	NIC III – NIC II	>0,4173
NIC III	92,27	9,13	117,91	156,39	Ca-Inv – NIC III	>0,1747
Ca-Inv	83,40	13,10	262,00	69,73		

NIC: neoplasia intraepitelial cervical.

Ca-Inv: cáncer invasor.

p: probabilidad del error al rechazar la hipótesis nula.

TABLA 3 INMUNOTINCIÓN PARA CADHERINA E (% de células)						
Media			Varianza		Comparación de medias en distribución t de Student (nivel de significación 0,05)	
Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	p
NIC I	37,68	80,47	592,63	233,03	NIC II- NIC I	<0,0018 09
NIC II	16,40	76,30	46,32	215,54	NIC III – NIC II	>0,3796 3
NIC III	18,94	70,52	264,06	599,36	Ca-Inv – NIC III	>0,0776
Ca-Inv	6,43	46,36	61,47	1400,94		

NIC: neoplasia intraepitelial cervical.

Ca-Inv: cáncer invasor.

p: probabilidad del error al rechazar la hipótesis nula.

TABLA 4 INMUNOTINCIÓN PARA p16^{INK4a} (% de células)						
Media			Varianza		Comparación de medias en distribución t de Studente (nivel de significación 0,05)	
Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	p
NIC II	61,75	4,89	1104,15	20,50	NIC III – NIC II	>0,05
NIC III	95,86	1,60	32,28	12,87	Ca-Inv – NIC III	>0,10
Ca-Inv	99,64	0,65	0,79	1,23		

NIC: neoplasia intraepitelial cervical.

Ca-Inv: cáncer invasor.

p: probabilidad del error al rechazar la hipótesis nula.

TABLA 5 CORRELACIÓN ENTRE MARCADORES CELULARES	
Marcadores celulares	Coefficiente r
PCNA – Cadherina E	0,08
p16 ^{INK4a} – Cadherina E	-0,12
PCNA – p16 ^{INK4a}	0,51