

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

TESIS

**“EVALUACIÓN DE APOPTOSIS Y SU CORRELACIÓN  
CON LA EXPRESIÓN DE CD1a EN CELULAS  
DENDRITICAS DE  
PROCESOS INFLAMATORIOS, PREMALIGNOS Y  
MALIGNOS DEL CÉRVIX UTERINO”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO

***de Maestro en Ciencias con especialidad en Morfología***

PRESENTA

**Norma Nava Gómez**

Directora: Dra. Sara Huerta Yépez

Codirectora: Dra. Adriana Becerril Montes

Enero del 2006

## AGRADEZCO:

A mis padres: Raúl y Célia por darme la posibilidad de vivir y proporcionarme las herramientas morales para seguir adelante.

A Sigfrido, mi esposo por su amor, comprensión y gran apoyo.

A Diana y Xóchitl, mis hijas quienes más han padecido mis sueños y me han enseñado a valorar la vida.

A Tonatiuh por iluminar mi camino.

A mis hermanas Gloria y Patricia que me han mostrado el valor de cada mujer.

A todas las mujeres que me distinguen con su confianza.

A mi *alma mater* el Instituto Mexicano del Seguro Social, que a través del Sindicato Nacional de Trabajadores del Seguro Social y las autoridades institucionales, me han permitido convinar el ser trabajadora, madre, estudiante y esposa

Al Instituto Politécnico Nacional por aceptarme como alumna de la Maestría en Ciencias.

A la Dra. Sara Huerta Yépez por la dirección de este estudio y enseñarme la disciplina en el trabajo.

A la Dra. Adriana Becerril Montes por su valiosa ayuda en la dirección de este estudio y su participación en el fortalecimiento de mi carácter.

Al Dr. César Raúl González Bonilla por permitirme realizar este trabajo en las instalaciones de su laboratorio y todas sus valiosas observaciones técnicas y personales.

Al Dr. Ramón Verduzco Jiménez por su apoyo y comprensión.

Al los directivos del HGZ 98 Dr. Leopoldo Daniel Soto López, Dra. Silvia Elena Cantú Flores y Dr. Antonio Aguilar de los Santos por su gran apoyo en la realización de este proyecto.

A Yu-Mei Anguiano Hernández, Guillermina Baay Guzmán, Dra. María de los Ángeles Hernández Cueto, Daniel Hernández Cueto, y al Dr. José Martín Coronel Enríquez por su participación y colaboración en este trabajo.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández”, Centro Médico Nacional “La Raza” IMSS.

El proyecto fue aprobado por el comité de investigación local del IMSS (2004/1402/005).

## **ABREVIATURAS**

<b>APAF-1</b>	Activating protease factor-1
<b>BH</b>	Bcl-2 homology domains.
<b>CACU</b>	Cáncer del cérvix.
<b>CARD</b>	Caspase recruitment domain death-fold.
<b>CD4</b>	Cluster of differentiation 4.
<b>CD8</b>	Cluster of differentiation 8.
<b>CR-1</b>	Región conservada 1.
<b>DC</b>	Dendritic cells.
<b>DD</b>	Domains of Death.
<b>DOC</b>	Detección Oportuna de CACU
<b>FADD</b>	Fas associated DD.
<b>IAP</b>	Inhibitor of apoptosis-protein.
<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social.
<b>L1</b>	Proteína de la cápside del VPH
<b>LC</b>	Langerhans cells.
<b>LRC</b>	Región de control largo
<b>NIC</b>	Neoplasia Intraepitelial Cervical.
<b>NK</b>	Natural killer.
<b>SS</b>	Secretaría de Salud.
<b>Th1</b>	T helper
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxinucleotidyl T transferase-Biotin-dUTP Nick end Labeling.
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano.

## ÍNDICE

Resumen	10
Introducción	14
Etiopatogénia del cáncer cervicouterino	14
Epidemiología del cáncer cervicouterino	16
Clasificación del VPH	19
Características del VPH	19
Mecanismo de inducción a la oncogenesis	23
Aspectos inmunológicos en la infección por VPH	25
Características generales de las células dendríticas	28
Apoptosis	32
Apoptosis inducida por VPH	34
Justificación	36
Planteamiento del problema	37
Hipótesis	38
Objetivo general	39
Objetivos específicos	39
Material y Métodos	40
Muestras	40
Reactivos	40
Anticuerpos	41
Tinción Hematoxilina Eosina	41
Inmunohistoquímica	42
Análisis Morfométrico	43
Procesamiento de datos	43
Resultados	44
Morfología topográfica con Hematoxilina-Eosina	44
Morfología de los hallazgos inmunohistoquímicos	44
Análisis morfométrico de los hallazgos inmunohistoquímicos	45
Discusión	55

Conclusiones	60
Perspectivas	61
Apéndice	62
Bibliografía	64

## **RESUMEN.**

Las apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular que mantiene la constancia del número de células de los tejidos maduros.

Las células dendríticas son elementos de primer nivel del sistema inmunitario en la defensa contra microorganismos. Los agentes microbianos, entre ellos los virus son capaces de causar enfermedades cuando alteran procesos vitales como la muerte fisiológica y la defensa inmunitaria.

El cérvix está expuesto a numerosos agentes patógenos que interrumpen la homeostásis del microambiente y desencadenan enfermedades que pueden producir lesiones capaces de dar manifestaciones localizadas o generalizadas de distinta gravedad. Las infecciones virales tienen manifestaciones de menor o mayor gravedad dependiendo del tipo de virus, pudiendo provocar lesiones que evolucionan hacia carcinoma por el impacto ejercido a nivel de cada célula.

En este trabajo se comparó la frecuencia de apoptosis y de células presentadoras de antígenos en lesiones del cérvix, de diferente etiología y se correlacionó con la presencia del virus del papiloma humano (VPH) de tipo de alto riesgo.

Por método inmunohistoquímico se detectaron las preteínas: CD1a, presente en células dendríticas, Fas y Fas-L; así como caspasa 3-activa, marcadoras del proceso de apoptosis y L1 marcadora de VPH tipo 16 y 33, en 22 casos de procesos inflamatorios, 22 de displasia de distinto grado y 12 de carcinoma in situ e invasor del cérvix.

Se analizó la frecuencia de las células positivas y la intensidad de la positividad entre los tres grupos. Los resultados mostraron que no existen diferencias en el número de células positivas para los marcadores de apoptosis y células dendríticas entre los grupos estudiados, pero sí en la densidad de la expresión de esas moléculas, mostrando una disminución significativa en el grupo de CACU. La proteína L1, molécula marcadora de

VPH se detectó en el 85% de los casos estudiados; con menor expresión en CACU.

Se concluye que los resultados apoyan que en los casos de CACU, existe disminución de la respuesta inmunitaria, bloqueo del proceso de apoptosis e integración del genoma del virus al de la célula.

## SUMMARY

Apoptosis is a physiological process of cell death that maintains the health and a constant number of cells in mature tissues. Dendritic cells are elements of the first level of defense against microorganisms of the immune system.

Microbian agents, among them the virus, are capable of causing illnesses when they alert vital processes such as physiological death and immune defense. The cervix is exposed to numerous pathogenic agents that break the homeostasis of the microenvironment and trigger illnesses that can produce sores which are capable of causing local or generalized manifestations of different levels of gravity. Viral infections have manifestations of greater or lesser gravity, depending on the type of virus, some being able to provoke sores that evolve into cancer due to their impact in each cell.

Cervical cancer (CACU) is the major cause of death by illness in women of fertile age. In this work the frequency of apoptosis and presenting antigens cells is compared in cervical sores from different pathologies and related to the presence of the high risk human papilloma virus (VPH).

CD1a protein marker present in dendritic cell. CD1a proteins was detected by immunohistochemical methods. Also the markers proteins of apoptosis process, Fas, Fas-L and 3-active caspase and the L1 viral protein. They were detected in 22 cases of inflammation, 22 of different level of dysplasia and 12 on site and invasive cervical carcinoma. The frequency of marker cells and the intensity of the marking were analyzed among the three groups.

The frequency of the positive cells and the intensity between the three groups was analyzed. The results show, that there is no difference in the number of positive cells for the apoptotic markers and dendritic cells between the groups, however significant difference was shown in the positive intensity in the CACU group compare with the other groups. The expression of L1 was detected in 85% in all the cases; with lower density expression in CACU.

The results support that in CACU exist significant downregulation in both the immune system, and apoptotic process and also is clear the virus genome integration of the nuclear cells.

## **INTRODUCCION**

El cuello uterino o cérvix es la porción de este órgano que hace protrusión en la vagina y que desde el punto de vista histológico está tapizado por una mucosa, que en el canal endocervical posee un epitelio secretor mucoso prismático o columnar simple y en la porción que se continua con la pared vaginal, el revestimiento es plano estratificado. Todo el cérvix y de manera especial el sitio de transición de los epitelios, es asiento de patologías frecuentes de diversa etiología y diferente gravedad, entre las cuales el cáncer representa el extremo de un espectro de alteraciones que afectan a las células de esos tejidos; los procesos inflamatorios o cervicitis están situados en el extremo opuesto y entre ambos, una gama de alteraciones en esas células, que estudiadas por citología exfoliativa o por análisis anatomopatológico, permite la clasificación de padecimientos que afectan a esa parte del tracto reproductor femenino. Algunas se identifican como benignas y estables, otras como inestables y progresivas, por esto precancerosas y finalmente como malignas. Las características de malignidad están ligadas con alteraciones profundas del microambiente y entrañan desquiciamiento de controles normales del funcionamiento celular, de manera relevante, el ciclo de división y de muerte fisiológica, produciendo además de células individuales con funcionamiento anormal, rompimiento de la homeostasis de las colectividades tisulares.

## **ETIOPATOGENIA DEL CACU.**

Diversos estudios epidemiológicos muestran que dentro de la etiopatogenia del cáncer cervicouterino (CACU) se ha identificado el virus del papiloma humano (VPH) como agente infeccioso de transmisión sexual. Existen otros factores de riesgo como son, inicio prematuro de vida sexual activa (antes de los 18 años de edad), no haberse practicado un estudio citológico,

inmunodeficiencia adquirida o congénita, promiscuidad sexual propia o de la pareja, uso de anticonceptivos orales por más de 10 años sin supervisión médica, tabaquismo, multiparidad, antecedentes familiares de cáncer, infecciones genitales recurrentes, falta de circuncisión de la pareja sexual masculina, deficiencia de folatos y vitamina A,C y E y consumo de esteroides (1-8).

Desde el punto de vista histológico, las lesiones precancerosas del cuello uterino se han clasificado de diversas maneras. El sistema más antiguo es el de la displasia leve en un extremo, y la displasia grave/carcinoma *in situ* en el otro. Otra clasificación como la neoplasia intraepitelial del cuello uterino (NIC), en la que las displasias leves se denominan NIC de grado I y las lesiones de carcinoma *in situ* se denominan NIC III. Incluso hay otro sistema en que estas entidades se reducen a dos, que se denominan lesiones intraepiteliales de bajo grado y de alto grado. Estas lesiones precancerosas o displásicas ocurren más frecuentemente en la zona de convergencia o de transformación del epitelio columnar en epitelio plano estratificado no queratinizante, también llamada unión escamocolumnar. En la displasia y carcinoma *in situ* la anormalidad es intraepitelial y las diferencias morfológicas permiten establecer un diagnóstico (6;7). En esencia, la neoplasia intraepitelial -displasia-, es una lesión caracterizada por la queratinización de los componentes celulares y la diferenciación anormal de los estratos del epitelio, que en la forma más severa, abarca todas las capas celulares (8;9-11)

Respecto al VPH como un factor importante en la oncogénesis del CACU se sabe que es el agente causal de múltiples procesos patológicos de cérvix que se transmiten por contacto sexual. Ha sido aislado de carcinomas epidermoides vulvares y vaginales; además, se asocia con otros tumores epidérmicos y en lesiones proliferativas de la piel y las mucosas (12-14) .

En el cuello uterino se considera que la lesión precancerosa puede existir en la fase no infiltrante durante 20 años y pueden estar desprendiéndose células anormales que a veces, se descubren en el examen citológico (12;13); por esto, en presencia de lesiones precancerosas debe tenerse presente que:

- 1) Constituyen un espectro continuo de cambios morfológicos cuyas fronteras no están bien determinadas.
- 2) No siempre evolucionan hacia la formación de un cáncer y pueden revertir espontáneamente; el riesgo de que persistan o que evolucionen hacia un cáncer aumenta a medida que aumenta la gravedad de la lesión precancerosa

## **EPIDEMIOLOGÍA DEL CACU.**

El CACU representa un importante problema de salud entre las mujeres en edad fértil de los países en desarrollo de América, África y Asia, lugares donde ocupa el primero o segundo puesto entre todos los cánceres que afectan al sexo femenino. La mayoría de los cánceres del cuello uterino se deben a una infección por determinados tipos de virus del papiloma humano (VPH), agente que se adquiere por transmisión sexual. Los países en desarrollo diagnosticaron 370 000 de los 466 000 casos totales de CACU, que según estimaciones, tuvieron lugar en el mundo del año 2000 al 2003. Paralelamente, cada año mueren por CACU 300 000 mujeres en todo el mundo; más del 80% de ellas vive en países en desarrollo (14-16). Una estimación de la prevalencia mundial (basada en el número de pacientes que sobrevive a los 5 años de diagnóstico), indica cada que año se presentan 1.4 millones de nuevos casos de CACU. Además, es muy probable que existan de 3 a 7 millones de mujeres en todo el mundo que sufren de displasia de alto grado y no han sido diagnosticadas (14;17).

En contraste, la incidencia del CACU y la mortalidad por su causa en los países desarrollados se ha reducido considerablemente durante los últimos 40 o 50 años, gracias al inicio y seguimiento de programas de detección oportuna del cáncer cérvicouterino (DOC); en los que se realiza anualmente una citología cérvicovaginal a mujeres con vida sexual activa. El objetivo de estos programas es detectar las lesiones precancerosas y tratarlas antes de que progresen a CACU. Ese examen es considerado como una prueba con elevada sensibilidad específica para identificar dichas lesiones; sin embargo, hay un porcentaje que no se detecta por múltiples razones, como apatía y temor por parte del sector femenino, así como muestreo inadecuado por falta de capacitación en la toma de la muestra, lo cual eleva los riesgos de enfermedad y muerte debidas a CACU, sobre todo en países en desarrollo. En la mayoría de los países desarrollados se recomienda efectuar la primera citología una vez que la mujer haya empezado a tener relaciones sexuales, luego se repite el estudio cada 1 a 5 años (15;17).

Así, hasta la fecha, los esfuerzos mundiales para prevenir el CACU se han basado en el muestreo citológico y en el tratamiento de las lesiones precancerosas de las mujeres con y sin vida sexual activa. Muchos expertos creen que el CACU proviene de lesiones displásicas precursoras que progresan de forma constante desde una displasia leve o moderada hasta una displasia severa, luego hacia el carcinoma *in situ* y por último hacia el carcinoma invasor. Hoy se piensa que la displasia de alto grado es la lesión precursora directa del CACU; un tercio de estas displasias progresan hacia cáncer durante un periodo de 10 a 15 años mientras que casi todas las lesiones de bajo grado permanecen estables o remiten de forma espontánea (1;8;15;18;19).

En los países en desarrollo ocurren el 75% de los casos de CACU y aunque se han implementado programas de DOC en América Latina en los últimos 30 años, ha habido resultados. En cambio, en Asia y África se han complementado resultados del exámen de citología convencional con otras posibles alternativas de detección del CACU y de lesiones premalignas, dando mejores resultados (15;20;21).

En México en 1974 se inició un programa nacional de DOC (2;15;20), que hoy funciona en el Distrito Federal y en los 31 estados del país. Todas las mujeres de 25 a 65 años pueden someterse a citologías anuales; el programa está integrado dentro de los servicios de salud. Más temprano, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) inició este programa de detección en 1962 y terminó de implementarlo en todo el país en 1971, aunque hasta el año 2000 las coberturas de detección fueron menores del 12% del total de la población (ver apéndice 1). Porque , dicho programa sólo se responsabiliza por mujeres derechohabientes y solo en 2004, esos centros de detección efectuaron 20 millones de frotis. La cobertura nacional de detección varía mucho (ver apéndice 2); algunos estudios indican que por el momento, menos del 30% de las mujeres que viven en el medio rural se han sometido a ésta prueba (2;3;6;21).

Según una evaluación de las citologías del cuello uterino integradas en este programa, la validez de los resultados variaban mucho dentro y entre los centros de detección de la SS y del IMSS (1;3). Entre los centros de muestreo, la sensibilidad para detectar las lesiones de alto grado oscila de 46% a 90% y la especificidad entre el 48% y 96%. La tasa de falsos negativos fluctuó entre el 10% y el 54%, lo que se refleja en el hecho de que la mortalidad por CACU no ha disminuido en México desde que se inició ese programa (3;6;19-21)

## CLASIFICACIÓN DEL VPH.

Los VPH han sido aislados de más de 60 especies animales incluyendo mamíferos, reptiles y anfibios. La mayoría de estos virus infectan las superficies epiteliales de la piel o las mucosas y produce crecimientos verrucosos. Los virus del papiloma son específicos de especie y no producen infecciones cruzadas. En el humano, utilizando hibridación molecular y análisis enzimático restrictivo, se han identificado 100 tipos de VPH, los de mayor importancia se muestran en la tabla 1 (4;13;22), algunos tipos se asocian a las lesiones de alto riesgo, ya que, se encuentran cada vez con mayor frecuencia en progresión a CACU (3;12).

**Tabla 1. Algunos tipos de VPH.**

TIPOS DE VPH	LESIÓN QUE CAUSAN
1, 2, 3, 4, 7,10, 28	Verruga común.
6, 11, 40, 42-45, 53-55, 57, 59, 61, 67, 69, 71, 74, 82	Condiloma ano genital, lesión de bajo riesgo (CIN grado I).
16, 18, 31-35, 39, 51, 52, 56, 58, 61, 66, 68, 70, 73	Lesión ano genital de alto riesgo (NIC grado II y III), Lesión laringoesofágica, Cáncer pulmonar (posiblemente).
26, 27	Verruga común, deficiencia inmunitaria y transplantes renales.

## CARACTERÍSTICAS DEL VPH

El VPH pertenece a la familia *Papovaviridae*, es un virus epiteliotrópico de cápside icosaédrica, compuesta de 72 capsómeros, la cual mide aproximadamente 55 nm de diámetro, de forma pentamérica, que contiene

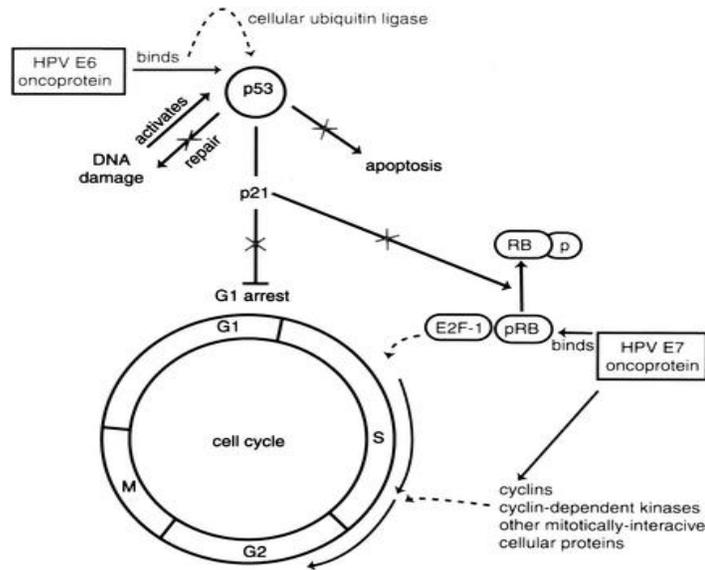
DNA de doble cadena de forma circular (13). Su genoma tiene una longitud aproximada de 7900 pares de bases con una masa molecular de  $5.2 \times 10^3$ , las cuales están asociadas con histonas (11) (esquema 1 y 2). Todas las secuencias de proteínas codificadas (ORF) están restringidas a una sola banda de apertura. El genoma viral está dividido funcionalmente en tres grandes dominios: la primera región de aproximadamente 400 a 1000 kb, es una región regulada "río arriba" que no codifica, referida como la región de control largo (LCR), o región reguladora superior, la cuál contiene un centro promotor largo, el p97 junto con una secuencia silenciosa que controla la transcripción de ORF (11;23). La segunda región que ha sido denominada de función viral temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) que codifica proteínas no estructurales y está involucrada con la replicación y la oncogénesis; y la tercera región de aproximadamente 3 Kb, llamada de función tardía que codifica dos proteínas estructurales de la cápside viral (L1 y L2). Por otro lado, se han encontrado que las secuencias de nucleótidos de E6, E7 y L1 de tipos conocidos de VPH son homólogos en más del 90% (24;25)

Entre las proteínas virales E6 promueve cambios importantes en el ciclo celular y del VPH, lo que conduce al proceso de inmortalización celular, induce la síntesis aberrante de proteínas, lo que resulta en un inadecuado crecimiento celular y altera señales que dan como resultado eliminación de los mecanismos de defensa y la respuesta de vigilancia tóxica, ya que las células infectadas presentan alta proliferación. Además, la proteína E6 induce disminución de los mecanismos de apoptosis, diferenciación y envejecimiento celular y actúa junto con E7 para inmortalizar células epiteliales a través de mecanismos como el bloqueo de la apoptosis por degradación del *p53*, alterando su transcripción al interactuar con la proteína p300 que incrementa la duración máxima del ciclo de vida celular y altera la actividad de las telomerasas (4;13;23;25). Por otro lado, la integración del genoma viral desorganiza el ciclo celular en las células infectadas por VPH



personas con la forma arginina de *p53* corren un riesgo siete veces mayor de desarrollar cáncer cervical que las que no lo poseen (4;13;30;31).

## FUNCIONAMIENTO DE LAS PROTEINAS E6 Y E7 DEL VPH .



ESQUEMA 2

Las proteínas E7 son de bajo peso molecular (100 aminoácidos aproximadamente), se relacionan con la familia de proteínas celulares p107 y p60 dentro de la secuencia LXCXE de la CR2 del VPH, que suprimen las señales celulares de diferenciación y apoptosis, a través del bloqueo de la familia de proteínas supresoras del retinoblastoma (pRB) (esquema 2). La propiedad de la proteína E7 del VPH para asociarse con el pRB es crítica para generar y/o mantener el medio de la célula huésped para la replicación del genoma viral. Las proteínas E7 derivadas de los VPHs de alto riesgo interactúan más eficientemente con el pRB que las proteínas E7 que codifican los VPHs de bajo riesgo y con las mutaciones en el dominio LXCXE que afectan a la asociación del paquete de proteínas antes mencionado y ocasionan la transformación defectuosa del sistema de defensa (4;13;23;25).

La región L que comprende alrededor del 40% del genoma viral, codifica las dos proteínas de la cápside; la más grande es L1, que forma aproximadamente el 98% de la cápside, su peso molecular es de 87 kb y es una región conservada en la mayor parte de los tipos de VPHs. La proteína L2 codifica el 8% de la cápside, es de alto peso molecular 70 kb y está constituida por 240 aminoácidos (10).

### **MECANISMO DE INDUCCIÓN A LA ONCOGÉNESIS.**

El intervalo de exposición para el desarrollo de la lesión varía de pocas semanas a meses y tal vez años (7), se cree que el virus aprovecha el acceso al cérvix o al tracto genital femenino a través de defectos en el epitelio que exponen a las células epiteliales basales a las partículas virales. Probablemente, la mayor parte de la infección ocurre a través de los receptores para integrinas de las células basales, específicamente la integrina  $\alpha 4\beta 6$  (4;13;23;25). Así, las células infectadas contienen el DNA viral desde las capas profundas del epitelio en donde el virus se replica y ensambla. El virus puede detectarse a través de microscopía electrónica o por técnicas inmunohistoquímicas (10;25).

El análisis molecular de los virus de alto riesgo y de los virus que producen condilomas genitales benignos muestra diferencias que podrían estar relacionadas con su actividad transformadora. En los condilomas benignos y las lesiones preneoplásicas, el genoma del VPH se mantiene en una forma episómica (no integrada) mientras en los cánceres, el DNA viral suele estar integrado en el genoma de la célula huésped. Este evento es clave para la inducción de la carcinogénesis del VPH. La integración del genoma del VPH en los cromosomas de la célula huésped ocurre comúnmente cerca de los sitios frágiles del genoma humano, sin que aparentemente existan evidencias de mutagénesis. La forma de integración más específica

corresponde a los genes E6 y E7, que se mantienen constantes; así, como otras porciones del DNA viral son suprimidas o su expresión es alterada (25). La localización de la integración del virus en los cromosomas de la célula huésped es aleatoria, pero el patrón de integración es clonal es decir, el lugar de la integración es idéntico en todas las células de un cáncer determinado. Esto no sucedería si el VPH fuera sólo un pasajero que infecta a las células después de la transformación. Las proteínas E1 y E2 de los virus del papiloma juegan un papel importante en la replicación del genoma viral. Las proteínas E2 de los papilomavirus contribuyen a la segregación del genoma viral durante la división celular, ya que une el genoma viral con los cromosomas mitóticos. (4;32). Como la región E2 del DNA viral inhibe normalmente la transcripción de los genes virales que se expresan precozmente E6 y E7, su interrupción conducen a una expresión excesiva de las proteínas E6 y E7 de los tipos 7 y 10 del VPH (32;33).

Además de la expresión de E4 y L1, asociada con VPH-7, que es dependiente en la replicación viral y diferenciación epitelial (34). La L1 es una proteína principal de la cápside del VPH, que se ha purificado y analizado por integridad estructural y autoensamblaje *in vitro* (35) el potencial oncogénico de los tipos 7 y 9 de VPH podría estar relacionado con estos dos productos de los genes virales tempranos (36;37).

Aunque todas estas observaciones implican a determinado tipo de VPH en la patogenia del cáncer humano, cuando se efectúa una transferencia *in vitro* con DNA de los tipos 7, 10 y 31 a queratinocitos humanos; éstos se hacen inmortales pero no forman tumores en los animales de experimentación. La transferencia con un gen *ras* mutante sí provoca la transformación maligna completa, por tanto, parece más probable que la infección por el VPH actúe como un iniciador, pero para que se produzca la transformación maligna son necesarias mutaciones somáticas adicionales. El consumo de cigarrillos, la

coexistencia de infecciones microbianas, las deficiencias dietéticas y los cambios hormonales, todos ellos implicados como cofactores en la patogenia del cáncer cervical, podrían facilitar estas mutaciones (38;39).

### **ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LAS LESIONES CERVICALES.**

Desde el punto de vista inmunológico, los sitios en donde se induce la respuesta de las mucosas del sistema reproductor femenino son el cuello uterino y la vagina, además del intestino grueso y el recto, así como los ganglios linfáticos ilíacos e inguinales. En la respuesta inmunitaria participan los linfocitos T intraepiteliales cuyo grupo de diferenciación de marcadores superficiales es principalmente 8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) y CD4<sup>+</sup> que se encuentran en la zona de transición epitelial escamoso columnar del cérvix. Así mismo, en la mucosa vaginal se produce IgA específica y en la cavidad uterina IgG. Junto con los efectos hormonales cíclicos en la mucosa y la producción de moco, se origina una notable variación en los títulos de inmunoglobulinas en el cuello uterino, durante el ciclo estral (40)

Por otro lado, la mucosa de epitelio vaginal contiene números capilares linfáticos que drenan a los ganglios linfáticos locales, en donde existe una abundante población de linfocitos B. Además de que, la lamina propia de la mucosa contiene un gran número de linfocitos B activados, células plasmáticas; así como macrófagos células dendríticas, eosinófilos y mastocitos (40).

Como agente infectante del cuello uterino el VPH es relevante por su capacidad para inducir progresión de las lesiones hacia carcinoma; una vez que el virus entra en contacto con el organismo se genera primero una respuesta inmunitaria innata, en la que se desencadenan una serie de eventos inmunológicos (40).

- En su fase extracelular, el VPH interactúa con la célula huésped, penetra, se replica y se libera a través de la asociación de la proteína E4 con la malla de filamentos intermedios de queratina, que afecta la estabilidad estructural celular para facilitar la liberación de nuevas partículas virales.
- Se activa el complemento para la lisis directa del virus pero los que entran a las células desencadenan la replicación viral intracelular, en donde son inaccesibles para los anticuerpos.

Posteriormente tiene lugar la generación de la respuesta inmunitaria adaptativa.

- Los VPH que permanecen fuera de la célula son neutralizados por los anticuerpos antivirales, que se fijan a la cápside viral y evitan su entrada a otras células.
- Citocinas como IFN tipo II son liberadas por las células infectadas que las producen como resultado de coestimulación, o por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, como consecuencia se activan linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs), cuya función principal es la vigilancia en contra de las infecciones virales, y que reconocen antígenos virales citosólicos de síntesis endógena, presentados en asociación con las moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).
- Para esto, las células infectadas son reconocidas por las células presentadoras de antígenos (APCs), que los procesan en péptidos que se acoplan al MHC y los presentan a los linfocitos T (14;10;28;40).

Las APCs profesionales mejor definidas incluyen: linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DC); están involucradas en diferentes vías de presentación de antígeno, dos de ellas reconocidas como clásicas: la vía del

MHC clase I, que presenta antígenos de origen citosólico, y cuya célula respondedora es el linfocito T CD8<sup>+</sup>; sin embargo, se sabe de la presentación de antígenos exógenos por parte del MHC clase I (presentación cruzada) (40). La otra vía es mediante MHC clase II, en donde se presentan antígenos proteicos de origen extracelular y cuya célula respondedora es el linfocito T CD4<sup>+</sup>.

Una vía independiente del MHC, recientemente descrita es la de la familia CD1 con cuatro isoformas en los humanos (basándose en la similitud de su secuencia molecular) CD1a, CD1b y CD1c, que conforman el grupo I, y CD1d único miembro del grupo II (41). Todas las moléculas de CD1, son glicoproteínas de la superficie celular que están relacionadas estructuralmente con las moléculas del MHC; sin embargo distintas, ya que son esencialmente proteínas no polimórficas. La familia CD1 presenta fundamentalmente antígenos de tipo lipídico y glicolípido a distintos tipos de linfocitos T CD4 (Th1 y Th2), CD8 y NKT. Tienen un ligando de estructura acanalada similar al péptido ligando de las moléculas del MHC. Análisis cristalográficos con rayos X de varias isoformas de CD1 mostraron que la superficie interior de los ligandos acanalados es altamente hidrofóbicos y favorece la unión no polar de antígenos ligados a lípidos y glicolípido (42-44).

La molécula CD1a fue descrita en los timocitos y los timomas. Los isotipos a,b y c son expresados en células doble positivo (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) en la corteza del timo y con baja intensidad células de un simple positivo para CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> en los timocitos de la médula. También son expresadas en las células dendríticas (Langerhans) de la piel. Por otro lado, la molécula CD1a ha sido ampliamente utilizada para identificar DCs en tejidos, o en sistemas *in vitro*, ya que se manifiesta fuertemente en DC maduras (42).

Recientemente fue reportada la expresión de CD1 en células epiteliales de la metaplasia esofágica de Barrett, en donde ha sido relacionada con evolución favorable, pues la falta de expresión de esta molécula correlaciona con el progreso de displasia a cáncer.

Se ha encontrado que la molécula de CD1a sólo es posible observarla en células epiteliales que presentan una transformación maligna aunque su manifestación en tumores es baja (43-48).

### **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS DC.**

Las únicas APCs que manifiestan las tres vías de presentación de antígenos mencionados son las DC (46). Se caracterizan porque poseen prolongaciones citoplasmáticas en forma de dendritas finas. En los humanos, existen dos tipos de células de morfología dendrítica con funciones diferentes, a las que deben su nombre. Un tipo son las llamadas *células dendríticas interdigitantes* o, simplemente, *células dendríticas*; son fagocíticas y expresan moléculas MHC de clase II en grandes cantidades, así como moléculas co-estimulantes B7-1 y B7-2 (CD80/86). De esta forma, están preparadas para presentar los antígenos a las células T CD4+, y son las APCs más potentes para las células T. Este tipo de DC se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, encontrándose en el sistema linfóide y en el intersticio de muchos otros órganos como corazón y pulmones; en la piel y en el epitelio vaginal existen unas células similares, denominadas *Células de Langerhans* (LC's) (47).

El otro tipo de células con morfología dendrítica se encuentra en los centros germinales de los folículos linfoides del bazo y los ganglios linfáticos, por lo que se les da el nombre de *células dendríticas foliculares* (FDC). Poseen receptores Fc para IgG, por lo que atrapan antígenos unidos a anticuerpos.

Las DC no se observan en el tránsito circulatorio; esta estirpe celular deriva de la médula ósea tanto de la serie linfoide como de la mieloide; de la primera serie (con fenotipo CD 11c-, CD1a-, receptor IL-12+) se originan las DC plasmocitoides; del linaje mieloide las LC y células intersticiales o dendríticas dérmicas (DDCs). Las DC en los tejidos periféricos del cuerpo (piel, intestino, epitelio genital y epitelio de las vías respiratorias) se encuentran en estado inmaduro, están especializadas en la captura y procesamiento de antígenos, pero tienen poca capacidad para activar a los linfocitos T. Estas células inmaduras se caracterizan por tener abundantes moléculas de MHC-II intracelulares, pueden fagocitar y expresar grandes cantidades de receptores para Fc (FcR); una vez que se exponen a cualquier tipo de estímulo, señal de daño o proceso inflamatorio, se induce su maduración que incluye cambios morfológicos, se pierde la capacidad de capturar y procesar antígenos, pero aumenta su capacidad de presentarlos a los linfocitos T. En este estado las DC expresan moléculas de adhesión CD54 e ICAM 3 que favorecen la unión con los linfocitos T; además expresan moléculas accesorias que interactúan con estos linfocitos para ser activados: CD80 y CD86 y gran cantidad de IL-12 (43).

Generalmente, las DCs pueden obtenerse de precursores de monocitos (CD14<sup>+</sup>) y se puede inducir a la diferenciación y proliferación en presencia de GM-CSF y de la interleucina-4 (IL-4). Las LCs son muy importantes para iniciar y regular el sistema inmunitario cutáneo y de las mucosas. Las LCs también infiltran tumores y experimentos *in vitro* han demostrado que están asociadas con un mejor pronóstico (43).

La colonización por LCs de cultivos organotípicos de queratinocitos transformados por VPH fue mejorada agregando a los cultivos GM-CSF. Su infiltración en el epitelio preneoplásico resultó dentro de la condición mínima

basal y se incrementó considerablemente después de adicionar en los cultivos ese factor. Esto sugiere que el GM-CSF tiene un papel importante en el reclutamiento de las LCs en lesiones preneoplásicas en epitelio cervical transformado con VPH y podría ser utilizado como una nueva alternativa de inmunoterapia para tratar esas lesiones, ya que otros estudios mostraron una disminución de la densidad de LCs en la zona de transformación del cérvix y en las lesiones intraepiteliales escamosas del cérvix (43). Por otro lado, la capacidad para generar DCs *in vivo* a partir de sus precursores sanguíneos es esencial tanto en mujeres sanas como en las que tienen alguna lesión intraepitelial escamosa. Esto sugiere que existen factores locales en el cérvix que juegan un papel importante en la producción y desarrollo de alteraciones de las LCs durante la carcinogénesis cervical asociada al VPH. Y dado que estas células generan una respuesta inmunitaria celular efectiva, su defecto puede contribuir a la persistencia del VPH e indirectamente al desarrollo del cáncer. Al respecto se ha observado, que los queratinocitos transformados por el VPH tienen una influencia directa en el número y función de las LCs porque disminuyen la producción de los factores que son necesarios para su migración y maduración (43;46).

Por otro lado, se ha sugerido que la maduración de las DCs , afecta el estado de diferenciación del cáncer de mama y que el sitio específico de activación antigénica es el nódulo linfático centinel (SLN); ya que, cuando fueron comparados los SNL de los bordes tumorales, se encontró que los que no tenían células tumorales contenían gran cantidad de células CD83 y una significativamente menor expresión de IL-10 que aquellos SLNs con metástasis. Además el número de células positivas a CD1a en los SLNs dentro de estos dos grupos, fue similar; sin embargo cuando se utilizaron marcadores basados en receptores hormonales y se clasificaron la DCs acuerdo con el estado de los SLNs y la morfología nuclear, el número de DCs inmunológicamente inmaduras mostraron una expresión

significativamente mayor a CD1a en los SLNs que drenaban a los tumores grado III que en los SLNs libres de células tumorales que drenaban a los tumores del mismo grado (48).

En la tabla siguiente se enlistan las características de las LC y se contrastan con otras DC humana.

Tabla 2. Subgrupos de DC humanas.

<b>Linaje linfoide</b>	<b>Linaje mieloides</b>	<b>Fenotipo en DCs maduras</b>
<b>DC Plasmacitoide</b>	<b>DC Intersticiales</b>	<b>Células de Langerhans</b>
CD11c-	CD11c+	CD11c+
IL-3R+	IL-3R-	IL-3R-
MHC-II+	MHC-II+	MHC-II+
CD11b-	CD11b+	CD11b+
CD6-	CD6+	CD6+
CD33-	CD33+	CD33+
CD4++	CD4+	CD4+
CD1a-	CD1a-	CD1a+
Gránulos de Birbeck-	Gránulos de Birbeck-	Gránulos de Birbeck+
Langerina-	Langerina-	Langerina+
Factor XIIIa-	Factor XIIIa+	Factor XIIIa-
CD86+	CD86+	CD86+
CD40+	CD40+	CD40+
DC-LAMP+	DC-LAMP+	DC-LAMP+

**FUNCIÓN**

Secreción de IL-12+/-	Secreción de IL-12++++	Secreción de IL-12++++
Secreción de IL-10-	Secreción de IL-10++++	Secreción de IL-10+/-

Aunque la naturaleza de una respuesta inmunitaria efectiva contra la infección del VPH no está completamente entendida, parece ser que la respuesta humoral es un reflejo de la progresión del tumor más que una respuesta de protección. Sin embargo existen evidencias de que la respuesta celular es importante en el control de las lesiones intraepiteliales escamosas asociadas al VPH pues se ha encontrado una disfunción en la respuesta inmunitaria local asociada a la infección cervical por el virus. Se han reportado alteraciones cuantitativas y cualitativas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Además se han encontrado alteraciones en la distribución y morfología de las LCs en las lesiones preneoplásicas del cérvix asociadas al VPH (46;47).

De lo anterior se ha concluido que los pacientes con cáncer desarrollan una respuesta inmunitaria en contra del tumor, que al parecer en muchos casos no es efectiva cuando se establece la inmunosupresión local. Es posible que esta inmunosupresión se deba a una inhibición de la función de las DC. Esto puede suceder por factores derivados de los tumores (48).

## **APOPTOSIS.**

Las células pueden morir por cualquiera de dos mecanismos principales: necrosis o apoptosis. Necrosis es la muerte de células a través de daño extremo, usualmente mediada por destrucción de la membrana plasmática o del soporte bioquímico de su integridad, liberando sus componentes alrededor del tejido dañado y con atracción de células inflamatorias, llevando a destrucción del tejido, característico de la inflamación (49;50).

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es el proceso que se caracteriza por condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitos adyacentes, por lo que no provoca respuesta inflamatoria. Se trata de un

mecanismo de eliminación ordenada de células y por tanto, participa en la morfogénesis, ontogenia y fisiología de las células, así como en la homeostasis de los tejidos y sistemas del organismo. Aunque el proceso de apoptosis se desarrolla en varias horas, la remoción de los fragmentos apoptóticos es tan rápida, que raramente se identifican células apoptóticas en condiciones normales (51).

Están descritas dos vías principales para la inducción de la apoptosis, la extrínseca y la intrínseca. La vía extrínseca depende de receptores celulares de la familia del TNFR, entre los que se incluyen el TNFR1, DR3/TNF y Fas. Estos receptores forman trímeros y contienen dominios intracitoplásmicos, llamados de muerte (DD). Cuando a estos receptores se unen sus ligandos en el exterior de la célula, los DD se unen a proteínas adaptadoras FADD (Fas associated DD), a excepción del TNFR1 que primero se une a TRADD.

Las proteínas FADD tienen un dominio efector (DED) que a su vez está unido a la pro-caspasa 8, formando el “complejo inductor de la señalización de muerte” que es capaz de activar a esas moléculas y formar la caspasa 8, la cual a su vez inicia la activación de la cascada de caspasas efectoras (7,6,8 y 3) (51).

Por otro lado, en la “vía intrínseca” o mitocondrial, la membrana de este organelo se permeabiliza por alteraciones celulares como hipoxia o disminución en el transporte de glucosa. Esta vía depende de caspasas iniciadoras (caspasa 9) que se unen mediante dominios denominados CARD (death-fold caspase recruitment domain) a APAF-1 (protease activating factor-1), el cual se encuentra como monómero en el citosol, pero que al activarse por acción del citocromo C, forma polímeros conocidos como apoptosomas. En condiciones normales APAF-1 se encuentra separado del citocromo C por la membrana mitocondrial externa; sin embargo, cuando por

alguna razón esta membrana se permeabiliza la segunda molécula se libera al citosol y se inicia la cascada de eventos que llevan a la apoptosis. El proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) se encuentra regulado por proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2; éstas pueden dividirse en dos grupos, antiapoptóticas y proapoptóticas; las primeras (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, A1, Bcl-w y Mcl-1), evitan la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C, en tanto que las proapoptóticas, que se clasifican de acuerdo al número de dominios BH (Bcl-2 homology domains) que contienen, pueden mediar la permeabilización de la membrana mitocondrial por si solas (Bax, Bak y Bok), o pueden activarse por otro subgrupo de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, denominadas BH3 (Bim, Bid, Bad, Bmf, BNIP-3, Puma y Noxa). Durante el proceso de apoptosis se presentan cambios morfológicos y fisiológicos celulares desde etapas tempranas, los cuales pueden ser detectados por diversas técnicas de laboratorio. Entre los primeros cambios se encuentran la exposición de la fosfatidil-serina en la superficie celular, la cual puede determinarse por su capacidad de unir Anexina V y el aumento de la permeabilidad celular que puede medirse por la captación de yoduro de propidio mediante citometría de flujo. La actividad de caspasas puede ser determinada directamente o mediante la detección con anticuerpos específicos contra los productos de su proteólisis. El rompimiento del DNA celular puede determinarse mediante electroforesis, técnicas inmunohistoquímicas, o bien mediante TUNEL (terminal-deoxinucleotidyl-transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labelling) (51;52).

### **APOPTOSIS INDUCIDA POR VPH.**

Las alteraciones en los mecanismos involucrados en la apoptosis y su regulación son muy importantes en la carcinogénesis del cérvix (53). Se sabe que la expresión de *p53* regula genes involucrados en el ciclo celular, la

reparación del DNA y la apoptosis (54). Específicamente p53 induce la expresión de factores proapoptóticos como Bax y reprime proteínas antiapoptóticas como Bcl. En ese proceso diversas proteínas ejercen su efecto de diferente manera, por ejemplo inhibiendo la actividad de las caspasas como lo hace la proteína survivina o aumentando la sobrevivencia celular como el caso de Bcl-2 la cual es sobre expresada en células malignas (53;58).

Respecto del VPH, la integración cromosómica de su genoma frecuentemente da como resultado una desorganización viral en la apertura del gen E2, ocasionando la pérdida del código de esa proteína. Estos eventos al parecer afectan el ciclo celular y el proceso de diferenciación; por lo que finalmente se transforma el fenotipo de la célula dando lugar a la inmortalización.

Sánchez y colaboradores (54) realizaron estudios con células SiHa (54), las cuales, fueron transfectadas transitoriamente con el gen E2 desorganizado del virus del papiloma bovino. Esta inducción de la expresión del E2 en las células transfectadas dió como resultado la inhibición del crecimiento celular, la ausencia de factores de crecimiento sérico y el inicio de la muerte celular vía apoptosis, la cual podría ser inducida a su vez, por la represión de la transcripción de los genes E6 y E7 lo que produce un aumento en los niveles de p53 y de Rb, respectivamente (53-58).

## **JUSTIFICACIÓN.**

El CACU ocupa el primer lugar entre los cánceres que afecta a las mujeres mexicanas en edad reproductiva, a pesar de los programas de detección oportuna y de las medidas implementadas por las instituciones oficiales y privadas de salud para combatirlo. Una causa es la falta de información en las mujeres acerca de los padecimientos genitourinarios en general, que pueden conducir a graves problema de salud. Sumado a esto, el control de calidad de la citología cervico-vaginal no es siempre el óptimo, lo cual limita la eficacia del método para la detección de la transformación maligna celular; en consecuencia el CACU continúa siendo la causa principal de muerte por cáncer en mujeres en nuestro País.

La afectación de los procesos de proliferación y muerte de las células, así como de la vigilancia inmunitaria durante la evolución de los cánceres, son características que se están estudiando en busca de medios para detener su avance. Investigar acerca de la expresión de marcadores como CD1a y de proteínas involucradas en la apoptosis como Fas, FasL y caspasa 3 activa en CACU, será de gran utilidad en la comprensión de su etiopatogenia y en la búsqueda de nuevas estrategias para el pronóstico y manejo de esta enfermedad.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Diversos estudios indican que el VPH bloquea la apoptosis en los epitelios estratificados como la piel y las mucosas, lo cual constituye un mecanismo por el cual el virus puede invadir las células con mayor facilidad y escapar de la respuesta inmunitaria del huésped. Recientemente se demostró que la expresión de algunas proteínas relacionadas con la apoptosis, correlaciona con la presencia del virus y la ausencia de apoptosis en CACU (4;10;30;56), los resultados sugieren que estas proteínas pueden ser utilizadas como marcadores con fines pronósticos.

En los últimos años se ha demostrado que en la evolución de diversos procesos patológicos, son particularmente importantes los mecanismos inmunológicos y los involucrados en apoptosis. Las células dendríticas juegan un papel fundamental en la presentación de antígenos en las mucosas. La molécula CD1a se ha utilizado como marcador de las LCs para su identificación, así como para diferenciar su estado de maduración y su morfología. Se ha reportado que algunos tejidos neoplásicos como cáncer de ovario y carcinoma escamoso de la lengua presentan disminución de la expresión de CD1a en las LCs locales, comparada con tejido normal (60). Hasta la fecha no existen reportes de lo que sucede con la expresión de esta molécula en cáncer cervicouterino y otros procesos patológicos del cérvix.

Por todo lo anterior, en este estudio se evalúa específicamente la expresión de CD1a y de las proteínas relacionadas con apoptosis Fas y FasL y la apoptosis misma(caspasa-3 activa) en diferentes procesos patológicos de cérvix (inflamatorios, displasias y CACU)

### **HIPOTESIS.**

Si las lesiones benignas y malignas del cuello uterino presentan variaciones en los procesos de apoptosis, defensa inmunitaria y presencia de infección viral, por método inmunohistoquímico, se encontrarán diferencias en la expresión de moléculas marcadoras de esos procesos, lo que podrá sugerir que estas proteínas podrán ser utilizadas con fines pronósticos.

## **OBJETIVO DEL ESTUDIO.**

### **Objetivo General:**

Detectar la expresión de CD1a, L1, Fas, FasL y Caspasa 3 activa (apoptosis) en procesos inflamatorios, lesiones precursoras y carcinoma del cérvix.

### **Objetivos específicos:**

Por métodos inmunohistoquímicos detectar en procesos inflamatorios, displasias y CACU,

- la expresión de CD1a, presente en DC
- la expresión de L1, marcador de la cápside del VPH.
- la expresión de las proteínas Fas, FasL y caspasa 3 activa como marcadores de apoptosis.

Por análisis morfométrico evaluar las diferencias de expresión de las proteínas detectadas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras.**

Se obtuvieron los bloques de parafina de biopsias de cérvix efectuadas por colposcopia y por cono con asa diatérmica e histerectomía total y radical, provenientes de los archivos de Patología de la clínica de Displasias del Hospital General de Zona (HGZ) 68, del HGZ 98 del IMSS y del Hospital de Gineco-Obstetricia 3 del CMN "La Raza". Se seleccionaron de los casos diagnosticados como endo-exocervicitis, displasias (leve, moderada y severa) y carcinoma, aquellos que tuvieron mejor calidad y cantidad de tejido, con un total final de 22 casos de procesos inflamatorios, 22 de displasia de diferentes grados y 12 de carcinoma in situ e invasor. No se requirió de calcular el tamaño de la muestra pues se trabajó con todos los casos disponibles en el momento que se realizó el estudio.

Con los bloques de parafina correspondientes se practicaron cortes de 4 a 8  $\mu$  de espesor para tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina (H/E), y de 2 a 4  $\mu$  de espesor para las tinciones inmunohistoquímicas.

### **Reactivos.**

Para la tinción de H/E:

- Grenetina Bacteriológica CTR SCIENTIFIC (Monterrey N.L. México).
- Hematoxilina de Harris, Merck (Naucalpan de Juárez, Edo de Mex.).
- HCl 1%-Alcohol amoniacal al 1%.
- Eosina B Merck (Naucalpan de Juárez, Edo de Mex.).
- Xileno.
- Eosina Y Merck (Naucalpan de Juárez, Edo de Mex.).
- Resina sintética Goleen Bell (Zapopan Jal. México).

Para el método de inmunohistoquímica:

- Silane (Sigma, Cal. USA).
- Citrato de sodio (0.01 M pH 6.0).
- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- Bloqueador universal (DAKO corporation).
- Albúmina sérica bovina al 1% (Sigma Cal. USA)
- Biotina (Link, DAKO LSAB + kit, DAKO corporation).
- Sustrato DAB (diamino benzidina) (DAKO LIQUID DAB + Substrate-Chromogen Solution. (DAKO corporation).

### **Anticuerpos.**

- Anti-L1. Anticuerpo monoclonal hecho en raton, anti-L1 de VPH-7. BD Pharmingen (San Diego, CA. USA).
- Anti-CD1a: Anticuerpo monoclonal hecho en raton, anti-CD1a humano., Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA. USA)
- Anti-Fas: Anticuerpo policlonal hecho en conejo, anti-Fas humano, Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA. USA)
- Anti-FasL: Anticuerpo policlonal hecho en conejo, anti-FasL humano, raton y rata Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA. USA)
- Anti-Caspasa-3-activa: anticuerpo policlonal hecho en conejo, anti-caspasa-3 activa humana, ratón y rata. Chemicon Internacional (Temecula, CA USA).
- Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR) (DAKO LSAB + kit, DAKO corporation).

### **Tincion de H/E.**

En los portaobjetos con grenetina bacteriológica se montaron los cortes del tejido para la tinción de rutina H/E. Las laminillas fueron desparafinadas en un horno a 60 C° e hidratadas mediante un tratamiento con alcohol a concentraciones decrecientes. Posteriormente el tejido fue teñido por 8

minutos con Hematoxilina de Harris, se enjuagó con agua corriente y el color fue virado con HCl 1%-Alcohol amoniacal al 1% en agua. Después el tejido fue contrateñido con Eosina, finalmente deshidratado en alcohol a concentraciones crecientes y xileno e inmediatamente cubiertos con resina sintética. Las muestras enseguida fueron analizadas mediante microscopia de campo claro.

### **Inmunohistoquímica.**

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para cada marcador se realizó en un solo tiempo en todos los grupos. Los cortes se montaron en laminillas cubiertas con silane. Se mantuvieron en una estufa bacteriológica a 62°C por 1 hora, después se desparafinaron con el siguiente procedimiento: 3 baños en xileno, 2 baños en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 8 minutos.

Ya con el tejido hidratado se procedió a la recuperación del antígeno sumergiendo en citrato de sodio (0.01 M pH 6.0) y calentando a ebullición en baño maría por 12 minutos. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 25 minutos. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60 minutos en una mezcla de bloqueador universal y albúmina sérica bovina al 1%.

Posteriormente las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con los anticuerpos anti- Caspasa-3 activa diluido 1:280, Fas diluido 1:1000, FasL diluido 1:1000, L1 a 1:1000 y CD1a a 1:100. Después de lavar las secciones de tejido se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a Biotina link con streptavidina conjugada a peroxidasa de rabano (HPR), por último el color se generó mediante la adición del substrato DAB

(diamino benzidina) durante 1 a 2 minutos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiñó con hematoxilina.

Posteriormente el tejido se deshidrató bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

### **Análisis morfométrico.**

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campos para cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes con el programa Imagen-Pro® Plus de Media cybernetics®, Silver Spring, MD. USA.

### **Procesamiento de los datos.**

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas, se realizó mediante ANOVA de una vía. Fue utilizado análisis de comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias entre grupos.  $p \leq 0.05$  fue considerada como significativa.

## **RESULTADOS.**

### **Morfología topográfica con HE.**

Con el análisis HE se confirmó el diagnóstico de exo y endo cervicitis, displasia de diversos grados y de CACU de los casos estudiados y se establecieron los grupos.

### **Morfología de los hallazgos Inmunohistoquímicos.**

Los hallazgos inmunohistoquímicos de la expresión de CD1a y de L1 en las diferentes patologías del cérvix se presentan en la figura 1. En los casos de cervicitis se encontró una intensa expresión de CD1a en la membrana y citoplasma de las células con morfología típica de dendríticas (A), y la expresión de L1 se observa muy marcada en la membrana y citoplasma de las células de epitelio plano (B). Para los casos de displasia se encontró expresión intensa de CD1a principalmente citoplásmica y de manera discreta en la membrana de células del epitelio (C); en tanto que, L1 se manifestó principalmente en la membrana celular de dicho epitelio y sólo levemente en el citoplasma (D). En CACU, la expresión de CD1a no fue muy intensa y se encontró principalmente en el citoplasma de las células tumorales (E), mientras que L1 se observó levemente expresado también en el citoplasma de las células malignas (F).

Los hallazgos inmunohistopatológicos de la figura 2 presentan la expresión de Fas y FasL. En el caso de cervicitis la expresión de estas dos proteínas se identificó en epitelio escamoso y en epitelio columnar. En contraste con la expresión de Fas (A), que se observó principalmente en la membrana citoplásmica, aunque también se expresó en el citoplasma de las células, en las células basales no se observó tinción para este receptor. De FasL se

mostró una discreta expresión en la membrana celular del epitelio columnar (B).

Para los casos de displasia, se observó la expresión de Fas casi exclusivamente en la membrana de las células del epitelio plano y muy discretamente tuvo expresión en el citoplasma celular (C). De FasL se encontró expresión muy leve, principalmente en el citoplasma celular y discretamente en la membrana de las células del epitelio plano (D).

En los casos de CACU se mostró la expresión de Fas muy intensa en la membrana y en el citoplasma de las células del epitelio plano (E). De manera interesante en algunas muestras este grupo no se expresó FasL (F).

Los resultados de la detección de la forma activa de la caspasa 3 se muestran en la Figura 3. En los casos de cervicitis (A), caspasa-3 activa se encontró claramente expresada en el citoplasma de las células del epitelio plano, mientras que en displasia (B) se encontró una moderada expresión en el citoplasma celular y en CACU (C) se observó expresión de esta proteína sólo en algunas de las muestras analizadas.

### **Análisis morfométrico de los hallazgos inmunohistoquímicos.**

La determinación del número de células positivas a cada uno de los anticuerpos y la densidad de la expresión en ellas mostró los siguientes datos: las figuras 4A y 4B grafican los resultados del número de células positivas y la densidad en ellas respectivamente, para la proteína CD1a; aunque los datos en la primera no muestran diferencias significativas entre el grupo de CACU y los demás grupos, sí es clara la diferencia ( $p < 0.0001$ ) en la densidad de la expresión de esta molécula, mostrada en 4B.

Los resultados en la expresión de L1 muestran las diferencias del número de células positivas en la figura 5A entre CACU y los otros dos grupos; las

cuales no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, con respecto a la densidad de la expresión, la diferencia fue muy clara ( $p < 0.0001$ ) (5B).

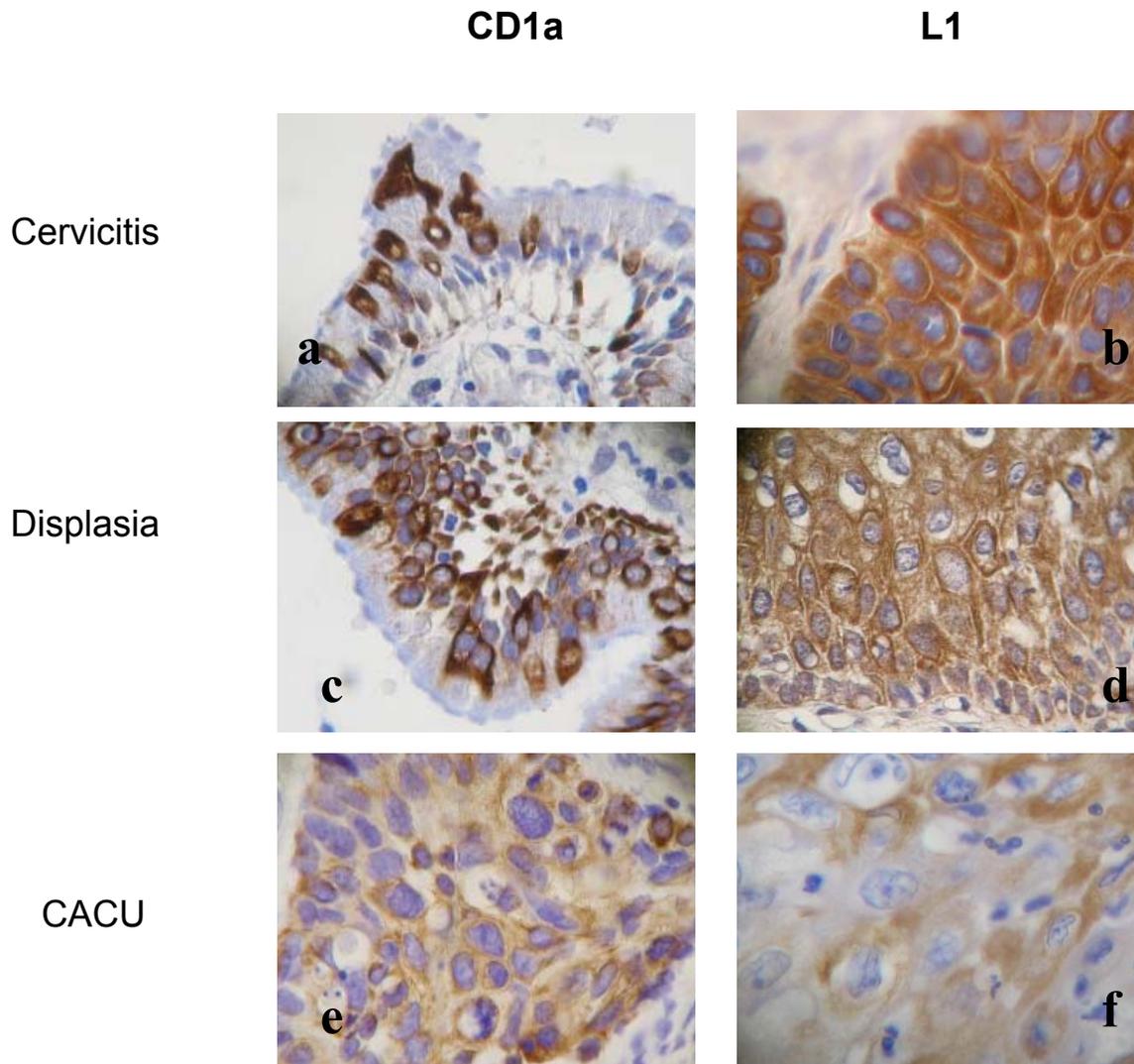
El número de células positivas para Fas se muestra en la figura 6A, en donde se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) cuando fueron comparados el grupo de CACU con los otros dos grupos; en cambio al comparar la densidad de la expresión de Fas no hubo diferencias estadísticamente significativas (figura 6B).

En cuanto a la expresión de FasL en la figura 7 se presenta la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) entre el grupo de CACU y los grupos restantes, tanto en número de células como en intensidad de la expresión.

La medición de apoptosis con caspasa-3 activa se muestra en la figura 8. En donde se observan diferencias significativas tanto en el número de células (8A), como en la densidad de la expresión (8B), cuando se compara el grupo de CACU con displasia y cervicitis ( $p < 0.05$ )

# Figura 1

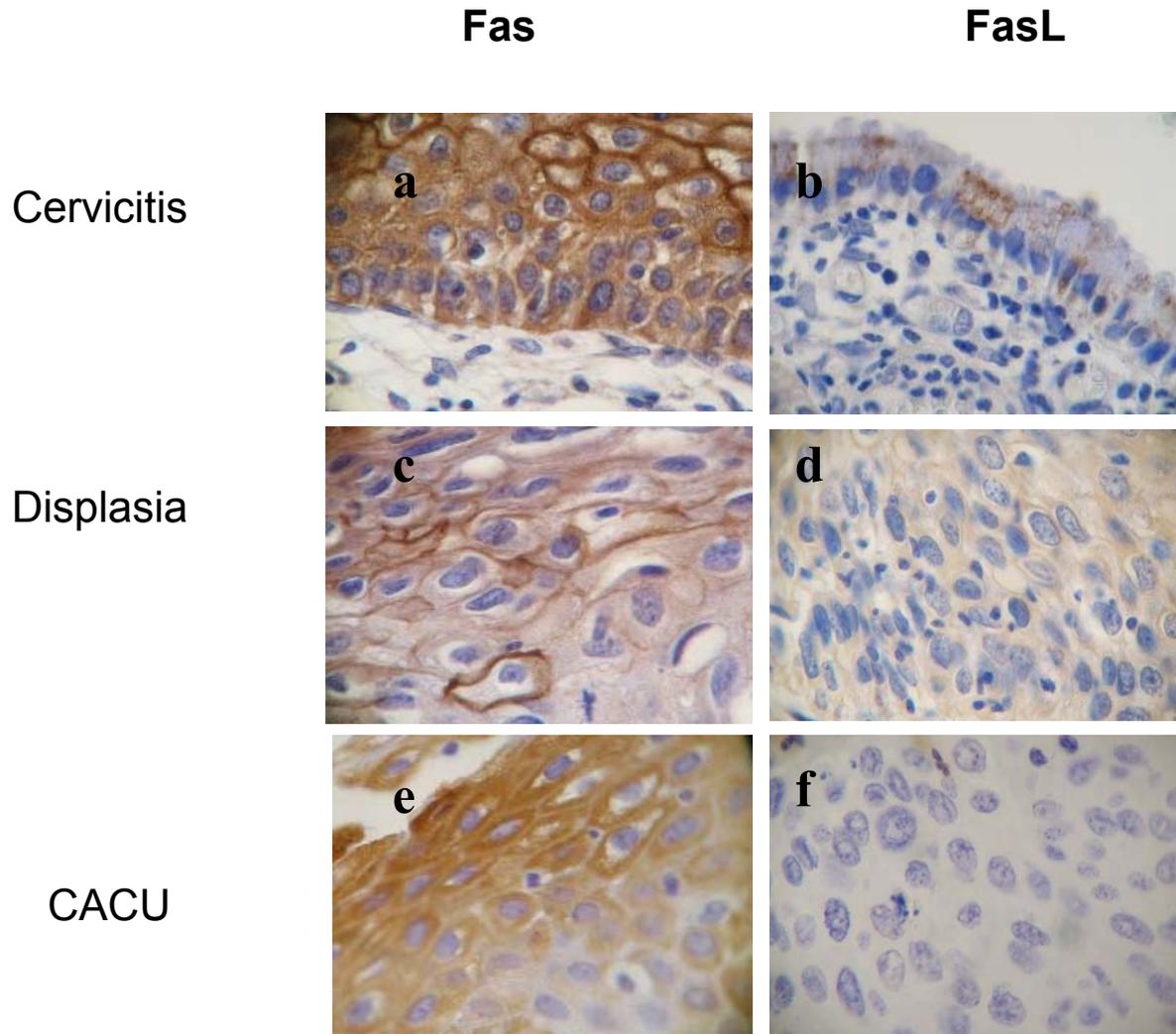
## Hallazgos inmunohistoquímicos de CD1a y



Positividad a CD1a (a, c y e) y a L1 (b, d y f), marcaje citoplásmico y membranas. Nótese la menor intensidad de la reacción en CACU.

---

**Figura 2**  
**Hallazgos inmunohistoquímicos de Fas y FasL**

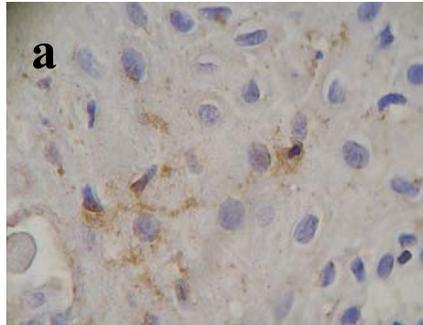


A la izquierda expresión de Fas en cervicitis, displasia y CACU. A la derecha expresión de FasL nótese la ausencia de expresión de FasL en CACU. (100X).

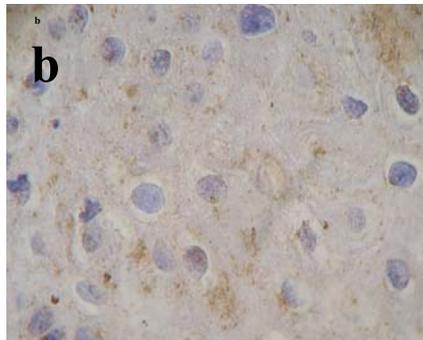
**Figura 3**  
**Hallazgos inmunohistoquímicos de caspasa 3 activa**

**Caspasa 3 activa**

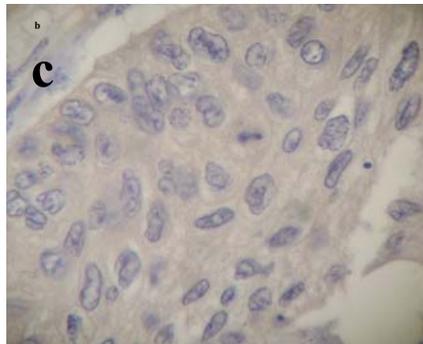
**Cervicitis**



**Displasia**

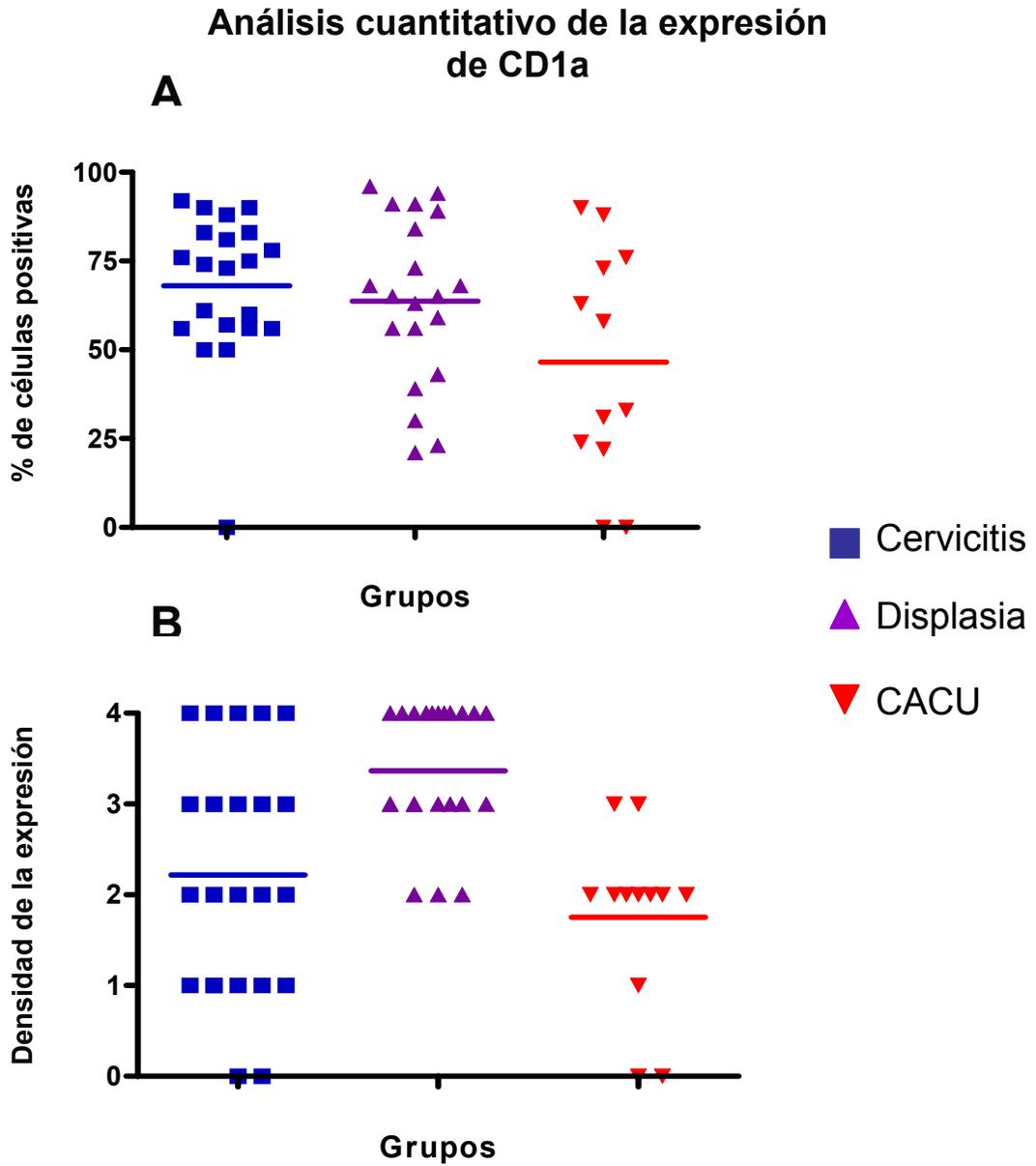


**CACU**



Expresión de caspasa-3 activa, muestras positivas de cervicitis y displasia y negativa de CACU; la positividad se observa en el citoplasma de las células. 100X.

Figura 4

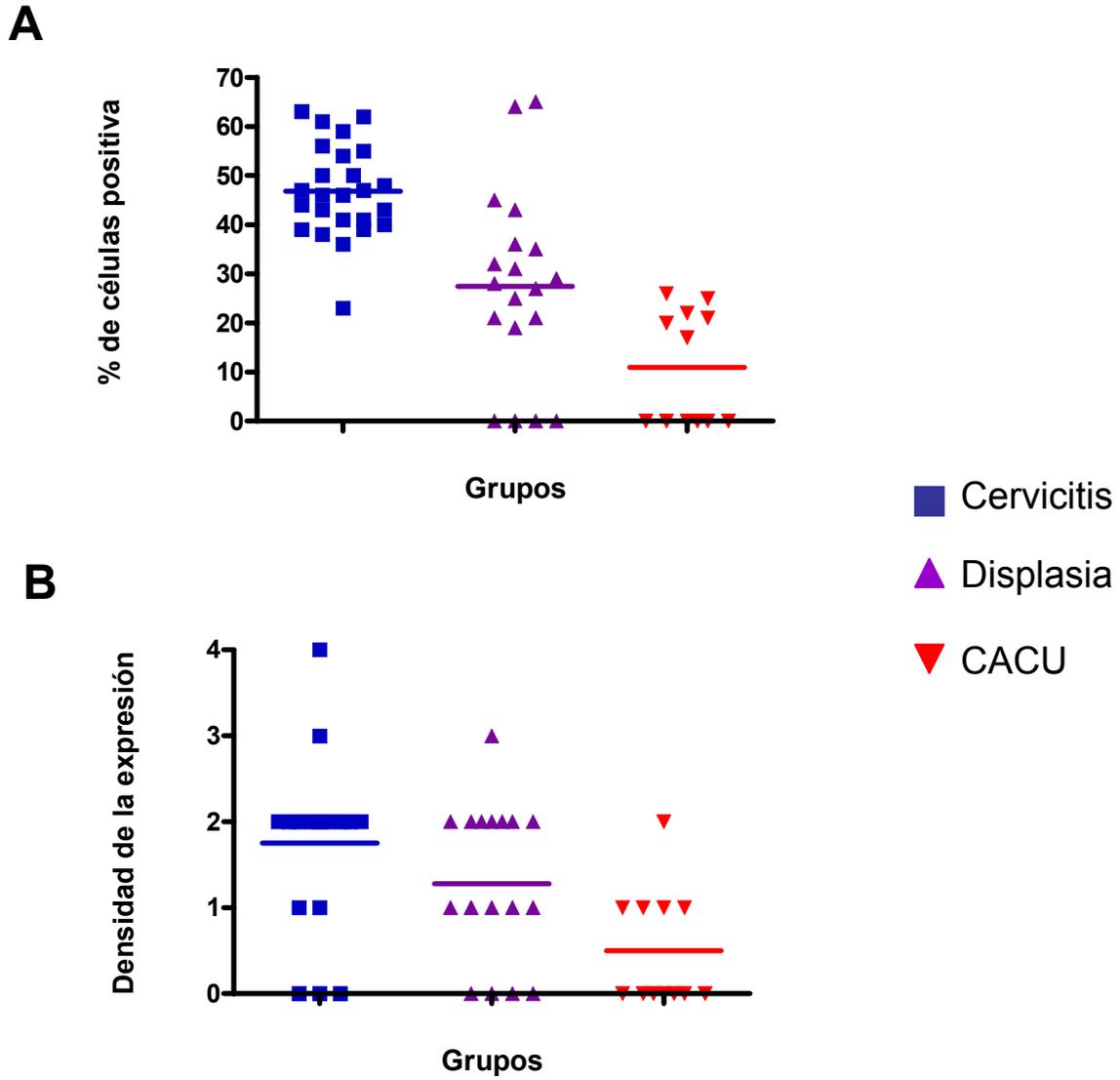


Número de células positivas (A) y la densidad de la expresión (B) para CD1a. Cada punto representa la media del número de células o la densidad de la expresión por 5 campos analizados. Las barras horizontales representan la media de cada grupo. Se observa una disminución en el número de células positivas para CD1a en el grupo de CACU, no es significativa ( $p = 0.0880$ ). La disminución en densidad de la expresión en el grupo de CACU si es estadísticamente significativa ( $p = 0.0001$ ).





**Figura 7**  
**Análisis cuantitativo de la expresión de FasL**



Número de células positivas (A) y densidad de la expresión (B) para FasL en las diferentes patologías del cérvix estudiadas. Cada punto representa la media 5 campos analizados (x 400 aumentos). Las barras horizontales representa la media de cada grupo. Se observa disminución en el número de células positivas en el grupo de CACU ( $p= 0.0001$ ), como en la densidad de la expresión ( $p= 0.0014$ ).



## DISCUSION.

Comúnmente CD1a es utilizado como marcador de células dendríticas (DC's), tanto *in vivo* como *in vitro*, y es altamente expresado en DC's maduras e inmaduras. Aunque no es expresada exclusivamente en estas células, para identificarlas pueden utilizarse dobles marcajes con MHC clase II o langerina o también por su morfología clásica. La densidad de esta molécula en DC's en tumores humanos ha sido asociada con mayor supervivencia y tanto la densidad como la actividad de CD1a en las DC's se ha relacionado de manera positiva con mejoría clínica en pacientes con cáncer de tiroides, colon, pulmón, próstata, vejiga, mama y de la cavidad oral (48). Sin embargo, este es el primer reporte de la expresión de CD1a en pacientes con CACU, comparado con otras patologías del cérvix. En este estudio se comparó la densidad de la expresión de este marcador de DC's en muestras de pacientes con CACU y con cervicitis y displasia, con la finalidad de establecer si existe asociación con la malignidad de la lesión.

Los resultados mostraron que existe relación entre la malignidad y disminución de la densidad de la expresión de CD1a en DC's (figura 1 y 4). Al respecto como ya se mencionó existen reportes de una asociación directa entre la densidad de CD1a en DC's y la supervivencia y la mejoría clínica de pacientes con diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo en pacientes con cáncer de ovario se encontró relación directa con mejor evolución clínica y la densidad alta de CD1a en pacientes que también coincide con una evolución favorable (58). En caso de carcinoma de células escamosas de la lengua se encontró una asociación directa con la mejoría general y supervivencia sin enfermedad (59). Sin embargo, en cáncer de mama no se encontró asociación significativa de supervivencia post-cirugía a 5 años (60).

Es importante señalar que en el presente estudio los resultados del análisis estadístico de la expresión de CD1a no muestra diferencias significativas en el número de células positivas para CD1a con características de DC's, entre los grupos de CACU, displasia y cervicitis, en tanto que si existe disminución significativa de la densidad de la expresión de esta molécula en el grupo de CACU , en relación con los otros dos grupos. (figura 1 y figura 4B). Lo cual sugiere una disminución de respuesta inmunitaria del huésped, ya que la función de CD1a es presentar antígenos no proteico a los linfocitos T o células NK. Así, la disminución de la expresión de esta proteína en las DC's puede limitar el reconocimiento del antígeno y por lo tanto la activación de dichas células, las cuales participan de manera muy importante en la eliminación de células tumorales (61). Aunque no está claro el mecanismo de disminución de la expresión de CD1a en las DC's en los tumores, se sabe que las citocina, los gangliosidos y otros factores del microambiente pueden inducirlo. En estudios donde utilizaron células tumorales de melanoma, colon y mama, se logró inhibir la expresión de CD1a, agregando sobrenadantes derivados de cultivos de células tumorales (62).

La búsqueda de la expresión de proteína L1 en este estudio, se utilizó como un indicador de la infección por VPH que ha sido ampliamente utilizado por otros autores (63). El anticuerpo empleado reconoce la proteína L1 del VPH-16 y tal vez del VPH-33, pero no reconoce otro subtipo, lo que permitiría además de detectar la infección por el VPH, determina el subtipo más común en la población estudiada. Como muestran los resultados, la mayoría de las muestras (más del 85%) fue positiva al anticuerpo L1 de VPH-16 (figura 1 y figura 8), lo que es consistente con los reportado por otros autores (66). En los resultados de la expresión de L1 existe otro hallazgo interesante: el número de células positivas no es significativamente diferente entre los tres grupos estudiados (figura 8A). Sin embargo, la densidad de la expresión de L1 si fue significativamente menor en CACU (figura 8B). Esto es consistente

con el hecho de que cuando el VPH se integra al genoma de la célula huésped, como un mecanismo que la transforma en maligna, no se requiere de la formación de más viriones, por lo que se dejan de expresar proteínas de la cápside viral entre otras (11;28). La leve presencia de L1 que se encuentra en las muestras de CACU, sugiere que se deba a residuos de esta proteína que fueron expresados antes de la integración del virus al genoma.

Por otro lado, en el presente trabajo se estudió la expresión de proteínas relacionadas con la vía extrínseca de la apoptosis (Fas y FasL) y de caspasas-3 activa como marcador de la inducción de apoptosis. El propósito fue investigar la relación entre el tipo de lesión del cérvix y la apoptosis, que pudiera utilizarse como marcador de pronóstico para CACU.

Al respecto, se sabe que la inhibición de la apoptosis es uno de los principales mecanismos por los que las células normales se transforman en tumorales. Una de las principales vías de inducción de apoptosis es la extrínseca (tipo I), en la cual participan receptores de membrana (receptores de muerte), como Fas,  $TNF\alpha$  y DR8/DR4. Cuando sus respectivos ligandos (ligandos de muerte) FasL, RTNF1/2 o TRAIL se unen a dichos receptores, se inicia el proceso de apoptosis mediante esta vía debido a la subsecuente formación del complejo de muerte, la activación de la cascada de caspasas y la degradación del ADN. Fas y su ligando son de suma importancia en la inducción de la apoptosis de células que participan en la respuesta inmunitaria. Por lo que, en este trabajo se estudió la expresión de estas dos moléculas en cervicitis, displasia y CACU; y también la asociación de dichas moléculas con la malignidad. Los resultados mostraron que existen diferencias significativas entre CACU y las otras dos patologías. El número de células positivas para Fas (Figura 6A) es menor en CACU. Sin embargo, la densidad de la expresión no es significativamente diferente (figura 6B).

Para FasL se observó una marcada inhibición en el número de células positivas y la densidad de la expresión en el grupo de CACU (figura 7A y 7B). Recientes estudios donde utilizan líneas celulares positivas a VPH de alto riesgo, han demostrado que existe una correlación directa entre la expresión de Fas y la sensibilidad a la apoptosis mediada por Fas-FasL (65). Por otro lado se ha demostrado que la proteína E5 del VPH-16 induce una inhibición de la apoptosis mediada por FasL (66). En otro estudio, se demostró que la proteína E6 del VPH-16 se une al dominio de muerte e induce su degradación, lo cual inhibe la apoptosis mediada por Fas (67). Sin embargo, no se encontró en la literatura reporte acerca de la inhibición de la expresión de FasL, pero resulta lógico pensar que alguna proteína de VPH induzca la inhibición de la expresión de FasL como un mecanismo más para evadir de la apoptosis. Lo cual es consistente con los resultados de la medición de apoptosis mediante la detección de caspasa-3 activa, donde se muestra que la apoptosis esta disminuida de manera significativa en CACU, cuando se compara con cervicitis y displasia (figura 8). Lo cual indica nuevamente que el VPH evade los mecanismos de apoptosis y esto está relacionado directamente con su potencial oncogénico.

La presencia de disminución en la expresión de la molécula marcadora de células dendríticas en los casos de malignidad corresponde a la media del grupo estudiado, pero en algunos casos la expresión fue nula, variación que sugiere que exista relación entre esa expresión y la evolución de la enfermedad como en los reportes de otros cánceres (58,59). En los casos estudiados aquí, deberá investigarse la evolución clínica y sobrevida de cada paciente, para establecer una relación que permita utilizar esta estrategia, como medio pronóstico o de monitoreo en el manejo de enfermos con este tipo de cáncer. Por otro lado, el hallazgo de disminución en los marcadores de apoptosis detectados, paralela con el de actividad de células dendríticas, plantea la duda sobre si la disminución de la respuesta inmunitaria

consecuencia de esa disminución y de la apoptosis, consecuencia de la pérdida de controles que mantienen la homeostasis, tienen relación en sus mecanismos de aparición y evolución, o suceden como procesos independientes y simplemente coincidentes.

## **CONCLUSIONES.**

-Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de la existencia de diferencias en la expresión de las moléculas detectadas, en los casos de lesiones benignas y malignas del cuello uterino.

-Las diferencias se manifiestan en todos los casos, en la densidad de las moléculas en cada célula, aunque no en todos los casos, en el número de células positivas para cada proteína.

-Las moléculas marcadoras de células dendríticas, del proceso de apoptosis y de la presencia de VPH mostraron disminución en su expresión en los casos de CACU

-Los datos apoyan la inhibición de la respuesta inmunitaria, el bloqueo del proceso de apoptosis y la integración del genoma viral al celular, en los casos de CACU.

- La infección por VPH del tipo 16 (tal vez tipo 33) está presente en lesiones benignas y malignas. En la muestra estudiada alcanzó el 85% de positividad para este tipo de VPH de todos los casos.

## **PERSPECTIVAS.**

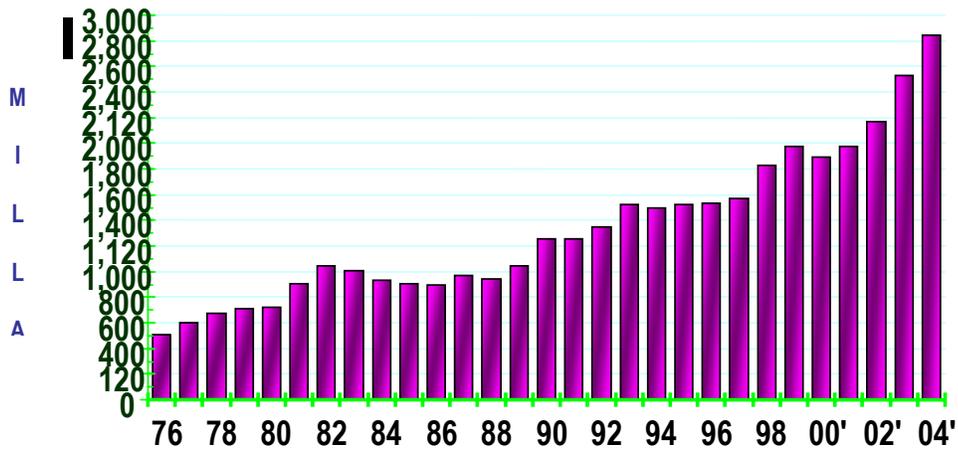
- Realizar estudio prospectivo sobre la evolución clínica de las lesiones de cuello uterino, para establecer o desechar la calidad de elementos de diagnóstico y pronóstico, de la disminución de las moléculas marcadoras detectadas.
- Ampliar la muestra de detección las moléculas estudiadas utilizando tecnología de microarreglo de tejidos para disminuir variables y establecer parámetros de pronóstico y diagnóstico de CACU..
- Realizar la búsqueda de otros marcadores de apoptosis mediante la técnica de microarreglo de tejidos.
- Realizar estudios de RT-PCR para la identificación de VPH-16, VHP-18 y VPH-31 y determinar su frecuencia.

APENDICES

Apendice No. 1



**Número de detecciones de Cáncer  
Cérvico Uterino. IMSS 1976-2004**

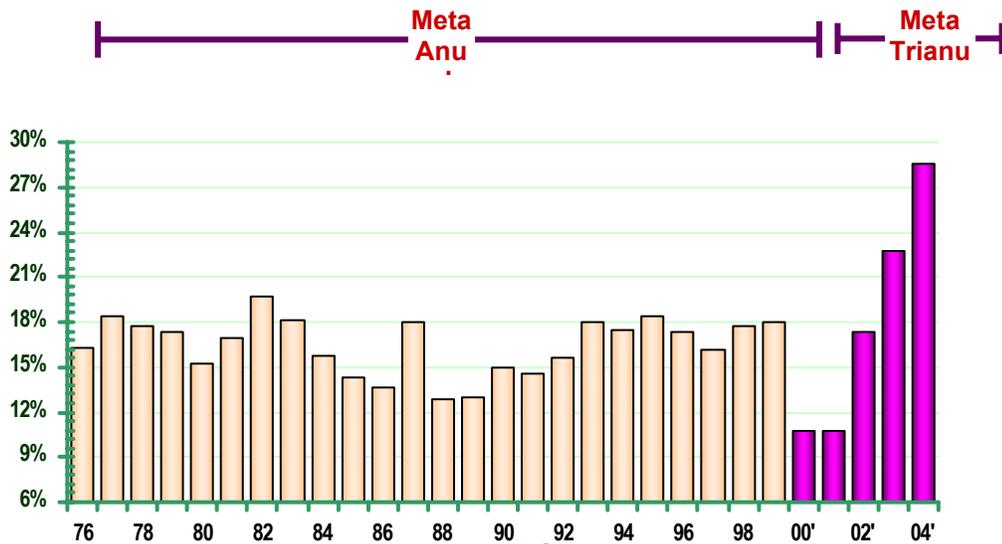


Fuente: Coordinación de Programas Integrados de Salud

## Apendice No.2



### Cobertura de detección del Cáncer Cérvico Uterino. IMSS 1976- 2004



Fuente: Coordinación de Programas Integrados de Salud

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Franceschi S. The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res* 2005;166:277-297.
- (2) Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(3):252-268.
- (3) Lazcano-Ponce EC, Alonso dR, Lopez-Carrillo L, Najera-Aguilar P, Avila-Ceniceros R, Escandon-Romero C et al. Validity and reproducibility of cytologic diagnosis in a sample of cervical cancer screening centers in Mexico. *Acta Cytol* 1997; 41(2):277-284.
- (4) Tyring SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43(1 Pt 2):S18-S26.
- (5) Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327(10):1272-1280.
- (6) Goodman A. Role of routine human papillomavirus subtyping in cervical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000;12(1):11-14.
- (7) Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* 2002; 78(718):225-228.
- (8) Miller AB, Chamberlain J, Day NE, Hakama M, Prorok PC. Report on a Workshop of the UICC Project on Evaluation of Screening for Cancer. *Int J Cancer* 1190; 46(5):761-769.
- (9) Richart RM. Colpomicoscopic studies of the distribution of dysplasia and carcinoma *in situ* on the exposed portion of the human uterine cervix. *Cancer* 1965; 18:950-954.
- (10) Kaufman RH, Adam E, Vonka V. Human papillomavirus infection and cervical carcinoma. *Clin Obstet Gynecol* 2000; 43(2):363-380.
- (11) Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1):1-7.
- (12) Alani RM, Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* 1997; 16(1):330-337.

- (13) Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, de Schipper FA, Snijders PJ et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59(7):543-553.
- (14) Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(2):467-475.
- (14) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1):12-19.
- (15) Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(5):1157-1164.
- (16) Hakama M, Chamberlain J, Day NE, Miller AB, Prorok PC. Evaluation of screening programmes for gynaecological cancer. *Br J Cancer* 1985; 52(4):669-673.
- (17) Damasus-Awatai G, Freeman-Wang T. Human papilloma virus and cervical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003;15(6):473-477.
- (18) Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995; 141(7):680-689.
- (19) Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 132(23):810-819.
- (20) Nasiell K, Roger V, Nasiell M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 1986; 67(5):665-669.
- (21) Aldrich T, Becker D, Garcia SG, Lara D. Mexican physicians' knowledge and attitudes about the human papillomavirus and cervical cancer: a national survey. *Sex Transm Infect* 2005; 81(2):135-141.
- (23) Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 75(13):11451-11460.

- (24) Thomas M, Glaunsinger B, Pim D, Javier R, Banks L. HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene* 2001; 20(39):5431-5439.
- (25) McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 2001; 82(1):15-33.
- (26) DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E8 proteins. *Oncogene* 2001; 20(54):7866-7873.
- (27) Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248(4981):76-79.
- (28) Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; 75(3):495-505.
- (29) Mantovani F, Banks L. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene* 1999; 18(14):3309-3315.
- (30) Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem* 1998; 273(11):6439-6445.
- (31) Aguilar-Lemarroy A, Kirchhoff S, Whitaker N, Gariglio P, zur HH, Krammer PH et al. Differential sensitivity of human papillomavirus type 16(+) and type 18(+) cervical carcinoma cells to CD95-mediated apoptosis. *Int J Cancer* 2001; 93(6):823-831.
- (32) Grm HS, Massimi P, Gammoh N, Banks L. Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene* 2005; 24(33):519-574.
- (33) Liu Y, You H, Chiriva-Internati M, Korourian S, Lowery CL, Carey MJ et al. Display of complete life cycle of human papillomavirus type 7 in cultured placental trophoblasts. *Virology* 2001; 290(1):99-105.
- (34) Chen XS, Casini G, Harrison SC, Garcea RL. Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol* 2001; 307(1):173-182.

- (35) De Bruijn ML, Greenstone HL, Vermeulen H, Melief CJ, Lowy DR, Schiller JT et al. L1-specific protection from tumor challenge elicited by HPV16 virus-like particles. *Virology* 1998; 250(2):371-376.
- (36) Zur Hausen H. Papillomavirus and p53. *Nature* 1998;393(2):217-226.
- (37) Huibregtse JM, Beaudenon SL. Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Semin Cancer Biol* 1996; 7(6):317-326.
- (38) Harris TG, Kulasingam SL, Kiviat NB, Mao C, Agoff SN, Feng Q et al. Cigarette smoking, oncogenic human papillomavirus, Ki-67 antigen, and cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Epidemiol* 2004; 159(9):834-842.
- (39) Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1):1-17.
- (40) Abbas K.Abul, Litchman H.Andrew, Pober S.Jordan. *Cellular and Molecular Immunology*. Second ed. Philadelphia: 2003.pp 7-28.
- (41) Cao X, Sugita M, Van Der WN, Lai J, Rogers RA, Peters PJ et al. CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation. *J Immunol* 2002; 169(9):4770-4777.
- (42) Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* 2004; 113(5):701-707.
- (43) Hubert P, van den BF, Giannini SL, Franzen-Detrooz E, Boniver J, Delvenne P. Colonization of in vitro-formed cervical human papillomavirus- associated (pre)neoplastic lesions with dendritic cells: role of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Am J Pathol* 1999; 154(3):775-784.
- (44) DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, DiMaio D. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol* 2003; 77(2):1551-1563.
- (45) Coventry B, Heinzl S. CD1a in human cancers: a new role for an old molecule. *Trends Immunol* 2004; 25(5):242-248.
- (46) Pulendran B, Banchereau J, Maraskovsky E, Maliszewski C. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 2001;22(1):41-47.

- (47) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(66):245-252.
- (48) Poindexter NJ, Sahin A, Hunt KK, Grimm EA. Analysis of dendritic cells in tumor-free and tumor-containing sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004; 6(4):R408-R423.
- (49) Andersen MH, Reker S, Kvistborg P, Becker JC, Straten PT. Spontaneous Immunity against Bcl-xL in Cancer Patients. *J Immunol* 2005; 175(4):2709-2714.
- (50) Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9):3155-3162.
- (51) Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; 88(2):386-401.
- (52) Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000; 404(6773):99-103.
- (53) Sanchez-Perez AM, Soriano S, Clarke AR, Gaston K. Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. *J Gen Virol* 1997; 78 ( Pt 11):3009-3018.
- (54) Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58(23):5315-5320.
- (55) Singh A, Sharma H, Salhan S, Gupta SD, Bhatla N, Jain SK et al. Evaluation of expression of apoptosis-related proteins and their correlation with HPV, telomerase activity, and apoptotic index in cervical cancer. *Pathobiology* 2004; 71(6):314-322.
- (56) Granger MP, Wright WE, Shay JW. Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 41(1):29-40.
- (57) Reddy VG, Khanna N, Jain SK, Das BC, Singh N. Telomerase-A molecular marker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11(2):100-106.

- (58) Goldman SA, Baker E, Weyant RJ, Clarke MR, Myers JN, Lotze MT. Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124(6):641-646.
- (59) Eisenthal A, Polyvkin N, Bramante-Schreiber L, Misonznik F, Hassner A, Lifschitz-Mercer B. Expression of dendritic cells in ovarian tumors correlates with clinical outcome in patients with ovarian cancer. *Hum Pathol* 2001; 32(8):803-807.
- (60) Coventry BJ, Morton J. CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89(3):533-538.
- (61) Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol Cell Biol* 2000; 78(2):91-102.
- (62) Sombroek CC, Stam AG, Masterson AJ, Lougheed SM, Schakel MJ, Meijer CJ et al. Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2002; 168(9):4333-4343.
- (63) Melsheimer P, Kaul S, Dobeck S, Bastert G. Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. *Acta Cytol* 2003; 47(2):124-128.
- (64) zur HH. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288(2):F55-F78.
- (65) Hougardy BM, van der Zee AG, van den Heuvel FA, Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in high-risk HPV-positive human cervical cancer cells: relationship with Fas, caspase-8, and Bid. *Gynecol Oncol* 2005; 97(2):353-364.
- (66) Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs T. *J Virol* 2002; 76(23):12162-12172.
- (67) Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(24):25729-25744.