

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Secretaría de Investigación y Posgrado



ESCUELA  
NACIONAL DE  
CIENCIAS  
BIOLÓGICAS



## Sección de Estudios de Posgrado e Investigación "Programa de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas"

"DETERMINACIÓN DE VPH, p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 EN LESIONES  
PRECURSORAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO DE  
RESIDENTES DE LA CIUDAD DE MÉXICO".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
QUIMICOBIOLOGICAS

P R E S E N T A

**QFB. ADALBERTO CARLOS DÍAZ VÁZQUEZ**

**DIRECTORAS:  
DRA. ELBA REYES MALDONADO  
M EN C. MARIA LEONILA DE LA VEGA BRAVO**

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2008

---

## **Dedico este trabajo con amor y gratitud:**

A mis padres **Sr. José Díaz y Sra. Ángela Vázquez** por darme la vida, regalarme su amor y por apoyarme incondicionalmente en todo momento en mis decisiones y a cada paso que he dado en mi vida.

*A mis hermanos **Guadalupe y Ángel**, mis cuñados **Gil y Miriam**, y mis sobrinos **Karen, Ulises, Julissa y Michelle**, por ser mi motivación.*

---

Esta tesis se realizó en el laboratorio de citología de la **Escuela Nacional de Ciencias Biológicas** bajo la dirección de la **Dra. Elba Reyes Maldonado** y la **M. en C. María Leonila De la Vega Bravo**. El autor fue becario **CONACYT** en el periodo comprendido de agosto de 2006 a julio de 2008.

---

## Agradecimientos:

A **Dios** por darme la vida y permitirme llegar a este día.

A la **Dra. Elba Reyes Maldonado** por la confianza que depositó en mí, por su paciencia y por aportar su experiencia en la dirección de este trabajo.

A la **M. en C. María Leonila De la Vega Bravo** quien con su forma de ser ha hecho más fácil mi paso por estas aulas, y con quien estaré eternamente agradecido por todas las muestras de amistad que me ha regalado.

A mi tercer hermano **M. en C. José Erasmo Vázquez Franco** por su amistad, apoyo y por estar conmigo en las buenas, en las malas y en la peores; y al **Sr. Erasmo Vázquez (Gordito)** por estar siempre pendiente de mí y por ser mi papá chilango.

A mi novia **Erika**: una vez más gracias amor por estar conmigo hoy, por tu paciencia, apoyo, comprensión y por ser mi motivación.

A mis amigos **Edder, Marco, Robe, Beto, Lucio, Chus, Pedro, Chabela, Coco, Susy, Maruri, Miguel, Pepe, Irma, Don Gaby et al.** por su apoyo, amistad sincera y por estar conmigo en todo momento.

A mis tíos **Miguel Díaz, Hortencia Argueta, Martín Román, Ángeles Díaz, Reyna, Nereida y Clara Ballinas, Carlos Soto**, por estar siempre pendientes de mí y por todo el apoyo que me han brindado

A las familias **Urbina Penagos y Jiménez de la Cruz** por su valioso apoyo.

A mis abuelos **Isabel, José<sup>†</sup> y Ofelia<sup>†</sup>** porque sus consejos y su cariño.

Al **Dr. Héctor Javier Sánchez Pérez** por su amistad y por sus consejos en la realización de este trabajo.

A la **Dra. Ruth Lezama Palacios** por sus consejos y amistad.

Al **M. en C. Víctor Gabriel Hernández Chávez** por su amistad, consejos y paciencia en la enseñanza de la citología

A la **M. en C. Guadalupe Rendón** por su amistad y por proporcionarme el material biológico para el trabajo.

---

---

## ÍNDICE

	<b>ABREVIATURAS</b>	<b>vii</b>
	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>viii</b>
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>ix</b>
	<b>RESUMEN</b>	<b>x</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>xi</b>
<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	Etiología del cáncer cervicouterino	1
1.2	Características generales de los papilomavirus	1
1.3	Transmisión del VPH	2
1.4	Historia natural del cáncer cervicouterino	3
1.5	Estado físico del DNA viral	3
1.6	Epidemiología del cáncer cervicouterino	7
1.7	Diagnóstico de la infección por VPH y del cáncer cervicouterino	10
1.8	Justificación	16
1.9	Hipótesis	16
1.10	Objetivo general	17
1.11	Objetivos específicos	17
<b>II</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
2.1	Tipo de estudio	18
2.2	Población de estudio	18
2.3	Material biológico	18
2.4	Criterios de inclusión	18
2.5	Criterios de exclusión y eliminación	19

---

---

2.6	Métodos	19
2.7	Diagrama de flujo	24
2.8	Análisis estadístico	25
III	RESULTADOS	26
3.1	Características generales de la población estudiada	28
3.2	Correlación entre el estado físico del DNA del VPHAR con el diagnóstico histológico	30
3.3	Correlación entre la expresión de Ki-67 con el diagnóstico histológico	33
3.4	Correlación entre la expresión de p16 <sup>INK4a</sup> con el diagnóstico histológico	35
3.5	Correlación entre la expresión de Ki-67 con el estado físico del DNA del VPHAR	38
3.6	Correlación entre la expresión de p16 <sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR	39
3.7	Expresión de Ki-67 y p16 <sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR en casos negativos a NIC	40
3.8	Expresión de Ki-67 y p16 <sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR en NIC II	41
IV	DISCUSIÓN	45
V	CONCLUSIONES	53
VI	EXPECTATIVAS	54
VII	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

---

---

## ABREVIATURAS

<b>C/CDK</b>	Complejo ciclina/cinasa dependiente de ciclina
<b>CaCu</b>	Cáncer cervicouterino
<b>cDNA</b>	DNA cíclico
<b>DIU</b>	Dispositivo intrauterino
<b>H-E</b>	Hematoxilina - eosina
<b>HIS</b>	Hibridación <i>in situ</i>
<b>IC/CDK</b>	Inhibidor del complejo ciclina/cinasa dependiente de ciclina
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>INK</b>	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas
<b>ITS</b>	Infecciones de transmisión sexual
<b>IVSA</b>	Inicio de vida sexual activa
<b>Ki-67</b>	Proteína Ki-67
<b>NF-kB</b>	Factor de transcripción Kappa B
<b>NIC</b>	Neoplasia intraepitelial cervical
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierta, por sus siglas en inglés
<b>p16<sup>INK4a</sup></b>	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PB</b>	Parabasales
<b>PCNA</b>	Antígeno de proliferación celular nuclear
<b>PDZ</b>	Dominio denominado así por las tres proteínas en las que fue identificado por primera vez: PSD-95, DLG en <i>Drosophila</i> y una proteína llamada ZO-1.
<b>pRB</b>	Proteína del retinoblastoma
<b>PS</b>	Parejas sexuales
<b>Ran</b>	Proteína monomérica de unión a GTP, que interviene en el transporte de macromoléculas a través de la membrana nuclear
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>TBST</b>	Solución amortiguadora con tris y tween 20
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano
<b>VPHAR</b>	Virus del papiloma humano de alto riesgo
<b>X<sup>2</sup></b>	Chi cuadrada

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

1	Tasas de incidencia y mortalidad por cada 100.000 mujeres en América Latina y el Caribe 2000	8
2	Tasa de incidencia de cáncer cervicouterino en el Distrito Federal en el periodo 2001-2006	9
3	Algunas proteínas que interactúan con Ki-67 y sus especificaciones	12
4	Resultados de la confirmación del diagnóstico histológico	26
5	Distribución de los casos por grupo de edad y diagnóstico histológico.	28
6	Distribución de casos por factores de riesgo primarios y por diagnóstico histológico	29
7	Distribución de casos por factores de riesgo secundarios y por diagnóstico histológico	30
8	Correlación entre la expresión del DNA del VPHAR con el diagnóstico histológico	31
9	Correlación entre la expresión de Ki-67 con el diagnóstico histológico	33
10	Correlación entre la localización de la expresión de Ki-67 con el diagnóstico histológico	35
11	Correlación entre la expresión de p16 <sup>INK4a</sup> con el diagnóstico histológico.	36
12	Correlación entre la localización de la expresión de p16 <sup>INK4a</sup> con el diagnóstico histológico	38
13	Correlación entre la expresión de Ki-67 con el estado físico del DNA del VPH de alto riesgo	39
14	Correlación entre la expresión de p16 <sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPH de alto riesgo	40
15	Correlación entre la expresión de Ki-67 y p16 <sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPH de alto riesgo en casos sin NIC	41

---

16	Correlación entre la expresión de p16 <sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPH de alto riesgo en NIC II	42
17	Distribución de los resultados por tipo de VPH, patrón de expresión de Ki-67 y diagnóstico histológico	43
18	Distribución de los resultados por tipo de VPH, patrón de expresión de p16 <sup>INK4a</sup> y diagnóstico histológico	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

1	Infección por VPH y progresión a cáncer cervicouterino	4
2	Mecanismo de acción de las proteínas E6 y E7 de los tipos alto riesgo sobre proteínas celulares	6
3	Incidencia de cáncer cervicouterino en el Distrito Federal en el periodo 2001 – 2006	9
4	Fundamento de la técnica inmunohistoquímica	11
5	Imágenes representativas de los diferentes tipos de lesiones analizadas	27
6	Imágenes representativas de los patrones de expresión del estado físico del DNA del VPH por HIS	32
7	Expresión inmunohistoquímica de Ki-67	34
8	Expresión inmunohistoquímica de p16 <sup>INK4a</sup>	37

---

---

## RESUMEN

En México, el 38.5% de los tumores malignos de la mujer corresponden a cáncer cervicouterino (CaCu), siendo la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres mayores de 25 años. Se ha demostrado una relación entre el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPHAR) con la carcinogénesis cervical, ya que su integración en el genoma celular, permite la sobreexpresión de sus proteínas E6 y E7 que interaccionan con p53 y pRb, lo que desregula el ciclo celular e induce proliferación celular y sobreexpresión del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina p16<sup>INK4a</sup> y de la proteína nuclear Ki-67. Con la finalidad de relacionar la presencia y estado físico del DNA del VPH con la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 en lesiones premalignas de mujeres residentes de la ciudad de México, se llevó a cabo un estudio transversal comparativo en 209 biopsias y/o conos de cuello uterino de mujeres residentes del Distrito Federal, que por valoración citológica presentaron algún grado de lesión premaligna (NIC) durante el 2005. Las muestras fueron fijadas en formol neutro al 10%, procesadas por la técnica histológica de inclusión en parafina obteniendo cortes de 5µm, los cuales fueron procesados por la técnica de H-E para realizar el diagnóstico histológico clasificando los casos como neoplasia intraepitelial cervical I (NIC I) (n=51), NIC II (n=49), y NIC III (n=92), además de un grupo control (negativo a NIC) (n=17). A partir de este material se realizó la técnica inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación *in situ* de p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67, y la hibridación *in situ* (HIS) para detectar el estado físico del DNA del VPH ya sea episomal (expresión difusa) o integrado (expresión puntiforme). En la población de estudio la edad osciló entre 15 a 67 años. El rango de edad en el que se presentó la mayor incidencia de NICs fue en el de 21 a 40 años, y se asoció significativamente con el IVSA antes de los 18 años. La infección por VPHAR se presentó en el 81.9% de los casos de lesiones cervicales y predominó el estado episomal (50.7%) del genoma viral. El estado físico del DNA del VPHAR se asoció con la progresión de las NICs, ya que el patrón de expresión puntiforme se relacionó con mayor riesgo de progresión. La infección por VPHBR se presentó en el 40% de los casos de las lesiones cervicales estudiadas y ésta fue principalmente como co-infección con VPHAR. La determinación de la expresión y localización de proteínas relacionadas con la regulación del ciclo y proliferación celular como lo son p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67, son útiles como marcadores del grado y progresión de NIC, asociándose la expresión difusa de p16<sup>INK4a</sup> y alta de Ki-67 con la progresión de la lesión. Así mismo, la integración del VPHAR se asoció significativamente con la expresión alta de Ki-67 y difusa de p16<sup>INK4a</sup>.

---

---

## ABSTRACT

In Mexico, cervical cancer (CC) accounts for 38.5% of malignant tumors in women, and it is the second cause of death in women over 25 years of age. The association between the high risk human papillomavirus (HRHPV) with cervical carcinogenesis, due to viral genome integration in the host cell genome has been well established. E6 and E7 proteins are overexpressed, inducing interaction with p53 and pRb which disrupts the cell cycle leading to proliferation and overexpression of p16<sup>INK4a</sup> (cyclin-dependent kinase) and Ki-67 (nuclear protein). Our purpose was to establish the association between the presence and physical status of the VPH genome with the expression of p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67 in premalignant lesions found among the female population in Mexico City. Our study design is comparative cross-sectional using 209 biopsies and/or cones of the uterine cervix of Mexico City residents. All samples showed a certain degree of premalignant lesion (CIN, cervical intraepithelial neoplasia) by cytological evaluation. The samples were fixed in 10% buffered formalin and paraffin embedded, sectioned to 5µm and subsequently stained by H-E stain for histological diagnosis. The cases were classified as CIN I (n=51), CIN II (n=49) and CIN III (n=92), and a control group (CIN negative) (n=17). Immunohistochemistry (IHC) was used for *in situ* determination of p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67 proteins, and *in situ* hybridization (ISH) was used to detect the condition of the viral DNA of either form, episomal (diffuse expression) or integrated (punctate expression). The population studied had an age range of 15 to 67 years. The age with the greatest incidence of CIN was 21 to 40, having a significant association with the initiation of an active sexual life (ASL) before 18. The HRHPV infection was shown in 81.9% of the cervical lesions, the viral genome was predominantly episomal (50.7%). The HRHPV DNA status was associated with progression of the CIN lesions, and the punctate pattern was related with higher risk of progression. Infection by LRHPV was shown in 40% of the cervical lesions, mainly as a co-infection with HRHPV. Determining the expression and location of proteins related to cycle regulation and cell proliferation such as p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67, may be useful as a marker of the grade and progression of CIN, associating the diffuse expression of p16<sup>INK4a</sup> and high expression of Ki-67 with the progression of the lesion. Also, the HRHPV was found to be significantly associated with high expression of Ki-67 and diffuse expression of p16<sup>INK4a</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) se presenta por la progresión de una serie de cambios en las células que cubren las paredes del cuello uterino (la porción inferior del útero que termina en el canal vaginal). Estas células inicialmente son normales y gradualmente se convierten en premalignas, manifestándose como lesiones en la pared de dicho cuello uterino. Eventualmente pueden cambiar a células malignas; sin embargo, en más del 50% de las mujeres con lesiones premalignas, las células no desarrollan neoplasia maligna. Con frecuencia, en sus etapas iniciales el CaCu no muestra síntomas por lo que a menudo no se detecta hasta que está en estado avanzado (CNCC 2004).

### 1.1 Etiología del cáncer cervicouterino

Se ha demostrado una función causal necesaria, pero no suficiente, de ciertos tipos genéticos de papilomavirus humanos (VPH) en la carcinogénesis del carcinoma cervicouterino. Asimismo, se han realizado diferentes estudios que han permitido establecer algunos tipos de cofactores predisponentes para el desarrollo de este cáncer, como la edad de inicio de las relaciones sexuales, promiscuidad, paridad, infecciones bacterianas, infecciones virales, estímulos hormonales, estado inmunológico, higiene, alteración del pH local y mala nutrición entre otros (Tamayo et al. 2001; León y Bosques 2005; Larizgoitia 2001; Castañeda et al. 1998).

### 1.2 Características generales de los papilomavirus

Los papilomavirus son un grupo de virus pequeños, de 50 a 52 nm de diámetro, que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, los cuales tienen afinidad por las células de piel y mucosas (altamente especie específicos), en las que inducen el desarrollo de lesiones proliferativas. La estructura de los papilomavirus consiste de una cápside proteica icosaédrica compuesta de 72 capsómeros y no están provistos de envoltura (Zamora 2000). El genoma está constituido por DNA de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases. La secuencia nucleotídica del genoma de los papilomavirus humanos contiene 8 marcos de lectura abierta (ORF), ubicados en una de las dos cadenas del DNA. Se han identificado ORF organizados en regiones de expresión temprana (E) que codifican para proteínas relacionadas

---

con la replicación, transcripción (E1 y E2 respectivamente), para el ensamblaje viral y la proliferación celular (E4 y E5) y para la transformación celular (E6 y E7); y en regiones de expresión tardía (L) que codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2). Existe también una región de control denominada large control region (LCR) que se encarga de regular la expresión de los genes tempranos E6 y E7 (Castañeda 2000; Zamora 2000).

Hasta el momento se han identificado alrededor de 100 tipos de VPH en humanos, de los cuales alrededor de 25 se han vinculado con la producción de lesiones genitales intraepiteliales e invasoras. Los genotipos virales de VPH se clasifican actualmente en las categorías de bajo riesgo oncogénico (BR), y alto riesgo oncogénico (AR), dependiendo de la frecuencia con que se han identificado en las lesiones benignas, de bajo grado, alto grado, y lesiones cancerosas. Se consideran en la categoría AR a los subtipos virales 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82; y en la categoría BR a los subtipos 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 (Larizgoitia 2001; Melo et al. 2003; Diestro et al. 2007).

En el ámbito mundial la prevalencia de VPH se ha registrado en 99,7% de los carcinomas cervicouterinos, en los que los tipos oncogénicos 16 y 18 se han detectado con mayor frecuencia, sin embargo, algunos estudios internacionales recientes han incluido a los otros subtipos de AR antes mencionados (Lewis 2004). La distribución geográfica es diferente para cada tipo, y resalta la presencia del VPH16 en todos los países con excepción de Indonesia (Castellanos 2003; Azúa et al. 2004).

### **1.3 Transmisión del VPH**

La infección por VPH representa una de las infecciones de transmisión sexual de mayor frecuencia en el mundo. Al parecer, la inoculación del VPH se lleva a cabo a través de microerosiones en la zona de transformación escamo columnar, que dejan expuestas las células basales del epitelio escamoso y permiten la unión entre los receptores presentes en dichas células con las proteínas de la cápside viral. Una vez que se lleva a cabo el paso anterior, el virus ingresa al citoplasma de la célula mediante interacción con proteínas transmembranales como la  $\alpha$ -integrina. El virus se establece en las células basales bajo la forma conocida como episomal (DNA no integrado), y se replica de manera discreta y coordinada con la célula hospedera (pocas unidades de genoma viral por célula) por

---

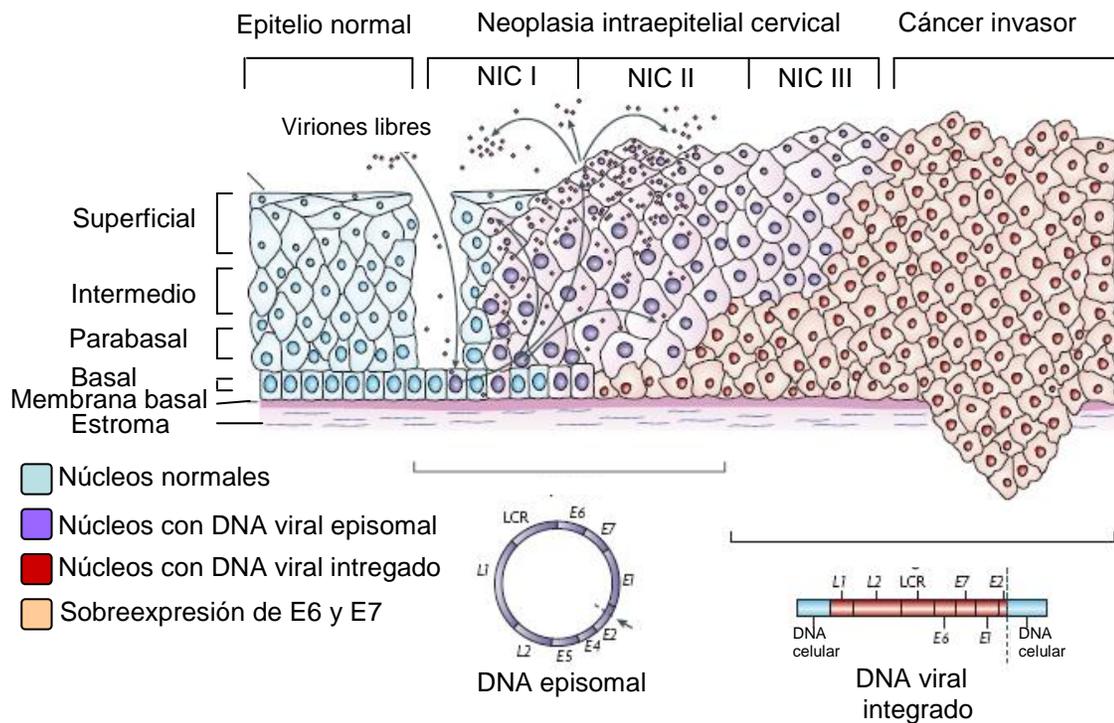
activación de genes tempranos como E1 y E2. Cuando la célula alcanza el último estrato de maduración, el genoma viral ya ha aumentado hasta miles de unidades por célula. Además de que en este último estrato, se forma la cápside por activación de los genes tardíos (L), dando lugar a viriones completos que pueden volver a infectar nuevas células basales (Figura 1) (Rivera et al. 2006).

#### **1.4 Historia natural del cáncer cervicouterino**

La historia natural de esta enfermedad implica la progresión gradual por etapas premalignas limitadas al epitelio denominadas neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) de grado I a III de acuerdo a la proporción del grosor del epitelio cervical con alteraciones morfológicas o lesiones de bajo y alto grado, según su correspondencia en el sistema Bethesda. La tasa de progresión de la NIC I se encuentra entre el 6% y el 34%, variando en relación con las distintas estrategias de detección oportuna, poblaciones en estudio, medios socioculturales y estándares de atención sanitaria implementados en cada país. Se reconoce una fase de infección aguda por VPH con una tasa de regresión espontánea de alrededor del 50 a 70% (lesión de bajo grado). La infección crónica por VPH se debe a la incorporación del DNA viral al genoma celular y el desarrollo de lesiones de alto grado que presentan una tasa de progresión a carcinoma invasor de hasta 70% (Figura 1) (Serman 2002; Woodman et al. 2007).

#### **1.5 Estado físico del DNA viral**

El DNA viral puede encontrarse en las células infectadas en forma episomal (libre del núcleo celular o extracromosomal) o integrado al DNA celular. Estos estados físicos del DNA viral determinan el tipo y grado de la lesión. En las lesiones premalignas sobretodo de bajo grado el DNA del virus permanece en estado episomal. La integración del DNA del virus al DNA celular es el paso fundamental en la progresión de las lesiones intraepiteliales de alto grado (NIC 2 a NIC 3). En los carcinomas el DNA viral se encuentra integrado (Ojeda 2002; Ojeda 2003; Pett y Coleman 2007).



**Figura 1. Infección por VPH y progresión a cáncer cervicouterino.** Los viriones aprovechan la erosión del epitelio para infectar a las células basales expuestas y se establecen en ellas en estado episomal; aprovechando el recambio normal del epitelio, las unidades de genoma viral se incrementan hasta que en el estrato superior se produce la lisis celular liberando nuevos viriones con capacidad infectiva. Una vez que el DNA viral se ha integrado al DNA celular se suspende el ciclo replicativo y se inicia el proceso de carcinogénesis con la consecuente invasión (Tomado de Woodman et al. 2007).

### **a) Integración del DNA viral al DNA celular**

La integración del genoma del VPH se ve favorecida por la presencia de un sitio llamado fra3b en el cromosoma 3, el cual predispone al DNA celular a mutaciones e integración de DNA de plásmidos, bacteriófagos y virus debido a que en este sitio los mecanismos de reparación del DNA fallaron o la integración de nucleótidos es defectuosa, impidiendo la expresión génica normal (López y Aristizábal 2006).

### **b) Consecuencias moleculares de la integración viral**

Cuando una célula normal recibe una señal para proliferar, existe un aumento en la concentración de ciclinas que forman un complejo con las respectivas cinasas dependientes de ciclinas (C/CDK), este complejo fosforila a una serie de proteínas necesarias para promover la progresión del ciclo celular, como por ejemplo la proteína producto del gen del

---

retinoblastoma (pRb). Existe una familia de proteínas pequeñas denominadas inhibidores de los complejos ciclina/cinasas dependientes de ciclina (IC/CDK) que al detectar alguna anomalía en el desarrollo del ciclo celular, detienen la progresión de éste inhibiendo la actividad del complejo C/CDK. Dentro de esta familia de proteínas inhibidoras se encuentran, entre otras, la p16, p21, p27 y p57. Toda ésta señalización celular se lleva a cabo en la transición de la fase G1 a la S, por lo que es de mucha importancia en la carcinogénesis ya que en ese momento se pueden inactivar varias proteínas, ya sea por una mutación del gen o una inactivación funcional. En este punto las tres proteínas más importantes son la pRb, p21 y p53, ésta última puede detener el ciclo celular cuando el DNA está dañado para que sea reparado o inducir apoptosis cuando el daño al DNA es severo. (Peralta et al. 1997).

Durante el proceso de integración, se interrumpe la transcripción genética normal de las células, lo que permite al VPH aumentar la expresión de oncoproteínas como las E6 y E7. Estas proteínas son las responsables de la transformación celular, debido a su capacidad de unirse e inactivar por la vía de la ubiquitina a las proteínas intracelulares p53 y pRb. La ubiquitinación de estas proteínas debida a E6 y E7, favorece la acumulación de mutaciones en los cromosomas provocando deterioros en la regulación del ciclo celular, lo cual incrementa la población de células que hospedan a los genomas virales (García 2006; Knebel 2006; Muños et al. 2003; Gariglio et al. 1999).

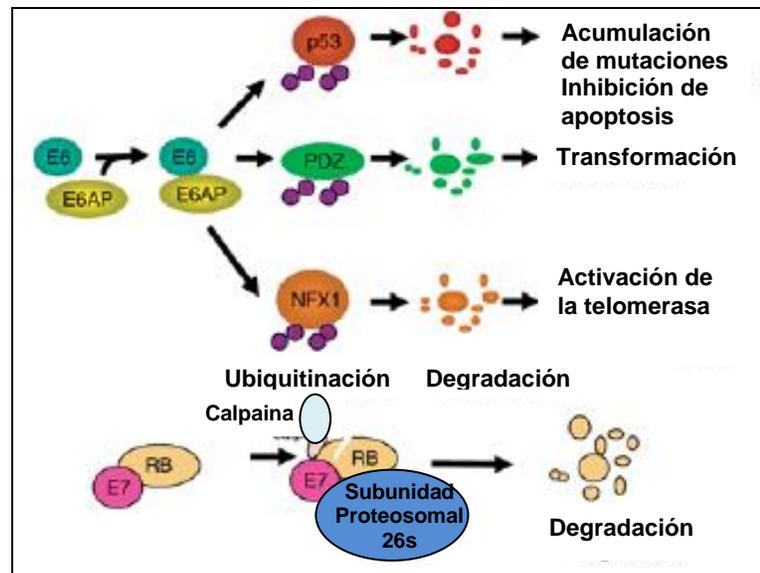
Como ya se sabe, diversos tipos de VPH pueden infectar el cérvix. Sin embargo, únicamente los tipos de alto riesgo están asociados con el cáncer cervical debido a la actividad de sus oncogenes. Lo anterior puede explicarse debido a que existen algunas diferencias en la actividad de las proteínas E6 y E7 entre virus de bajo y alto riesgo.

La proteína E7 de los virus de alto riesgo tiene las siguientes funciones: (Figura 2):

- Mayor afinidad de unión a la proteína pRb
- Mediar la degradación de pRb por ubiquitinación mediante el proteosoma

De la misma manera, la proteína E6 del virus de alto riesgo lleva a cabo las siguientes actividades (Figura 2):

- Mayor afinidad de unión a p53 que induce la degradación de dicha proteína y la inhibición de la apoptosis por la activación del factor de transcripción NF-κB.
- Formación de un complejo con la ligasa de ubiquitina E6AP conocida como proteína asociada a E6, p53 y ubiquitina, que permite la degradación por el proteosoma.
- Activación de la subunidad catalítica de la telomerasa, mediante degradación de su represor (NFX1) con lo cual la célula podría immortalizarse
- Degradación de proteínas con dominios PDZ, como la PATJ proteína asociada a la zona de oclusión, con lo que se pierde el contacto célula-célula y se favorece la pérdida de la polaridad celular (González 2007; Narisawa y Kiyono 2007).



**Figura 2. Mecanismo de acción de las proteínas E6 y E7 de los tipos alto riesgo sobre proteínas celulares.** En la parte superior se muestra que la proteína E6 del virus de alto riesgo unida a E6AP (proteína de unión a E6) ubiquitina a p53, proteínas con dominios PDZ y a NFX1 favoreciendo la acumulación de mutaciones que inhibirán la apoptosis, la transformación oncogénica y la activación de la telomerasa, respectivamente. En la parte inferior se observa la acción de la proteína E7 viral sobre pRb resultando en la degradación de esta última (Tomado de Narisawa y Kiyono 2007).

---

---

## 1.6 Epidemiología del cáncer cervicouterino

### a) Panorama mundial del CaCu

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el CaCu es la segunda causa de mortalidad por neoplasia maligna en las mujeres en todo el mundo. El 80% de los casos corresponden a países en vías de desarrollo, y cerca de 500 000 casos nuevos se diagnostican cada año, por lo tanto, se considera un problema serio de salud pública a nivel mundial. La mayoría de las mujeres que desarrollan este cáncer tienen entre 40 y 50 años de edad. Sin embargo, cada vez es más común ver mujeres jóvenes infectadas, diagnosticadas con cáncer cérvicouterino a edades entre 20 y 30 años. En el año 2001, prácticamente el 12% de todas las neoplasias en las mujeres correspondieron a CaCu. Se reportaron 369,500 casos nuevos en países en vías de desarrollo, en tanto que en los países desarrollados el número de casos fue de 96,100 en el mismo año (Hidalgo 2006; Novoa 2001).

En el continente americano la reducción en la incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino ha dado lugar a tasas significativamente bajas, menores a 10 casos por cada 100.000 mujeres, en Canadá y Estados Unidos. Sin embargo, en la mayoría de los países de América Latina y el Caribe, las tasas de incidencia y mortalidad anuales se mantienen elevadas, la primera por arriba de 25 casos por cada 100,000 mujeres, y la última superior a 10 casos por cada 100,000 mujeres. Estas cifras ubican a estas regiones de América dentro de aquellas que tienen las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino más altas del mundo, únicamente superadas por África Oriental y Melanesia (Tabla 1) (Lewis 2004).

### b) Cáncer cervicouterino en México

En México, el 38.5% de los tumores malignos de la mujer corresponden a CaCu, siendo así la segunda neoplasia más importante entre la población mexicana y, la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años. Durante el periodo 2001-2006 la incidencia nacional se comportó prácticamente constante, con tasas entre 9.5\* en el año 2001 a 9.83\* en el 2006, y un solo pico de 10.75\* en el año 2003 (Tabla 2 y figura 3). En lo que

---

\* Tasa por 100 000 habitantes femeninos mayores de 14 años

corresponde a la mortalidad, en el período 1990 - 2000 se registraron un total de 48761 muertes por cáncer cervicouterino, comenzando en 1990 con 4280 muertes al final del año, y alcanzando 4620 muertes por año para el 2000. Estos datos permiten considerar que durante este período murieron 13 mujeres diariamente debido a esta neoplasia, tomando como numerador las 48761 muertes y como numerador los 3650 días en dicho período (Palacio et al. 2003; SSA 2006).

**Tabla 1. Tasas de incidencia y mortalidad por cada 100.000 mujeres en América Latina y el Caribe 2000**

Región	Tasa de incidencia	Tasa de mortalidad
África Oriental	44.32	24.24
Melanesia	43.81	23.78
Centro América	40.28	17.03
Caribe	35.78	16.84
América del Sur	30.92	11.97
América del Norte	7.89	3.23

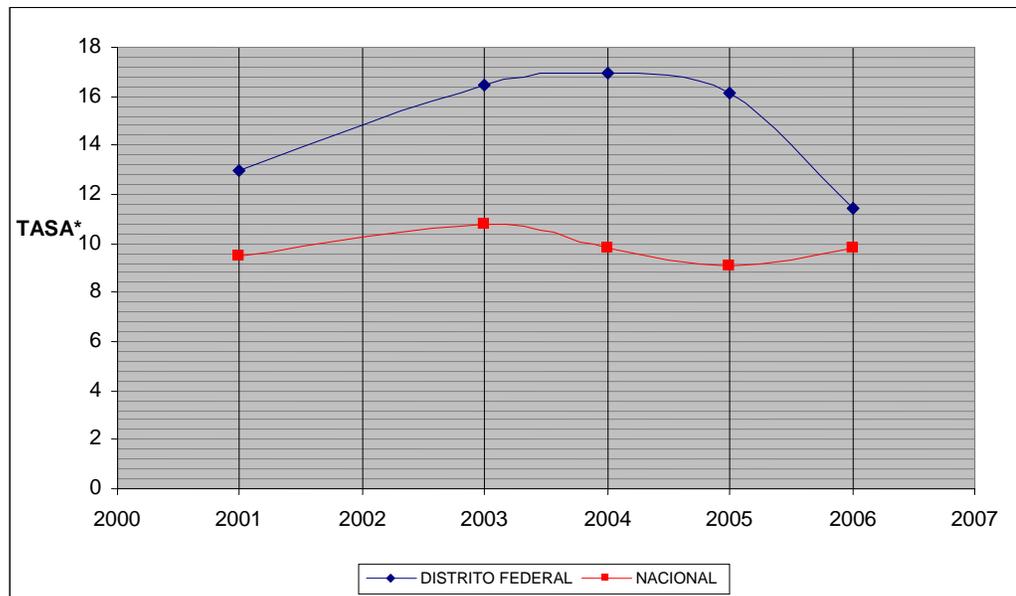
En el año 2001, la tasa de mortalidad por CaCu fue de 8.8 por cada 100,000 mujeres, mientras que para el año 2002 este mismo indicador disminuyó a 8.6 por cada 100,000 mujeres. Para éste mismo año se considera que se presentaron 16 muertes diarias por CaCu, ya que se diagnosticaron 12 512 casos nuevos de los cuales 5 777 fueron decesos. Esta enfermedad fue la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres mexicanas, ocupando un 16.6% de todos los cánceres (Novoa 2001; Hidalgo 2006; López y Lizano 2006).

### **c) Cáncer cervicouterino en el Distrito Federal**

La incidencia de cáncer cervicouterino en el Distrito Federal durante el periodo 2001-2006 se comportó como una curva que inicia en el año 2001 con una tasa de 12.97\* y comienza a ascender en el 2003, alcanzando su mayor valor en el 2004 con 16.93\*, posteriormente empieza a declinar en el 2005 a 16.11\*, culminando en el 2006 con una incidencia de 11.47. Dichos valores fueron mayores a los registrados para todo el país, cuya incidencia permaneció casi estática (Tabla 2 y figura 3) (SSA 2006).

**Tabla 2 Tasa\* de incidencia de cáncer cervicouterino en el Distrito Federal en el periodo 2001-2006**

AÑO	DISTRITO FEDERAL	NACIONAL
2001	12.97	9.5
2003	16.45	10.75
2004	16.93	9.83
2005	16.11	9.12
2006	11.47	9.83



FUENTE: Sistema Único para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA

**Figura 3 Incidencia de cáncer cervicouterino en el Distrito Federal en el periodo 2001 – 2006**

En el Distrito Federal, la mortalidad por CaCu presentó un comportamiento regular de 1990 a 1997, con una tendencia descendente y con niveles menores a los registrados en el país en su conjunto. En 1997, la tasa de mortalidad que se registró fue de 15.1<sup>†</sup>, lo que lo ubicó en el tercer nivel más bajo de mortalidad por este cáncer en el país, solamente superado por Nuevo León y Zacatecas, ambos con tasas de mortalidad de 14.8<sup>†</sup> (CONAPO 2000). En el año 2002

<sup>†</sup> Tasa por 100 000 habitantes femeninos de 25 años y más

---

---

la mortalidad disminuyó a 13.8<sup>†</sup>, y nuevamente se situó en el tercer nivel más bajo de este indicador a nivel nacional, ahora superado por Nuevo León y Guanajuato con tasas de 11.0<sup>†</sup> y 13.08<sup>†</sup>, respectivamente (CONAPO, 2002)

### **1.7. Diagnóstico de la infección por VPH y del cáncer cervicouterino**

La detección de infección por VPH puede realizarse por distintos métodos, que se engloban en los siguientes grupos: diagnóstico morfológico, inmunohistoquímico (detección de proteínas relacionadas con la infección por VPH) y molecular (detección de secuencias genómicas del VPH) (Archila y Neira 2008).

#### **a) Diagnóstico morfológico**

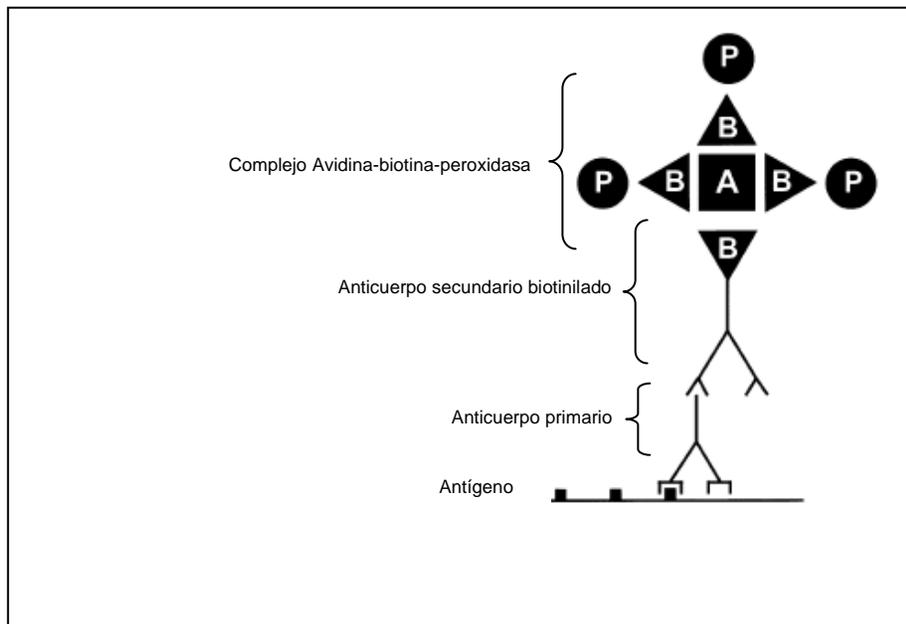
Este tipo de diagnóstico consiste en la identificación de las alteraciones morfológicas producidas por el VPH en las células escamosas, las que pueden observarse en el examen citológico y en el estudio histológico. Se considera a la coilocitosis o atipia coilocítica como el signo morfológico característico de la infección por VPH. Esta alteración se caracteriza por aumento en el tamaño nuclear, hipercromasia e irregularidad de la membrana nuclear, junto con un halo perinuclear. Actualmente sabemos que estas alteraciones son la traducción de una infección viral productiva con presencia de gran cantidad de viriones en el interior de estas células (Archila y Neira 2008).

#### **b) Detección de proteínas asociadas al VPH (método inmunohistoquímico)**

Esta técnica empezó a utilizarse en los años ochenta, y en la actualidad se usa comúnmente en laboratorios de patología debido a que ha demostrado tener valor en el diagnóstico de neoplasias. Se basa en el uso de anticuerpos dirigidos específicamente contra antígenos celulares (superficiales o intracelulares) y un sistema que permita evidenciar la interacción antígeno – anticuerpo. El procedimiento inmunohistoquímico más utilizado es el sistema avidina-biotina-peroxidasa, que emplea un anticuerpo secundario biotinilado dirigido al anticuerpo primario que se encuentra interaccionando con el antígeno a demostrar, además de un complejo avidina biotina peroxidasa, que permite amplificar dicha interacción y ponerla de manifiesto mediante un cromógeno (Figura 4). Algunos ejemplos son la determinación

---

inmunohistoquímica de las proteínas Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> (Deavers et al. 2003; Shutter et al. 2007).



**Figura 4. Fundamento de la técnica inmunohistoquímica.** Se esquematiza la unión del anticuerpo primario al antígeno *in situ* y la posterior unión del anticuerpo secundario biotilado que forma un complejo con la avidina conjugada con peroxidasa (Tomado de Deavers et al. 2003).

### c) Proteína Ki-67

Fue descrita por primera vez en 1983 por Gerdes et al, como una proteína nuclear no histona, poco después este mismo grupo logró desarrollar un anticuerpo para su detección. El anticuerpo original fue obtenido en ratones inmunizados con núcleos de la línea celular L428 (Schmidt et al. 2002). La proteína se presenta en dos isoformas con peso molecular aproximado de 345 a 395 KDa, codificadas por el mismo gen mediante empalme alternativo. La clonación del cDNA de la Ki-67 revela un gen de alrededor de 12500 Pb con 15 exones; el exón 13 de 6845 Pb codifica la mayor parte de la proteína. Contiene 16 secuencias repetidas de 366 Pb cada una, dentro de las cuales se encuentran las que codifican para el epítipo FKEL (llamado así por su secuencia aminoacídica) reconocido por el anticuerpo MIB-1 (Scholzen y Gerdes 2000).

Se ha determinado la asociación de Ki-67 con diversas proteínas como las Ran (proteínas de transporte al núcleo), proteínas regulatorias del ciclo celular, helicasas dependientes de ATP y

proteínas propias del nucleolo (Tabla 3) (Schmidt et al. 2003). Ki-67 se ha visto expresada únicamente en células en proliferación (células en fases G1, S, G2 y M), excepto en aquellas en fase G0, por lo que su expresión inmunohistoquímica proporciona un índice directo de la fracción de crecimiento del tejido. La expresión de la proteína Ki-67 está restringida al estrato basal o parabasal del epitelio ectocervical, al epitelio metaplásico escamoso y al estrato basal del epitelio endocervical. En el desarrollo de lesiones intraepiteliales cervicales la expresión de Ki-67 puede encontrarse en los estratos intermedio y superficial del epitelio (Cambruzzi et al. 2005; Urruticoechea et al 2005).

**Tabla 3. Algunas proteínas que interactúan con Ki-67 y sus especificaciones**

		<b>Función</b>	<b>Dominio de ki-67 en el que interaccionan</b>
<b>Proteínas relacionadas con el ciclo celular</b>	MCM2	Replicación del DNA	N Terminal
	RanBP7	Transporte de macromoleculas a través de la lamina nuclear	Repeat 3R
	RanBP9	Organiza los microtúbulos de los centrosomas durante la mitosis	N Terminal
<b>Proteínas asociadas al nucleolo</b>	Proteína ribosomal L6	proteína del ribosoma	Repeat 3R
	Fibrillarín/casein kinase II	Cinasa serina/treonina nucleolar	Repeat 3R
	Survival motor neuron protein I (SMNI)	Pre-mRNA splicing	Repeat 3R
<b>Proteínas relacionadas con el DNA</b>	Retinoblastoma binding protein 7	Remodelado de los cromosomas después de la mitosis	Repeat 3R
	Heterocromatin protein 1α y 1γ	Componentes de la heterocromatina	C Terminal

FUENTE: Schmidt et al. 2003

---

Inicialmente el anticuerpo contra Ki-67 se utilizó para la determinación de proliferación celular en cortes de tejido no fijados, posteriormente Cattoreti y cols. desarrollaron nuevos anticuerpos denominados MIB-1 y MIB-3, los cuales son anticuerpos monoclonales que reconocen a las isoformas de Ki-67 una de 345KDa y la otra de 395 KDa respectivamente. Estos anticuerpos mostraron resultados equivalentes al anticuerpo Ki-67 original, aunque en los estudios recientes el anticuerpo más utilizado es MIB-1 ya que ha probado ser más estable en la determinación en cortes fijados en formalina y embebidos en parafina. (Key et al. 1993; Urruticoechea et al 2005).

En el 2005 Cambuzzi et al, investigaron la expresión de Ki-67 en el adenocarcinoma endocervical y su relación con el VPH. El estudio se realizó en 229 casos de adenocarcinoma obteniendo expresión alta a Ki-67 en 207 (90.4%) de ellos, al mismo tiempo que encontraron asociación significativa con la presencia de VPH (Cambuzzi et al 2005).

#### **d) Proteína p16<sup>INK4a</sup>**

La proteína p16<sup>INK4a</sup> pertenece a la familia INK4 de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (INK4 CKI). Esta familia de inhibidores está integrada por las proteínas p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, y p19<sup>INK4d</sup> y son codificadas por el gen CDKN2A. p16<sup>INK4a</sup> está estructurada por cuatro dominios repetidos de 33 aminoácidos descubiertos en la anquirina, la cual es una proteína de la membrana eritrocitaria que interacciona con la espectrina y con la proteína de la banda 3 con el fin de mantener la morfología bicóncava del glóbulo rojo. Estos dominios de anquirina median el reconocimiento molecular a través de las interacciones proteína-proteína. Todas las proteínas INK4 tienen una estructura similar y se unen específicamente a las cinasas CDK4 y CDK6 inhibiendo su actividad. CDK4 y CDK6 son cinasas dependientes de ciclinas D, cuya función es fosforilar a la proteína Rb (retinoblastoma), que en estado hiperfosforilado se libera del factor de transcripción E2F permitiendo el progreso del ciclo celular de la fase G1 a S. p16<sup>INK4a</sup> impide la progresión del ciclo celular induciendo un cambio conformacional en las cinasas CDK4 y CDK6 inhibiendo la interacción de estas proteínas con las ciclinas D, por lo tanto, pRb no es fosforilado y se detiene el ciclo celular en la fase G1. Estudios recientes sugieren que el tercer dominio de anquirina es crucial en la interacción con estas cinasas (Arniges 2006; Toro y Llobart 2005; Satyanarayana y Lenhard 2004; Roussel 1999).

---

En los últimos años se ha demostrado una relación recíproca entre la integridad de pRb y la expresión de p16<sup>INK4a</sup>. Es decir, p16<sup>INK4a</sup> se encuentra incrementada cuando pRb está mutada, con alguna delección o inactivada; y reducida cuando pRb está normal. La inmunodetección p16<sup>INK4a</sup> es considerada como un marcador sensible y específico de lesiones cervicales clínicamente significativas asociada a VPH de alto riesgo (VPHAR) (Toro et al. 2005; Hardisson 2005).

En el año 2001, Klaes et al, realizaron un estudio acerca de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> como un marcador de células displásicas y neoplásicas en 310 biopsias de cérvix, en el que informan una marcada sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> en 40 de las 47 neoplasias intraepiteliales cervicales I (NIC I) excepto en 7 de ellas que se asociaron a subtipos de VPH de bajo riesgo, en las 32 NIC II y 60 NIC III, y en 58 de 60 carcinomas cervicales invasores. Además de no haber encontrado expresión de p16<sup>INK4a</sup> en los 42 casos de epitelio cervical normal, ni en 69 de lesiones inflamatorias (Klaes et al. 2001).

Guimaraes et al, en el 2005, en un estudio realizado en 65 biopsias cervicales, encontraron asociación entre la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> con VPH 16 y 18, y sugirieron la probable utilidad de p16<sup>INK4a</sup> como un buen marcador en la predicción de la progresión de lesiones escamosas intraepiteliales (SIL) (Guimaraes et al. 2005).

La detección de la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> en lesiones cervicales, puede permitir identificar de forma inequívoca las células con cambio neoplásico inducido por el VPH, mejorar la reproducibilidad de los diagnósticos histológicos de las lesiones cervicales intraepiteliales, y predecir el riesgo de progresión de displasia cervical de bajo grado (Knebel 2006; Hardisson 2005).

#### **e) Detección de secuencias genómicas del VPH (técnicas de biología molecular)**

Se basan en la detección específica de secuencias de DNA del VPH en tejido o bien en raspados de material procedente del área a estudiar (cérvix), y permiten, por tanto, identificar el tipo de virus presente en la lesión. Básicamente, todas ellas consisten en enfrentar el DNA de una determinada muestra con sondas o iniciadores específicos cuya secuencia es complementaria a la secuencia de DNA del tipo viral que se va a identificar. Algunas de las

---

técnicas moleculares más empleadas en el estudio del virus del papiloma son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), captura de híbridos e hibridación *in situ*. (Dehn et al. 2007).

#### **f) Diagnóstico del cáncer cervicouterino**

En México la normatividad actual indica como método de detección oportuna del carcinoma de cérvix a la citología cérvico-vaginal, la cual ha reducido la incidencia y la mortalidad del carcinoma cervicouterino debido a su capacidad para detectar, no solo carcinomas escamosos y adenocarcinomas invasores, sino también sus lesiones precursoras (CIN, del inglés cervical intraepithelial neoplasia o SIL, del inglés squamous intraepithelial lesion). Sin embargo, a pesar de su amplia aceptación como tamizaje, también se han evidenciado algunas limitaciones en este método (Archila y Neira 2008).

Las diversas manifestaciones subclínicas y latentes de la infección por VPH, se constituyen en los obstáculos más importantes para la detección clínica precoz y citohistológica de esta infección. La sensibilidad de la citología cervicovaginal se estima, entre el 49% y 67%, y la especificidad entre el 62% y 77%, aunque se debe considerar que estos parámetros se ven afectados por la representatividad de la muestra cervicovaginal. Además, desde la inclusión del sistema de Bethesda en el diagnóstico citopatológico se consideró una nueva entidad denominada "ASCUS" (atipia de células escamosas de significado incierto), que como su nombre lo indica, supone una incertidumbre diagnóstica que requiere el seguimiento citológico de las pacientes y en muchas ocasiones, la realización de biopsia y/o colposcopia. Otro problema de la citología es su importante variabilidad interobservador. Todo lo anterior ha determinado el interés en los nuevos medios de detección de la infección por VPH con dos objetivos básicos: en primer lugar, aumentar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de las lesiones premalignas y malignas del cérvix uterino y, en segundo lugar, determinar la capacidad evolutiva de las lesiones intraepiteliales, discriminando las lesiones con capacidad de progresión de las lesiones no evolutivas (Dehn et al. 2007; Andujar et al. 2005; Tamayo et al. 2001).

Se ha evaluado la utilización de diversos biomarcadores relacionados con la progresión de las lesiones cervicales, entre ellos los conocidos como antígenos de proliferación celular nuclear (PCNA) o la proteína Ki-67, que hacen notoria la presencia de células con replicación activa

---

de DNA, por lo que se han usado comúnmente para evaluar la proliferación mediante inmunohistoquímica. Asimismo se ha investigado la expresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup>, que interviene en la regulación del ciclo celular y cuya expresión inmunohistoquímica se ha asociado con la presencia del VPH de alto riesgo (Wang et al. 2004).

## **1.8 Justificación**

A medida que se ha adoptado el concepto de la relación entre el cáncer cervicouterino y la presencia del virus del papiloma humano, se ha centrado el interés en la detección del VPH por los diferentes métodos como un auxiliar en el diagnóstico citológico cervicovaginal. Además, la variabilidad de los criterios morfológicos, así como la existencia de manifestaciones benignas que pueden simular neoplasia del epitelio cervical, como es el caso de la atrofia cervical o la metaplasia escamosa inmadura; implican la necesidad de desarrollar parámetros diagnósticos objetivos para especímenes citológicos e histológicos que permitan tener una mayor precisión en el criterio diagnóstico así como pronosticar la progresión de las lesiones premalignas a carcinoma invasor.

Considerando que de la infección crónica por VPH de alto riesgo se deriva la integración del DNA viral en el celular, lo cual es trascendental en la carcinogénesis cervicouterina, además de que prácticamente no existen estudios que documenten la detección del estado físico del DNA del VPH y la expresión de biomarcadores de progresión en lesiones premalignas de mujeres del Distrito Federal, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe relación entre la presencia y estado físico del DNA del VPH con la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67?

## **1.9 Hipótesis**

La presencia y estado físico del DNA del VPH se correlacionará con la expresión incrementada de los biomarcadores p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67.

---

### **1.10 Objetivo general**

Relacionar la presencia y estado físico del DNA del VPH con la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 en lesiones premalignas de mujeres residentes de la ciudad de México.

### **1.11 Objetivos específicos**

Determinar la presencia y estado físico del DNA del VPH de alto y bajo riesgo mediante hibridación *in situ* en lesiones premalignas NIC I, NIC II y NIC III.

Determinar la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 mediante inmunohistoquímica en lesiones premalignas NIC I, NIC II y NIC III.

Correlacionar la presencia y estado físico del DNA del VPH con la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67

Determinar la asociación entre los factores de riesgo con el diagnóstico histológico.

---

---

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Tipo de estudio

Transversal y comparativo

### 2.2 Población de estudio

La población de estudio estuvo formada por mujeres que asistieron a los servicios de salud pública del Distrito Federal, y que mediante valoración citológica presentaron algún grado de lesión premaligna (NIC I; NIC II, NIC III<sup>‡</sup>) durante el año 2005.

### 2.3 Material biológico

El material de estudio consistió en 248 biopsias y conos de cuello uterino, clasificadas en NIC I (n= 63), NIC II (n=65), y NIC III (n=67) además de un grupo control de casos negativos a NIC (n=53). El material se seleccionó de los archivos del laboratorio central de citopatología de los servicios de salud del Distrito Federal. En todos los casos se obtuvo información acerca de los factores de riesgo asociados al cáncer cervicouterino (inicio de vida sexual antes o después de los 18 años, número de parejas sexuales, antecedentes de infecciones de transmisión sexual, tabaquismo, efecto de la presencia de DIU y hormonal).

Las muestras se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 5 micras y se montaron en portaobjetos preparados con poly L-lisina, posteriormente fueron teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina para la evaluación de la conservación del epitelio cervical y confirmación del diagnóstico histológico; así como para los estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicos.

### 2.4 Criterios de inclusión

Contar con diagnóstico positivo a algún tipo de lesión cervicouterina (bajo o alto grado) mediante citología.

Tener biopsia o cono del cuello cervical.

---

<sup>‡</sup> Se consideraron dentro de éste grupo a los casos con carcinoma *in situ* y 4 casos de carcinoma invasor

---

## **2.5 Criterios de exclusión y eliminación**

No se consideraron en el estudio a las pacientes que no cumplieron con alguno de los criterios de inclusión.

Se eliminaron las muestras mal conservadas, insuficientes para el diagnóstico, o que se perdieron durante el tratamiento histológico.

## **2.6 Métodos**

### **a) Confirmación del diagnóstico histológico previo mediante la técnica hematoxilina-eosina**

La técnica de hematoxilina-eosina (H-E) se realizó en todos los casos para corroborar el diagnóstico morfológico, para lo cual una vez que se obtuvieron los cortes en láminas con poly-L-lisina, se procedió a la desparafinación en xilol y xilol-alcohol absoluto durante 10 y 5 minutos respectivamente, se continuó con cambios en gradientes descendientes de alcohol (100°, 96° y 70°), durante 3 minutos en cada uno ellos, y finalmente se hidrató en agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente se tiñó con hematoxilina de Harris durante un minuto y medio. Se eliminó el exceso de colorante mediante un lavado en agua de la llave. Se diferenció en alcohol ácido. Se lavó en agua destilada y se prosiguió con el azuleamiento en agua amoniacal (2-3 gotas de hidróxido de amonio concentrado por cada 20 mL de agua de la llave). Se lavó en agua destilada para quitar el exceso de hidróxido de amonio. Se continuó con la tinción con eosina durante 45 segundos. Se eliminó el exceso del colorante con alcohol de 96°. Se procedió a deshidratar con pasos sucesivos en alcoholes de 96° y absoluto, xilol-alcohol absoluto durante 5 minutos cada uno, y xilol durante 10 minutos. Finalmente se montaron las laminillas con entellan (Merck).

---

---

Interpretación:

Estructuras	Color
◆ Núcleo:	Azul-negro
◆ Citoplasma:	Rosa-pálido

Para la valoración histológica se usó la clasificación propuesta por Richart en 1973, de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Richart 1973; López et al. 2006), con tres grados de progresión (I, II y III), incluyendo en el grado III al carcinoma *in situ* y 4 casos de carcinoma invasor.

#### **b) Detección del estado físico del DNA del VPH mediante hibridación *in situ***

Para la hibridación *in situ* se siguió el protocolo Hibridación *in situ* en histología manual VPH y DakoGenpoint (DakoCytomation, Carpintería, CA, USA) con algunas modificaciones. Para la desparafinación e hidratación se desparafinaron las laminillas en xilol y xilol absoluto durante 5 minutos respectivamente, seguido de cambios en gradientes descendientes de alcohol, durante 3 minutos en cada uno ellos (100°, 96° y 70°, respectivamente), y finalmente en agua destilada. Para la recuperación del epítipo, las preparaciones se colocaron en un vaso de Coplin con solución de recuperación (ImmunoDNA Retriever; BioSB, Inc, Santa Barbara, CA) dilución 1:10, el cual fue llevado a una olla de presión para alcanzar una temperatura de 240°C. Una vez alcanzada esta temperatura se incubaron durante 15-20 minutos. Pasado este tiempo las preparaciones se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se realizó un lavado en TBST a dilución 1:10 durante 5 minutos (DakoCytomation, Carpintería, CA, USA). Se aplicó proteinasa K (Maxim Biotech, Inc, San Francisco, CA) a una dilución 1:1000 durante 5 minutos para la digestión enzimática y se lavó nuevamente en TBST. Se bloqueó la peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 minutos, y posteriormente, se lavó en agua destilada. Se deshidrataron las preparaciones mediante inclusiones en alcohol de 96° y 100°. Se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se dispersó a las preparaciones 10µL de sonda DakoCytomation Genpoint™ HPV Biotinilated DNA Probe (DakoCytomation, Carpintería, CA, USA) coctel que contiene a los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 68. Se colocó el cubreobjetos y se sellaron con

---

cemento iris. Se colocaron en el hibridizador (DakoCytomation, Carpintería, CA, USA) el cual fue previamente preparado saturando las bandas de control de humedad y programado para iniciar el proceso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos e hibridación a 37° C durante 20 horas. Terminada la hibridación se continuó con el proceso de amplificación de la señal mediante el sistema Genpoint™ Tyramide signal amplification system for Biotinilated Probes (DakoCytomation, Carpintería, CA, USA). Primero se realizó un lavado con solución de astringencia en un baño a 55°C durante 5 minutos. Se lavó en TBST y se aplicó la estreptavidina –HRP primaria, se lavó en TBST y se aplicó biotil tiramida, se lavó en TBST y se aplicó estreptavidina HRP secundaria. Después de lavar nuevamente en TBST, se aplicó el sustrato DAB (diaminobencidina) (Cell Marque Corp, USA) durante 20 segundos. El exceso de cromógeno se retiró con un lavado en agua destilada. Posteriormente se realizó una contratinción con hematoxilina durante 25-30 segundos; el exceso de colorante se retiró con un lavado en agua destilada. Se deshidrató mediante cambios en alcoholes crecientes (70°, 96°, absoluto y absoluto-xilol) hasta xilol. Finalmente se montaron las laminillas con entellan (Merck).

Interpretación: La reacción positiva se observó de color café-ocre en el núcleo pudiendo ser puntiforme (un único punto teñido de color café-ocre localizado en el núcleo celular) o difusa (desde dos o más puntos hasta todo el núcleo celular teñido de color café- ocre).

### **c) Determinación inmunohistoquímica de la expresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup>**

Para la determinación de p16<sup>INK4a</sup> se utilizó el anticuerpo de ratón 16PO4 (Cell Marque Corp, USA). Se realizaron los pasos de desparafinación, hidratación, recuperación del epítotope, y lavado en solución de TBST, de la misma manera que la descrita para la técnica de hibridación *in situ*. Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 minutos. Después de un lavado con agua destilada durante 2 minutos y en TBST durante 5 minutos, se aplicaron 15-20µL del anticuerpo primario (16PO4) a una dilución 1:100 durante 30 minutos; se lavó en TBST y se continuó con el sistema: LSAB2 System-HRP (DakoCytomation, Carpintería, CA, USA) aplicando 15-20µL del anticuerpo secundario (Biotinylated link) durante 15 minutos. Se realizó un lavado en TBST y se aplicó 15-20µL de estreptavidina (streptavidin-HRP) durante 15 minutos. Se lavó nuevamente en TBST y se aplicó el sustrato diaminobencidina (Cell Marque Corp, USA)

---

durante 20 segundos, el exceso de cromógeno se retiró mediante un lavado en agua destilada. Posteriormente se realizó una contratinción con hematoxilina durante 25-30 segundos; el exceso de colorante se retiró con un lavado en agua destilada. Se deshidrató mediante cambios en alcoholes crecientes (70°, 96°, absoluto y absoluto-xilol) hasta xilol. Finalmente se montaron las laminillas con entellan.

Interpretación: La reacción positiva se observó de color café-ocre en el núcleo o citoplasma celular

Para la valoración de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> se usó la escala semicuantitativa descrita por Klaes et al en el 2001, la cual se describe a continuación:

Negativa: no hay células con tinción positiva

Esporádica: menos del 5% de células positivas.

Focal: de 5 – 25% de células positivas.

Difusa: más del 25% de células positivas.

#### **d) Técnica para la determinación inmunohistoquímica de la expresión de la proteína Ki-67**

Para la determinación de Ki-67 se utilizó el anticuerpo de ratón MIB1 (DakoCytomation, Carpintería, CA, USA). Se realizaron los pasos de desparafinación, hidratación, recuperación del epítotope, y lavado en solución de TBST, de la misma manera que la descrita para la técnica de hibridación in situ. Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 minutos. Después de un lavado con agua destilada durante 2 minutos y en TBST durante 5 minutos, se aplicaron 15-20µL del anticuerpo primario MIB1 a una dilución 1:50 durante 30 minutos; se lavó en TBST y se continuó con el sistema: LSAB2 System-HRP (DakoCytomation, Carpintería, CA, USA) aplicando 15-20µL del anticuerpo secundario (Biotinylated link) durante 15 minutos. Se realizó un lavado en TBST y se aplicó 15-20µL de estreptavidina (streptavidin-HRP) durante 15 minutos. Se lavó nuevamente en TBST y se aplicó el sustrato diaminobencidina (Cell Marque Corp, USA) durante 20 segundos. El exceso de cromógeno se retiró mediante un lavado en

---

agua destilada. Posteriormente se realizó una contratinción con hematoxilina durante 25-30 segundos; el exceso de colorante se retiró con un lavado en agua destilada. Se deshidrató mediante cambios en alcoholes crecientes (70°, 96°, absoluto y absoluto-xilol) hasta xilol. Finalmente se montaron las laminillas con entellan.

Interpretación: La reacción positiva se observó de color café-ocre en el núcleo celular.

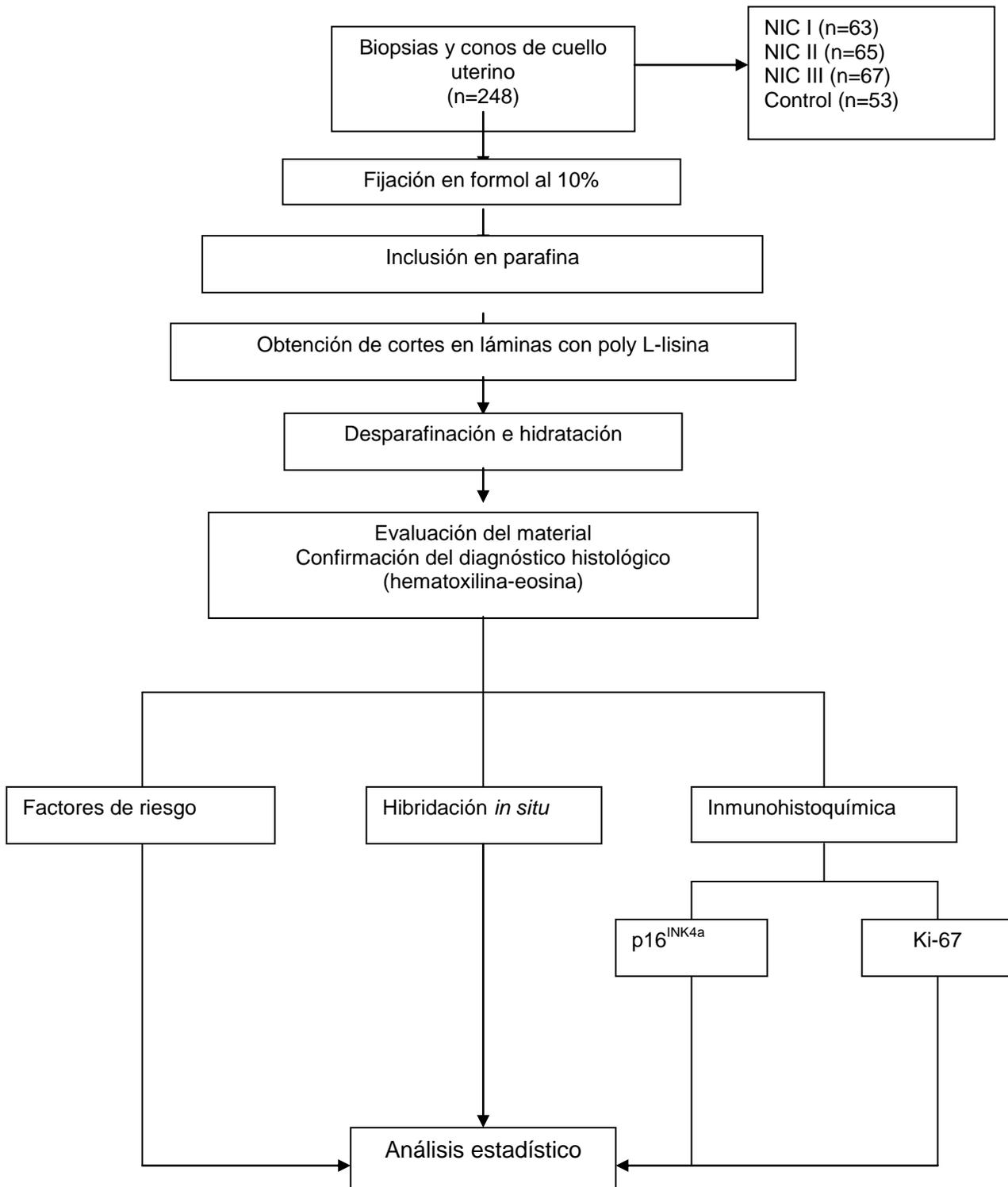
Para la valoración de la expresión de Ki-67 se usó la escala semicuantitativa descrita por Mirhashemi et al en el 2003, la cual se describe a continuación:

Mínima: menos del 10% de células positivas

Moderada: entre el 10% y el 50% de células positivas

Alta: más del 50% de células positivas.

## 2.7 Diagrama de flujo



---

## 2.8 Análisis estadístico

La información obtenida de los estudios de laboratorio y factores de riesgo se capturó en una base de datos y el procesamiento estadístico se realizó en el paquete estadístico SPSS versión 11.0. Para determinar la concordancia entre el diagnóstico previo y el definitivo se usó el índice Kappa (K). Para las variables cuantitativas continuas se obtuvieron medias y medianas. La comparación de medias se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA). Para las variables cualitativas (categóricas) se obtuvieron frecuencias, y se realizaron pruebas de independencia estadística tipo  $X^2$  para evaluar la relación entre la expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup>, con la presencia y estado físico del DNA del VPH de alto y bajo riesgo, así como también con el grado de lesión histológica.

### III. RESULTADOS

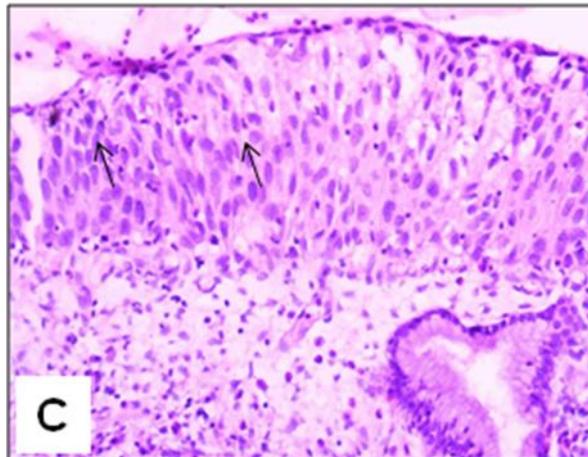
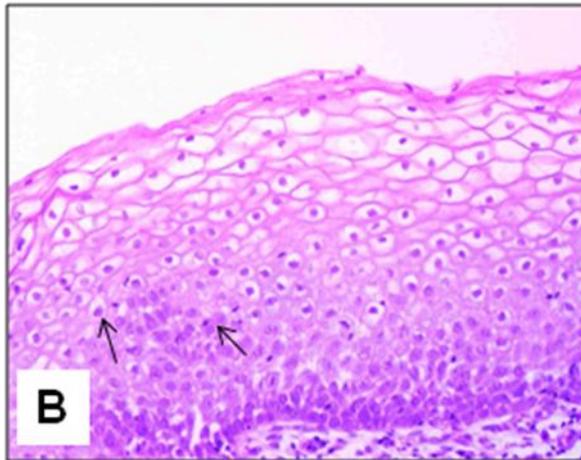
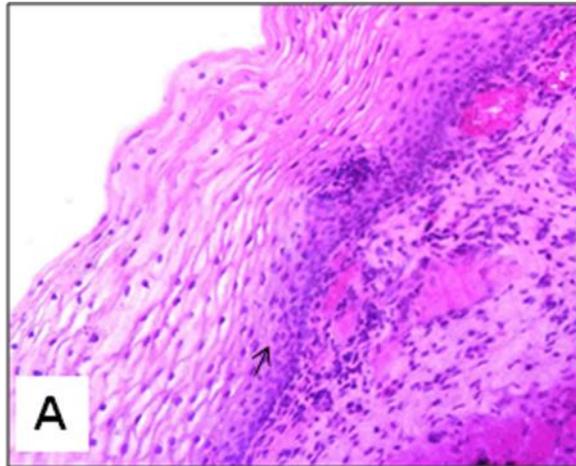
Antes de realizar las determinaciones inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ* (HIS), se procedió a comprobar el estado de conservación del tejido y epitelio cervical, así como a corroborar o realizar un diagnóstico histológico definitivo de cada pieza incluida en el estudio. Por esta razón el tamaño muestral disminuyó de 248 a 209 casos, ya que el resto no presentaron epitelio adecuadamente conservado o suficiente para la valoración. El diagnóstico definitivo de los casos lo realizó un observador ciego (patólogo que desconocía el diagnóstico previo), éste se hizo de acuerdo con la clasificación propuesta por Richart de NIC I a III, incluyendo en el grado III al carcinoma *in situ* y 4 casos de carcinoma invasor (Figura 5). Este diagnóstico se utilizó en adelante para cada una de las determinaciones y análisis de datos. La tabla 4 muestra los resultados definitivos del diagnóstico histológico.

**Tabla 4 Resultados de la confirmación del diagnóstico histológico**

	Diagnóstico histológico previo				Valor de K <sup>‡</sup>
	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III	
<b>Dx definitivo</b>					
<b>n (%) S/NIC (17)</b>	15 (88.2)	1 (5.9)	0	1 (5.9)	
<b>n (%) NIC I (51)</b>	17 (33.3)	22 (43.1)	8 (15.7)	4 (7.8)	<<1
<b>n (%) NIC II (49)</b>	7 (14.3)	17 (34.7)	16 (32.7)	9 (18.4)	
<b>n (%) NIC III(92)</b>	7 (7.6)	11 (12.0)	29 (31.5)	45 (48.9)	
<b>n (%) Total (209)</b>	46 (22.0)	51 (24.4)	53 (25.4)	59 (28.2)	

<sup>‡</sup> Índice Kappa, DX: diagnóstico, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical.

Se encontró que en el grupo sin NIC (n=17), el diagnóstico previo coincidió con el definitivo en 15 casos (dos de ellos tenían diagnóstico previo de NIC I y III respectivamente). En el grupo de NIC I (n=51), ambos diagnósticos coincidieron en 22 casos (43.1%) y hubo discrepancia en 29 (17 sin NIC, 8 NIC II y 4 NIC III). En el grupo NIC II (n=49) hubo concordancia en 16 casos y discordancia en 33 (7 sin NIC, 17 NIC I y 9 NIC III). En NIC III (n=92), la concordancia entre ambos diagnósticos fue solo en 45 casos (48.9%) y discrepancia en 47 (7 sin NIC, 11 NIC I y 29 NIC II). Al llevar a cabo el análisis entre el diagnóstico previo y el definitivo se obtuvo una discrepancia importante, la cual fue estadísticamente significativa (K<<1).



**Figura 5** Imágenes representativas de los diferentes tipos de lesiones analizadas. Cortes histológicos de cervix donde se muestra: A: Neoplasia intraepitelial cervical I, B: Neoplasia intraepitelial cervical II y C: Neoplasia intraepitelial cervical III. Las flechas señalan algunas células con alteración morfológica (H-E). 100X.

### 3.1 Características generales de la población estudiada

Se estudiaron un total de 209 mujeres cuyas edades oscilaron entre 15 y 67 años, con una media de 34 y mediana de 33 años. Todas ellas residentes en alguna de las 16 delegaciones del Distrito Federal. En la tabla 5 se resume la población estudiada distribuida por grupo de edad y por diagnóstico histológico definitivo con el que fueron incluidas. Los rangos de edad se consideraron con base al efecto hormonal y a las características del desarrollo epitelial.

**Tabla 5 Distribución de los casos por grupo de edad y diagnóstico histológico.**

Variable	Diagnóstico histológico				Valor de <i>p</i>
	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III	
<b>Promedio de edad (años) (n=209)</b>	38.2	35.1	32.0	34.0	>0.05 <sup>‡</sup>
<b>Edad en grupos (años)</b>					
<b>n (%) 15-20 (n=22)</b>	2 (9.1)	5 (22.7)	5 (22.7)	10 (45.5)	
<b>n (%) 21-30 (n=68)</b>	2 (2.9)	17 (25.0)	19 (27.9)	30 (44.1)	
<b>n (%) 31-40 (n=63)</b>	5 (7.9)	13 (20.6)	18 (28.6)	27 (42.9)	
<b>n (%) 41-50 (n=43)</b>	6 (14.0)	13 (30.2)	5 (11.6)	19 (44.2)	>0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) 51 Y + (n=13)</b>	2 (15.4)	3 (23.1)	2 (15.4)	6 (46.2)	
<b>n (%) Total+ (n=209)</b>	17 (8.1)	51 (24.4)	49 (23.4)	92 (44.0)	

<sup>‡</sup>ANOVA, <sup>§</sup>X<sup>2</sup>, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

En la tabla 5 se muestra la presencia 20 casos de NICs en mujeres menores de 20 años, de los cuales el 50.0% presentaron diagnóstico de NIC III (que incluye displasia severa y carcinoma *in situ*). También nos muestra que la mayor cantidad de mujeres con NIC se concentra en los grupos de 21 a 30 y 31 a 40 años. De ambos grupos 57 de 131 mujeres (43%) presentaron NIC III, y solamente 7 no presentaron NIC, mientras que la menor frecuencia de NICs se presentó en el grupo de mayores de 50 años (11 casos). En el análisis estadístico para determinar si había asociación entre los grupos etarios respecto al diagnóstico histológico no se obtuvo significancia ( $p > 0.05$ ).

Con la finalidad de determinar si la presencia de las lesiones se asociaba con factores de riesgo en la población de estudio, los casos se distribuyeron por factores de riesgo, tales como: inicio de vida sexual activa (IVSA), parejas sexuales (PS), antecedentes de infecciones de transmisión sexual (ITS), y tabaquismo, todos ellos relacionados con el diagnóstico histológico. Dichos resultados se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6 Distribución de casos por factores de riesgo primarios y por diagnóstico histológico**

Variable	Diagnóstico histológico				Valor <i>p</i>
	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III	
<b>n (%)IVSA &lt; 18 años(n=56)</b>	5 (8.9)	10 (17.9)	15 (26.8)	26 (46.4)	
<b>n (%)IVSA &gt;18 años (n=83)</b>	10 (12.0)	32 (38.6)	14 (16.9)	27 (32.5)	<0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%)Total (n=139)*</b>	15 (10.8)	42 (30.2)	29 (20.9)	53 (38.1)	
<b>n (%)2 o más PS (n=20)</b>	1 (5.0)	5 (25.0)	4 (20.0)	10 (50.0)	
<b>n (%)1 PS (n=119)</b>	14 (11.8)	37 (31.1)	25 (21.0)	43 (36.1)	>0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%)Total (n=139) *</b>	15 (10.8)	42 (30.2)	29 (20.9)	53 (38.1)	
<b>n (%) Con antecedentes ITS (n=15)</b>	2 (13.3)	5 (33.3)	1 (6.7)	7 (46.7)	
<b>n (%) Sin antecedentes ITS</b>	14 (11.8)	37 (29.8)	28 (22.6)	46 (37.1)	>0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Total (n=139) *</b>	15 (10.8)	51 (30.2)	29 (20.9)	53 (38.1)	
<b>n (%) Con tabaquismo (n=9)</b>	1 (11.1)	3 (33.3)	2 (22.2)	3 (33.3)	
<b>n (%) Sin tabaquismo (n=130)</b>	14 (10.8)	39 (30.0)	27 (20.8)	50 (38.5)	>0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Total (n=139) *</b>	15 (10.8)	42 (30.2)	29 (20.9)	53 (38.1)	

<sup>§</sup>X<sup>2</sup>, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical,

\*n=139 debido a que no se obtuvo datos de los casos restantes

Respecto al IVSA, se muestra que 51 de las 56 mujeres con IVSA antes de los 18 años presentaron algún grado de NIC, y que en ellas la lesión más frecuente fue la NIC III en 26 casos, mientras que 73 de las 83 mujeres con IVSA después de los 18 años, presentaron alguna NIC y en ellas la lesión más frecuente fue la NIC I en 32 casos. En el análisis de esta variable para determinar su asociación respecto al diagnóstico histológico se obtuvo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En lo que respecta a los factores de riesgo como número de PS, antecedentes de ITS y tabaquismo, el análisis estadístico no mostró asociación significativa ( $p > 0.05$ ) (Tabla 6).

Así mismo, para determinar la influencia de los factores de riesgo secundario (efecto hormonal y uso de dispositivo intrauterino –DIU-) con la progresión de NIC, los casos se distribuyeron como se muestra en la tabla 7.

Como se muestra en esta tabla no se obtuvo relación significativa ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 7 Distribución de casos por factores de riesgo secundarios y por diagnóstico histológico**

Variable	Diagnóstico histológico				Valor $p$
	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III	
<b>n (%) Con DIU (n=39)</b>	2 (5.1)	7 (17.9)	11 (28.2)	19 (48.7)	
<b>n (%) Sin DIU (n=170)</b>	15 (8.8)	44 (25.9)	38 (22.4)	73 (42.9)	>0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Total (n=209)</b>	17 (8.1)	51 (24.4)	49 (23.4)	92 (44.0)	
<b>n (%) Con efecto hormonal (n=38)</b>	3 (7.9)	9 (23.7)	8 (21.1)	18 (47.4)	
<b>n (%) Sin efecto hormonal (n=171)</b>	14 (8.2)	42 (24.6)	41 (24.0)	74 (43.3)	>0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Total (n=209)</b>	17 (8.1)	51 (24.4)	49 (23.4)	92 (44.0)	

<sup>§</sup> $\chi^2$ , NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Con el propósito de correlacionar el tipo de expresión del DNA del VPH mediante HIS y la expresión de las proteínas Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> con el diagnóstico histológico los resultados se distribuyeron por dichos parámetros como se muestra en las tablas 8 a la 12 que se presentan a continuación de forma individual.

### **3.2 Correlación entre el estado físico del DNA del VPHAR con el diagnóstico histológico**

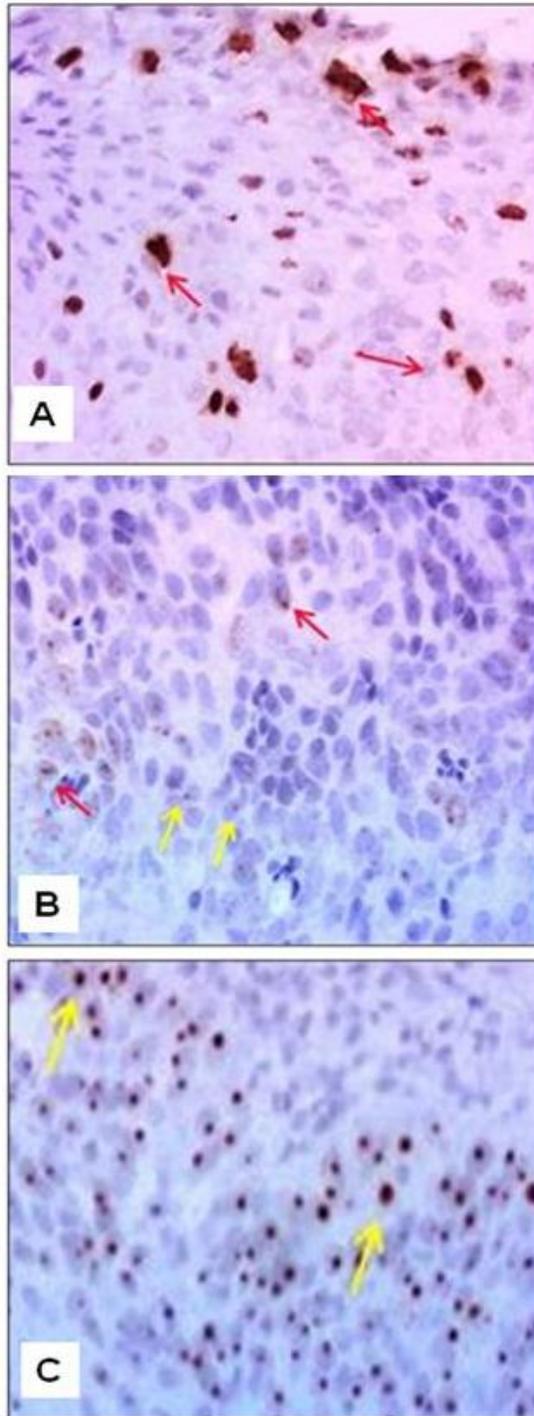
Los resultados obtenidos de éste análisis (Figura 6) se resumen en la tabla 8, donde se puede ver que de 32 casos con HIS negativa, 22 fueron diagnosticados como NICs (12 NIC I, 6 NIC II y 4 NIC III), mientras que 10 fueron negativos a NIC. Para la expresión difusa de VPH (n=68) 67 casos presentaron NICs, de ellos, 27 (39.7% del total de la categoría) fueron NIC III

y solo un caso con expresión difusa fue negativo a NIC. Se observa también que 7 casos presentaron expresión mixta y que ésta fue más frecuente en NIC III (en 4 casos). Para la expresión puntiforme 26 de 27 casos presentaron NICs, de ellos, la mayor cantidad se presentó en NIC III con 20 casos, y solo hubo un caso negativo a NIC que expresó este tipo de patrón de tinción. Con el fin de calcular el porcentaje de casos de lesiones cervicales con infección por VPHAR se relacionaron los casos con expresión viral (n=102, expresión difusa, mixta y puntiforme) con los casos con diagnóstico de NIC (n=122), obteniéndose con esto el porcentaje de positividad que fue de 81.9%. El análisis estadístico para determinar la relación entre el estado físico del DNA del VPH con la progresión de la NIC fue significativo ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 8 Correlación entre la expresión del DNA del VPHAR con el diagnóstico histológico**

	Diagnóstico histológico				Valor $p$
	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III	
<b>Expresión de HIS</b>					
<b>n (%) Negativo (n=32)</b>	10 (31.3)	12 (37.5)	6 (18.8)	4 (12.5)	
<b>n (%) Difusa (n=68)</b>	1 (1.5)	22 (32.4)	18 (26.5)	27 (39.7)	
<b>n (%) Mixta (n=7)</b>	0	2 (28.6)	1 (14.3)	4 (57.1)	<0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Puntiforme (n=27)</b>	1 (3.7)	2 (7.4)	4 (14.8)	20 (74.1)	
<b>n (%) Total (n=134)</b>	12 (9.0)	38 (28.4)	29 (21.6)	55 (41.0)	

<sup>§</sup> $\chi^2$ , NIC: Neoplasia intraepitelial cervical.



**Figura 6. Imágenes representativas de los patrones de expresión del estado físico del DNA del VPHAR por HIS.** Cortes histológicos de cervix (NIC III) que muestran: A: Expresión difusa (DNA episomal), B: Expresión mixta y C: Expresión puntiforme (DNA integrado). Las flechas rojas señalan células con expresión difusa; las flechas amarillas señalan células con expresión puntiforme. 100x.

### 3.3 Correlación entre la expresión de Ki-67 con el diagnóstico histológico

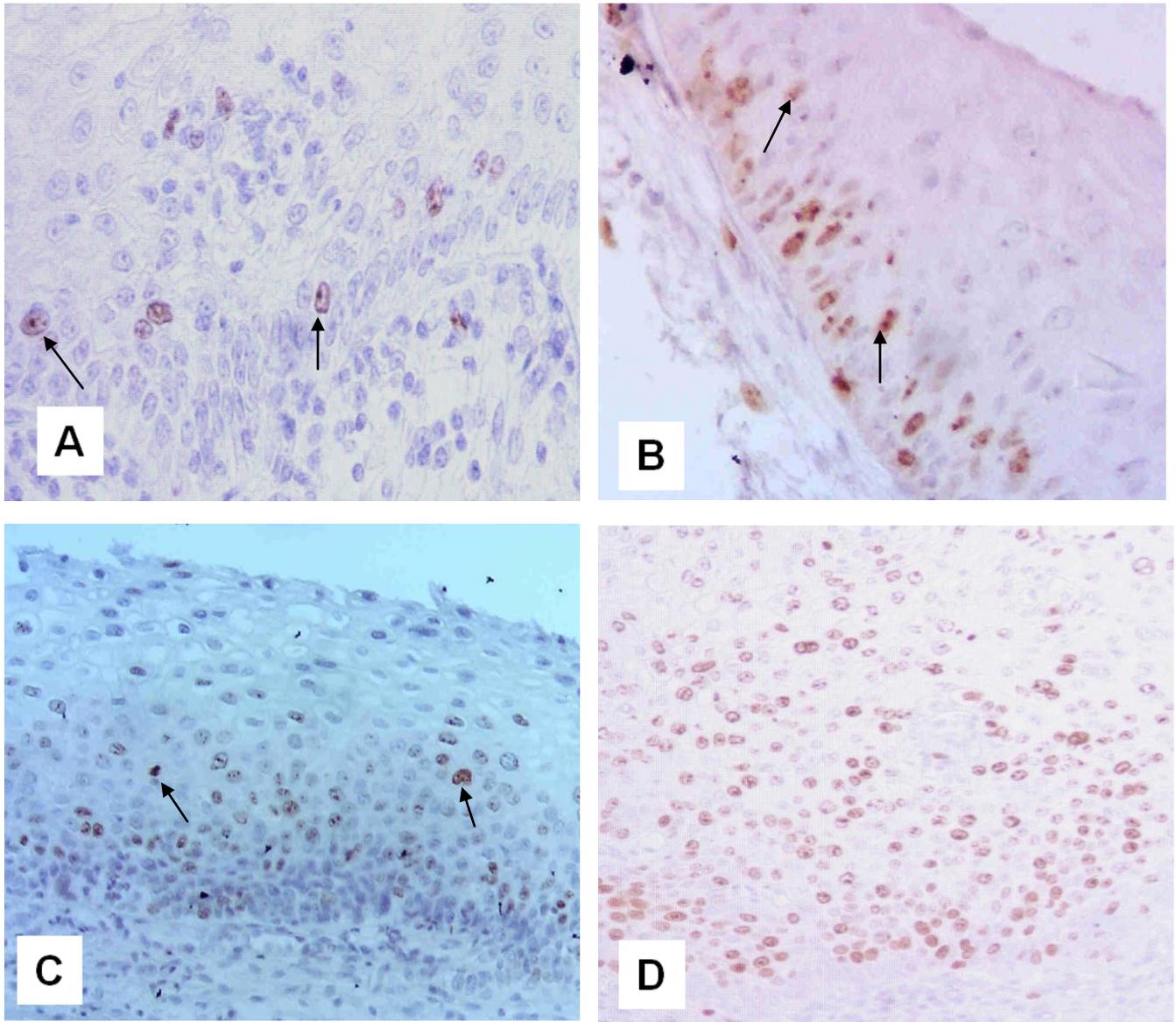
La expresión de Ki-67, habitualmente es únicamente nuclear y se dividió en mínima, moderada y alta, (Figura 7). Los resultados obtenidos de éste análisis se resumen en la tabla 9, donde se muestra que 71 casos con patrón de expresión mínima (n=84) presentaron NICs, encontrándose con mayor frecuencia en NIC I (32 casos), así mismo, 13 casos sin NIC también expresaron este patrón de tinción. Respecto a la expresión moderada, ésta se presentó en todos los grupos de NIC, predominando en NIC III. De los 57 casos con expresión alta de Ki-67, 56 de ellos tenían diagnóstico histológico de NICs, con predominio de NIC III en 42 casos, mientras que el grupo sin NIC solamente presentó un caso con expresión alta de Ki-67. El análisis estadístico para determinar la relación entre la expresión de la proteína Ki-67 y la progresión en el diagnóstico histológico mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 9 Correlación entre la expresión de Ki-67 con el diagnóstico histológico**

	Diagnóstico histológico				Valor $p$
	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III	
<b>Expresión de Ki-67</b>					
<b>n (%) Mínima (n=84)</b>	13 (15.5)	32 (38.1)	25 (29.8)	14 (16.7)	<0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Moderada (n=35)</b>	1 (2.9)	10 (28.6)	7 (20.0)	17 (48.6)	
<b>n (%) Alta (n=57)</b>	1 (1.8)	5 (8.8)	9 (15.8)	42 (73.7)	
<b>n (%) Total (n=176)</b>	15 (8.5)	47 (26.7)	41 (23.3)	73 (41.5)	

<sup>§</sup> $\chi^2$ , NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Respecto a la localización de la proteína Ki-67 en el epitelio cervical, esta fue variable y se dividió en las siguientes categorías: algunas células parabasales (cuando la reacción no abarcó el primer tercio del epitelio), primer o segundo tercio y todo el epitelio. En la tabla 10 se resumen los resultados obtenidos de la localización de la reacción por diagnóstico histológico.



**Figura 7. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67.** Cortes histológicos de cérvix que muestran en A: Expresión en muy escasas células en epitelio normal; B: Expresión moderada que abarca el primer tercio del epitelio en NIC I; C: Expresión moderada que abarca dos tercios del epitelio en NIC II, y D: Expresión alta que abarca todo el epitelio en NIC III. Las flechas señalan algunas de las células que muestran patrón de expresión nuclear. 100x

**Tabla 10 Correlación entre la localización de la expresión de Ki-67 con el diagnóstico histológico**

	Diagnóstico histológico				Valor <i>p</i>
	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III	
<b>Localización Ki-67</b>					
<b>Algunas PB (n=37)</b>	11 (73.3)	13 (27.7)	11 (26.8)	2 (2.7)	
<b>Primer tercio (n=47)</b>	2 (13.3)	20 (42.6)	14 (34.1)	11 (15.1)	<0.05 <sup>§</sup>
<b>Segundo tercio (n=34)</b>	1 (6.7)	9 (19.1)	7 (17.1)	17 (23.3)	
<b>Todo epitelio (n=58)</b>	1 (6.7)	5 (10.6)	9 (22.0)	43 (58.9)	
<b>Total (n=176)</b>	15 (100.0)	47 (100.0)	41 (100.0)	73 (100.0)	

<sup>§</sup>X<sup>2</sup>, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical, PB: Parabasales

En esta tabla se muestra que de 15 casos negativos a NIC, en 11 de ellos la reacción de Ki-67 se presentó en algunas células parabasales, 2 abarcando el primer tercio, y uno en cada caso, abarcando dos tercios o todo el epitelio. Respecto a los casos que presentaron NIC I (n=47), 13 de ellos expresaron la proteína en algunas células parabasales, la mayor cantidad la expresó en el primer tercio del epitelio (n=20), 9 presentaron expresión hasta dos tercios y 5 en todo el epitelio. Para los 41 casos con NIC II, también predominó la localización en el primer tercio (n=14), y del resto, 11 expresaron la proteína en algunas células parabasales, 7 hasta el segundo tercio y 9 en todo el epitelio. De los 73 casos diagnosticados como NIC III, preponderó la expresión que abarcó todo el epitelio (n=43), seguida por los casos que presentaron la expresión en el segundo tercio (n=17) y primer tercio (n=11), y solamente 2 casos en algunas células parabasales. El análisis mostró diferencias significativas entre la localización de la expresión de Ki-67 con la progresión en el diagnóstico histológico (*p* <0.05)

### 3.4 Correlación entre la expresión de p16<sup>INK4a</sup> con el diagnóstico histológico

La expresión de p16<sup>INK4a</sup> es citoplásmica y nuclear y se clasificó en negativa, esporádica, focal y difusa (Figura 8), según la escala semicuantitativa propuesta por Klaes et al en 2001. Los resultados obtenidos de este análisis se resumen en la tabla 11, en la cual se muestra que de los 85 casos que no expresaron p16<sup>INK4a</sup>, 16 de ellos correspondieron al grupo negativo a NIC, y los 69 restantes presentaron alguno de los tipos de NICs, con preponderancia de NIC I

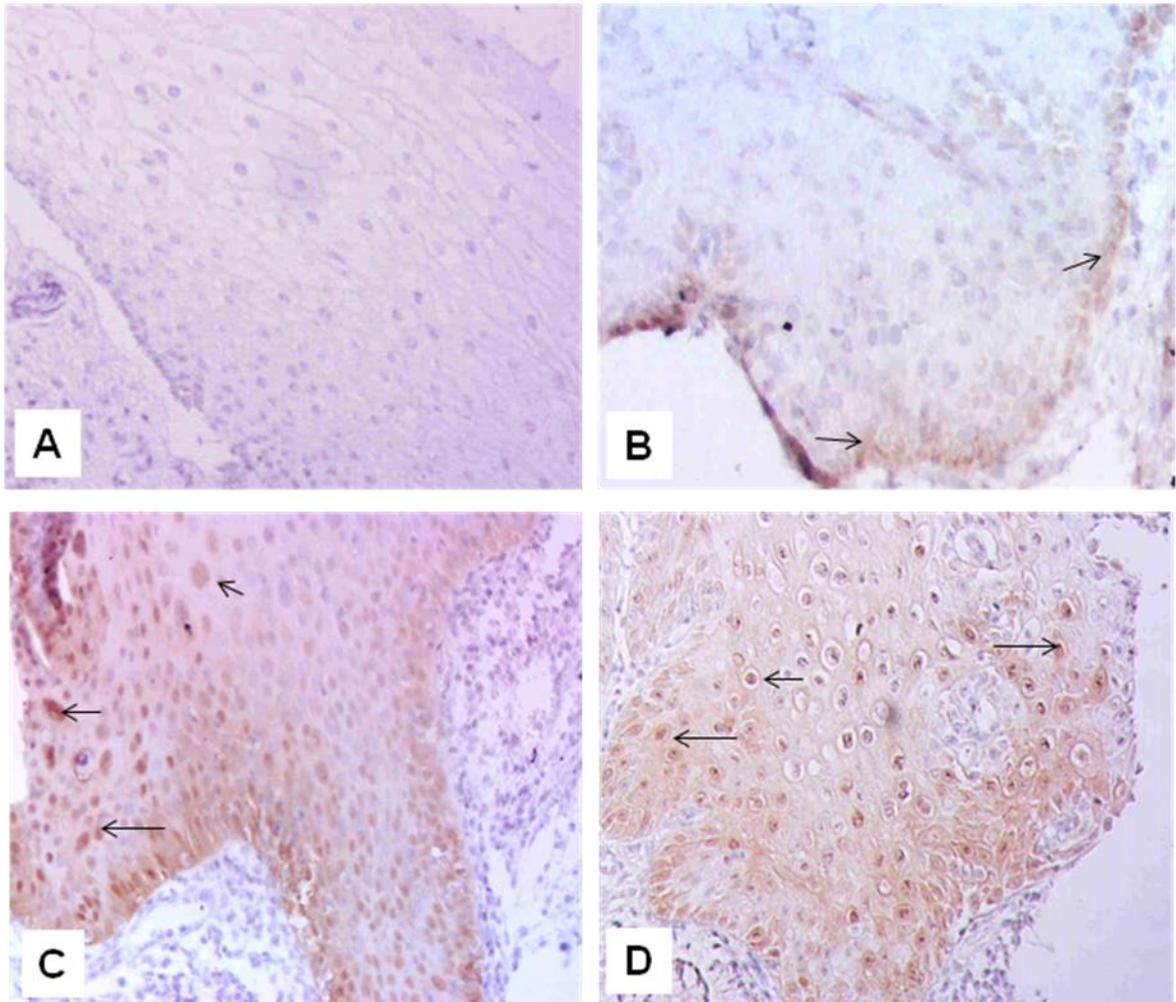
con 35 casos (41.2%). También se puede ver que 12 casos presentaron un patrón de expresión esporádica, y que tanto las NIC II como las NIC III mostraron este patrón de expresión. Ninguno de los casos negativos a NIC mostró expresión. Respecto a la expresión focal, ésta se observó en 24 casos (todos ellos con alguna NIC), de los cuales 14 (58.3%) fueron NIC III. La expresión difusa de la proteína (n=70) se presentó en 69 casos de NIC, siendo más frecuente en NIC III (68.6%), aunque también se presentó en un caso sin NIC. El análisis entre los diferentes patrones de expresión de p16<sup>INK4a</sup> respecto al diagnóstico histológico mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 11 Correlación entre la expresión de p16<sup>INK4a</sup> con el diagnóstico histológico.**

	Diagnóstico histológico				Valor p
	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III	
<b>Expresión de p16<sup>INK4a</sup></b>					
<b>(n) % Negativo (n=85)</b>	16 (18.8)	35 (41.2)	20 (23.5)	14 (16.5)	
<b>(n) % Esporádico (n=12)</b>	0	2 (16.7)	5 (41.7)	5 (41.7)	
<b>(n) % Focal (n=24)</b>	0	3 (12.5)	7 (29.2)	14 (58.3)	<0.05 <sup>§</sup>
<b>(n) % Difuso (n=70)</b>	1 (1.4)	8 (11.4)	13 (18.6)	48 (68.6)	
<b>(n) % Total (n=191)</b>	17 (8.9)	48 (25.1)	45 (23.6)	81 (42.4)	

<sup>§</sup>X<sup>2</sup>, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

La localización de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> en el epitelio se dividió en negativa, algunas células parabasales, primer tercio, segundo tercio y todo el epitelio. Los resultados obtenidos de este análisis se resumen en la tabla 12, en donde se puede observar que de 17 casos negativos a NIC, 16 no expresaron la proteína, y solo un caso presentó expresión, la cual abarcó todo el epitelio. Para las 48 NIC I, 35 de ellas no presentaron expresión, y 13 expresaron la proteína abarcando desde el primer tercio a todo el epitelio. En los casos con diagnóstico de NIC II (n=45), no se presentó expresión en 20 de ellos, de los restantes (n=25), 13 expresaron la proteína en todo el epitelio (n=13), 7 hasta el segundo tercio, 4 en el primer tercio y solamente uno en algunas células parabasales. Respecto a los casos con NIC III (n=81), en ellos 14 no presentaron expresión, 4 expresaron en el primer tercio, 15 en el segundo y 48 en todo el epitelio. Se obtuvieron diferencias significativas entre la localización de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> con la progresión del diagnóstico histológico ( $p < 0.05$ ).



**Figura 8. Expresión inmunohistoquímica de p16<sup>INK4a</sup>.** Cortes histológicos de cérvix que muestran en A: Epitelio normal sin expresión; B: Expresión focal en células parabasales; C y D: Expresión difusa que abarca todo el epitelio en NIC III. Las flechas señalan algunas de las células que muestran patrón de expresión nuclear y citoplásmico. 100x

**Tabla 12 Correlación entre la localización de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> con el diagnóstico histológico**

	Diagnóstico histológico				Valor <i>p</i>
	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III	
<b>Localización p16<sup>INK4a</sup></b>					
<b>Negativo (n=85)</b>	16 (94.1)	35 (72.9)	20 (44.4)	14 (17.3)	
<b>Algunas PB (n=1)</b>	0	0	1 (2.2)	0	
<b>Primer tercio (n=9)</b>	0	1 (11.1)	4 (8.8)	4 (4.9)	<0.05 <sup>§</sup>
<b>Segundo tercio (n=26)</b>	0	4 (8.3)	7 (15.6)	15 (18.5)	
<b>Todo epitelio (n=70)</b>	1 (5.9)	8 (16.7)	13 (28.9)	48 (59.3)	
<b>Total (n=191)</b>	17 (100.0)	48 (100.0)	45 (100.0)	81 (100.0)	

<sup>§</sup>X<sup>2</sup>, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical, PB: Parabasales

Con el fin de determinar la relación entre la expresión de Ki-67 así como de p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR, se elaboraron las tablas 13 y 14 en las que se resumen los resultados obtenidos.

### 3.5 Correlación entre la expresión de Ki-67 con el estado físico del DNA del VPHAR

Como se muestra en la tabla 13, 30 casos en los que la expresión de Ki-67 fue mínima, hubo expresión del DNA viral variando de la forma difusa a puntiforme, con predominio del tipo difuso en 45.2% de ellos. Sin embargo, la mayoría de casos (n=32) con esta expresión de la proteína, fueron negativos para DNA viral. En lo que se refiere a la expresión moderada de Ki-67 (n=31), ésta se presentó desde aquellos casos que fueron negativos a la expresión del DNA del VPH (n=6) hasta aquellos con expresión puntiforme, sin embargo, la mayor cantidad de casos con este patrón de expresión fue en aquellos donde el DNA del VPH se expresó en forma difusa VPH (n=18). En 36 de 38 casos con patrón de expresión alta de Ki-67, también mostraron expresión del DNA viral, de ellos, el mayor porcentaje correspondió al tipo difuso en 52.6%, seguido del tipo puntiforme en 36.8%. Dos casos con expresión alta de esta proteína fueron negativos para DNA viral. El análisis mostró diferencias significativas entre el patrón de expresión de Ki-67 con el estado físico del DNA viral (*p* <0.05).

**Tabla 13 Correlación entre la expresión de Ki-67 con el estado físico del DNA del VPHAR**

	Estado físico del DNA del VPHAR				Valor <i>p</i>
	Negativo	Difuso	Mixto	Puntiforme	
<b>Expresión de Ki-67</b>					
<b>n (%) Mínima (n= 62)</b>	32 (51.6)	28 (45.2)	1 (1.6)	1 (1.6)	
<b>n (%) Moderada (n=31)</b>	6 (19.4)	18 (58.1)	2 (6.5)	5 (16.1)	<0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Alta (n=38)</b>	2 (5.3)	20 (52.6)	2 (5.3)	14 (36.8)	
<b>n (%) Total (n=131)</b>	40 (30.5)	66 (50.4)	5 (3.8)	20 (15.3)	

<sup>§</sup>Chi cuadrada, VPHAR: virus del papiloma humano de alto riesgo

### 3.6 Correlación entre la expresión de p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR

La tabla 14 muestra que de 61 casos negativos para la expresión de p16<sup>INK4a</sup>, 33 no presentaron DNA del VPH, mientras que 28 sí expresaron el genoma viral, ya sea difuso o puntiforme, siendo más frecuente el tipo difuso (n=24). Entre los casos con expresión esporádica a la proteína (n=16), 14 (87.5%) expresaron la forma difusa del DNA viral, uno puntiforme y en otro no lo expresó. Respecto al patrón de expresión focal a p16<sup>INK4a</sup>, éste se presentó en 17 casos, de ellos 15 expresaron el DNA viral, con predominio del tipo difuso (n=11), dos con patrón mixto y dos solamente puntiforme. En dos casos con este patrón de expresión de la proteína no se observó DNA viral. Para el patrón de expresión difusa de p16<sup>INK4a</sup>, este se presentó en 45 casos, en 4 de ellos no se evidenció DNA viral, y 41 lo expresaron ya sea difuso el mayor porcentaje (46.7%), puntiforme (37.8%) o ambos (6.7%). Se obtuvieron diferencias significativas entre el patrón de expresión de Ki-67 con el estado físico del DNA viral (*p* <0.05).

**Tabla 14 Correlación entre la expresión de p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR**

	Estado físico del DNA del VPHAR				Valor <i>p</i>
	Negativo	Difuso	Mixto	Puntiforme	
<b>Expresión de p16<sup>INK4a</sup></b>					
<b>% Negativo (n=61)</b>	33 (54.1)	24 (39.3)	1 (1.6)	3 (4.9)	
<b>% Esporádico (n=16)</b>	1 (6.3)	14 (87.5)	0	1 (6.3)	<0.05 <sup>§</sup>
<b>% Focal (n=17)</b>	2 (11.8)	11 (64.7)	2 (11.8)	2 (11.8)	
<b>% Difuso (n=45)</b>	4 (8.9)	21 (46.7)	3 (6.7)	17 (37.8)	
<b>% Total (n=139)</b>	40 (28.8)	70 (50.4)	6 (4.3)	23 (16.5)	

<sup>§</sup>X<sup>2</sup>, VPHAR: virus del papiloma humano de alto riesgo

Con el propósito de comparar la expresión de las proteínas Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR por diagnóstico histológico los datos se distribuyeron como se observa en las tablas 15 a la 18.

### **3.7 Expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR en casos negativos a NIC**

La tabla 15 muestra que de los casos sin NIC (n=12), 10 presentaron expresión mínima de Ki-67 y negativa a VPH, uno presentó expresión moderada de la proteína y DNA del VPH con patrón difuso, y uno con expresión alta de Ki-67 presentó patrón puntiforme del genoma viral. El patrón de expresión de Ki-67 respecto al estado físico del DNA viral mostró significancia ( $p < 0.05$ ).

Respecto a la expresión de p16<sup>INK4a</sup> en los casos negativos a NIC (n=12), 11 fueron negativos a p16<sup>INK4a</sup>, 10 no expresaron DNA viral y uno presentó el patrón difuso del genoma viral. El otro caso expresó la proteína con patrón difuso y el genoma viral de tipo puntiforme. La expresión de p16<sup>INK4a</sup> y el estado físico del DNA viral fueron significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 15 Correlación entre la expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR en casos sin NIC**

	Estado físico del DNA del VPHAR			Valor de <i>p</i>
	Negativo	Difuso	Puntiforme	
<b>Expresión de Ki-67</b>				
<b>n (%) Mínima (n=10)</b>	10 (100.0)	0	0	
<b>n (%) Moderada (n=1)</b>	0	1(100.0)	0	<0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Alta (n=1)</b>	0	0	1(100.0)	
<b>n (%) Total (n=12)</b>	10 (83.3)	1(8.3)	1(8.3)	
<b>Expresión de p16<sup>INK4a</sup></b>				
<b>n (%) Negativo (n=11)</b>	10 (90.9)	1 (9.09)	0	
<b>n (%) Difuso (n=1)</b>	0	0	1(100.0)	<0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Total (n=12)</b>	10 (83.3)	1 (8.3)	1 (8.3)	

<sup>§</sup>X<sup>2</sup>, VPHAR: virus del papiloma humano de alto riesgo

El análisis entre la expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> en relación con el estado físico del DNA del VPH en casos con NIC I, no mostró diferencias significativas (datos no mostrados).

### **3.8 Expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR en NIC II**

La expresión de Ki-67 con el estado físico del genoma viral en este tipo de lesión no fue significativa (datos no mostrados).

En cuanto a la expresión de p16<sup>INK4a</sup> en NIC II (n=25), en la tabla 16 se muestra que en 9 casos sin expresión, 4 presentaron DNA viral con patrón difuso, y 5 no lo expresaron DNA viral. La expresión esporádica (n=4) y focal (n=3), se presentó exclusivamente en los casos con DNA viral con patrón difuso. En los 9 casos de expresión difusa, 5 presentaron DNA viral con patrón difuso, 3 puntiforme, y solo uno no lo expresó. El análisis estadístico entre la expresión de p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA viral, fue significativo ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 16 Correlación entre la expresión de p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPH de alto riesgo en NIC II**

	Estado físico del DNA del VPHAR			Valor p
	Negativo	Difuso	Puntiforme	
<b>Expresión de p16<sup>INK4a</sup></b>				
<b>n (%) Negativo (n=9)</b>	5 (55.6)	4 (44.4)	0	
<b>n (%) Esporádico (n=4)</b>	0	4 (100.0)	0	
<b>n (%) Focal (n=3)</b>	0	3 (100.0)	0	<0.05 <sup>§</sup>
<b>n (%) Difuso (n=9)</b>	1 (11.1)	5 (55.6)	3 (33.3)	
<b>n (%) Total (n=25)</b>	6 (24.0)	16 (64.0)	3 (12.0)	

<sup>§</sup>X<sup>2</sup>, VPHAR: virus del papiloma humano de alto riesgo

El análisis entre la expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> en relación con el estado físico del DNA del VPH en casos con NIC III, no fue significativo (datos no mostrados).

Adicionalmente se relacionó la expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> con el diagnóstico histológico y la infección por VPH de alto (VPHAR) y/o bajo riesgo (VPHBR), para lo cual se determinó por HIS la presencia del genoma viral de bajo riesgo en 20 casos. La expresión del estado físico del DNA viral de bajo riesgo se presentó exclusivamente con patrón difuso. Los datos se resumen en las tablas 17 y 18.

En la tabla 17 se muestra que los casos en que no se detectó infección por VPH la expresión de Ki-67 fue mínima y moderada en un caso de NIC I. Cuando la infección se debió solamente a VPHBR la expresión de Ki-67 fue mínima.

Respecto a los casos positivos para VPHAR (n=9), éstos se distribuyeron en patrón difuso (n=7), mixto (n=1) y puntiforme (n=1). En el caso de los de patrón difuso, 4 presentaron simultáneamente expresión para VPHBR, así como un caso con expresión puntiforme. La expresión de Ki-67 fue mínima en los casos que solamente expresaron VPHAR, moderada en un caso negativo a NIC, y alta en un caso de NIC III, mientras que en los casos positivos a VPHBR, la expresión de Ki-67 fue mínima en un caso de NIC II, moderada en uno de NIC I y uno de NIC III, y alta en un caso de NIC II. Para los casos con infección por VPHAR tanto de patrón mixto como puntiforme la expresión de Ki-67 en ambos fue moderada y se presentó en casos de NIC III.

**Tabla 17 Distribución de los resultados por tipo de VPH, patrón de expresión de Ki-67 y diagnóstico histológico**

HIS		IHQ	Diagnóstico histológico			
VPHAR	VPHBR	Ki-67	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III
Neg (n=11)	Neg (n=10)	Mín (n=9)	4	4	0	1
		Mod (n=1)	0	1	0	0
	Pos (n=1)	Mín (n=1)	0	0	1	0
Dif (n=7)		Mín (n=1)	0	0	1	0
	Neg (n=3)	Mod (n=1)	1	0	0	0
		Alta (n=1)	0	0	0	1
		Mín (n=1)	0	0	1	0
	Pos (n=4)	Mod (n=2)	0	1	0	1
		Alta (n=1)	0	0	1	0
Mix (n=1)	Neg (n=1)	Mod (n=1)	0	0	0	1
Punt (n=1)	Pos (n=1)	Mod (n=1)	0	0	0	1

NIC: neoplasia intraepitelial cervical, HIS: hibridación *in situ*, IHQ: inmunohistoquímica, VPHAR: virus del papiloma humano de alto riesgo, VPHBR: virus del papiloma humano de bajo riesgo, Neg: negativo, Pos: positivo, Dif: difuso, Mix: mixto, Punt: puntiforme, Min: mínima, Mod: moderada

La tabla 18 muestra que en los casos en que no se detectó infección por VPH la expresión de p16<sup>INK4a</sup> también fue negativa independientemente del tipo de lesión. Únicamente se encontró un caso positivo a VPHBR con expresión negativa a p16<sup>INK4a</sup>.

Respecto a los casos positivos para VPHAR (n=9), éstos expresaron patrón difuso (n=6), mixto (n=1) y puntiforme (n=2). En 3 de los 6 casos con patrón difuso, y en uno de los 3 casos con patrón puntiforme se detectó co-infección con VPHBR. En el caso donde solamente se evidenció VPHBR la expresión de p16<sup>INK4a</sup> fue negativa. Para el caso con infección por VPHAR con patrón mixto, no hubo co-infección con VPHBR, la expresión de p16<sup>INK4a</sup> fue difusa y presentó NIC III. Respecto a los dos casos con expresión del VPHAR con patrón puntiforme, en ambos hubo co-infección con VPHBR, uno de ellos no expresó p16<sup>INK4a</sup> y presentó NIC III, y el otro expresó el patrón difuso de la proteína con diagnóstico de NIC II.

**Tabla 18 Distribución de los resultados por tipo de VPH, patrón de expresión de p16<sup>INK4a</sup> y diagnóstico histológico**

HIS		IHQ	Diagnóstico histológico			
VPHAR	VPHBR	p16 <sup>INK4a</sup>	S/NIC	NIC I	NIC II	NIC III
Neg (n=11)	Neg(n=10)	Neg (n=10)	4	5	0	1
	Pos (n=1)	Neg (n=1)	0	0	1	0
Dif (n=6)	Neg (n=3)	Neg (n=2)	1	0	1	0
		Dif (n=1)	0	0	0	1
	Pos (n=3)	Neg (n=1)	0	1	0	0
		Esp (n=1)	0	0	0	1
		Dif (n=1)	0	0	1	0
Mix (n=1)	Neg (n=1)	Dif (n=1)	0	0	0	1
Punt (n=2)	Pos (n=2)	Neg (n=1)	0	0	0	1
		Dif (n=1)	0	0	1	0

NIC: neoplasia intraepitelial cervical, HIS: hibridación *in situ*, IHQ: inmunohistoquímica, VPHAR: virus del papiloma humano de alto riesgo, VPHBR: virus del papiloma humano de bajo riesgo, Neg: negativo, Pos: positivo, Dif: difuso, Mix: mixto, Punt: puntiforme, Esp: esporádico.

---

---

#### IV. DISCUSION

El objetivo del trabajo fue relacionar la presencia y estado físico del DNA del VPH con la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 en lesiones premalignas de mujeres residentes de la ciudad de México, y por tal motivo lo primero fue establecer el diagnóstico definitivo del material a estudiar, como se muestra en la tabla 4 se presentaron tanto el diagnóstico previo como el definitivo, el cual fue el que se tomó como referencia para la interpretación de los resultados. En esta tabla se observa que hubo una discordancia muy importante entre estos diagnósticos, lo que coincide con los estudios realizados por McCluggage et al. 1996 y Curiel et al. 2007, los cuales fueron realizados para determinar la concordancia diagnóstica en histología cervical concluyendo que los criterios diagnósticos de histología convencional no son reproducibles o no se aplican correctamente.

Los casos incluidos se distribuyeron por grupos de edad y diagnóstico histológico (Tabla 5) en menores de 20 años y posteriormente en grupos de 10 años hasta el último de 51 o más. En este estudio, los grupos etarios con mayor incidencia de NICs (con predominio de NIC III) fueron los de 21-30 y 31-40 años, estos resultados concuerdan con el estudio realizado en la India por Gupta et al 2008, en el cual la mayor incidencia de NICs se presentó en el grupo de 30-39 años y lo reportado por la Dirección General de Epidemiología (SSA, 2007), en que se muestra que el grupo de edad de 25 a 44 años es el que presenta mayor cantidad de casos de NIC I y NIC II (2307/4302) y NIC III (296/750), aunque en este estudio hay lesiones desde los 21 años.

Con respecto a la distribución de los factores de riesgo primarios y secundarios por diagnóstico histológico (Tablas 6 y 7) encontramos diferencias significativas solo en el inicio de vida sexual activa (IVSA), respecto a la progresión del diagnóstico histológico, también es evidente que el grupo más afectado fue el de las mujeres con IVSA menores a los 18 años, ya que tuvieron mayor incidencia de NIC III, lo cual es congruente con estudios como el de Talavera (2006) en Nicaragua y el de Zúñiga et al. (2008) en Venezuela, en donde el mayor porcentaje de casos de lesiones precursoras de cáncer se presentó en pacientes con IVSA entre 15 y 17 años, y menores de 19 años, respectivamente. Esto puede deberse a que el inicio de vida sexual a temprana edad aumenta el riesgo de infección por VPH y por ende del desarrollo de lesiones precursoras y cáncer cervicouterino. Se ha estimado 1.6 y 2.6 veces

---

más riesgo en mujeres con IVSA menor a 17 y 20 años respectivamente que en las de IVSA a mayor edad (Eppel et al. 2000; Tirado et al. 2005).

Respecto a la infección por VPH y al estado físico de su genoma, se encontró expresión positiva a VPHAR en el 81.9% de los casos de NIC, esta proporción es similar a la encontrada por Alarcón L en 2006, quien detectó 82.8% de infección por VPHAR mediante HIS en población guerrerense.

En nuestra población, el mayor porcentaje de casos sin presencia de VPHAR correspondió a los casos negativos a NIC, NIC I y en menor frecuencia en NIC II y NIC III. Estos resultados pueden atribuirse, desde el punto de vista metodológico, a que la infección pudiera deberse a algún tipo viral que no haya sido incluido en el coctel de sondas utilizadas para la HIS; por otro lado considerando que tanto el proceso inflamatorio ocasionado por la infección viral como la presencia de factores agregados tales como bacterias, virus como el herpes y hongos, provocan inducción y liberación autócrina de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1) por el epitelio cervical. Dichas citocinas, de acuerdo a estudios realizados en líneas celulares de origen cervical, inhiben la replicación del genoma viral provocando que en etapas tempranas de la infección el número de copias virales sea mínimo y no se alcance la cantidad de 30 copias de DNA viral necesarias para la detección por HIS (Scott et al. 2001).

La mayor cantidad de casos positivos a VPHAR lo expresaron en forma difusa (estado episomal), y se presentó en los 3 tipos de NIC y sólo en un caso negativo a NIC. El hecho de que el estado episomal sea el más frecuentemente detectado implica que dichos casos tienen menor riesgo de progresión ya que de acuerdo con Pett y Coleman 2007, este estado del genoma viral no implica la desregulación de E2 por lo que la expresión de E6 y E7 esta adecuadamente regulada; aunque sí se considera un riesgo potencial para la integración del genoma viral lo que se traduciría en una progresión de las lesiones a carcinoma invasor. Es por esto que debería realizarse un seguimiento de estos casos lo cual permitiría detectar a tiempo la integración del genoma viral y por ende la expresión desregulada de E6 y E7.

La expresión mixta fue negativa en los casos sin NIC y positiva en los 3 tipos de NIC. La puntiforme (estado integrado del DNA del VPH) se presentó en los 3 tipos de NIC siendo más frecuente en las NIC III. Es decir, se encontró un aumento de casos con DNA viral integrado a

---

medida que progresó la lesión de NIC I a NIC III. Obteniendo diferencias significativas entre el estado físico del DNA del VPHAR con la progresión del diagnóstico histológico (Figura 6). En el estado integrado la expresión de las proteínas E6 y E7 está desregulada por lo que existe una interacción de estas proteínas virales con las proteínas del hospedero pRb relacionada con la proliferación y p53 con la apoptosis por activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, dicha interacción induce la degradación de las mismas por ubiquitinación. Por otro lado, a medida que se integra el DNA viral en sitios de alta fragilidad del genoma celular, la expresión de la transcripción de los genes involucrados en la regulación de la proliferación y apoptosis se desregula y por lo tanto, se irán acumulando una serie de mutaciones que junto con la elevada expresión de las proteínas virales llevarán a la progresión de las lesiones cervicales (Pett y Coleman 2007; López y Aristizabal 2006; Krauss 2003)

Dos casos negativos a NIC, presentaron DNA viral, uno de ellos con expresión difusa y el otro con expresión puntiforme, lo que indica que, aunque morfológicamente no haya datos de infección viral, el genoma del VPH está presente en estado episomal e integrado, respectivamente, por lo cual existe mayor riesgo de progresión a NICs. Estos hallazgos demuestran la utilidad de la detección del estado físico del genoma viral en la progresión de las NICs, ya que se considera que las lesiones con genoma viral integrado tienen un alto riesgo de progresión por lo ya expuesto.

En cuanto a la correlación entre la expresión y localización de Ki-67 por diagnóstico histológico (Tablas 9 y 10), el mayor porcentaje de casos con expresión mínima correspondió a NIC I (38.1%), mientras que la expresión moderada y alta fue mayor en NIC III, dos casos negativos a NIC también presentaron este patrón de expresión, lo cual indica que tienen elevada actividad proliferativa, lo que puede deberse a que se trata de casos que presentan algún proceso inflamatorio, lo que concuerda con lo obtenido por Agoff et al en el 2003, en biopsias con diagnóstico histológico normal o inflamatorio (n=120), en las que observó la expresión moderada y alta de Ki-67 en 15 y 5 casos respectivamente.

Respecto a la localización de la expresión de Ki-67 (Tabla 10), la mayoría del grupo negativo a NIC presentó expresión exclusivamente en células parabasales, los casos con NIC I y NIC II en el primer y segundo tercio, y los casos con NIC III en el segundo tercio y todo el epitelio, lo que correlaciona con el diagnóstico histológico. Así mismo, 4 casos negativos a NIC,

---

presentaron expresión que abarcó desde el primer tercio en dos de ellos, el segundo tercio en otro, y todo el epitelio en el caso restante. De lo mencionado podemos señalar que existe una correlación significativa entre la expresión y localización de la proteína Ki-67 con la progresión preneoplásica, es decir, la expresión de Ki-67 aumenta al progresar el grado de lesión, así mismo su localización se relaciona significativamente con el grado de lesión histológica ( $p < 0.05$ ), por lo cual este marcador representa una herramienta esencial en el diagnóstico histológico, que hasta el momento es exclusivamente dependiente del criterio del observador. La expresión desregulada de la proteína viral E7 favorece la degradación de pRb, por lo que la proliferación celular se ve aumentada y por lo tanto, ya que Ki-67 es una proteína nuclear, la expresión de la misma aumenta proporcionalmente en cada división celular, es por ello que queda de manifiesto que puede funcionar como un buen marcador de proliferación y progresión de las lesiones precursoras de CaCu. Este marcador permite discriminar entre casos particulares, como se comprueba en dos casos en los que el criterio morfológico fue negativo pero la expresión de Ki-67 correspondió a NIC II y NIC III. Así mismo, 4 casos negativos a NIC, abarcaron desde un tercio hasta todo el epitelio, el comportamiento en 2 de ellos fue como NIC I, otro como NIC II y el restante como NIC III, lo que indica que la expresión de Ki-67 permite detectar la progresión a NIC en casos sin evidencia morfológica de alteración.

En cuanto a la correlación entre la expresión y localización de p16<sup>INK4a</sup> por diagnóstico histológico (Tabla 11 y 12) el mayor porcentaje de casos sin expresión correspondió a NIC I (41.2%), la expresión esporádica predominó en NIC II y NIC III, y los patrones de expresión focal y difuso principalmente en NIC III. Un caso negativo a NIC también presentó expresión difusa. Respecto a la localización de la expresión, la mayor cantidad de casos negativos a NIC y algunos de NIC I no expresaron la proteína, y solamente 8 casos de NIC I presentaron expresión en todo el epitelio (patrón difuso). En los casos de NIC II y NIC III la mayor cantidad la expresaron en todo el epitelio. Lo anterior implica que se obtuvo una correlación significativa entre la expresión y localización de la proteína p16<sup>INK4a</sup> con el diagnóstico histológico, es decir, que aumentó la expresión difusa de la proteína a medida que aumentó el grado de lesión, y que dicha expresión permite distinguir entre aquellos casos cuyo comportamiento biológico no coincide con el diagnóstico histológico. Un ejemplo de ello es el caso negativo a NIC, que expresó la proteína en todo el epitelio. Lo cual sugiere que aunque

---

todavía no haya alteración morfológica si puede estar presente un proceso de transformación celular, que posiblemente se deba a un VPHAR dada la relación propuesta para p16<sup>INK4a</sup> y este virus (Toro et al. 2005; Hardisson 2005). Así mismo, los casos con NIC I y NIC II que expresaron la proteína en todo el epitelio mostraron un comportamiento similar al de NIC III, por lo que posiblemente progresarán a ese grado de lesión. Resultados semejantes han sido obtenidos por Klaes et al. (2001), donde 13 de 48 casos diagnosticados histológicamente como inflamatorios presentaron expresión de p16<sup>INK4a</sup>, 10 con patrón esporádico y 3 focal. Es importante reconocer que, en general, en el estrato parabasal comienza a aumentar el número de copias del genoma viral, lo cual concuerda con datos experimentales en los que se ha determinado que si bien, la infección por VPHAR se lleva a cabo en el estrato basal, la integración del genoma viral y la desregulación de E2 viral comienza a partir de que las células inician su diferenciación al estrato parabasal (Woodman et al. 2007).

En lo referente a la expresión de Ki-67 con el estado físico del DNA del VPHAR (Tabla 13), se observa que la mayor cantidad de casos con expresión mínima no presentaron infección por VPHAR, la expresión moderada predominó en casos con genoma viral difuso, y la expresión alta en casos con DNA viral difuso y puntiforme.

Respecto a la correlación entre la expresión de p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR (Tabla 14) no se evidenció el DNA viral del VPHAR en los casos sin expresión de p16<sup>INK4a</sup>, los patrones esporádico y focal, se presentaron principalmente en casos con DNA viral episomal, pero contrario a lo esperado el patrón difuso no solo predominó en los casos con DNA viral integrado, sino también en los de estado episomal. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kalof et al. (2005), quienes reportan 44.4% de casos con VPHAR episomal (n=18) y 100% de casos con expresión puntiforme (n=20), que presentaron patrón difuso de p16<sup>INK4a</sup>. Respecto a los casos con genoma en estado episomal que expresaron el patrón difuso de p16<sup>INK4a</sup> podrían indicar que la sobre-expresión de p16<sup>INK4a</sup> no necesariamente es consecuencia de la integración del genoma viral, lo cual queda de manifiesto en 8 casos negativos a VPHAR donde hubo expresión de p16<sup>INK4a</sup> asociado a un proceso inflamatorio intenso ajeno al VPHAR, dicha sobreexpresión posiblemente sea el resultado de la activación de la vía de Ras y del factor de transcripción Myc, los cuales regulan la expresión de p16<sup>INK4a</sup> en células humanas; la activación de esta vía puede deberse

---

principalmente a factores de estrés celular tales como hipoxia, estrés de tipo oxidativo, radiaciones ionizantes entre otros; considerando las características del microambiente uterino como es el proceso inflamatorio crónico, dichos elementos deben ser identificados en estas lesiones con el fin de relacionar todos los factores que de forma independiente a la infección viral pudiesen estar favoreciendo la proliferación y la inhibición de la apoptosis (Gil y Peters 2006).

De la correlación entre Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> con el estado físico del DNA del VPHAR en casos negativos a NIC (Tabla 15), se puede ver que en 10 de ellos, se presentó expresión mínima de Ki-67, y negativa de p16<sup>INK4a</sup>, además de que no se evidenció infección por VPHAR. Estos datos correlacionan significativamente ( $p < 0.05$ ) con el diagnóstico histológico, aunque es prudente señalar que al menos en 2 de ellos tanto la presencia y estado físico viral como la expresión de proteínas indican que hay alta probabilidad de progresión a NIC. Lo anterior pone de manifiesto la importancia de la detección del estado físico del genoma viral y de las proteínas estudiadas, sobretodo en casos en que no se presentan alteración morfológica. En lo que respecta a la expresión de Ki-67 en NIC I, II y III no se obtuvo asociación con el estado físico del DNA del VPHAR debido a la dispersión en los datos y a la disminución del número muestral al restringir el análisis exclusivamente a dichos grupos por separado. Sin embargo fue importante realizarlos dado que nos permitió conocer si había alguna tendencia a la progresión en cada uno de los grupos analizados (datos no mostrados).

En la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y el estado físico del DNA del VPHAR en casos con diagnóstico de NIC II (Tabla 16), se observa que prácticamente las mitad de casos sin expresión de la proteína tampoco presentaron infección por VPHAR, lo cual podría indicar la posibilidad de que estos casos pertenezcan al grupo de lesiones que sufren una regresión espontánea, cuyo proceso no está bien dilucidado. Tanto la expresión esporádica como la focal, se presentaron en casos con patrón difuso del DNA viral. En el caso de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> en NIC I y NIC III, no se obtuvo asociación con el estado físico del DNA del VPHAR debido a las mismas razones antes mencionadas para Ki-67 (datos no mostrados).

En las tablas 17 y 18 donde se reporta la distribución de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup>, por diagnóstico, se observa que en 20 casos fue posible la detección de VPHBR mediante HIS, así mismo que en 6 casos con infección por VPHBR 5 de ellos presentaron co-infección por VPHAR y solamente

---

un caso presentó infección exclusiva por VPHBR; en este caso se encontró una expresión mínima de Ki-67 y negativa de p16<sup>INK4a</sup> lo que implica que aunque se trata de un solo caso la expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> se presenta cuando está presente una infección por VPHAR. Estos hallazgos implican que, como se mencionó en la introducción, hay diferencias estructurales de las proteínas E6 y E7 provenientes de VPHBR con respecto a las proteínas de los VPHAR, lo que las hace menos afines a las proteínas blanco del hospedero, pRb y p53, lo cual explicaría el no haber encontrado expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> cuando no está presente el VPHAR.

Integrando los resultados obtenidos con el ciclo infeccioso del VPH en tejido cervical, podemos proponer que desde que el VPH ingresa a la célula mediante proteínas transmembranales como la  $\alpha$  integrina, se induce la activación de la cinasa de tirosina no receptora FAK por autofosforilación, creando sitios de unión para Src (cinasa de tirosina no receptora codificada por el oncogén Src el cual fosforila a FAK en otros residuos de tirosina creando más sitios de unión para otras proteínas tales como la proteína adaptadora Grb2, y otras como PI3K (cinasa 3 de fosfoinositidos). La proteína Grb2 formará un complejo con Sos, el cual es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que da lugar a la activación de la vía de Ras, que estimula la proliferación celular y la expresión de la proteína Ki-67 como lo observamos en los casos analizados (McCubrey et al. 2007; Cooper 2006).

Por otro lado, el virus se establece inicialmente de forma episomal y transcribe sus proteínas de manera regulada, como ya se ha explicado, lo que significa que la expresión de E6 y E7 aumentará proporcionalmente con el número de copias de genoma replicadas; por lo que podemos inferir que dichas proteínas virales, además de favorecer la proliferación por acción directa sobre el ciclo celular, también, al interactuar E6 con p53, se inducirá la alteración en la expresión de las fosfatasa que regulan la actividad de cinasas río abajo de Ras (Raf/MEK/ERK), con lo que permanecerán activas y aumentaran la transcripción de c-Myc, y este a su vez aumenta la transcripción de p16<sup>INK4a</sup>. Todo lo anterior nos indica que la unión del virión con las integrinas va a propiciar la activación de vías antiapoptóticas como la vía de PI3K, lo que propiciará la carcinogénesis; así mismo, la activación de la vía de Ras que regula la organización del citoesqueleto de actina, y controla diversos procesos celulares, incluidos la motilidad celular, la adhesión celular y la citocinesis por activación de las proteínas Rho,

---

explica la presencia de diversos grados de lesión (NICs) en los tejidos donde el genoma viral se encuentra en estado episomal y que para este estudio, fue el predominante (McCubrey et al. 2007; Cooper 2006).

---

## V. CONCLUSIONES

En la población del Distrito Federal, el rango de edad en el que se presentó la mayor incidencia de neoplasia intraepitelial cervical fue en el de 21 a 40 años, y se asoció significativamente con el IVSA antes de los 18 años.

La infección por VPHAR se presentó en el 81.9% de los casos con lesiones premalignas cervicales y predominó el estado episomal (50.7%) del genoma viral.

El estado físico del DNA del VPHAR se asoció significativamente con la progresión de las NICs, en las que el patrón de expresión puntiforme se relacionó con mayor riesgo de progresión.

La infección por VPHBR se presentó en el 40% de los casos de las lesiones cervicales estudiados y ésta fue principalmente como co-infección con VPHAR.

El DNA del VPHAR se relacionó significativamente con la expresión una alta Ki-67 y difusa de p16<sup>INK4a</sup>, y esto correlacionó con el grado y progresión de NIC.

---

## VI. EXPECTATIVAS

Realizar el seguimiento de la cohorte que permita establecer el porcentaje de progresión de NIC, el comportamiento en cuanto a la expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup>, y el estado físico del DNA del VPH.

Determinar la expresión de Ki-67 y p16<sup>INK4a</sup> en citología convencional y compararla con la expresión en histología para determinar su utilidad como marcadores de progresión en el primer nivel de atención.

Realizar un estudio que permita establecer la relación entre el estado físico del DNA del VPHAR con la expresión *in situ* de las proteínas virales E2, E6 y E7 en lesiones premalignas y malignas de CaCu.

Determinar la activación de las vías Ras y su relación con la expresión de p16<sup>INK4a</sup> en la línea celular HeLa

---

---

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol.* 2003 Jul;16(7):665-73.
2. Alarcón L. Expresión de marcadores de proliferación y regulación en lesiones premalignas y carcinoma cervical con infección por virus del papiloma humano. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas. 2006.  
  
all for one or one for all. *Mol Cell Biol.*2006; 7:667-677.
3. Andujar M., Pavcovich M., Sánchez M, Torres A, Arias M, De Lera J, León L, Hernández T, Vega B, Flacón J, Lubrano A, Falcón O, Arencibia O. Prevalencia de la infección cervical por el virus de papiloma humano en la población femenina de Gran Canaria. Estudio poblacional. Resultados preliminares. VII congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet. 2005. (Documento en línea). Disponible en: <http://www.conganat.org/7congreso/PDF/558.pdf>
4. Archila M., Neira J. Antígenos de VPH en lesiones intraepiteliales escamosas. Inmunohistoquímica con p16INK4a, Viroactiv® y Ki-67. *Repert.med.cir.* 2008;17(3)136-144
5. Arniges M. Caracterización molecular y funcional del canal TRPV4 en el epitelio respiratorio y su relación con la fisiopatología de la fibrosis quística. Univerisitat Pompeu Fabra. Doctorado en ciencias de la salud y la vida. 2006. (Documento en línea). Disponible en: [http://www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UPF/AVAILABLE/TDX-0404107-175741//tmag.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UPF/AVAILABLE/TDX-0404107-175741//tmag.pdf)
6. Azúa R., Grasa J., Azúa J., Savirón R., Tires A., Santamaría A. Estudio descriptivo de la prevalencia de VPH en una consulta privada. *Revista de investigación clínica.* 2004; 56(4):460-465
7. Cambruzzi E., Galleano C., Pereira C. Expresión of Ki-67 and squamous intraepithelial lesions are related with HPV in endocervical adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2005;11:114-120

- 
8. Castañeda M. El cáncer cervical como problema de salud pública en mujeres mexicanas y su relación con el virus del papiloma humano. Doctorado en salud pública y metodología de la investigación biomédica. Universidad Autónoma de Barcelona. 2000. (Documento en línea). Disponible en: [http://www.tesisenxarxa.net/TESIS\\_UAB/AVAILABLE/TDX-1125105-175123//msci1de1.pdf](http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1125105-175123//msci1de1.pdf)
  9. Castañeda M., Toledo R., Aguilera M. Factores de riesgo para cáncer cervicouterino en mujeres de Zacatecas. *Salud Publica Mex.* 1998;(40):330-338
  10. Castellanos M. Cáncer cervicouterino y el VPH. Opciones de detección. *Rev Fac Med UNAM.* 2003;46 (2): 62-66
  11. Comisión Nacional de Cáncer Cervicouterino (CNCC). Diagnóstico y tratamiento cáncer cervicouterino. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. Documento de trabajo. 2004. (Documento en línea). Disponible en: [http://ncd.bvsalud.org/lildbi/docsonline/4/5/054-Chile\\_Cacu.pdf](http://ncd.bvsalud.org/lildbi/docsonline/4/5/054-Chile_Cacu.pdf)
  12. Consejo Nacional de Población (CONAPO). Cuadernos de salud reproductiva. Distrito Federal. 2000.
  13. Consejo Nacional de Población (CONAPO). Tasas de mortalidad de cáncer cérvico uterino según entidad federativa. Estimaciones a partir de las bases de defunciones. 2002.
  14. Cooper G. Edición en español de: *The cell: A molecular Approach.* Third Edition. 2006. Ed. Marban Libros P.P. 716.
  15. Curiel J. Biopsia del cuello uterino ¿es confiable y reproducible el diagnóstico histológico? Utilidad de p16INK4A para lograrlo. *Ginecol Obstet Mex.* 2007; 75 (10):615-620
  16. Deavers M., Malpica A., Silva E. Immunohistochemistry in gynecological pathology. *Int J Gynecol Cancer.* 2003; 13, 567—579
  17. Dehn D., Torkko K., Shroyer K. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer cytopathol.* 2007; 111:1-14
  18. Diestro M., Serrano M., Gómez F. Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH). *Oncología.* 2007;30(2):42-59

- 
19. Eppel W., Worda C., Frigo P., Ulm M., Kucera E., Czerwenka K. Human papillomavirus in the cervix and placenta. *Obstet Gynecol.* 2000;96(3):337-341
  20. García J. Actualización sobre la historia del virus del Papiloma Humano en Venezuela y su relación con el cáncer cervical. *Academia Biomédica Digital. Facultad de Medicina – Universidad Central de Venezuela.* 2006;27. (Documento en línea). Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=7&n=228>
  21. Gariglio P, López E, Alvarez L. Virus y cáncer humano: Genética molecular del cáncer cervicouterino. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex).* 1999; 45(3)
  22. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. Production of a Mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer.* 1983; 31:13-20.
  23. Gil J., Peters G. Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus:
  24. González A. Molecular biology of cervical cancer. *Clin Transl Oncol.* 2007; 9:347-354
  25. Guimaraes M., Goncalves M., Soares C., Bettini J., Duarte R., Soares E. Immunohistochemical Expression of p16 INK4a and bcl-2 According to VPH Type and to the Progression of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53:509–516
  26. Gupta S., Sodhani P., Halder K., Chachra K., Singh V., Sehgal A. Age trends in pre-cancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in a cytology screening programme: what should be the target age group for a major thrust of screening in resource-limited settings?. *Cytopathology.* 2008;19:106-110
  27. Hardisson D. La biopsia en el manejo de las lesiones cervicales. Sesión conjunta Sociedad Española de Citología-Club de Patología Ginecológica. Curso corto: Papel del patólogo en el cribado y diagnóstico de las lesiones premalignas y el cáncer de cérvix: tecnologías clásicas y propuestas actuales. 2005. (Documento en línea). Disponible en:
  28. Hidalgo A. El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. Carta al editor. *Rev Biomed.* 2006;17:81-84. [http://www.seapcongresos.com/2005/Cursos/Curso\\_Corto\\_Papel\\_patologo\\_cribado/SESSION\\_CONJUNTA\\_CPG-SEC.PDF](http://www.seapcongresos.com/2005/Cursos/Curso_Corto_Papel_patologo_cribado/SESSION_CONJUNTA_CPG-SEC.PDF)

- 
29. Kalof A., Evans M., Simmons L., Beatty B., Cooper K. Immunoexpression and VPH in situ hybridization signal patterns. Potencial markers of high- grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:674-679
  30. Key G, J L Petersen, M H Becker, M Duchrow, C Schlüter, J Askaa, and J Gerdes New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections. *J Clin Pathol.* 1993; 46(12): 1080–1084.
  31. Key G., Becker M., Baron B. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab invest.* 1993; 68: 629-636.
  32. Klaes R., Friederich T., Spitkovsky D., Ridder R., Rudy W., Petry U., Dallenbach G., Schmidt D., Doeberitz M.. Overexpresion of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cáncer.* 2001;92:276-284
  33. Knebel M. Principios y Hallazgos clave del test de p16; VPH today. 2006; 8:12-13
  34. Krauss G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation.* Third Edition. 2003. Ed Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. P.P. 529-531
  35. Larizgoitia I. Diagnóstico precoz del cáncer cervical: conocimiento actual sobre viejas y nuevas tecnologías. Barcelona:Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques. Server Catalá de la Salut. Department de Sanitat i Seguretat Social Generalitat de Catalunya. 2001. (Documento en línea). Disponible en: <http://www.gencat.net/salut/depsan/units/aatrm/pdf/br0102es.pdf>
  36. León G., Bosques O. Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. *Rev Cubana Obstet Ginecol.* 2005;31(1)
  37. Lewis M. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2004. (Documento en línea). Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/ad/dpc/nc/pcc-cc-sit-lac.pdf>
  38. López A; Lizano M. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología.* 2006;1:31-35

- 
39. López J., Aristizábal F. Integración viral y cáncer de cuello uterino. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 2006; 35 (1), 5-32
40. López J., Hernández A., Gutiérrez P., Platón J. Nomenclatura de las lesiones precursoras del cáncer cérvico uterino. Rev Sanid Milit Mex. 2006; 60(6):406-410
41. McCluggage W., Bharucha H, Caughley L, Date A., Hamilton P., Thornton C, Walsh M. Interobserver variation in the reporting of cervical colposcopic biopsy specimens: comparison of grading systems. J Clin Pathol. 1996;49:833-835
42. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Biochim Biophys Acta. 2007.1773:1263-1284.
43. Melo A., Montenegro S., Hooper T. Capurro I., Roa J., Roa I. Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX Región-Chile. Rev Méd Chile. 2003.131: 1382-1390
44. Mirhashemi R.; Ganjei P.; Nadji M.; Lambrou N.; Atamdede F.; Averette H. Papillary squamous cell carcinoma of the uterine cervix: an immunophenotypic appraisal of 12 casos. gynecol oncol. 2003; 90(3):657-661.
45. Muños M., Mendoza J., Téllez L., Noguera M., Moret O., López M., Toro M. Detección de VPH-16 y 18 en muestras de cervix de mujeres que acuden a centros asistenciales de la ciudad de Mérida, Venezuela. Rev Biomed. 2003; 14:61-68.
46. Narisawa M., Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. Cancer Sci. 2007; 98(10): 1505-1511
47. Novoa A. Cáncer del cérvix uterino, revisión epidemiológica en Latinoamérica. La Salud en Durango. 2001; 2 (2): 21-27
48. Ojeda J (2003). Del VPH al Cáncer Cervicouterino. Medwave; Año 3 (9). (Documento en línea). Disponible en: <http://www.medwave.cl/congresos/Cancerologia/Oct2003/1.act>
49. Ojeda J. Infecciones genitales por virus papiloma humano. Medwave. 2002; 2(8). (Documento en línea). Disponible en: <http://www.medwave.cl/ciencia/15.act>
50. Palacio L., Rangel G., Hernández M., Lazcano E. Cervical cancer, a disease of poverty: Mortality differences between urban and rural areas in Mexico. Salud Publica Mex. 2003;45 supl 3:S315-S325

- 
51. Peralta O., Bahena M., Díaz C., Madrid V., Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Publica Mex.* 1997; 39: 451- 462
  52. Pett M., Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?. *J Pathol.* 2007; 212: 356–367
  53. Ritchart R. Cervical Intraepithelial neoplasia. *Pathol Ann.* 1973; 8:301-328
  54. Rivera R., Delgado J., Painel V., Barrero R. Larraín A. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2006;71(2): 135-140
  55. Roussel M. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene.* 1999;18:5311-5317
  56. Satyanarayana A., Lenhard K. p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age. *J Clin Invest.* 2004; 114:1237-1240
  57. Schmidt M., Broll R., Hans B., Blöger O., Duchrow M. The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. *J Pathol.* 2003; 199: 18-27
  58. Schmidt M., Broll R., Hans B., Duchrow M. The proliferation marker pKi-67 becomes masked to MIB-1 staining after expression of its tandem repeats. *Histochem Cell Biol.* 2002;118:415-422
  59. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cell Physiology.* 2000;182:311-322
  60. Scott M., Nakagawa M., Moscicki A. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin diag lab immunol.* 2001;8(2):209–220
  61. Secretaría de Salud (SSA). Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE). Dirección General de Epidemiología (DGEPI). 2007. (Documento en línea). Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
  62. Secretaría de Salud (SSA). Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE). Dirección General de Epidemiología (DGEPI). 2006 (Documento en línea). Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

- 
63. Serman F. Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. Rev Chil Obstet Ginecol. 2002; 67(4):318-323
64. Shutter J., Atkins K., Gharthey K., Herzog T. Clinical applications of Immunohistochemistry in gynecological malignancies. Int J Gynecol Cancer. 2007; 17: 311–315
65. Talavera S. Factores de riesgo asociados a lesiones precursoras de cáncer cervical en mujeres que asisten al centro de salud Edgar Lang. Silais Managua. Año 2005. Universidad Autónoma de Nicaragua. Centro de Investigaciones y Estudios de la Salud. Escuela de Salud Pública de Nicaragua. Maestría en Salud Pública. 2006. (Documento en línea). Disponible en: [http://www.minsa.gob.ni/bns/tesis\\_sp/58.pdf](http://www.minsa.gob.ni/bns/tesis_sp/58.pdf)
66. Tamayo L., Valencia M., Escobar S. Tendencia de la infección por el Virus Papiloma Humano (VPH) en usuarias del Servicio de Citología del Laboratorio Docente Asistencial de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Antioquia. 1993-1998. Revista de la facultad de farmacia. 2001; 42: 20-26
67. Tirado L., Mohar A., López M., García A., Franco F., Borges G. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. Salud Publica Mex. 2005;47:342-350
68. Toro M., Llombart A. Sobreexpresión de p16INK4a en carcinoma epidermoide de cuello uterino. VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet. 2005. (Documento en línea). Disponible en: [http://www.conganat.org/7congreso/final/vistaImpresion.asp?id\\_trabajo=159](http://www.conganat.org/7congreso/final/vistaImpresion.asp?id_trabajo=159)
69. Urruticoechea A., Smith I., Dowsett M. Proliferation Marker Ki-67 in early breast cancer. J Clin Oncol. 2005;23:7212-7220
70. Wang J., Zheng B., Li X., Anström T., Lindström M., Wallin K. Predictive Significance of the Alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in the Progression of Cervical Cancer. Clinical Cancer Research. 2004;10: 2407-2414
71. Woodman C., Collins S., Young L. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nature reviews. 2007;7:11-22

- 
72. Zamora A. Infección por virus del papiloma humano en mujeres y hombres mexicanos. Identificación por el sistema de captura de híbridos. Rev Hosp Met. 2000;1(1): 9-13
73. Zúñiga M., González W., Gandul L. Caracterización de factores de riesgo en pacientes con citología positiva. 2008. (Documento en línea). Disponible en: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/1179/1/Caracterizacion-de-factores-de-riesgo-en-pacientes-con-citologia-positiva>.