



177  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESION DE GENES TARDIOS DEL  
PAPILOMAVIRUS HUMANO EN TEJIDO  
CERVICO-UTERINO EN PACIENTES DEL  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA.  
ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICO

TESIS DE LICENCIATURA  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
LUCIA GUADALUPE TAJA CHAYEB



MEXICO, D. F.

MARZO DE 1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

|   | PAGINA    |
|---|-----------|
| <b>Resumen</b>                            | <b>1</b>  |
| <b>Antecedentes</b>                       | <b>2</b>  |
| <b>Aparato Genital Femenino</b>           | <b>6</b>  |
| <b>Cancer Cérvico-uterino (CaCU)</b>      | <b>8</b>  |
| <b>Factores de Riesgo en CaCU</b>         | <b>11</b> |
| <b>HPV como Carcinomavirus</b>            | <b>13</b> |
| <b>Mecanismos de participación de HPV</b> | <b>18</b> |
| <b>Técnicas de detección de HPV</b>       | <b>23</b> |
| <b>Hipótesis</b>                          | <b>26</b> |
| <b>Objetivos</b>                          | <b>27</b> |
| <b>Materiales y Métodos</b>               | <b>28</b> |
| <b>Resultados</b>                         | <b>33</b> |
| <b>Discusión</b>                          | <b>48</b> |
| <b>Conclusiones</b>                       | <b>54</b> |
| <b>Bibliografía</b>                       | <b>56</b> |
| <b>Apéndice</b>                           | <b>62</b> |

## RESUMEN

Los papilomavirus humanos (HPV) son virus pequeños de DNA que producen tumores benignos, y que poseen un alto potencial oncogénico. Han sido asociados como agentes etiológicos del cáncer cérvico-uterino (CaCU) debido a que se han encontrado distintos tipos de HPV en un alto porcentaje de lesiones cervicales. En tejidos infectados por HPV, el virus es detectable mediante análisis inmunológico del antígeno de la cápside (antígeno tardío) en las células epiteliales. Sin embargo, cuando ha ocurrido transformación maligna hasta carcinoma, se pierde la integridad estructural del virus y no se pueden detectar las proteínas de la cápside, por lo que para detectar la presencia de HPV se deben usar métodos que identifiquen el DNA viral.

Con el objetivo de determinar la distribución de HPV en pacientes del Instituto Nacional de Cancerología, se analizaron casos con diversas lesiones cervicales. Se estudiaron 13 casos de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de grado I y II, 10 casos con Carcinoma *In Situ*, 18 casos de Carcinomas invasores, y 6 muestras de cérvix normal, obtenidas de piezas de histerectomía por patología benigna de la matriz. Como control positivo se utilizaron 6 condilomas o papilomas infectados por papilomavirus. Mediante análisis inmunohistoquímico se detectó el antígeno de cápside común de los HPVs.

Se encontró la presencia de HPV en: 1 de 6 de los cérvix normal, 9 de 13 NIC, 4 de 10 carcinomas *In Situ*, 6 de 18 carcinomas invasores, y en los 5 condilomas. Sorprendentemente se encontró que algunas de las muestras positivas de las displasias (6 de 9) y de los carcinomas *In Situ* (4 de 4), presentaron núcleos positivos en las células basales (indiferenciadas), lo cual que no había sido reportado sino hasta estos momentos.

Este hallazgo podría sugerir que en México los HPVs presentan algún mecanismo de regulación de genes tardíos diferente, que se trate de otro tipo de HPV, o bien que los virus se encuentren en forma episomal debido a una etapa temprana de infección. También podría sugerir la presencia de algún tipo especial de células permisivas en estos tejidos. Con este análisis no podemos dilucidar la causa de la presencia de células indiferenciadas positivas, por lo que sería necesario hacer un análisis más detallado utilizando técnicas de Biología Molecular.

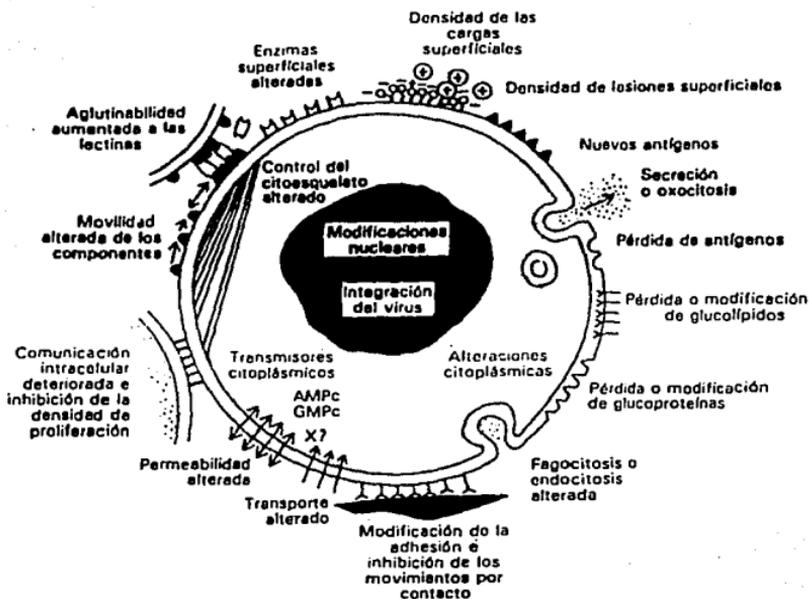
## ANTECEDENTES

Los animales superiores están compuestos por una gran variedad de células especializadas. Esta especialización se da por el proceso conocido como diferenciación, el cual generalmente implica una elevada especialización y una restricción para realizar otras funciones como la división celular. Defectos en la diferenciación pueden llevar al desarrollo de una **hiperplasia**, que es el aumento en tamaño de un tejido u órgano por un incremento en el número de células, y que puede originar formas patológicas: las neoplasias (1).

La **neoplasia** es una masa de tejido anormal que presenta crecimiento incontrolado y que persiste aún después de terminado el estímulo el cual provocó el cambio; esta masa es virtualmente autónoma aunque depende del resto del organismo para su nutrición y vascularización. De acuerdo al comportamiento clínico de la neoplasia se le llama benigna o maligna (2).

Las neoplasias altamente diferenciadas, es decir, aquellas que difieren morfológicamente muy poco del tejido original, son llamadas **benignas**, y generalmente tienen un crecimiento relativamente lento. Por otro lado, aquellas neoplasias que muestran una marcada anormalidad celular (atipia) y poca diferenciación (anaplasia), son llamadas malignas. El **cáncer** es una **neoplasia maligna** (1).

Las células de estas neoplasias malignas muestran muchos cambios celulares, entre ellos: mitosis numerosas y frecuentemente anormales, mayor tamaño celular y nuclear, presencia de múltiples nucleólos, complementos cromosómicos aberrantes (aneuploidías), composición genética inestable que provoca alteraciones espontáneas, elevación del nivel de la función glucolítica, reducción y desorganización del citoesqueleto que provoca cambios morfológicos en la células transformadas, adquisición de nuevas proteínas de superficie llamadas antígenos asociados a tumores (ya que se producen anticuerpos contra las células tumorales), inmortalización (se dividen en forma indefinida), y alteraciones en la permeabilidad celular aumentando el transporte de metabolitos a través de la membrana (3) (ver Figura 1).



**FIGURA 1:** Ilustración diagramática de diferentes alteraciones de la superficie celular que se encuentran después de la transformación neoplásica (Tomado de Karp G., Biología Celular, 1987).

**El cáncer puede definirse como:** una enfermedad que implica defectos heredables en los mecanismos de control celular que dan como consecuencia la formación de tumores malignos y usualmente invasores. Dado que diversos factores tienen efecto en la producción tumoral, se reconoce al cáncer como una enfermedad multifactorial (3).

En las últimas décadas se han identificado una gran variedad de agentes que pueden inducir cáncer, a estos agentes se les conoce como carcinógenos (4). Un carcinógeno se define como: aquel agente cuya administración en animales, lleva a una incrementada incidencia, estadísticamente significativa, de neoplasias de uno o más tipos histogenéticos, comparada con la incidencia de los animales no tratados con él (5). Diferentes agentes carcinogénicos son capaces de convertir a una célula normal en una célula maligna (transformación) (3). Se conocen 3 tipos principales de agentes carcinogénicos:

Agentes químicos: Para que un agente químico pueda ser considerado como un carcinógeno debe ser directa o indirectamente mutagénico. Se ha encontrado que estos agentes se convierten en carcinogénicos después de ser activados en el cuerpo. Algunos de estos agentes son: Aflatoxina B, Etionina, Dimetil-nitrosamina, O-aminoazotolueno, etc. (3,5,6).

Agentes Físicos: Rayos X, Ultravioleta, gama, radioisótopos (radiaciones ionizantes en general). Cuando una célula absorbe radiación, la energía disponible causa la expulsión de electrones de las moléculas afectadas causando que la molécula se fragmente, o altere su estructura. También puede producir que el agua se disocie en partículas cargadas eléctricamente ( $H^+$  y  $OH^-$ ). El radical  $OH^-$  es un agente oxidante muy poderoso que atrae fuertemente a los electrones para convertirse en el ión  $OH^-$ , pero al hacerlo rompe enlaces químicos produciendo efectos biológicos. Las moléculas que pueden ser afectadas, entre otras son: proteínas y ácidos nucleicos (7).

Agentes Biológicos: Hay evidencias que señalan a ciertos virus como agentes carcinogénicos. Se han relacionado a varios virus como agentes etiológicos importantes de diferentes tumores animales, por ejemplo el virus VSR o virus del Sarcoma de Rous, y VEB o virus de Epstein-Barr relacionado con el Linfoma de Burkitt en humanos, entre otros. Por otro lado, se han encontrado a ciertos genes celulares involucrados en el fenómeno tumoral; a éstos genes se les

llama proto-oncogenes, y son genes que se encuentran en todas nuestras células, desarrollando funciones muy importantes y que potencialmente pueden transformar células en cultivo, siempre y cuando sufran mutaciones que conforman a los llamados oncogenes (c-onc) (3,4,6,8,9).

En cuanto a los virus se conocen 3 familias de DNA-virus y una familia de RNA-virus que son capaces de causar tumores en diversos animales incluyendo al hombre :

**RNA-Virus:** Reciben el nombre genérico de Retrovirus. Su nombre refleja el hecho de que el RNA (su genoma), debe ser transcrito en DNA (camino contrario a la dirección normal) mediante la enzima transcriptasa reversa, para que el virus sea capaz de funcionar dentro de una célula. Algunos ejemplos son: el virus VSR que produce el Sarcoma de Rous en gallinas, el virus HTLV-1 causa leucemia de células T y linfomas en humanos, el HTLV-2 que causa leucemia de células vellosas en humanos, y el virus de Inmunodeficiencia Humana HIV que causa el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (3,5,10).

**DNA-Virus:** Se conocen tres familias, que están relacionadas con el desarrollo de tumores: Adenovirus, Herpesvirus, y Papovavirus

Los Adenovirus causan comunmente infecciones en la conjuntiva y en el tracto respiratorio en humanos. Existen 3 tipos de adenovirus (12, 18 y 31) que son muy oncogénicos en hamster, pero no así en humanos.

Los Herpesvirus son responsables de una variedad de enfermedades proliferativas y cáncer en varias especies de vertebrados. Algunas formas se relacionan con ciertos cánceres humanos. Uno de los miembros más importantes de esta familia es el virus de Epstein-Barr (EBV); otros miembros son: Citomegalovirus, Varicella zoster y Herpes Simplex 1 y 2 (el cual ha sido asociado al cáncer cérvico-uterino) (5,11).

La familia Papovavirus es la más importante ya que los 3 miembros de que consta, están involucrados en el desarrollo de diferentes tumores en animales y en el humano. Sus miembros son: 1) Papilomavirus: que induce papilomas o verrugas (los cuales pueden progresar hasta carcinomas) en varios mamíferos; 2) Polyomavirus: causa adenomas, hemangiomas, fibromas y fibrosarcomas en ratón, y 3) SV-40: causa fibrosarcomas en sus hospederos naturales (los simios) (2,5).

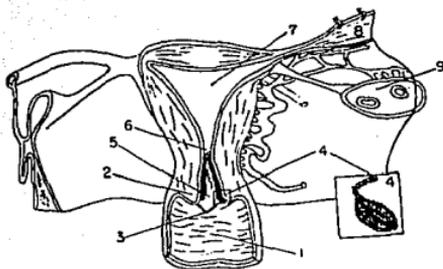
## APARATO GENITAL FEMENINO

Uno de los cánceres humanos en el que se piensa los virus tengan un papel importante, es el Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) (12).

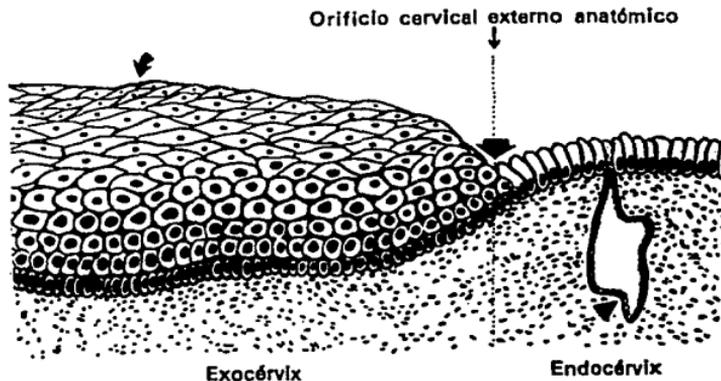
El aparato genital femenino está constituido por los siguientes órganos: vulva, vagina, útero, trompas de Falopio y ovarios. El útero es un órgano muscular hueco que mide aproximadamente de 6 a 7 cm de largo; se sitúa en la cavidad pélvica atrás de la vejiga y delante del recto. Está constituido por el cuerpo y el cuello o cérvix uterino.

El cuerpo es una formación muscular gruesa, hueca que se ensancha hacia la parte superior. Su cavidad endometrial se continúa hacia abajo con el canal endocervical, y hacia arriba cerrada en el fondo uterino; se comunica a los lados con las trompas de Falopio. Su forma es cónica invertida, y está recubierto por epitelio cilíndrico columnar denominado epitelio endometrial (que produce moco y glucógeno).

El cérvix o cuello uterino es una estructura tubular que sale a la vagina; ésta región se denomina ectocérvix, presenta un orificio externo a la vagina y uno interno hacia el cuerpo; el canal endocervical une las cavidades uterina y de la vagina. Este canal está recubierto por epitelio cilíndrico denominado epitelio endocervical. La unión del epitelio estratificado del exocérvix y del epitelio cilíndrico del endocérvix se denomina zona escamocolumnar (o de transformación) del endocérvix y representa el sitio donde comúnmente se inicia el CaCU (13), en este sitio tiene lugar aproximadamente el 90% de las infecciones por Papilomavirus Humano (14) (Figura 2).



**FIGURA 2A.** Esquema de la estructura del aparato genital femenino : 1) Vagina, 2) Fortio, 3) Cérvix, 4) Zona escamocolumnar, 5) Canal cervical, 6) Orificio interno, 7) Cavidad endometrial, 8) Trompas de Falopio, y 9) Ovarios. (Tomado de Fentanes TE., Citología Clínica, 1980).



**FIGURA 2B:** Esquema de la estructura del epitelio estratificado exocervical (flecha delgada), y la transición a epitelio cilíndrico mucosecretor endocervical (flecha gruesa), se observa una glándula endocervical (cabeza de flecha). (Tomado de Carrera JM., Tratado y Atlas de Colposcopia, 1975).

## CANCER CERVICO-UTERINO (CaCU)

El CaCU es una neoplasia que histogenéticamente se va desarrollando a través de un proceso progresivo de alteraciones que van desde Condiloma, Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC, ahora denominada Lesión Escamosa Intraepitelial o LEI), pasando por el Carcinoma *In Situ* hasta llegar al Carcinoma Invasor (13).

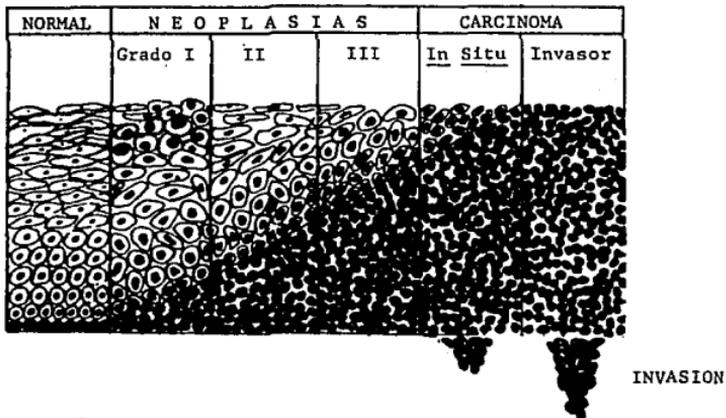
El Condiloma es una lesión polipoide caracterizada por papilomatosis, vacuolización citoplásmica de las células escamosas (coilocitosis) e infiltración inflamatoria. Estas lesiones se caracterizan por presentar cambios morfológicos causados por infecciones por papilomavirus humanos (HPV) en el cérvix. Las características de estas lesiones son: células basales relativamente normales, capa parabasal expandida o hiperplásica, actividad mitótica elevada y coilocitosis. Los coilocitos son células escamosas maduras o intermedias caracterizadas por una vacuolización perinuclear bien marcada, tinción citoplásmica periférica densa e irregular, y con cambios degenerativos en el núcleo (15) (Figura 3).

La Neoplasia Intraepitelial Cervical involucra el epitelio escamoso del exocérvix, y a veces áreas de metaplasia escamosa del endocérvix. Las células displásicas son grandes, irregulares, e hiper cromáticas. Estas lesiones se gradúan en ligeras, moderadas y severas de acuerdo al grado de anomalías que se observen en el núcleo. Anteriormente se les denominaba Neoplasia Intraepitelial Cervical o NIC ahora también se les denomina Lesión Intraepitelial Escamosa (LIE). (Figura 3).

El Carcinoma *In Situ* del cérvix es un cambio en la superficie del epitelio escamoso hacia un patrón anaplásico; una característica importante es la desorganización de la capa basal. El proceso involucra la superficie del epitelio, así como elementos glandulares, pero sin invasión al estroma (Figura 3).

Se llama Carcinoma Invasor a la lesión que penetra al estroma subyacente al epitelio rompiendo la membrana basal. Se caracteriza porque sus células presentan diferentes tamaños, al igual que los núcleos, con mitosis anormales e invasión desordenada del estroma por el epitelio; las células muestran diferentes grados de madurez. Se clasifica en 3 tipos: 1) Carcinoma invasor de células grandes no queratinizante, 2) queratinizante, y 3) de células pequeñas. Característicamente se expande a vagina, cuerpo, parametrio, tracto uterino inferior, y ligamentos uterosacrales (13,16) (Figura 3).

El CaCU representa aproximadamente el 35% de las neoplasias que afectan a la mujer que acude a los centros de atención de cáncer de la Ciudad de México. Constituye la neoplasia ginecológica más frecuente en México, y es una de las principales causas de muerte por cáncer en el país. Con mayor frecuencia afecta a la mujer en la etapa más productiva de la vida, entre los 30 y 40 años de edad, por todo ésto se le considera un serio problema socioeconómico y de salud nacional (14,17).



**FIGURA 3.** Esquema de los precursores del Cáncer Cérvico-Uterino, desde el epitelio estratificado normal hasta carcinoma invasor, pasando por las diferentes lesiones tales como Neoplasias Intraepiteliales Cervicales de Grado I a III y Cáncer *In Situ*. (Tomado de Robbins SL., Patología Estructural y Funcional, 1988).

## FACTORES DE RIESGO EN EL CaCU

Dentro de los factores que tienen el efecto de incrementar el riesgo de desarrollar CaCU están:

Actividad sexual femenina: El CaCU ocurre con mayor frecuencia en mujeres casadas que solteras, en mujeres con más de un compañero sexual (el riesgo parece crecer directamente con el número de compañeros). Mujeres con relaciones sexuales tempranas tienen un incremento en el riesgo a diferencia de mujeres vírgenes o con vida sexual tardía. También se incrementa el riesgo en mujeres multíparas, con abortos numerosos, con menarca temprana, y con diferentes lesiones cervicales (11,13,18).

Factores de riesgo asociados al hombre: Esposas de hombres con cáncer del pene tienen una elevación significativa en el riesgo de desarrollar CaCU. El comportamiento sexual del hombre es importante: relaciones sexuales tempranas, enfermedades sexuales transmisibles, relaciones extramaritales, muchas compañeras sexuales y visitas a prostitutas, incrementan el riesgo de que sus parejas desarrollen CaCU. Esto parece indicar que el hombre puede ser transmisor de algún agente etiológico del CaCU (19,20).

Enfermedades Sexuales transmisibles: Se ha encontrado que algunos virus como Herpes simplex tipo 2 (HSV-2) (5,11,21,22), y los virus del Papiloma Humano (HPV) (23-26), así como las infecciones producidas por Clamidia, Sífilis, Haemophilus vaginalis y Tricomonas (11,21,27) se relacionan de alguna forma con el CaCU.

Cigarro: Recientemente se han asociado ciertos factores de riesgo no venéreos para el CaCU, tal es el caso del cigarro, anticonceptivos y dieta. El cigarro es un factor de riesgo independiente para el cáncer cervical de células escamosas: mujeres que fuman de manera regular tienen un riesgo elevado (un 50%) comparado con las no fumadoras. Existe una relación lineal entre el riesgo de desarrollar CaCU con el tiempo que tengan de ser fumadoras y con el número de cigarrillos por día; también se ha encontrado que el riesgo crece en aquellas mu

jeros que fuman cigarrillos sin filtro. No se sabe con certeza cuales son los mecanismos biológicos del cigarro en el CaCU; pero si se ha observado la presencia de cotinina, nicotina y mutágenos en el mucus cervical de fumadoras, y al parecer el cigarro tiene un efecto inmunosupresor (28).

**Anticonceptivos:** Se ha encontrado un riesgo incrementado de enfermedades cervicales preinvasoras en mujeres que usan anticonceptivos por largo tiempo. Estudios recientes han indicado que el uso de los anticonceptivos orales es un factor de riesgo independiente y que las usuarias de largo tiempo están en un riesgo mayor de desarrollar cáncer cervical (29,30).

**Dieta:** Recientemente ha empezado a surgir el posible papel de la dieta como un factor de riesgo para el CaCU. Este factor puede ser particularmente importante con respecto a las diferencias regionales de la incidencia de cáncer. Varios estudios han indicado que existe un mayor riesgo para las mujeres que consumen una dieta baja en vitamina A o C. Se ha observado que la deficiencia en vitamina A puede provocar alteraciones del tejido cervical haciéndolo más vulnerable a la carcinogénesis. La Deficiencia de ácido fólico también se considera como un factor de riesgo (18,21,31).

## EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO COMO UN CARCINOMAVIRUS

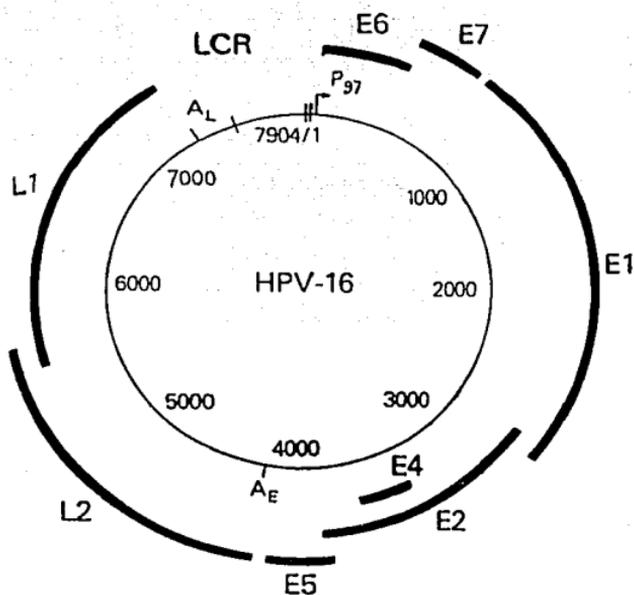
Como ya se ha mencionado el cáncer es una enfermedad multifactorial, de modo que en el CaCU también son varios los factores que intervienen para su génesis y mantenimiento. Se sabe que en esta neoplasia en particular los HPVs tienen un papel muy importante.

Los HPVs son virus pequeños que producen tumores benignos cutáneos y mucosos en sus hospederos naturales. Los HPVs pueden producir tumores en sus hospederos naturales e incluso en no-naturales infectados experimentalmente; debido a este potencial oncogénico se les considera un grupo importante de virus tumorales. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan a muchas especies de vertebrados superiores, desde aves hasta el humano.

La cápside de éstos virus es icosaédrica de 50 a 55 nm de diámetro, y constan de 72 capsómeros. El genoma de HPV consta de una molécula circular (cerrada) de DNA de doble cadena superenrollada, y contiene aproximadamente 8000 pares de bases (pb) y un peso molecular de  $10 \times 10^6$  Daltones. Se han encontrado 4 polipéptidos asociados al DNA viral que son semejantes a las histonas (5,32,33).

La nomenclatura de éstos virus en tipos o subtipos se basa en la homología de las secuencias polinucleotídicas. Para que un virus se clasifique como un tipo nuevo, debe existir un máximo de 50% de homología con otros virus ya clasificados. Los virus con más del 50% pero menos del 100% de homología con otros virus son llamados subtipos. Hasta estos momentos se han identificado más de 60 tipos, muchos de los cuales se asocian a cánceres del cérvix y del pene (32).

El genoma viral se divide en tres regiones distintas. Una región temprana constituida por los genes E1 a E7, que codifica las proteínas involucradas en la replicación del DNA, la transcripción y transformación celular; una región tardía constituida por los genes L1 y L2, que codifica para las proteínas de cápside; y una región control denominada LCR, que controla la expresión genómica y la replicación (34,35) (Figura 4).



**FIGURA 4:** Mapa genómico de HPV-16, deducido de la secuencia de DNA. El número de nucleótidos está escrito dentro del círculo. La transcripción inicia en el sentido de las manecillas del reloj. La región control se denomina LCR, la región temprana está constituida por los genes E1 a E7, y la región tardía por los genes L1 y L2. (Tomado de DeVita VT., *Cancer. Principles and Practice of Oncology*, 1989).

Las regiones temprana y tardía son transcritas secuencialmente durante la infección lítica de una célula permisiva, que es aquella en la que el virus se puede replicar sin restricción hasta provocar la lisis de la célula hospedera. En las células no permisivas, que son aquellas en las que el DNA viral se integra al genoma de la célula hospedera, su replicación no es independiente y lleva a la transformación maligna, la activación de la región tardía no se efectúa, sólo la región temprana se transcribe formando las proteínas que tienen la capacidad transformante y regulan la replicación del DNA (5,6).

Según la respuesta del hospedero, los papilomavirus se pueden subdividir en:

- 1) los que inducen neoplasias en el epitelio estratificado cutáneo,
- 2) inducen hiperplasias del epitelio escamoso no-estratificado,
- 3) inducen papilomas cutáneos y fibropapilomas (fibromas del tejido conjuntivo).
- 4) inducen fibromas con poco epitelio cutáneo hiperplásico (32).

La infección natural por papilomavirus se limita generalmente a la piel o a las membranas mucosas de sus hospederos de acuerdo al tropismo tisular de los virus (32). En general los papilomavirus son epiteliotrópicos (26).

La infección por papilomavirus de células epiteliales causa hiperplasia de las células de la capa espinosa (acantosis); estas células muestran un aumento en el tamaño y número de desmosomas y tonofibrillas; otras células epiteliales muestran cambios degenerativos con pérdida de tonofibrillas, separación de desmosomas, atipia nuclear y vacuolización citoplásmica. En las capas más superficiales del epitelio estos cambios son más pronunciados. En la capa granular, ocurre degeneración nuclear con marginación y condensación de la cromatina. Un análisis en el microscopio electrónico puede demostrar la presencia de viriones en forma cristalina en el núcleo de células degeneradas de la capa queratinizante (32).

En lesiones asociadas a HPV, se ha encontrado que el genoma de los virus se distribuye de la siguiente manera:

- 1) el DNA viral está confinado al núcleo de las células epiteliales,
- 2) la mayor cantidad de DNA viral se encuentra en los coilocitos,
- 3) el contenido de DNA viral varía de célula a célula,
- 4) se observa un incremento gradual de la concentración del DNA viral extendiéndose desde la capa inferior del epitelio hacia la superficie, y
- 5) el DNA viral se detecta más tempranamente (por ejemplo en las capas profundas del epitelio) que el antígeno de cápside el cuál se detecta en las capas superficiales del epitelio (36).

Se sugiere que la infección por HPV empieza en la capa basal del epitelio, la replicación del DNA viral tiene lugar en las células basales proliferativas, pero no es posible detectar en éstas células las proteínas estructurales de cápside. Se cree que la proliferación en las células basales debe a la actividad de genes tempranos de los HPVs. Arriba de la capa parabasal proliferativa, las células empiezan a madurar y diferenciarse, el citoplasma se vuelve más abundante y eosinofílico (lo cual indica la síntesis de queratina), y empieza a manifestarse la expresión de los genes tardíos virales, y es posible detectar, mediante técnicas inmunohistoquímicas, el antígeno de cápside de HPV (37,38).

Se ha observado que en algunos casos las verrugas causadas por papilomavirus sufren regresión; esta regresión parece estar asociada con la respuesta inmune. La respuesta inmunológica a la infección por HPV se caracteriza por la aparición de Inmunoglobulina M (IgM) antes de la regresión, después de la regresión sólo se encuentra Inmunoglobulina G (IgG) (32,37), como ocurre en casi cualquier infección.

En papilomas escamosos inducidos por HPV, el virus es detectable mediante métodos inmunológicos para localizar el antígeno de cápside, pero si ha ocurrido transformación maligna del tejido hasta carcinoma, la integridad estructural del virus se pierde y el antígeno estructural no está presente, por lo que para detectar al virus, hay que usar algún método que evidencie la presencia del DNA viral (32,39,40). El no encontrar antígeno de cápside en carcinomas, sugiere que con la transformación maligna, los genes que codifican para la replicación del virión (genes tardíos) se pierden, o se vuelven inoperantes (37).

Se ha observado que los condilomas o papilomas, son las lesiones genitales más frecuentemente inducidas por HPV. Los tipos de HPV 16,18, 31 y

33 se encuentran en un alto porcentaje de todos los cánceres cervicales, por lo que se les ha propuesto como virus de alto riesgo; mientras que los tipos 6 y 11 se han encontrado en lesiones benignas, proponiéndolos como virus de bajo riesgo (18, 24, 41, 42). Incluso se ha observado que el genotipo de los HPV puede influenciar en el desarrollo clínico del cáncer cervical: mujeres con tumores que presentan HPV 18 tienen un alto porcentaje de recurrencia, y un peor pronóstico, a diferencia de aquellas que tienen HPV-16 o sin HPV (43). Se sugiere que los tumores con HPV-18 tienen un curso clínico más agresivo y progresan más rápido desde LIE hasta carcinoma invasor (25, 44, 45). Se ha observado que algunos tipos específicos de HPV tienden a estar asociados con patrones histopatológicos específicos: por ejem. HPV-18 se encuentra más frecuentemente en adenocarcinomas, (la línea celular HeLa que se derivó de un adenocarcinoma cervical, contiene HPV-18), HPV-16 en tumores queratinizantes de células grandes, y HPV-31 en carcinomas adenoescamosos poco diferenciados (26).

Las evidencias que apoyan a los HPV como agentes etiológicos del cáncer cervical, son las siguientes:

- 1) los papilomavirus de conejo y borrego inducen transformación maligna del epitelio escamoso infectado,
- 2) en tumores cervicales humanos se encuentra el DNA de los HPV, y la expresión de sus proteínas codificadas,
- 3) el DNA de los HPV puede transformar morfológicamente a células de rata y ratón en ensayos *in vitro*,
- 4) en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales, tales como HeLa, SiHa y CaSki, el DNA de HPV se encuentra integrado al genoma celular, y el genoma viral es transcripcionalmente activo ya que se han encontrado transcritos de los genes E6 y E7 en estas células, y
- 5) el DNA de HPV parece estar estable tanto en líneas celulares transformadas, como en tumores cervicales. En algunas líneas celulares se ha encontrado el mismo número de copias de HPV a lo largo del tiempo. En lesiones metastásicas originadas de cánceres cervicales primarios, se ha encontrado el mismo tipo de DNA viral que en la lesión cervical, lo que soporta el concepto de interacción estable entre el genoma viral y la célula maligna (18, 25, 44).

## MECANISMOS DE ACCION DE LOS PAPILOMAVIRUS

No se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales los HPVs participan en la génesis y desarrollo del CaCU; sin embargo se cree que algunos de estos mecanismos pudieran ser:

1) El DNA de los HPVs es capaz de integrarse al genoma hospedero y ser transcripcionalmente activo (esto se observa principalmente en carcinomas cervicales, en cambio en las lesiones benignas HPV se encuentra en forma episomal y transcripcionalmente activo) (26,46-48). Esta integración del genoma viral puede tener implicaciones en el desarrollo de neoplasias humanas, pues con la integración del genoma viral, el hospedero adquiere genes transformantes. También se ha observado que esta integración viral puede ocasionar alteraciones en genes celulares, inclusive en protooncogenes: en las líneas celulares C4-I y HeLa, el DNA del HPV-18 se encuentra integrado en el cromosoma 8, cerca del protooncogén c-MYC, causando amplificación y sobre expresión de éste. También se han encontrado a los oncogenes c-MYC y c-Ha-RAS amplificados y rearrreglados en un alto porcentaje de muestras de carcinomas cervicales (41,49-52). La integración viral involucra una región específica del genoma viral, pero se integra azarosamente en la célula hospedera. Si esto ocurre así, existen 3 posibles mecanismos de transformación maligna de las células cervicales:

1) los productos de genes tempranos, tales como E6 y E7 pueden actuar como moléculas transactivadoras que alteran la expresión de genes celulares que controlan la proliferación celular (tales como los antioncogenes RB y p53). La capacidad de las proteínas E6, E7 y E5 de papilomavirus bovino (BPV) para inducir transformación en células en cultivo soportan esta hipótesis (18). Las evidencias que apoyan la importancia de éstas secuencias en la transformación maligna son:

a) Carcinomas cervicales humanos y líneas celulares derivadas de tumores cervicales, expresan el mRNA y las proteínas E6 (de 11 a 18 Kd) y E7 (de 12 a 15Kd). Células cervicales humanas immortalizadas y transformadas por HPVs de alto riesgo (tipos 16, 18, 31 y 33) expresan las proteínas E6 y E7.

b) Existe un grado significativo de homología polipeptídica entre las proteínas E6 de BPV-1 (papilomavirus bovino tipo 1) y la E6 del HPV-16 y HPV-18. Comparten la secuencia de aminoácidos Cys-X-X-Cys la cual se repite a intervalos regulares. Esta región está implicada en la unión a DNA.

c) Existe un patrón consistente de integración viral al DNA en carcinomas cervicales y líneas celulares, lo cual permite que sigan expresándose los genes E6 y E7.

d) Las secuencias de aminoácidos de la proteína E7 de HPV-16 tiene una región que comparte con la proteína E1A de Adenovirus y el Antígeno T grande de SV40; esta región es la que es capaz de unirse a la proteína p105<sup>RB</sup> del antioncogén Retinoblastoma, esta unión provoca que la célula proliferé incontroladamente. Estas regiones homólogas son las requeridas para la transformación (18, 23, 53).

e) La proteína E7 puede cooperar con el oncogén RAS activado para transformar células de riñón de ratón; o bien actuar solo y causar transformación morfológica de la línea celular NIH 3T3. Además el gen E7 codifica para un factor que puede transactivar la transcripción del promotor del gen E2 de Adenovirus (53).

2) las regiones que regulan la transcripción del genoma viral integrado, pueden alterar la transcripción de oncogenes celulares; se han encontrado niveles elevados de mRNA del oncogén c-MYC en 2 líneas celulares que tienen integrado a HPV-18; y niveles elevados de mRNA de los oncogenes c-MYC y c-Ha-RAS en tumores cervicales humanos (52).

3) productos de fusión creados en los sitios de integración del DNA viral pueden actuar alterando el fenotipo celular (18).

Sin embargo, también se ha encontrado que algunos carcinomas pueden presentar DNA de HPV en forma episomal y/o integrada, de modo que puede ser que la integración no sea un paso indispensable para la tumorigénesis del CaCU, y la simple presencia del virus en la célula hospedera sea suficiente para activar alguna señal para la transformación celular (54).

II) El punto de apertura del genoma viral para la integración, involucra predominantemente los genes E1 y E2 (en líneas celulares y algunos carcinomas cervicales) (55). El gen E2 de HPV-16 codifica por lo menos 2 proteínas capaces de regular la transcripción: 1) una proteína E2 completa que regula la transcripción de otros genes virales uniéndose y activando una secuencia que aumenta la transcripción de algún gen específico (secuencia enhancer). A esta proteína se le llama transactivadora, ya que activa la transcripción; y 2) una proteína E2 troncada que es codificada por la mitad del gen E2; esta proteína se une a la misma secuencia enhancer que la E2 completa, compitiendo con ella e inhibiéndola, tiene una función represora de la transcripción, por lo que se le llama E2 represora.

En verrugas infectadas por BPV-1 el nivel de transcritos de la proteína E2 represora es 10 veces más alto que el de E2 transactivadora, de modo que si el balance normal entre estas dos proteínas causa represión de la transcripción, al interrumpir el gen E2 con la integración, puede esperarse que se elimine la represión, y ocurra una expresión incontrolada de los oncogenes virales E6 y E7. En líneas celulares y tumores con algún HPV integrado, los genes E6 y E7, los cuales codifican proteínas que están involucradas en la transformación, se conservan y transcriben normalmente. Estos hallazgos apoyan la idea de que la alteración del control del promotor viral pueden permitir libremente la transcripción de las proteínas transformantes de los virus (23,26,56).

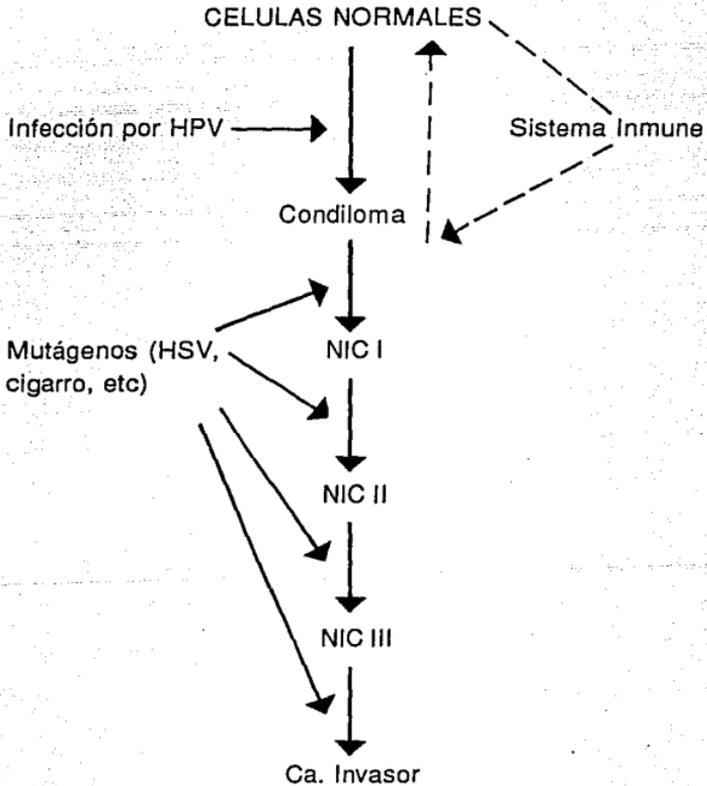
III) Recientemente se ha propuesto un mecanismo en el que las proteínas E7 y E6 de HPV-16 son capaces de unirse a los productos de los genes de Retinoblastoma (p105<sup>RB</sup>) y p53 respectivamente, para formar complejos (57). La unión de E7 inactiva a la proteína RB, simulando una pérdida o alteración del gen o su producto, provocando una proliferación celular incontrolada (58). Los productos de los genes RB y p53 son secuencias que controlan negativamente la proliferación celular, por lo que se les llama antioncogenes o genes supresores del tumor (59-61). Se ha observado que la pérdida o alteración de éstos genes o sus proteínas, puede contribuir a la falta de regulación en la proliferación de diferentes linajes celulares, ya que se han encontrado alterados en diferentes neoplasias (10,62,63).

Esta unión se ha observado con otras proteínas virales (por ejemplo, E1A de Adenovirus y antígeno T grande de SV40), por lo que se sugiere que la unión de oncoproteínas virales a una proteína que controla la proliferación celular sea un mecanismo común de transformación (64,65).

**IV)** Se ha encontrado que bajo condiciones experimentales y naturales, algunos tipos de papilomavirus requieren ser activados por algún carcinógeno para provocar la progresión de un papiloma hasta carcinoma. Por ejemplo, muchos de los papilomas laríngeos juveniles progresan hasta carcinoma de células escamosas, después de terapia por irradiación con rayos X. También se ha observado que el carcinoma del tracto digestivo del ganado vacuno se desarrolla cuando el animal ingiere cierto heñeche, el cual contiene un carcinógeno muy potente, y la Epidermodisplasia Verruciforme progresa a carcinoma cuando se expone a los rayos ultravioleta de la luz solar.

El virus HSV-2 presenta potencial oncogénico grande, ya que actúa como mutágeno (puede inducir aberraciones cromosómicas). de modo que este virus puede actuar como un agente carcinogénico. Como se han encontrado evidencias de la presencia de HSV-2 en algunas lesiones cervicales infectadas por HPV, es posible que HSV-2 actúe como iniciador activando a HPV, el cual permite la progresión hasta CaCU (37,66,67).

ZurHausen sugiere un modelo de sinergismo entre la infección de HPV y eventos iniciadores que llevan a la progresión (66):



## TECNICAS DE DETECCION DE HPV

Se reconoce a los HPVs como agentes etiológicos importantes del CaCU, por lo que actualmente es muy común que se desea detectar a este virus en el tejido cervical, ya sea para auxiliar a los clínicos en su diagnóstico, o a los investigadores en sus intentos de dilucidar el papel de éstos virus en el CaCU.

Existen diferentes técnicas para determinar la presencia de HPV en tejido cervical. Algunas de éstas permiten reconocer la presencia del DNA o RNA viral: Southern blot, Dot blot, Hibridación *In Situ*, y Northern blot. Con éstas técnicas se puede utilizar tanto material fresco como fijado e incluido en parafina, y nos permiten detectar tipos específicos de HPV y cantidad de DNA viral.

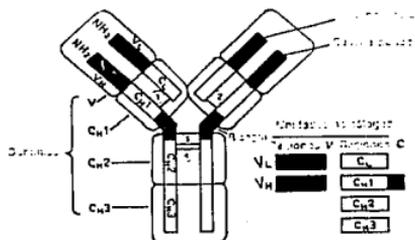
Existe otra técnica que sirve para detectar las proteínas virales: la Inmunohistoquímica. Esta técnica tiene la ventaja de ser más rápida que las anteriores, por lo que se pueden analizar un mayor número de muestras. Así se puede detectar el antígeno tardío común de HPV (proteínas de cápside), y como se realiza sobre cortes de tejido incluido en parafina, se puede determinar el tipo de células en que ocurrió la infección, y la distribución de la infección en el tejido. Sin embargo, éste no puede detectar tipos específicos de HPV y es un método cualitativo y no cuantitativo, por lo que no podemos analizar el número de copias del virus que existe en cada célula.

Las técnicas inmunohistoquímicas se emplean desde hace mucho tiempo por histopatólogos, ya que les permite dar un mejor diagnóstico, al identificar específicamente a una célula de acuerdo a su constitución antigénica o sus productos. La inmunohistoquímica se basa en el reconocimiento específico de una molécula llamada antígeno, por otra conocida como anticuerpo.

Un antígeno es una molécula extraña al hospedero que estimula la formación de un anticuerpo específico, y que reacciona con el anticuerpo producido. Esta reacción involucra la formación de complejos inmunes constituidos por varias moléculas de antígeno y anticuerpo. Sus principales características son: 1) Inmunogenicidad, que es la habilidad para inducir la formación de anticuerpos, y 2) Reactividad específica, esto es que el antígeno solo reacciona con el anticuerpo que se produjo.

Un **anticuerpo** es una glicoproteína sérica, producida por los vertebrados, que se forma en respuesta a la exposición a un antígeno. La producción de anticuerpos tiene como objetivo eliminar a la molécula extraña del cuerpo del hospedero. Los anticuerpos pueden existir en millones de formas diferentes (ya que son específicos para cada antígeno). De manera general se les conoce como Inmunoglobulinas (Ig) (8,68).

La unidad estructural básica de una inmunoglobulina (Ig) consta de 4 cadenas polipéptidicas unidas formando un complejo macromolecular. Está constituida por 2 cadenas ligeras (L) idénticas (polipéptidos pequeños), y 2 cadenas pesadas (H) idénticas (polipéptidos grandes); las 4 cadenas se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes, y por enlaces disulfuro:



Si una Ig es cortada por enzimas proteolíticas (tales como la papaína o tripsina), ésta se divide en 2 dominios funcionales básicos: Fragmento **F<sub>ab</sub>** que tiene las dos cadenas L y un fragmento de las cadenas H; el otro fragmento se denomina **F<sub>c</sub>** y está constituido por el resto de las cadenas H.

En los vertebrados superiores existen cinco clases diferentes de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Cada uno se diferencia por que las cadenas H son diferentes, existen cadenas H de tipo:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ . La IgA tiene cadenas alfa, la IgG cadenas gamma, etc. Las diferentes cadenas H dan una conformación distintiva a los anticuerpos y confieren a cada una características propias (69).

Las técnicas de inmunohistoquímica nos ayudan a reconocer la presencia de un antígeno específico dentro de un tejido. Para esto es necesario obtener los anticuerpos contra el antígeno que se desea detectar.

Para obtener un anticuerpo contra un antígeno específico, se debe inyectar el antígeno puro a un animal. Al ser inyectado el antígeno, los linfocitos B se encargan de producir los anticuerpos. Cada célula B puede producir anticuerpos contra un sólo epítope antigénico (cada antígeno tiene varios epítopes o determinantes antigénicos), pero como hay muchos tipos (clonas) de células B, se producen anticuerpos contra cada epítope, a estos anticuerpos se les llama policlonales (pues son producidos por muchas clonas celulares). En algunas técnicas se desea tener anticuerpos contra un sólo epítope, de modo que tienen que ser producidos por una sola línea de células B, y se les denomina monoclonales (8).

Existen diferentes técnicas de tinción inmunohistoquímica, y una de las más usadas es la tinción con Inmunoperoxidasa, la cual tiene 4 métodos principales:

a) Método Directo: El anticuerpo es marcado con la peroxidasa de rábano fuerte (HRP) (70); la reacción de éste con un crómogeno, por ejemplo la Diaminobencidina (DAB) dan un producto final de color café en el sitio donde se encuentra el antígeno.

b) Método Indirecto: Se hace reaccionar el antígeno con el anticuerpo producido en conejo (IgG de conejo), luego es tratado con un anticuerpo anti-IgG de conejo producido en otra especie y marcado con HRP; todo el complejo es tratado con DAB produciendo un color café en el sitio del antígeno.

c) Método del Puente Enzimático: El antígeno es marcado con IgG de conejo, este complejo se une indirectamente al anticuerpo anti-HRP usando como puente un anti-IgG de conejo. La región variable del anti-HRP se enlaza con la peroxidasa libre; todo el complejo es evidenciado con la reacción de DAB.

d) Método Peroxidasa-anti-Peroxidasa (PAP): Combinan los 2 últimos pasos del anterior método, el anticuerpo anti-HRP y la peroxidasa libre se hacen reaccionar formando un complejo soluble PAP; este complejo actúa como el último sistema antigénico el cual se enlaza al anticuerpo anti-IgG de conejo por medio una IgG de cerdo anti-IgG de conejo (71).

Considerando pues, las características de la infección por papilomavirus, los mecanismos de regulación de éstos virus, así como la importancia de este tipo de infecciones en la génesis y desarrollo del cáncer cérvico-uterino, el cuál es el cáncer ginecológico más importante que afecta a nuestra población, trabajamos considerando las siguientes hipótesis y objetivos:

## HIPOTESIS

- El antígeno común de Papilomavirus se encontrará distribuido en las capas más superficiales e intermedias del epitelio cervical.
- Debido a que la fase lítica -forma libre o episomal- de HPV se presenta en las primeros estadios de la gama de lesiones cervicales, y que en lesiones más avanzadas el virus posiblemente se encuentra integrado al genoma celular, se encontrará un mayor número de casos positivos para el antígeno tardío de Papilomavirus en lesiones pre-neoplásicas que en las lesiones invasoras.

## **OBJETIVOS**

- Determinar la expresión de genes tardíos de Papiloma virus y su prevalencia, en tejido cérvico-uterino normal y con patología preneoplásica y neoplásica, mediante Inmunohistoquímica, en pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN).

- Determinar la distribución del antígeno tardío común de Papilomavirus en el epitelio cervical.

## MATERIALES Y METODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO:

El estudio se llevó a cabo en: 13 muestras de Neoplasias Intraepitelial Cervical de grado I-II, 10 muestras de Carcinomas *In Situ*, y 18 muestras de Carcinomas Invasores, que incluyen un adenocarcinoma y 17 carcinomas epidermoides. Las muestras se obtuvieron del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

El grupo control, estuvo constituido por 6 muestras de tejido cérvico-uterino normal, obtenido de piezas quirúrgicas (histerectomía por patología benigna) de mujeres operadas en el servicio de Ginecología del Hospital Juárez del Centro. También se usaron 5 muestras de tejidos infectados por papilomavirus como controles positivos, obtenidos del PAP-Kit de los laboratorios DAKO.

### METODOLOGIA:

Las muestras problema se obtuvieron del archivo del Departamento de Patología del INCan (biopsias incluidas en parafina). Se obtuvieron cortes de 4-5  $\mu\text{m}$  de grosor y se montaron sobre portaobjetos cubiertos con una solución de poli-D-lisina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  en Buffer Salino de Fosfatos (PBS) 1X. Este recubrimiento permitió mantener a los tejidos adheridos a los portaobjetos durante todo el procedimiento de la técnica.

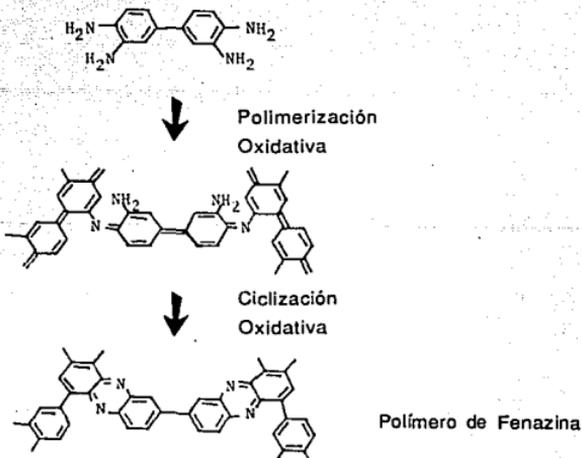
De cada tejido se obtuvieron varios cortes seriados, uno de los cuales fue sometido a tinción de Hematoxilina-Eosina (HE), para ser revisadas por el médico Patólogo y verificar el diagnóstico. El resto de los cortes se sometió al análisis inmunohistoquímico por el método de tinción por Peroxidasa-anti-Peroxidasa (PAP), para determinar la presencia y distribución del antígeno tardío común de papilomavirus.

El método de PAP utiliza tres reactivos principales: anticuerpo primario, anticuerpo secundario, y complejo PAP, constituido por 3 moléculas de la enzima peroxidasa y dos anticuerpos contra dicha enzima. El anticuerpo primario es específico para el antígeno; el anticuerpo secundario o de unión, es capaz de unir al anticuerpo primario con el complejo PAP. El anticuerpo secundario une uno de sus sitios Fab al anticuerpo primario, y el otro queda libre para unirse al anticuerpo del complejo PAP. La enzima peroxidasa se visualiza mediante una reacción con sustrato-cromógeno:

Oxidación de la Diaminobencidina (3,3',4,4'-Tetraminodifenil):



HRP=Peroxidasa



Las ventajas de éste método son: permite que se emplee material fijado en formol e incluido en parafina, lo que permite que se realicen estudios retrospectivos; no se requiere de equipo especial, las muestras pueden ser revisadas en microscopio de campo claro; el tejido queda permanentemente teñido, por lo que puede ser almacenado por mucho tiempo; se puede usar para estudios ultraestructurales y es una técnica muy sensible (68,72-75).

#### TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA POR EL METODO PAP:

Antes de iniciar con la técnica, todos los cortes se desparafinaron en un horno a 50°C por 2 horas; luego se lavaron varias veces en Xilol, y fueron rehidratados en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes: 100%, 95%, 70% y 30%. Finalmente se pasaron a PBS 1X.

1. Se añadió peróxido de hidrógeno al 3% a cada tejido, y se incubó 5 min a temperatura ambiente. El peróxido inactivó la peroxidasa endógena, que pudiera dar señales positivas falsas.

2. Se lavó en PBS 1X, y se secaron los alrededores del tejido. Se añadió la solución bloqueadora (suero de cerdo) que suprime la unión proteica inespecífica al anticuerpo que se emplea, se incubó 15 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.

3. Se eliminó el exceso de bloqueador y se añadió el primer anticuerpo, el cual va dirigido contra la proteína tardía común de Papilomavirus. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.

4. Se lavó en PBS 1X y se agregó el segundo anticuerpo que va dirigido contra el primer anticuerpo; a este anticuerpo se le conoce como anticuerpo de unión o puente. Se incubó 15 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.

5. Se lavó en PBS 1X, y se añadió el complejo PAP, el cual se une al anticuerpo secundario por el extremo que le queda libre. Se incubó 15 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.

6. Se lavó en PBS 1X y se añadió una solución de 3,3' Diaminobencidina-Tetrahidroclorada (DAB de Sigma) 6 mg en 10 ml de agua destilada con 100  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno 3%.

Cuando el peróxido entra en contacto con la peroxidasa del complejo, se descompone en agua y oxígeno; el oxígeno oxida a la DAB lo que resulta en la precipitación localizada de un polímero (fenacina) de color café que es insoluble en agua (72,76); de modo que en los sitios en los que había antígeno y se unió todo el complejo de tres reactivos, se observará al microscopio de campo claro un precipitado de color café.

7. Bajo el microscopio se checó el tiempo de reacción de la DAB con la peroxidasa. Cuando ya se había llevado a cabo la reacción, las laminillas se lavaron en PBS 1X.

8. Se tiñó con Hematoxilina de Harris para contrastar la señal positiva del resto del tejido; después de teñir 1-2 min se viró en agua corriente.

9. Se deshidrató en soluciones de etanol de concentraciones crecientes hasta llegar a Etanol absoluto, y finalmente se aclaró en Xilol.

10. Se montaron en resina sintética y se revisaron al microscopio de campo claro para determinar si hubo o no reacción positiva.

Las siguientes soluciones se obtuvieron del Kit DAKO PAP para tinción específica de Papilomavirus, de los Laboratorios DAKO: Peróxido de Hidrógeno 3%, Bloqueador, Anticuerpo primario, Anticuerpo secundario, y Complejo PAP.

**ESQUEMA METODOLOGICO DE LA TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA POR EL METODO DE PAP (68):**



**Bloqueador**



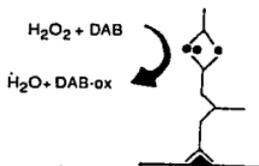
**1er Anticuerpo (Ab) anti-antígeno tardío de papilomavirus.**



**2o Ab. anti-1er Ab**



**Complejo PAP**



**3,3'-Diaminobencidina**

**Tinción con Hematoxilina**

## RESULTADOS

Al considerarse estos virus importantes en el CaCU, es deseable detectarlos en estas lesiones en la población Mexicana y determinar si tienen algún papel en el desarrollo de esta neoplasia. Para esto existen varias técnicas, una de ellas es la Inmunohistoquímica, la cual nos permite detectar productos protéicos de estos virus, tales como las proteínas de cápside (codificadas por los genes tardíos); esto nos permite detectar en una forma aproximada, que tan frecuente es y como se distribuye la infección por HPV en lesiones cervicales de diferente grado en pacientes del Instituto Nacional de Cancerología.

Se utilizaron cortes de tejidos incluidos en parafina de biopsias con displasias cervicales con diferentes grados, los cuales fueron sometidos al análisis inmunohistoquímico por el método de Peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP), y revisados en microscopio de campo claro. Se consideraron positivas para el antígeno común de papilomavirus, aquellas células cuyos núcleos estuvieran teñidos de color café, ya que al reaccionar la Diaminobencidina (DAB, 3,3',4,4'-Tetraaminodifenil) con la peroxidasa, ésta se oxidó originando un precipitado insoluble coloreado. Las células positivas se diferenciaron de las negativas, ya que éstas últimas se tiñieron de azul por la hematoxilina (Figura 5).

Se analizaron 6 muestras de cérvix normal (Figura 6) por el método de PAP y se encontró una muestra positiva para la expresión de la proteína tardía de HPV, y el resto fueron negativas (Figura 6 y Tabla 1). Los 5 papilomas (condilomas) estudiados fueron positivos para la expresión tardía de HPV (Figura 5 y Tabla 1).

De las muestras de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) grado I y II se encontraron 9 positivas de 13 (Figura 7 y Tabla 2); en el caso de las muestras con Carcinoma *In Situ* 4 de 10 fueron positivas (Figura 8 y Tabla 3); en tanto y sorpresivamente 6 de los 18 Carcinomas invasores fueron positivos (Figura 9 y Tabla 4).

**Tabla 1:** Análisis Inmunohistoquímico para la detección del antígeno tardío de papilomavirus en tejido cervical normal y en papilomas.

| TEJIDO                | Expresión de proteína tardía de HPV. | Localización de la señal positiva. |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Cérvix uterino</b> |                                      |                                    |
| N1                    | +                                    | parte sup. del epitelio            |
| N2                    | -                                    | -                                  |
| N3                    | -                                    | -                                  |
| N4                    | -                                    | -                                  |
| N5                    | -                                    | -                                  |
| N6                    | -                                    | -                                  |
| <b>Papilomas</b>      |                                      |                                    |
| P1                    | +                                    | parte sup. del epitelio            |
| P2                    | +                                    | parte sup. del epitelio            |
| P3                    | +                                    | parte sup. del epitelio            |
| P4                    | +                                    | parte sup. del epitelio            |
| P5                    | +                                    | parte sup. del epitelio            |

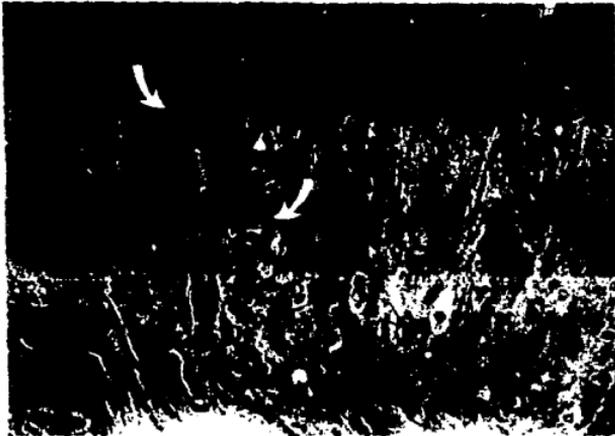
N = biopsias de tejido normal,

P = biopsias de papilomas infectados con papilomavirus;

sup. = superior.

+ = positivas

- = negativas



**Figura 5:** Tinción positiva para el antígeno tardío de papilomavirus, por el método inmunohistoquímico de Peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP): se añade un anticuerpo (Ab) 1o. dirigido contra la proteína tardía de papilomavirus, después se incuba con un Ab 2o. que actúa como puente para unir al Ab 1o con el complejo PAP, el cual se detecta por una reacción sustrato-cromógeno con DAB. 126X. Contratinción con Hematoxilina. A. Células positivas (flecha blanca), B. células negativas (flecha blanca).



**FIGURA 6:** Tejido cérvico-uterino normal negativo al análisis Inmuno-histoquímico para la expresión de la proteína de cápside de papilomavirus. 160X. Contraintención con Hematoxilina.

## LOCALIZACION DE LA PROTEINA TARDIA VIRAL EN LOS TEJIDOS:

La señal positiva se encontró distribuida en las células epiteliales de la región intermedia y superior del epitelio (Fig. 10), las cuales corresponden a las células más diferenciadas, tal y como se esperaba, ya que la expresión de los genes tardíos de HPV está regulada por los mecanismos de diferenciación celular. Es decir, sólo es posible encontrar proteínas de cápside en las células más diferenciadas del epitelio infectado.

Al examinar detenidamente las tinciones de inmunohistoquímica y en forma por demás interesante, ya que contrariamente a lo reportado en la literatura hasta ahora, también se encontró señal positiva en células de la capa basal (Figuras 11 y 12) (que son células indiferenciadas) en un número elevado de muestras positivas como se muestra en la Gráfica 1.

De las muestras positivas para la expresión de proteínas tardías de HPV, de NIC I-II, 6/9 de ellas mostraron células basales positivas, y en las 4 muestras de Carcinoma *In Situ* con proteína tardía de HPV se encontró señal positiva en el núcleo de células basales. También se encontró que conforme aumentaba la gravedad de la lesión disminuía la prevalencia del antígeno tardío de HPV ( ver Gráfica 1).

Para verificar el hallazgo de células basales positivas se repitió el análisis en un corte adyacente de muestras con este tipo de células positivas, y nuevamente se encontró tinción positiva en la capa basal del epitelio.

Por otro lado, para el caso de los carcinomas invasores positivos, estos también mostraron células positivas en cortes adyacentes. Con esto se confirma que la tinción positiva que se obtuvo no fué inespecífica.

Además, al realizar los controles adecuados, es decir, no usando el anticuerpo anti-proteína tardía de HPV, la señal no fué observada, corroborando una vez más que la tinción positiva obtenida no fué inespecífica.

**Tabla 2:** Análisis Inmuno histoquímico para la expresión de la proteína tardía de papilomavirus en biopsias de Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado I y II.

| TEJIDO       | Expresión de proteína tardía de HPV. | Localización de la señal positiva. |
|--------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <b>N I C</b> |                                      |                                    |
| NIC I        | ++                                   | parte superior y basal             |
| NIC I        | +                                    | parte superior                     |
| NIC I        | ++                                   | parte superior y basal             |
| NIC I        | ++                                   | parte superior y basal             |
| NIC I        | +                                    | parte superior                     |
| NIC I        | -                                    | -                                  |
| NIC I        | -                                    | -                                  |
| NIC II       | ++                                   | parte superior y basal             |
| NIC II       | -                                    | -                                  |
| NIC II       | +                                    | parte superior                     |
| NIC II       | ++                                   | parte superior y basal             |
| NIC II       | +                                    | parte superior                     |
| NIC II       | -                                    | -                                  |

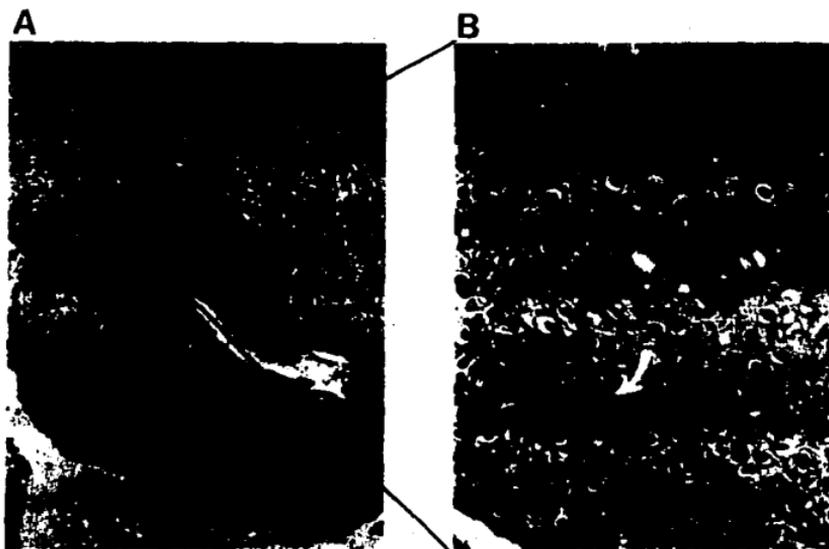
NIC I = Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I

NIC II= Neoplasia Intraepitelial Cervical grado II

+ = biopsias con células positivas para el antígeno de cápside sólo en la región superior del epitelio.

++ = biopsias con células positivas en las regiones superior y basal del epitelio.

- = negativas



**FIGURA 7:** Expresión de proteínas tardías de papilomavirus en una biopsia de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I (célula positiva señalada con la flecha). Contratinción con Hematoxilina. A. 50X, B. 160X.

**Tabla 3:** Análisis Inmunohistoquímico de la expresión de la proteína tardía de papilomavirus en biopsias de tejidos de Carcinoma *In Situ*.

| TEJIDO       | Expresión de proteína tardía de HPV. | Localización de la señal positiva. |
|--------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <b>C I S</b> |                                      |                                    |
| CIS 1        | ++                                   | parte superior y basal             |
| CIS 2        | ++                                   | parte superior y basal             |
| CIS 3        | -                                    | -                                  |
| CIS 4        | -                                    | -                                  |
| CIS 5        | -                                    | -                                  |
| CIS 6        | -                                    | -                                  |
| CIS 7        | ++                                   | parte superior y basal             |
| CIS 8        | ++                                   | parte superior y basal             |
| CIS 9        | -                                    | -                                  |
| CIS 10       | -                                    | -                                  |

CIS = Carcinoma *In Situ*;

++ = biopsias con células positivas para el a antígeno tardío en las regiones superior y basal del epitelio.

- = negativas

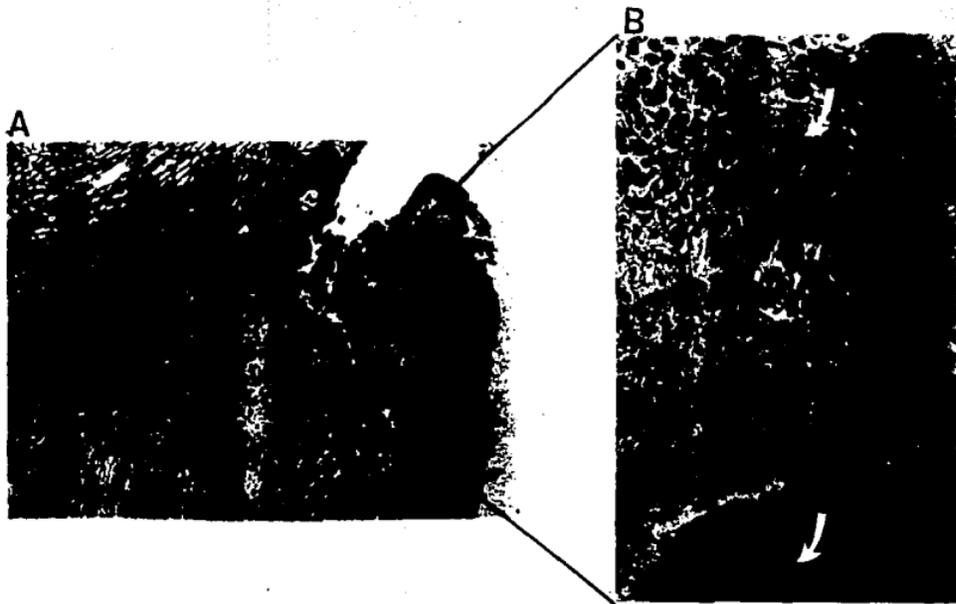


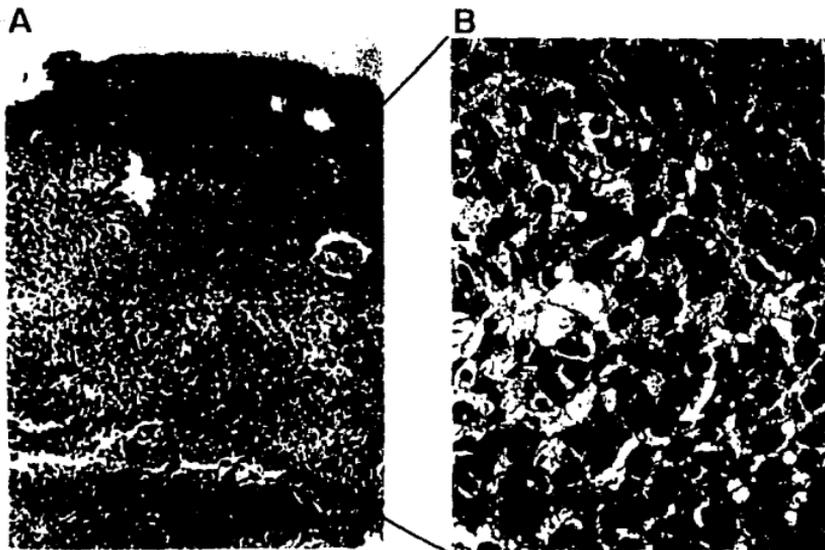
FIGURA 8: Expresión de proteínas tardías de papilomavirus en una biopsia de Carcinoma *In Situ* (célula positiva señalada con la flecha). Contratinción con Hematoxilina. A. 50X, B. 160X.

**Tabla 4: Análisis Inmunohistoquímico de la expresión de genes tardíos de HPV en biopsias de Carcinomas invasores.**

| TEJIDO  | Expresión de proteína tardía de HPV. | Localización de la señal positiva. |
|---|--------------------------------------|------------------------------------|
| NIC III, CIS con invasión glandular             | -                                    | -                                  |
| CIS c/invasión glandular                        | +                                    | células neoplásicas                |
| CIS con invasión glandular                      | -                                    | -                                  |
| NIC III, CIS con invasión glandular             | -                                    | -                                  |
| Ca. epid. microinvasor c/invasión glandular     | +                                    | células neoplásicas                |
| Ca. epid. microinvasor                          | +                                    | células neoplásicas                |
| Adenocarcinoma Endocervical Invasor             | -                                    | -                                  |
| Ca. epidermoide                                 | +                                    | células neoplásicas                |
| Ca. epid. de células grandes                    | +                                    | células neoplásicas                |
| Ca. epid. Invasor de células grandes.           | -                                    | -                                  |
| Ca. epid. Invasor de células grandes            | -                                    | -                                  |
| Ca. epid. Invasor de células grandes            | -                                    | -                                  |
| Ca. epid. Invasor de células grandes            | -                                    | -                                  |
| Ca. epid. Invasor de células grandes            | -                                    | -                                  |
| Ca. epid. Invasor de células grandes            | -                                    | -                                  |
| Ca. epid. Invasor de células grandes            | +                                    | células neoplásicas                |
| Ca. epid. Invasor de células grandes            | -                                    | -                                  |
| Ca. epid. Invasor de cels. gdes. queratinizante | -                                    | -                                  |

Ca.=Carcinoma; CIS=Carcinoma *In Situ*; Epid.= epidermoide, Cels = células

- = negativo, + = positivo.



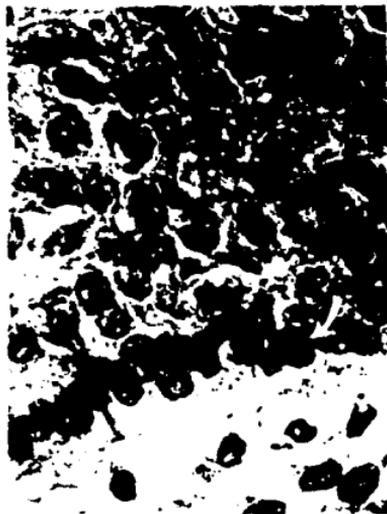
**FIGURA 9:** Expresión de proteínas tardías de Papilomavirus en una biopsia de Carcinoma Epidermoide Invasor (célula positiva señalada con la flecha). Contratinción con Hematoxilina. A. 63X, B. 315X.



**FIGURA 10:** Expresión del antígeno tardío de cápside de papilomavirus en las regiones: **A.** superior (células diferenciadas) 200X, y **B.** intermedia del epitelio cervical de una biopsia de Neoplasia Intraepitelial Cérvical grado I (las células positivas están señaladas con flechas). Contratinción con Hematoxilina. 126X.

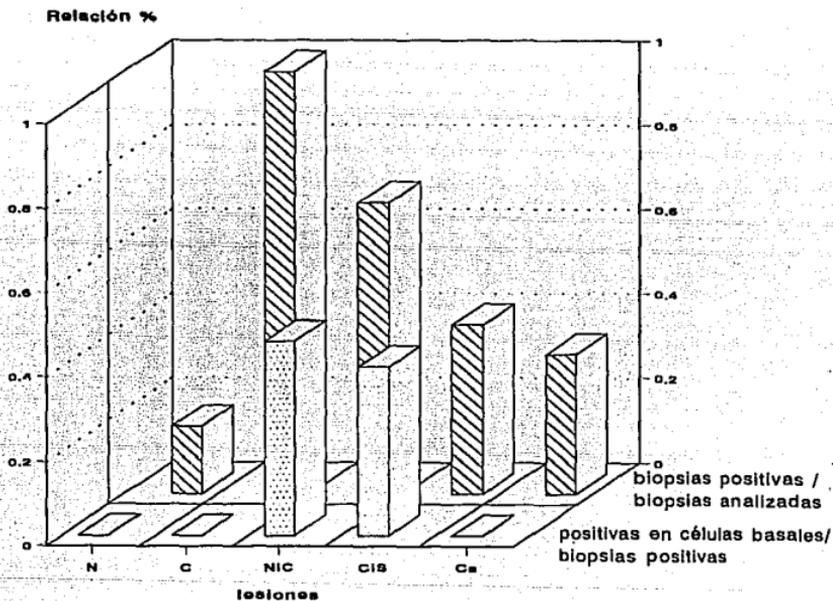


**FIGURA 11:** Expresión del antígeno tardío de cápside de papilomavirus en las regiones: **A.** intermedia 126X, y **B.** basal del epitelio cervical de una biopsia de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I (células positivas señaladas con flechas). Contraintinción con Hematoxilina. 315X.



**FIGURA 12:** Expresión del antígeno tardío de papilomavirus en células de la capa basal del epitelio cervical de una biopsia de una Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I (flechas). Contratación con Hematoxilina. 315X..

**GRAFICA 1: Relación de la expresión de proteína tardía de HPV y lesión cervical**



N = Cérvix normal

C = Condilomas (papilomas)

NIC = Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I - II

CIS = Carcinoma In Situ

Ca = Carcinomas epidermoides invasores  
(incluye un adenocarcinoma)

## DISCUSION

Existen evidencias que sugieren a los HPVs como agentes etiológicos del CaCU. Entre ellas se ha encontrado que inducen transformación maligna en el epitelio infectado (de modo que las infecciones por HPV pueden ser potencialmente oncogénicas) (79), pueden transformar morfológicamente células de rata y ratón *in vitro*, y se ha encontrado el DNA de HPV presente y estable tanto en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales, como en tumores cervicales (18, 25, 44). Recientemente, basándose en estudios de microscopía electrónica y citológicos, se ha sugerido que la infección por HPV del cérvix puede ser la principal causa de la displasia cervical (12, 23); también se ha encontrado antígeno viral en algunas biopsias con atipias en el epitelio cervical (78).

Ya que se sugiere que los HPVs sean agentes etiológicos importantes del CaCU, es muy común que se desee detectar este virus en tejido cervical con el objetivo de tratar de dilucidar su papel en el CaCU o bien para auxiliar a los clínicos en el diagnóstico. Existen diferentes técnicas para detectar la presencia de HPV, algunas permiten reconocer la presencia del DNA o sus transcritos, lo que nos ayuda a detectar tipos específicos del virus, y la cantidad de material genético viral, información que es útil para estudios más finos y detallados. También existe otra técnica que nos permite identificar la presencia de proteínas virales: la Inmunohistoquímica, la cual se basa en el reconocimiento específico de un antígeno mediante un anticuerpo (68). Con esta técnica se puede identificar el antígeno tardío de HPV (proteína de cápside). Esta técnica se realiza sobre cortes de tejido incluidos en parafina, lo que nos permite determinar en que tipo de células ocurrió la infección, y como se distribuye ésta en el tejido. Existen diferentes técnicas de tinción Inmunohistoquímica. Una de las más usadas es la tinción con inmunoperoxidasa por el método de PAP.

Se sabe que el genoma viral consta de tres regiones: una región Control denominada LCR que controla la expresión genómica y replicación; una región Temprana, la cual contiene los genes que codifican las proteínas involucradas en la replicación de su DNA, la transcripción y transformación celular (oncoproteínas), y una región Tardía que codifica para las proteínas de cápside (73, 74).

Las regiones tardía y temprana son transcritas secuencialmente durante una infección lítica en células permisivas (que permiten que el virus se replique libremente hasta causar lisis celular), mientras que en las no-permisivas el genoma viral puede integrarse al genoma hospedero, de forma que su replicación no es independiente y la transcripción de la región tardía no se efectúa, solo se transcribe la región temprana formando las proteínas oncogénicas (5, 6).

Se ha encontrado que los genes tardíos se expresan sólo en células diferenciadas del epitelio, ya que su expresión está regulada por los mecanismos de diferenciación celular (37, 38). Se ha demostrado que los papilomavirus humanos, caninos, bovinos y de conejo comparten 10 o más determinantes antigénicos de cápside, de modo que puede detectarse por un anticuerpo común preparado contra viriones rotos de cualquier miembro del género (78, 80).

Con el objetivo de determinar la expresión de los genes tardíos de papilomavirus y su distribución, así como su prevalencia en lesiones cervicales de diferente grado de severidad, se analizaron cortes de tejidos incluidos en parafina de biopsias con diferentes lesiones cervicales mediante Inmunohistoquímica por el método de PAP, el cual ofrece las siguientes ventajas:

- 1) Se pueden usar tejidos incluidos en parafina, lo que permite
- 2) hacer estudios retrospectivos,
- 3) estudios ultraestructurales,
- 4) da un buen detalle morfológico,
- 5) no se requiere equipo sofisticado,
- 6) la tinción positiva es permanente,
- 7) la técnica es reproducible y sencilla, y,
- 8) nos permite determinar exactamente en que tipo de células y en que región del tejido se encuentra la proteína que estamos buscando específicamente (72, 74).

Así pues, nos permite establecer la distribución de la proteína que se está buscando en el tejido. También podemos determinar en cuantas células está presente esta proteína.

Al determinar en que tipo de células se localiza el antígeno tardío de HPV así como su distribución dentro de los tejidos, los cuales presentan lesiones cervicales de diferentes grados, nos permite analizar un poco la historia natural de la infección.

En nuestro caso las técnicas Inmunohistoquímicas nos permitieron evaluar simultáneamente la morfología de las células que se analizan, así como la presencia del virus en ellas, de modo que se puede correlacionar la infección con el grado de diferenciación celular.

A pesar de las ventajas que tiene el método de PAP, tiene las siguientes limitantes: no nos permite identificar específicamente que tipo de HPV está presente en las muestras, y es un método cualitativo, no cuantitativo, por lo que no podemos determinar el número de copias del virus.

Para detectar el antígeno tardío de papilomavirus, utilizamos un Kit (DAKO PAP Kit) que contiene todos los anticuerpos y reactivos necesarios para el ensayo por el método de PAP. Antes de iniciar la técnica todos los tejidos fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 3%, para eliminar la actividad de peroxidasa endógena.

Una reacción positiva fue interpretada como un precipitado granular de color café intranuclear confinado a las células epiteliales, este precipitado es el producto de la oxidación del DAB. Se encontró que la reacción positiva variaba en intensidad, lo cual puede deberse a diferente cantidad de proteína viral presente en los tejidos, o que algunas células apenas estuvieran comenzando a sintetizarla. Las células que mostraban una reacción positiva para el antígeno común de papilomavirus, no se distinguieron morfológicamente de aquellas que fueron negativas. La señal positiva se encontró siempre en los núcleos y a diferentes niveles en el epitelio cervical. Se observó que mientras aumentaba la severidad de la atipia epitelial, la prevalencia del antígeno disminuía; esto sugiere que al aumentar la severidad de la lesión, los mecanismos de regulación de los virus pueden cambiar de tal forma que ya no es necesario que se sintetice proteína de cápside, esto puede deberse a que el genoma viral puede integrarse al genoma hospedero (41, 49).

Las diferencias en tinción dentro un mismo tejido, es decir que se encontrarán algunas células positivas y otras negativas, puede deberse a que las diferentes células se encontraban en diferentes estadios de infección viral; no todas estaban produciendo las proteínas de cápside al mismo tiempo o bien, que las células no tuvieran virus. Una célula negativa no indica necesariamente que no haya infección por papilomavirus; en éstas células puede ser que el genoma esté presente, pero que no haya síntesis de proteína de cápside. Así, las células que tiñeren inmunológicamente son sitios de producción viral.

También hay que considerar que se trabajó sobre cortes histológicos muy delgados, de tal forma que debido al plano que tenga el corte, puede ser que se esté subestimando de alguna forma algunas células que sean positivas, pero que no se alcanzan a observar en el corte.

Los tejidos que tenían núcleos positivos para el antígeno común tardío de papilomavirus, se encontraban en un rango de diagnóstico histológico que va desde endocervicitis crónica inespecífica (no neoplásico) hasta Carcinoma Invasor. La distribución del antígeno en los tejidos positivos fue variable, pero no todas las células afectadas se tiñeron para el antígeno. En los tejidos positivos el número de células positivas varió. En algunas muestras la distribución de las células positivas fue irregular y dispersa, y la identificación de las células poco positivas requirió de una cuidadosa revisión de todo el tejido.

Algo que llamó la atención fue que se encontró que una de las muestras de tejido cérvico-uterino "normal" presentó antígeno de cápside de HPV. Puede ser que esta paciente al infectarse estuviera en buen estado inmunológico, de modo que no desarrolló la lesión característica de estos virus. En algunos países de América del Norte y Europa se ha reportado una incidencia relativamente alta de HPV en mujeres sanas, que al momento del análisis no habían desarrollado ninguna lesión cervical relacionada con la presencia de HPV (81), por lo que nuestro resultado puede considerarse válido. Aún cuando se trata de una muestra muy pequeña, esto es importante, por que nos indica que puede existir población aparentemente "sana" que está infectada por papilomavirus, de forma que potencialmente, están expuestas a desarrollar una lesión característica de éste virus en algún momento.

Se encontró una cantidad mas alta de lo esperado de carcinomas invasores positivos para el antígeno de cápside (6/18). Debido a que en los carcinomas invasores (excepto los bien diferenciados), la mayor parte de las células son indiferenciadas que están en constante división y que se ha observado que la expresión de los genes tardíos sólo se lleva a cabo en células diferenciadas (37, 38), se esperaba un número menor de casos positivos para estas muestras. Se repitió el ensayo en otros cortes adyacentes, y se volvió a encontrar señal para el antígeno común. Esto nos indica que la señal que se obtuvo en el primer ensayo en las muestras de carcinomas invasores, fue específica y no se debió a algún efecto *in vitro* o a tinción inespecífica.

De acuerdo a nuestros objetivos encontramos que la prevalencia de HPV (determinada por la presencia del antígeno tardío de cápside) que encontramos para el caso de los cérvix normales y las Neoplasias cervicales intraepiteliales fué muy semejante a los que se ha observado en otras poblaciones. Sin embargo para el caso de los carcinomas *In Situ* y carcinomas invasores la prevalencia del antígeno tardío de HPV fué mucho más alta de lo que se ha encontrado en otros países (de Europa y América del Norte) y de lo que se esperaba (81).

En todos los tejidos sometidos al análisis inmunohistoquímico para determinar la expresión de los genes tardíos de HPV, se encontró que la mayoría de los núcleos positivos pertenecían a las células de las capas superficiales e intermedias del epitelio, donde se encuentran las células más diferenciadas. Esto coincide con lo que se ha reportado hasta ahora, ya que se sabe que la expresión de éstos genes está regulada por los mecanismos de diferenciación celular, y apoya la hipótesis del trabajo.

Sin embargo, en un gran número de las muestras positivas (6/9 NIC I-II y 4/4 Carcinomas *In Situ*), también se encontraron células basales positivas, siendo que estas células son indiferenciadas. En algunos de los casos con células basales positivas, se repitió el ensayo sobre cortes adyacentes del mismo tejido, y nuevamente se encontraron células basales positivas ratificando los primeros resultados.

El encontrar células indiferenciadas (células basales y células de los carcinomas invasores) con el antígeno de cápside de papilomavirus, puede

sugerir la presencia de algún tipo especial de célula indiferenciada permisiva en estos tejidos, favorece que se expresen los genes tardíos y se sintetice la proteína de cápside; o bien puede sugerir que los HPV que infectaron a estas muestras presenten algún mecanismo diferente de regulación de expresión de sus genes tardíos (por lo menos), que les permite presentar proteínas de cápside en células que presentan división constante (indiferenciadas). También puede deberse a que los tejidos no-diferenciados pueden permitir la expresión de los genes virales.

Otra posibilidad, es que en los carcinomas invasores e *In Situ* donde se detectó proteína tardía, los HPV se encuentren como formas libres (episomales) (54) y no integrados, de tal forma que los genes tardíos se encuentran íntegros y activos y por lo que hay síntesis de cápside, y es lo que se está detectando. Ya se ha observado que en carcinomas invasores pueden existir formas episomales de papilomavirus, por lo que esta puede ser una buena explicación a nuestro hallazgo.

Por otra parte el Dr. Luis Marat Alvarez Salas (CINVESTAV-IPN) (82) en una comunicación personal, sugiere que en todas las células existen los factores que permiten que los genes tardíos de HPV se expresen, pero de acuerdo al estado de diferenciación de la célula, éstos se encuentran en mayor o menor cantidad, de tal forma que hasta ahora se había encontrado que sólo se expresaban los genes tardíos de HPV en células diferenciadas; pero debido a que estos factores se encuentran en todas las células es posible que en células no diferenciadas se expresen también debido por un aumento en la cantidad de éstos.

Con este tipo de ensayo no podemos caracterizar con precisión nuestro hallazgo, por lo que sería necesario realizar estudios más específicos (que nos permitan detectar DNA o RNA), tales como análisis por Hibridación *In Situ*, y determinar, que tipo de HPV se encuentra en éstos tejidos, y que mecanismos podrían estar participando en la regulación de éstos genes.

Aunque el análisis inmunohistoquímico no nos proporciona información muy detallada, si nos permite detectar una infección por papilomavirus en lesiones cervicales con patologías de diferente grado. Esto nos puede ayudar en el estudio de la historia natural de estas lesiones y así apoyar la idea de que estos virus tienen algún papel en el desarrollo de las mismas.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se determinó la expresión, prevalencia y distribución del antígeno tardío de HPV en biopsias de tejido cérvico-uterino normal y con patología preneoplásica y neoplásica mediante Inmunohistoquímica.
2. Se encontró un porcentaje elevado de muestras de Carcinomas Invasores y Carcinomas *In Situ* positivos para el antígeno de cápside de papilomavirus.
3. Se encontró reactividad para la expresión de proteína de cápside de papilomavirus en células indiferenciadas (de la capa basal del epitelio, y células de carcinomas invasores) y en células diferenciadas epiteliales.
4. La presencia de proteínas de cápside en células en división continua, sugiere la existencia de algún tipo especial de células indiferenciadas permisivas que soportan la expresión de los genes tardíos de papilomavirus.

## BIBLIOGRAFIA

1. LaVia MF., Hill RB. 1975. *Principles of Pathobiology*. Oxford University Press, USA. Chapter 6, Prehn, RT.
2. Robbins SL., Contran RS., Kumar V. 1984. *Pathologic Basis of Disease*. Saunders Co. 3rd. Ed. USA.
3. Karp G. 1987. *Biología Celular*. McGraw-Hill, México.
4. Weinberg RA. The Genetic Bases of Cancer. *Arch. Surg.* 125: 257-260, 1990.
5. DeVita VT., Hellman Sjr., Rossenbarg AS. 1989. *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. Lincott. USA.
6. Guerrero I, Pellicer P. Mutational activation of Oncogenes in animal model systems of carcinogenesis. *Mut Res.* 185:293-308, 1987.
7. MacDonald SG., Burns DM. 1978. *Física para las Ciencias de la Vida y de la Salud*. Fondo Educativo Interamericano. México.
8. Alberts B., Bray D., Lewis J., *et al.* 1983. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishers Inc. New York & London.
9. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222:771-778, 1983.
10. Haseltine WA, Staal FW. The molecular biology of the AIDS virus. *Sci. Amer.* 254(4): 34-42, 1988.
11. Kessler I. Venereal Factors in Human cervical Cancer. *Cancer*, 39:1912-1919, 1977.
12. Coleman DV, Richman PI. Human Papillomavirus infection and cancer of the uterine cervix. *J. Pathol.* 145:207-212, 1985.
13. Fentanes TE., Guevara CE. 1980. *Citología Clínica*. La Prensa Medica Mexicana, México.
14. Torres LA., Cruz TF., *et al.* Cáncer Cervico-uterino, 1983-1984. *Rev. Inst. Nat. Cancer.* 34(3): 617-622, 1988.
15. Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol.* 21(3):379-389, 1977.
16. Rosai J. 1989. *Surgical pathology*. Vol II. USA.

17. Ramírez GJL, Luévano FE, Mora TA, *et al.* Carcinoma Cervico-Uterino. Rev. Inst. Nal Canc. 33(3):417-420, 1987.
18. Reeves WC., Rawls WE., Brinton LA. Epidemiology of Genital Papillomaviruses and Cervical Cancer. Rev. Infect. Diseases. 11(3): 426-439, 1989.
19. Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, *et al.* The male factor in the etiology of cervical cancer among sexually monogamous women. Int. J. Cancer, 44:199-203, 1989.
20. Skregg DC, Corwin PA, PAul C, Doll R. Importance of the male factor in cancer of the cervix. The Lancet, 2:581-583, 1982.
21. Josey WE., Nahmias AJ., Naib ZM. Viruses and Cancer of the Lower Genital Tract. Cancer 38(1): 526-533, 1976.
22. Rapp F, Jenkins FJ. Genital cancer and viruses. Gynecol Oncol. 12:S25-S41, 1981.
23. Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomaviruses and human cancer. Hum. Pathol. 21(7):686-698, 1990.
24. Gupta JW, Saito K, Saito A, *et al.* Human papillomaviruses and the pathogenesis of cervical neoplasia. A study by *In Situ* Hybridization. Cancer 64(10): 2104-2110, 1989.
25. ZurHausen H. Papillomaviruses in Human Cervical Cancer. Cancer 59(10): 1692-1696, 1987.
26. Wilczynski SP, Bergen S, Walker J, *et al.* Human papillomaviruses en cervical cancer: Analysis of histopathologic features associated with different viral types. Hum Pathol 19(6): 697-704, 1988.
27. Kessler II. Etiological concepts in cervical carcinogenesis. Gynecol Oncol. 12: S7-S24, 1981.
28. Brinton LA, Scharner C, Haenszel W, *et al.* Cigarette smoking and invasive cervical cancer. JAMA, 255(23): 3265-3269, 1986.
29. Swan SH, Brown WL. Oral Contraceptive use, sexual activity, and cervical cancer. Am J Obstet Gynecol. 139(1): 52-57, 1981.
30. Stern E, Forsythe AB, Youkeles L, Coffelt CF. Steroid contraceptive use and cervical dysplasia. Science 196:1460-1462, 1977.
31. Bernstein A, Harris B. The relationship of the dietary and serum vitamin A to the occurrence of cervical intraepithelial neoplasia in sexually active women. Am J Obstet Gynecol, 148(3): 309-312, 1984.

- 32 Lancaster WD., Olson C. Animal Papillomaviruses. *Microbiol Rev.* 46(2):191-207, 1982.
33. Crawford LV. Nucleic Acids of Tumor Viruses. *Adv Virus Res.* 14:89-152, 1969.
34. Cole ST, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J Mol Biol.*, 193: 599-608, 1987.
35. Seedorf K, Krämer G, Dürst M, *et al.* Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 145: 181-185, 1985.
36. Schneider A, Oltersdorf T, Schneider V, Gissman L. Distribution pattern of human papillomavirus 16 genome in cervical neoplasia by molecular *In Situ* Hybridization of tissue sections. *Int J Cancer*, 39:717-721, 1987.
37. Brescia RJ, Jenson B, Lancaster WD, Kurman RJ. The role of human papillomaviruses in the pathogenesis and histologic classification of precancerous lesions of the cervix. *Hum Pathol.*, 17(6): 552-559, 1986.
38. Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD. Papillomavirus infection of the cervix. II. Relationship to intraepithelial neoplasia based on the presence of specific viral structural proteins. *Am J Surg Pathol.*, 7: 39-52, 1983.
39. Tase T, Okagaki T, Clarck BA, *et al.* Human papillomavirus types and localization in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix: A study by *In Situ* DNA Hybridization. *Cancer Res.*, 48: 993-998, 1988.
40. Grubendorf-Conen EI, Cremer S. The Demonstration of human papillomavirus 16 genomes in the nuclei of genital cancers using two different methods of *In Situ* Hybridization. *Cancer* 65(2): 238-241, 1990.
41. Lazo PL., *et al.* Amplification of the Integrated viral transforming genes of human papillomavirus 18 and it's 5'flanking cellular sequence located near the c-MYC protooncogene in HeLa cells. *Can Res.*, 49:4305-4310, 1989.
42. McCance PL. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7169-7173, 1988.
43. Barnes W, Delgado G, Kurman RJ, *et al.* Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 29:267-273, 1988.
44. Walker J, Bloss JD, Liao SY, *et al.* Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet. Gynecol.*, 74(5): 781-185, 1989.

45. Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, *et al.* Oncogene association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI*, 79(4): 671-677, 1987.
46. Lehn H, krieg P, Sauer G. Papillomavirus genomes in human cervical tumours: Analysis of their transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 82: 5540-5544, 1985.
47. Crum CP, Ikenberg H, Richart M, Gissman L. Human papillomavirus type 16 and aerly cervical neoplasia. *N. Engl. J. Med.*, 310(14): 880-883, 1984.
48. Lehn H, Ernst M, Sauer G. Transcription of episomal papillomavirus DNA in human condylomata acuminata and Buschke-Löwenstein tumours. *J Gen Virol*. 65: 2003-2010, 1984.
49. Dürst M., *et al.* Papillomavirus sequence integrate near cellular oncogene in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 84: 1070-1074, 1987.
50. Ocadiz R., Saucedo R, Salcedo M., *et al.* Ocurrence of human papillomavirus type 16 DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine-cervix carcinoma. *Arch Invest (Méx.)*, 20(4): 355-362, 1989.
51. Ocadiz R., Saucedo R., Cruz M., *et al.* High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 47: 4173-4177, 1987.
52. Riou G, Barrois M, Tordjman I, *et al.* Présence de genomes de papillomavirus et amplification des oncogènes c-myc et c-Ha-ras dans des cancers envahissants du col de l'utérus. *C.R.Acad. Sci. Paris, III* 299:575-580, 1984.
53. Phelps WC., Yee CL., Münger K., Howley P. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53:539-547, 1988.
54. Choo KB, Pan CC, Liu MS, *et al.* Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma. *J Med Virol.*, 21: 101-107, 1987.
55. Schwarz E, Freese UK, Gissman L, *et al.* Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314:111-114, 1985.
56. Lambert PF, Baker CC, Howley PM. The genetics of Bovine Papillomavirus type 1. *Annu Rev Genet* 22: 235-258, 1988.
57. Münger K., *et al.* Complex formation of the human papillomavirus E7 with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO. J.*, 8(13):4099-4105, 1989.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

58. Dyson N., *et al.* The human papillomavirus E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243:934-946, 1989.
59. Green MR. When the products of oncogenes and antioncogenes meet. *Cell*, 56:1-3, 1989.
60. Horowitz JM, *et al.* Point mutational inactivation of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science*, 242:263-266, 1988.
61. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 pro-oncogene can act as a supresor of transformation. *Cell*, 57:1083-1093, 1989.
62. Furukawa Y, *et al.* Expression state of phosphorylation of the Rb susceptibility gene product in cycling and non-cycling human hematopoietic cells. *Proc. Natl Acad sci USA*, 87: 2771-2774, 1990.
63. Shirasawa S, Urabe K, Yanagawa Y, *et al.* p53 gene mutations in colorectal tumors from patients with famillial polyposis coli. *Cancer Res.* 51(11):2874-2878, 1991.
64. Green AR. Recessive mechanisms of malignancy. *Br J Cancer*, 38:115-121, 1988.
65. Whyte P., *et al.* Association between an oncogene and antioncogene: the adenovirus E1A protein bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 334:124-129, 1988.
66. Zur Hausen H. Human genital cancer: Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events?. *The Lancet*, ii:1370-1372, 1982.
67. Zur Hausen H. The role of Viruses in Human Tumors. *Adv Cancer Res.*, 33: 77-107, 1980.
68. Bourne JA. 1983. Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods. DAKO Corporation, USA.
69. Paul WE. 1989. Fundamental Immunology. Raven Press, N. York, USA.
70. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem Cytochem*, 22(12): 1084-1091, 1974.
71. Sepulveda AH. 1984. Tecnicas Inmunohistoquímicas en patología. I. Preparación del complejo Peroxidasa-Antiperoxidasa. Tesis, Facultad de Química, UNAM.

72. Mesa TR, Pascal RR, Fenoglio CM. Immunoperoxidase: a sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory. *Hum Pathol.* 8(3):313-320, 1977.
73. Kurman RJ, Shah KH, Lancaster WD, Jenson AB. Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulvar condylomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 140(8):931-935, 1981
74. Taylor CR, Kledzick G. Immunohistologic Techniques in Surgical Pathology - a spectrum of new special stains. *Hum Pathol.*, 12(7): 590-596, 1981
75. Nakane PK, Pierce GB. Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 14(12): 929-931, 1967.
76. Seligman AM, Shannon WA, Hoshina Y, Plapinger RE. Some important principles in 3,3' Diaminobenzidine, ultrastructural cytochemistry. *J Histochem Cytochem.* 21(8): 756-758, 1973.
77. Gupta JW, Gupta PK, Shah KV, Kelly DP. Distribution of human papillomavirus antigen in cervicovaginal smears and cervical tissues. *Int J Gynecol Pathol.* 2: 160-170, 1983.
78. Woodruff JD, Braun L, Cavaleri R, *et al.* Immunologic identification of papillomavirus antigen in condyloma tissues from female genital tract. *Obst. Gynecol.* 56(6): 727-732, 1980.
79. Zur Hausen H, DeVilliers EM, Gissman L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol Onciol.* 12:S124-S128, 1981.
80. Jenson AB, Rosenthal JD, Olson C, *et al.* Immunologic relatedness of papillomavirus from different species. *J Natl Cancer Inst.* 64(3): 495-500, 1980.
81. Fuchs PG, Girardi F, Pfister H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 41: 41-45, 1988.
82. Dr. Luis Marat Alvarez Salas, CINVESTAV, IPN. México, D.F. Comunicación personal

## APENDICE:

### **Reactivos:**

Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Baker)

Fosfato Dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Baker)

Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ , Baker)

3,3' Diaminobencidina ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4$ , Sigma)

Poli-D-Lisina ( P.M. 150,000-300,000, Sigma)

Agua Bidestilada ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Peróxido de Hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Hematoxilina

Eosina

Etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ , Laitz)

Xilol (Merck)

Resina Sintética (Sigma)

### **Soluciones:**

#### **- Buffer Salino de Fosfatos 1X (PBS):**

|  |          |
|--|----------|
| Fosfato monobásico de sodio                  | 0.092 gr |
| Fosfato dibásico de sodio                    | 0.320 gr |
| Cloruro de sodio                             | 8.480 gr |
| Aforo con $\text{H}_2\text{O}$ bidestilada a | 1000 ml  |

#### **- Poli-D-Lisina 10mg/ml (solución stock):**

|               |       |
|---------------|-------|
| Poli-D-Lisina | 10 mg |
| PBS 1X        | 1 ml  |

#### **- Solución de Eosina Alcohólica:**

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Eosina Azulosa            | 1.0 gr |
| Orange G                  | 1.0 gr |
| Aforo con etanol al 70% a | 100 ml |

**Solución de Hematoxilina de Harris:**

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| Hematoxilina                  | 1.0 gr   |
| Oxido rojo de Mercurio        | 0.5 gr   |
| Sulfato de Aluminio o Potasio | 20.0 gr  |
| Etanol absoluto (100%)        | 10.0 ml  |
| Aforo con agua bidestilada    | a 200 ml |

**Técnicas:**

**Técnica de Tinción de Hematoxilina-Eosina:**

Esta tinción se usa comúnmente para diagnósticos histopatológicos. Es una tinción diferencial, en la que la Hematoxilina tiñe al núcleo, y la Eosina tiñe al citoplasma y al tejido conectivo.

Las preparaciones se sumergieron en las siguientes soluciones:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Hematoxilina de Harris | 3 min    |
| Agua de la llave       | 10 baños |
| Agua bidestilada       | 1 min    |
| Eosina-alcohólica      | 5 min    |
| Etanol al 70 %         | 2 min    |
| Etanol al 80 %         | 2 min    |
| Etanol al 96 %         | 5 min    |
| Etanol al 100%         | 5 min    |
| Etanol-Xilol           | 3 min    |
| Xilol                  | 3 min    |
| Xilol                  | 3 min    |

Por último, los tejidos ya teñidos y aclarados en Xilol, se montaron en resina sintética.

**- Técnica de Tinción con Hematoxilina:**

Se usó como tinción de contraste. Las preparaciones se pasaron por las siguientes soluciones:

|                        |       |
|------------------------|-------|
| Hematoxilina de Harris | 2 min |
| Agua de la llave       | 2 min |
| Agua destilada         | 1 min |
| Etanol al 50%          | 3 min |
| Etanol al 70%          | 3 min |
| Etanol al 96%          | 3 min |
| Etanol al 100%         | 5 min |
| Xilol                  | 5 min |

Por último se montaron las preparaciones en resina sintética.