



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Presencia y localización de las proteínas supresoras de  
tumores p53, hDlg y PTEN en lesiones premalignas y  
Cáncer Invasor del Cervix**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MARÍA ALICIA ELENAÉ VÁZQUEZ ULLOA**



**DIRECTORA DE TESIS:  
Dra. Adriana Contreras Paredes  
2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## **HOJA DE DATOS DEL JURADO**

### **1.- Datos del alumno**

**Vázquez**

**Ulloa**

**María Alicia Elenaé**

**55 83 18 50**

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Ciencias**

**Biología**

**40503306-9**

### **2.- Datos del tutor**

**Dra.**

**Adriana**

**Contreras**

**Paredes**

### **3.- Datos del sinodal 1**

**Dr.**

**Rafael**

**Camacho**

**Carranza**

### **4.- Datos del sinodal 2**

**Dra.**

**Marcela**

**Lizano**

**Soberón**

### **5.- Datos del sinodal 3**

**Dr.**

**Erick Natividad**

**De la Cruz**

**Hernández**

### **6.- Datos del sinodal 4**

**M. en C.**

**Gustavo Jesús**

**Ortega**

**Lule**

### **7.- Datos del trabajo escrito**

**Presencia y localización de las proteínas supresoras de tumores p53, hDlg y PTEN en lesiones premalignas y Cáncer Invasor del Cervix.**

**63p 2009**

## AGRADECIMIENTOS

- *Al departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), a todas las personas que ahí laboran por su apoyo y amabilidad. Un especial agradecimiento a la señora Lupita por su paciencia, a Edith y Eduardo por tanto trabajo que les di.*
- *Al Dr. Alejandro Aviles quien con su conocimiento y buen ojo hizo posible este trabajo: mil gracias.*
  - *Al Dr. Alejandro Mohar por su apoyo a este trabajo*
- *A la Dra. Marcela Lizano por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y por sus aportaciones a esta tesis.*
- *A la Dra. Adriana Contreras por ser además de maestra una amiga. Gracias por tenerme la confianza de ser tu primera alumna. He aprendido mucho de ti.*
- *Al Dr. Erick de la Cruz y al Profesor Gustavo Ortega por el tiempo de leer este trabajo y darme sus consejos.*
- *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto 69875 y Salud-2004 (01-67/A-1)*
  - *A la Facultad de Ciencias*
- *A todos mis compañeros del laboratorio, porque somos un gran equipo y es un placer trabajar con ustedes.*

## DEDICATORIAS

- **A Dios quien me dio la oportunidad de vivir y me ha concedido tantas cosas bellas.**
- **A todos mis amigos de hoy y siempre los llevo en mi corazón: Dora, Daniel, Morita; Rose y Marina (arañas), Yadira, mi amiga de toda la vida Gilda, Carlitos, mis compañeros en la carrera que tantas risas me regalaron: José Luis, Samanta y Pit.**
- **A ese amiguito que se desvelo tantas veces conmigo y que me ha enseñado a respetar la vida en todas sus formas: Darwin.**
- **A mi primo Álvaro, eres un gran amigo, cómplice y maestro, eres el mejor de los primos. Me haz recordado lo bella que es la familia.**
  - **A mi tío Fernando, te quiero, te admiro. Gracias por creer en mí.**
- **A mi Nina: Eres la mejor tía que hubiera podido tener, siempre de buenas y dispuesta. Te quiero mucho.**
- **Luis: gracias por recorrer conmigo este largo camino, porque siempre creíste en mí. En los momentos más difíciles me ayudaste y me diste aliento. Haz llenado mi vida de amor, fe, paciencia y alegría. TA**
- **A mi hermano Lupansky por todos los momentos buenos y malos juntos, por decirme lo que no quiero escuchar y por enseñarme lo que tu haz visto. Gracias por ser un gran ejemplo. Sabes que te quiero muchísimo.**
- **Mamá: gracias por ser mi mapa, por siempre estar a mi lado y darme la confianza para hacer las cosas. Gracias por tu amor incondicional, por tu tiempo y tu esfuerzo, hubo veces que el camino se vio oscuro pero no te rendiste. Gracias por hacerme una persona de bien y darme la oportunidad de cumplir este sueño. Este trabajo es para ti!!!**

## INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
1. El Cáncer.....	3
1.2 Cáncer cervicouterino y epidemiología.....	3
1.3 Anatomía del cervix .....	4
1.4 Patología cervical: Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).....	6
1.5 Cáncer invasor de células escamosas.....	8
1.6 Cáncer invasor de células columnares (adenocarcinoma).....	9
1.7 Factores de riesgo.....	10
2. El virus del papiloma humano y el cáncer cervicouterino.....	11
2.1 Clasificación del virus del papiloma humano.....	11
2.2 Historia Natural de la infección por VPH.....	12
3. Biología molecular del virus del papiloma humano.....	13
3.1 Biología molecular del VPH.....	13
3.2 Proteínas virales.....	15
3.2.1 La región de expresión tardía: proteínas L1 y L2.....	15
3.2.2 La región de expresión temprana: proteínas E1-E7.....	15
3.2.3 La proteína E1.....	16
3.2.4 La proteína E2.....	16
3.2.5 La proteína E4.....	16
3.2.6 La proteína E5.....	17
3.2.7 La proteína E7.....	17
3.2.8 La proteína E6.....	18
4. Interacciones de la proteína E6 con proteínas celulares.....	19
4.1 Estructura de la proteína p53.....	19
4.1.2 Funciones de la proteína p53.....	19
4.1.3 Regulación de la actividad de la proteína p53.....	21
4.2 La proteína hDlg.....	23
4.2.1 Funciones de la proteína hDlg.....	23
4.2.2 Estructura de la proteína hDlg.....	24
4.3 La proteína PTEN.....	25
4.3.1 Función de la proteína PTEN.....	25
4.3.2 Estructura de la proteína PTEN.....	26
4.3.3 Modulación de la actividad de la proteína PTEN.....	26
Justificación.....	29
Hipótesis.....	30
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares.....	30
Materiales y Métodos.....	31
1. Obtención de muestras.....	31
2. Hematoxilina-Eosina (H&E).....	32
3. Inmunohistoquímica.....	32
4. Revisión de historias clínicas.....	34
5. Tipificación Viral .....	34

6. Análisis de datos.....	35
7. Análisis estadístico.....	36
Resultados.....	37
1. Características epidemiológicas de la población.....	37
2. Presencia de las proteínas p53, PTEN y hDlg en lesiones premalignas y CaCU.....	39
3. Localización subcelular de las proteínas p53, PTEN y hDlg en muestras premalignas y CaCu.....	41
4. Expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg en cáncer escamoso y adenocarcinomas.....	45
5. Intensidad de la expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg en muestras premalignas y CaCU.....	45
Discusión.....	50
Conclusiones.....	55
Bibliografía.....	56

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Anatomía del cervix.....	4
<b>FIGURA 2.</b> Histología del cervix.....	6
<b>FIGURA 3.</b> Etapas de la Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	7
<b>FIGURA 4.</b> Tipos de carcinomas escamosos.....	8
<b>FIGURA 5.</b> Corte histológico de adenocarcinoma <i>in situ</i> .....	10
<b>FIGURA 6.</b> Historia Natural de la infección por VPH.....	13
<b>FIGURA 7.</b> El genoma viral.....	14
<b>FIGURA 8.</b> Proteínas reguladas por E6-AR.....	18
<b>FIGURA 9.</b> Estructura de la proteína p53.....	19
<b>FIGURA 10.</b> Activación de la proteína p53.....	20
<b>FIGURA 11.</b> Blancos celulares de p53.....	21
<b>FIGURA 12.</b> E6 y p53 en el ciclo celular.....	22
<b>FIGURA 13.</b> Dominios PDZ de E6-AR.....	23
<b>FIGURA 14.</b> Estructura de la proteína hDlg.....	24
<b>FIGURA 15.</b> Actividad de la proteína PTEN.....	25
<b>FIGURA 16.</b> Estructura de la proteína PTEN.....	26
<b>FIGURA 17.</b> Regulación de la actividad de la proteína PTEN.....	27
<b>FIGURA 18.</b> Intensidad de reacción.....	35
<b>FIGURA 19.</b> Población caracterizada por diagnóstico histopatológico.....	37
<b>FIGURA 20.</b> Tipos virales mas frecuentes.....	38
<b>FIGURA 21.</b> Distribución por edades en relación al diagnostico histopatológico.....	38
<b>FIGURA 22.</b> Expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg.....	40
<b>FIGURA 23.</b> Localización nuclear de la proteína p53.....	42
<b>FIGURA 24.</b> Localización de la proteína PTEN.....	43
<b>FIGURA 25.</b> Localización de la proteína hDlg.....	44
<b>FIGURA 26.</b> Intensidad de la inmunotinción.....	46
<b>FIGURA 27.</b> Porcentaje de tejido tumoral positivo a la proteína PTEN.....	47
<b>FIGURA 28.</b> Porcentaje de tejido tumoral positivo a la proteína hDlg.....	48
<b>FIGURA 29.</b> Porcentaje de tejido tumoral positivo a la proteína p53.....	49



## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b> Clasificación clínica de los tumores cervicales.....	9
<b>CUADRO 2.</b> Factores de riesgo asociados al CaCU.....	11
<b>CUADRO 3.</b> Características de las proteínas virales.....	15
<b>CUADRO 4.</b> Datos obtenidos de las historias clínicas.....	34
<b>CUADRO 5.</b> Expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg en muestras premalignas y CaCU.....	39
<b>CUADRO 6.</b> Localización de la proteína PTEN en lesiones premalignas y CaCU.....	41
<b>CUADRO 7.</b> Localización de la proteína hDlg en lesiones premalignas y CaCU.....	43
<b>CUADRO 8.</b> Diferencia en la expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg entre los tipos de cáncer escamoso y adenocarcinoma.....	45
<b>CUADRO 9.</b> Intensidad de la inmunoreacción de la proteína PTEN en lesiones premalignas y CaCU.....	46
<b>CUADRO 10.</b> Intensidad de la inmunoreacción de la proteína hDlg en muestras premalignas y CaCU.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Asiático-americano

Af1: Africana-1

Af-2: Africana-2

AIS: Adenocarcinoma *in situ*

As: Asiáticas

CaCU: Cáncer cérvico-uterino

E: Europea

E6-AR: Proteína E6 de alto riesgo

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

VP: Virus del papiloma

VPH: Virus del papiloma humano

VPH-AR: Virus del papiloma humano de alto riesgo

## RESUMEN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es un tipo frecuente de cáncer entre las mujeres, sobre todo en países en vías de desarrollo, como México. Representa un gran reto de salud en todo el mundo, ya que es la segunda causa de muerte por cáncer en la población femenina. Se conoce que la infección por virus del papiloma humano (VPH) es el agente etiológico necesario, pero no suficiente para el desarrollo de CaCU. La capacidad transformante de este virus, es responsabilidad de las oncoproteínas E6 y E7, mismas que son capaces de unirse a numerosas dianas celulares, que controlan importantes procesos biológicos.

Entre los blancos celulares de E6 se encuentran las proteínas supresoras de tumores p53 y hDlg: la primera desempeña un importante papel en la regulación del ciclo celular y la transcripción de numerosos genes como la fosfatasa y homóloga de la tensina (PTEN), cuyo papel más importante es la regulación negativa de la vía de Akt; hDlg tiene un papel importante en la conservación de la arquitectura celular y como proteína intermediaria en numerosas vías de señalización. Además se ha propuesto que esta proteína supresora de tumor, regula la estabilidad de PTEN lo que favorece su actividad.

En el presente trabajo se evaluó la expresión de las proteínas supresoras de tumores p53, PTEN y hDlg en lesiones premalignas y de CaCU, mediante el uso de la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para cada proteína, con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas en la expresión de estas tres proteínas, que pudieran favorecer la progresión a cáncer invasor.

Los resultados mostraron que la expresión de la proteína PTEN es menor en las lesiones invasoras que en las lesiones premalignas y que su localización es significativamente nuclear en las lesiones precursoras en contraste con las lesiones malignas donde se localiza tanto en el núcleo como el citoplasma. Con respecto a los niveles de la proteína hDlg, estos fueron mayores en las lesiones malignas que en aquellas precursoras; su localización fue principalmente citoplásmica en las lesiones invasoras. La proteína p53,

se expreso en niveles similares en ambos grupos con una localización en su totalidad nuclear.

Mediante este trabajo pudimos determinar que la expresión y localización, ampliamente ligadas con la funcionalidad, de las proteínas PTEN y hDlg, podrían estar involucradas en el mecanismo oncogénico mediado por la proteína E6 en el CaCU.

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. EL CÁNCER**

La palabra cáncer es el término genérico que se emplea para designar un grupo de entidades que difieren de forma variable en su histología, morfología, evolución clínica y pronóstico. Estas entidades presentan particularidades morfológicas y biológicas, lo que permite clasificar e identificar por separado diferentes lesiones (1). Según El Instituto Nacional del Cáncer “el cáncer es la rápida creación de células anormales que crecen más allá de sus límites normales y que pueden invadir partes adyacentes y extenderse por todo el cuerpo” (2).

El cáncer se refiere a un grupo de más de 100 enfermedades diferentes, en todas ellas se afecta la unidad básica del cuerpo: la célula. El cáncer ocurre cuando las células se dividen sin control y sin orden (2). La pérdida del control de la división celular responde al hecho que se alteran genes importantes como los protooncogenes y los genes supresores de tumores que controlan funciones tan importantes como la proliferación celular.

El cáncer representa un problema de salud muy importante, en el 2007 se registraron 7.9 millones de muertes por cáncer, lo que equivale al 13% de las muertes a nivel mundial, de las cuales el 40% pudieron haberse prevenido de haber evitado algunos factores de riesgo. Para el caso de México, en el año 2005 murieron aproximadamente 64,000 personas, este padecimiento representó la cuarta causa de muerte en nuestro país (OMS) (3).

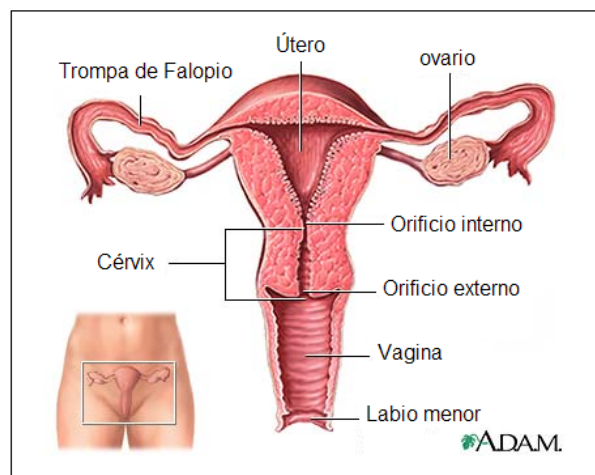
### **1.1 CÁNCER CERVICOUTERINO Y EPIDEMIOLOGIA**

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es un tipo muy frecuente de cáncer entre las mujeres, éste padecimiento tiene como principal agente etiológico a la infección por el virus del papiloma humano (VPH) y se presenta principalmente en pacientes en la tercera y cuarta década de la vida (4).

Esta enfermedad significa un gran reto para los servicios de salud en todo el mundo, ya que el desarrollo carcinogénico está precedido por cambios citológicos bien conocidos, que de ser detectados a tiempo, pueden prevenir el desarrollo neoplásico. En todo el mundo, el cáncer cérvico uterino es la segunda neoplasia maligna más común en la población femenina y sigue ocupando el primer lugar como causa de mortalidad en los países en desarrollo. En el 2005, la tasa media nacional de mortalidad fue del 15.46 por 100,000 mujeres de 25 años y más, que corresponde a 4,247 defunciones. El 84% ocurrieron en mujeres con escolaridad primaria o menor y predominantemente en edad productiva (5).

## 1.2 ANATOMÍA DEL CERVIX

El cervix o cuello uterino es la porción fibromuscular baja del útero; por lo general, mide de 3 a 4 cm de longitud y unos 2,5 cm de diámetro (6). El cervix forma un canal que en su parte vaginal presenta un orificio externo que es redondeado y puntiforme; hacia el otro extremo, en contacto con el útero, se encuentra el orificio cervical interno (Fig. 1).



**Figura 1. Anatomía del Cervix.** El útero es un órgano hueco ubicado en la pelvis femenina, el cervix es la parte baja y estrecha de este, forma lo que es el canal cervical. Fuente: <http://www.healthline.com/adamimage?contentId=1-002317&id=19263> (7).

El cervix se divide en la región endocervical que es la que se encuentra por dentro del canal cervical, es decir, detrás del orificio cervical externo; la región exocervical se extiende por fuera del mismo orificio cervical (Fig. 2).

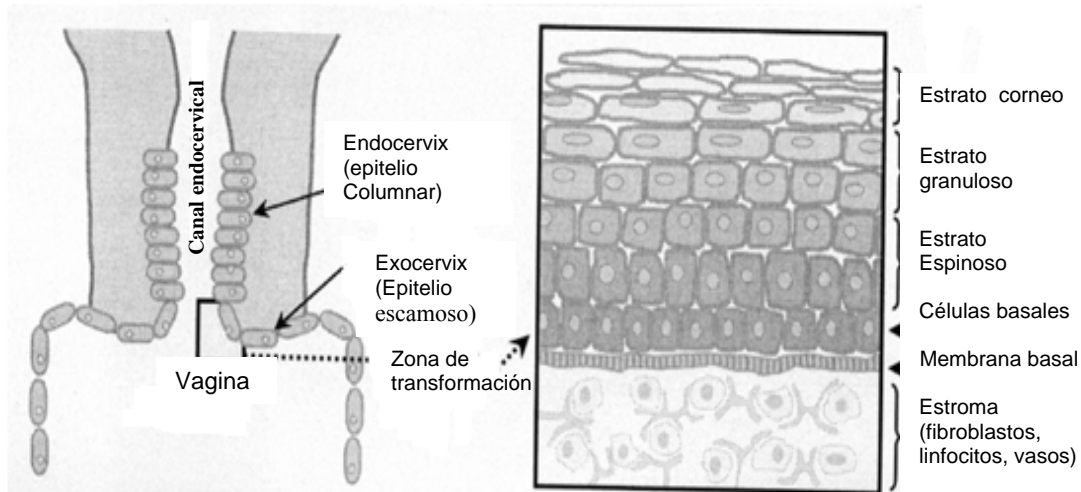
Histológicamente el exocervix está conformado por un epitelio escamoso estratificado, el cual es sensible a los estímulos hormonales y se renueva cada cinco días por acción de los estrógenos. Este epitelio contiene cuatro capas de células (6, 8,9) (Fig. 2):

- Capa basal o germinal, la cual es una capa de células responsables de renovar el epitelio por su gran actividad mitótica; conforme estas células van madurando van migrando y cambiando su morfología para formar los siguientes estratos.
- Estrato espinoso o capa intermedia formada por varias capas de células poligonales que intervienen en el proceso de glucogenización.
- Estrato granuloso formado por 3 a 5 capas de células fusiformes o en forma de huso, las cuales presentan gránulos de queratina.
- Estrato superficial o estrato corneo esta formado por células muertas anucleadas que protegen al epitelio de las lesiones e infecciones.

Histológicamente el endocervix esta formado por una capa de células alargadas en forma de cilindros (o columnas) con núcleos ovoides, éstas descansan directamente sobre la capa fibrosa del cervix siendo muy sensible a las infecciones bacterianas y virales. Este epitelio presenta hendiduras llamadas criptas, donde se genera el moco. El moco desempeña las funciones de protección endouterina, actuando como un tapón por espesamiento, pero durante la fase ovulatoria, esta sustancia pierde consistencia y actúa como un activador de los espermatozoides para facilitar su acceso en busca de la fecundación (10).

La unión de ambos tipos epiteliales se denomina unión escamo-columnar, la cual es un escalón bien diferenciado por la altura de ambos epitelios, ahora bien, existe una zona dinámica, donde el tejido glandular, esta siendo sustituido por tejido escamoso, a esta zona se le conoce como zona de transformación, la cual contiene a la unión escamo-columnar (11).

Esta región anatómica de transición entre el epitelio cilíndrico del canal endocervical y el epitelio escamoso del exocervix es de gran actividad biológica celular, debido a la transformación de un epitelio en otro (metaplasia). Diversos agentes físicos, químicos y biológicos, actuando sobre esta población celular inestable, pueden inducir cambios morfológicos y estructurales del epitelio, dando lugar a lo que actualmente se denomina NIC (neoplasia intraepitelial cervical), concepto original de Richart (1967) (12).



**Figura 2: Histología del Cervix.** Esquema donde se muestra el cervix y los dos tipos histológicos que lo conforman: el endocervix que se extiende en el canal endocervical uniéndose a través de la zona de transformación con el exocervix. Modificado de Lin. et. al 2004 (8).

### 1.3 PATOLOGIA CERVICAL: NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)

Al CaCU preceden generalmente un largo período de enfermedad preinvasora, que se caracteriza microscópicamente por una serie de lesiones precursoras que van de la atipia celular hacia los diferentes grados de NIC, antes de evolucionar hacia un carcinoma invasor.

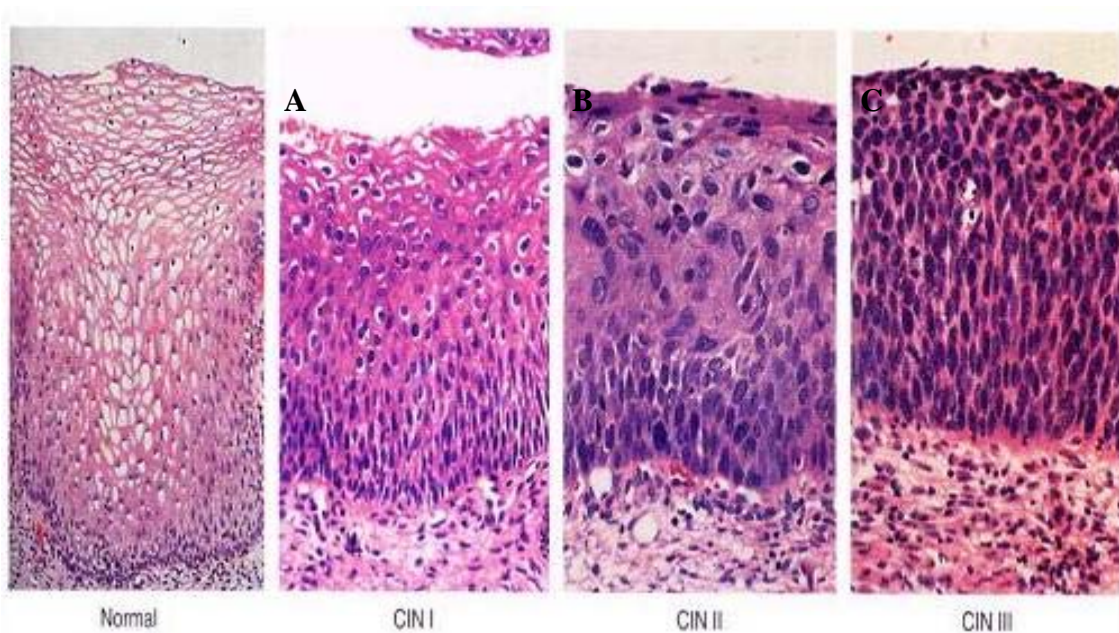
La NIC presenta células indiferenciadas que se caracterizan por un núcleo voluminoso, y con una relación núcleo citoplásmica aumentada. Además se pueden observar las llamadas alteraciones coilocíticas o condilomatosas asociadas con la infección por VPH (13,14). Los coilocitos son células pavimentosas caracterizadas por colapso del núcleo y



por una degeneración citoplasmática, consistente en un amplio espacio claro perinuclear. Es uno de los aspectos citológicos diagnósticos de la infección por VPH (6).

Se determina el grado de la NIC según la proporción del espesor del epitelio con células indiferenciadas. Los cambios citológicos e histológicos de las neoplasias cervicales tempranas se dividen en tres grados (Fig 3) (13,14):

- NIC I: equivalente a la displasia leve, afecta el tercio inferior del epitelio cervical. Se observan algunas figuras mitóticas.
- NIC II: corresponde a la displasia moderada, que involucra dos tercios del epitelio cervical (inferior y medio). Las anomalías nucleares son más marcadas que en el grado anterior y también se pueden observar figuras mitóticas.
- NIC III: equivale a la displasia severa y carcinoma *in situ* que afecta a la totalidad del epitelio cervical. La diferenciación y la estratificación pueden faltar por completo, o existir solo en el cuarto superficial del epitelio, con abundantes figuras mitóticas, algunas con formas anormales.



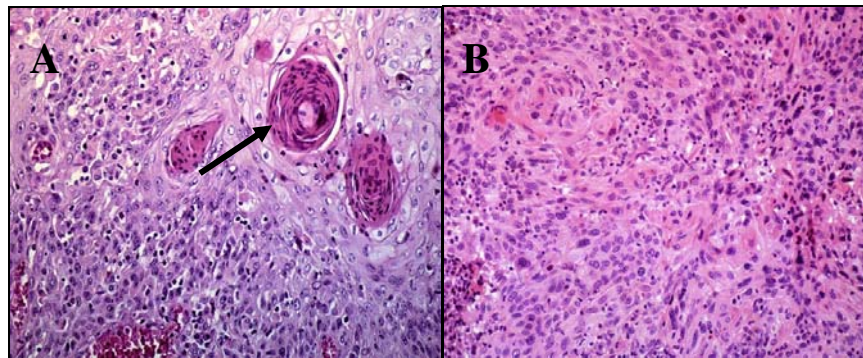
**Figura 3. Etapas de la Neoplasia Intraepitelial Cervical.** El epitelio cervical normal puede sufrir alteraciones por causa de agentes infecciosos como el VPH. La neoplasia intraepitelial cervical (CIN por sus siglas en inglés) se clasifica como leve o NIC I(A), moderada o NIC II (B) y severa o NIC III (C). Fuente: <http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=4086&lang=spanish>

La lesión precursora que procede del epitelio cilíndrico, se denomina neoplasia glandular intraepitelial o adenocarcinoma *in situ* (AIS). Esta lesión se considera de manera similar a la NIC como precursora del adenocarcinoma. En el AIS, el epitelio cilíndrico normal se reemplaza por el epitelio anormal que presenta una pérdida de la polaridad, células y núcleos de mayor tamaño, una hiper Cromasia nuclear, una actividad mitótica, una menor expresión de la mucina citoplasmática y una estratificación celular (14).

#### 1.4 CÁNCER INVASOR DE CELULAS ESCAMOSAS

La primera fase del cáncer invasor se presenta como una lesión subclínica, la cual transcurre sin manifestación, por lo que es poco diagnosticada; estos son cánceres que no han invadido más allá de 5 mm de profundidad y 7 mm de ancho hacia el estroma cervical subyacente (6).

Microscópicamente, la mayoría de los carcinomas escamocelulares aparecen como redes infiltrantes de bandas de células neoplásicas separadas por estroma, con una gran variación en los patrones de crecimiento, tipos de células y grado de diferenciación. El estroma cervical que separa las bandas de células malignas muestra infiltración por linfocitos y células plasmáticas. Las células malignas pueden subdividirse en dos tipos, queratinizantes que presentan perlas corneas de queratina; y no queratinizantes los cuales no presentan perlas córneas y están asociados a peor pronóstico clínico (6,16)



**Figura 4. Tipos de carcinomas escamosos.** Cortes histológicos (A) carcinoma cervicouterino con perlas corneas y (B) un carcinoma infiltrante donde no se reconocen perlas corneas. Fuente:

La OMS reconoce seis tipos histológicos de tumores escamosos incluidos los dos tipos anteriormente mencionados (queratinizante y no queratinizante) además de otros cuatro tipos menos comunes como el carcinoma condilomatoso (también llamado carcinoma verrucoso), el carcinoma escamocelular papilar, el carcinoma linfoepitelioide y el carcinoma de células escamotransicionales (16).

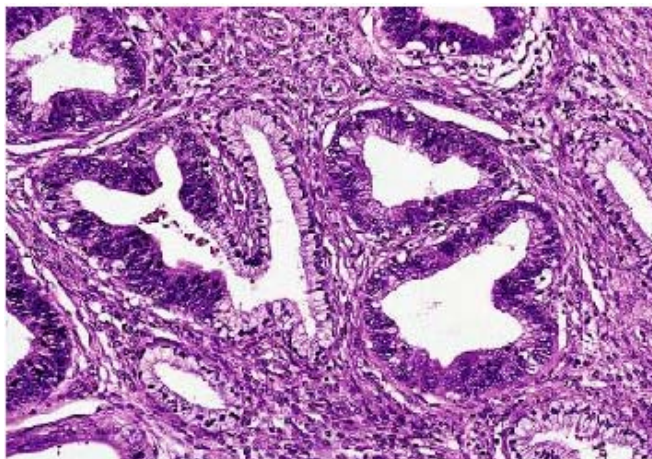
Clínicamente los carcinomas se clasifican según el sistema FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) que se basa en el análisis clínico y radiológico de la extensión tumoral, para determinar el estadio de la enfermedad, que va del I al IV. A continuación se muestra el resumen de la clasificación FIGO (Cuadro 1):

*Cuadro 1. Clasificación clínica de los tumores cervicales. Fuente: Vera et al ,2001 (17).*

Clasificación	Descripción
<b>Etapa 0</b>	Ca in situ o intraepitelial
<b>Etapa I</b>	Estrictamente limitado al cervix (Sin extensión al cuerpo) <ul style="list-style-type: none"><li>• IA: Ca pre-clínico o microscópico</li><li>• IB: Lesiones clínicas confinadas al cervix o preclínicas con dimensión mayor que IA2</li></ul>
<b>Etapa II</b>	Con extensión fuera del cervix, sin alcanzar la pared pélvica o la porción inferior de la vagina. <ul style="list-style-type: none"><li>• IIA: Compromiso del 1/3 superior de la vagina. Sin compromiso de parametrios</li><li>• IIB: Compromiso de parametrios</li></ul>
<b>Etapa III</b>	Compromiso del 1/3 inferior de la vagina o pared pélvica o ureteral sin otra causa. <ul style="list-style-type: none"><li>• IIIA: Hasta 1/3 inferior de vagina</li><li>• IIIB: Hasta pared pélvica o compromiso ureteral</li></ul>
<b>Etapa IV</b>	Compromiso de órganos <ul style="list-style-type: none"><li>• IVA: Compromiso de órganos adyacentes.</li><li>• IVB: Compromiso de órganos a distancia.</li></ul>

## 1.5 CÁNCER INVASOR DE CELULAS COLUMNARES (ADENOCARCINOMA)

Bajo el término genérico de adenocarcinoma se agrupa todo un conjunto de neoplasias malignas cuyo único denominador común es una diferenciación histológica glandular (Fig. 5). La última clasificación de la OMS reconoce 6 tipos histológicos. El tipo endocervical o mucinoso representa el 65% de los casos. Los demás tipos de adenocarcinomas son menos frecuentes y están representados por los tipos: adenoescamoso, de células claras, tipo endometroide, adeno quístico e indiferenciado. (18). Estos carcinomas no demuestran grandes diferencias con respecto a los tumores escamosos; y la clasificación clínica también se lleva a cabo por el sistema de la FIGO (6, 17,18).



*Figura 5: Corte Histológico de Adenocarcinoma in situ.*  
<http://www.womenshealthsection.com/content/print.php3?title=gynpc006&cat=65&lng=spanish> (19).

La frecuencia del adenocarcinoma se sitúa alrededor del 2% al 8% de los casos de cáncer cervical y se aprecia un relativo incremento en pacientes jóvenes, con una edad media de 37 años, un comportamiento biológico más agresivo, preferentemente asociado a una infección por VPH tipo 18 y un peor pronóstico con respecto al carcinoma escamoso en estadios similares (20,21).



## 1.6 FACTORES DE RIESGO

El CaCU es el resultado de una infección persistente por VPH de los tipos clasificados como de alto riesgo (VPH-AR), esta persistencia aunada a otros cofactores permiten la progresión maligna. La infección por VPH es la infección de transmisión sexual más común; se estima que al menos la mitad de las personas sexualmente activas se infectarán en algún momento de su vida, pero solo el 10% de estas mujeres infectadas progresara a un carcinoma. (22,23). A continuación en el Cuadro 2 se resumen los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de CaCU

*Cuadro 2. Factores de Riesgo Asociados al CaCU. Fuente Dallred 2006 (24).*

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CANCER CERVICAL
<b>Infección por Virus del Papiloma Humano</b>
Practica sexual
<ul style="list-style-type: none"><li>• Inicio de la vida sexual a temprana edad</li><li>• Múltiples parejas sexuales</li><li>• Pareja no circuncidada</li></ul>
Tabaquismo
VIH
Dieta
Uso de anticonceptivos orales
Multiparidad
Nivel socioeconómico bajo
Exposición a Dietilstilbestrol (DES)
Historia familiar
Edad

## 2. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y EL CÁNCER CERVICO UTERINO

### 2.1. CLASIFICACION DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

A partir de la década de los años ochenta se ha identificado a la infección persistente con el VPH como una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar una neoplasia cervical (25).

Actualmente se conocen más de 100 tipos de VPHs, de los cuales aproximadamente un tercio infectan al tracto genital (26), estos VPHs se clasifican según su capacidad

oncogénico en virus de bajo y alto riesgo. Dentro del grupo de bajo riesgo los más comunes son los tipos 6 y 11 que provocan verrugas y papilomas genitales y muestran una débil asociación con CaCU. Entre los virus de alto riesgo los de mayor prevalencia son los tipos 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35 que se encuentran fuertemente asociados a CaCU ya que en el 99.7% de los casos de cáncer cervical se ha detectado DNA de estos tipos virales (22).

Desde finales de los años 70's cada nuevo virus del papiloma (VP) descrito es identificado como un tipo al cual se le asigna un número. Los tipos virales se determinan mediante el estudio del gen L1 el cual es el gen más conservado entre los VP's, de tal modo que se reconoce un nuevo tipo viral cuando la secuencia de ADN del gen L1 difiere por más del 10% del VP más cercano conocido. Una diferencia menor al 2% determina una variante viral (27).

Todos los tipos virales tienen variantes genómicas pero las más estudiadas son las de los tipos 16 y 18, que son los que más comúnmente se encuentran en el CaCU y combinados, representan cerca del 70% de los casos en America (28).

Las variantes intratipo del VPH16 forman 5 ramas filogenéticas clasificadas según su distribución geográfica como Europeas (E), Asiáticas (As), Asiático-americanas (AA), Africana-1 (Af1) y Africana-2 (Af-2) (29).

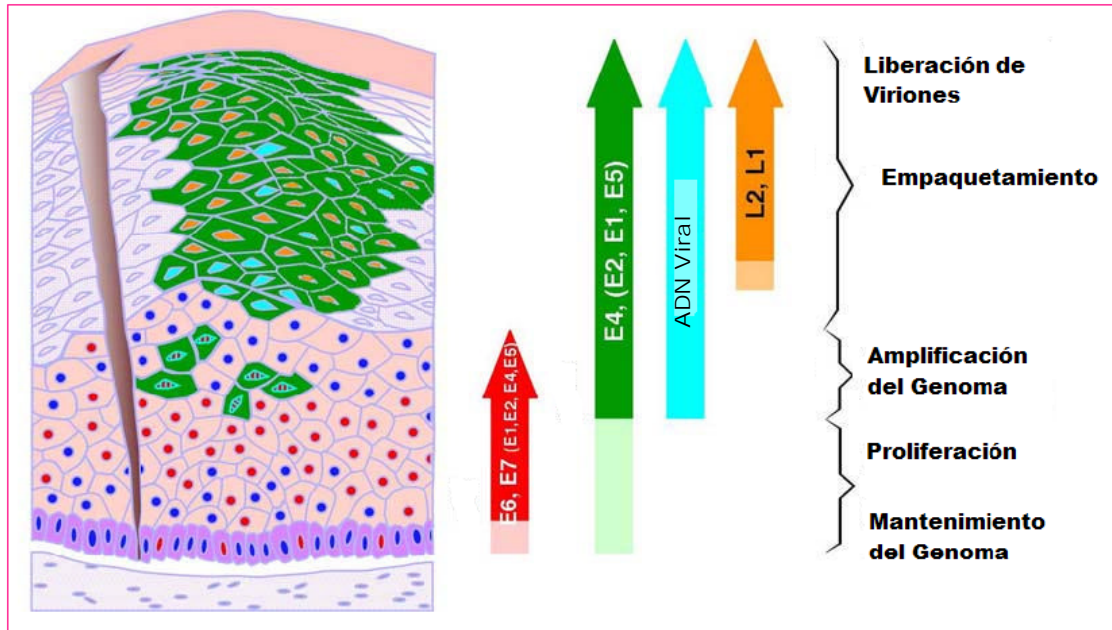
Debido a los cambios en su genoma, las variantes virales han demostrado diferir en su potencial oncogénico, por ejemplo las variantes no europeas del tipos 16 se hallan involucradas con un riesgo mayor de progresión ya que se replican más rápidamente, además de que suelen infectar a mujeres más jóvenes e inclusive con mayor afinidad a cierto componente genéticos determinados étnicamente (30). Para el caso del tipo 18 las variantes AsAi y E han demostrado una capacidad oncogénica mayor (31,32).

## 2.2 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION POR VPH

En el inicio de la infección, las microlesiones del epitelio cervical producidos durante la actividad sexual, exponen a las células basales, el VPH se une a estas células a través de sus proteínas L1 presentes en la capsida. Tras la unión, el virus se introduce a la célula por endocitosis, una vez dentro de la celular, este se desensambla permitiendo el transporte de su ADN hacia el núcleo celular (34).

Durante la fase no productiva el genoma viral se mantiene en forma de episomas y con un bajo número de copias para evitar la respuesta inmune (34). Para mantener este estado no integrado (episomal) se requiere la expresión de las proteínas tempranas E1 y E2, para evitar la expresión de los oncogenes E6 y E7, responsables principales del control y transformación celular (Fig. 6) (33).

Con la expresión de E6 y E7 se da inicio a la etapa productiva, donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas de la cápsida y ensamblaje de viriones en el estrato granuloso; finalmente estas células infectadas continúan migrando hasta el estrato corneo en donde se descaman. El virus se libera de las células escamosas por la acción de la proteína E4, quien induce la ruptura de las redes de citoqueratina y altera el potencial de la membrana mitocondrial lo que genera una inestabilidad a la célula que permite el egreso del virus. (29,34).



**Figura. 6. Historia natural de la infección por VPH.** Diagrama del epitelio cervical donde se muestra la expresión de las proteínas virales. Tras la entrada del virus a través de una microlesión, este infecta las células basales manteniéndose con pocas copias de su genoma. Los oncogenes E6 y E7 se expresan tempranamente (flecha roja). Los núcleos azules representan células no infectadas. La expresión de la proteína E4 y de otras proteínas (flecha verde) depende de la diferenciación del epitelio. Las proteínas de expresión tardía (flecha naranja) forman la capsida para llevar a cabo el empaquetamiento y liberación de viriones. Modificado de Zheng & Baker 2006 (35).

### 3. BIOLOGIA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

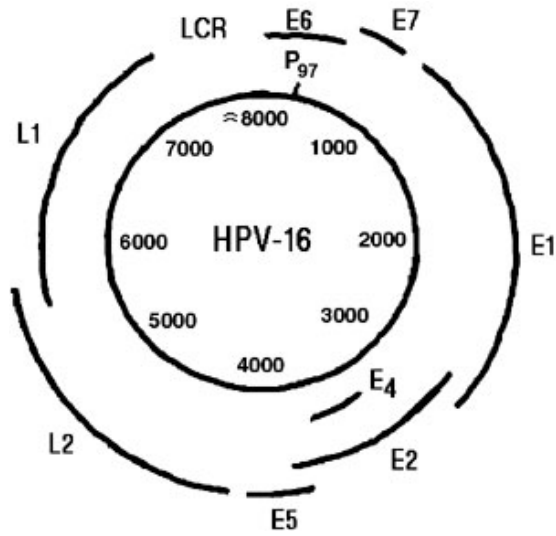
#### 3.1 BIOLOGIA MOLECULAR DEL VPH

El VPH es un virus no envuelto, su genoma que es una doble cadena de ADN se empaqueta en partículas de 72 capsómeros, con un diámetro aproximado de 55nm. Los capsómeros están formados por dos proteínas estructurales: L1 (en mayor proporción) y L2 (29).

El genoma viral tiene dos regiones codificantes, y una región reguladora no codificante conocida como la región larga de control (LCR): un segmento genómico que contiene los elementos que inician la replicación y controlan la transcripción viral. (36). Las dos regiones codificantes se dividen histológicamente en dos grupos, la región de expresión temprana (E) y la región de genes de expresión tardía (L) (Fig. 7). Los genes tempranos son E1, E2, E4, E5, E6 y E7, codifican para proteínas involucradas en la replicación del



ADN viral, control transcripcional y transformación celular. Los genes tardíos L1 y L2 codifican para proteínas estructurales del virus (37). (Fig. 7).



**Figura 7. El genoma viral.** Se muestran los genes de expresión temprana (E1-E7), los genes de expresión tardía (L1 y L2) y la región larga de control (LCR) del VPH16. Tomado de Rivera et al 2006.

### 3.2 PROTEINAS VIRALES

A continuación en el Cuadro 3 se muestran las principales funciones de las proteínas virales del VPH.

*Cuadro 3. Características de las proteínas virales. Tomado de HPV Handbook (38).*

<b>Proteína viral/elemento genómico</b>	<b>Pesos molecular/tamaño</b>	<b>Función</b>
<b>Elementos no codificantes</b>		
Región Larga de Control (LCR)	500-1000 pb	Origen de replicación y regulación de la expresión génica de VPH
<b>Proteínas Tempranas</b>		
E1	68-85 Kd	Función de helicasa, esencial para la replicación viral.
E2	48 kD	Factor de transcripción viral; esencial para la replicación viral y control de transcripción de genes; segregación del genoma y encapsulamiento.
E3	Desconocido	Función no conocida; presente solo en algunos pocos VPHs
E1 <sup>^</sup> E4	10-44 kD	Unión a proteínas del citoesqueleto
E5	14 kD	Interacción con receptores de EGF/PDGF
E6	16-18 kD	Interacción con diversas proteínas celulares, degradación de p53 y activación de la telomerasa
E7	~ 10 kD	Interacción con diversas proteínas celulares, interacción con pRB y transactivación de promotores dependientes de E2F
<b>Proteínas Tardías</b>		
L1	57 kD	Proteína mayoritaria de la capsida
L2	43-53 kD	Proteína minoritaria de la capsida

### **3.2.1 LA REGION DE EXPRESION TARDIA: PROTEINAS L1 y L2**

La región tardía, contiene dos genes que codifican para las proteínas estructurales de la capsida: L1, es la proteína mayoritaria de la capsida y la más conservada entre los diferentes tipos de VPH y L2 es específica para cada tipo viral (29).

### **3.2.2 LA REGION DE EXPRESION TEMPRANA: PROTEINAS E1-E7**

En la región temprana están 7 marcos de lectura abierta que codifican para proteínas no estructurales, cuya función es controlar la replicación del DNA e inducir la transformación maligna de la célula huésped (26).

### **3.2.3 LA PROTEÍNA E1**

El gen E1 es de los más conservados entre los VP's. La proteína E1 tiene un tamaño aproximado de 68 kDa; el producto de este gen es una proteína con función de ATPasa y helicasa que reconoce secuencias ricas en A y T que se encuentran en el origen de replicación viral (26,29).

### **3.2.4 LA PROTEÍNA E2**

El gen E2 codifica tres proteínas diferentes generadas por procesamiento alternativo. Una proteína de longitud completa (E2), la proteína E1/E2 y E2-C. La proteína E2 tiene un peso aproximado de 50 kDa y funciona como un dímero; su extremo C terminal interactúa con la proteína E1 a la cual estabiliza (33). Además E2 reprime al promotor P97 (VPH 16) o P105 (VPH 18), encargados de la transcripción de las proteínas E6 y E7, reduciendo de esta manera la síntesis de estas proteínas (34).

### **3.2.5 LA PROTEÍNA E4**

La secuencia codificante de E4, aproximadamente de 260 bp, está contenida dentro del marco de lectura de la proteína E2. La proteína E4 se transcribe como producto de un procesamiento alternativo, fusionada a la proteína E1 para generar la proteína de fusión E1<sup>Δ</sup>E4 (29).

La proteína E1-E4 se localiza en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma, así como en regiones perinucleares y citoplásmicas. Ante una infección por un VPH esta proteína provoca el colapso de dichas queratinas, lo que se relaciona con la liberación de los viriones (34).

### **3.2.6. LA PROTEÍNA E5**

E5 es una proteína hidrofóbica pequeña de 90 aminoácidos, esta proteína se expresa durante la infección productiva y su marco de lectura se pierde en células cervicales cancerosas, debido a la integración del genoma del VPH durante la transformación maligna (33).

Esta proteína forma complejos con una variedad de proteínas transmembranales como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), al cual además, incrementa su expresión en la superficie celular al inhibir su degradación, contribuyendo así a la proliferación de las células infectadas. (26,39).

### **3.2.7. LA PROTEÍNA E7**

El gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica para una proteína de 100 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa. La capacidad transformante de E7 reside en su unión a proteínas supresoras de tumor de la familia pRb. Esta unión se logra por la presencia de tres sitios conservados presentes en todas las proteínas E7 de los VPH-AR: CR1 en el extremo terminal, CR2 que contiene un motivo LXCXE el cual se une a Rb; y CR3 que contienen dos motivos tipo dedos de zinc (26).

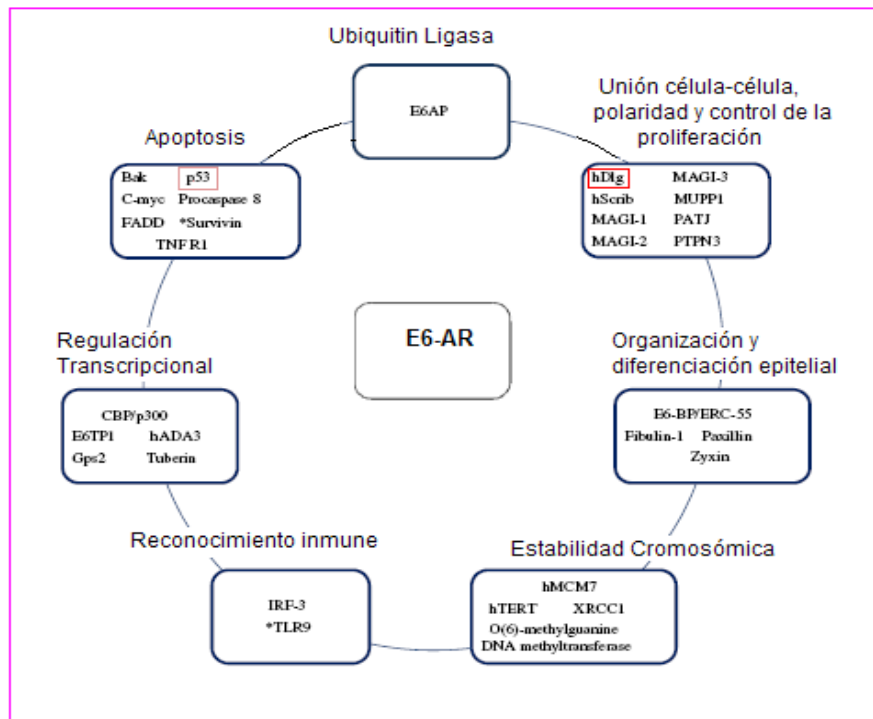
E7 puede unirse a las proteínas inhibidoras del complejo ciclina-cinasa (cdk) p21 y p27, la presencia de E7 impide la unión entre la cdk y su inhibidor por lo que se estimula el crecimiento de las células infectadas por VPH (26,39).

### **3.2.8. LA PROTEÍNA E6**

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb., codifica para una proteína de aproximadamente 150 aminoácidos para todos los tipos virales (tanto de bajo como de alto riesgo). Contiene dos dominios de unión a Zinc caracterizados por la presencia del motivo Cys-X-X-Cys, cuya integridad es esencial para su función. Esta proteína se

distribuye tanto en el núcleo como el citoplasma donde puede unirse a una gran cantidad de proteínas celulares. Su estructura secundaria es rica en hélices- $\alpha$  y laminas- $\beta$ , lo que convierte a esta proteína en inestable e insoluble una vez purificada (40).

Se sabe que E6 se une a numerosas proteínas celulares importantes en la regulación de procesos biológicos como: la apoptosis, la transcripción de proteínas supresoras de tumores, el mantenimiento de la arquitectura del epitelio y el control de la proliferación celular. La unión acumulativa de E6-AR (alto riesgo) a estas proteínas contribuye al potencial oncogénico de los VPH (Fig. 8).

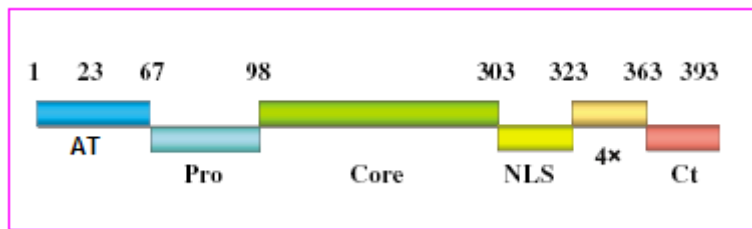


**Figura 8: Proteínas reguladas por E6-AR.** En rojo se muestran p53 y hDlg, dos proteínas degradadas por efecto de E6 y que son estudiadas en este trabajo. Modificado de Tungteakkun & Durkensen-Hughes 2008 (40).

## 4. INTERACCIONES DE LA PROTEÍNA E6 CON PROTEÍNAS CELULARES

### 4.1 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA p53

El blanco celular más conocido de E6 es la proteína supresora de tumores p53, esta proteína es codificada por el gen TP53, que se encuentra localizado en el cromosoma 17p13.1. Es de aproximadamente 393 aminoácidos divididos en 6 dominios mostrados en la figura 9 (41).



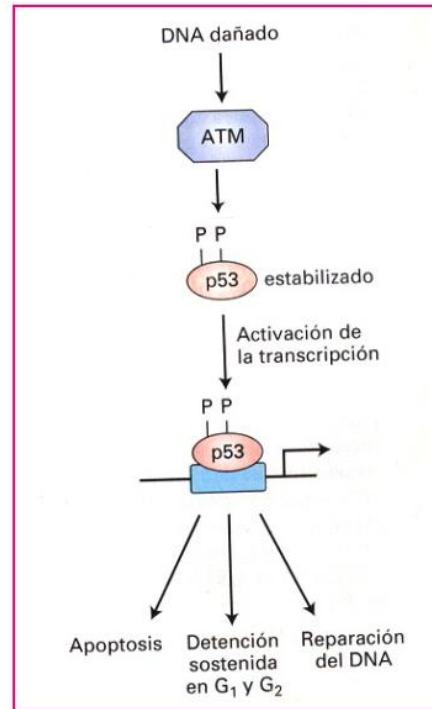
**Figura 9. Estructura de la proteína p53.** AT, dominio activación de la transcripción; Pro, Región rica en Prolinas; Core, Dominio de unión a secuencias específicas de ADN; NLS, región de localización nuclear; 4x, dominio de oligomerización y Ct, extremo carboxilo. Modificado de Okorokov et al 2006 (41).

p53 es un supresor tumoral clasificado dentro del grupo “gatekeeper”, encargado de aumentar la longevidad, reduciendo las mutaciones somáticas y la sobrevivencia o proliferación de células mutantes. Funciona como un punto de monitoreo del ciclo celular que responde a una gran variedad de señales de estrés como el daño al ADN, hipoxia, choque térmico (desnaturalización de proteínas) y daño al huso mitótico entre otros (42).

#### 4.1.2. FUNCIONES DE LA PROTEÍNA p53

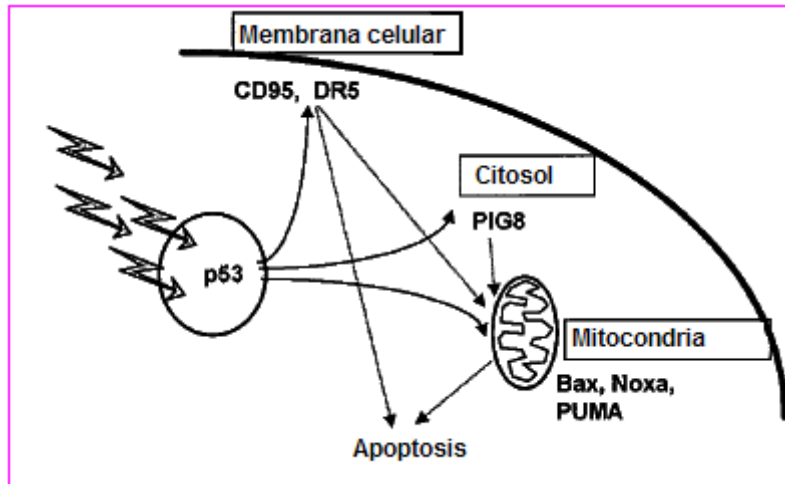
Las células con p53 funcional se detienen en G1 cuando son expuestas a agentes que causan daño al ADN, lo que no ocurre en células que carecen de p53 funcional. A diferencia de otras proteínas, p53 esta presente en niveles muy bajos en las células normales por su extrema inestabilidad y su rápida degradación (43). El daño al ADN de alguna manera lleva a la activación de ATM, una cinasa que fosforila y estabiliza a p53 (Fig. 10). Una vez estabilizado, p53 activa la expresión de p21, que inhibe los complejos ciclina-cinasa de G1. En consecuencia, las células se detienen en G1, dando oportunidad a la reparación del ADN, pero de no ser posible p53 induce la activación de genes proapoptóticos. Además, p53 reprime la expresión de los genes que codifican para la

ciclina B y la topoisomerasa II, necesarias para la transición de G<sub>2</sub> a mitosis, por lo que p53 evita la transmisión de ADN dañado después de la replicación (Fig. 12) (44).



**Figura 10. Activación de la proteína p53.** La actividad cinasa de ATM se impulsa en respuesta al daño del ADN. ATM activada fosforila a p53 lo estabiliza y permite la expresión de genes que codifican para proteínas que (1) detienen el ciclo celular en G<sub>1</sub> y en algunos casos G<sub>2</sub>, (2) estimulan la apoptosis y (3) participan en la reparación del ADN. Modificado de Lodish (44).

Por otro lado, p53 es capaz de inducir apoptosis ante un daño mayor al ADN por la vía de Apaf-1/caspasa 9, lo que implica liberación de citocromo c de la mitocondria. La manera en que p53 induce la liberación de citocromo c de la mitocondria, aun no es bien conocida, pero se sabe de varios genes proapopticos regulados por p53 por ejemplo: genes que codifican para proteínas de superficie celular como los receptores de la familia TNF, CD95 y DR5 capaces de inducir apoptosis. P53 también es capaz de inducir a Bax y Noxa, quienes interactúan con la proteína antiapoptico Bcl-2 en la mitocondria. Otra proteína mitocondria inducida por p53 es PUMA, quien se encarga de la liberación del citocromo c de la mitocondria y consecuente activación de la caspasa 3. Finalmente p53 también permite la expresión de los genes denominados PIGs, estos se ven involucrados en la apoptosis por ser capaces de generar especies reactivas de oxígeno (Fig. 11)(45).



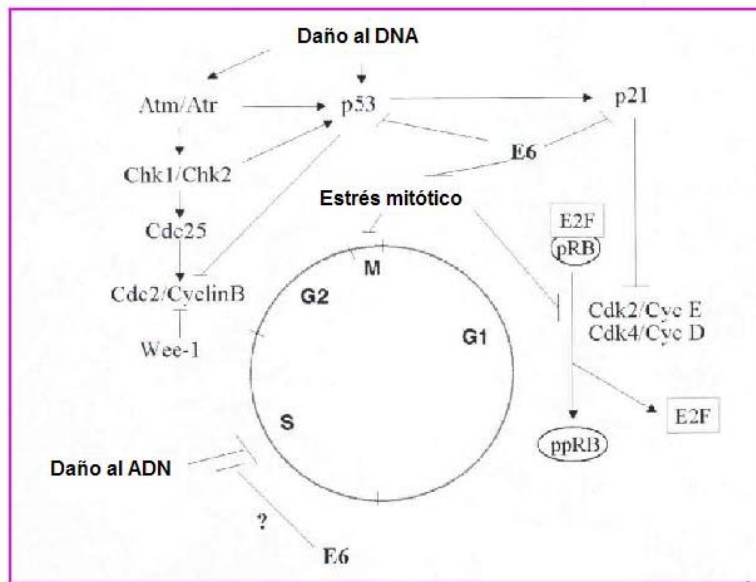
**Figura 11. Blancos celulares de p53.** En respuesta a diferentes estímulos de estrés, p53 puede activar la transcripción de diferentes genes. El primer grupo es de proteínas de membrana como CD95, DR5 y PERP. El siguiente grupo es de proteínas de localización citosólica como las denominadas PIGs y por último proteínas de localización mitocondrial como las propapóticas Bax, Noxa y PUMA. Modificado de Benchimol 2001 (45).

#### 4.1.3 REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA p53

La actividad de p53 suele mantenerse en niveles bajos por acción de la proteína ligasa Mdm2, cuando esta proteína se encuentra unida a p53 inhibe su capacidad activadora de la transcripción y cataliza la adición de moléculas de ubiquitina, dirigiendo de este modo a p53 hacia su degradación proteosómica. En si mismo, el gen *Mdm2* es transcripcionalmente activado por p53 lo que hace que Mdm2 funcione en un ciclo de retroalimentación autorregulatoria con p53. La fosforilación de p53 por ATM inhibe a Mdm2 de p53 (44).

Ahora bien, ante una infección por VPH-AR las funciones de p53 se ven abatidas (Fig. 11). La proteína E6 tiene la capacidad de degradar a p53 mediante la asociación con una proteína ligasa de 100 kDa llamada E6-AP (de associated protein) esta asociación marca a p53 para su degradación vía ubiquitina (63). E6 se puede unir en dos sitios diferentes a p53: 1) a la región que corresponde al dominio de reconocimiento del ADN (core), esta unión es exclusiva de las infecciones por VPH-AR y es dependiente de E6-AP y 2) al extremo C-terminal lo que requiere de altas concentraciones de E6, esta unión no favorece la degradación de p53 (48).





**Figura 12. E6 y p53 en el ciclo celular.** p53 es un inductor del arresto de la fase G1 del ciclo celular así como de la transición de G2/M. La degradación de p53 por E6 impide el arresto del ciclo celular en G1 y promueve el paso del punto de monitoreo de G2/M. Tomado de Fan & Chen 2004 (49).

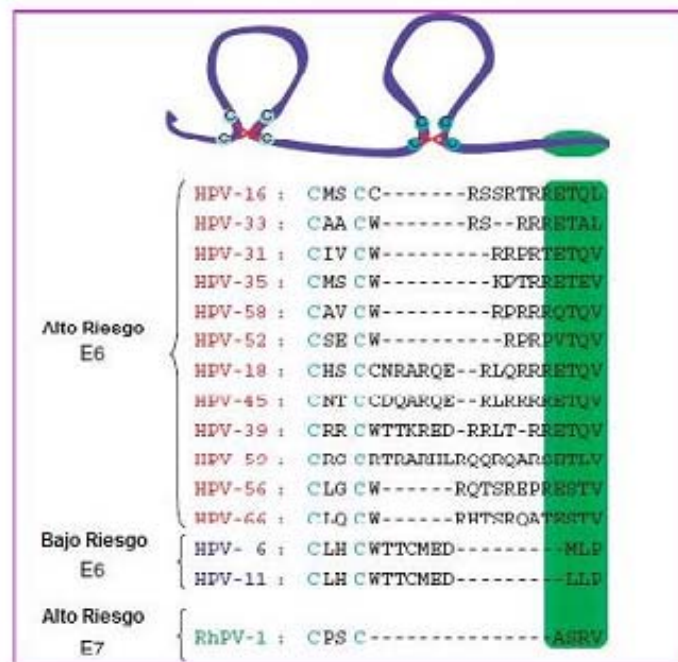
Aproximadamente el 50% de todos los casos de cáncer presentan mutaciones del gen p53, lo que lo hace el evento genético más común durante la carcinogénesis. Sin embargo en comparación con otros tipos de cáncer, las mutaciones de p53 en la neoplasia cervical son poco comunes (menos del 10% de los casos) (50). En este caso la oncoproteína E6 provoca la degradación de p53, lo que reduce la vida media de esta proteína supresora de manera dramática, desde 3 horas hasta 20 minutos. En células de CaCU los niveles de p53 son menores que la mitad del nivel presente en células normales (29).

Numerosos estudios reportan bajos niveles de inmunopositividad a p53, inclusive puede llegar a no ser identificado en el epitelio cervical libre de infección por VPH o en lesiones de bajo grado como lo son las NIC I y II. Por otro lado, en el caso de las lesiones más avanzadas, como la NIC III, los carcinomas *in situ* y los carcinomas invasores es bien aceptada la idea de una sobre expresión nuclear de p53 (51, 52, 53,54).

## 4.2. LA PROTEÍNA hDlg

### 4.2.1 FUNCION DE LA PROTEÍNA hDlg

E6 puede unirse a una variedad de proteínas entre las cuales resaltan las proteínas con dominios PDZ: dominio de aproximadamente 90 aminoácidos que repiten la secuencia glicina-leucina-glicina-fenilalanina. Funcionan como módulos de reconocimiento entre proteínas que contienen la secuencia consenso S/TXV en el extremo C-terminal como es el caso de todas las proteínas E6-AR (40 y 56). Los dominios PDZ deben su nombre a las primeras tres proteínas en donde fueron descritos (PSD-95, Dlg y ZO) (55) (Fig. 13).



**Figura 13. Dominios PDZ de E6-AR.** Representación esquemática de la proteína E6 conformada por dos dedos de zinc y un extremo carboxilo bien conservado. Los motivos de unión a PDZ son exclusivos de los E6-AR. Se incluye a RhPV-1 (Papilomavirus de Rhesus) para su comparación. Tomado de Thomas et al 2008 (56).

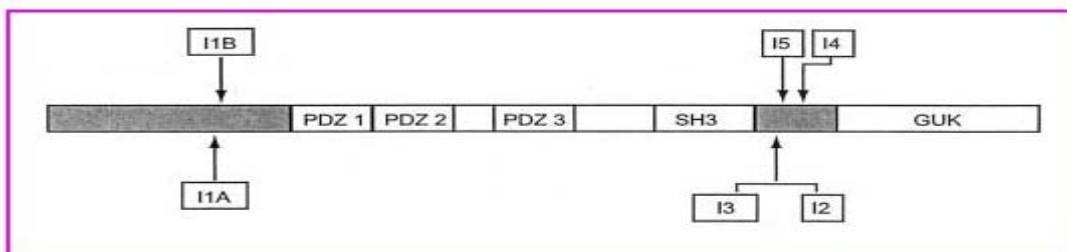
Los repetidos PDZ tienen un papel crucial en el anclaje de proteínas transmembranales a dominios específicos de membrana. Ha surgido la visión de considerar a las proteínas con múltiples dominios PDZ como andamios (scaffolds) corticales que se asocian en regiones específicas de la membrana a diferentes proteínas que participan en una misma vía de señalización (57).

Entre las proteínas con dominios PDZ que son degradadas por E6 durante la tumorigénesis se encuentran MAGI-1, MAGI-2 y hDlg, esta última es la proteína supresora de tumores homóloga del disco largo de *Drosophila*. Esta proteína fue inicialmente identificada por su función en la regulación de la polaridad apico-basal de las células epiteliales (58). Sin embargo más recientemente se ha determinado su capacidad para regular la proliferación celular por su acción de gen supresor de tumores.

#### 4.2.2 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA hDlg

La proteína hDlg pertenece a la familia MAGUK, cuyo nombre proviene de las iniciales en inglés de *membrane associated guanylate kinases homologues*, está formada por 3 dominios PDZ en su extremo amino-terminal, un motivo SH3 central y en su extremo carboxilo-terminal un dominio GUK (homóloga de guanilato-cinasa) (Fig.13). Ahora bien, se han descrito varias proteínas homólogas a hDlg, cuatro de ellas bien relacionadas entre sí, nombradas desde Dlg 1 al 4. La isoforma hDlg1, producto del gen SAP97, es la mejor caracterizada en su capacidad supresora de tumores y es marcada para su degradación por E6 de VPH-AR (59).

El procesamiento alternativo de hDlg da como resultado cinco isoformas de esta proteína: I1 a I5 y más recientemente descritos I1A e I1B (62). Se ha propuesto que estas isoformas podrían tener funciones y localizaciones celulares diferentes, la más caracterizada es la denominada variante I3 la cual se localiza en la membrana plasmática formando las uniones célula-célula. Por su parte la variante I2 se localiza en el núcleo pero su función en este sitio aun no es conocida (62).



**Figura 14. Estructura de la proteína hDlg** La proteína hDlg contiene tres regiones PDZ (PDZ 1 a 3) un dominio SH3 y un dominio homólogo a guanilato-cinasa homólogo de levadura. Se muestran los posibles puntos para el procesamiento alternativo (recuadros grises). Tomado de McLaughlin et al 2002 (62).

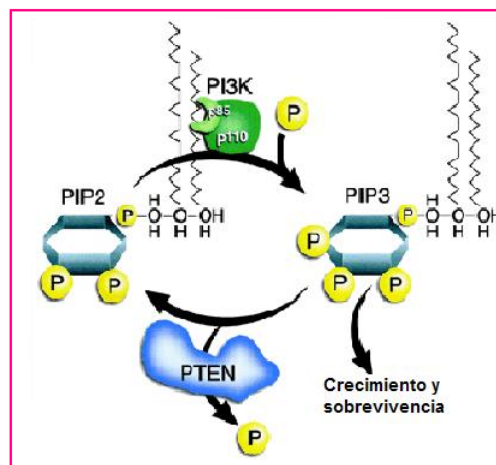
Los tipos virales de VPH-AR difieren en su capacidad para degradar a hDlg, siendo E6 del VPH18 más eficiente para inducir la degradación de esta proteína; debido a que cuenta con un motivo de unión más efectivo que solo difiere en un aminoácido en comparación con la proteína E6 de VPH-16 (60,61).

### 4.3. LA PROTEÍNA PTEN

#### 4.3.1. FUNCION DE LA PROTEÍNA PTEN

La proteína PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) también llamada MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers) y TEP-1 (TGFβ-regulated and epithelial cell enriched phosphatase); es una proteína supresora de tumor cuyo gen se localiza en el cromosoma 10q23 (63).

La actividad de PTEN como fosfatasa lipídica, se basa en su capacidad de desfosforilar al fosfatidilinositol 3, 4,5-trifosfato (PIP-3) siendo de esta manera un regulador negativo de la vía de Akt (Fig. 15) encargada del control de procesos biológicos como la proliferación celular, la motilidad, la apoptosis, homeostasis de la glucosa, tamaño celular, respuesta a nutrientes y daño al DNA (64,65). Por lo anterior la perdida de la función de PTEN resulta en un incremento en la concentración de PIP-3 lo que resulta en una sobre activación de la vía de Akt (66).

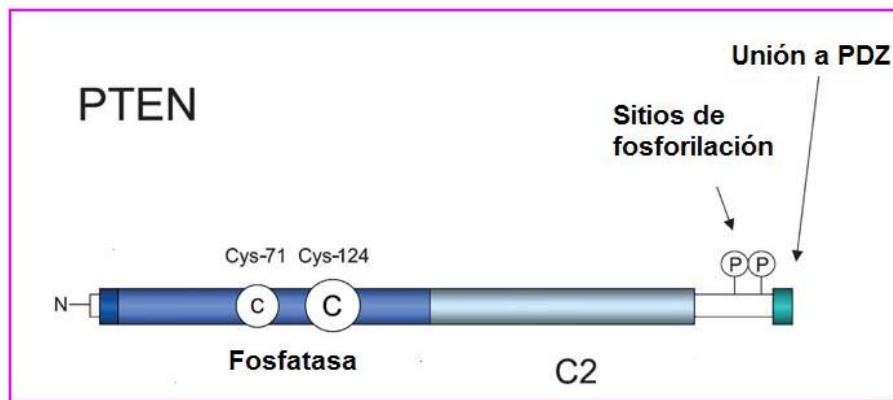


**Figura 15. Actividad de la proteína PTEN.** La cinasa lipídica PI3K cataliza la transferencia de un grupo fosfato (amarillo) al fosfatidilinositol-4,5 bifosfato (PIP2), generando fosfatidilinositol-3, 4, 5 trifosfato (PIP3), el cual transmite señales de crecimiento y supervivencia. PTEN remueve el fosfato D3 del PIP3, inactivando la cascada de señalización y regenerando el PIP2. Tomado de Sansall & Sellers 2004 (65).

La proteína PTEN tiene altas tasas de mutaciones en un gran número de tumores esporádicos humanos, como mama, próstata, cerebro, endometrio, colon y glioblastoma (65,66). Sin embargo en el caso del CaCU raramente han sido reportadas mutaciones en esta proteína (66, 68).

#### 4.3.2 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA PTEN

Esta proteína esta constituida por 403 aminoácidos forma parte de la familia PTP (protein tyrosine phosphatase). Su estructura química esta constituida por un dominio de fosfatasa en su extremo amino terminal, un dominio C2 responsable de la ubicación de la proteína en la membrana; y finalmente en su extremo carboxilo terminal, se localiza una secuencia de unión a dominios PDZ (68) (Fig. 15).



**Figura 16. Estructura de la proteína PTEN.** La proteína PTEN contiene un extremo N-terminal con los residuos Cys 71 y 124 catalíticos; un dominio C2 que junto al N-terminal son necesarios para la actividad catalítica de la proteína; en el extremo C-terminal se muestra el sitio de unión a PDZ y los sitios de fosforilación. Modificado de Leslie & Downes 2004 (68).

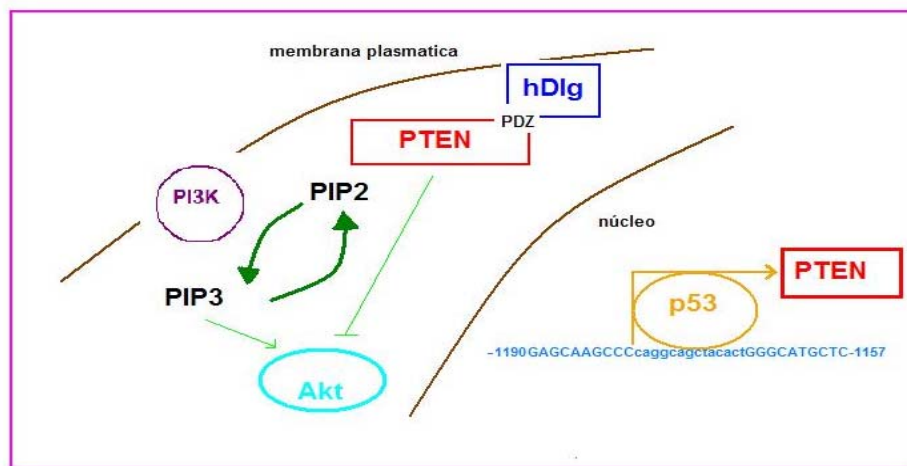
#### 4.3.3 MODULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA PTEN.

Existen varias formas de regulación de la actividad de la proteína PTEN la primera de estas es a nivel transcripcional. En diferentes circunstancias han sido identificados diversos factores de transcripción capaces de unirse al promotor de PTEN, uno de ellos es p53 el cual es capaz de unirse entre las bases -1190 y -1157 del promotor de PTEN lo que regula la expresión inducible de esta proteína, mientras que los niveles basales de esta proteína se deben a elementos fuera de la región de respuesta a p53 (69).

Las fosforilaciones de la proteína PTEN también juega un papel importante en la regulación de su actividad. Las cinasas CK1 y 2 (Cinasas de la caseína) son capaces de fosforilar el extremo carboxilo de PTEN, lo que conlleva a un cambio conformacional de PTEN a una forma “cerrada” incapaz de interactuar con otras proteínas y por lo tanto deslocalizándola de la membrana celular (64, 70).

La localización funcional de PTEN es a nivel de membrana, esta ubicación se debe a la capacidad de PTEN de unirse a proteínas que contengan dominios PDZ, ejemplo de estas es la proteína hDlg la cual estabiliza a PTEN en la membrana haciéndola funcional (63).

Por lo anterior, y en general, la regulación de PTEN se debe, por un lado, a la proteína hDlg quien la estabiliza en membrana para desempeñar su función de fosfatasa; y por el lado de la regulación transcripcional es p53 uno de los factores responsables de la transcripción PTEN (Fig. 16). La pérdida de las proteínas hDlg y p53 debido a la infección por VPH-AR, resulta en la deslocalización y reducción de la transcripción de PTEN lo que se traduce en una sobre activación de la vía Akt.



**Figura 17. Regulación de la actividad de la proteína PTEN.** A nivel de membrana la proteína hDlg estabiliza a la proteína PTEN a partir de uno de sus dominios PDZ. En el núcleo p53 actúa como factor de transcripción uniéndose al promotor de PTEN entre los aminoácidos -1190 a -1157.

Estudios muestran que esta proteína se localiza en el citosol y una mínima proporción en la membrana. La expresión nuclear de PTEN se ha observado en una variedad de tejidos estudiados, aunque la función de PTEN en el núcleo no es clara (68).

## JUSTIFICACION

El cáncer cérvico uterino (CaCU), es un problema de salud a nivel mundial, ya que ocupa la tercera causa de muerte en mujeres en el mundo. En los países en vías de desarrollo el cáncer cervical está todavía asociado a una alta mortalidad. A partir de la década de los años ochenta se ha identificado al VPH como una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar una neoplasia.

Resulta notable que el mecanismo carcinogénico inducido por el VPH se basa en la degradación de importantes proteínas supresoras de tumores y no su mutación como sucede con estas mismas proteínas en otros tipos de cáncer, por lo que se muestra importante entender como estas proteínas interactúan entre si y sobre todo como es su comportamiento *in vivo* el cual ha sido poco estudiado.

En el presente trabajo se estudia de manera indirecta, la interacción de la proteína E6-AR con las proteínas supresoras de tumores p53 y hDlg, y el efecto de su degradación sobre la proteína PTEN .Con este trabajo se relacionara la localización y expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg con su función biológica y como estos aspectos se ven modificados ante la infección por VPH en los contextos histológicos presentes en el cáncer cervical.



## **HIPÓTESIS**

Las proteínas supresoras de tumores p53, PTEN y hDlg disminuyen su expresión en el cáncer invasor del cervix en comparación a las lesiones premalignas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión y localización de las proteínas p53, hDlg y PTEN en muestras premalignas y de cáncer invasor para correlacionarlo con el grado de malignidad de la lesión.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Comparar los niveles de expresión de las proteínas p53, hDlg y PTEN entre lesiones premalignas y cáncer invasor
- Determinar si existen cambios en la localización de las proteínas hDlg y PTEN en las lesiones premalignas y CaCu.
- Correlacionar el tipo viral con la expresión de hDlg, PTEN y p53.
- Correlacionar la expresión de estas proteínas con aspectos clínico-patológicos de las pacientes

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. OBTENCION DE MUESTRAS**

Para el presente trabajo se obtuvieron 200 muestras de pacientes que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Mujeres que asistieron a consulta al Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) durante los años 2004 a 2007 por presunta lesión cervical.
- No embarazadas.
- Vírgenes de tratamiento.
- Muestras que contaran con previa tipificación para VPH.

De estos casos, se obtuvieron 148 biopsias embebidas en parafina, ya que en los casos restantes se eliminaron del estudio, por no cumplir con los criterios de inclusión, por que no se encontraron en el archivo de patología o el material fue insuficiente para ser evaluado.

Los 148 casos se dividieron por diagnóstico histopatológico de la siguiente forma: 43 fueron diagnosticados como lesión premaligna del cervix y 105 como cáncer invasor; para cada una de los bloques se realizaron 3 cortes de 3 $\mu$ m de grosor y se colocaron en laminillas tratadas para evitar desprendimiento del tejido.

Los controles fueron biopsias de cervix incluidas en parafina, de mujeres libres de infección por VPH y CaCU, lo que se determino por observación histopatológica. Estas fueron obtenidas de la morgue del mismo instituto, las cuales fueron procesadas de manera similar que los casos. Como control a la técnica se incluyeron tejidos previamente probados como positivos a cada una de las proteínas a evaluar.

De manera paralela a la técnica inmunohistoquímica se revisaron las historias clínicas de todas las pacientes incluidas para conocer datos socio-económicos, gineco-obstétricos e higiénico-dietéticos para correlacionar con los resultados prácticos.

## **2. HEMATOXILINA – EOSINA (H&E)**

Para llevar a cabo el análisis morfológico e histopatológico de los casos y controles, se realizó la tinción con hematoxilina y eosina. Esta es una tinción histológica topográfica que permite identificar o visualizar las células con un patrón diferencial de colores, ya que emplea la afinidad química de ambos colorantes para la identificación de componentes celulares (71).

La eosina es un colorante ácido que tiñe particularmente bien las estructuras básicas por lo tanto, en las preparaciones teñidas con H/E las proteínas del citoplasma o del material extracelular se colorean de rosa o rojo con la eosina, o sea que se comportan como estructuras acidófilas. Con respecto a la hematoxilina, un colorante básico, tiñe de color azul o violeta las estructuras ricas en ácidos nucleicos como los son el núcleo, el retículo endoplasmático rugoso y los ribosomas (72).

Las laminillas se desparafinaron por 30 minutos en estufa, se aclararon en xilol y rehidrataron en baños de alcohol a concentraciones descendentes (96°,80°,70°) y agua destilada; se sumergieron en hematoxilina de Harris (Merck, Germany) por 5 minutos, posteriormente se lavaron con agua corriente. Finalmente, las laminillas se tiñeron por 1 minuto en Eosina y se deshidrataron colocándolas en alcoholes al 70°, al 80° y al 90°, por último, las laminillas se colocaron en un baño de xilol, hasta su montaje con medio rápido Entellan® (Merck, Germany).

## **3. INMUNOHISTOQUIMICA**

La inmunohistoquímica es una técnica de tinción específica mediante anticuerpos que se emplea para visualizar *in situ* la expresión de alguna proteína. En este caso se empleó esta técnica para determinar la localización de las proteínas PTEN, hDlg y p53.

Las laminillas se desparafinaron por 30 minutos en estufa; se sumergieron en xilol para eliminar el residuo de parafina y se re-hidrataron en alcohol 96°, 80°, 70° y agua. La recuperación de antígenos se realizó en buffer de citrato de sodio a pH ácido (pH6) en

una vaporera de uso doméstico para evitar el desprendimiento del tejido en el microondas. Se dejaron enfriar en buffer de citratos a 4°C.

Tras la recuperación se hizo un lavado en buffer de fosfatos (PBS) 0.1M a pH7.4 y se bloqueo la peroxidasa endógena con el bloqueador del kit DakoCytomation EnVision+® System-HRP (DAB). Tras el lavado con PBS se incubo el anticuerpo primario a la concentración específica a cada proteína:

Anticuerpo	Concentración	Marca
p53	1:50	P53 (DO-1):sc-126
HDlg	1:50	SAP 97 (2D11):sc-9961
PTEN	1:50	PTEN(28H6):sc-5620

El tiempo de incubación fue de 1 noche a 4° C, pasado este tiempo se realizo un lavado para agregar el polímero marcado también incluido en el kit de Dako, el cual se incubo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

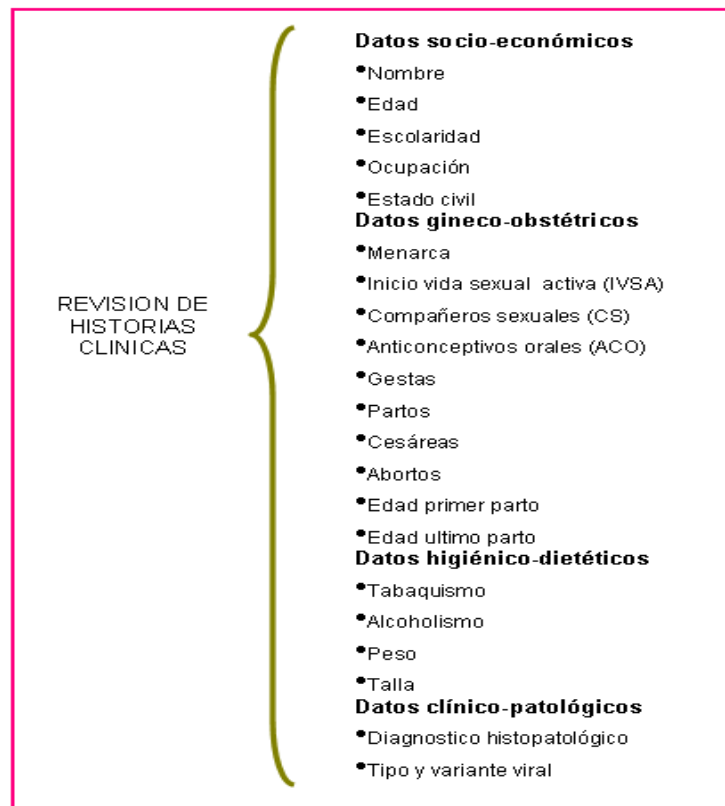
Al momento del revelado se realizó la mezcla del buffer substrato y la diaminobencidina (DAB) a razón de dos mililitros de buffer por una gota de DAB también incluidos en el kit, fue filtrada y aplicada a la muestra mientras se observaba al microscopio óptico la reacción para evitar sobre exposición; el tiempo promedio en el cual se observo la reacción fue de un minuto tras el cual las muestras se lavaban en PBS.

Las laminillas se contrastaron con hematoxilina de Harris (Merck, Alemania) se lavaron en agua corriente y deshidrataron en alcohol 70°,80° ,96° y xilol. Fueron montadas con medio rápido Entellan ® (Merck, Alemania) y evaluadas por el departamento de patología.

#### 4. REVISION DE HISTORIAS CLINICAS

La hoja de captura para recolección de datos fue organizada como se muestra en el siguiente cuadro:

*Cuadro 4. Datos obtenidos de las historias clínicas.*



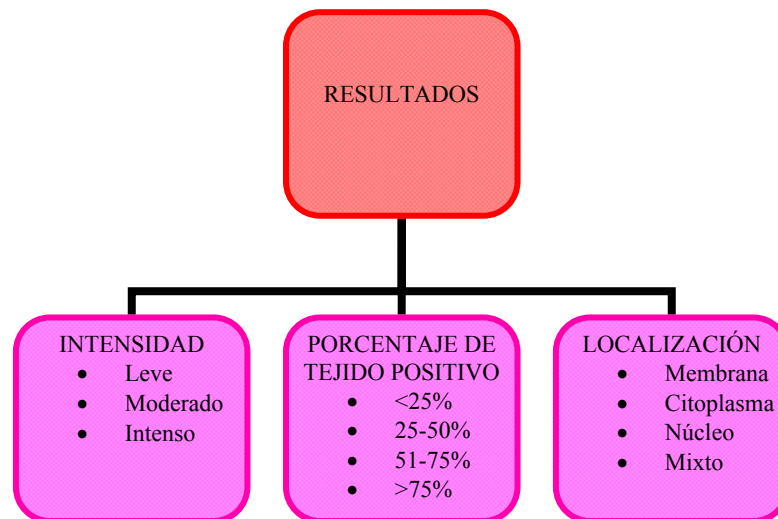
#### 5. TIPIFICACION VIRAL

La determinación del tipo viral de las muestras se realizó en piezas quirúrgicas en fresco, en un trabajo previo en el laboratorio. La amplificación del genoma viral se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligos específicos a la región L1 del VPH para identificar infecciones únicas.

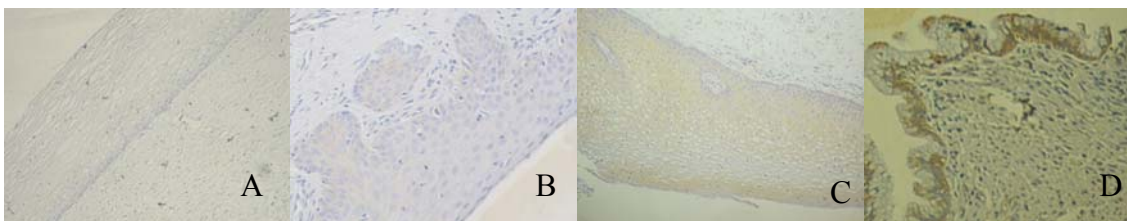
Las muestras positivas a VPH fueron secuenciadas por medio de un secuenciador automático, ABI PRISM 3100 AVANT. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos contenida en el programa BLAST para determinación del VPH específico.

## 6. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos por el método inmunohistoquímico fueron evaluados por el departamento de patología del Instituto para determinar la presencia (intensidad y porcentaje de tejido positivo) y localización celular de cada proteína que se estudio. Los criterios se reportaron como se muestra en la siguiente figura:



En la Figura 18 se muestran ejemplos de los criterios de intensidad de intensidad utilizados a lo largo de este trabajo.



**Figura 18. Intensidad de reacción:** A) Cervix sano libre de infección a VPH control negativo; B) Cervix sano intensidad leve en citoplasma; C) Cervix sano intensidad moderada en citoplasma y membrana y D) Epitelio glandular positividad intensa

## **7. ANALISIS ESTADISTICO**

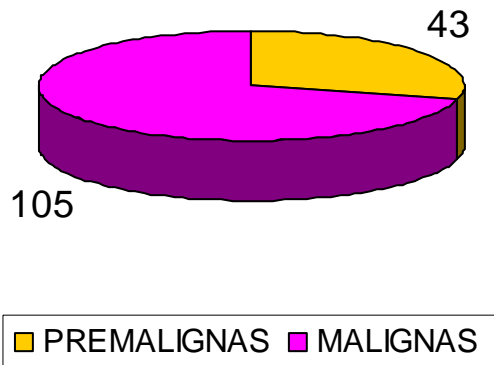
Para el análisis estadístico, se empleo la prueba estadística exacta de Fisher y Xi cuadrada tomando una  $p < 0.05$  como significativa.

## RESULTADOS

### 1. CARACTERISTICAS EPIDEMIOLOGICAS DE LA POBLACION

El objetivo principal de este trabajo, fue determinar los niveles de expresión y localización de las proteínas p53, PTEN y hDlg en muestras premalignas y de cáncer invasor del cervix, para cumplir este objetivo, se colectaron 148 biopsias en bloques de parafina del banco de patología del Instituto Nacional de Cancerología, las cuales se agruparon por diagnóstico histopatológico de la siguiente forma: 43 muestras premalignas y 105 de cáncer invasor (Fig. 18). Debido a que se ha reportado que la proteína E6 de los VPH-AR regula la actividad de las proteínas p53, PTEN y hDlg, las muestras fueron previamente tipificadas para determinar los tipos virales presentes (Fig. 19).

#### DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO

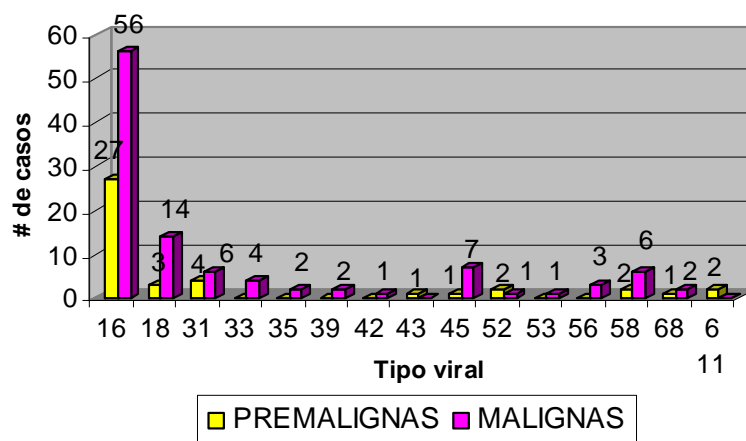


**FIGURA 19. Población caracterizada por diagnóstico Histopatológico.** Las muestras fueron agrupadas como: premalignas (n= 43), en donde se incluyeron los cambios citopáticos, las cervicitis y todos los casos de NIC (I al III), además de los casos de cáncer in situ. Las muestras malignas (n=105) incluyeron a todos los CaCU invasores.

En la figura 19 se muestran los resultados de la tipificación viral, encontrando una mayor prevalencia del tipo VPH 16 seguido del VPH 18. El presente trabajo no considera las infecciones múltiples, solo la infección por el tipo viral de mayoritario.

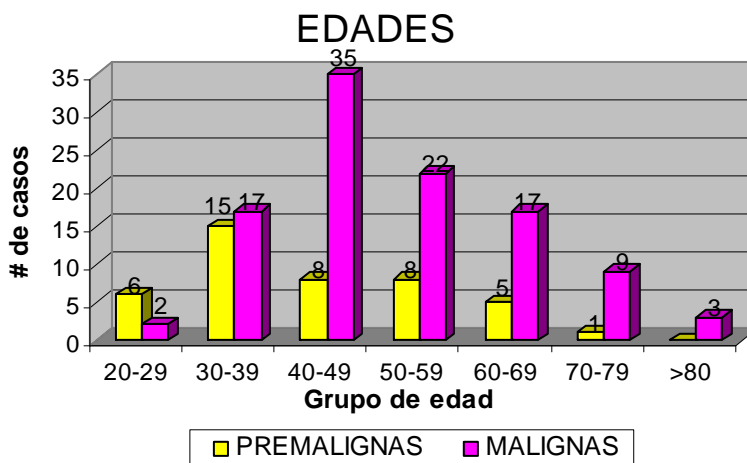


## FRECUENCIA TIPOS VIRALES



**Figura 20. Tipos virales más frecuentes.** Los tipos virales fueron obtenidos por secuenciación automática, siendo los más frecuentes el tipo 16 (56%), seguido del tipo 18 (11.5%). Los tipos virales de bajo riesgo 6 y 11 (2 casos) sólo fueron encontrados en muestras premalignas.

Con respecto a la distribución por edades, en la figura 20 se puede observar que la edad de mayor incidencia de cáncer invasor resulto en la década de los 40's (35 casos lo que corresponde al 33.6%). Para las lesiones precursoras, la mayor incidencia se observo en la década de los 30's (15 casos que corresponden al 34.8%).



**Figura 21. Distribución por edades en relación al diagnostico histopatológico.**

## 2. PRESENCIA DE LAS PROTEINAS p53, PTEN Y hDlg EN LESIONES PREMALIGNAS Y CaCU.

Los dos grupos estudiados fueron: muestras premalignas en donde se incluyeron los cambios citopáticos, todos los niveles de NIC y los carcinomas *in situ* para un total de 43 muestras, lesiones malignas incluyeron a todos los CaCU invasores siendo estas 105 muestras.

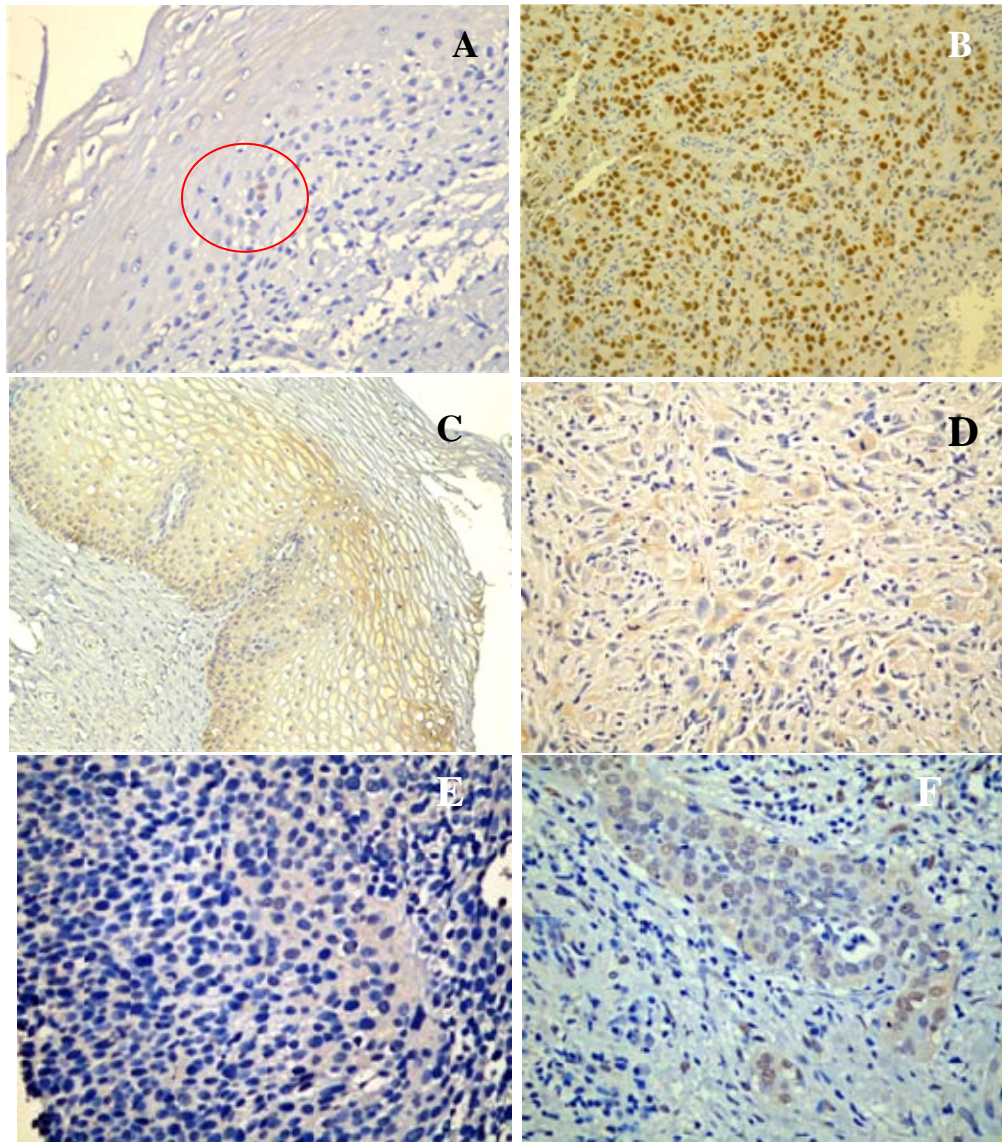
El siguiente paso fue evaluar la positividad de la inmunotinción para las proteínas p53, PTEN y hDlg en muestras premalignas y malignas (Fig. 21). Los resultados de expresión de cada proteína se muestran en el Cuadro 5.

*Cuadro 5. Expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg en muestras premalignas y CaCU.*

PROTEINA	PREMALIGNAS n=43	MALIGNAS N=105
p53	22 (51.1%)	67 (63.8%)
PTEN	20 (46.5%)	24 (22.8%)
hDlg	20 (46.5%)	78 (74.2%)

El cuadro 5 detalla la inmunotinción positiva para cada proteína. Para el casos de las proteínas PTEN y hDlg se encontró una diferencia significativa en cuanto a su positividad entre los grupos de lesiones premalignas y malignas, ( $p=0.0052$  y  $p=0.0020$  respectivamente), ya que para la proteína PTEN se obtuvieron 20 casos positivos en lesiones premalignas (46.5%) y 24 casos de lesiones malignas (22.8%). Para la proteína hDlg hubo una sobre expresión de esta en las lesiones malignas donde el 74% de los casos resultaron positivos (78 muestras); en contraste con las lesiones premalignas donde solo se encontró un 46.5% (20 casos).

Finalmente la inmunotinción para la proteína p53 no mostró diferencia significativa entre los dos grupos.



**Figura 22. Expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg.** Se muestran casos premalignos y malignos positivos a cada proteína: (A) NIC I positivo a p53; (B) Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado, invasor, positivo a p53. (C) Cervicitis crónica positiva a hDlg; (D) Carcinoma epidermoide con patrón sarcomatoide positivo a hDlg, (E) NIC III PTEN positivo y (F) Carcinoma epidermoide microinvasor PTEN positivo. Todas las fotos a un aumento 10X.

### 3. LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS PROTEINAS p53, PTEN Y hDlg EN MUESTRAS PREMALIGNAS Y CaCU.

En diversos trabajos se ha documentado que la localización subcelular de las proteínas p53, PTEN y hDlg se encuentra íntimamente ligada con su actividad biológica (84, 60, 62, 69). Por lo anterior en este trabajo se evaluó la localización celular de estas.

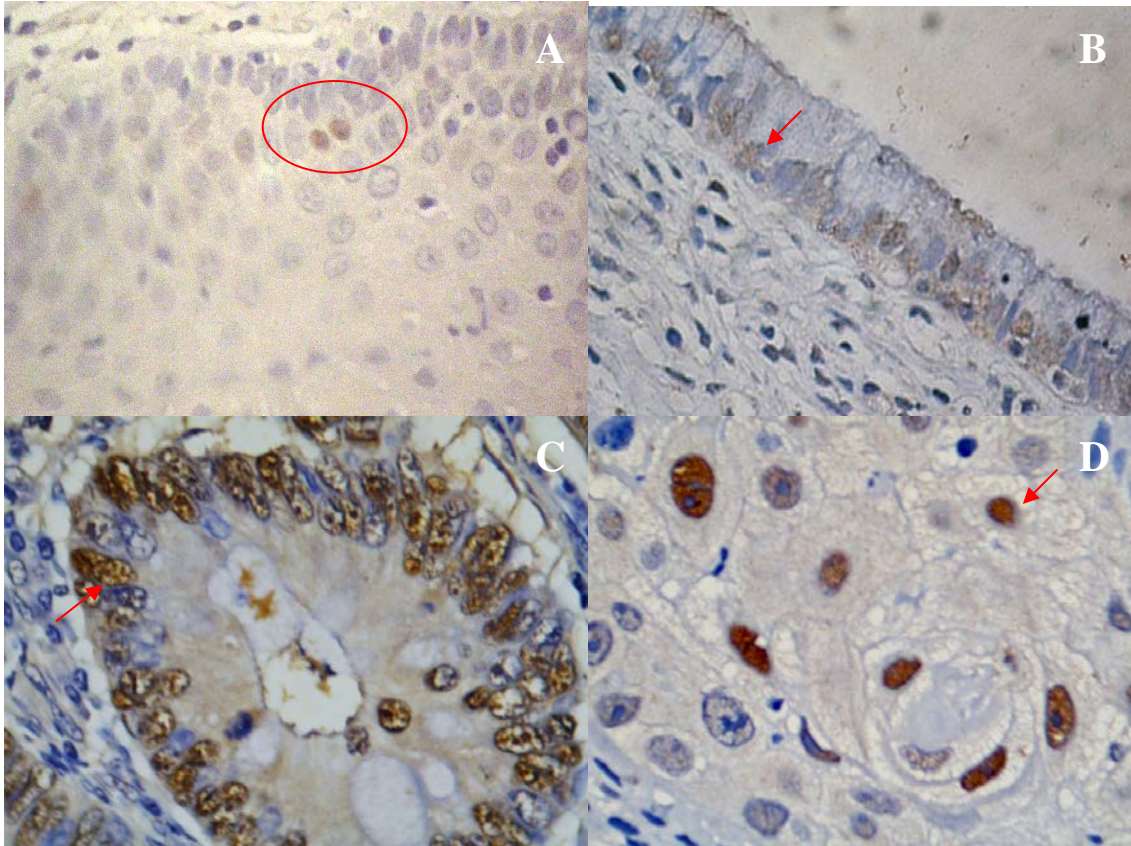
En este trabajo se pudo evaluar una expresión nuclear en la totalidad de los casos positivos a la proteína p53 independientemente del diagnóstico histopatológico (Fig. 22). Para las proteínas PTEN y hDlg la localización fue más heterogénea, los resultados se presentan en los cuadros 6 y 7 respectivamente.

*Cuadro 6. Localización de la proteína PTEN en lesiones premalignas y CaCU.*

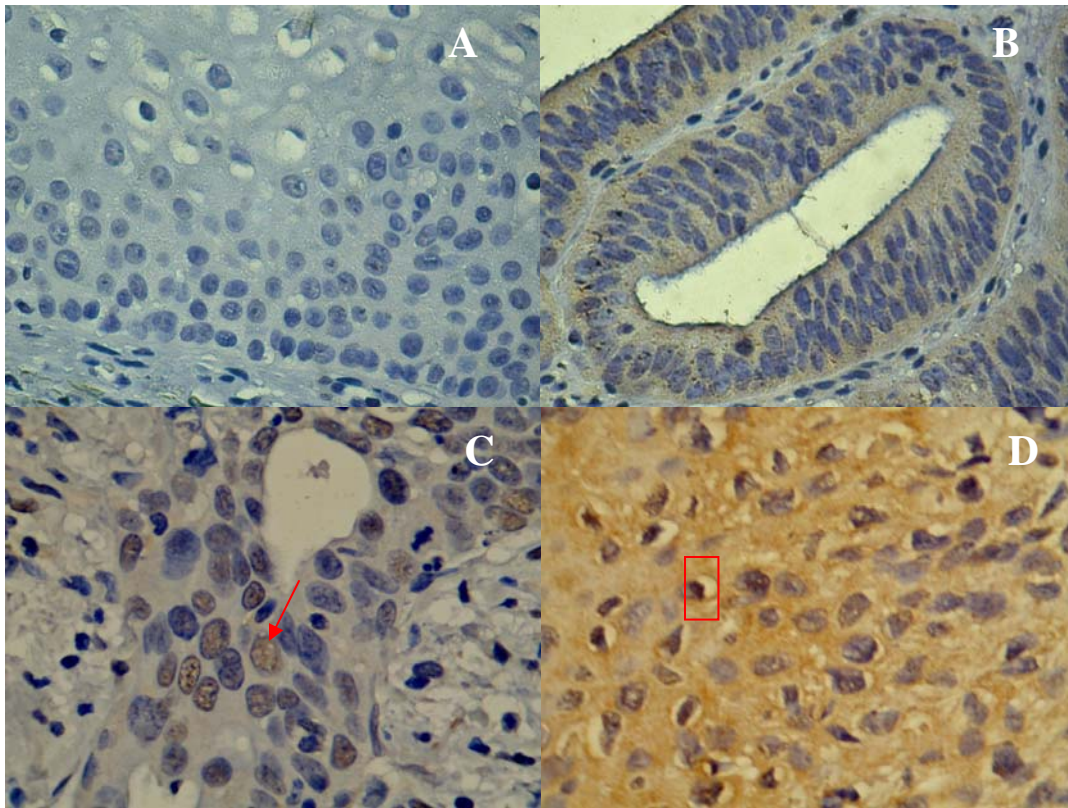
LOCALIZACION PTEN	PREMALIGNAS n=20	MALIGNAS n=24
MEMBRANA	0	0
CITOPLASMA	2 (10%)	5 (20.8%)
NUCLEO	17 (85%)	14(58.3%)
MEMBRANA Y CITOPLASMA	0	0
CITOPLASMA Y NUCLEO	1 (5%)	5(20.8%)

La localización de la proteína PTEN (Fig. 23) fue significativamente diferente entre los dos grupos ( $p= 0.0001$ ). En las muestras premalignas el mayor número de casos, 17 equivalentes al 85%, presentaron una tinción positiva en el núcleo; mientras tanto las lesiones malignas mostraron solo 14 casos nucleares lo que representa un 58.3% de la muestra. Los casos positivos restantes se distribuyeron en la región citoplasmática.





**Figura 23. Localización nuclear de la proteína p53.** A) Epitelio cervical sano; B) Epitelio glandular sano y C) Adenocarcinoma in situ y C) Carcinoma epidermoide invasor.



**Figura 24. Localización de la proteína PTEN.** A) Cervicitis crónica PTEN negativa; B) Glándula cervical positiva a PTEN en citoplasma; C) Carcinoma epidermoide invasor, positivo a PTEN en el núcleo y D) CaCU in situ positivo a PTEN en núcleo (recuadro) y citoplasma

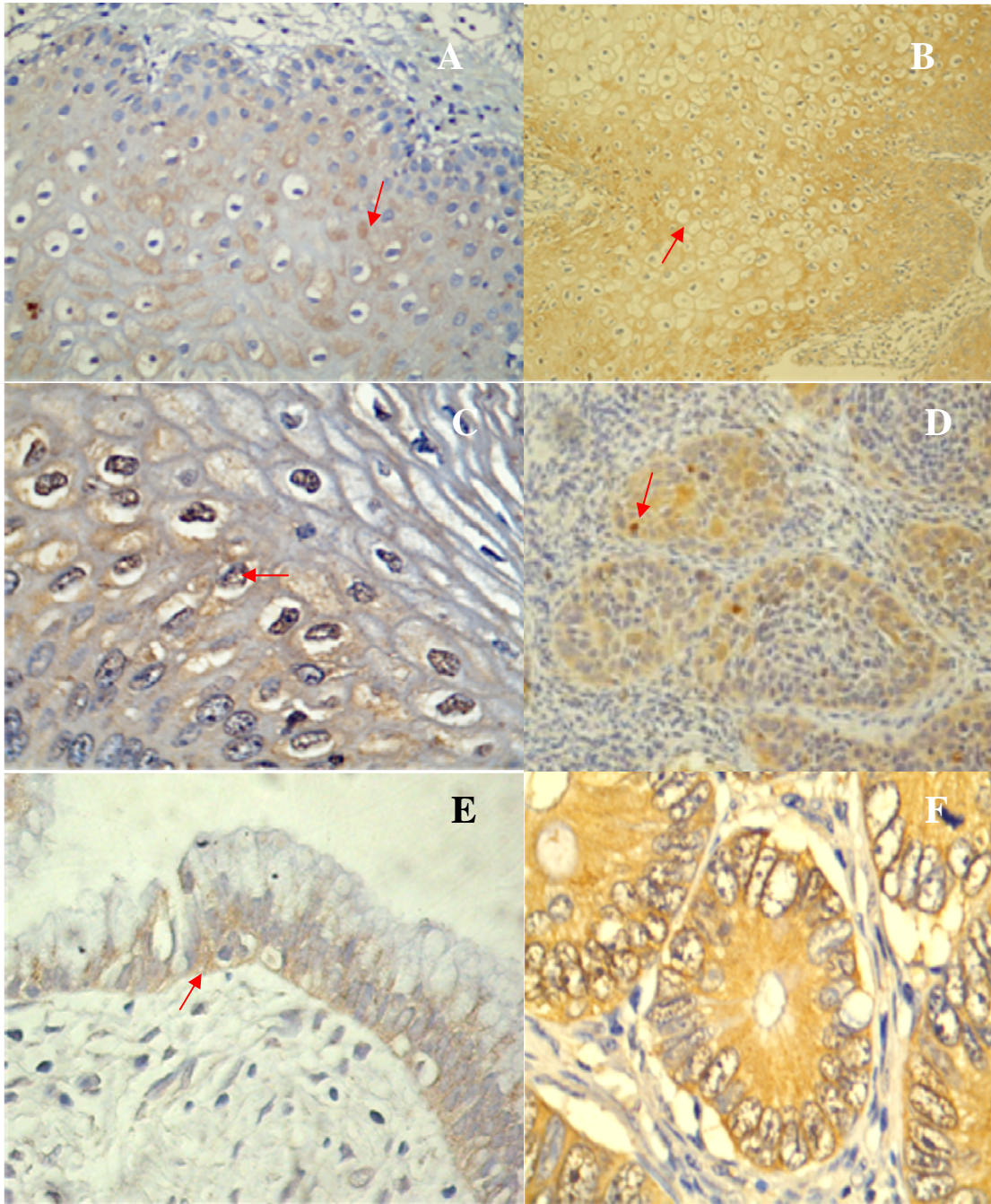
**Cuadro 7. Localización de la proteína hDlg en lesiones premalignas y CaCU.**

LOCALIZACION hDlg	PREMALIGNAS n=20	MALIGNAS n=78
MEMBRANA	0	2 (2.5%)
CITOPLASMA	13 (65%)	57 (73%)
NUCLEO	2 (10%)	3 (3.8%)
MEMBRANA Y CITOPLASMA	4 (20%)	7 (8.9%)
CITOPLASMA Y NUCLEO	1(5%)	9 (11.5%)

La ubicación celular de la proteína hDlg (Fig. 24) fue en su mayoría citoplásmica en ambos grupos: 65% para las muestras premalignas y 73% para las malignas. Por el contrario, el porcentaje de positividad en el núcleo fue muy bajo, del 10% en lesiones precursoras y del 3.5% en lesiones invasoras. Aunque los patrones de expresión en



membrana y citoplasma fueron mayores en las muestras premalignas que en las muestras de cáncer invasor no existió una diferencia significativa en la ubicación de esta proteína entre los grupos.



**Figura 25. Localización de la proteína hDlg.** (A) Cambios citopáticos hDlg positivo en localización citoplásmica (flecha); (B) Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado, invasor, hDlg positivo en membrana.(flecha) y citoplasma (C) Cervicitis crónica positiva a hDlg en el núcleo(flecha) y

*citoplasma;(D)Epitelio glandular positivo a hDlg tinción citoplásmica y E) Glándula positiva a hDlg en citoplasma.*

#### **4. EXPRESION DE LAS PROTEINAS p53, PTEN Y hDlg EN CÁNCER ESCAMOSO Y ADENOCARCINOMAS.**

Los tumores del cervix pueden provenir de dos tipos histológicos diferentes: escamoso y glandular (adenocarcinoma). Esta diferencia cobra importancia en el hecho de que los adenocarcinomas mantienen un comportamiento más agresivo y relacionado a un peor pronóstico clínico (21, 66). Por lo anterior en este trabajo se analizo si existía alguna diferencia en la expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg entre los dos tipos histológicos, los resultados se muestran en el cuadro 8.

*Cuadro 8. Diferencia en la expresión de las proteínas p53, PTEN y hDlg entre los tipos de cáncer escamoso y adenocarcinoma.*

PROTEINA	CÁNCER ESCAMOSO n=91	ADENOCARCINOMA n=14
P53	59(64.8%)	8 (57.4%)
PTEN	23(25.2%)	1(7%)
hDlg	70(76.9%)	8(57.4%)

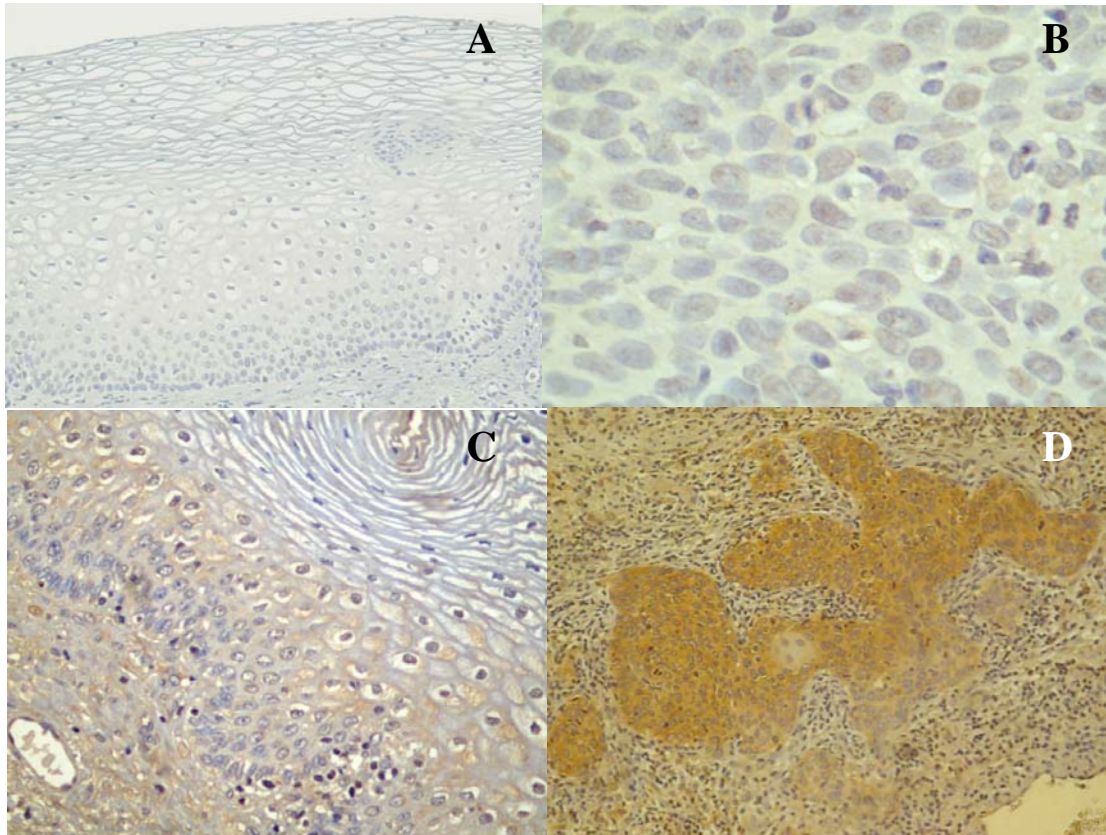
En el cuadro 8 se muestran los casos de cáncer escamoso (n= 91, lo que corresponde 86.6% de la muestra) y de adenocarcinomas (n=14, lo que concierne al 9.45%). A pesar de que los cánceres escamosos presentaron una mayor inmunoreactividad para las tres proteínas, no existió una diferencia significativa en cuanto a su expresión entre los dos grupos.

#### **5. INTENSIDAD DE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS p53, PTEN Y hDlg EN MUESTRAS PREMALIGNAS Y CaCU.**

El marcaje inmunohistoquímico como factor pronóstico en neoplasias representa quizás uno de los temas más controvertidos en el campo de la patología oncológica, ya que los resultados se pueden prestar a subjetividad debido a la adopción de múltiples sistemas



para clasificar la intensidad (82). En este trabajo la intensidad del marcaje se considero como leve, moderada e intensa con respecto a un tejido control (Fig. 25). A si mismo se evaluó el porcentaje de tejido tumoral positivo para cada una de las proteínas. Los niveles de expresión de las proteínas PTEN y hDIg se muestran en los cuadros 9 y 10.



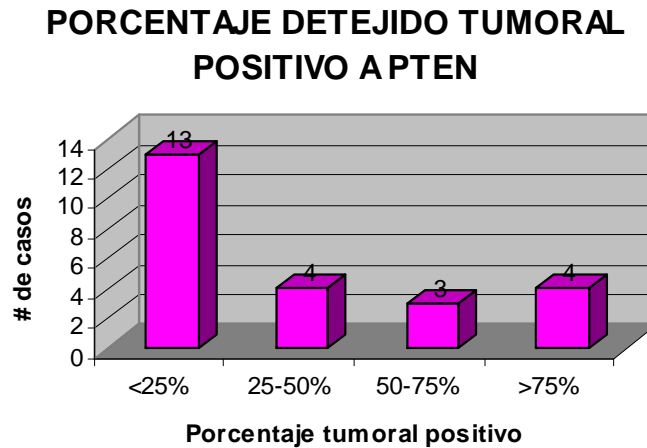
**FIGURA 26. Intensidad de la inmunotinción.** A) Cambios citopáticos negativos a inmunotinción, B) Carcinoma epidermoide tinción leve en el núcleo (flecha) C) Cáncer in situ tinción moderada en citoplasma y D) Carcinoma epidermoide invasor tinción intensa en citoplasma.

**Cuadro 9. Intensidad de la inmunoreacción de la proteína PTEN en lesiones premalignas y CaCU.**

INTENSIDAD PTEN	PREMALIGNAS n=43	MALIGNAS n=105
LEVE (1)	16(37.2%)	16(15.2%)
MODERADA (2)	4(9.3%)	7(6.6%)
INTENSA (3)	0	1(0.9%)

En el cuadro 9, se exponen los resultados de intensidad de inmunotinción para la proteína PTEN, en general la expresión de esta proteína es leve en ambos grupos, sin embargo existe una diferencia significativa ( $p=0.0191$ ) en el número de casos entre las lesiones premalignas (16 casos igual a 37.2%) y los casos de cáncer invasor (16 casos igual al 15.2%).

Con respecto a los porcentajes de tejido tumoral positivo (Fig. 26) nos muestran una clara tendencia a la pérdida de la expresión de esta proteína en las lesiones invasoras, ya que el 12.38% de los casos presento un porcentaje de tejido tumoral muy bajo (<25%) que contrasta con el bajo porcentaje (3.8%) de casos que presentaron una positividad alto (>75%).



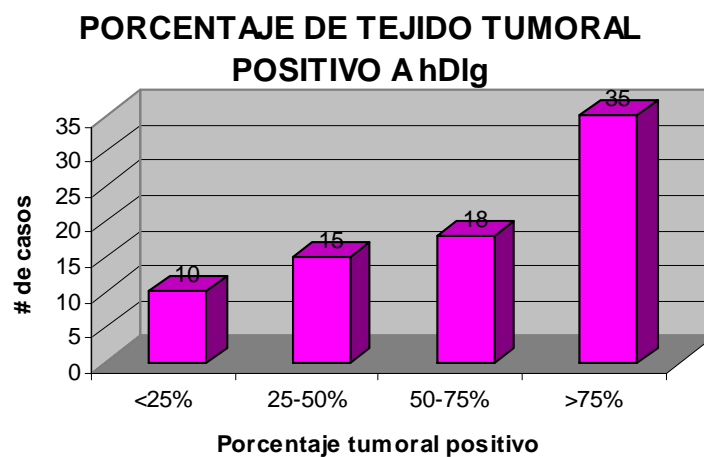
*Figura 27. Porcentaje tejido tumoral positivo a la proteína PTEN. La mayoría de los casos positivos (13) a esta proteína se distribuyeron en un área tumoral menor al 25%.*

**Cuadro 10. Intensidad de la inmunoreacción de la proteína hDlg en muestras premalignas y CaCU.**

INTENSIDAD hDlg	PREMALIGNAS n=43	MALIGNAS n=105
LEVE (1)	7(16.2%)	32(30.47%)
MODERADO (2)	9(20.9%)	29(27.61%)
INTENSO (3)	4(9.3%)	17(16.1%)

La intensidad de la inmunotinción para la proteína hDlg también resulto significativamente diferente entre ambos grupos ( $p=0.0126$ ). Estos resultados se observan en el cuadro 10, donde se refleja claramente un aumento en la expresión de esta proteína en las lesiones malignas. Un ejemplo de esto lo representa el porcentaje de inmunotinción intensa que para el caso de las lesiones premalignas fue del 9.3% mientras que para las lesiones invasoras fue del 16.1%.

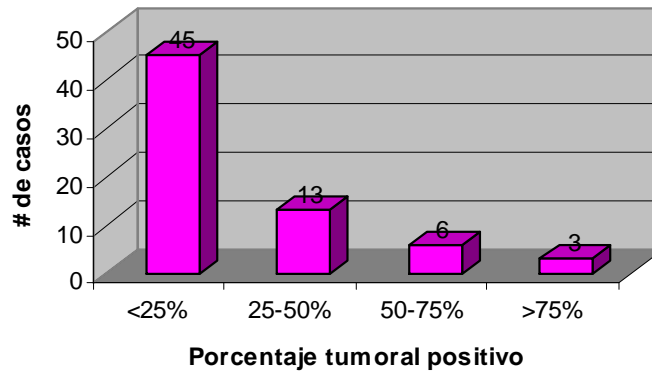
Esta misma tendencia se encontró en el porcentaje de tejido tumoral positivo (Fig. 27), donde el mayor numero de casos (35 casos) presentaron grandes superficies del tumor positivos a esta proteína (>75%).



**Figura 28. Porcentaje de tejido tumoral positivo a la proteína hDlg. La mayoría de los casos positivos (35) a esta proteína se dieron en un área tumoral mayor al 75%.**

Con respecto a la proteína p53 no se encontró diferencia significativa en cuanto a la intensidad de marcaje entre los dos grupos. Sin embargo es notable la diferencia que existe en el área tumoral positiva (Fig. 28) a esta proteína ya que el mayor número de casos positivos (n= 45) presentaron un área poco extensa (<25%).

### **PORCENTAJE DE TEJIDO TUMORAL POSITIVO A p53**



**Figura 29. Porcentaje de tejido tumoral positivo a la proteína p53.** La mayoría de los casos positivos (45) a esta proteína se distribuyeron en un área menor al 25% del tejido tumoral.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, mediante ensayos de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos, se determinaron los niveles de expresión y la localización de las proteínas supresoras de tumores p53, PTEN y hDlg, en 43 muestras premalignas y 105 de cáncer invasor. Con respecto a la expresión de la proteína PTEN esta disminuyó significativamente, en las lesiones invasoras con respecto a las premalignas; su localización fue principalmente nuclear. La expresión de la proteína hDlg se encontró significativamente aumentada en las lesiones invasoras, expresándose preferentemente en el citoplasma. Por último, no se encontraron cambios significativos entre los casos positivos a la proteína p53 con una localización 100% nuclear.

En estudios epidemiológicos, se han identificado varios factores de riesgo que contribuyen al establecimiento del CaCu. Entre estos, el principal es la infección persistente por tipos oncogénicos de VPH, siendo los genotipos víricos 16 y 18 los de mayor incidencia en la población en general y los más asociados a CaCU (6, 25,30). En el caso de nuestra población el comportamiento fue similar ya que el 56% de los casos presentaron una infección por el virus tipo 16 y el 11.5% con el tipo 18. El resto de los tipos viral (31, 32, 33, 35, 39) estuvieron representados por un número menor de casos, este comportamiento fue igual tanto en las muestras premalignas como de cáncer invasor. Cabe mencionar que las infecciones múltiples no fueron incluidas en este trabajo, ya que el papel de la sinergia entre diferentes tipos virales en una misma lesión aun es un tema controversial.

Varios estudios han reportado la evolución de la historia natural de las lesiones premalignas, estos han revelado que la mayoría de las lesiones de bajo grado son transitorias y que la mayoría de las pacientes tiene la capacidad de eliminar la infección, sin embargo, es probable que las lesiones de alto grado persistan y progresen a CaCU, en un intervalo de tiempo que va de los 10 a 20 años (6). Consistente con este dato, en nuestro grupo de mujeres, aquellas que presentaron lesiones precursoras fueron en general, mujeres más jóvenes, en un promedio de edad en la década de los 30's, en

comparación, las mujeres con lesiones invasoras fueron 10 años mayores, con un promedio de edad en la década de los 40's; esta ventana de tiempo de diez años, podría representar el tiempo necesario para que una infección persistente del VPH-AR progresara a una lesión maligna.

La fosfatasa PTEN presenta altas tasas de mutación en una gran variedad de casos cáncer; sin embargo, en CaCU el índice de mutaciones de esta fosfatasa es muy bajo. En la literatura se ha mostrado que la positividad para la proteína PTEN, va disminuyendo conforme las lesiones cervicales van progresando de lesiones precursoras a lesiones malignas. Por otro lado, se ha propuesto que esta disminución en los niveles de expresión de esta fosfatasa se deben a la oncoproteína E6 de los VPH-AR que puede regular la actividad de la proteína PTEN a través de su capacidad para inducir la degradación de hDlg (32). Otro mecanismo importante en la regulación de PTEN es a nivel transcripcional y esta mediado por la actividad de la proteína p53. Con estas observaciones, se ha postulado, que la pérdida de esta PTEN está asociada con la progresión a cáncer invasor, independientemente del tipo viral que infecte la lesión. También se ha asumido que la pérdida de PTEN, incrementa la angiogénesis favoreciendo el crecimiento tumoral (76, 85 y 86).

Estos datos coinciden con lo encontrado en el presente trabajo, ya que en el análisis de la expresión de la proteína PTEN, se encontró una disminución de la expresión de esta proteína en las muestras de cáncer invasor con respecto a las lesiones premalignas. En general la expresión de PTEN en ambos grupos fue leve, debido a que nuestro grupo de muestras premalignas esta constituido en un alto porcentaje de muestras de lesiones muy avanzadas. Con el análisis del porcentaje de tejido tumoral positivo, se demostró una reducida superficie positiva para PTEN, finalmente se trató de correlacionar el tipo viral con la expresión de PTEN y como se reporta en la literatura no se encontramos una correlación positiva.

La localización de PTEN, tiene un importante papel en su actividad. Su principal función es la desfosforilación de fosfolípidos de membrana, para entrar en contacto con éstos,

PTEN necesita estar reclutada en membrana, para lo cual, se une a proteínas de la familia MAGUK como hDlg. Sin embargo, su detección en membrana, por métodos inmunohistoquímicos clásicos es muy difícil, debido al tiempo tan corto que esta proteína permanece en esta localización (84). Esto correlaciona con nuestros resultados, ya que no se encontró en ninguno de los casos, ni en lesiones premalignas ni en cáncer invasor, la presencia de PTEN en la membrana. En contraste, en la mayoría de los casos premalignos la ubicación de esta fosfatasa fue nuclear a diferencia de los casos de cáncer invasor donde la distribución fue nucleo-citoplasmica. La función nuclear de PTEN se desconoce, aunque se ha postulado que numerosas proteínas reguladoras transportan a esta para su degradación en el núcleo (86). Esto podría explicar los reducidos niveles de esta proteína.

Debido a la importancia de la proteína hDlg en la regulación de la actividad de PTEN, en este trabajo se realizó el análisis de expresión de esta proteína encontrándose una acumulación significativa de hDlg en las lesiones invasoras, además de un alto porcentaje de la superficie tumoral positiva a esta proteína. La acumulación de hDlg, podría ser resultado de un aumento en la vida media de ésta, producto de mutaciones relacionadas con el proceso carcinogénico. Sin embargo, lo anterior no puede ser corroborado con el anticuerpo para hDlg empleado en este trabajo.

Por otro lado, este aumento en la expresión de hDlg en citoplasma, podría explicarse por una deficiente fosforilación de esta proteína por las cinasa CDKs, lo cual impide su translocación a núcleo y su consecuente degradación, cuyo mecanismo ha sido recientemente descrito como una forma de regulación de los patrones de estabilidad de la proteína hDlg. Sin embargo como los niveles de estas CDKs no fueron evaluados, y dado que el anticuerpo empleado en este trabajo no nos permite identificar el estado de fosforilación de hDlg nos es imposible afirmar lo anterior.

En este trabajo, encontramos niveles muy bajos de expresión de hDlg en la membrana y una localización preferentemente citoplásmica. La ausencia de hDlg en la membrana de los casos de CaCU es congruente con lo reportado, sin embargo, los bajos niveles de

expresión de hDlg en la membrana de las muestras premalignas se podría deber a que estas en su mayoría corresponden a NIC III y cáncer *in situ*.

Los reportes sobre los niveles de expresión de la proteína p53 en el epitelio cervical son controversiales, ya que, algunos autores reportan aumento en la expresión de esta proteína en diversos tumores (51, 52, 53, 54). Sin embargo, dado el mecanismo carcinogénico de los VPH- AR, en el cual la oncoproteína E6, es capaz de mediar la degradación de p53, no se esperarían muchos casos positivos a esta proteína en epitelios con presencia del virus, aunado a la corta vida media de p53 (29).

En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la expresión de la proteína p53 entre las lesiones premalignas y malignas. Una vez más el hecho de no encontrar diferencias entre los grupos se puede deber a las características mismas de la población en donde las lesiones premalignas ya eran muy avanzadas, así mismo, se determinaron un elevado número de casos positivos a este supresor tumoral (más de la mitad de los casos en ambos grupos), lo que puede ser explicado por la capacidad de E6, de los VPH-AR, de unirse a p53 a través de dos sitios diferentes : uno que regula su degradación mediada por E6-AP; y otros sitio el cual no esta involucrado con su capacidad para degradar a p53, sino que podría estar evitando la salida de p53 al citoplasma y favoreciendo su acumulación en el núcleo (48, 81).

Finalmente las mutaciones de esta proteína, pueden aumentar su expresión, pero numerosos estudios concluyen que las mutaciones de p53 en el cáncer cervical son muy bajas, menos del 10% (50). El anticuerpo empleado en este trabajo era capaz de detectar a la proteína p53 silvestre, pero no a sus mutantes. Sin embargo, podemos deducir que el aumento en la expresión de esta proteína en el área tumoral esta relacionada con mutaciones, tal como es propuesto por Chaegh & Looi en 2002 (83), donde concluyen que la presencia de p53 en más del 75% del tejido tumoral, se debe a mutaciones. Con este criterio el porcentaje de mutaciones en nuestras muestras, es muy bajo, menor al 3%.



Por último la expresión de la proteína p53, se ha ubicado en el núcleo celular (51, 52, 53), no obstante un estudio reciente reportó que ante una infección por VPH de bajo riesgo (Tipos 6/11), la proteína p53 se localiza en el citoplasma celular (81). En nuestro caso, la totalidad de las muestras en ambos grupos, se encontró a p53 en el núcleo celular. La ausencia de esta proteína en el citoplasma, se puede deber a que tuvimos muy pocos casos de VPH de bajo riesgo.

Con respecto al análisis que se realizó entre los tipos histológicos de CaCU (adenocarcinomas y escamosos), no se logró encontrar cambio significativo en la expresión de ninguna de las tres proteínas. Sin embargo, existe una marcada tendencia a la reducción de las tres proteínas en los casos de adenocarcinomas, por lo que esta reducción en los niveles de expresión de estas proteínas puede estar relacionada con la patología glandular, la cual es más agresiva y de peor pronóstico clínico. Cabe mencionar que la incidencia de adenocarcinomas es alrededor del 2% al 8% del total de los casos de CaCU (20,21), por lo que la incidencia de este tipo histológico en nuestra población (9.45%) correlaciona con lo reportado en la literatura.

En este trabajo, se encontró una expresión diferencial de las proteínas supresoras de tumores PTEN y hDlg entre las lesiones premalignas y las invasoras, lo que nos permite postular la importancia de estas proteínas en la progresión tumoral.

## CONCLUSIONES

- La expresión de la proteína PTEN es menor en las lesiones malignas con respecto a las lesiones premalignas. Su localización en lesiones premalignas es significativamente nuclear, mientras que en las lesiones invariás se distribuye tanto en el núcleo como en el citoplasma.
- hDlg aumenta su expresión en las lesiones malignas con respecto a las lesiones precursoras y se pierde de la membrana celular para acumularse en el citoplasma.
- Los niveles de p53 no presentaron cambios significativos entre las lesiones precursoras e invasoras. Esta se ubica en núcleo.
- La expresión de las proteínas PTEN y hDlg podrían ser un marcadores de progresión tumoral.



## BIBLIOGRAFIA

1. Ferbeyre BL, Salinas GJ. 2005. Bases genéticas y moleculares del cáncer/ 1ª parte. *Gamo*.**4**(2):32-39
2. Instituto Nacional del Cáncer <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
3. Organización Mundial de la Salud <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
4. Lazcano-Ponce EC, Rojas-Martínez R, López-Acuña MP, López-Carrillo L, Hernández-Avila M.1993. Factores de Riesgo Reproductivo y Cáncer Cérvico-uterino en la Ciudad de México. *Salud Pública Mex*.**35** (1):65-73.
5. Seminario el Ejercicio Actual de la Medicina: Cáncer Cérvico Uterino. [en línea].Disponible en [http://www.facmed.unam.mx/eventos/seam2k1/2007/sep\\_01\\_ponencia.html](http://www.facmed.unam.mx/eventos/seam2k1/2007/sep_01_ponencia.html)
6. Sellors JW, Sankaranarayanan R. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical. Manual para principiantes. Lyon 2003/4 [en línea]. Disponible en <http://screening.iarc.fr/colpoforeword.php?lang=3>
7. Healthline <http://www.healthline.com/adamimage?contentId=1-002317&id=19263>
8. Junqueira, Carneiro. Histología básica Texto y atlas, Barcelona: Masson, 2004, p. 59-82.
9. Lin HT, Steller MA, Aish L, Hanada T, Chishti H. 2004. Differential expression of human Dlg in cervical intraepithelial neoplasias. *Gynecologic Oncology*. **93**:422-428.
10. Erazo DJ. Manual de Patología Cervical. Universidad del CAUCA. Colombia, 78 pp.
11. Mukonoweshuro P, Oriowolo A, Smith M. 2005. Audit of the histological definition of cervical transformation zone. *Clin. Pathol*. **58**(6):671.
12. Cáncer Humano <http://www.cancerhumano.com/archivo/aspectos-generales-y-clasificacion-de-neoplasia-cervical-intraepitelial>
13. Parraguirre MS, De Larios NM, Martínez MJJ. 2001. Correlación citológica e histológica de la neoplasia intraepitelial cervical temprana. Tres años de revisión

- en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González*. **4**(1-2):39-45.
14. Manual Practico para la detección visual de las neoplasias cervicales. Ed. R. Sankaranarayanan and Ramani S. Wesley 2004
  15. Patología del Cuello Uterino  
[http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/tercero/AnatomiaPatologica/Imagenes\\_AP/patologia1028-1036.html](http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/tercero/AnatomiaPatologica/Imagenes_AP/patologia1028-1036.html)
  16. Giuseppe de Palo W. Patología y tratamiento del tracto genital inferior. 2007. [en línea] Disponible en [http://books.google.com.mx/books?id=OlyaAT11EGYC&pg=PA115&lpg=PA115&dq=carcinoma+queratinizante&source=web&ots=csP7XaxLZJ&sig=vYebiX34wkMDx2do\\_9u2HOr8SZk&hl=es&sa=X&oi=book\\_result&resnum=5&ct=result#PPA115,M1](http://books.google.com.mx/books?id=OlyaAT11EGYC&pg=PA115&lpg=PA115&dq=carcinoma+queratinizante&source=web&ots=csP7XaxLZJ&sig=vYebiX34wkMDx2do_9u2HOr8SZk&hl=es&sa=X&oi=book_result&resnum=5&ct=result#PPA115,M1)
  17. Vera R, Prujá E, Marcos M, Albistur JJ, Tejedor M, Velardi JJ. 2001. Factores pronósticos en los tumores de origen ginecológico. *Anales Sis San Navarra*. **24**:121-132.
  18. Celorio A, Armas A. Fundamentos de ginecología oncológica. 1986. [en línea] Disponible en [http://books.google.com.mx/books?id=FRNFXtgAigC&pg=PA346&lpg=PA346&dq=adenocarcinoma+de+cuello+uterino&source=bl&ots=N\\_zKkl2T5&sig=pvialEQ1itu9brU0waIOm3-Ty08&hl=es&ei=jtfnSbDNDJuyMNPZ8PEF&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1#PPA349,M1](http://books.google.com.mx/books?id=FRNFXtgAigC&pg=PA346&lpg=PA346&dq=adenocarcinoma+de+cuello+uterino&source=bl&ots=N_zKkl2T5&sig=pvialEQ1itu9brU0waIOm3-Ty08&hl=es&ei=jtfnSbDNDJuyMNPZ8PEF&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1#PPA349,M1)
  19. <http://www.womenshealthsection.com/content/print.php3?title=gynpc006&cat=65&lng=spanish>
  20. González Merlo J. Ginecología Oncológica 2b. [en línea]. Disponible en [http://books.google.com.mx/books?id=LZd\\_qoR6bV0C&pg=PA215&lpg=PA215&dq=TUMOR+MESENQUIMAL+DE+CERVIX&source=bl&ots=AT3Opu1ZFY&sig=2kzYh0mOgcDSoxOkztdqd2zUv\\_0&hl=es&ei=Uc3aScKzFYeKtAP9ysTaBg&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1#PPA199,M1](http://books.google.com.mx/books?id=LZd_qoR6bV0C&pg=PA215&lpg=PA215&dq=TUMOR+MESENQUIMAL+DE+CERVIX&source=bl&ots=AT3Opu1ZFY&sig=2kzYh0mOgcDSoxOkztdqd2zUv_0&hl=es&ei=Uc3aScKzFYeKtAP9ysTaBg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1#PPA199,M1)
  21. Lizano M, Berumen J, Guido MC. 1997. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Can Inst*. **89**:1227-1231.
  22. Vargas HV, Acosta AG. 2007. Vacunas para virus del papiloma humano. *Enfermedades del tracto genital inferior*. **1**(1):36-44.
  23. Centro para el Control y Diagnostico de enfermedades <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/cervical/>.

24. Dallred C. 2006. Cervical Cancer Screening in Older Women. *Clinical Journal of Oncology Nursing* .**10**(1): 31-33.
25. Tirado-Gómez LL, Mohar-Betancourt A, López-Cervantes M, García-Carranca A, Franco-Marina F, Borges G. 2005. Factores de Riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud pública de México*. **47**(5):342-350.
26. Longworth M, Laimins L. 2004. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**(2):362-371.
27. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*. **324**:17-27.
28. Organización Panamericana de la Salud. 142ª Sesión del Comité ejecutivo. [en línea] Disponible en: <http://www.paho.org/spanish/gov/ce/ce142-10-s.pdf>.
29. Lizano M, López A. 2006. Cáncer Cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La Historia que no termina. *Cancerología*.**1**:31-55.
30. Berumen-Campos J. 2003. Nuevos Virus del Papiloma Humano descubiertos en México:su asociación a la alta incidencia del cáncer del cérvix. *Gac Med Méx.* **139**(4): S3-S10.
31. De la Cruz E, Mohar A, Garcia-Carranca A, Contreras-Paredes A, Perez-Cárdenas E, Herrera R, Lizano-Soberon M. 2005. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J.Gen.Virol.***86**:2459-2468.
32. Contreras-Paredes A, De la Cruz-Hernández E, Martinez-Ramirez I, Dueñas-Gonzalez A, Lizano M. 2009. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology*.**383**:78-85.
33. De la Cruz E, Mohar A, Lizano M. 2004. Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Rev Oncol.* **6**(5):263-271.
34. Rivera ZR, Delgado DJ, Painel PV, Barrero PR, Larraín HA. 2006. Mecanismos de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol.* **71**(2):135-40.
35. Zheng ZM, Baker CC. 2006. Papillomavirus genome structure,expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* **11**:2286-2302.

36. Calixto LM. Vacunas contra el papilomavirus humano. Especialización en Microbiología Clínica. Bogota, 2005.
37. Zekri AR, Bahnassy AA, Seif-Eldin WM, El-Din HM, Madbouly MS, Zidan AZ, El-Hoshy K, El-Ramyl A, Abdel-Hamid NA. 2005. Role of Human Papilloma Virus (HPV) in Common and Genital Warts and its Relation to P53 Expression. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.* **17**(4): 117-124.
38. The Health Professional's HPV Handbook. 1: Human Papillomavirus and Cervical Cancer. United Kingdom 2004. Ed. Taylor & Francis. 97 pp.
39. zur Hausen H. 2000. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute.* **92**(9): 690-698.
40. Tungteakkun SS, Durkensen-Hughes. 2008. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol.* **153**: 397-408.
41. Okorokov A, Sherman B, Pilsson C, Grinkevich V, Sigmundsson K, Selivanovas G, Milner J, Orlav E. 2006. The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. *The EMBO Journal.* **25**(21): 5191-51200.
42. Levine A, Finlay C, Hinds P. 2004. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell.* **S116**: S67-S69.
43. Guerrero AI, Castilla TF. 2003. Sobre-expresión de la proteína p53 en la displasia cervical estudio inmunohistoquímico en 55 casos del hospital regional de apoyo de ICA. *Acta Cancerológica.* **32**(1):18-21.
44. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. Biología celular y molecular. Médica Panamericana. Estados Unidos 2004. 973 pp.
45. Benchimol S. 2003. p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death and Differentiation.* **8**:149-151.
46. The p53 web site [http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_Pathways.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html)
47. Huibregtse J, Scheffner M, Howley P. 1991. A cellular proteina mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO Journal.* **10**(13):4129-4135.
48. Li X, Coffino P. 1996. High-Risk Papillomavirus E6 Protein Has Two Distinct Binding Sites within p53, of Which Only One Determines Degradation. *J. Virol.* **70**(7):4509-4516.

49. Fan X, Chen J. 2004. Regulation of Cell Cycle Progression and Apoptosis by the Papillomavirus E6 Oncogene. *Eukaryotic Gene Expression*. **14**(3): 183-202.
50. Lu X. 2004. Phenotypic Features with p53 Alterations Related to HPV and Prognostic Evaluation in Cervical Cancer.
51. Jeffers MD, Richmond J, Farquharson M, McNicol AM. 1994. p53 immunoreactivity in cervical intraepithelial neoplasia and non-neoplastic cervical squamous epithelium. *J Clin Pathol*.**47**: 1073-1076
52. Akasofu M, Oda Y. 1995. Immunohistochemical detection of p53 in cervical epithelial lesions with or without infection of human papillomavirus types 16 and 18. *Virchows Archiv*.**425**: 593.602.
53. Troncone G, Martinez JC, Palombini L, De Rosa G, Mugica C, Rodriguez JA, Zeppa P, Di Vizio D, Lucariello A, Piris MA. 1998. Immunohistochemical expresión of mdm2 and p21<sup>WAF1</sup> in invasive cervical cancer: correlation with p53 protein and high risk HPV infection. *J Clin Pathol*. **51**: 754-760.
54. Bahnassy AA, Zekri AR, Mohammed LM, Moneir M, Shawki O. 2007. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clinical Pathology*.**7**:4
55. Morais CJ, Petosa C, Sutcliffe MJ, Raza S, Byron O, Poy F, Marfatia SM, Chishti AH, Liddington RC. 1996. Crystal structure of a PDZ domain. *Nature*. **382**: 649-652.
56. Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaic V, Massimi P, Nagasaka K, Kranjec C, Gammoh N, Banks L. 2008. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*.**27**:718.730.
57. Jiménez García L, Merchant Larios H. Biología celular y molecular. 2002 [en línea] Disponible en [http://books.google.com.mx/books?id=sDQYRWEhVroC&pg=PA243&lpg=PA243&dq=proteinas+maguk&source=bl&ots=79K6BsRhbl&sig=N4MB3XFwCHTatFTrWl2xNBkm4Qs&hl=es&ei=Ir46Sp6tOY2gsgONv43oCg&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1](http://books.google.com.mx/books?id=sDQYRWEhVroC&pg=PA243&lpg=PA243&dq=proteinas+maguk&source=bl&ots=79K6BsRhbl&sig=N4MB3XFwCHTatFTrWl2xNBkm4Qs&hl=es&ei=Ir46Sp6tOY2gsgONv43oCg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1)
58. Humbert PO, grzeschik NA, Brumby AM, Galea R, Elsum I, Richardson HE. 2008. Control of tumorigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene*. **27**: 6888-6907.
59. Handa K, Yugawa T, Narisawa-Saito, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. 2007. E6AP-Dependent Degradation of DLG4/PSD95 by High-Risk Human Papillomavirus Type 18 E6 Protein. *J. Virol*. **81**(3): 1379-1389.



60. Thomas M, Glaunsinger B, Pim D, Javier R, Banks L. 2001. HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific recognition and degradation. *Oncogene*. **20**: 5431-5439.
61. Pim D, Thomas M, Banks L. 2002. Chimaeric HPV E6 proteins allow dissection of the proteolytic pathways regulating different E6 cellular target proteins. *Oncogene*. **21**: 8140-8148.
62. McLaughlin M, Hale R, Ellston D, Gaudet S, Lue R, Viel A. 2001. The Distribution and Function of Alternatively Spliced Insertions in hDlg. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**(8): 6406-6412.
63. Adey N, Huang L, Ormonde P, Baumgard M, Pero R, Byreddy D, Tavtigian S, Barte P. 2000. Threonine Phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ Binding Domain Both Inhibits and Stimulates PDZ Binding. *Cancer Research*. **60**: 35-37.
64. Vazquez F, Grossman S, Takahashi Y, Rokas M, Nakamura N, Sellers W. 2001. Phosphorylation of the PTEN Tail Acts as an Inhibitory Switch by Preventing Its Recruitment into a Protein Complex. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**(52): 48627-48630.
65. Sansal I, Sellers W. 2004. The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway. *Journal of Clinical Oncology*. **22**(14): 2954-2963.
66. Tawfik M, Williams A. 2006. Evaluation of PTEN expression in cervical adenocarcinoma by tissue microarrays. *Int J Gynecol Cancer*. **16**: 1254-1260.
67. Tsung-Hsien S, Jan-Gowth C, Lih-I P, Chih-Peng C, Hsiao-Jui W, Wang N, Chang-Hai T. 2000. Mutation Analysis of the Putative Tumor Suppressor Gene PTEN/MMAC1 in Cervical Cancer. *Gynecologic Oncology*. **76**(2): 193-199.
68. Leslie N, Downes P. 2004. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J*. **382**: 1-11.
69. Stambolic V, Mac Pherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S. 2001. Regulation of PTEN Transcription by p53. *Molecular cell*. **8**: 317-325.
70. Okamura A, Iwata N, Tamekane A, Yukushijin K, Nishikawa S, Hamaguchi M, Fukui C, Yamamoto K, Matsui T. 2005. Casein kinase I $\epsilon$  down-regulates phospho-Akt via PTEN, following genotoxic stress-induced apoptosis in hematopoietic cells. *Life Sciences*. **78**(14): 1624-1629.
71. Técnica Histológica y Hematoxilina y Eosina. Departamento de Zootecnia. Biología Celular. [en línea] Disponible en:

[http://www.emagister.com/uploads\\_user\\_home/Comunidad\\_Emagister\\_7322\\_hema.pdf](http://www.emagister.com/uploads_user_home/Comunidad_Emagister_7322_hema.pdf)

72. García Bermejo M. Técnico especialista en Anatomía Patológica del Servicio Gallego de Salud. 2005 [en línea] Disponible en: [http://books.google.com.mx/books?id=v3WYlx7FCHAC&printsec=frontcover&source=gbs\\_navlinks\\_s#v=onepage&q=&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=v3WYlx7FCHAC&printsec=frontcover&source=gbs_navlinks_s#v=onepage&q=&f=false)
73. Coeficiente de Correlación de Pearson. [en línea] Disponible en: <http://oceanologia.ens.uabc.mx/~chelo/estadistica/doc-pdf/lec-8-2-1.pdf>
74. Woodman C, Collins S, Young L. 2007. The Natural History of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews*. **7**: 11-22.
75. Ault A. 2006. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. **2006**: 1-5.
76. Qi M, Anderson A, Chen D-Z, Sun S, Auburn K. 2006. Indole-3-Carbinol Prevents PTEN Loss in Cervical Cancer In Vivo. *Mol Med*. **11** (1-12): 59-63.
77. Shin J, Duk Choi Y, Hyuk Lee J, Hee Nam J, Choi C, Cheo Lee M, Soo Park C, Seok Kim H, Whan Min K. 2006. Expression of PTEN in the progression of cervical neoplasia and its relation to tumor behavior and angiogenesis in invasive squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*. **93**(3): 233-240
78. Tak-Hong Cheung, Wing-Kit K, So-Fan Yim, Kit-Ying L, Mei-Sze Heung, Chun-Sing Chan, Yu-Kiu A, Kwok-Hung T, Yick-Fu Wong. [./././Documents and Settings/Accenture SC/Desktop/bajo nivel de pten.htm - aff1](#). 2004. Epigenetic and genetic alternation of *PTEN* in cervical neoplasm. *Gynecologic Oncology*. **93** (3): 621-627.
79. Watson R, Rollason T, Gary R, Murray P, Banks L, Roberts S. 2002. Changes in expression of the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein in high-grade premalignant cervical neoplasias. *Carcinogenesis*. **23**(11): 1791-1796.
80. Han-Ting L, Steller M, Aish L, Hanada T, Chisthi A. 2004. Differential expression of human Dlg in cervical intraepithelial neoplasias. *Gynecologic Oncology*. **93**: 422-428.
81. Piestch C, Murphy M. 2008. Low risk HPV-E6 traps p53 in cytoplasm and induces p53-dependent apoptosis. *Cancer Biol Ther*. **7**(12): 1916-1918.

82. Hernandez A, Cespedes G, Trejo E. 2008. Expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en relación con el grado histológico y riesgo de recidivas en meningiomas intracraneanos. *Gac Med Caracas*. **116**(3): 198-211.
83. Cheag L, Lai.Meng L. 2002. p53 immunohistochemical expression: messages in cervical carcinogenesis. *Pathology*. **34**(4): 326-331.
84. Tamguney T, Stokoe D. 2007. New Insights into PTEN. *Journal of Cell Science*. 120: 4071-4079.
85. [Harima Y](#), [Sawada S](#), [Nagata K](#), [Sougawa M](#), [Ostapenko V](#), [Ohnishi T](#). 2001. Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int J Oncol*.**18**(3): 493-497.
86. Trotman L, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H, Pavletich N, Carver B, Cordon-Cardo C, Erdjument-Bromage, Tempst P, Sung-Gil C, Hyo-Jong K, Misteli T, Jiang X, Pandolfil P. 2007. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell*.**128** (1): 141-156.