



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Estudio de la expresión de p16^{INK4a} y Ki-67 en tejido
de Ectopía Cervical infectado por Virus del
Papiloma Humano.**

T E S I S

Que para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Nelly Gabriela Vázquez Burgos

Directora: Doctora Leticia Rocha Zavaleta

Asesora: Doctora Martha Legorreta Herrera





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.

***“Ver el mundo, enfrentar peligros, traspasar muros, acercarse a los demás,
encontrarse y sentir. Ése es el propósito de la vida”***

La vida secreta de Walter Mitty, Dir. Ben Stiller, 20th Century Fox Red House
Entertainment Truenorth Productions, 2013.

Agradecimientos técnicos

Se agradece a la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías por el apoyo técnico brindado para la realización de esta tesis. El presente proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave IN209613) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Ciencia Básica. Clave 152492).

Agradecimientos personales

A toda mi familia y amigos, los cuales sería difícil mencionar a cada uno.

A mis padres **Guadalupe** y **José Luis** y hermanos que con sus consejos, regaños, bromas y demás, me han ayudado a encauzar mi camino y no dejarme vencer fácilmente, especialmente a **Santos**, que ha sido un ejemplo para mí y a **Wicho**, que probando más de una vez mi paciencia, me ha enseñado que no necesariamente ésta debe de tener límite.

A mis tí@s y prim@s:

Tía Blanquis, Nacho, Maiky, Yariz, Frany y John, gracias por todo su apoyo, las palabras de aliento, los consejos y por creer en mí. También por todos esos momentos que compartimos, en los cuales reíamos como locos y nos la pasábamos ¡súper!

Guague, tía Yuya y **tía Alma** que fueron un apoyo emocional y también estuvieron ahí siempre pendientes de mí y preocupándose por mi bienestar, muchas gracias.

A mis amigos:

Anita, de verdad muchas gracias por todo el tiempo compartido, desde el inicio de la carrera hasta ahora, siempre ayudándome en mis tropiezos y en los exámenes... ¡jeje! **Ale y Jacobo**, también gracias por la ayuda en esos momentos de desesperación, en los que no lograba ver el camino y en las varias fallidas invitaciones a fiestas (Ale) ¡jeje!, igualmente **Vik, Mike y Ro**, por recordarme lo importante de dar este gran paso.

Idalia y Helena, por su apoyo en laboratorio y sobre todo su amistad, sus locuras y las risas que compartimos.

Dra. Argentina y Dra. Leti de S.O.S., por su consejo y ayuda en esos momentos más difíciles por los que he pasado, por estar siempre dispuestas a escucharme y enseñarme que si hay algo más allá del límite de lo que podía ver, ¡muchas gracias!

A **Peter** por enseñarme la sencillez con la que se puede vivir y la facilidad de hacer lo que se quiere con el simple acto de tomar una decisión, sin dejar que el miedo te lo impida; por ayudarme a romper mis límites y por confiar y creer en mí.

A **Ceci, Dra. Rocha, profesora Mercedes, Dra. Legorreta, Dra. Retana y Dra. Soto** por su apoyo, tiempo y paciencia.

Y finalmente a todos aquellos que ya no están pero que compartieron conmigo parte de este camino, siempre dándome ánimo y creyendo en mí, incluso cuando yo misma dejé de hacerlo.

**“La tinta no secó y en palabras dije muchas cosas, pero en mi corazón
todavía queda tanto por decir, no me voy...me quedo aquí”**

Gustavo Adrián Cerati Clark

ÍNDICE

	Página
I. Introducción	10
II. Marco Teórico	12
○ Ectopía Cervical	11
○ Virus del papiloma humano (VPH)	13
▪ Definición y características principales	13
▪ Clasificación	14
▪ Estructura	15
▪ Ciclo de vida	17
○ Ciclo celular y proteínas p16 ^{INK4a} y Ki-67	28
III. Planteamiento del problema	33
IV. Hipótesis	34
V. Objetivos	35
○ Objetivo General	35
○ Objetivos Específicos	35
VI. Diseño Experimental	36
○ Tipo de estudio	36
○ Población de estudio	36
○ Criterios de inclusión	37
○ Criterios de exclusión	37
○ Criterios de eliminación	37
○ Variable	37
○ Procesamiento de las muestras	38
○ Extracción de ácidos nucleicos	39

○ Cuantificación de ácidos nucleicos	40
○ Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	41
▪ Integridad de ADN	41
▪ Determinación de la presencia de virus del papiloma humano (VPH)	42
▪ Identificación de Virus de Papiloma Humano tipo 18	43
▪ Identificación de Virus de Papiloma Humano tipo 16	45
○ Análisis Inmunocitoquímico de citologías exfoliativas	47
▪ Preparación de los frotis	47
▪ Tinción Inmunocitoquímica	47
▪ Contratación	49
▪ Montaje	50
○ Diseño Estadístico	50
VII. Resultados	51
○ Integridad del ADN en las muestras	51
○ Presencia del virus del papiloma humano (VPH)	51
○ Identificación del tipo viral 16 y 18 del virus del papiloma humano (VPH)	53
○ Estudio de la expresión de las proteínas celulares p16 ^{INK4a} y Ki-67 mediante tinción inmunocitoquímica con el kit de tinción CINtec Plus®	57
○ Análisis estadístico	61
VIII. Discusión	65
IX. Conclusiones	71
X. Referencias	73

Índice de Cuadros

		Página
Cuadro 1	Principales proteínas ciclinas y proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) en vertebrados y su función.	28
Cuadro 2	Concentraciones de los reactivos en la técnica de PCR de β -globina.	41
Cuadro 3	Concentraciones de los reactivos en la técnica de PCR de VPH general.	42
Cuadro 4	Concentraciones de los reactivos en la técnica de PCR de VPH tipo 18 gen E7.	44
Cuadro 5	Pares de oligonucleótidos que se usaron para amplificación de los genes LCR y E6 del VPH tipo 18.	44
Cuadro 6	Concentraciones de los reactivos en la técnica de PCR de VPH tipo 18 genes LCR y E6.	45
Cuadro 7	Concentraciones de los reactivos en la técnica de PCR de VPH tipo 16 gen E7.	46
Cuadro 8	Presencia de ADN de virus del papiloma humano tipo 6, 11, 16, 18 ó 33, en muestras de ectopía cervical.	52
Cuadro 9	Identificación del tipo viral en las muestras fuertemente positivas a la presencia de ADN de algún tipo viral del VPH.	55
Cuadro 10	Resultados de la tinción inmunocitoquímica con el kit de tinción CINtec Plus®.	58

Índice de Figuras

		Página
Figura 1	Anatomía del útero y ectopía cervical.	12
Figura 2	Imagen de microscopía electrónica a color del virus del papiloma humano.	14
Figura 3	El genoma del VPH tipo 16.	17
Figura 4	Acontecimientos principales que se producen después de la infección por VPH.	18
Figura 5	Progresión a cáncer cervical mediado por infección por VPH.	26
Figura 6	Bases moleculares de la expresión de los marcadores de ciclo celular.	30
Figura 7	Determinación de los tipos 6, 11, 16, 18 y 33 de virus del papiloma humano en gel de agarosa [1%].	52
Figura 8	Identificación del gen E7 del VPH tipo 18 en gel de agarosa [1%].	53
Figura 9	Identificación de la región larga de control (LCR) del VPH tipo 18 en gel de agarosa [1%].	54
Figura 10	Identificación del gen E6 del VPH tipo 18 en gel de agarosa [1%].	54
Figura 11	Identificación del gen E7 del VPH tipo 16 en gel de agarosa [1%].	55
Figura 12	Gráfica porcentual de la identificación de los tipos virales del Virus de Papiloma Humano en muestras de ectopía cervical.	56
Figura 13	Tinción inmunocitoquímica de la muestra EX64, del Grupo A, con el kit CINtec Plus®.	58
Figura 14	Tinción inmunocitoquímica de la muestra EP160, del Grupo B, con el kit CINtec Plus®.	59
Figura 15	Tinción inmunocitoquímica de la muestra EP123, del Grupo C, con el kit CINtec Plus®.	60
Figura 16	Tinción inmunocitoquímica de la muestra EP201, del Grupo D, con el kit CINtec Plus®.	61
Figura 17	Resultados de la tinción inmunocitoquímica con el Kit de tinción CINtec Plus® entre el control (Grupo A) y las muestras positivas al tipo VPH 6, 11 y/o 33 (Grupo B).	62
Figura 18	Resultados de la tinción inmunocitoquímica con el Kit de tinción CINtec Plus® entre el control (Grupo A) y las muestras positivas al tipo VPH 16 (Grupo C).	63

Figura 19 Resultados de la tinción inmunocitoquímica con el Kit de tinción CINtec Plus® entre el control (Grupo A) y las muestras positivas al tipo VPH 18 (Grupo D).

64

I. Introducción.

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de mortalidad en mujeres en México, el virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor para su desarrollo.

Junto con otros patógenos infectan una zona propensa del cuello uterino llamada ectopía cervical que consiste en la extensión del epitelio glandular del ectocérvix hacia el ambiente vaginal del exocérvix, donde predomina el epitelio escamoso. Es un fenómeno benigno del útero que se produce durante la adolescencia y el primer embarazo y que está relacionado con el uso frecuente de anticonceptivos orales (Andersson S, 2001).

Anteriores trabajos de nuestro grupo (Monroy, 2010; Rocha-Zavaleta L, 2004) han detectado alta prevalencia de infección por VPH en pacientes con ectopía cervical, por lo que se considera como un factor de riesgo en la adquisición de infección por algún tipo de VPH de alto riesgo, especialmente del VPH tipo 18 y VPH tipo 16. A partir de esto surge la necesidad de aclarar el riesgo que establece la presencia del virus en este tejido y su potencial en la transformación maligna de las células.

El trabajo actual se enfoca en determinar el potencial oncogénico del virus del papiloma humano de alto riesgo, tipo 18 y tipo 16, en muestras celulares de ectopía cervical mediante el estudio de la expresión de proteínas específicas del ciclo celular: p16^{INK4a} y Ki-67.

La alteración en la vía de la proteína del retinoblastoma (pRb), por la presencia de la oncoproteína viral E7, se manifiesta con la sobreexpresión de la proteína

p16^{INK4a} en un intento fallido por regular negativamente el ciclo celular para detenerlo. Mientras que la expresión de la proteína Ki-67 es un marcador confiable de progresión en el ciclo celular, ya que se identifica en todas las etapas del ciclo celular, con excepción de la fase de inactividad celular G₀ (Gerdes J, et al, 1984).

Ambas proteínas expresadas en conjunto dentro de la misma célula, indican el descontrol celular así como una progresión activa en el ciclo celular, lo que se puede traducir como la existencia de un proceso oncogénico ya que existe una fuerte asociación de estas proteínas con los tipos VPH de alto riesgo (Donà MG, 2012).

Esto hace notar que las pacientes que presentan ectopía cervical, pueden presentar mayor riesgo para desarrollar cáncer cervicouterino, en comparación con aquellas que no la presentan, por lo que es aconsejable un tratamiento oportuno y el seguimiento clínico.

II. Marco Teórico

Ectopía Cervical.

Durante la menarca y el embarazo, el cuerpo del útero así como el cuello uterino se agrandan influenciados por la acción hormonal. Esto provoca alteraciones en su forma como la **ectopía cervical**, un fenómeno natural en el cuello uterino de la mujer, en el cual, el epitelio columnar del canal endocervical o endocérvix (formado por una hilera de células columnares) se evierte o sale hacia el orificio exterior, en la porción vaginal o exocérvix donde predomina el epitelio escamoso (formado por varias capas de células escamosas), (figura 1).

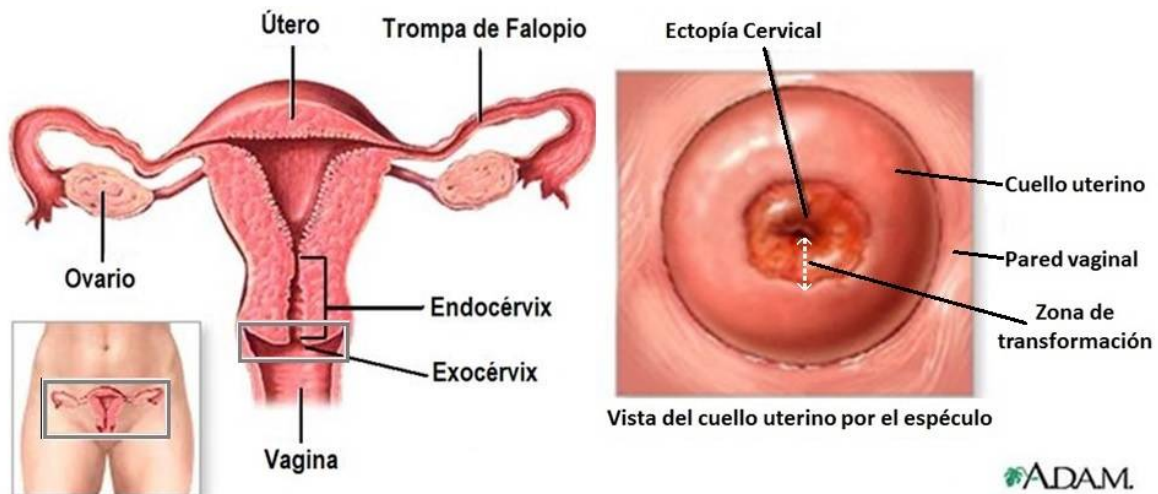


Figura 1. Anatomía del Útero y ectopía cervical. Modificado de www.prevencioncancer.org.ar

Esta exposición del epitelio columnar al ambiente ácido vaginal promueve una destrucción y final reemplazo del epitelio columnar ectópico por epitelio escamoso metaplásico, en un área conocida como **zona de transformación**. Esta zona es propensa a infecciones, especialmente de tipo viral como el virus del papiloma

humano, ya que representa un acceso fácil a la capa más interna del epitelio escamoso, donde el virus puede comenzar la infección (Tatti, 2008).

Virus del papiloma humano (VPH).

Definición y características principales.

Los virus del papiloma humano son un grupo de virus con ADN pequeños, no envueltos, pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*, inducen verrugas (o papilomas) en gran variedad de grandes vertebrados, incluyendo al hombre (figura 2). El virus del papiloma humano (VPH) se ha estudiado extensamente por su importancia médica como factor principal en el desarrollo de cáncer cervical (zur Hausen, 2006; zur Hausen, 1996).

En general, son virus altamente específicos de la especie ya que no hay evidencia de que algún tipo de virus cause infección en otra especie diferente de la que proviene, además de que poseen especificidad por las células del epitelio escamoso, como las que se encuentran en la orofaringe, esófago o **tracto genital** (Fields, et al, 1996) donde pueden causar una variedad de lesiones epiteliales incluyendo verrugas comunes, papilomas faríngeos y condilomas, según el tipo de VPH que cause la infección (Doorbar, 2007).

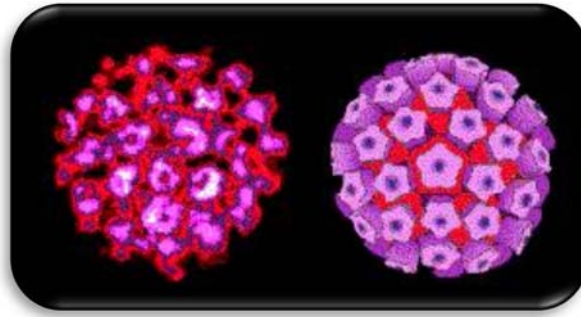


Figura 2. Imagen de microscopía electrónica a color del virus del papiloma humano.web.uct.ac.za

La forma de transmisión en el caso de las lesiones cutáneas, es por contacto directo con un individuo infectado o una superficie contaminada, mientras que para las **lesiones en las mucosas** es por **contacto sexual**. El epitelio del tracto genital masculino (pene y uretra) funciona como reservorio para este virus, lo que le proporciona el medio adecuado para su transmisión (Achenson, 2007).

Clasificación.

De los grupos que conforman a los VPH, el de mayor importancia es el grupo alfa (α) ya que incluye a las especies que infectan el tracto anogenital, el tracto aerodigestivo superior y otras mucosas de cabeza y cuello. Ha tenido prioridad en investigación y en atención clínica porque puede transmitirse sexualmente y causar enfermedades significativas (Chow L, 2010).

A su vez, los miembros de este grupo, se dividen en **tipos virales debajo riesgo** (no oncogénicos), como VPH6 y VPH11 raramente encontrados en cáncer genital pero asociados con cáncer pulmonar en una pequeña fracción de pacientes con

Papilomatosis Respiratoria Recurrente (RRP) (Gerein, 2005), y en **tipos virales de alto riesgo** (oncogénicos), como VPH16, VPH18, VPH51 y VPH53. Un pequeño grupo de lesiones inducidas por estos tipos pueden progresar a displasias de alto grado y más notablemente a cáncer cervical, vaginal, de pene, anal y orofaríngeo (zurHausen, 2002).

Estructura

Los virus del papiloma humano consisten en un genoma circular de doble cadena, de aproximadamente 8000 pares de bases (pb) de longitud, contenido dentro de un caparazón icosaédrico de proteínas, llamado cápside viral, la cual está formada por 72 capsómeros que consisten en dos proteínas estructurales tardías (late): **L1** con un peso molecular de aproximadamente 55Kd, es la mayoritaria (Fields, et al, 1996) y la minoritaria, **L2** que tiene un peso molecular de 70Kd (Fields, et al, 1996).

El genoma viral tiene la capacidad codificante para estas dos proteínas estructurales tardías (late) y al menos seis proteínas tempranas (early): **E1, E2, E4, E5, E6 y E7**, codificadas por genes con los mismos nombres y que son necesarias para la replicación viral del ADN y para el ensamblaje de nuevas partículas virales dentro de las células infectadas (figura 3).

Estos conjuntos de genes están separados por una **Región Larga de Control (LCR)** no codificante de proteínas, pero que contiene elementos requeridos para la

regulación de la expresión génica, replicación del genoma y su empaquetamiento en partículas virales. (Muñoz, 2006).

Los dos promotores principales que usan los virus del papiloma humano son:

- Promotor Temprano, localizado río arriba del gen E6, es activo en células basales no diferenciadas.
- Promotor Tardío, localizado río arriba del gen E1, es activo en queratinocitos diferenciados. Muchos de estos transcritos se poliadenilan en el sitio de poliadenilación temprana, aumentando el número de ARNs mensajeros que expresan la proteína E1 y E2. El incremento en estas proteínas contribuye en llevar a cabo la replicación vegetativa del ADN, durante el cual, se sintetizan varios miles de moléculas de ADN por célula (Doorbar, 2007).

Una característica importante sobre la organización genómica de los virus del papiloma humano, es que todos los marcos abiertos de lectura (ORF's) se localizan solamente en una de las hebras del ADN viral. Lo cual indica que todos los genes están localizados en esa misma cadena, lo que hace de ésta la hebra molde para la transcripción viral (Fields, et al, 1996).

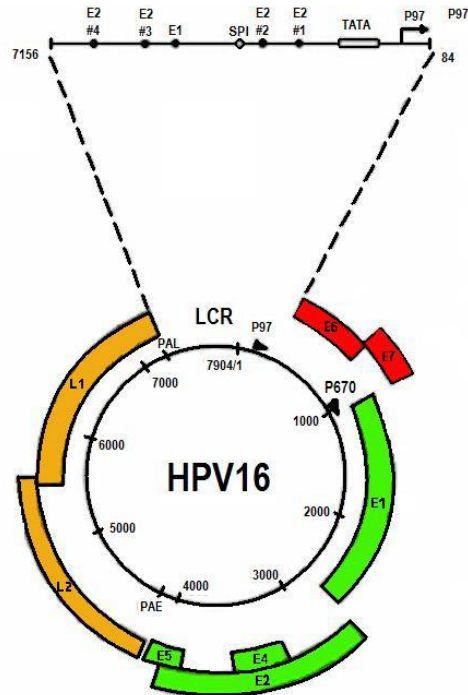


Figura 3 El genoma del VPH tipo 16. El genoma (7904pb) se muestra como un círculo negro con los promotores tempranos (p97) y tardíos (p670) marcados por flechas. Los seis ORFs tempranos E1, E2, E4 y E5 (verde), E6 y E7 (rojo), se expresan ya sea de p97 o p670 en diferentes etapas durante la diferenciación celular. Los ORFs tardíos L1 y L2 (amarillo) son también expresados desde p670 siguiendo un cambio en el patrón de empalme y un desplazamiento en el sitio de poliadenilación usado (desde el sitio de poliadenilación temprano (PAE) al tardío (PAL)). Todos los genes virales se codifican solamente de una de las dos cadenas del ADN circular. La región Larga de Control (LCR, 7156-7184) se amplificó para la visualización de los sitios de unión de E2 y los elementos TATA del promotor p97. También se muestra la localización de los sitios de unión de E1 y SP1. Modificado de Doorbar, 2006.

Ciclo de Vida.

Todos los virus del papiloma humano deben completar su ciclo de vida en el **tejido epitelial escamoso** que infectan, para producir partículas infecciosas que eventualmente se secretarán desde la superficie epitelial. Esto requiere una expresión ordenada y coordinada de los diferentes productos génicos virales, así como de la dinámica celular de este epitelio (figura 4). Este patrón altamente regulado de expresión génica permite que las diferentes etapas del ciclo de vida

del virus se completan apropiadamente y proporcionen bases para la selección de biomarcadores que son muy útiles en el diagnóstico (Doorbar, 2007), ya que cada estrato presenta funciones especializadas como consecuencia del encendido y apagado de diferentes conjuntos de genes (Chow L, 2010).

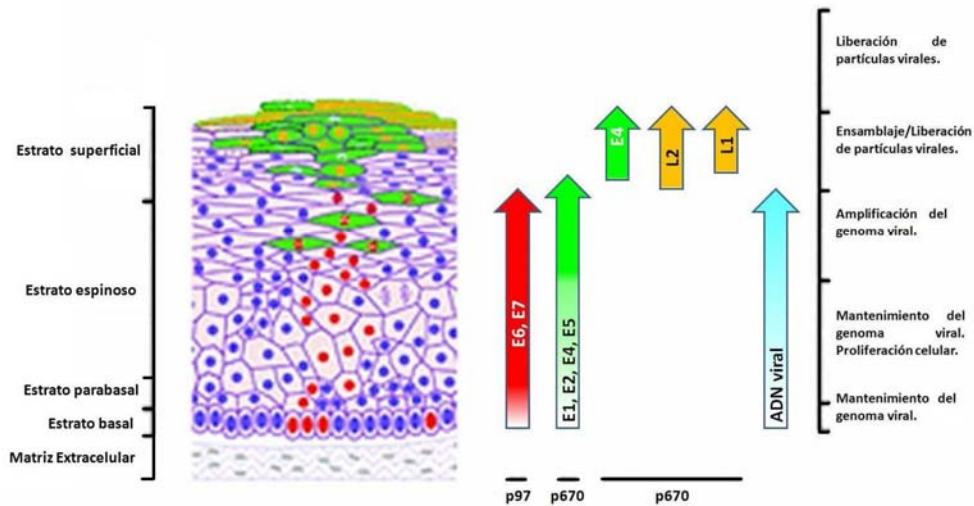


Figura 4. Acontecimientos principales que se producen después de la infección por VPH. La epidermis se muestra a color mientras que la matriz extracelular subyacente se muestra en gris. Las diferentes capas celulares se indican en la izquierda. Las células que expresan marcadores del ciclo celular se muestran con núcleos rojos. La aparición de estas células por encima de la capa basal es una consecuencia de la infección viral y, particularmente de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7. La expresión de las proteínas virales necesarias para la replicación del genoma, se produce en células que expresan E6 y E7 tras la activación de p670 en las capas epiteliales más superiores (células verdes con núcleos rojos). Los genes L1 y L2 (amarillo) se expresan en un subconjunto de células en el epitelio superior, y que contienen ADN viral amplificado. Modificado de Doorbar 2006.

La **infección productiva** está conformada por varias etapas, en las que las diferentes proteínas virales tienen funciones específicas, como recepción, internalización, desensamblaje de la cápside viral, replicación, proliferación, amplificación, ensamblaje y liberación.

Comienza con las partículas virales que se introducen a las células mitóticamente activas de la capa basal, mediante microlesiones en el epitelio estratificado o a través de la **zona de transformación** donde las células infectadas del epitelio columnar formarán la capa basal del epitelio metaplásico estratificado una vez que la **ectopía cervical** ha sanado (Noya, 2001).

Los factores que están involucrados en la **recepción** de las partículas virales sobre la superficie celular, son **laminina-5**, **α -6 integrina** y **sindecano-1** (Shafti-Keramat, 2003; Abban, 2010; Evander, 1997; Culp, 2006), este último es un proteoglicano de heparan sulfato que actúa como receptor primario para el VPH (Patterson, 2005; Shafti-Keramat, 2003; Joyce, 1999) y junto con la laminina-5 contribuyen con la unión de la cápside viral en la matriz extracelular, mientras que la integrina α -6 funciona como receptor específico en los queratinocitos (Enader, 1997).

La **internalización** de los viriones unidos es un proceso lento, con una duración media de 2-4 horas, a través de **endocitosis mediada por clatrin** (Culp, 2004; Day, 2003) **y/o caveolinas**, según el tipo de VPH que se trate.

El siguiente paso es el **desensamblaje de la cápside viral** (desenvoltura del genoma viral), que ocurre de 8-12 horas después de la recepción de los viriones en la superficie celular. Una vez que el genoma viral escapa del endosoma tardío, el transporte citoplasmático a lo largo de los microtúbulos está mediado por una proteína motora llamada dineína y la proteína viral L2 (Florin, 2006) que lo dirigen hacia el núcleo, en el cual entra al momento en el que la membrana nuclear se

rompe durante la mitosis (Darshan, 2004). Esto ocurre aproximadamente 24 horas después de la unión del virus a la célula. Una vez dentro del núcleo, el complejo formado por el genoma viral y L2 se localiza en distintos dominios nucleares designados cuerpos ND10 o dominios oncogénicos de leucemia promielocítica (PML) (Day, 2004).

La **replicación** del DNA viral en las células depende de la maquinaria de replicación celular, cuando éstas replican su propio ADN al progresar a través de la fase S en el ciclo celular. Las únicas proteínas virales necesarias son **E1**, una helicasa replicativa de ADN, su función es unir proteínas necesarias para la replicación como la proteína A y ADN polimerasa α primasa (Loo, 2004; Masterson, 1998; Conger, 1999) y **E2**, una proteína dimérica que tiene varias funciones como: reconocer el origen de replicación (ori) (Stenlund, 2003) para que, al reclutar a E1, de comienzo la replicación y contribuir en la correcta segregación de los episomas virales (You, 2004).

E1 y E2, además de inducir la replicación del ADN viral, también actúan como reguladores de los promotores virales tempranos en cánceres asociados con VPH, ya que el origen de replicación se traslapa con el promotor p97 (en VPH16) que controla la expresión de los oncogenes virales E6 y E7. La habilidad de E2 para reprimir o activar la expresión de genes virales tempranos, de acuerdo con su abundancia, es el resultado de diferente afinidad de E2 por varios sitios de unión (Hines, 1998).

Es así que el genoma viral se replica en promedio una vez por ciclo celular, cada vez las células basales se dividen y el genoma viral se distribuye en partes iguales entre las células hijas, permitiendo una fase inicial de replicación que resulta en 50-100 copias de ADN viral, por célula. Este tipo de replicación se conoce como “replicación plasmídica” (Achenson, 2007) y propicia una infección exitosa permitiendo el establecimiento del genoma viral en forma de episomas estables que se mantienen en un número bajo de copias y sin que éstos se integren a los cromosomas celulares del huésped (Doorbar, 2005).

En las lesiones cervicales causadas por VPH, la **proliferación** de las células del epitelio suprabasal se atribuye a la expresión de las proteínas formadas a partir de los oncogenes virales **E6** y **E7** (ambas expresadas del mismo ARN mensajero bicistrónico), que inducen la entrada en la fase S del ciclo celular, mientras que **E1** y **E2** replican los episomas virales, lo que permite el aumento del pequeño número de células infectadas, las cuales subsecuentemente producirán viriones infecciosos (Doorbar, 2006).

La principal función de la proteína viral **E7** es inducir la síntesis no programada del ADN en queratinocitos completamente diferenciados, mediante la unión con el mayor regulador del ciclo celular: la **proteína del retinoblastoma (pRb)**, una proteína supresora de tumores que a través de la activación de varias proteínas celulares involucradas en la proliferación celular tales como **E2F**, **Ciclina A**, **Ciclina E**, **Ki67**, un antígeno nuclear de proliferación celular **yp16** una proteína supresora de tumores, entre otras, permite la progresión en el ciclo celular de la

fase G₁ a la fase S en células por encima de la capa basal(Doorbar, 2006). Este proceso se mencionará detalladamente más adelante.

Una de las funciones de la proteína viral **E6** es complementar la acción de la proteína viral **E7**, mediante la asociación y dirección de la degradación de **p53**, la principal proteína supresora de tumores. p53 monitorea y protege la integridad del genoma celular, induciendo la expresión de genes que detienen el ciclo celular, reparan el ADN, o alternativamente provocan senescencia o apoptosis en la célula (Massimi, 1999). Normalmente p53 se encuentra presente en bajas concentraciones, en una forma latente e inactiva pero cuando la célula se expone a condiciones de estrés, como una infección viral o daño al material genético, p53 se estabiliza por fosforilación y su nivel se incrementa, lo que induce el arresto del ciclo celular en la fase G₁, lo que proporciona suficiente tiempo para que se repare el ADN o en caso de infección, induce apoptosis en la célula, evitando la dispersión del virus (Doorbar, 2005).

Es así que la proteína viral **E6** ejerce una función antiapoptótica, lo cual, se ejemplifica por la asociación con las proteínas inductoras de apoptosis Bak (Thomas, 1998) y Bax (Li, 2000), lo que compromete la efectividad de la respuesta al daño en el ADN celular y permite la acumulación de mutaciones secundarias. Las proteínas E6 y E7 derivadas de los tipos virales de alto riesgo como VPH16 y VPH18 se unen más fuertemente a PRb que las derivadas de los tipos virales de bajo riesgo VPH6 y VPH11 (Doorbar, 2007).

Para la producción de viriones infecciosos, los virus del papiloma humano deben **amplificar** su genoma viral y empaquetarlo dentro de partículas infecciosas. Esto ocurre en las capas medias o superiores del epitelio y depende en parte de los cambios que experimenta la célula mientras se mueve a la superficie epitelial, así como de la sobre activación del promotor tardío dependiente de diferenciación, el cual reside dentro del marco de lectura (ORF) del gen E7 (p670 en VPH16) (Bodily, 2005; Spink, 2005). El gen E7 promueve el incremento en los niveles de proteínas virales necesarias para la replicación, incluyendo E1, E2, E4 y E5, sin afectar directamente la expresión de las proteínas E6 y E7 (Middlenton, 2003).

E5 es una proteína transmembranal que se localiza predominantemente en el retículo endoplásmico (RE) (Krawczyk, 2010), se puede asociar con protones de la ATPasa vacuolar lo que retrasa el proceso de acidificación endosomal (Disbrow, 2005; Hwang, 1995; Straight, 1995), el cual afecta el reciclaje de los receptores del factor de crecimiento (EGF) en la superficie epitelial. La consecuencia es un incremento en la señal mediada por el receptor EGF, que contribuye, junto con E6 y E7, al mantenimiento del ambiente propicio para la replicación (Crusius, 2000).

El **ensamblaje y la liberación** son los pasos finales en el ciclo productivo de los virus del papiloma humano. Consisten en el empaquetamiento del genoma viral replicado en partículas infecciosas que se liberarán desde la superficie epitelial. Las dos proteínas L1 y L2 se expresan solamente en aquellas células que han amplificado su genoma y presentan altos niveles de la proteína viral **E4** en su citoplasma. La proteína E4 persiste en la superficie epitelial y se cree que tiene una función en la liberación del virus por su asociación con las citoqueratinas

(Doorbar, 1991; Roberts, 1997; Wang, 2004) y con la envoltura córnea (Brown, 2006; Bryan, 2000).

Además de las proteínas virales estructurales L1 y L2, se requiere la proteína E2 para el ensamblaje de las partículas infecciosas. L2 y E2 se localizan en lugares específicos dentro del núcleo, llamados dominios de anemia promielocítica (PML), donde E2 moviliza el genoma replicado a este sitio (Buck, 2004; Day, 1998). Una vez dentro, el ensamblaje viral ocurre cuando los capsómeros de L1 entran recluidos por L2 (Florin, 2002) y se unen por la interacción entre la región C-terminal en los capsómeros. Estas interacciones proteína-proteína se estabilizan en las capas epiteliales superiores por la formación de enlaces disulfuro que contribuyen a la estabilidad de las partículas liberadas (Buck, 2004; Roden, 1997). Aunque las partículas de los virus del papiloma humano se pueden ensamblar en ausencia de L2, el empaquetamiento (Stauffer, 1998) y la infectividad viral (Roden, 2001) son más efectivas en su presencia.

La acumulación en altos niveles de proteínas víricas estructurales se retarda hasta que la célula alcanza las capas epiteliales superficiales para limitar la detección de la respuesta inmune del huésped (Doorbar, 2007).

El curso normal que sigue una infección por VPH consiste en: un período de infección productiva seguido por una etapa de regresión de las lesiones causadas y finalmente la resolución de la infección, lo que demuestra el resultado de la respuesta inmune mediada por células como el mecanismo primario, pero bajo ciertas circunstancias el genoma viral se mantiene como episomas latentes en las

células de la capa basal, que se reactivan cuando se deprime el sistema inmune. Esta infección latente requiere únicamente de la expresión de las proteínas virales E1 y E2 (Zhang, 1999).

Una **infección abortiva** se produce cuando el patrón normal de expresión génica se compromete al no poder llevar a cabo, de forma adecuada, el programa reproductivo del VPH, como en el epitelio columnar que no presenta los niveles de diferenciación característicos del epitelio escamoso. Esto trae como consecuencia el desarrollo de neoplasias cervicales que surgen cuando la infección por VPH no se resuelve adecuadamente, manteniendo una infección persistente por años o incluso décadas después de la infección inicial (Doorbar, 2006).

La continua estimulación en el progreso de la fase S del ciclo celular, junto con la pérdida de mecanismos de reparación del daño al ADN celular, mediados por p53 como resultado de la expresión de E6, permite la acumulación de mutaciones que eventualmente conducirán a cáncer (figura 5).

Estos acontecimientos se favorecen con la integración del ADN viral al genoma celular.

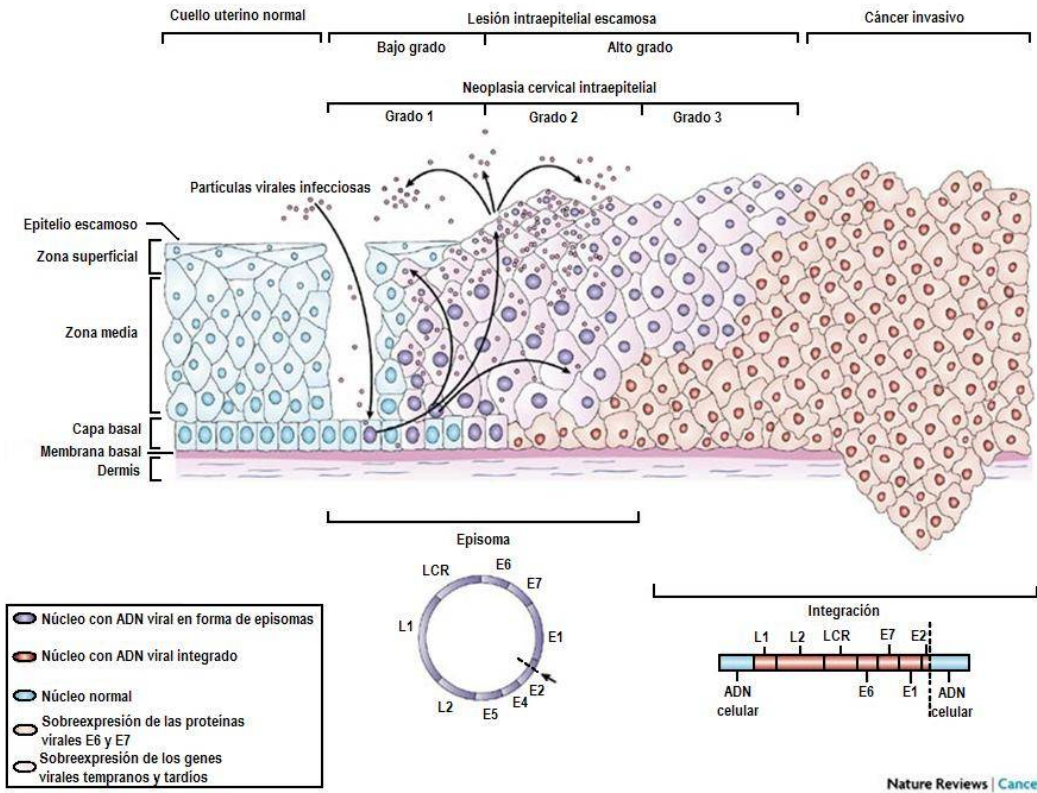


Figura 5. Progresión a Cáncer Cervical mediado por infección por VPH. Las células basales en el epitelio cervical, descansan sobre la membrana basal, cuyo soporte es la dermis. Se cree que el virus del papiloma humano accede a las células basales a través de microlesiones en el epitelio cervical. Después de la infección, los genes virales tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7 se expresan y el ADN viral se replica a partir de ADN episomal (núcleos morados). En las capas superiores del epitelio (zona media y superficial) el genoma viral se replica aún más y los genes tardíos L1 y L2 encapsidan el genoma viral para formar su progenie: viriones en el núcleo. Los virus ya formados se pueden arrojar para iniciar una nueva infección. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado soportan la replicación viral productiva. Un número desconocido de infecciones por VPH de alto riesgo progresan a neoplasia cervical intraepitelial de alto grado (NIC). La progresión de lesiones no tratadas a cáncer microinvasor e invasor, se ha relacionado con la integración del genoma viral en los cromosomas del huésped (núcleos rojos), con la pérdida asociada o la interrupción de E2 y la subsecuente sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7. LCR es la región larga de control. Modificado de Woodman, 2007.

La integración es un evento al azar, no es objetivo del virus inducir la transformación a la malignidad ya que las células transformadas por VPH son incapaces de producir nuevas partículas víricas porque solo contienen una parte de su genoma. Puede ocurrir en cualquier sitio frágil del ADN celular y causa la interrupción de los genes virales E1 y E2, frecuentemente se acompaña por la

deleción de secuencias virales río abajo que abarcan el gen E5 y sitios tempranos de adición de poli-A (Stoler, 1992) lo que resulta en la pérdida de la regulación negativa del promotor P1 que trae como consecuencia la sobre expresión de E6 y E7, que además de ser importantes en la infección productiva, también son cruciales en la progresión a cáncer (Doorbar, 2007).

- La proteína viral E7 de los VPH de alto riesgo media la degradación de Rb a través de mecanismos dependientes de proteosomas (Berezutskaya, 1997; Boyer, 1996) lo cual es importante para la transformación celular mediada por E7.
- La pérdida de la respuesta al daño del ADN celular mediado por p53 en células que expresan la proteína E6 de VPH de alto riesgo, predispone a la acumulación de mutaciones. También la proteína viral E6 de VPH de alto riesgo tiene la capacidad de transactivar la subunidad catalítica del gen de la telomerasa (hTert) (Klingelutz, 1996), así como contribuir al desarrollo de tumores metastásicos por la alteración de la adhesión celular a través del carbono terminal en el dominio de unión a PDZ (acronimo de las primeras tres letras de proteínas en las que se encontró por primera vez: proteína de densidad postsináptica [PSD95], proteína supresora de tumores en *Drosophila* [DlG], y proteína zonula occludens-1 [zo-1]), (Thomas M, 2002).

Ciclo celular y proteínas p16^{INK4a} y Ki-67.

Las proteínas reguladoras que conforman al ciclo celular, son principalmente cinasas dependientes de ciclinas (Cdks), permanecen constantes a lo largo del ciclo celular y únicamente se activan al unirse a las proteínas ciclinas, que al aumentar o disminuir su concentración, inician o regulan los principales eventos en el ciclo celular. Los complejos ciclina-Cdk fosforilan a diferentes conjuntos de proteínas sustrato (cuadro 1).

Cuadro 1. Principales proteínas ciclinas y proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) en vertebrados y su función.

Complejo ciclina-Cdk	Ciclina	Cdk	Función
G ₁ -Cdk	Ciclina D	Cdk4, Cdk6	Ayudar a regular la actividad de la ciclina G ₁ /S.
G ₁ /S-Cdk	Ciclina E	Cdk2	Desencadena la progresión a través del punto de restricción en G ₁ tardío.
S-Cdk	Ciclina A	Cdk2, Cdk1	Estimula la división de cromosomas, contribuye al control de algunos eventos tempranos en la mitosis.
M-Cdk	Ciclina B	Cdk1	Estimula el ingreso a la fase de mitosis en el punto de control G ₂ /M.

(Cdk) Cinasas dependientes de Ciclinas; (G₁) fase Gap 1 del ciclo celular; (S) Fase de síntesis del ciclo celular; (M) fase de mitosis del ciclo celular (Bruce A, 1983).

Además de los complejos Ciclinas-Cdks, el sistema de control del ciclo celular cuenta con otras proteínas que ayudan a la regulación de los eventos en las diferentes etapas del ciclo celular.

Una de éstas son las proteínas inhibidoras de Cdks (CKIs), que al unirse a los complejos ciclina-Cdks, específicamente a G₁/S-Cdk y S-Cdk, regulan su actividad en el comienzo del ciclo celular (Alberts, 1983).

La **proteína p16^{INK4a}** es un regulador negativo del ciclo celular cuya acción tiene lugar en el núcleo celular, es el principal miembro de la familia INK4a de proteínas CKIs, la codifica un gen localizado en el cromosoma 9p21 dentro del locus INK4a/ARF, que también codifica a la **proteína p19^{ARF}**. Ambas proteínas tienen actividad biológica antiproliferativa relacionada con la vía de la **proteína del Retinoblastoma(pRb)** y con la **proteína supresora de tumores p53**, respectivamente (Romagosa, 2011).

La presencia de los factores de crecimiento o mitógenos incrementan la expresión de genes que codifican ciclinas G₁ (Ciclina D), promoviendo la formación de los complejos Ciclina D-Cdk4/6 que median la fosforilación de pRb, lo que permite la liberación de la **familia de proteínas E2F** que a su vez estimulan la síntesis de proteínas requeridas para el ingreso a la fase S del ciclo celular como las relacionadas con la síntesis de ADN, y con la regulación celular como p16^{INK4a} y p19^{ARF} (figura 6). Su papel regulador consiste en, que al unirse p16^{INK4a} con las Cdk4/6, inhibe la formación del complejo Ciclina D-Cdk4/6, sin el cual no se fosforila la proteína pRb. Este estado hipofosforilado en el que se mantiene a pRb promueve una asociación estable con la familia de proteínas E2F, que al no activarse detiene el ciclo celular en la fase G₁, mientras que la proteína p19^{ARF} interviene en la concentración de la **proteína Mdm2**, una ligasa de ubiquitina que mantiene baja la concentración de p53 mediante proteólisis (Romagosa, 2011).

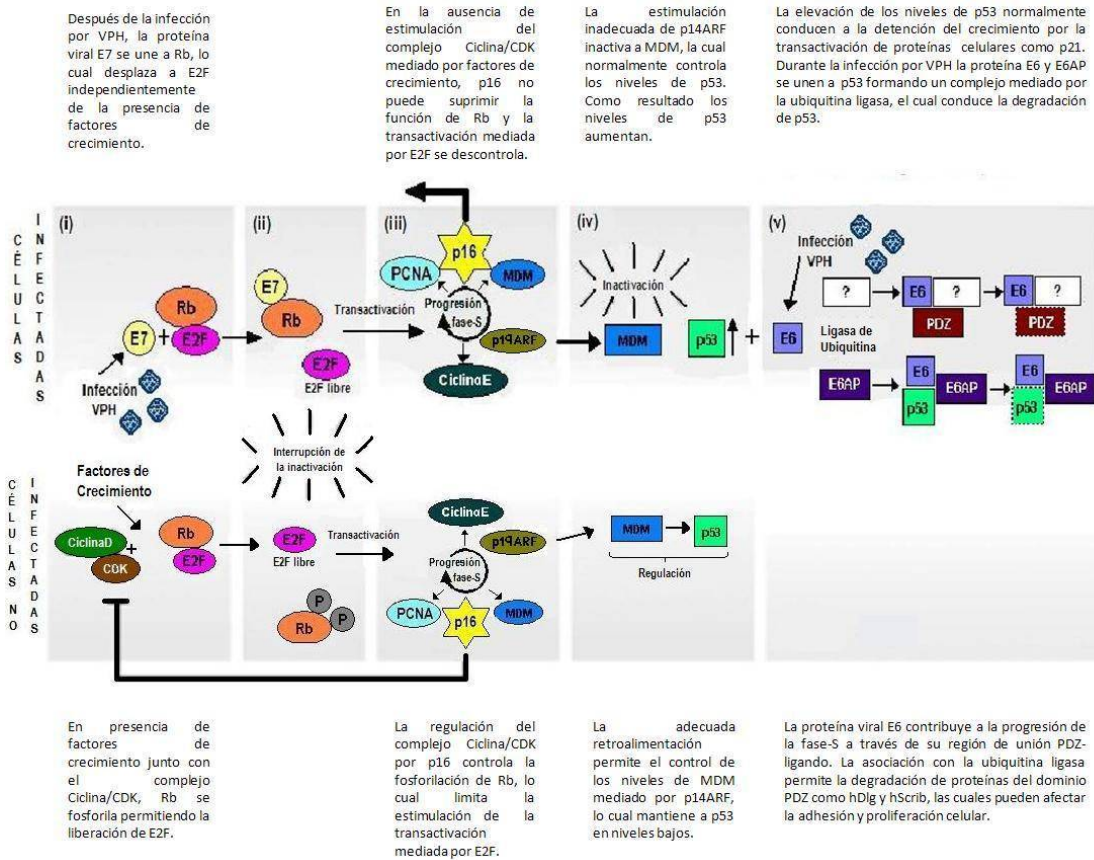


Figura 6. Bases moleculares de la expresión de los marcadores de ciclo celular. La figura muestra la regulación en la progresión de la fase S en células no infectadas. i) En células no infectadas, la estimulación de la progresión de la fase S requiere la presencia de factores externos de crecimiento que activan al complejo CiclinaD/CDK lo que permite la fosforilación de pRb. En caso de infección con HPV, la proteína viral E7 une a pRb. ii) La consecuencia en ambos casos es la liberación de E2F que actúa como factor de transcripción. iii) E2F estimula la expresión de las proteínas necesarias para la progresión de la fase S, tales como PCNA y MCM. En las células no infectadas, p16 regula la expresión continua de estas proteínas inhibiendo la activación del complejo CiclinaD/CDK. En las células infectadas por HPV, p16 es incapaz de ejercer un efecto regulador y la progresión de la fase S se estimula por E7. iv) La expresión descontrolada de p16 que se detecta con la expresión de E7, se acompaña por un aumento en la concentración de p14. Esto permite la inactivación de MDM y un incremento en p53 que se regula por la proteína E6. En células no infectadas, la concentración de p14 se regula por la retroalimentación de p16, que mantiene la concentración de p53 baja. v) La proteína E6 forma un complejo con E6AP y p53, el cual permite la degradación de p53 mediado por arresto en el crecimiento y/o apoptosis. E6 también puede estimular la degradación de proteínas del dominio PDZ, las cuales afectan la adhesión celular y el señalamiento. Modificado de Doorbar, 2007.

En la infección con el virus del papiloma humano, la vía $p16^{INK4a}$ -pRb frecuentemente es el blanco de las **oncoproteínas virales E6 y E7**, ya que su actividad es crítica para prevenir la proliferación celular inapropiada (Romagosa, 2011). Al unirse la proteína viral E7 a pRb, se permite la liberación de la familia de

proteínas E2F, lo que estimula la progresión de la fase G₁ a la fase S, independientemente de factores externos de crecimiento. El consecuente aumento de las proteínas necesarias para el ingreso a la fase S se descontrola causando una sobreexpresión de p16^{INK4a} que, al no poder unirse a Cdk4/6 (que no se encuentra de forma activa), no puede suprimir la función de pRb con lo cual la progresión del ciclo celular continua. A su vez, la estimulación inadecuada de la proteína p19^{ARF} inactiva a la proteína Mdm2, dando como resultado un aumento en los niveles de la proteína p53, lo que normalmente conduciría a la detención del ciclo celular mediante otra proteína inhibidora de Cdks, la proteína p21. Pero este efecto se contrarresta con la proteína viral E6, ya que se une a p53 mediante su proteína asociada (E6-AP), provocando la degradación proteolítica de p53 por ubiquitinas (figura 6).

Es por esto que la presencia de las oncoproteínas virales E6 y E7 es el mecanismo molecular que explica la sobreexpresión de p16^{INK4a} en estos casos, ya que la inactivación de pRb por la proteína E7 de Virus de Papiloma Humano de alto riesgo (Munger et al, 1989; Huang et al, 1993) libera a p16^{INK4a} de su control de retroalimentación negativa, causando su sobreexpresión como un intento fallido para detener la proliferación celular en tumores relacionados con virus del papiloma humano (Reuschenbach et al, 2008), mientras que la oncoproteína E6 induce la degradación de la proteína supresora de tumores p53.

Por otro lado, la **proteína Ki-67** también se considera un marcador, ya que está asociada y es un requisito indispensable para la progresión a través del ciclo celular (Scholzen T, 2000). Se localiza en el núcleo celular tanto en las fases G₁, S

y G₂ del ciclo celular, así como en la mitosis, mientras que en células en estado inactivo o G₀ no la presentan (Gerdes J, et al, 1984). Es por esta razón que la expresión de la proteína Ki-67 se puede utilizar como herramienta para estimar la fracción de células normales o células tumorales que presentan proliferación (Scholzen T, 2000).

Por lo tanto, la expresión en conjunto de la proteína p16^{INK4a} y Ki-67 proporcionan un marcador específico y sensible de lesiones malignas y premalignas en la mucosa cervical, las cuales no se esperan en células benignas y que no están cursando el ciclo celular (Singh M, et al, 2012).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que el virus del papiloma humano es el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer cervicouterino. Tan solo en México en el año 2008 se registraron 10186 casos de cáncer cervicouterino invasor y una mortalidad por el mismo de 5061 casos (Globocan, 2008). Además se ha observado que la prevalencia de infección por virus del papiloma humano de alto riesgo es mayor en mujeres con ectopía cervical, en comparación de aquellas que no la presentan.

En pacientes con ectopía cervical e infección por virus del papiloma humano de alto riesgo se desconoce si:

- ◆ El virus del papiloma humano origina un proceso oncogénico,
- ◆ Si, estas pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino, y por lo tanto
- ◆ Si, será necesario proporcionar un tratamiento oportuno y seguimiento clínico.

IV. HIPÓTESIS

La infección de células de ectopía cervical por virus del papiloma humano de alto riesgo tipo 16 y tipo 18, provocará modificaciones en el ciclo celular que se evidenciará por la expresión de las proteínas celulares p16^{INK4a} y Ki-67.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

- ◆ Determinar el potencial oncogénico de VPH de alto riesgo en células de ectopía cervical mediante la evaluación de la co-expresión de p16^{INK4a} y Ki-67.

Objetivos Específicos.

- ◆ Determinar la presencia de ADN de virus del papiloma humano de alto riesgo tipo 16 y tipo 18 en muestras de ADN de células de la zona de ectopía cervical, usando oligonucleótidos específicos y la técnica de PCR.
- ◆ Determinar la presencia en conjunto de las proteínas celulares p16^{INK4a} y Ki-67 en muestras de células de ectopía cervical con presencia de ADN de virus del papiloma humano de alto riesgo tipo 16 y tipo 18 realizando una tinción Inmunocitoquímica con el Kit CINtec® Plus Cytology.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio: Experimental

Población de estudio.

El material biológico analizado en el presente trabajo se obtuvo de pacientes que acudieron a la Clínica de Colposcopia Fundación “Cruz Talonia”, durante el período del 4 de agosto al 4 de noviembre de 2011. Un total de 200 mujeres con diagnóstico colposcópico de ectopía cervical se incluyeron independientemente de la presencia de lesión por virus del papiloma humano. De cada paciente se obtuvo una muestra de células de la zona de la ectopía cervical, que se tomó mediante un cepillo citológico “cytobrush” al cual se le dobló el extremo con cerdas, para facilitar la recolección.

Se colocaron dentro de tubos Eppendorf con 600µL de PBS frío y se colocaron dentro de una hielera con gel refrigerante que las mantuvo a 10°C el tiempo necesario hasta procesarse el mismo día en el laboratorio.

Al final del procedimiento ginecológico, se aplicó a cada paciente un cuestionario sobre factores de riesgo de Cáncer Cervicouterino, que incluyó preguntas como edad actual, edad en la que se tuvo la primera relación sexual, número de parejas sexuales hasta el momento, número de embarazos, método anticonceptivo empleado, existencia previa de infecciones de VPH, realización del examen Papanicolaou e ingesta frecuente de alcohol y tabaco.

Criterios de inclusión.

Muestras celulares de pacientes con diagnóstico de ectopía cervical.

Criterios de exclusión.

Muestras celulares de pacientes cuyo diagnóstico colposcópico resultó en:

- Sin presencia de ectopía cervical.
- Lesiones premalignas como: cualquier grado de Neoplasia cervical intraepitelial (CIN) I, II ó III; Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL), Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL).
- Cáncer.

Criterios de eliminación.

- Muestras que no presentaron ADN amplificable.
- Muestras con células en condiciones inadecuadas para la realización de frotis.

Variable.

Presencia de lesión por virus del papiloma humano diagnosticada colposcópicamente.

Procesamiento de las muestras.

Se agitó en un vórtex cada tubo para homogeneizar las muestras. Con ayuda de unas pinzas, se separó el cepillo citológico y se volvió a agitar.

Debido a la presencia de moco cervical, las muestras se lavaron con una solución de N-Acetilcisteína (NAC) [Sigma-Aldrich] 5% en PBS, un agente mucolítico que facilita el manejo de las muestras. (Gutiérrez, 2009). El lavado de las muestras con NAC se realizó de manera rápida ya que se observó que un tiempo de incubación prolongado, dañó las células.

El lavado se llevó a cabo centrifugando a 1200 rpm y desechando el PBS sobrenadante en el que se transportaron las muestras, se agregaron 600µL de NAC (N-Acetilcisteína) 5% en PBS y se agitaron inmediatamente en un vórtex durante 20 segundos, se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 segundos y se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 600µL de PBS y se agitó en un vórtex para homogeneizar.

En tubos diferentes se separó cada muestra en dos fracciones de 300µL cada una. La primera se sometió a extracción de ácidos nucleicos y la segunda se volvió a centrifugar a 1200 rpm, se eliminó el PBS sobrenadante, se agregaron 300µL de etanol al 70% y se almacenó a -20°C hasta que se realizó el análisis inmunocitoquímico con el Kit de tinción CINtec PLUS Cytology [mtmLaboratories].

Extracción de ácidos nucleicos.

Las fracciones destinadas a extracción de ácidos nucleicos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 500µL de amortiguador de lisis para romper las células y núcleos. Se agregaron 50µL de RNAsa (100µg/mL) y 50µL de Proteinasa K (100µg/mL) para degradar ARNs y proteínas, respectivamente. Se agitaron en un vortex y se incubaron a 37°C durante toda la noche. (Magdalena, et al, 1997).

La extracción del ADN se realizó con 500µL de una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) [Amresco]. Se agitó con un vortex y se centrifugó a 14000 rpm durante 20 segundos.

Cuidando de no romper la interfase, se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo en el cual se repitió la extracción con mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) una vez más. De nuevo, la fase acuosa se transfirió a otro tubo.

Se adicionó 1mL de Etanol absoluto frío y se incubó toda la noche a -20°C. Pasado este tiempo se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante con cuidado de no perder el botón de ADN. Se dejó secar a temperatura ambiente y una vez seco se resuspendió en 20-50µL (según el tamaño del botón de ADN) de agua ultrapura estéril y se conservó a -20°C. (Sambrook, 1989).

Cuantificación de ácidos nucleicos.

Cada muestra de ADN se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop modelo ND-1000 V3.3.0.

La concentración se calculó utilizando la ecuación de Lambert-Beer que correlaciona la absorbancia calculada con la concentración de la muestra:

$$A = (E) (b) (c)$$

donde:

A= absorbancia (A)

E= Coeficiente de absortividad molar o coeficiente de extinción (L/mol-cm)

b= Longitud de la celda (cm)

c= Concentración del analito (mol/L)

El procedimiento se realizó colocando 1 μ L de cada muestra cada vez en el pedestal del Nanodrop y registrando la concentración la concentración obtenida.

Los valores obtenidos de absorbancia a 260/280nm y 260/230nm se utilizaron para evaluar la pureza del ADN.

Para la relación de las absorbancias a 260/280nm se consideró adecuado un valor aproximado a 1.8.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- Integridad de ADN.

Se evaluó la integridad del ADN de las muestras amplificando un fragmento de 260-268 pares de bases del gen **β-globina**, que es un control interno en la técnica de PCR (Herrel, 2009).

Se utilizaron los oligonucleótidos **GH20** (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') Y **PC04** (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') (Meshkat. 2006) con el siguiente programa de ciclaje de PCR: precalentado a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, alineamiento a 65°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 1 minuto. Al terminar los ciclos, se sometió a 72°C durante 10 minutos.

Las condiciones de reacción se enlistan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Concentraciones de los reactivos en la técnica de PCR de β-globina.

Reactivo	Concentración	Cantidad	Marca
Amortiguador	10x	5µL	Invitrogen
MgCl ₂	25mM	1 µL	Invitrogen
Mezcla de dNTP's	2mM	1 µL	Invitrogen
Oligonucleótido GH20	0.0560 µg/µL	2.7 µL	Invitrogen
Oligonucleótido PC04	0.0359 µg/µL	3.1 µL	Invitrogen
Taq Polimerasa	5U/µL	0.2 µL	Invitrogen
Muestra ADN	50-100ng	2 µL	-
Agua ultrapura estéril	-	la necesaria	GIBCO
Volumen final	-	25 µL	-

Como control positivo se utilizó ADN de una muestra confirmada como positiva para VPH y como control negativo se usó agua ultrapura estéril.

- Determinación de la presencia de virus del papiloma humano (VPH).

Se utilizó el par de oligonucleótidos universales **MY09** (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3') y **MY11** (5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') el cual amplificó un fragmento de 450 pares de bases, entre los nucleótidos 6722-7170 en el gen L1, que además de ser muy conservado entre los tipos virales VPH 6, 11, 16, 18 y 33, también se mantiene en caso de que el ADN viral se integre al genoma celular (Manos et al, 1989). Estas características hacen que el gen se utilice de rutina para la detección de ADN viral (Husnjak K, 2000).

El programa de amplificación fue el siguiente: Precaentado a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos para desnaturalización, 45°C durante 30 segundos para alineamiento y 72°C por 60 segundos para elongación. Una vez terminados los ciclos, se incubó a 72°C durante 10 minutos para la extensión de fragmentos incompletos.

Las concentraciones de los reactivos se enlistan en el cuadro3:

Cuadro 3. Concentraciones de los reactivos en la técnica dePCR de VPH general.

Reactivo	Concentración	Cantidad	Marca
Amortiguador	10x	2µL	Invitrogen
MgCl ₂	50mM	2 µL	Invitrogen
Mezcla de dNTP's	2mM	2 µL	Invitrogen
Oligonucleótido MY09	10 µM	1 µL	Invitrogen
Oligonucleótido MY11	10 µM	1 µL	Invitrogen
Taq Polimerasa	5U/µL	0.2 µL	Invitrogen
Muestra ADN	50-100ng	6 µL	-
Agua ultrapura estéril	-	la necesaria	GIBCO
Volumen final	-	20 µL	-

Como control positivo se utilizó ADN de células HeLa (Línea celular de adenocarcinoma que contiene ADN viral de HPV 18, integrado al genoma viral), y como control negativo se usó agua ultrapura estéril.

- Identificación de virus del papiloma humano tipo 18.

Se utilizaron tres pares de oligonucleótidos diferentes, así como diferentes protocolos de PCR para determinar el genotipo 18 del virus del papiloma humano.

Para la amplificación de **genE7**, se usaron los oligonucleótidos **HPVE7 18F** (5'-AAG AAA ACG ATG AAA TAG ATG-3') y **HPVE7 18R** (5'-GGC TTC ACA CTT ACA ACA CA-3') que amplificaron un fragmento de 100 pares de bases, entre los nucleótidos 696–716 y 799-780 respectivamente.

El programa de ciclado fue: 94°C por 5 minutos, 38 ciclos de 95°C durante 30 segundos para desnaturalización, 53°C durante 60 segundos para alineamiento y 72°C durante 90 segundos para elongación.

Finalizados los ciclos, se incubó a 72°C durante 10 minutos para completar la extensión de fragmentos incompletos. (Monroy, 2010).

Las condiciones de reacción se enlistan en el cuadro 4:

Cuadro 4. Concentración de los reactivos en latécnica de PCR de VPH tipo 18 gen E7.

Reactivo	Concentración	Cantidad	Marca
Amortiguador	10x	2µL	Invitrogen
MgCl ₂	50mM	0.5 µL	Invitrogen
Mezcla de dNTP's	2mM	2 µL	Invitrogen
Oligonucleótido HPVE7 18F	10 µM	1 µL	Invitrogen
Oligonucleótido HPVE7 18R	10 µM	1 µL	Invitrogen
Taq Polimerasa	5U/µL	0.2 µL	Invitrogen
Muestra ADN	50-100ng	2 µL	-
Agua ultrapura estéril	-	11.3 µL	GIBCO
Volumen final	-	20 µL	-

ADN de células HeLa (Línea celular de adenocarcinoma que contiene ADN viral de VPH 18, integrado al genoma viral) se utilizó como control positivo, mientras que como control negativo se usó agua ultrapura estéril.

La **LCR** y el **gen E6** se amplificaron utilizando los oligonucleótidos diseñados y donados por la Dra. Marcela Lizano Soberón del Instituto Nacional de Cancerología (De la Cruz-Hernández, 2005) (Cuadro5).

Cuadro 5. Pares de oligonucleótidos que se usaron para amplificación de los genes LCR y E6 del VPH tipo 18.

Oligonucleótidos	Secuencia	Posición	Longitud (pb)
LCR sense	5'-CCC CCC GGG TGT ATG ATT GCA TTG TAT GG-3'	7201-7219	787
LCR antisense	5'-CCC AAG CTT GGA TCC TCA AAG CGC GCC AT-3'	124-105	
E6 pcDNAsense	5'-GGG GGA TCC ATC CCG CGC TTT GAA GAT CCA ACA-3'	105-128	495
E6 pcDNAantisense	5'-GGG GAA TCC TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TCG-3'	581-558	

(pb) pares de bases.

El protocolo de PCR fue el mismo para ambos pares de oligonucleótidos: 94°C por 10 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C durante 40 segundos para desnaturalizar, 59°C por 40 segundos para alineamiento y 72°C por 55

segundos para elongación. Y al termino de los ciclos, de nuevo 72°C durante 7 minutos para completar fragmentos incompletos.

Las condiciones de reacción fueron las mismas para ambos pares de oligonucleótidos, con diferencia de que se adicionaron a una concentración de 50pM en lugar de 10µM. (Cuadro 6)

Cuadro 6. Concentraciones de los reactivos en latécnica de PCR de VPH tipo 18 genes LCR y E6.

Reactivo	Concentración	Cantidad	Marca
Amortiguador	10x	2µL	Invitrogen
MgCl ₂	50mM	0.8 µL	Invitrogen
Mezcla de dNTP's	2mM	2 µL	Invitrogen
Oligonucleótido 1	50 pM	0.2 µL	IDT (Integrated DNA Technologies)
Oligonucleótido 2	50 pM	0.2 µL	IDT (Integrated DNA Technologies)
Taq Polimerasa	5U/µL	0.13 µL	Invitrogen
Muestra ADN	50-100ng	4 µL	-
Agua ultrapura estéril	-	10.67 µL	GIBCO
Volumen final	-	20 µL	-

ADN de células HeLa (Línea celular de adenocarcinoma que contiene ADN viral de VPH 18, integrado al genoma viral) se utilizó como control positivo, mientras que como control negativo se usó agua ultrapura estéril.

- Identificación de virus del papiloma humano tipo 16.

Se usaron los oligonucleótidos **Pr3** (5'-GTC AAA AGC CAC TGT GTC CT-3') y **Pr4** (5'-CCA TCC ATT ACA TCC CGT AC-3') que amplificaron un fragmento de 499 pares de bases, entre los nucleótidos 420 y 919 en el **gen E7** del VPH tipo 16 (Karlsen, 1996).

El programa de amplificación usado fue el siguiente: precalentamiento a 95°C por 5 minutos, 38 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos,

alineamiento a 54°C por 60 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos. Al término de los ciclos se sometió a 72°C durante 10 minutos para completar fragmentos incompletos (Monroy, 2010).

Las condiciones de reacción se enlistan en la cuadro7:

Cuadro 7. Concentraciones de los reactivos en la técnica dePCR de VPH tipo 16 gen E7.

Reactivo	Concentración	Cantidad	Marca
Amortiguador	10x	2µL	Invitrogen
MgCl ₂	50mM	0.6 µL	Invitrogen
Mezcla de dNTP's	50mM	2 µL	Invitrogen
Oligonucleótido Pr3	10 µM	1 µL	GIBCOBRL®
Oligonucleótido Pr4	10 µM	1 µL	GIBCOBRL®
Taq Polimerasa	5U/µL	0.2 µL	Invitrogen
Muestra ADN	50-100ng	4 µL	-
Agua ultrapura estéril	-	9.2 µL	GIBCO
Volumen final	-	20 µL	-

Como control positivo se usó ADN de células SiHa (Línea celular de carcinoma de células escamosas con ADN viral de VPH 16 integrado a su genoma), y como control negativo se adicionó agua ultrapura estéril.

Todos los PCRs se llevaron a cabo en un termociclador marca PERKIN ELMER GeneAmp PCR System 9600 y los ampliconesse analizaron por electroforesis en geles de agarosa (1%), teñidos con bromuro de etidio. Los geles se visualizaron y fotografiaron en elfotodocumentador de geles con luz UV [KODAK GEL LOGIC IMAGING CABINET]

Análisis Inmunocitoquímico de citologías exfoliativas.

Se utilizó el kit CINtec® PLUS Cytology para la detección inmunocitoquímica de los antígenos celulares p16^{INK4a} y Ki-67 en muestras citológicas provenientes de la zona de ectopía cervical en el cuello uterino.

- Preparación de los frotis.

Las muestras con células conservadas en etanol 70% [J.T. Baker] se centrifugaron y resuspendieron en 20 µL a 200 µL de etanol absoluto [J.T. Baker] (según el tamaño del botón celular) y se agitaron para homogeneizar. En portaobjetos cargados electrostáticamente [BIOCARE MEDICAL] y debidamente identificados, se aplicaron 5 µL de muestra, se secaron y se observaron con un microscopio óptico [Carl Zeiss 426126, Axiostar plus] para corroborar la existencia de una cantidad considerable de células (≥ 200 células).

- Tinción Inmunocitoquímica.

Se llevaron a temperatura ambiente todos los reactivos del kit (a excepción de la solución Fast Red) durante 1 hora a y se prepararon la solución de recuperación del epítipo y la solución de trabajo DAB (como lo indica el manual del kit) antes de comenzar con el procedimiento de tinción.

Se hidrataron las muestras celulares en agua destilada durante 10 minutos, en seguida se recuperó el epítipo sumergiéndolas en solución de recuperación del epítipo en baño María, durante 10 minutos a una temperatura de 92°C-96°C dentro de una olla exprés, a la cual se le colocó la tapa sin válvula. Se dejaron enfriar hasta que el baño alcanzó una temperatura $\leq 50^{\circ}\text{C}$.

Una vez que la solución llegó a la temperatura, las muestras se lavaron con tampón de lavado [CINtec® Cytology, mtmlabs] durante 5 minutos, posteriormente se bloqueó la actividad de la peroxidasa incubando durante 5 minutos con el reactivo de bloqueo de la peroxidasa (peróxido de hidrógeno 3%). Se repitió el lavado con tampón de lavado y se incubaron las muestras con anticuerpos monoclonales de ratón antihumano p16^{INK4a} y conejo antihumano Ki-67 (50 mM), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Nuevamente se lavaron las muestras celulares con tampón de lavado durante 5 minutos y se incubaron con reactivo de visualización HRP (polímero conjugado con peroxidasa de rábano y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-ratón purificados) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las muestras con tampón de lavado tres veces seguidas, cada una por 5 minutos. En seguida se adicionó el reactivo de visualización AP (polímero conjugado con fosfatasa alcalina y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-conejo purificados) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se realizaron tres lavados con tampón de lavado, cada uno durante 5 minutos, después se les adicionó la solución de trabajo DAB (preparada anteriormente) y se incubó durante 10 minutos protegiendo las muestras de la luz directa. Esta solución contiene el cromógeno 3-3'-diaminobencidina que al reaccionar con la peroxidasa de rábano picante, produce un color marrón, el cual indica la presencia de la proteína p16^{INK4a} en el citoplasma de las células.

Las muestras se lavaron con agua destilada y se les adicionó la solución de trabajo fast red (preparada justo antes de usarse y tal como lo indica el manual) y se incubaron durante 15 minutos protegiendo de la luz directa.

Finalmente se lavaron las células una vez más con tampón de lavado y se enjuagaron con agua destilada.

- **Contratinción.**

Una vez finalizada la tinción Inmunocitoquímica, se realizó la tinción de contraste sumergiendo las muestras celulares en Hematoxilina sin alcohol [BIOCARE MEDICAL] durante 10 minutos. Se les eliminó el exceso de colorante enjuagándolas con agua destilada durante 30 segundos.

- **Montaje.**

Las muestras se incubaron durante al menos 1 minuto en agua destilada, se les eliminó el exceso de agua con una toallita de papel y se cubrieron con medio de montaje acuoso [CINtec® PLUS Mount]. Se dejaron secar toda la noche en un lugar protegido de la luz directa.

Pasado el tiempo, y una vez secas, las muestras se incubaron en xileno [J.T. Baker] durante 10 minutos, después se les eliminó el exceso de xileno, se les añadió una gota de medio de montaje a base de xileno [EcoMount, BIOCARE MEDICAL] y se les colocó un cubreobjetos de cristal. Se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente en un lugar protegido de la luz directa.

Finalmente se analizaron y se capturaron imágenes de cada muestra en un microscopio óptico con los objetivos de 20x y 40x [Carl Zeiss 426126, Axiostar Plus].

Diseño estadístico.

Para analizar los diferentes grupos de pacientes se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 6, los resultados se analizaron a través de frecuencias y porcentajes, y como prueba de comparación se usó la prueba exacta de Fisher, tomando en cuenta una significancia de $p < 0.05$.

VII.RESULTADOS

Integridad del ADN en las muestras.

De 200 muestras recolectadas de ectopía cervical, se logró extraer el ADN a 176, las cuales se sometieron a una amplificación, mediante PCR, de un fragmento de 260-268 pares de bases del gen β -globina que comprobó que el ADN se encontraba en condiciones óptimas para su uso. Se descartaron 8 muestras por no presentar ADN apto para la amplificación, por lo que se trabajó con 168 muestras.

Presencia del virus del papiloma humano (VPH).

Se determinó la presencia de ADN del tipo 6, 11, 16, 18 y 33 del virus del papiloma humano mediante la amplificación de un fragmento de 450 pares de bases, en las 168 muestras de ectopía cervical que presentaron ADN apto para la amplificación.

Se obtuvieron 14 (8.33%) muestras sin la presencia de ADN de algún tipo de VPH antes mencionado y 154 (91.66%) muestras positivas para la presencia de ADN del tipo 6, 11, 16, 18 ó 33 de VPH, que se clasificaron según la intensidad de la banda amplificada, en 66 (39.28%) muestras fuertemente positivas y 88 (52.38%) débilmente positivas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Presencia de ADN de virus del papiloma humano tipo 6, 11, 16, 18 ó 33, en muestras de ectopía cervical.

Muestras con ectopía cervical	Muestras Positivas 154 (91.66%)		Muestras Negativas
	Fuertes	Débiles	
168 (100%)	66 (39.28%)	*88 (52.38%)	14 (8.33%)

Oligonucleótidos usados MY09 y MY11 que identificaron los tipos virales 6, 11, 16, 18 y 33.

*Se consideró una baja cantidad de ADN en las muestras débilmente positivas, por lo que se descartaron del estudio.

De las muestras positivas, solo las que resultaron fuertemente positivas se utilizaron para continuar con la identificación del tipo viral, ya que las muestras débilmente positivas, al considerarse con baja concentración de ADN, se descartaron del ensayo (Figura 7).

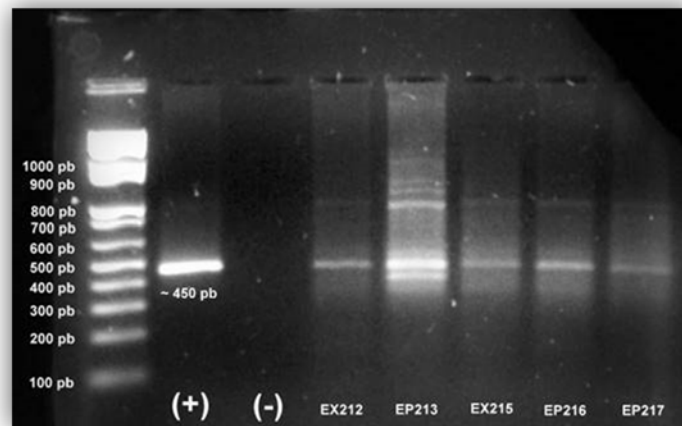


Figura 7. Determinación de los tipos 6, 11, 16, 18 y 33 de virus del papiloma humano en gel de agarosa [1%]. Primer carril: Marcador de peso molecular 1Kb, segundo carril: Control positivo ADN de línea celular HeLa, tercer carril: Control negativo (agua ultrapura estéril), cuarto carril: Muestra EX212 débilmente positiva para VPH general, quinto carril: Muestra EP213 fuertemente positiva para VPH general, sexto, séptimo y octavo carril: Muestras EX215, EP216 y EP217, todas débilmente positivas para VPH tipo 6, 11, 16, 18 y 33.

Identificación del tipo viral 16 y 18 del virus del papiloma humano (VPH).

La identificación del tipo viral 16 y 18 se realizó amplificando fragmentos definidos, con oligonucleótidos específicos para cada caso, en las 66 muestras fuertemente positivas para la presencia de ADN del tipo 6, 11, 16, 18 ó 33 del virus del papiloma humano.

Para el **tipo viral 18** se usaron seis pares diferentes de oligonucleótidos, ya que al no obtener resultados iniciales, se creyó que estaban defectuosos. Se obtuvieron solo 2 (3.03%) muestras positivas para la presencia de ADN de VPH tipo 18, una muestra cuando se amplificó el gen E7 (Figura 8 y cuadro 9) y otra cuando se amplificó la región larga de control (LCR) del virus (Figura 9 y Cuadro 9). Se llevó a cabo una amplificación más, esta vez del gen E6 del VPH tipo 18, pero no generó resultados (Figura 10).

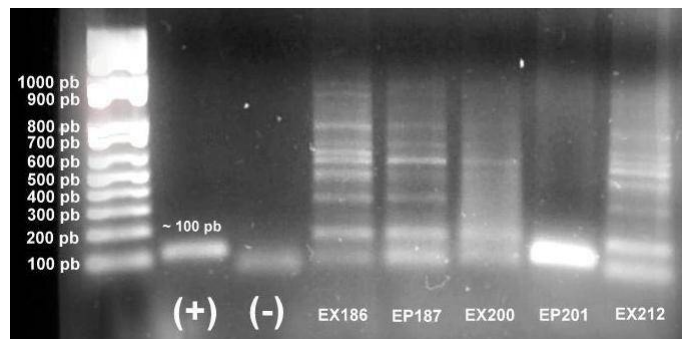


Figura 8. Identificación del gen E7 del VPH tipo 18 en gel de agarosa [1%]. Primer carril: Marcador de peso molecular 1Kb, segundo carril: Control positivo ADN de línea celular HeLa, tercer carril: Control negativo (agua ultrapura estéril), cuarto carril: Muestra EX186, quinto carril: Muestra EP187, sexto carril: Muestra EX200, séptimo carril: Muestra EP201 y octavo carril: Muestra EX212. Solo la muestra EP201 fue positiva al PCR, por lo que tiene presencia de ADN de VPH específicamente del tipo 18.

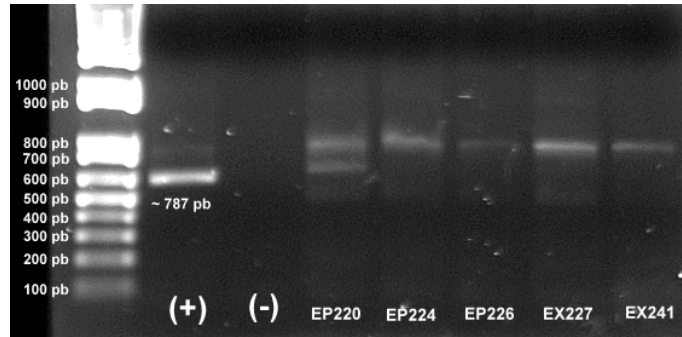


Figura 9. Identificación de la región larga de control (LCR) del VPH tipo 18 en gel de agarosa [1%]. Primer carril: Marcador de peso molecular 1Kb, segundo carril: Control positivo ADN de línea celular HeLa, tercer carril: Control negativo (agua ultrapura estéril), cuarto carril: Muestra EP220, quinto carril: Muestra EP224, sexto carril: Muestra EP226, séptimo carril: Muestra EX227 y octavo carril: Muestra EX241. Solo la muestra EP220 amplificó la banda buscada, por lo que fue positiva para la presencia específica de ADN de VPH tipo 18.

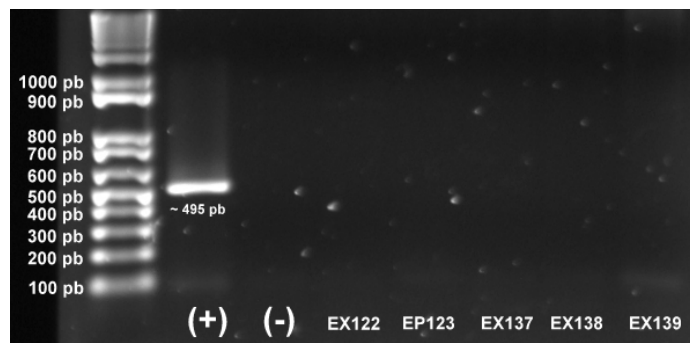


Figura 10. Identificación del gen E6 del VPH tipo 18 en gel de agarosa [1%]. Primer carril: Marcador de peso molecular 1Kb, segundo carril: Control positivo ADN de línea celular HeLa, tercer carril: Control negativo (agua ultrapura estéril), cuarto carril: Muestra EX122, quinto carril: Muestra EP123, sexto carril: Muestra EX137, séptimo carril: Muestra EX138 y octavo carril: Muestra EX139. Todas las muestras fueron negativas para la presencia específica de ADN de VPH tipo 18, ya que ninguna amplificó la banda buscada alrededor de 495 pares de bases.

Al contrario que con el tipo 18, solo se utilizó un par de oligonucleótidos que amplificaron el gen E7 del **tipo 16 del VPH**. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 9.

De las 66 muestras, 33 (50%) fueron positivas para la presencia de ADN del tipo viral VPH 16, 31 muestras (46.96%) resultaron negativas para este mismo (Figura 11), mientras que las dos últimas resultaron positivas para VPH tipo 18, como se mencionó anteriormente.

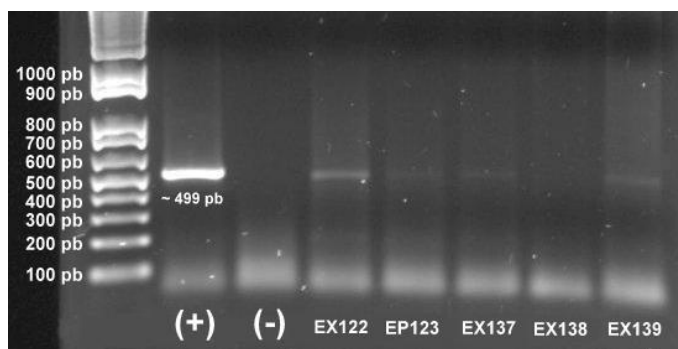


Figura 11. Identificación del gen E7 de VPH tipo 16 en gel de agarosa [1%]. Primer carril: Marcador de peso molecular 1Kb, segundo carril: Control positivo ADN de línea celular SiHa, tercer carril: Control negativo (agua ultrapura estéril), cuarto carril: Muestra EX122, quinto carril: Muestra EP123, sexto carril: Muestra EX137, séptimo carril: Muestra EX138 y octavo carril: Muestra EX139. Las muestras EX122, EP123, EX137 Y EX139 presentan una banda alrededor de 500 pares de bases, esto indica la presencia de ADN de VPH específicamente del tipo 16. La muestra EX138 no presenta banda, por lo que es negativa a este tipo viral.

Cuadro 9. Identificación del tipo viral en las muestras fuertemente positivas a la presencia de ADN de algún tipo viral del VPH.

Muestras analizadas	VPH tipos 6, 11 ó 33 ¹	VPH tipo 16 ²	VPH tipo 18 ³
66	31 (46.96%)	33 (50%)	2 (3.03%)

¹Oligonucleótidos usados: MY09 y MY11 que identificaron los tipos virales 6, 11, 16, 18 y 33.

²Oligonucleótidos usados: Pr3 y Pr4, amplificaron un fragmento de 499 pares de bases del gen E7 del VPH tipo 16.

³Oligonucleótidos usados: **18R y 18F**, amplificaron un segmento de 100 pares de bases en el gen E7; **LCR sentido y LCR antisentido** amplificaron un segmento de 787 pares de bases en la región larga de control (LCR) y los oligonucleótidos **pcDNA sentido y pcDNA antisentido** que amplificaron un segmento de 495 pares de bases en el gen E6, todos para identificar el virus del papiloma humano tipo 18.

Una vez que se identificaron las muestras positivas para los tipos virales 16 y 18, se agruparon las muestras restantes como positivas solo para los tipos virales 6, 11 ó 33 del virus del papiloma humano, también se muestran en el cuadro B.

En la figura 12 se presentan los diferentes grupos identificados con distintos tipos de ADN de virus de papiloma humano. Un total de 80 (100%) muestras se analizaron molecularmente: 14 (17.5%) muestras resultaron negativas; 31 (38.75%) positivas para VPH entre el tipo 6, 11 ó 33; así mismo, 33 muestras equivalentes al 41.25% presentaron ADN de VPH tipo 16 y finalmente 2 muestras (2.5%) positivas para VPH tipo 18.

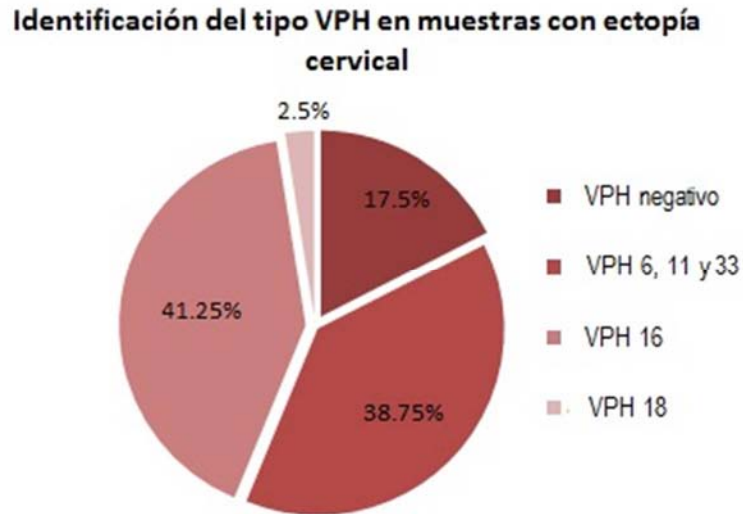


Figura 12. Gráfica porcentual de la identificación de los tipos virales del virus de papiloma humano en muestras de ectopía cervical.

Estudio de la expresión de las proteínas celulares p16^{INK4a} y Ki-67 mediante tinción inmunocitoquímica con el kit de tinción CINtec Plus®.

Se consideraron las muestras de ADN positivas y negativas para la identificación del tipo VPH, así como aquellas que resultaron negativas a cualquier tipo viral de VPH, para evaluar las muestras de células conservadas en etanol (-20°C) correspondientes con las anteriores. Estas muestras se clasificaron en grupos para su comparación:

- **Grupo A.** 14 muestras negativas para la presencia de ADN de cualquier tipo de VPH (Cuadro A).
- **Grupo B.** 31 muestras positivas a los tipos virales 6, 11 ó 33 de VPH (Cuadro B).
- **Grupo C.** 33 muestras positivas al tipo viral 16 de VPH (Cuadro B).
- **Grupo D.** 2 muestras positivas al tipo viral 18 de VPH (Cuadro B).

Un total de 80 muestras celulares se sometieron a una tinción inmunocitoquímica con el kit de tinción CINtec Plus®, para identificar la expresión de las proteínas celulares p16^{INK4a} y Ki-67. Se clasificaron como positivas las muestras con una o más células que presentaron la doble tinción, es decir, que mostraron citoplasma color marrón (café oscuro) y núcleo rojo brillante, como lo indica el fabricante. Los resultados se muestran en la cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados de la tinción inmunocitoquímica con el kit de tinción CINtec Plus®.

	Muestras positivas p16 ^{INK4a} y Ki-67	Muestras negativas p16 ^{INK4a} y Ki-67	Total de muestras
Grupo A * ¹	2 (16.66%)	10 (83.33%)	12
Grupo B * ²	1 (4.16%)	23 (95.83%)	24
Grupo C * ³	16 (53.33%)	14 (46.66%)	30
Grupo D	0 (0%)	2 (100%)	2
	Total		68

*¹Se excluyeron dos muestras de este grupo ya que las células no se encontraron en condiciones adecuadas para el procedimiento.

*²En este grupo se excluyeron siete muestras por la misma razón que las células no se encontraron conservadas adecuadamente y/o que el número de células no fue el suficiente para realizar la tinción.

*³Del grupo C se rechazaron tres muestras por la inadecuada conservación y/o ausencia de un número adecuado de células para realizar el ensayo.

El **Grupo A** de muestras celulares que no mostraron presencia de ADN de algún tipo viral VPH, 2 (16.66%) muestras presentaron las proteínas p16^{INK4a} y Ki-67, mientras que 10 (83.33%) no las presentaron (figura 13). Cabe mencionar que en este grupo, originalmente formado por 14 muestras, se excluyeron dos de ellas a causa de que las células no se encontraron en condiciones óptimas para llevar a cabo la tinción inmunocitoquímica.

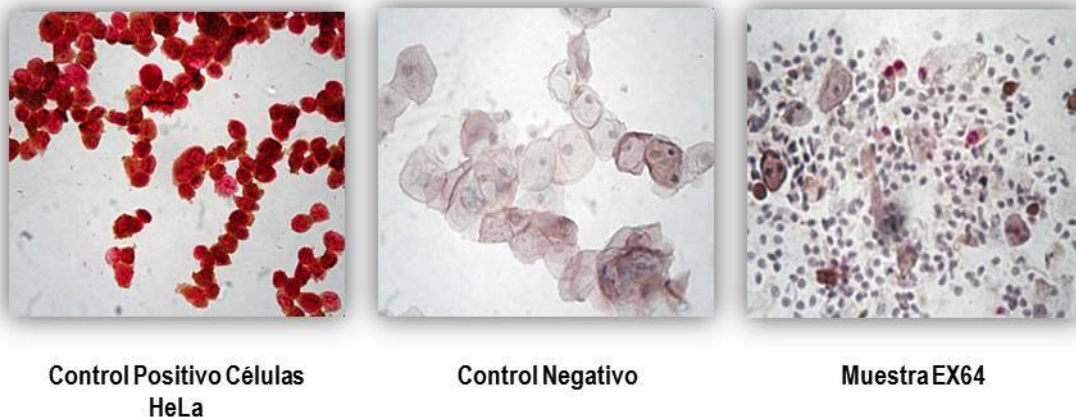


Figura. 13 Tinción inmunocitoquímica de la muestra EX64, del Grupo A, con el kit CINtec Plus®. Control positivo (izquierda): Células de línea celular HeLa que presentan poco citoplasma color marrón y un gran núcleo color rojo brillante. Control negativo (centro): Células de muestra positiva a PCR de β -globina, pero negativa al PCR de VPH general, el citoplasma es abundante y ligeramente grisáceo mientras que el núcleo es pequeño y azulado. Muestra EX64 (derecha): las flechas verdes indican las células que presentan las proteínas p16^{INK4a} en el citoplasma (marrón) y Ki-67 en el núcleo (rojo brillante).

El **Grupo B**, formado por muestras celulares con ADN del tipo viral 6, 11 ó 33 de VPH, solo 1 (4.16%) muestra fue positiva para ambas proteínas, mientras que 23 (95.83%) resultaron negativas (figura 14). También este grupo se redujo de 31 muestras iniciales a 24 muestras porque las células de 7 muestras no se encontraron conservadas adecuadamente y/o su número no fue suficiente para realizar la tinción.



Figura 14. Tinción inmunocitoquímica de la muestra EP160, del Grupo B, con el kit CINtec Plus®. Control positivo (izquierda): Células de línea celular HeLa que presentan poco citoplasma color marrón y un gran núcleo color rojo brillante. Control negativo (centro): Células de muestra positiva a PCR de β -globina, pero negativa al PCR de VPH general, el citoplasma es abundante y ligeramente grisáceo mientras que el núcleo es pequeño y azulado. Muestra EP160 (derecha): No presenta ninguna célula que exprese las proteínas celulares $p16^{INK4a}$ y Ki-67.

Para el **Grupo C** que clasificó las muestras celulares positivas a la presencia de VPH tipo 16, solo 16 muestras (53.33) resultaron positivas para las proteínas $p16^{INK4a}$ y Ki-67 mientras que 14 (46.66%) resultaron negativas (figura 15). En este grupo también se rechazaron tres muestras por la misma razón: las células no se encontraron bien conservadas y/o no se encontró el suficiente número de células para realizar el ensayo.

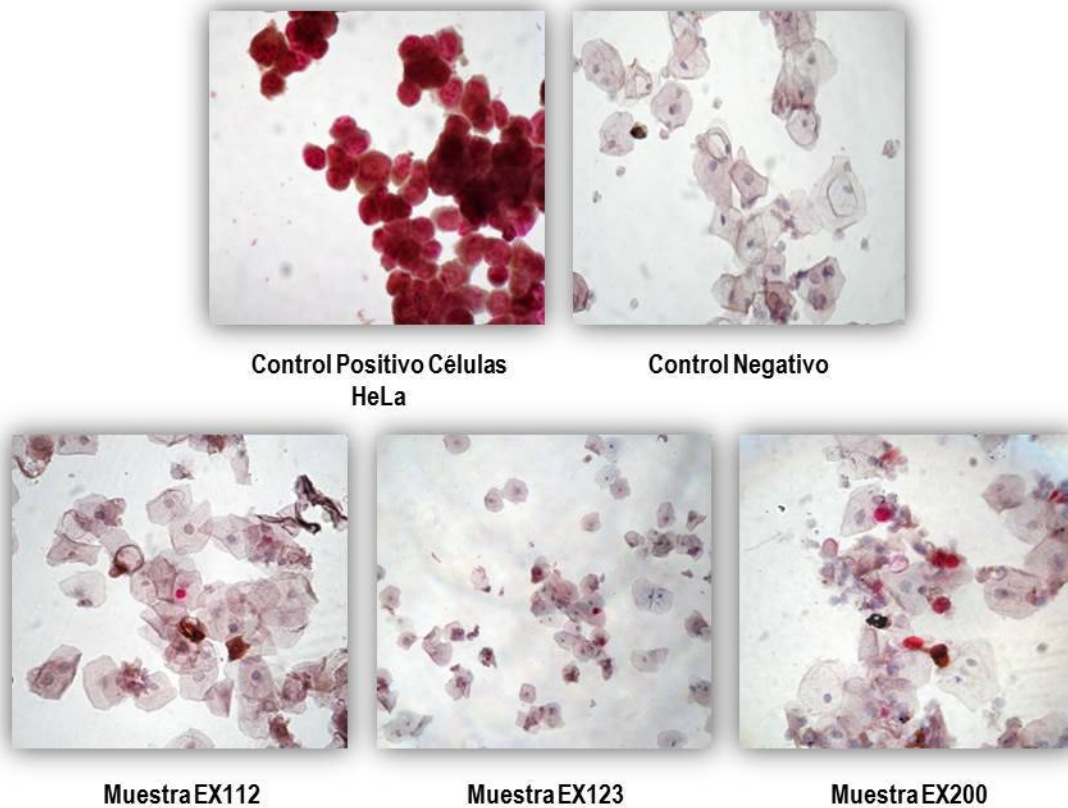


Figura 15. Tinción inmunocitoquímica de la muestra EP123, del Grupo C, con el kit CINtec Plus®. Control positivo (izquierda): Células de línea celular HeLa que presentan poco citoplasma color marrón y un gran núcleo color rojo brillante. Control negativo (centro): Células de muestra positiva a PCR de β -globina, pero negativa al PCR de VPH general, el citoplasma es abundante y ligeramente grisáceo mientras que el núcleo es pequeño y azulado. Muestra EP123 (derecha): las flechas verdes indican las células que presentan las proteínas p16^{INK4a} en el citoplasma (marrón) y Ki-67 en el núcleo (rojo brillante).

Por último, en el **Grupo D**, las dos muestras identificadas con presencia de ADN de VPH tipo 18 resultaron negativas para la presencia de las proteínas celulares p16^{INK4a} y Ki-67(figura16).

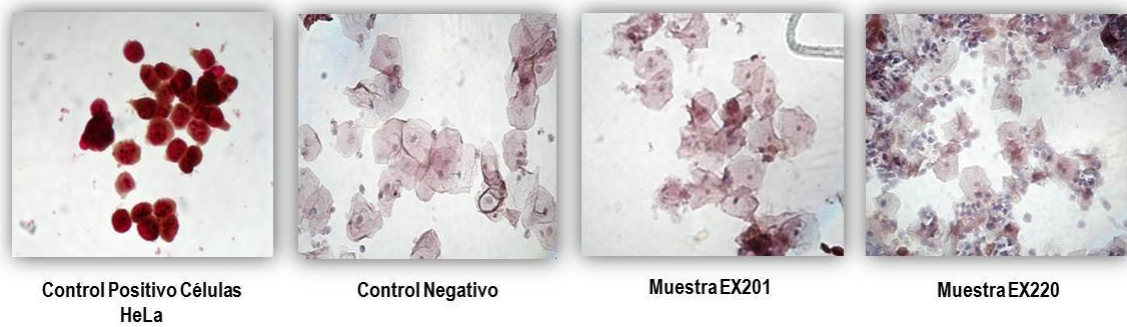


Figura 16. Tinción inmunocitoquímica de la muestra EP201, del Grupo D, con el kit CINtec Plus®. Control positivo (izquierda): Células de línea celular HeLa que presentan poco citoplasma color marrón y un gran núcleo color rojo brillante. Control negativo (centro): Células de muestra positiva a PCR de β -globina, pero negativa al PCR de VPH general, el citoplasma es abundante y ligeramente grisáceo mientras que el núcleo es pequeño y azulado. Muestra EP201 (derecha): Negativa para la expresión de las proteínas p16^{INK4a} y Ki-67 ya que no presenta ninguna célula con el citoplasma marrón y núcleo rojo brillante.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPadPrism, versión 6 para realizar el análisis estadístico mediante la prueba de Fisher, de las muestras positivas a algún tipo viral VPH 6, 11 y/o 33 (Grupo B), las muestras positivas a VPH 16 (Grupo C) y VPH 18 (Grupo D), así como un control negativo conformado por muestras celulares VPH negativas (Grupo A), los resultados se muestran a continuación.

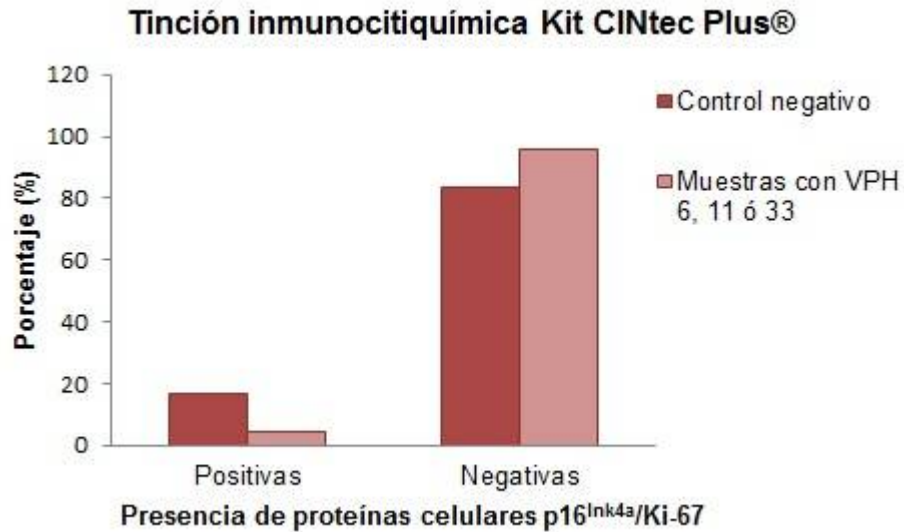


Figura 17. Resultados de la tinción inmunocitoquímica con el Kit de tinción CINTec Plus® entre el control (Grupo A) y las muestras positivas al tipo VPH 6, 11 y/o 33 (Grupo B).

La figura 17 muestra la comparación de las muestras positivas al tipo VPH 6, 11 y/o 33 (Grupo B) contra el control negativo (Grupo A), se observó que la mayoría de las muestras no presentaron las proteínas celulares p16^{INK4a} y Ki-67, por lo que resultaron negativas para la tinción, la diferencia con el control negativo no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

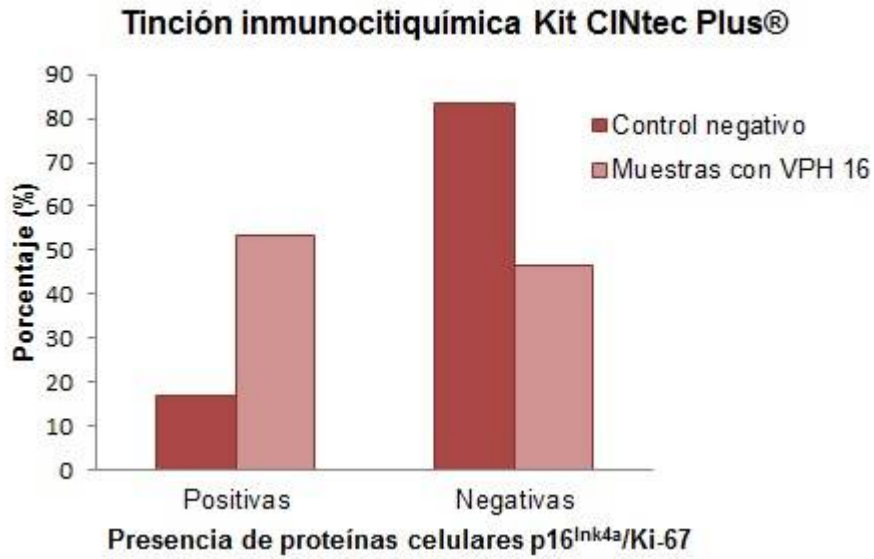


Figura 18. Resultados de la tinción inmunocitoquímica con el Kit de tinción CINtec Plus® entre el control (Grupo A) y las muestras positivas al tipo VPH 16 (Grupo C).

La siguiente figura, muestra la comparación entre las muestras del control negativo (Grupo A) y las muestras que resultaron positivas al tipo VPH 16 (Grupo C). Se encontró prevalencia de las muestras del grupo C positivas para la tinción, presentando ambas proteínas marcadoras, en comparación con las muestras que no presentaron dichas proteínas ($p=0.0415$). Por otro lado, en el grupo del control negativo, predominaron las muestras negativas.

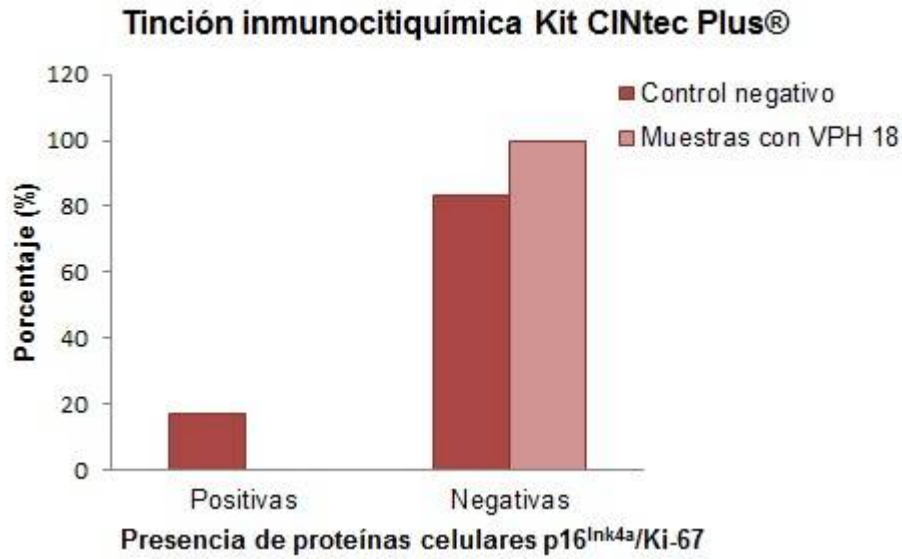


Figura 19. Resultados de la tinción inmunocitoquímica con el Kit de tinción CINtec Plus® entre el control (Grupo A) y las muestras positivas al tipo VPH 18 (Grupo D).

A continuación, en las muestras del grupo D, positivas a VPH tipo 18, ninguna resultó positiva a la presencia de las proteínas celulares p16^{INK4a} y Ki-67 indicadas por el kit de tinción. En comparación con el grupo control negativo, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

De las muestras de células recolectadas de la zona con ectopía cervical, que se analizaron para la identificación de ADN de algún tipo del virus del papiloma humano, solo el 8.33% fueron negativas, mientras que el 91.66% presentó ADN de algún tipo VPH (cuadro 8).

Lo anterior puede indicar la relación de la ectopía cervical con la infección por este virus, ya que se sabe por trabajos anteriores (Toon P G, 1986), incluidos los de nuestro grupo (Rocha-Zavaleta L, 2004; Monroy, 2010), que la presencia de ectopía cervical en el cuello uterino de la mujer, se puede considerar como un factor de riesgo para la obtención de infección por virus del papiloma humano. Esto es debido a la exposición de las células columnares del endocérvix en el ambiente ácido del exocérvix, lo que propicia que las células basales del epitelio escamoso se vuelvan accesibles para agentes potencialmente infecciosos, incluidos los tipos virales oncogénicos de alto riesgo como el tipo 16 y 18 del VPH (Tatti, 2008).

Comúnmente la ectopía cervical se trata clínicamente como un padecimiento normal al cual no se le da un seguimiento oportuno, lo que trae como consecuencia que la incidencia de infección por virus del papiloma humano, así como de cáncer cervicouterino sean altas (GLOBOCAN, 2008). Sería de gran ayuda entender más sobre la ectopía cervical y los tipos de VPH que se pueden encontrar en los diferentes tipos de epitelio en el cuello cervical, para tratar de

comprender el por qué se encuentran ahí, así como el impacto que ocasionan en la salud.

Por otro lado, la identificación del tipo viral del virus del papiloma humano en las muestras con ectopía cervical (cuadro 9), se detectó al tipo 16 como el más frecuente en comparación con los otros tipos virales. La mitad de las muestras (50%) presentaron ADN de VPH 16 mientras que, de la otra mitad, la mayoría (46.96%) presentó ADN de los tipos virales 6, 11 ó 33, y por lo tanto, la fracción más pequeña presentó ADN de VPH tipo 18 (3.03%). Estos resultados concuerdan con uno de los trabajos de nuestro grupo (Rocha-Zavaleta L, 2004), en el que se encontró que la infección por virus de papiloma humano tipo 16 es más común en pacientes con ectopía cervical, aunque por otro lado, no concuerda con otro trabajo también de nuestro grupo (Monroy, 2010), en el que prevaleció el VPH tipo 18 sobre el tipo 16, también en pacientes con ectopía cervical.

Cabe mencionar que en el trabajo de Monroy, 2010; las muestras de tejido columnar expuesto, se recolectaron mediante biopsias dirigidas colposcopicamente, se analizaron histopatológicamente para corroborar la presencia de epitelio glandular y se analizaron con dos conjuntos diferentes de oligonucleótidos (MY09-MY11 y L1C1-L1C2) para la identificación de los tipos virales presentes, por lo que la técnica usada resultó más específica, mientras que en el trabajo de Rocha-Zavaleta L, 2004, las muestras se trataron de forma más

sencilla, lo que confirmó que el ADN con el que se trabajó fue extraído tanto de tejido columnar como escamoso, por lo que no se logró demostrar que las células infectadas con VPH fueran de naturaleza endocervical.

En el presente estudio, trabajamos con muestras celulares de citologías exfoliativas de la zona de ectopía cervical, que se recolectaron mediante un cepillo citológico “cytobrush”. Se sabe que con esta técnica de recolección es fácil recoger células columnares y escamosas a la vez, por lo que creemos que al igual que en el trabajo de Rocha-Zavaleta, 2004; las muestras contenían ADN de células tanto de tejido columnar como escamoso y por lo tanto no podemos concluir que subtipo del virus del papiloma humano se encuentra en un tejido específico.

Es de gran importancia continuar con la determinación de los tipos virales que se podrían encontrar específicamente en los diferentes tipos de epitelios en el cuello uterino para tratar de comprender el porqué de su localización, así como para tomar las medidas necesarias en caso de que presenten actividad oncogénica.

En cuanto a los resultados de la tinción inmunocitoquímica, en la que se buscó la presencia de las proteínas marcadoras p16^{INK4a} y Ki-67, las muestras estudiadas se clasificaron como:

Grupo A) Control negativo. Muestras negativas para la presencia de ADN de virus del papiloma humano.

Grupo B) Muestras positivas a la presencia de ADN de virus del papiloma humano tipo 6, 11 y/o 33.

Grupo C) Muestras positivas a la presencia de ADN de VPH solamente del tipo 16.

Grupo D) Muestras positivas a la presencia de ADN de VPH solamente del tipo 18.

Los resultados mostraron una fuerte asociación (16/30 muestras, 53.33%) entre la presencia de las proteínas p16^{INK4a} y Ki-67 con la infección por virus del papiloma humano tipo 16 (clasificado como un tipo viral oncogénico de alto riesgo), reportado en trabajos como el de Donà, 2012; en el que se encontró la misma asociación de estas proteínas marcadoras con la presencia de infección por VPH de alto riesgo resultó dos veces más fuerte para los tipos VPH16 y VPH18 que para los demás tipos.

Esto también concuerda con nuestros resultados en el grupo B (muestras positivas a VPH tipo 6, 11 y/o 33) ya que solo una muestra (4.16%) presentó las proteínas marcadoras. Esto se puede deber a que la proteína E7 de los tipos VPH de alto riesgo (como el tipo 16 y 18) se une más fuertemente a la proteína del retinoblastoma (pRb), en comparación con las proteínas de los tipos virales de bajo riesgo, estimulando así la progresión de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular y originando la sobreexpresión de p16^{INK4a} en la célula infectada, lo que junto con la expresión de la proteína de proliferación Ki-67, se interpreta como la pérdida del

control celular junto con una proliferación activa, lo que eventualmente se puede traducir como un potencial proceso oncogénico.

Por otro lado, se encontró que ninguna de las muestras positivas a la presencia de ADN de VPH18, presentó las proteínas p16^{INK4a} y Ki-67, resultado estadísticamente no significativo ($p > 0.05$) ya que el tamaño de la población de este grupo resultó muy pequeño (2 muestras positivas a la presencia de ADN de VPH18); mientras que en el grupo control negativo dos muestras resultaron positivas para las proteínas p16^{INK4a} y Ki-67, posiblemente debido a la falta de especificidad en la técnica de identificación usada, ya que se sabe que diferentes sistemas de oligonucleótidos tienen patrones de detección discrepantes (Speich, 2004) y por lo tanto pueden permitir la presencia de muestras falsas negativas (Lee, 2007)

Otros estudios en los cuales se trabajó con el kit de tinción inmunocitoquímica CINtec Plus®, encontraron resultados semejantes que han indicado su elevada sensibilidad y especificidad relacionada fuertemente con la presencia de lesiones intraepiteliales de alto y bajo grado (por sus siglas en inglés H-SIL y L-SIL, respectivamente), con neoplasias cervicales intraepiteliales, grado 1, 2 o 3 (CIN, por sus siglas en inglés), con células glandulares atípicas (AGC, por sus siglas en inglés) y para los resultados catalogados como células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US, por sus siglas en inglés) en la prueba de Papanicolaou (Singh M, 2011; Schmidt, 2011 y Donà, 2012), en

comparación con la identificación de VPH por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Donà, 2012; Singh M, 2011), además ésta técnica de tinción doble no requiere correlación de los resultados con la morfología celular o la evaluación del número de células reactivas, lo que disminuye la variabilidad interobservador (Singh M, 2011). Lo anterior indica que en muestras de ectopía cervical, un fenómeno benigno del útero que se produce durante la adolescencia y el primer embarazo, en las que se encontró infección por algún tipo VPH de alto riesgo junto con la expresión de las proteínas p16^{INK4a} y Ki-67, puede existir una alteración del ciclo celular, así como una proliferación descontrolada, lo que se podría interpretar como una potencial transformación de las células hacia la malignidad.

Por este motivo se considera de gran importancia proporcionar mayor vigilancia a los casos de pacientes en los que hay presencia de ectopía cervical relacionada o no con el uso de anticonceptivos orales, así como de infección por virus del papiloma humano de alto riesgo, ya que, al igual que en las lesiones antes mencionadas, la presencia en conjunto de las proteínas p16^{INK4a} y Ki-67 podrían indicar la potencial existencia de un proceso oncogénico, con el cual se podría determinar la posibilidad de evolución a lesiones más graves. Es así que a medida en que se detecte desde una etapa más temprana, será más fácil proporcionar el tratamiento adecuado para tratar y limitar el curso de la infección.

IX. CONCLUSIONES

- Se encontró relación de la presencia de ectopía cervical con la infección por virus del papiloma humano de alto riesgo tipo 16, en muestras de citologías exfoliativas de la zona de ectopía cervical del cuello cervicouterino.
- De acuerdo a nuestro trabajo, el tipo 16 de alto riesgo del virus del papiloma humano se presentó con mayor frecuencia en muestras de citologías exfoliativas de la zona de ectopía cervical del cuello cervicouterino, en comparación con otro tipo viral de alto riesgo, el virus del papiloma humano tipo 18.
- Encontramos relación entre la presencia de infección de virus del papiloma humano de alto riesgo tipo 16 con la expresión de la proteína marcadora de progresión celular (de la fase G₁ a la fase S) p16^{INK4a}, y la proteína de proliferación celular Ki-67, igualmente en muestras de citologías exfoliativas de la zona de ectopía cervical del cuello cervicouterino.

Por estas razones se recomienda el oportuno seguimiento y atención clínica a pacientes que presenten ectopía cervical, así como infección por algún tipo de virus del papiloma humano de alto riesgo, ya que al ser un padecimiento frecuente y común en la mujer, es de gran importancia no restarle valor en el diagnóstico colposcópico.

Sería de gran utilidad realizar un estudio más detallado sobre la preferencia de los tipos de virus del papiloma humano en los diferentes epitelios con los que está formado el cuello cervicouterino, así como en su prevalencia.

X. Referencias.

1. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversväd C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2001; **37**: 246-250.
2. Gerdes J, Lemke H, Baish H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984; **133**: 1710-1715.
3. Tatti S. A. Colposcopia y patologías del tracto genital inferior. En la era de la vacunación. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
4. Monroy O, Aguilar C, Lizano M, Cruz-Talonia F, Cruz RM, Rocha-Zavaleta L. Prevalence of human papillomavirus genotypes, and mucosal IgA anti-viral responses in women with cervical ectopy. *J ClinVirology*. 2010; **47**: 43-48.
5. Rocha-Zavaleta L, Yescas G, Cruz RM, Cruz-Talonia F. Human papilomavirus infection and cervical ectopy. *Int J Gynecol Obstet*. 2004; **85**: 259-266.
6. DiSaia P. J. *Oncología ginecológica clínica*. 6ª ed. Madrid: Mosby; 2002.
7. Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2002; **61(2)**: 69-90.
8. GLOBOCAN 2008. 3/04/2013. [internet]. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp#WOMEN>. 2013.
9. de Villiers E M, Gissmann L, ZurHausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virol*, 1981; **40**: 932-935.

10. ZurHausen H. Human genital cancer; synergism between two virus infections and/or synergism between a virus infection and initiating events?. *Lancet* II. 1982; 1370–1372
11. ZurHausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996; **1288**: 55–78.
12. ZurHausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 1999; **111**: 581 – 587.
13. Fuchs E. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J CellSciSuppl.* 1993; **17**: 197-208.
14. Demeter I M, Stoler M H, Broker T R, Chow L T. Induction of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in differentiated epithelium in productively infected human papillomavirus-infected lesions. *Human Pathol.* 1994; **25**: 343-8.
15. Cheng S, Schmidt-Grimminger D-C, Murant T, Broker T R, Chow L T. Differentiation dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 1995; **9**: 2335-49.
16. Genovese N J, Banerjee N S, Broker T R, Chow L T. Casein kinase II motif-dependent phosphorylation of the human papillomavirus E7 protein promotes p130 degradation and S-phase induction in differentiated human keratinocytes. *J Virol.* 2008; **82**: 4862-73.
17. Chow L, Broker T, Steinberg B. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *AMPIS.* 2010; **118**: 422-449.

18. Altirriba EJ, Cala FJ. Licenciatura ginecológica. Barcelona: Ediciones Científicas y Tecnológicas S. A.; 1990.
19. zurHausen H. Infections causing human cancer. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
20. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. Virology. Vol. 2. 3^a ed. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins; 1996.
21. Acheson NH, Fundamentals of molecular virology. United States of America: John Wiley & Sons; 2007.
22. Gerein V, Rastorguev E, Gerein J, Draf W, Schirren J. Incidence, age at onset and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients. 20 years experience. Otolaryngol Head Neck Surg. 2005; **132**: 392-4.
23. zurHausen H. Papillomaviruses and cancers from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002; **2**: 342-50.
24. Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. Dis Markers. 2007; **23**: 297-313.
25. Fields B, Knipe D, Howley P, Chanock R, Melnick J, Monath T, et al. Virology. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins; 1996.
26. Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de González A, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 2006; **S3**: 1-10.

27. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* 2003; **77**: 13125-13135.
28. Abban C Y, Meneses P I. Usage of heparan sulfate, integrins and FAK in HPV16 infection. *Virology.* 2010; **403**: 1-16.
29. Evander M, Frazer I H, Payne E, Qi Y M, Hengst K, McMillan N A. Identification of the α_6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* 1997; **71**: 2449-2456.
30. Culp T D, Budgeon L R, Marinkovich M P, Meneguzzi G, Christensen N D. Keratinocyte-secreted laminin-5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol.* 2006; **80**: 8940-8950.
31. Patterson N A, Smith J L, Ozbun M A. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J Virol.* 2005; **79**: 6838-6847.
32. Joyce J G, Tung J S, Przysiecki C T, Cook J C, Lehman E D, Sands J A, Jansen K U, Keller P M. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans of human keratinocytes. *J BiolChem.* 1999; **274**: 5810-5822.
33. Culp T D, Christensen N D. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirusvirions. *Virology.* 2004; **319**: 152-61.

34. Florin L, Becker K A, Lambert C, Nowak T, Sapp C, Strand D, et al. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2. *J Virol.* 2006; **80**: 6691-6.
35. Darshan M S, Lucchi J, Harding E, Moroianu J. The L2 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J Virol.* 2004; **78**: 12179-88.
36. Day P M, Baker C C, Lowy D R, Schiller J T. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *ProcNatlAcadSci U S A.* 2004; **101**: 14252-7.
37. Loo Y M, Melendy T. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol.* 2004; **78**: 1605-1615.
38. Masterson P J, Stanley M A, Lewis A P, Romanos M A. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase α -primase p68 subunit. *J Virol.* 1998; **72**: 7407-7419.
39. Conger K L, Liu J S, Kuo S R, Chow L T, Wang T S. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 proteins and two subunits of human DNA polymerase α /primase. *J BiolChem.* 1999; **274**: 2692-2705.
40. Stenlund A. Initiation of DNA replication; lesions from viral initiator proteins. *NatRev Mol Cell Biol.* 2003; **4**: 777-85.
41. You J, Croyle J, Nishimura A, Ozate K, Howley P. Interactions of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell.* 2004; **117**: 349-360.

42. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *ClinSci*. 2006; **110**: 525-541.
43. Massimi P, Pim D, Bertoli C, Bouvard V, Banks L. Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene*. 1999; **18**: 7748-54.
44. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogen*. 1998; **17**: 2943-2954.
45. Li B, Dou Q P. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and pregression. *ProcNatlAcadSci*. 2000; **97**: 3850-55.
46. Klingelhutz A J, Foster S A, McDougall J K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 1996; **380**: 79-82.
47. Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L, Banks L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*. 2002; **21**; 5088-5096.
48. Bodily J M, Meyers C. Genetic analysis of the human papillomavirus type 31 differentiation-dependent late promoter. *J Virol*. 2005; **76**: 3309-3321.
49. Spink K M, Laimins L A. Induction of human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J Virol*. 2005; **79**: 4918-4926.
50. Middleton K, Peh H, Southern S A, Griffin H M, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during

neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers.

J Virol. 2003; **77**: 10186-201.

51. Krawczyk E, Supryniewicz F A, Sudarshan S R, Schleger R. Membrane orientation of human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. J Virol. 2010; **84**: 1696-703.

52. Disbrow G L, Hanover J A, Schleger R. Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 proteins alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. J Virol. 2005; **79**: 5839-5846.

53. Hwang E S, Nottoli T, Dimaio D. The HPV 16 E5 protein: expression, detection and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. Virology. 1995; **211**: 227-233.

54. Straight S W, Herman B, McCance D J. The E5 oncoprotein of HPV 16 inhibits acidification of endosomes in human keratinocytes. J Virol. 1995; **69**: 3185-3192.

55. Crusius K, Rodríguez I, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. Virus Genes. 2000; **20**: 65-69.

56. Hines C S, Meghoo C, Shetty S, Biburger M, Brenowitz M, Hedge R S. DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus E2 proteins. J Mol Biol. 1998; **276**: 809-818.

57. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1^{E4} and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991; **352**: 824-827.
58. Roberts S, Ashmole I, Rookes S, Gallimore P. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1^{E4} protein shows that the C-terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol*. 1997; **71**: 3554-62.
59. Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, Davy C, Masterson P J, Walker P A, Laskey P, Omary M B, Doorbar J. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1^{E4} protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament re-organization. *J Virol*. 2004; **78**: 821-833.
60. Brown D R, Kitchin D, Qadradl B, Neptune N, Batterger T, Ermel A. The human papillomavirus type 11 E1^{E4} protein is a transglutaminase 3 substrate and induces abnormalities of the cornified cell envelope. *Virology*. 2006; **345**: 290-298.
61. Bryan J T, Brown D R. Association of the human papillomavirus type 11 E1^{E4} protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology*. 2000; **277**: 262-269.
62. Zhao X, Rush M, Schwartz S. Identification of an hn-RNP A1-dependent splicing silencer in the human papillomavirus type 16 L1 coding region that prevents premature expression of the late L1 gene. *J Virol*. 2004; **78**: 10888-10905.

63. Cumming S A, McPhillips M G, Veerapraditsin T, Milligan S G, Graham S V. Activity of human papillomavirus type 16 late negative regulatory element is partly due to four weak consensus 5' splice sites that bind a U1 snRNP-like complex. *J Virol*, 2003; **77**: 5167-5177.
64. McPhillips M G, Veerapraditsin T, Cumming S A, Karali D, Milligan S G, Boner W, Morgan I M, Graham S V. S2F/ASF bind the human papillomavirus type 16 late RNA control element and is regulated during differentiation of virus-infected epithelial cells. *J Virol*. 2004; **78**: 10598-10605.
65. Buck C B, Pastrana D V, Lowy D R, Schiller J T. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol*. 2004; **78**: 751-757.
66. Day P M, Roden R B S, Lowy D R, Schiller J T. The papillomavirus minor capsid protein, L2 induces localization of major capsid protein L1 and the viral transcription/replication protein E2 to PML oncogenic domains. *J Virol*. 1998; **72**: 142-150.
67. Florin L, Sapp C, Streeck R E, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*. 2002; **76**: 10009-10014.
68. Roden R B, Lowy D R, Schiller J T. Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis*. 1997; **176**: 1076-1079.
69. Stauffer Y, Raj K, Masternak K, Beard P. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J Mol Biol*. 1998; **283**: 529-536.
70. Roden R B, Day P M, Bronzo B K, Yutzy W H, Yang Y, Lowy D R, Schiller J T. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol*. 2001; **75**: 10493-10497.

71. Zhang P, Nouri M, Brandsma J L, Iftner T, Steinberg B M. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology*. 1999; **263**: 388-394.
72. Stoler M H, Rhodes C R, Whitbeck A, Wolinsky S, Chow L T, Broker T R. Gene expression of human papillomavirus type 16 and 18 in cervical neoplasias. *Human Pathol*. 1992; **23**: 117-28.
73. Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Differential regulation of the pocket domains of the Retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *CellGrowthDiffer*. 1997; **8**: 1277-1286.
74. Boyer S N, Wazer D E, Band V. E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996; **56**: 4620-24.
75. Alberts B, et al. *Molecular biology of the cell*. United States of America: Garland Publishing; 1983.
76. Romagosa A, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart M E, Castellvi J, Ramon y Cajal S. p16^{INK4a} overexpression in cáncer: a tumor supreso gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011; **30**:2087-2097.
77. Munger K, Werness B A, Dyson N, Phelps W C, Harlow E, Howley P M. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the Retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989; **8**: 4099-4105.
78. Huang P S, Patrick D R, Edwards G, Goodhart P J, Huber H E, Miles L, et al. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene

- product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol Cell Biol.* 1993; **13**: 953-950.
79. Reuschenbach M, Waterboer T, Wallin K L, Eienkel J, Dillner J, Hamsikova E, et al. Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV 16 E6 and HPV 16 E7 in patients with HPC-associated cancers. *Int J Cancer.* 2008; **123**: 2626-2631.
80. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J CellPhy.* 2000; **182**: 311-322.
81. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J immunol.* 1984; **133**: 1710-1715.
82. Singh M, Mockler D, Akalin A, Burke S, Shroyer A L, Shroyer K R. Immunocytochemical colocalization of p16^{INK4a} and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/Adenocarcinoma. *CancerCytopathol.* 2012; **120(1)**: 26-34.
83. Gutiérrez Palacios, Elsa Guadalupe. 2009. Detección de aberraciones cromosómicas numéricas en pacientes con diagnóstico inflamatorio, Tesis de Maestría, México D. F., Universidad Nacional Autónoma de México, Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias.
84. Magdalena C, Koraljka H, Lada M, Marijan I, Marijan Z, Dubrauko L, Josip L, Branko H, Veselko G, Asim K, Zvonko K, Kresimir P. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal Cytology. *Eur J Epidemiol.* 1997; **13**: 645-651.

85. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America, 1989.
86. Herrel NR, Johnson NL, Cameron JE, Leigh J, Hagensse ME. Development and validation of a HPV-32. Specific PCR assay. *J Virol.* 2009; **6**: 90.
87. Meshkat Z, Hassan ZM, Soleimanjadi H, Mahmoodi H, Mirshahabi H, FarhadiLangeroudi M. Detection of Human Papillomaviruses type 16 and 18 by PCR and RFLP in paraffin-embedded cervical cancer tissue specimens. *Archives of RaziInstitute.* 2006; **61** (3): 159-165.
88. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *CancerCells.* 1989; **7**: 209-14.
89. Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods.* 2000; **88**: 125-134.
90. De la Cruz-Hernández E, García-Carrancá A, Mohar-Bentancourt A, Dueñas-Gonzalez A, Contreras-Paredes A, Pérez-Cardenas E, Herrera-Goepfert R, Lizano-Soberón M. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol.* 2005; **86**: 2459-2468.
91. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1996; **34**: 2095-100.

92. Toon P G, Arrand J R, Wilson L P, Sharp D S. Human Papillomavirus infection of the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasia. *Br Med J.* 1986; **293**: 1261-4.
93. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, Carosi M, Vocaturo G, Benevolo M. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *GynecolOncol.* 2012, **126**: 198-202.
94. Singh M, Mockler D, Akalin A, Burke S, Shroyer AL, Shroyer KR. Immunocytochemical colocalization of p16^{INK4a} and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/Adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2012, **120**: 26-34.
95. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. Results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytophatol.* 2011, **119**: 158-66.