



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN

MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“EXPRESIÓN DE Ki-67, TOPOISOMERASA II
α/MCM2 EN LESIONES ESCAMOSAS
INTRAEPITELIALES DE BAJO GRADO CON VIRUS
DE PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

BRENDA MAGALI LIN-LI LAGUNAS BUCIO

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

CHILPANCINGO, GRO., DICIEMBRE DE 2010.

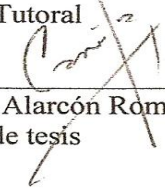


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

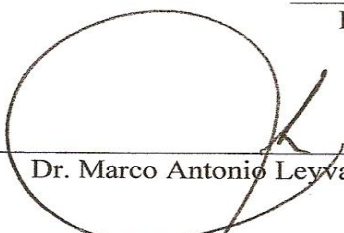
APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 9 días del mes de julio de dos mil diez, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “**Expresión de Ki-67, topoisomerasa II α /MCM2 en lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado con virus de papiloma humano de alto riesgo**”, presentada por la alumna Brenda Magali Lin-Li Lagunas Bucio, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

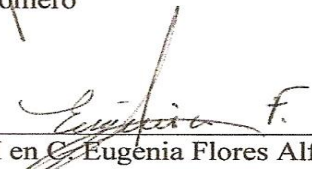
El Comité Tutorial



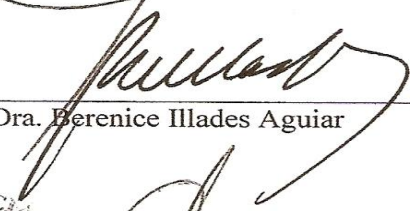
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero
Dirección de tesis



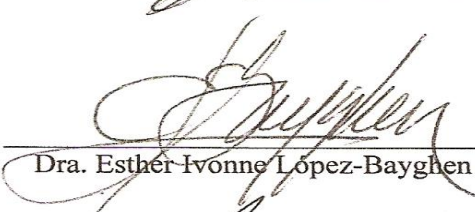
Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez



M en C. Eugenia Flores Alfaro

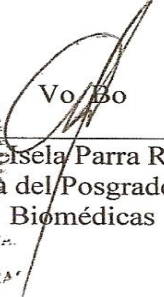


Dra. Berenice Illades Aguiar



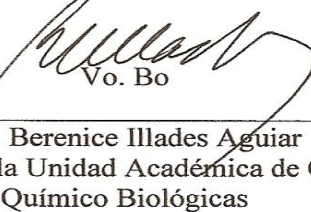
Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Vo. Bo




Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias
Biomédicas

Vo. Bo



Dra. Berenice Illades Aguiar
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas


UNIDAD ACADÉMICA
DE CIENCIAS
QUÍMICO BIOLÓGICAS



ÍNDICE.	PÁGINA
I.RESUMEN	2
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCION	6
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	10
V. RESULTADOS	14
VI. DISCUSIÓN	24
VII. ANEXOS	30
VIII. REFERENCIAS	31

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de investigación en Citopatología de la Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Chilpancingo Guerrero, México.

Bajo la dirección de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

La Tutoría de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

La Asesoría de:

Dra. Berenice Íllades Aguíar

Dra. Esther López Bayghen

MC. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Durante el periodo en que se curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Brenda Magali Lin-li Lagunas Bucio recibió la beca CONACYT.

Esta investigación se desarrollo con el financiamiento otorgado por el apoyo a la reincorporación de exbecarios PROMEP/SEP UAGRO 106 (Nov 2007-2010).

Asimismo se agradece al Banco Santander Serfín por la beca otorgada de Movilidad Santader Universia, durante el periodo de Febrero-Junio 2010.

EXPRESIÓN DE KI-67 Y TOPOISOMERASA II α /MCM2 EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE BAJO GRADO CON VIRUS DE PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO.

I. RESUMEN:

Introducción. Las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) son lesiones tempranas del carcinoma invasor que pueden revertir de manera espontánea. La integración del VPH-AR es un evento clave en la progresión, debido a que conduce a la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 que alteran la expresión de proteínas del ciclo celular como el antígeno nuclear Ki-67, MCM2 y Topoisomerasa II α (TOP2A). La evaluación de la expresión de estas proteínas así como el estado físico del DNA del VPH-AR podría permitir monitorear el avance de la lesión cervical. **Objetivo.** Evaluar la expresión de Topoisomerasa II α /MCM2, Ki-67 y el estado físico del DNA del VPH-AR en LEIBG, como marcadores de lesiones cervicales precoces. **Metodología.** Se realizó un estudio transversal analítico en el que se incluyeron 125 muestras de Citología en base líquida (Kit liquid-PREP™). Se realizó inmunocitoquímica para la expresión de Ki-67 (MIB-1-DAKO), TOP2A/MCM2 (ProExC) e hibridación *in situ* con amplificación con tiramida utilizando una sonda que incluye 13 VPH-AR, para determinar el estado físico del VPH-AR. Se utilizó PCR/RFLP y secuenciación para tipificar VPH-AR. **Resultados.** Se diagnosticaron 25 citologías sin LEIBG y sin VPH, 50 citologías sin LEIBG+VPH-AR y 50 citologías con LEIBG más VPH-AR. El VPH-16 fue más frecuentemente encontrado con un 84% tanto en LEIBG como en las citologías sin LEI, ambas con VPH-AR seguido del VPH-18 y 45. La expresión de las proteínas fue nuclear. El 98% de las LEIBG más VPH-AR y el 88% de las citologías sin LEI más VPH-AR, fueron positivos a Ki-67, el 94% de las citologías sin LEI más VPH-AR y LEIBG más VPH-AR fueron positivas a la expresión de TOP2A/MCM2, ($p < 0.0001$) para ambos marcadores. Las mujeres que presentaron la expresión de Ki-67 y el estado puntiforme (integrado) del virus tienen 32.1 más riesgo de desarrollar una LEIBG, mientras, que las mujeres que presentaron el estado puntiforme y la expresión de TOP2A/MCM2 positiva tienen 35.5 veces más riesgo de desarrollar una LEIBG. **Conclusiones.** La integración del VPH-16 se relaciona con la sobreexpresión de las proteínas TOP2A/MCM2 y Ki-67.

Palabras clave: Ki-67, Topoisomerasa II α /MCM2, Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado

II. ABSTRACT

Introduction: Squamous intraepithelial lesion of low grade (LSIL) are early lesions of invasive carcinoma that may revert spontaneously, but the integration of HR-HPV is suggested, this is a key event in the progression, because it leads to overexpression of the E6 and E7 oncoproteins that alter the expression of cell cycle proteins such as Ki-67 nuclear antigen, MCM2 and Topoisomerase II α (TOP2A), so that the expression of these proteins as well as the physical state of HR-HPV DNA may allow monitoring the progression of cervical lesion. **Objective.** Evaluate the expression of Topoisomerase II α / MCM2, Ki-67 and the physical state of HR-HPV DNA in SIL, as markers of early cervical lesions. **Methods.** We performed a cross sectional study and included 125 samples of liquid based cytology (Kit liquid-PREP™). We performed immunocytochemistry for the expression of Ki-67 (MIB-1-DAKO), TOP2A/MCM2 (ProExC) an *in situ* hybridization with tyramide amplification using a probe that includes 13 HR-HPV, to determine the physical state of HR-HPV. We use PCR/RFLP and sequencing to characterize HR-HPV. **Results.** 25 were diagnosed cytology without SIL and without HPV, 50 cytology without SIL plus HR-HPV and 50 LSIL plus HR-HPV. HPV-16 was found most frequently in 84% of the LSIL and in group without SIL followed by HPV-18 and 45. The expression of this proteins it observed in the nucleus. 98% of LSIL plus HR-HPV and 88% of cytology without SIL plus HR-HPV were positive for Ki-67, 94% of smears without SIL plus HR-HPV and LSIL plus HR-HPV were positive TOP2A/MCM2 expression, ($p < 0.0001$) for both markers **Conclusions.** The integration of HPV-16 is associated with the overexpression of Ki-67 and TOP2A/MCM2 proteins.

Key words: Ki-67, Topoisomerase II α / MCM2, Squamous intraepithelial lesion of low grade

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero por el apoyo y confianza que deposito en mí para realizar este trabajo, por el tiempo dedicado a la realización de este trabajo no solo como directora, también como mi tutora. Gracias!!!

A la M en C. Eugenia Flores Alfaro, por todas sus aportaciones a este trabajo, por su tiempo y disposición, por los consejos y las palabras de aliento muchas gracias Maestra.

A la Dra. Berenice Íllades Agúar por sus valiosas aportaciones y colaboración para la realización de este trabajo.

A la Dra. Esther López-Bayghen Patiño, gracias por la disposición y las valiosas aportaciones realizadas.

Al Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez por su colaboración y apoyo en la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios por haberme permitido llegar hasta aquí, por todas las bendiciones que me has dado.

A mi mami, por todos tus consejos, por esas noches de desvelo compartidas, gracias por tu confianza y tu amor, eres mi ángel.

A mi papá por tu apoyo, porque sin ti esto no habría sido posible. Gracias por tu dedicación. Una estrella más papi.

A mis hermanos, muchas gracias chaparritos por que han sido una parte muy especial de este sueño, los amo.

A mis amigos de la MCB Lupita, Nathy, Betza, Jesús, Adrian, Jorge, Pepe Rivera por todos los buenos momentos que vivimos durante estos dos años, a todos los llevo en mi corazón.

A mis amigas Irais, Norma Edith, Vicky, Magaly, por todo su apoyo en los momentos difíciles, las quiero mucho chicas.

III. INTRODUCCIÓN:

El carcinoma invasor de cérvix uterino es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, en México representa la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Las etapas precursoras del carcinoma invasor están clasificadas citológicamente de acuerdo con el sistema Bethesda como lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) de bajo grado (LEIBG) y alto grado (LEIAG). Estas lesiones, están asociadas con la infección por el virus de papiloma humano (VPH), especialmente los tipos de alto riesgo (VPH-AR) tales como 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, en su mayoría estas lesiones regresan espontáneamente, sin embargo, diferentes factores pueden ser necesarios para la progresión a cáncer cervical (Munger *et al.*, 2004, Arias-Pulido *et al.*, 2006). Las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR, tienen propiedades de transformación celular e interactúan con proteínas del ciclo celular, lo que conduce a anormalidades cromosómicas e induce aneuploidía, así mismo, la pérdida de estabilidad genética del huésped favorece la integración del DNA viral, lo que representa un evento clave en la progresión de las lesiones. El DNA viral en la célula infectada puede encontrarse de tres formas: integrado al genoma celular, libre en el núcleo (forma episomal) o bien, en forma mixta (integrada y episomal). Los estudios *in vitro*, han demostrado que cultivos celulares en los que el DNA del VPH-16 está integrado, poseen ventajas de crecimiento en comparación con cultivos celulares que mantienen el genoma del VPH-16 en estado episomal (Pyeon *et al.*, 2009, Garcia-Tamayo *et al.*, 2009, Saunier *et al.*, 2008)

Kulmala *et al.* (2005) analizaron el estado físico del VPH-16 por medio de PCR en tiempo real en 127 mujeres con citología normal, 7 con ASCUS, 13 con LEIBG, 6 con LEIAG y 7 de carcinoma cervical, reportando encontrar la forma mixta tanto en muestras negativas, como en LEIBG. Estos resultados concuerdan con estudios en líneas celulares positivas al VPH-33 y VPH-16, donde encontraron que estas líneas, mostraban tanto patrones de señal difusa (episomal) como de señal puntiforme (integrado), por lo que se sugiere que el evento de integración puede ser un evento temprano en la carcinogénesis cervical (Kulmala *et al.*, 2006).

La infección de células cervicales por el VPH-AR, se manifiesta por cambios en la función productiva de los genes. Los estudios de expresión génica han demostrado la alteración de proteínas involucradas en la proliferación celular (fase S) como las proteínas de mantenimiento de minicromosoma 2 (MCM2), Topoisomerasa II α y Ki-67 que están involucradas en la síntesis y la proliferación celular normal, por lo que estas proteínas pueden ser marcadores de la desregulación del ciclo celular (Mimica *et al.*, Kelly *et al.*, 2006)

Las proteínas del mantenimiento del minicromosoma o MCM, pertenecen a la familia de moléculas conservadas que son esenciales para la inicio de replicación del DNA y son activadas por la acción de cinasas de la fase S. Seis de estas proteínas MCM2-MCM7 interactúan entre sí para formar un complejo que desempeña un papel directo en los orígenes de replicación (Shechter and Gautier, 2004, Garcia-Tamayo *et al.*, 2009)

MCM2 es esencial para el inicio de replicación del DNA, conduce a la formación de un complejo pre-replicative durante la fase G₁, limitando la replicación a una vez por ciclo, esta proteína se detecta solamente en células en proliferación (Feng Tan *et al.* 2001, Siddiqui *et al.* 2008). Esta proteína se ha encontrado sobreexpresada en displasias cervicales en presencia de la infección por VPH-AR como el 16 y 18 con la subsecuente activación descontrolada de transcripción de genes y la inducción aberrante de la fase S, mediada por el factor de transcripción E2F (Shi *et al.* 2007).

La Topoisomerasa es una enzima que altera la topología del DNA, elimina la torsión y tensión de la cadena de DNA, juega un papel importante en los procesos replicativos y es necesaria para la segregación de cromátidas hermanas durante la mitosis y meiosis. Esta enzima cataliza la rotura transitoria y la ligación de las dos hebras de DNA (Depowski *et al.*, 2000, Deweese *et al.*, 2008)

Jianhui Shi *et al.* (2007) evaluaron la expresión conjunta de MCM2/Topoisomerasa II alfa, a través del anticuerpo recombinante llamado ProExC, además de p16^{INK4a} en 14 muestras de mucosa escamosa benigna, 34 de LEIBG y 14 muestras de

LEIAG con infección por VPH-AR, encontrando que el 94.1% de las LEIBG y 78.6% de las LEIAG, fueron positivas para MCM2/Topoisomerasa II alfa, mientras que una mezcla de p16/ MCM2/Topoisomerasa II alfa, es capaz de identificar el 100% de los casos de LEIBG y LEIAG. Por su parte, Shroyer *et al.* (2006), en un análisis de 40 biopsias observaron la expresión de Topoisomerasa II alfa/MCM2 en el 20% (2) de 10 casos de células escamosas atípicas de significancia indeterminada, el 50% (5) de 10 LEIBG, y el 100% (10) de los casos de LEIAG en muestras citológicas, sugiriendo que estas proteínas pueden ser utilizados en la detección de lesiones de bajo y alto grado.

Ki-67 es un antígeno de proliferación descubierto por Gerdes *et al.* (1983), el cual se localiza dentro del núcleo celular y contiene sitios de fosforilación para una gran variedad de cinasas. Esta molécula se encuentra presente en cada división celular (G1, S, G2/M) pero ausente en células quiescentes, es muy adecuado para la identificación de células en proliferación, provee información acerca de la malignidad de un tumor y sobre la respuesta a cierta terapia. Se sugiere que la evaluación conjunta de Ki-67 con otras proteínas alteradas del ciclo celular, representa una alternativa para la detección de células tumorales residuales postratamiento (Scholzen and Gerdes, 2000, A N Y Cheung, 2004, Yang *et al.*, 2006).

Estudios realizados por Cheung *et al.* (2004); sugieren que Ki-67 puede ser un marcador confiable en el diagnóstico citológico debido a que el número y distribución de células positivas a Ki-67, se relaciona con el grado de LEI, mientras que el índice de positividad en células normales es bajo e incrementa gradualmente con la LEI. Por su parte, Cambruzzi *et al.* (2005); reportaron asociación entre la presencia de VPH-AR y la expresión de Ki-67, observando la expresión de Ki-67 en 31.5% (79) de LEI, con el 12.5% en las LEIBG y 87.5% en LIEAG, y que el 79.4% (182) de los casos se asoció a la presencia de VPH-AR-16 (34%) y tipo 18 (51%), sugiriendo que el VPH-AR, promueve alteraciones directas en la mitosis desregulando el ciclo celular lo que puede ser estimado por la expresión de Ki-67.

En la actualidad, las pruebas utilizadas en la detección oportuna del carcinoma invasor no han sido suficientes, aunque un porcentaje significativo de mujeres ha sido controlado, aproximadamente 30% pueden tener un resultado falso negativo debido a errores en la toma de muestra o en la interpretación en la prueba de Papanicolaou. En el caso de mujeres con atipia leve, el estudio colposcópico, la biopsia y los estudios moleculares son necesarios para descartar las LEIAG (Kelly *et al.*, 2006). De tal forma que las investigaciones han sido orientadas al desarrollo y uso de marcadores moleculares que puedan identificar las células que han sufrido transformación, y no simplemente identificar los efectos citopáticos virales transitorios, contribuyendo a la detección oportuna del cáncer cervicouterino.

Por lo anterior es importante determinar si la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular, como MCM2/Topoisomerasa II alfa, en conjunto con Ki-67, se relaciona con la forma integrada del DNA de los tipos de VPH-AR y con las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado en muestras de citología en base líquida, por lo que el propósito de este estudio fue evaluar el patrón de expresión de Topoisomerasa II α /MCM2 y Ki-67, así como el estado físico del DNA del VPH-AR en lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado en presencia de tipos virales de alto riesgo, que permitan su uso como marcadores tempranos de lesiones cervicales tempranas con potencial progresión celular.

IV. MÉTODOLÓGÍA

Obtención de muestras

Se incluyeron 125 muestras de citología en base líquida de mujeres que asistieron a realizarse el estudio de Papanicolaou en el laboratorio de investigación en Citopatología, en el periodo comprendido de septiembre de 2009 - Marzo de 2010. Se realizaron 2 tomas de muestra, asegurando material citológico de la zona de transformación escamocilíndrica, la primera se utilizó para realizar la citología convencional y la citología en base líquida por el método inmunocitoquímica y de hibridación *in situ*, la segunda toma se utilizó para la detección y genotipificación del VPH por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), RFLPs y secuenciación utilizando los oligonucleótidos MY09/MY11 y los GP5+ /GP6+.

Citología en base líquida (*Liqui PREP*) y diagnóstico de LEI.

Se depositó la muestra en un frasco de solución de conservación, se agitó en vórtex y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó evitando eliminar las células, nuevamente se agitó el sedimento hasta obtener una solución homogénea, a partir de la cual se preparo una dilución 1:5 del material celular en 100µL de solución encapsuladora, con el fin de realizar extendidos en laminillas silanizadas, los cuales se fijaron en alcohol por 10 minutos y determinar por el método inmunocitoquímico la expresión de las proteínas TOP2A, MCM2 (ProEx C) y Ki-67.

Se realizó la técnica de Papanicolaou y el resultado citológico se emitió en base a la clasificación del sistema Bethesda que incluye los siguientes parámetros: Citología normal, que son aquellas muestras sin cambios atípicos de infección por VPH, ni displasia y negativas a malignidad; las LEIBG, que son aquellos cambios morfológicos característicos de la infección por VPH (coilocitos, cariomegalia y binucleación entre otros), o muestras con coilocitos más displasia leve (discariosis y acentuada binucleación) (Anexo No.1)

Método inmunocitoquímico para la detección de la expresión de las proteínas Ki-67, MCM2 y TOP2A

Para la expresión y la localización celular de la proteína Ki-67, se utilizó el anticuerpo monoclonal MIB1 (Dako, Carpintería CA, USA) y para Topoisomerasa 2 alfa y MCM2, un anticuerpo monoclonal recombinante que incluye las clonas MCM2 26H6.19, MCM2 27C5.6, TOP2A SWT3D1 conocido como ProEx C (Tripath Imaging, Burlington, NC). El sistema de detección inmunocitoquímico utilizado fue ImmunoDetector HRP/DAB (BioSB, Inc, Santa Bárbara, CA, EUA).

Las laminillas preparadas por citología líquida, se fijaron en alcohol. La recuperación antigénica (ImmunoDNA retriever con citratos; BioSB, Inc, Santa Bárbara, CA, EUA), se realizó en una olla pascal (DaKo) a presión de 120°C durante 5 minutos para Ki-67, mientras que para ProExC se realizó a una presión 125° durante 4 minutos. Posteriormente se adicionó el anticuerpo primario en una dilución de 1:50 para Ki-67 (MIB-1 Dako, Carpinteria CA, EUA) y se incubó a 37° C durante 30 min. Para MCM2/TOP2A (ProExC) el anticuerpo primario en una dilución 1:20 y se incubó a 37° C por 2 horas. Se adicionó el anti-anticuerpo acoplado a biotina y se incubó a 37° C durante 15 min, se agregó la estreptavidina peroxidasa, incubando a 37° C durante 15 min, y posteriormente se agregó la diaminobencidina, durante 1 minuto. Por último, se realizó una contratinción con Hematoxilina de Mayer (Merck) y se montaron con Entellan (MERCK), para su posterior observación al microscopio.

En la estandarización y validación del método inmunocitoquímico, se utilizaron las siguientes condiciones: como control positivo en cada corrimiento, las líneas celulares HeLa (carcinoma del cérvix uterino con VPH 18) y Caski (carcinoma de cérvix uterino con VPH 16); como control negativo, se utilizaron las mismas líneas celulares omitiendo el anticuerpo primario. La expresión de las proteínas se consideró positiva cuando mostraron coloración café en el núcleo.

Evaluación inmunocitoquímica de TOP2A /MCM2 y Ki-67 (ProExC)

En primer lugar se realizó el estudio citológico considerando los criterios de clasificación del sistema Bethesda 2001, posteriormente se evaluó si existían células escamosas con tinción nuclear color café y finalmente si las células así teñidas mostraban anormalidades de acuerdo con el diagnóstico del sistema Bethesda.

Para evaluar la expresión de las proteínas estudiadas se utilizaron los criterios de Cambuzzi *et al.* (2005) y las células positivas se expresaron en porcentaje de núcleos positivos como sigue: medio (1-10%), moderado (11-50%), e intenso (> 50%), mientras que un extendido se consideró negativo cuando no se observó ninguna célula basal profunda teñida que equivale al 0%.

Detección del DNA viral en citología líquida por Hibridación *in situ*.

Los tipos virales de AR fueron determinados previamente por PCR. La detección del genoma viral por hibridación *in situ* (HIS), se realizó con el sistema de amplificación de señal de tiramida GenPoint de DaKo Cytomation, según el procedimiento propuesto por DAKO (Carpintería, CA, USA) ajustados en los tiempos que se indican a continuación.

Los extendidos citológicos realizados en laminilla silanizadas se sometieron a digestión enzimática de la siguiente manera: 1) las laminillas se colocaron en proteinasa K por 1 min a 37° C y posteriormente se lavaron con agua destilada. 2) se aplicó una gota de reactivo prueba (DNA viral biotilado) que contiene pares de bases homólogos para 13 genotipos de VPH-AR, que incluye los VPH tipo 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. 3) Se colocaron por 10 min a 95° C para su desnaturalización por 20 h a 37° C en condiciones de humedad, en un hibridador (110v, Dako). 4) Se colocaron las laminillas en solución astringente (dilución 1:50) a 55° C, durante 20 min. 5) Se cubrieron los extendidos citológicos con el anticuerpo primario estreptavidina peroxidasa (dilución 1:100), durante 40 min a temperatura ambiente. 6) Posteriormente se agregó la biotil tiramida durante 20 min y después se cubrieron con el anticuerpo secundario estreptavidina durante

20 min. 7) Finalmente se cubrió el extendido con el cromógeno diaminobencidina (DAB) y se contratiñó con Hematoxilina de Mayer (MERCK), se deshidrataron y montaron con Entellan.

Para la estandarización y validación del método de Hibridación *in situ*, se utilizaron las siguientes condiciones: como control positivo, se utilizaron cultivos de células Hela (VPH18) y Caski (VPH 16); como control negativo se utilizaron los mismos cultivos sin agregar la sonda viral.

Resultados: El patrón de señal positiva por HIS se visualizó de la siguiente manera (Evans *et al.*, 2002):

Expresión difusa (estado episomal): Se observó como un depósito café intracelular que cubre completamente el núcleo.

Expresión puntiforme (estado integrado): Se observó un discreto patrón punteado dentro del núcleo.

Consideraciones éticas y de bioseguridad.

Para asegurar la calidad ética del trabajo de investigación se consulto a las pacientes para su aceptación de ser incluidas en el estudio a través del consentimiento informado. La información obtenida es confidencial y solo es disponible para la paciente y el investigador, con base en el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud, título segundo, capítulo VI.

En el caso de los residuos peligrosos que el trabajo de investigación generó fueron dispuestos conforme lo marca la **NOM-087-ECOL-SSA1-2002**.

Análisis estadístico.

Las características generales y resultados fueron presentados en frecuencias, y para las diferencias entre los grupos de estudio, se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para evaluar la asociación entre las proteínas Ki-67, Topoisomerasa II α /MCM2 y el estado físico del VPH-AR en las LEIBG se realizó a través de modelos de regresión logística. El análisis estadístico se hizo utilizando el paquete

estadístico STATA versión 9.2, considerándose como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

Características generales de la población estudiada

Se incluyeron 50 mujeres con diagnóstico de LEIBG y con VPH-AR, 50 con células normales y VPH-AR y 25 con células normales y son VPH-AR. El 76% fueron mayores de 31 años, mientras que el 46% reportaron tener 3 o más hijos; 60.8% de ellas refirió haber iniciado su vida sexual activa entre los 18 a 25 años, el 48% de las mujeres con de LEIBG y VPH-AR refirieron ser multíparas. No se encontraron diferencias significativas entre las variables incluidas en el estudio (Cuadro 1).

Distribución de los tipos de VPH de alto riesgo.

El VPH-16 fue el VPH-AR más frecuente en los grupos estudiados, encontrándose en el 84% de los casos de LEIBG y en con citología sin LEI más VPH-AR ($p < 0.0001$). Otros tipos virales como 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58 y 66 fueron menos frecuentes en estos grupos (cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de los tipos de VPH-AR y el diagnóstico citológico.

Distribución de VPH	Citología Sin LEI VPH (-) n=25 %	Citología Sin LEI más VPH-AR n=50 %	Citología con LEIBG más VPH-AR n=50 %	Valor de p
Infección por VPH				
Negativo	25 (100)			
Positivo	0 (0)			
Tipos Virales				
16	0 (0)	42 (84.0)	42 (84.0)	< 0.0001
18	0 (0)	2 (4.0)	2 (4.0)	
31	0 (0)	1 (2.0)	0 (0)	
33	0 (0)	1 (2.0)	0 (0)	
39	0 (0)	0 (0)	1 (2.0)	
45	0 (0)	2 (4.0)	2 (4.0)	
52	0 (0)	1 (2.0)	0 (0)	
58	0 (0)	0 (0)	2 (4.0)	
66	0 (0)	1 (2.0)	1 (2.0)	

LEI: Lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, VPH-AR: Virus de papiloma humano de alto riesgo. Datos expresados en n (%), valor p obtenido con prueba exacta de Fisher.

Cuadro 1. Características generales de la población por grupo de estudio

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO						
VARIABLES		Citología Sin LEI VPH (-) n=25 (%)	Citología Sin LEI más VPH-AR n=50 (%)	Citología LEIBG más VPH-AR n=50 (%)	TOTAL n=125 (%)	Valor de <i>p</i>
Edad	<18	0 (0.0)	1 (2.0)	2(4.0)	3(2.4)	0.916
	18-24	1 (4.0)	2 (4.0)	2 (4.0)	5 (4.0)	
	25-30	3 (12.0)	10 (20.0)	9 (18.0)	22(17.6)	
	>31	21 (84.0)	37 (74.0)	37(74.0)	95 (76.0)	
Número de hijos	NINGUNO	2 (8.0)	15 (30.0)	10 (20.0)	27 (21.6)	0.284
	1 a 2	10 (40.0)	14 (28.0)	16 (32.0)	40 (32.0)	
	3 o más	13 (52.0)	21 (42.0)	24 (48.0)	58 (46.4)	
I.V.S.A	NR	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (6.0)	3 (2.4)	0.627
	<18	8 (32.0)	11 (22.0)	12 (24.0)	31 (24.8)	
	18-25	15 (60.0)	32 (64.0)	29 (58.0)	76 (60.8)	
	>25	2 (8.0)	7 (14.0)	6 (12.0)	15 (12.0)	
Método anticonceptivo	Ninguno	14 (56.0)	22 (44.0)	29 (58.0)	65 (52.0)	0.027
	Hormonal	2 (8.0)	0 (0.0)	3 (6.0)	5 (4.0)	
	De barrera	4 (16.0)	18 (36.0)	5 (10.0)	27 (21.6)	
	Quirúrgico	5 (20.0)	10 (20.0)	13 (26.0)	28 (22.4)	

LEI: Lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, VPH-AR: Virus de papiloma humano de alto riesgo, I.V.S.A: Inicio de vida sexual activa. Datos expresados en n (%), valor *p* obtenido con prueba exacta de *Fisher*.

Expresión de Ki-67 por diagnóstico citológico.

Se encontró que en el 98% de las mujeres con LEIBG más VPH-AR y en el 88% con citología sin LEIBG más VPH-AR fueron positivos a Ki-67, detectado a nivel nuclear (Cuadro 3). Cabe señalar que en las LEIBG más VPH-AR la expresión de Ki-67 fue positiva en células intermedias con cariomegalia (Figura 1A), con cambios coilocíticos característicos de la infección por VPH y en algunas células con binucleación; dicha expresión fue nuclear (Figura 1B) y en algunos casos hubo tinción del contorno citoplasmático en presencia de cambios celulares (Figura 1C) ($p < 0.0001$). En las muestras de las citologías sin LEI y sin virus, el 16% de las muestras presentaron tinción nuclear de células basales profundas, mientras que las células negativas se observaron de color azul (Figura 1D).

Cuadro 3. Expresión de Ki-67 y su relación con el diagnóstico citológico.

Expresión de Ki-67	Citología Sin LEI VPH (-) n=25 %	Citología Sin LEI más VPH-AR n=50 %	Citología con LEIBG más VPH-AR n=50 %	Valor de <i>p</i>
Negativo	21 (84.0)	6 (12.0)	1 (2.0)	< 0.001
Positivo	4 (16.0)	44 (88.0)	49 (98.0)	
Total	25 (100)	50 (100)	50 (100)	

LEI: Lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, VPH-AR: Virus de papiloma humano de alto riesgo. Datos expresados en n (%), valor *p* obtenido con prueba exacta de Fisher.

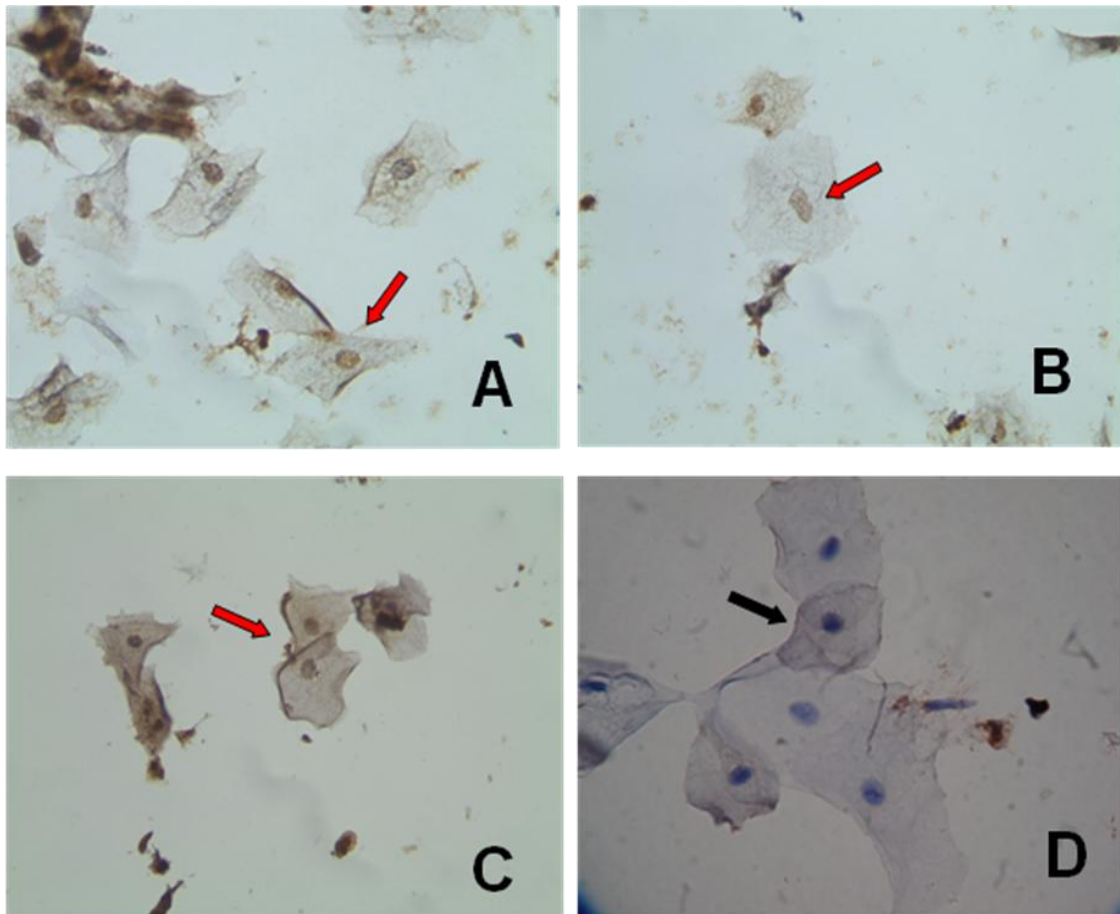


Figura 1. Expresión de Ki-67 **A.** Citología con LEIBG más VPH-AR con células intermedias con cariomegalia, positivos a la expresión de Ki-67 (Flecha roja). **B.** Citología con LEIBG más VPH-AR células intermedias con binucleación (Flecha roja). **C.** Citología con LEIBG más VPH-AR se observan células intermedias positivas con tinción de contorno citoplasmático (Flecha roja). **D.** Citología sin LEI y sin virus, donde las células intermedias fueron negativas a la expresión de Ki-67 (Flecha negra). Método: Citología en base líquida. Técnica Streptavidina Biotina Peroxidasa. 40X

Expresión de MCM2/Topoisomerasa II α (ProExC) y su relación con el diagnóstico citológico.

Las células normales sin LEI y sin virus no expresaron MCM2/Topoisomerasa II α , mientras que el 94% los casos de LEIBG con VPH-AR y en el grupo de citologías sin LEIBG más VPH-AR respectivamente, expresaron este marcador en comparación con las citologías sin LEI y sin VPH, donde el 100% fueron negativas ($p < 0.0001$); existiendo diferencias son significativas entre los grupos (Cuadro 4). La expresión de

MCM2/Topoisomerasa II α fue nuclear y se encontró en las células intermedias que mostraron cariomegalia, ($p < 0.0001$) (Figura 2A y 2B); algunas células presentaron binucleación (Figura 3).

Cuadro 4. Expresión de MCM2/Topoisomerasa II α (ProExC) y su relación con el diagnóstico citológico.

Expresión de MCM2/Topoisomerasa II α (ProExC)	Citología Sin LEI VPH (-) n =25 %	Citología Sin LEI más VPH-AR n =50 %	Citología con LEIBG más VPH-AR n =50 %	Valor de p
Negativo	25 (100)	3 (6.0)	3 (6.0)	< 0.001
Positivo	0 (0.0)	47 (94.0)	47 (94.0)	
Total	25 (100)	50 (100)	50 (100)	125 (100)

LEI: Lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, VPH-AR: Virus de papiloma humano de alto riesgo. Datos expresados en n (%), valor p obtenido con prueba exacta de Fisher.

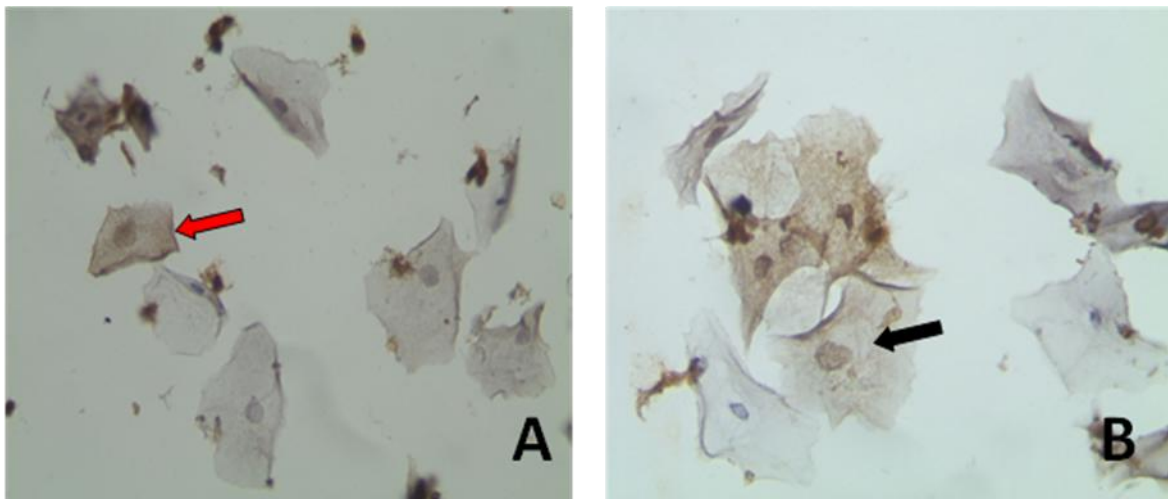


Figura 2. Expresión de MCM2/Topoisomerasa II α **A. Citología con LEIBG más VPH-AR.** Se observa la expresión de estas proteínas en células intermedias con cariomegalia e infección por VPH-AR (Flecha roja), **B. Citología con LEIBG más VPH-AR,** células intermedias con cariomegalia positivas (Flecha negra). Método: Citología en base líquida. Técnica Streptavidina Biotina Peroxidasa. 40X



Figura 3. Expresión de MCM2/Topoisomerasa II α (ProExC) en un caso de LEIBG más VPH-AR. Presencia de células intermedias con binucleación y kariomegalia fueron positivas a la expresión MCM2/Topoisomerasa II α (ProExC) (Flechas). Método: Citología en base líquida. Técnica Streptavidina Biotina Peroxidasa. 40X

Asociación de la expresión de Ki-67 y Topoisomerasa II α / MCM2 con el diagnóstico citológico.

Se encontró que las pacientes que presentaron una citología sin LEI más VPH-AR tienen 909.6 veces más la posibilidad de expresar Topoisomerasa II α / MCM2 en comparación con las pacientes que no tienen LEI y son negativas al VPH-AR; mientras que las pacientes con diagnóstico de LEIBG más VPH-AR tuvieron 837.6 veces la posibilidad de expresar Topoisomerasa II α / MCM2 en comparación con las citologías sin LEI VPH (-). En relación al estudio de Ki-67, se encontró que las mujeres sin sin LEI más VPH-AR tienen 48.4 veces más la posibilidad de expresar Ki-67 en comparación de las pacientes sin LEI VPH (-) y aquellas con LEIBG más VPH-AR tuvieron 352.1 veces más la posibilidad de expresar Ki-67 en comparación con las citologías Sin LEI VPH (-).

Cuadro 5. Asociación de la expresión de Ki-67, Topoisomerasa II α y MCM2 con el diagnóstico citológico.

Variable	Ki-67 OR (IC 95%)	Topoisomerasa II α y MCM2 OR (IC 95%)	Valor <i>p</i>
*Sin LEI VPH (-)	1.0	1.0	
Sin LEI más VPH-AR	48.4 (10.8 – 216.5)	909.6 (45.6 - 18321.3)	< 0.0001
LEIBG más VPH-AR	352.1 (33.3 – 3717.1)	837.6 (43.1 – 16261.5)	< 0.0001

LEI: Lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, VPH-AR: Virus de papiloma humano de alto riesgo. OR: odds Ratio, IC: intervalo de confianza, MCM2: proteína de mantenimiento de minicromosoma, *Categoría de referencia LEIBG: Lesión escamosa intraepitelial

Análisis del estado del DNA del VPH-AR (Hibridación *in situ*) y su relación con el diagnóstico citológico

Se encontró que en el 100% de las citologías con LEIBG más VPH-AR y de las citologías sin LEI más VPH-AR, el VPH identificado por PCR, fueron positivas a la sonda del VPH-AR utilizada. El 96% de las citologías sin LEI más VPH-AR y 40% de las LEIBG más VPH-AR presentaron la versión difusa (estado episomal), mientras que en el 28% de las LEIBG más VPH-AR se observó la señal puntiforme (estado integrado); (Figura 4) (cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis del estado del DNA del VPH-AR (Hibridación *in situ*) y su relación con el Diagnóstico citológico

Hibridación <i>In situ</i> (Tipo de señal)	Citología Sin LEI más VPH-AR n %	Citología con LEIBG más VPH-AR n %	Valor de <i>p</i>
Difusa (estado episomal)	48 (96.0)	20 (40.0)	
Puntiforme (estado integrado)	2 (4.0)	30 (60.0)	< 0.0001
Total	50 (100)	50 (100)	

LEI: Lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, VPH-AR: Virus de papiloma humano de alto riesgo. Datos expresados en n (%), valor *p* obtenido con prueba exacta de Fisher.

Análisis de la relación del estado físico del VPH-AR por tipo viral

Se observó que de las muestras que presentaron el VPH-16, el 68.7% el estado fue episomal y el 31.3% el estado integrado, observando diferencias significativas (cuadro 7) (Figura 5).

Cuadro 7. Análisis de la relación del estado físico del VPH-AR por tipo viral.

Tipo viral	Estado episomal	Estado integrado	Valor de p
	n %	n %	
16	57 (68.7)	26 (31.3)	< 0.0001
18	3 (75)	1 (25)	
31	1 (100)	0	
33	1 (100)	0	
39	0	1 (100)	
45	2 (50)	2 (50)	
52	1 (50)	1 (50)	
58	1 (50)	1 (50)	
66	1 (50)	1 (50)	

LEI: Lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, VPH-AR: Virus de papiloma humano de alto riesgo. Datos expresados en n (%), valor *p* obtenido con prueba exacta de Fisher.

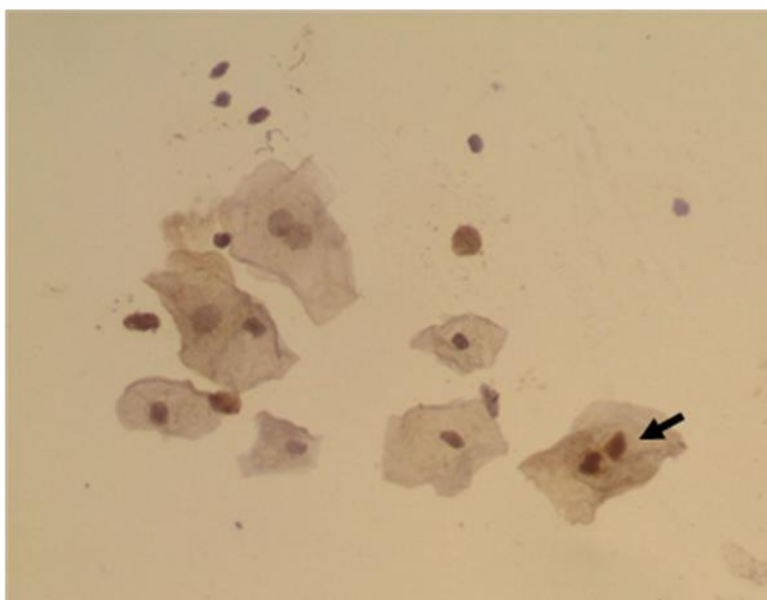


Figura 4. Expresión del estado episomal del VPH-AR, en LEIBG. Se observan células intermedias con el patrón de señal difuso que cubre completamente el núcleo y que corresponde al estado episomal del VPH-AR (Flecha negra). Método: Citología en base líquida. Técnica: Hibridación *in situ* con amplificación con tiramida. Sonda de VPH-AR. 40X.

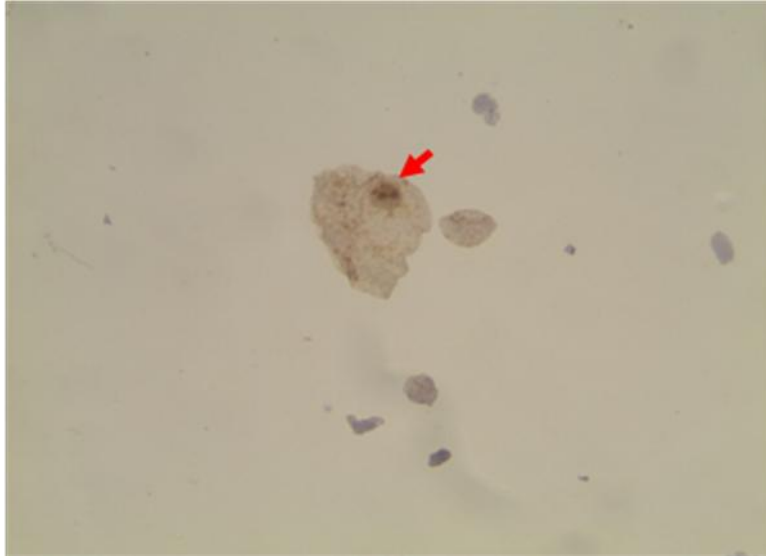


Figura 5. Expresión del estado integrado del VPH-AR en LEIBG. Se observan una célula intermedia con el patrón de señal puntiforme en el núcleo y que corresponde al estado integrado del VPH-AR (Flecha roja). Método: Citología en base líquida. Técnica: Hibridación *in situ* con amplificación con tiramida. Sonda de VPH-AR. 40X.

Asociación del estado del DNA viral y la expresión de KI-67 y Topoisomerasa II α /MCM2 por diagnóstico citológico.

las mujeres que presentan un estado puntiforme (integrado) del VPH-AR y la expresión de Ki-67 positiva tienen 32.1 veces más riesgo de tener una LEIBG en comparación con las mujeres que presentan estado difuso del VPH-AR y expresión negativa de Ki-67, controlado por edad; mientras que las mujeres que expresan un estado puntiforme (integrado) del VPH-AR y la expresión de Topoisomerasa II α /MCM2 positiva tienen 35.5 veces más riesgo de tener una LEIBG en comparación con las mujeres que presentan estado difuso del VPH-AR y expresión negativa de Topoisomerasa II α /MCM2 (cuadro 8)

Cuadro 8. Análisis de la Asociación del estado del DNA viral y la expresión de KI-67 y Topoisomerasa II α /MCM2 por diagnóstico citológico.

Expresión de marcadores y estado del DNA del VPH	Dx citológico		OR (IC 95%)*	p
	Sin LEIBG+VPH-AR	LEIBG+VPH-AR		
Ki-67 negativo				
Difuso	6 (100)	0	1.0*	0.143
Puntiforme	0	1 (100)		
Ki-67 positivo				
Difuso	42 (99.5)	20 (40.8)	32.1 (6.8-151.1)	< 0.001
Puntiforme	2 (4.5)	29 (59.2)		
TOP2A/MCM2 negativo				
Difuso	3 (100)	1 (33.3)	1.0*	0.200
Puntiforme	0	2 (66.7)		
TOP2A/MCM2 positivo				
Difuso	45 (95.7)	19 (40.4)	35.5 (7.5- 168)	< 0.001
Puntiforme	2 (4.3)	28 (59.6)		

LEI: Lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, VPH-AR: Virus de papiloma humano de alto riesgo, OR: odds Ratio, IC: intervalo de confianza, MCM2: proteína de mantenimiento de minicromosoma, *Categoría de referencia: Expresión negativa de TOP2A/MCM2 Negativo y ki-67 y patrón difuso.

VI. DISCUSIÓN

El carcinoma invasor de cérvix uterino es una enfermedad gradual y multifactorial, donde el virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) juega un papel central en el desarrollo de esta enfermedad, sin embargo, se considera que los VPH-AR, son un factor necesario más no suficiente para el desarrollo de este carcinoma (Arvanitis and Spandidos, 2008), por lo que la presencia de otros factores como la edad, la edad de inicio de vida sexual, el número de partos, entre otros, son necesarios para el desarrollo de este padecimiento (Munger *et al.*, 2004, Parada *et al.*). Es importante destacar que las mujeres con LEIBG, presentaron tipos de VPH-AR, refirieron ser en un 48% ser multíparas y el 24% inició su vida sexualmente activa antes de los 18 años, lo cual pudo influir en el desarrollo de las lesiones precoces encontradas.

Los tipos virales que se encontraron en este estudio fueron los VPH 16,18,31,33,39,45,52,58 y 66, siendo el más frecuente el tipo viral 16 con un 84%, tanto en el grupo de muestras citológicas sin LEI más VPH-AR, como en el grupo de LEIBG más VPH-AR, seguido del tipo 18 con un 4% en los mismos grupos respectivamente. Esto es importante ya que algunos estudios han demostrado que estos virus son los más frecuentes y que la persistencia de la infección por VPH-AR-16 y 18, es necesaria para el desarrollo y progresión de las LEI (Burk *et al.*, 2009, García-Tamayo *et al.*, 2009), por su parte, Nakagawa *et al.* (2002) encontraron que el 98% de las LEI fueron asociadas con el VPH-AR, mientras que en los casos de carcinoma cervical, el VPH-16 se encuentra en el 68.6%, y en el 100% de los casos de adenocarcinoma fue el VPH-18. También Nam *et al.* (2008) observaron la presencia de VPH-16 en un 84.2% de las LEIAG y 45.5% de las LEIBG. Asimismo, el tipo viral 18 fue relacionado con el desarrollo adenocarcinoma, mientras que el tipo viral 16, tiene una alta prevalencia en las lesiones escamosas intraepiteliales (LEI), Cambuzzi *et al.* (2005), sugieren que esto es debido al tropismo del VPH-16 por los filamentos intermedios de las células escamosas del cérvix uterino.

La infección por el VPH-AR es un factor importante para la progresión a carcinoma invasor, debido a la expresión de sus oncoproteínas E6 y E7 que inducen cambios en la expresión de proteínas. Se ha descrito que la expresión de Topoisomerasa II α / MCM2 y Ki-67 pueden ser considerados marcadores de la infección por VPH-AR debido a que estas proteínas son sobreexpresadas en LEIBG como resultado de la infección por VPH-AR a través de la alteración del factor de transcripción E2F (Badr *et al.*, 2008, Beccati *et al.*, 2008, Halloush *et al.*, 2008)

Con respecto a la expresión de Topoisomerasa II α /MCM2, los resultados muestran que 94% de los casos de LEIBG más VPH y de las muestras citológicas sin LEIBG más VPH-AR, expresaron estas proteínas, Estos resultados concuerdan con lo reportado por Shi *et al.* (2007) que analizaron la expresión de Topoisomerasa II α /MCM2 en 34 muestras de LEIBG encontrando, que 94.1 de las LEIBG expresaban este marcador, mientras que en nuestro estudio el aumento en la expresión encontrado en las citologías sin LEIBG más VPH-AR es un hallazgo relevante, ya que el anticuerpo recombinante utilizado, tiene una alta sensibilidad para evidenciar a las proteínas antes de que se presente la lesión cervical, lo que pudiera hacer evidente la fase latente de estos virus, esto es muy importante ya que se reconoce que esta fase no puede hacerse evidente por técnicas colposcópicas, ni morfológicas como el estudio cito-histológico (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001, Castle *et al.*, 2008). Consideramos que la expresión de estas proteínas a través del método inmunocitoquímico, podría ser una alternativa en el diagnóstico oportuno de estas lesiones, además, estos resultados sugieren que estas mujeres deben recibir un seguimiento estricto con controles periódicos para vigilar que pueda progresar a una lesión mayor (Pinto *et al.*, 2008)

Por otro lado, en este estudio, las células de metaplasia escamosa endocervical y las células cilíndricas encontradas, fueron negativas tanto a Ki-67 como a Topoisomerasa II α /MCM2, sin embargo, Siddiqui *et al.* (2008), reportaron una ligera expresión de Topoisomerasa II α / MCM2 en células de metaplasia y células endocervicales, lo cual atribuyeron a la inflamación y sus mediadores, sin embargo, también sugieren que la expresión positiva de esta proteínas debe

considerarse sólo en células que han sido evaluadas citológicamente y presenten cambios atípicos, concluyen que la evaluación de la expresión de Topoisomerasa II α / MCM2 es útil en el diagnóstico de LEI, ya que en el 100% de las LEIAG y el 25% de las LEIBG, fueron clasificados satisfactoriamente con este marcador, concordando con el resultado de la biopsia. En nuestro estudio la expresión de Topoisomerasa II α / MCM2 fue encontrada en células intermedias y superficiales en presencia del VPH-16.

Shroyer *et al.* (2006), analizaron la utilidad de Topoisomerasa II α / MCM2 en 10 muestras negativas a neoplasia intraepitelial, 10 de LEIBG, 10 de ASCUS, 10 de LEIAG, y 10 muestras de células SiHa (VPH-16), observando que Topoisomerasa II α / MCM2 se expresan en 20% de las muestras de ASCUS, 50% de las LEIBG y 100% de las LEIAG, mientras que en las muestras negativas a neoplasias no hubo expresión. Estos resultados concuerdan con lo observado en nuestro estudio, donde el grupo de muestras sin LEI VPH-AR (-) no expresaron Topoisomerasa II α / MCM2.

Por su parte, Shi *et al.* (2007) estudiaron la expresión de marcadores individuales (p16^{INK4a}, MCM2, Topoisomerasa II α y Topoisomerasa II α /MCM2) y en combinación (p16^{INK4a}/Topoisomerasa II α /MCM2, p16^{INK4a}/MCM2 y Topoisomerasa II α / MCM2), encontrando que p16^{INK4a} detectaba el 76.5% de las LEIBG y el 100% de las LEIAG mientras que cuando era combinado con Topoisomerasa II α / MCM2 era capaz de identificar el 100% de las LEIBG y el 100% de las LEIAG.

En cuanto a la expresión de Ki-67, en nuestro estudio se observó que el 16% de las citologías sin LEI VPH (-) expresaron Ki-67, esta expresión se observó en células basales, las cuales son capaces de proliferar y de manera normal expresan Ki-67. Halloush *et al.* (2008) analizaron la expresión de Ki-67 en 29 casos negativos a LEI, 27 LEIBG y 16 LEIAG, encontrando que el 7% de los casos negativos a LEI expresaron Ki-67 en células basales, indicando que en este tipo celular, la expresión de Ki-67 es un evento normal.

En las citologías sin LEI más VPH-AR, el 88% de las muestras expresaron Ki-67, cabe señalar que no se han realizado estudios en relación a la expresión de Ki-67 en citología sin LEI con infección por VPH-AR, pero en nuestro estudio pudimos observar que existe expresión de este marcador de proliferación, lo que indica que estas citologías tienen un mayor potencial a desarrollar una LEI con respecto al 12% de las citologías en las que no hubo expresión, esto podría sugerir que la carga viral o las oncoproteínas del VPH-AR no han afectado la maquinaria de la célula huésped y no hubo cambios a nivel molecular, a pesar de estar presente el VPH-AR.

En las citologías con LEIBG más VPH-AR, la expresión de Ki-67 se observó en un 98% de los casos, estos resultados fueron mayores a los encontrados por Sahebali *et al*, (2003), quienes analizaron 42 muestras de LEIBG y 20 de LEIAG, encontraron la expresión de Ki-67 en el 86% de las muestras de LEIAG, y en el 76% de los casos de LEIBG, atribuyendo esta expresión a la presencia del VPH-AR, principalmente el VPH-16, así como su posible integración.

Debido a que en este estudio se observó que el 84% de las citologías presentaron la infección por el VPH-16 y a que varios estudios refieren que este tipo viral es encontrado en aproximadamente en el 50% de los casos de carcinoma cervical, se analizó por HIS el estado físico del DNA del VPH-AR para conocer el patrón de expresión, se encontró que en el 96% del grupo de citología sin LEI más VPH-AR, presentó el patrón difuso (estado episomal), estudios similares realizados por (Samama *et al.*, 2002) analizaron el estado físico del DNA del VPH reportando que en muestras con VPH, el 17% presentaron el estado episomal, al igual que el 95%(16) de las LEIBG, mientras, que el 100% (5) de las LEIAG y una muestra de carcinoma invasor mostraron señales puntiformes que corresponden a la versión integrada.

El 60% de las muestras con LEIBG más VPH-AR presentó el estado integrado (versión puntiforme) comparado con el encontrado por Evans *et al.* (2002), quienes reportaron que 30% de 50 casos de LEIBG en presencia del VPH-16, mostraron el estado integrado (versión puntiforme), mientras que el 70% de los casos

mostraron señales difusas (estado episomal). Por su parte Kulmala *et al.* (2005) proponen que la integración es un evento temprano en la carcinogénesis cervical debido a sus observaciones en líneas celulares que contenían copias del genoma de VPH-33, el genoma se encontraba en estado episomal, pero en cultivos subsecuente presentaban la integración del DNA del VPH-33, en otra línea celular positiva a VPH-16 el genoma fue primero observado en forma episomal y después integrado. Posteriormente analizaron estas observaciones en muestras de citología, encontrando que las muestras negativas a LEI más VPH-16 presentaban un estado difuso (episomal) en un 19.7% y en un 11% puntiforme (integrado), mientras que las LEIBG presentaron en un 15% la versión difusa y en 7.7% integrada. Estas observaciones pueden explicar el 4% de muestras de citología sin LEI más VPH-AR en nuestro estudio, las cuales presentaron un estado puntiforme que nos indican un evento de integración temprana en presencia de VPH-16, sugiriendo que existe una fase de selección hacia un fenotipo maligno.

Al relacionar el estado del VPH-AR con la expresión de las proteínas Topoisomerasa II α / MCM2 y Ki-67 se encontró, que existe una asociación significativa entre la expresión de Topoisomerasa II α / MCM2 con el estado puntiforme del VPH-AR, teniendo las mujeres con esta condición un riesgo de 35.5 veces más en comparación de las mujeres que no tuvieron LEI y que fueron VPH (-) (IC 95%; 7.5- 168.0), y las mujeres que presentaron la expresión de Ki-67 y el estado puntiforme del virus tuvieron 32.1 veces más riesgo de tener una lesión que las mujeres sin LEI y VPH(-) (IC 95%; 6.8-151.1),

Finalmente los resultados muestran, que tanto la evaluación de la expresión inmunocitoquímica de Ki-67, además de Topoisomerasa II α / MCM2, así como la determinación del estado físico del DNA de los VPH-AR son factibles y reproducibles en muestras de citología en base líquida, por lo que representan excelentes marcadores biológicos de las alteraciones de las proteínas celulares en presencia del los VPH-AR, así como del estado integrado de estos virus principalmente el tipo 16, no sólo en casos de LEIBG, sino en las muestras de citología sin LEI pero que presentaron VPH-AR, lo que podría evidenciar un grupo

de mujeres con mayor riesgo de progresión a LEIBG o de LEIBG a LEIAG respectivamente, por lo que se requiere el seguimiento estricto de los casos y seguir explorando esta hipótesis y su valor pronóstico, además de ser una alternativa para mejorar y complementar el diagnóstico de lesiones tempranas del cérvix uterino en mujeres mexicanas.

VII. ANEXOS

Anexo 1

Nomenclatura citológica de acuerdo
al sistema BETHESDA 2001.

Anormalidades de las células epiteliales escamosas:

A. Células escamosas atípicas (ASC)

1. Células escamosas atípicas de significado no determinado (ASC-US)
 - ASC-US: (*Atypical squamous cells of undetermined significance*, células escamosas atípicas de significado indeterminado o incierto.
 - No puede excluirse LEIAG(ASC-H)
2. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
LEIBG
 - Virus papiloma humano (VPH)
 - Displasia leve (CIN 1).
3. Lesión intraepitelial escamosa de alto grado
LEIAG
 - Displasia moderada, displasia severa y carcinoma in situ (CIN 2 y 3)
4. Carcinoma escamosa

B. Células glandulares atípicas (AGC)

- Endocervicales (NOS o especificar en comentarios)
- Endometriales (NOS o especificar en comentarios)
- Glandulares (NOS o especificar en comentarios).

VIII. REFERENCIAS

- A N Y CHEUNG, P. M. C., K L TSUN, U S KHOO, B S Y LEUNG, H Y S NGAN (2004) Chromosome in situ hybridisation, Ki-67, and telomerase immunocytochemistry in liquid based cervical cytology. *J Clin Pathol* 57, 721–727.
- ARIAS-PULIDO, H., PEYTON, C. L., JOSTE, N. E., VARGAS, H. & WHEELER, C. M. (2006) Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol*, 44, 1755-62.
- ARVANITIS, D. A. & SPANDIDOS, D. A. (2008) Deregulation of the G1/S phase transition in cancer and squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: a case control study. *Oncol Rep*, 20, 751-60.
- BADR, R. E., WALTS, A. E., CHUNG, F. & BOSE, S. (2008) BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. *Am J Surg Pathol*, 32, 899-906.
- BECCATI, M. D., BURIANI, C., PEDRIALI, M., ROSSI, S. & NENCI, I. (2008) Quantitative detection of molecular markers ProEx C (minichromosome maintenance protein 2 and topoisomerase IIa) and MIB-1 in liquid-based cervical squamous cell cytology. *Cancer*, 114, 196-203.
- BURK, R. D., CHEN, Z. & VAN DOORSLAER, K. (2009) Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*, 12, 281-90.
- CASTLE, P. E., COX, J. T., SCHIFFMAN, M., WHEELER, C. M. & SOLOMON, D. (2008) Factors influencing histologic confirmation of high-grade squamous intraepithelial lesion cytology. *Obstet Gynecol*, 112, 637-45.
- DEPOWSKI, P. L., ROSENTHAL, S. I., BRIEN, T. P., STYLOS, S., JOHNSON, R. L. & ROSS, J. S. (2000) Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol*, 13, 542-7.
- DEWEESE, J. E., OSHEROFF, M. A. & OSHEROFF, N. (2008) DNA Topology and Topoisomerases: Teaching a "Knotty" Subject. *Biochem Mol Biol Educ*, 37, 2-10.
- EVANS, M. F., MOUNT, S. L., BEATTY, B. G. & COOPER, K. (2002) Biotinyl-tyramide-based in situ hybridization signal patterns distinguish human papillomavirus type and grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol*, 15, 1339-47.
- GARCIA-TAMAYO, J., MOLINA, J. & BLASCO-OLAETXEA, E. (2009) [Importance of immunohistochemical studies in the diagnosis and the prognostic evaluation of cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Review]. *Invest Clin*, 50, 241-50.
- HALLOUSH, R. A., AKPOLAT, I., JIM ZHAI, Q., SCHWARTZ, M. R. & MODY, D. R. (2008) Comparison of ProEx C with p16INK4a and Ki-67 immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal material: a pilot study. *Cancer*, 114, 474-80.
- KELLY, D., KINCAID, E., FANSLER, Z., ROSENTHAL, D. L. & CLARK, D. P. (2006) Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions from cytologic samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx C). *Cancer*, 108, 494-500.
- KULMALA, S. M., SYRJANEN, S. M., GYLLENSTEN, U. B., SHABALOVA, I. P., PETROVICHEV, N., TOSI, P., SYRJANEN, K. J. & JOHANSSON, B. C. (2006) Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*, 59, 513-7.
- LAZCANO-PONCE, E., HERRERO, R., MUNOZ, N., CRUZ, A., SHAH, K. V., ALONSO, P., HERNANDEZ, P., SALMERON, J. & HERNANDEZ, M. (2001) Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*, 91, 412-20.

- MIMICA, M., TOMIC, S., KARDUM, G., HOFMAN, I. D., KALITERNA, V. & PEJKOVIC, L. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Cancer*, 20, 116-9.
- MUNGER, K., BALDWIN, A., EDWARDS, K. M., HAYAKAWA, H., NGUYEN, C. L., OWENS, M., GRACE, M. & HUH, K. (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, 78, 11451-60.
- PARADA, R., MORALES, R., GIULIANO, A. R., CRUZ, A., CASTELLSAGUE, X. & LAZCANO-PONCE, E. Prevalence, concordance and determinants of human papillomavirus infection among heterosexual partners in a rural region in central Mexico. *BMC Infect Dis*, 10, 223.
- PINTO, A. P., SCHLECHT, N. F., WOO, T. Y., CRUM, C. P. & CIBAS, E. S. (2008) Biomarker (ProEx C, p16(INK4A), and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. *Mod Pathol*, 21, 1067-74.
- PYEON, D., PEARCE, S. M., LANK, S. M., AHLQUIST, P. & LAMBERT, P. F. (2009) Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*, 5, e1000318.
- SAMAMA, B., PLAS-ROSER, S., SCHAEFFER, C., CHATEAU, D., FABRE, M. & BOEHM, N. (2002) HPV DNA detection by in situ hybridization with catalyzed signal amplification on thin-layer cervical smears. *J Histochem Cytochem*, 50, 1417-20.
- SAUNIER, M., MONNIER-BENOIT, S., MAUNY, F., DALSTEIN, V., BRIOLAT, J., RIETHMULLER, D., KANTELEIP, B., SCHWARZ, E., MOUGIN, C. & PRETET, J. L. (2008) Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol*, 46, 3678-85.
- SCHOLZEN, T. & GERDES, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182, 311-22.
- SHECHTER, D. & GAUTIER, J. (2004) MCM proteins and checkpoint kinases get together at the fork. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10845-6.
- YANG, J., RAMNATH, N., MOYSICH, K. B., ASCH, H. L., SWEDE, H., ALRAWI, S. J., HUBERMAN, J., GERADTS, J., BROOKS, J. S. & TAN, D. (2006) Prognostic significance of MCM2, Ki-67 and gelsolin in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 6, 203.