



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA



MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

T E S I S

**EXPRESIÓN DE LUMICAN, α -SMA Y CICLINA D1
Y SU ASOCIACIÓN CON E6 DEL VPH DE ALTO
RIESGO EN LESIONES PREMALIGNAS Y
CARCINOMA CERVICAL.**

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
QBP. OSCAR CATALÁN CASTORENA

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. LUZ DEL CARMEN ALARCÓN
ROMERO**

CODIRECTOR: **DR. NICOLÁS ADDIEL SERAFÍN HIGUERA**

CHILPANCINGO DE LOS BRAVO GUERRERO, ENERO DE 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 20 días del mes de junio de dos mil dieciocho 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 lumican, α SMA y ciclina D1 y su asociación con E6 del VPH de alto riesgo en lesiones premalignas y carcinoma cervical", presentada por el alumno Oscar Catalán Castorena, 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. Nicolás Addiel Serafín Higuera
Codirección de tesis

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dr. Napoleón Navarro Tito

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 UAGro
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas
Coordinación 2014-2018

Dra. Isela Parra Rojas

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 UAGro
Facultad de Ciencias
Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2018-2021
Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Dr. Oscar del Moral Hernández

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de investigación en Citopatología e Histoquímica de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB) de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) en Chilpancingo, Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

La codirección de:

Dr. Nicolás Addiel Serafín Higuera

La asesoría de:

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares

Dr. Napoleón Navarro Tito

Dr. Oscar del Moral Hernández

Este estudio fue apoyado por el financiamiento de CONACyT, del Fondo Sectorial para la investigación en Salud y Seguridad Social (Número de proyecto 201579). También se recibió financiamiento por CONACyT del proyecto con la clave 271256.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Oscar Catalán Castorena recibió la beca (No. 470774) del 01 de septiembre de 2016 al 31 de agosto de 2018 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a los programas del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

AGRADECIMIENTOS

Estoy especialmente agradecido con mi directora de tesis la **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero** por su entrega y pasión en la revisión minuciosa de este trabajo dándome la posibilidad de mejorarlo. Admiro su gran calidad humana y científica, gracias por recibirme y darme un lugar en su grupo de trabajo. Agradezco sinceramente su confianza, el apoyo y los consejos que me brindó durante la estancia en el posgrado, mi cariño y amistad por siempre.

Al **Dr. Nicolás Addiel Serafín Higuera** por sus aportaciones y el interés que mostro en la realización del proyecto, gracias por el tiempo dedicado a enriquecer el proyecto.

A la **Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares**, agradezco infinitamente la disposición a ayudarme y por escucharme cuando más lo necesitaba, por creer en mí y por impulsarme siempre a mejorar, por las aportaciones y observaciones al proyecto. Admiro su profesionalismo y la pasión que imprime en cada una de las actividades que desempeña siendo muy inspirador, pero sobre todo gracias por estar en los momentos más difíciles, sabe que en mí tiene a un amigo y mi cariño incondicional.

A mis sinodales y profesores **Dr. Napoleón Navarro Tito y Dr. Oscar Del Moral Hernández**, por sus valiosas observaciones y aportaciones a este proyecto, sin duda son excelentes investigadores, mi respeto y admiración.

A mi profesora de seminario la **Dra. Eugenia Flores Alfaro**, por la motivación y el entusiasmo que trasmite a sus estudiantes, gracias por la orientación en la redacción del escrito y el apoyo en el análisis estadístico.


A **Pao**, tu que fuiste parte importante para poder concluir este proyecto, gracias por la disposición y la amabilidad que mostraste siempre y sobre todo gracias por la amistad que me brindaste haciendo mi estancia más agradable.

A la **Dra. Ma. Isabel Zubillaga**, por la atención y los conocimientos compartidos durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeras de laboratorio **Maritza, Wendy, Sonia, Q.Chayo, Kay** por compartir su experiencia y conocimientos. Gracias por las risas y los buenos momentos. Siempre tendrán en mí a un amigo.

Al Ginecólogo colposcopista **Dr. Raúl Peralta Catalán** y a la enfermera **Dalia Nava Torres** de la clínica de displasias del Hospital General Dr. Raymundo Abarca Alarcón, por haber colaborado en la obtención de muestras histológicas

Y por último, pero no menos importante, quiero agradecer a **Ana Laura, Leilany, Gloria Angelina, Tania y Sandra** por hacer más emocionante mi estancia en la maestría, por esas tardes de café, por las locuras interminables y las risas, las admiro a cada una de ustedes son mujeres inteligentes con un gran futuro en la investigación, espero poder coincidir en otro momento con ustedes.



EXPRESIÓN DE LUMICAN, α -SMA Y CICLINA
D1 Y SU ASOCIACIÓN CON E6 DEL VPH DE
ALTO RIESGO EN LESIONES PREMALIGNAS
Y CARCINOMA CERVICAL.

ÍNDICE

I. RESUMEN.	8
II. ABSTRACT	9
III. INTRODUCCIÓN	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	13
V. RESULTADOS	17
VI. DISCUSIÓN	31
VII. CONCLUSIONES	41
VIII.PERSPECTIVAS.	42
IX. REFERENCIAS	43

I. RESUMEN.

Introducción: La persistencia e integración de los VPH-AR, incrementan el riesgo de progresión de las lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) a carcinoma cervical invasor (CCI). La proteína E6 de los VPH-AR, juega un papel importante en la proliferación celular. Un estudio de proteómica en mujeres guerrerense ha evidenciado un aumento en la expresión de lumican y α -SMA en estadios tempranos IB1, IB2 y IIB del carcinoma de células escamosas con infección por VPH-16, perfilándose como potenciales biomarcadores de diagnóstico y pronóstico. Además, existen marcadores de proliferación celular como CD1 y Ki-67 que permiten definir el índice del crecimiento tumoral. **Objetivo:** Evaluar la expresión de lumican, α -SMA y CD1 en lesiones premalignas y carcinoma cervical y su relación con la oncoproteína E6 y el estado físico de los VPH-AR. **Material y métodos:** Se incluyeron 75 biopsias de cérvix uterino, con diagnóstico histológico de LEI o cáncer cervical. La genotipificación de los VPH-AR se determinó por INNOLiPAA-HPV Genotyping Extra II Amp y el estado físico del virus por el método de hibridación *in situ* con amplificación con tiramida. La expresión Ki-67, CD1, lumican, α -SMA y E6 fue por inmunohistoquímica **Resultados:** La expresión de CD1, lumican y E6 se correlacionan directamente con el grado de lesión histológico de LEI y CCE ($p < 0.001$). Los cambios en la expresión de α -SMA permiten diferenciar lesiones de bajo grado con respecto a las de alto grado ($p = 0.021$) y carcinoma cervical ($p < 0.001$). Se observaron diferencias significativas entre el estado físico de los VPH-AR (integrado y mixto) respecto a las LEI y al CCE ($p = 0.003$). La expresión de la oncoproteína E6 se correlaciona con la expresión de lumican, α -SMA y CD1 ($p < 0.001$). **Conclusión:** La expresión de lumican, α -SMA y CD1 se incrementó de acuerdo con el grado de lesión cervical y en los casos de CCE y está relacionada con la expresión de E6 ($p < 0.001$) de los VPH-AR, por lo que estas proteínas pueden ser implementadas para identificar grupos de riesgo con probabilidades de progresar a una lesión mayor.

Palabras clave: Lesión escamosa intraepitelial, carcinoma cervical invasor, VPH-AR, lumican, α -SMA, CD1, E6, Ki-67, inmunohistoquímica.

II. ABSTRACT

Introduction: The persistence and integration of HR-HPV, increase the risk of progression of squamous intraepithelial lesions (SIL) to invasive cervical carcinoma (CCI). The E6 protein of HR-HPV, plays an important role in cell proliferation. A proteomic study in women guerrerense evidenced an increase in the expression of α -SMA and lumican early stage IB1, IB2 and IIB of squamous cell carcinoma with HPV-16, emerging as potential diagnostic and prognostic biomarkers. Furthermore, there cell proliferation markers such as Ki-67 and CD1 for defining the rate of tumor growth. **Objective:** Evaluate the expression of lumican, α -SMA and CD1 in premalignant and cervical carcinoma and its relationship to the oncoprotein E6 and physical condition of HR-HPV. **Material and methods:** 75 biopsies of the uterine cervix were included, with histological diagnosis of SIL or cervical cancer. Genotyping of HR-HPV was determined by INNOLiPAA-HPV Genotyping Extra II Amp and fitness of the virus by the method of in situ hybridization with tyramide amplification. Ki-67 expression, CD1, lumican, α -SMA and E6 was by immunohistochemistry. **Results:** The expression of CD1, lumican and E6 directly correlate with the degree of histological injury SIL and CCE ($p < 0.001$). Changes in the expression of α -SMA differentiate low-grade lesions with respect to high-grade ($p = 0.021$) and cervical carcinoma ($p < 0.001$). Significant differences between the physical state of HR-HPV (integrated and mixed) regarding the SIL and CCE were observed ($p = 0.003$). The expression of E6 oncoprotein correlates with the expression of lumican, α -SMA and CD1 ($p < 0.001$). **Conclusion:** The expression of lumican, α -SMA and CD1 increased according to the degree of neck injury and in cases of CCE and is related to expression of E6 ($p < 0.001$) of HR-HPV, therefore, these proteins can be implemented to identify risk groups with probability of progressing to a greater injury.

Keywords: Squamous intraepithelial lesion, invasive cervical carcinoma, HR-HPV, lumican, α -SMA, CD1, E6, Ki-67 immunohistochemistry.

III. INTRODUCCIÓN

El virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), es el principal agente causal de las lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) y de los casos de carcinoma cervical invasor (CCI). Los VPH-AR que se consideran tienen un potencial oncogénico incluyen el 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 (Graham, 2017; Moody, 2017). La persistencia de los VPH-AR como el VPH-16 resulta en la integración del genoma viral en los sitios frágiles del cromosoma humano y ocurre cuando hay una pérdida del gen supresor E2, lo que conduce a una sobre expresión de las secuencias oncogénicas virales E6/E7 (Holme *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2015). Se ha reportado que la integración viral es un evento temprano asociado a la progresión de las LEI (Vega-Peña *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015).

En la carcinogénesis cervical está implicada la interacción de las oncoproteínas E6/E7 con proteínas clave en la regulación del ciclo celular, promoviendo la transformación e inmortalización celular (Mittal y Banks, 2016; Schiffman *et al.*, 2016). La oncoproteína E6 del VPH-16 inhibe la diferenciación y aumenta la proliferación de las células basales del epitelio cervical a través de la inactivación de p53 y Notch1 favoreciendo la progresión de las LEI (Kranjec *et al.*, 2017).

Las LEI de bajo grado (LEIBG), se caracterizan porque el estrato del tercio profundo epitelial presenta células inmaduras con alta capacidad proliferativa y un aumento del espesor de las capas basales y parabasales, mientras que las LEI de alto grado (LEIAG), representan las verdaderas lesiones precursoras del cáncer cervical y se caracterizan por presentar proliferación de células basales inmaduras con pérdida de polaridad, sobreposición del núcleo y escaso citoplasma que se encuentran confinadas en los dos tercios o hasta todo el espesor del epitelio (Jenkins, 2007; Galgano *et al.*, 2010).

Un ambiente de inflamación crónica posterior a la infección por el VPH-AR incrementa el riesgo de progresión de las LEI, los fibroblastos del estroma son responsables de inducir un estado inflamatorio a través de la secreción de citocinas y quimiocinas al epitelio cervical (Rego Barros *et al.*, 2018; Sheetal *et al.*, 2014).

La evaluación de marcadores de proliferación en las LEI, permite definir el grado de alteración celular, detectando cambios displásicos asociados a la infección por el VPH-AR. Ki-67 es un marcador de proliferación nuclear que se expresa en todas las fases del ciclo celular excepto en la G0, es considerado de valor pronóstico debido a que indica el índice del crecimiento del tumor (Aslani *et al.*, 2013).

La expresión de ciclina D1 (CD1) también es considerada como un marcador de proliferación celular, ya que promueve la progresión de la fase G1 a la S, asociándose a cinasas dependiente de ciclinas (CDK4-CDK6), formando un complejo que fosforila e inhibe la función de la proteína de retinoblastoma (RB) liberando el factor de transcripción E2F e induciendo la expresión de genes cuyas proteínas son necesarias para que las células entren en la fase de síntesis de ADN (Qie y Diehl, 2016). Un estudio por Conesa-Zamora *et al.*, en el 2009 reportan un aumento en la expresión de CD1 en los casos de CCE respecto a las LEIAG, asociando su expresión con la progresión de las neoplasias cervicales, sin embargo, un estudio realizado por Little y Stewart *et al.*, en el 2010, evaluaron a CD1 en 7 casos de lesiones glandulares de alto grado reportando expresión positiva, 12 casos adenocarcinoma *in situ* negativos a CD1 y 19 casos de adenocarcinoma endocervical invasor negativos a este marcador, por lo que concluyen que la evaluación de CD1 puede ayudar a la distinción entre lesiones premalignas endocervicales y adenocarcinoma (Little y Stewart *et al.*, 2010).

Por otro lado, debido a la necesidad de identificar que proteínas están presentes en los primeros estadios del carcinoma de células escamosas (CCE) en las mujeres guerrerenses, Serafín-Higuera *et al.*, en el 2016 realizaron un análisis proteómico en mujeres guerrerenses, identificando expresión elevada de lumican y α -SMA en un pool de muestras de CCE en estadios IB1, IB2 y IIB con infección por VPH-16, en comparación con tejido normal sin la infección viral donde se encontró disminuida la expresión de estas proteínas (Serafín-Higuera *et al.*, 2016).

Lumican es una proteína con un peso molecular de 40 kDa que pertenece a la familia de los proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP) de clase II, contribuyen al ensamblaje y organización de la matriz extracelular (MEC), los

motivos ricos en leucina de lumican (LRR) participan en el proceso de ensamblaje del colágeno, en el control de la migración celular, regula la progresión de las células tumorales, el crecimiento celular, la apoptosis, invasión, inmunorespuesta y la angiogénesis (Stasiak *et al.*, 2016). En cáncer de mama y pancreático se ha observado que lumican se integra a las fibras de colágeno del tipo I y II disminuyendo su degradación y en consecuencia altera la estructura del estroma promoviendo un tejido más fibroso y resistente a la quimioterapia (Nikitovic *et al.*, 2013).

Actina alfa del musculo liso (α -SMA) es una proteína con un peso molecular de 42 kDa del citoesqueleto y contribuyen a la transición epitelio mesénquima (TEM) en la embriogénesis y a la cicatrización de heridas en las células epiteliales normales (Scanlon *et al.*, 2013). En cáncer cervical, el tejido tumoral está rodeado por estroma reactivo, compuesto en su mayoría por fibroblastos asociados a cáncer (FAC) los cuales expresan α -SMA en el citoesqueleto, adquiriendo mayor motilidad para migrar e invadir otros nichos celulares (Fullár *et al.*, 2015).

En CCE existen cambios en la expresión de genes que alteran el estroma, promoviendo la angiogénesis y la invasión epitelial, además, diversos estudios señalan que la infección por VPH-AR induce la secreción de factores de crecimiento, citocinas y componentes de la MEC que favorecen la persistencia viral (Spurgeon y Lambert, 2017; Pietras *et al.*, 2008). Debido a la necesidad de contar con diversos biomarcadores que orienten al diagnóstico oportuno de las LEI, evaluamos la expresión de lumican, α -SMA, CD1 y E6 en biopsias cervicales con diagnóstico histológico de LEIBG, LEIAG y CCE en presencia de los VPH-AR y la integración del genoma viral.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se analizaron 75 biopsias cervicales de mujeres residentes del estado de Guerrero, el cual se ubica en el suroeste de México. Las biopsias de LEI fueron de mujeres que acudieron al servicio de colposcopia en la clínica de displasia del Hospital General Dr. Raymundo Abarca Alarcón de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, mientras que las muestras de CCE fueron de mujeres que asistieron al Instituto Estatal de Cancerología Dr. Arturo Beltrán Ortega, de la ciudad de Acapulco Guerrero. La biopsia dirigida por colposcopia fue obtenida de la zona acetoblancas del sitio de la lesión. El diagnóstico clínico y la clasificación histopatológica se realizó bajo los criterios de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (Wiebea *et al.*, 2012)

Las biopsias se preservaron en formol neutro amortiguado en buffer de fosfatos al 10% y se procesaron con la técnica de inclusión en parafina, realizando cortes de 3 μ , los cuales se desparafinaron en una estufa a 60 °C durante 10 min y se preservaron en xilol por 15 días. Posteriormente se realizó la tinción de Hematoxilina y Eosina H-E con el fin de ubicar la lesión y corroborar el diagnóstico histológico, utilizando la clasificación NIC modificada y su equivalencia citológica de Bethesda (Sellors y Sankaranarayanan, 2003). Se analizaron 3 grupos de mujeres: 25 con LEIBG (NIC I), 25 con LEIAG (NIC II/III) y 25 biopsias de CCE. Bajo la firma de un consentimiento informado, cada una de las pacientes respondió una encuesta para obtener información clínica. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Guerrero

Tipificación viral

La genotipificación viral se realizó con el kit INNO-LiPA® Genotyping Extra (Innogenetics NV, Ghent, Bélgica) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La región L1 del VPH fue amplificada por PCR con los primers-SPF10, los amplicones biotinados se desnaturalizaron e hibridaron con oligonucleótidos específicos anclados a una membrana, se añadió estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina seguido del cromógeno BCIP / NBT para revelar la reacción.

Inmunohistoquímica

La evaluación de la expresión de las proteínas lumican, α -SMA, ciclina D1, E6 y Ki-67 fue determinada por el método de inmunohistoquímica estreptavidina-biotina-peroxidasa, utilizando el sistema de detección the Cytoscan HRP/DAB Cell (Cell Marque Corporation, Hot Springs, AR, USA). Los anticuerpos monoclonales que se utilizaron fueron Lumican (clona EPR8898; 1:50), Abcam, Cambridge, MA, USA), α -SMA (clona 1A4; 1:100, alfa actina del musculo liso, Abcam, Cambridge, MA, USA), ciclina D1 (clona SP4; 1:10, Dako, Carpinteria, CA, USA), E6 (clona C1P5; 1:100, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) y Ki-67 (SP6; 1:70, Cell Marque Corporation CA, USA). Los tejidos se sometieron a recuperación antigénica utilizando un buffer citrato pH 6.0 (Newcastle Upon Tyne, UK) a 120°C durante 10 min en una olla pascal (Dako, Carpinteria, CA, USA). La actividad de la peroxidasa endógena se inactivó utilizando peróxido de hidrógeno al 3% por 1 h, posteriormente los tejidos se incubaron con su respectivo anticuerpo durante 2 h, y luego se añadió el anticuerpo secundario acoplado con biotina seguido de la incubación con estreptavidina peroxidasa. La reacción se reveló utilizando el cromógeno DAB y se contra-tiñó con hematoxilina de Harris.

Evaluación de la inmunohistoquímica

El inmunomarcaje de las proteínas lumican, α -SMA, CD1, E6 y Ki-67 se evaluó utilizando los criterios establecidos por Herfs *et al.*, en el 2013 basado en un sistema semicuantitativo que analiza la intensidad y distribución de la tinción. El puntaje para lumican y α -SMA incluyó la evaluación de una tinción marrón en el núcleo y citoplasma de las células del epitelio plano, células cilíndricas y del estroma, se calificó como 0 (negativo), 1 (células dispersas positivas), 2 (tinción continua en más de un tercio, pero no más de dos tercios del espesor epitelial) y 3 (tinción fuerte y difusa, uniforme desde la capa basal a la superficie epitelial). La puntuación para CD1, E6 y Ki-67 se basó en la tinción nuclear utilizando el criterio anteriormente señalado. Se evaluó la expresión de Ki-67 con la finalidad de definir el grado de lesión histológica en las biopsias, utilizándolo como control de proliferación celular y se comparó con la expresión de lumican, α -SMA, D1 y E6.

Análisis densitométrico

Se capturaron 5 imágenes de cada una de las inmunohistoquímicas mediante un microscopio óptico (Leica DM1000 LED) acoplado a una cámara digital (Leica EC3). Las imágenes se analizaron en el Software Image-Pro Plus 6.0® (IPP6) (Media Cybernetics, Silver Spring, MD. USA). Los resultados se expresaron como el promedio de la densidad óptica relativa multiplicado por $1.00 \pm EE$. (medida en unidades arbitrarias de intensidad neta).

Hibridación in situ:

La detección del DNA viral se realizó por hibridación *in situ* (HIS), con el sistema de amplificación de señal de tiramida de GenPoint Dako Cytomation, según el procedimiento de DAKO (Carpintería, CA, USA). Las muestras histológicas se sometieron a permeabilización durante 10 min a 120 °C (inmuno DNA recuperación con Declere Bio SB Inc., Santa Barbara, CA, USA), posteriormente se realizó digestión enzimática con proteinasa K (dilución 1:1000) por 1 min y se aplicó una gota de reactivo de ensayo (DNA viral biotinilado) con sondas dirigidas para 13 genotipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Posteriormente, se desnaturalizó durante 5 min a 95°C, se sometió a hibridación durante 20 h a 37°C (Hibridizer Dako, Carpintería, CA, USA) y se incubó en solución astringente durante 20 min a 55 °C. Para después incubar con estreptavidina primaria, seguido de biotinil-tiramida y por último estreptavidina secundaria durante 40 min cada reactivo. Se añadió DAB (1:50) por un min y finalmente se tiñó con hematoxilina de Harris por 5 seg. La reacción positiva se observó con un color marrón en el interior del núcleo, con un patrón difuso el estado episomal, punteado para el estado integrado o difuso y punteado para el estado mixto.

Análisis estadístico

La información obtenida del estudio histológico, tipificación del virus y datos de las encuestas de las pacientes fueron capturados en el programa STATA v 13. La relación entre las proteínas y el estado físico del VPH-AR se evaluó mediante la prueba de t-student. Las frecuencias relativas para las diferentes variables se analizaron mediante ANOVA y Chi2 para evaluar la correlación. Para determinar la relación entre la expresión de lumican, α -SMA, CD1 y E6 con el grado de la lesión, se evaluaron modelos de regresión lineal, obteniendo los coeficientes β e intervalos de confianza del 95%. Se consideró un valor significativo de $p \leq 0.05$. Finalmente, para evaluar la asociación de la expresión de E6 con lumican, α -SMA, y CD1 se realizó la prueba de correlación de *Pearson*.

V. RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran las variables de riesgo asociadas a la infección por el VPH en el desarrollo de una LEI y CCE. El rango de edad de las mujeres estudiadas fue de 20 a 86 años, identificando diferencias significativas entre la edad y el grado de lesión o cáncer ($p= 0.006$). Por otra parte, factores de riesgo asociados al cáncer cervical como la edad de inicio de vida sexual activa, la edad de la menarca, el número de compañeros sexuales o número de partos no fueron significativamente diferentes entre los grupos ($p > 0.05$).

Tabla 1. Características de la población en relación con el diagnóstico histológico

Variable de riesgo	LEIBG (NIC I) +VPH-AR n= 25	LEIAG (NIC II/III) +VPH-AR n= 25	CCE +VPH-AR n= 25	Total n= 75	p
*Edad					
20-30	11 (44)	5 (20)	0 (0)	16 (21.33)	0.006
31-40	5 (20)	10 (40)	6 (24)	21 (28.00)	
41-50	5 (20)	5 (20)	10 (40)	20 (26.67)	
>50	4 (16)	5 (20)	9 (36)	18 (24.00)	
*IVSA					
12-16	12 (48)	14 (56)	13 (54.17)	39 (52.70)	0.277
17-21	13 (52)	10 (40)	7 (29.17)	30 (40.54)	
22-26	0 (0)	1 (4)	3 (12.50)	4 (5.41)	
27-30	0 (0)	0 (0)	1 (4.17)	1 (1.35)	
*Menarca					
10-12	9 (37.50)	11 (44)	8 (32)	28 (37.84)	0.273
13-14	13 (54.17)	9 (36)	9 (36)	31 (41.89)	
15-16	2 (8.33)	5 (20)	8 (32)	15 (20.27)	
*No. de compañeros sexuales					
1	13 (52)	11 (44)	10 (50)	34 (48.57)	0.842
≥2	12 (48)	14 (56)	10 (50)	36 (51.43)	
*Número de partos					
0	4 (16)	5 (20)	1 (4)	10 (13.33)	0.223
≥1	21 (84)	20 (80)	24 (96)	65 (86.67)	

*Datos mostrados en n (%) frecuencias de las variables $p < 0.05$ (Chi2). IVSA: inicio de vida sexual activa. LEIBG lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG lesión escamosa intraepitelial de alto grado; NIC: Neoplasia intraepitelial cervical CCE carcinoma de células escamosas. VPH-AR virus de papiloma humano de alto riesgo; IM infección múltiple.

Frecuencia de los genotipos de VPH y el estado físico del DNA viral.

En este estudio se identificó que la infección múltiple (IM) por el VPH (42.7%) fue la más frecuente en los diferentes grupos de estudio, seguido por la infección con VPH 16 (24%) y VPH 18 (13.3%). De las muestras con IM, los genotipos más frecuentes fueron el 31, 33, 45, 51, 52, 56 y 58, también se identificaron virus de bajo riesgo (6,11) y de probable alto riesgo (26, 53, 66, 68, 73) en coinfección con los de alto riesgo. En las LEI la IM fue la de mayor frecuencia (56%), mientras que en los casos de CCE, el VPH 16 fue el más frecuente con el 44% (Tabla 2). Por otro lado, se realizó el análisis del estado físico del genoma viral, el estado integrado en combinación con el estado episomal (patrón mixto) fue el más frecuente en las LEIBG (76%), mientras que el estado integrado fue el más frecuente en las LEIAG (52%) y CCE (72%) (Tabla 2 Figura 1).

Tabla 2. Frecuencia de los VPH-AR en la población de estudio y evaluación del estado físico

VPH-AR	LEIBG (NIC I) n= 25	LEIAG (NIC II/III) n=25	CCE n= 25	Total n=75	<i>p</i>	
16	2 (8)	5 (20)	11 (44)	18 (24)	0.025	
18	1 (4)	3 (12)	6 (24)	10 (13.3)		
16+18	0 (0)	1 (4)	2 (12)	3 (12)		
31	1 (4)	1 (4)	0 (0)	2 (2.7)		
39	1 (4)	0 (0)	1 (4)	2 (2.7)		
45	0 (0)	0 (0)	1 (4)	1 (1.3)		
51	2 (8)	1 (4)	0 (0)	3 (12)		
53	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (1.3)		
58	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (1.3)		
66	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (1.3)		
68	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (1.3)		
*IM POR VPH (AR-BR)	14 (56)	14 (56)	4 (16)	32 (42.7)		
Estado Físico del VPH						
Mixto	19 (76)	12 (48)	7 (28)	38 (50.67)		0.003
Integrado	6 (24)	13 (52)	18 (72)	37 (49.33)		

Datos mostrados en n (%). El valor de $p < 0.05$ se calculó utilizando la prueba exacta de Fisher. LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEIAG: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; NIC: Neoplasia intraepitelial cervical. CCE: carcinoma de células escamosas. VPH-AR: virus de papiloma humano de alto riesgo. IM infección múltiple.

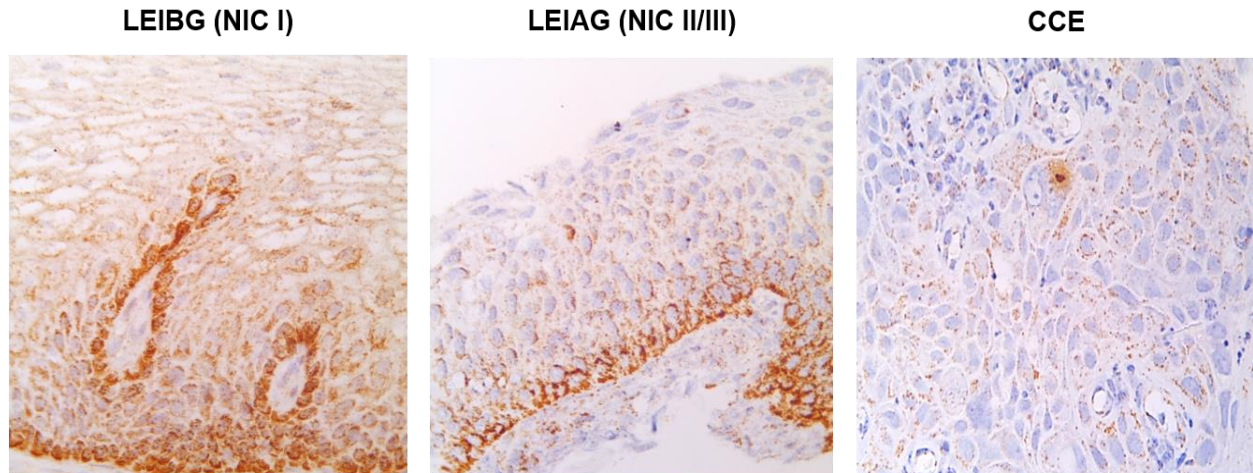


Figura 1. Estado físico del genoma de los VPH-AR. Imagen representativa de la forma integrada en una LEIBG, LEIAG y CCE. Señal puntiforme correspondiente al estado integrado del genoma viral. Técnica de hibridación *in situ* con amplificación con tiramida. 40X. LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. LEIAG: lesión escamosa intraepitelial de alto grado. CCE: carcinoma de células escamosas. NIC: neoplasia intraepitelial cervical

La expresión de Ki-67, CD1, lumican, α -SMA y E6 y las lesiones escamosas intraepiteliales y carcinoma de células escamosas.

Para corroborar el diagnóstico de LEI o CCE en los tejidos obtenidos por biopsia, se realizó la tinción de H-E (Figura 2 A1, A2, A3) y el análisis de la expresión de Ki-67 como un marcador de proliferación celular conocido en la detección de lesiones cervicales, el cual se realizó con base en la distribución del inmunomarcaje en el estrato epitelial de las LEI (primer tercio profundo, dos tercios profundos o en todo el espesor del epitelio). La expresión de Ki-67 en CCE se evaluó en las células con núcleos pleomórficos y anisocariosis.

Los resultados del inmunomarcaje de Ki-67 muestran que el 72% de los casos de LEIBG (NIC I), expresaron a la proteína en el primer tercio profundo de las células del epitelio (Tabla 3 y Figura 2-B1), mientras que en las LEIAG (NICII/III) se identificó una tinción en todo el espesor del epitelio con un 64% (Tabla 3 y Figura 2-B2) y en CCE en el 100% se expresó en los núcleos pleomórficos con anisocariosis en nidos tumorales que se encontraron en el estroma cervical (Tabla 3 y Figura 2-B3). En cuanto a los resultados de la evaluación de la expresión de CD1, se encontró que en los casos de LEIBG (NIC I) la expresión de esta proteína fue detectada en un

68% en el primer tercio profundo del epitelio, a nivel nuclear en un 96% (Tabla 3 y Figura 2-C1), comparadas las LEIAG (NIC II/III) en donde el 40% de estos casos, CD1 se expresó en los dos tercios profundos del epitelio y el 32% en todo el espesor del epitelio, presentando una localización nuclear del 92% de los casos de LEIAG (Tabla 3 y Figura 2-C2). El grupo de CCE mostró un inmunomarcaje del 100% en las células malignas y nidos tumorales (Tabla 3 y Figura 2-C3).

Lumican se expresó en un 44% en el primer tercio profundo del epitelio en las LEIBG (NIC I), presentó una localización a nivel de núcleo/citoplasma de un 44% (Tabla 3 y Figura 2-D1), mientras que en las LEIAG (NICII/III) se expresó en un 72% en todo el espesor del epitelio (Tabla 3 y Figura 2-D2). En CCE se expresó en el 100% de las células malignas y de manera muy interesante, el 76% se localizó sólo a nivel de citoplasma (Tabla 3 y Figura 2-D3).

La expresión positiva de α -SMA se detectó en un 52% en todo el espesor del epitelio de las LEIBG (NIC I), con mayor frecuencia en núcleo y citoplasma con el 52% (Tabla 3 y Figura 2-E1). En el grupo de las LEIAG (NIC II/III) se expresó en un 80% en todo el espesor del epitelio a nivel de núcleo y citoplasma (Tabla 3 y Figura 2-E2). El 100% de las muestras de CCE fue positivo para α -SMA expresándose en los fibroblastos estromales, células malignas y nidos tumorales, en un 80% a nivel de núcleo y citoplasma (Tabla 3 y Figura 2-E3).

En cuanto a E6 de los VPH-AR, los resultados muestran que la oncoproteína se expresó mayormente en los dos tercios del epitelio (48%) en las LEIBG (NIC I) (Tabla 3 y Figura 2-F1) y en un 84% en todo el espesor del epitelio en las LEIAG (NIC II/III) (Tabla 3 y Figura 2-F2), de acuerdo con la localización celular, ambos grupos expresaron a E6 tanto en núcleo como en citoplasma con una frecuencia del 72% y 64% respectivamente. En CCE E6 se sobreexpresó en el 100% de las células con anisocariosis y pleomorfismo nuclear presentes en nidos tumorales en el estroma, de igual manera se localizó a nivel de núcleo y citoplasma con una frecuencia de 88% (Tabla 3 y Figura 2-F3).

TABLA 3. EVALUACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA Ki-67, CD1, LUMICAN, α -SMA Y E6 EN LEI Y CCE

MARCADOR/TINCIÓN	LEIBG (NIC I) n=25	LEIAG (NIC II/III) n=25	CCE n=25	p
Ki-67				
DISTRIBUCIÓN				
1/3 DEL EPITELIO	18(72)	3(12)	0	
2/3 DEL EPITELIO	6(24)	6(24)	0	
TODO EL ESPESOR DEL EPITELIO	1(4)	16(64)	0	
NÚCLEOS PLEOMÓRFICOS Y NIDOS TUMORALES EN EL ESTROMA	0	0	25(100)	<0.001
LOCALIZACIÓN				
NÚCLEO	25(100)	25(100)	25(100)	
CITOPLASMA	0	0	0	
NÚCLEO/CITOPLASMA	0	0	0	
CD1				
DISTRIBUCIÓN				
1/3 DEL EPITELIO	17(68)	7(28)	0	
2/3 DEL EPITELIO	7(28)	10(40)	0	
TODO EL ESPESOR DEL EPITELIO	1(4)	8(32)	0	
NÚCLEOS PLEOMÓRFICOS Y NIDOS TUMORALES EN EL ESTROMA	0	0	25(100)	<0.001
LOCALIZACIÓN				
NÚCLEO	24(96)	23(92)	11(44)	
CITOPLASMA	0	0	0	
NÚCLEO/CITOPLASMA	1(4)	2(8)	14(56)	
LUMICAN				
DISTRIBUCIÓN				
1/3 DEL EPITELIO	11(44)	0	0	
2/3 DEL EPITELIO	6(24)	7(28)	0	
TODO EL ESPESOR DEL EPITELIO	8(32)	18(72)	0	
NÚCLEOS PLEOMÓRFICOS Y NIDOS TUMORALES EN EL ESTROMA	0	0	25(100)	<0.001
LOCALIZACIÓN				
NÚCLEO	8(32)	9(36)	0	
CITOPLASMA	6(24)	9(36)	19(76)	
NÚCLEO/CITOPLASMA	11(44)	7(28)	6(24)	
α-SMA				
DISTRIBUCIÓN				
1/3 DEL EPITELIO	2(8)	0	0	
2/3 DEL EPITELIO	10(40)	5(20)	0	
TODO EL ESPESOR DEL EPITELIO	13(52)	20(80)	0	
NÚCLEOS PLEOMÓRFICOS Y NIDOS TUMORALES EN EL ESTROMA	0	0	25(100)	<0.001
LOCALIZACIÓN				
NÚCLEO	12(48)	11(44)	1(4)	
CITOPLASMA	0	1(4)	2(8)	
NÚCLEO/CITOPLASMA	13(52)	13(52)	22(88)	
E6				
DISTRIBUCIÓN				
1/3 DEL EPITELIO	5(20)	0	0	
2/3 DEL EPITELIO	12(48)	4(16)	0	
TODO EL ESPESOR DEL EPITELIO	8(32)	21(84)	0	
NÚCLEOS PLEOMÓRFICOS Y NIDOS TUMORALES EN EL ESTROMA	0	0	25(100)	<0.001
LOCALIZACIÓN				
NÚCLEO	7(28)	7(28)	3(12)	
CITOPLASMA	0	2(8)	0	
NÚCLEO/CITOPLASMA	18(72)	16(64)	22(88)	

LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. LEIAG: lesión escamosa intraepitelial de alto grado. CCE: carcinoma de células escamosas. NIC: neoplasia intraepitelial cervical. Datos mostrados en n (%) *p<0.05 calculado por χ^2 . La interpretación de la inmunohistoquímica se realizó utilizando los criterios de evaluación de Herfs *et al* 2013

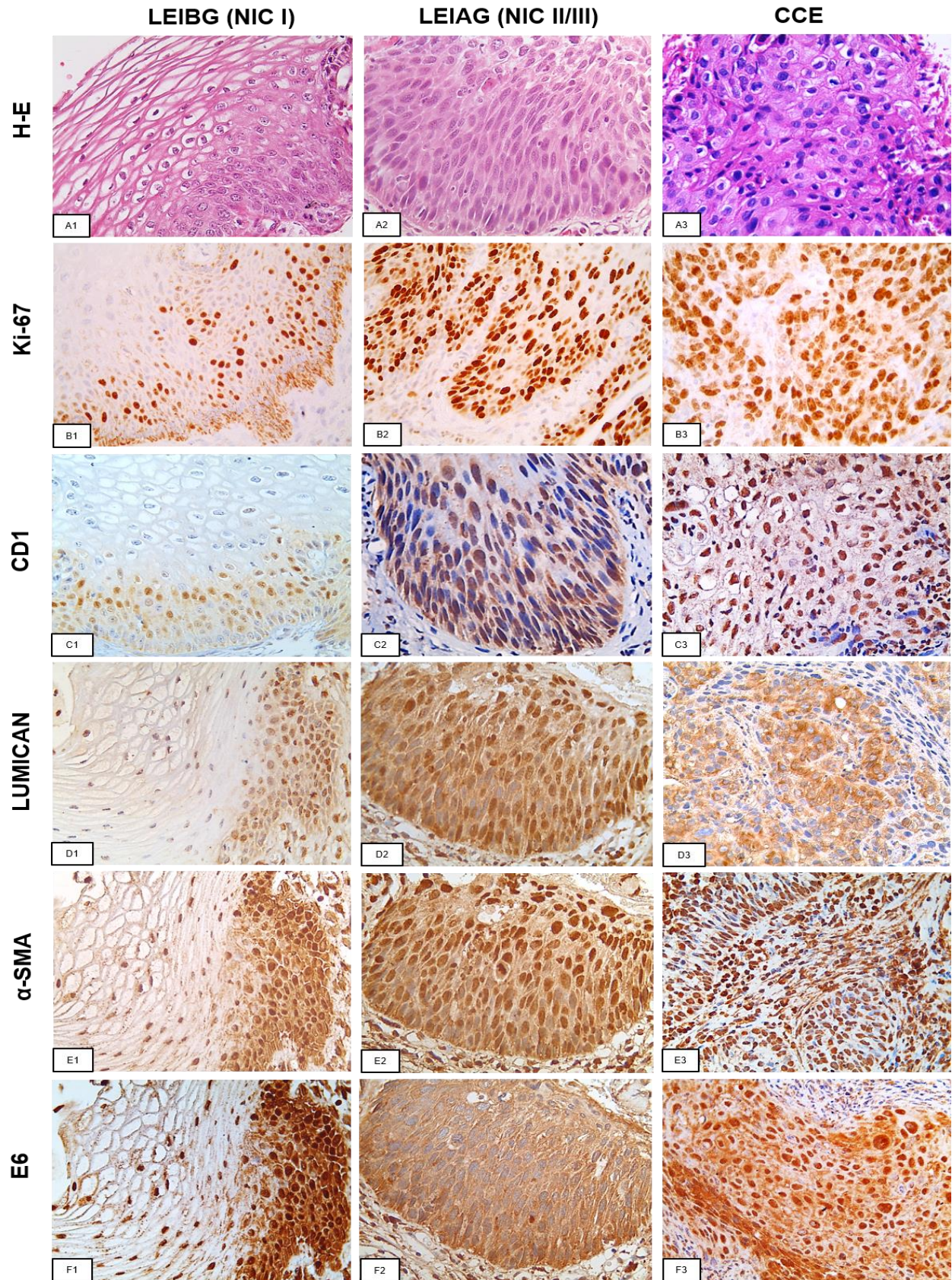


Figura 2. Expresión de Ki-67, CD1, lumican, α -SMA y E6 en biopsias cervicales de casos de LEI y CCE. (A1, A2, A3) Tinción de H-E de una LEIBG, LEIAG y CCE. (B1, B2, B3) Tinción marrón a nivel nuclear de Ki-67 en LEI Y CCE. (C1, C2, C3) Inmunohistoquímica positiva para CD1 en LEI y CCE. (D1, D2, D3) Inmunohistoquímica positiva para lumican en LEI y CCE. (E1, E2, E3) Inmunohistoquímica positiva para α -SMA en LEI y CCE. (F1, F2, F3) Inmunohistoquímica positiva para E6 en LEI y CCE. Técnica: Estreptavidina-Biotina peroxidasa. 40X

Expresión aberrante de CD1, lumican, α -SMA, y E6 en el epitelio cilíndrico y en la ZT

Por otro lado, en relación con el epitelio cilíndrico de la parte glandular del endocérnix presente en las biopsias estudiadas, los resultados se muestran en la tabla 4, encontrando que de las 25 muestras de LEIBG, el 52% fue positiva en las células cilíndricas para CD1 a nivel nuclear, mientras que en el grupo de las LEIAG el 60% de las células cilíndricas fueron positivas para este marcador (Figura 3-B). De lumican sólo el 28% de las células cilíndricas fue positiva a nivel de núcleo en las LEIBG, mientras que en las LEIAG solo el 20% fueron positivas a nivel de núcleo y citoplasma (Figura 3-C). La evaluación de α -SMA mostró que el 48% de las células cilíndricas fueron positivas a nivel de núcleo en las LEIBG y un 52 % en las LEIAG en el núcleo de las células cilíndrica (Figura 3-D). En las LEIBG se observó una expresión positiva de E6 en las células cilíndricas, identificando que el 56% presentó tinción positiva a nivel de núcleo, mientras que en las mujeres con diagnóstico de LEIAG, fue positivo en un 60% a E6 (Figura 3-E).

También es relevante mencionar que 4 de 25 muestras de casos con LEIAG (NIC II/III), presentaron la zona de transformación cervical completa y la expresión de lumican, α -SMA y E6 (Figura 3 H, I, J) en estos casos fue en las células de la unión escamocilíndrica de esta zona, mientras que la expresión de la CD1 fue positiva en solo tres muestras (Figura 3-G).

TABLA 4. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD1, LUMICAN, α -SMA Y E6 EN EL EPITELIO CILÍNDRICO DE LAS LEI

MARCADOR/LOCALIZACIÓN	LEIBG (NIC I) n=25	LEIAG (NIC II/III) n=25	*p
CD1	NÚCLEO	13 (52)	0.569
	CITOPLASMA	0	
	NÚCLEO/CITOPLASMA	0	
	NEGATIVO	12 (48)	
LUMICAN	NÚCLEO	7 (28)	0.448
	CITOPLASMA	3 (12)	
	NÚCLEO/CITOPLASMA	2 (8)	
	NEGATIVO	13 (52)	
α -SMA	NÚCLEO	12 (48)	0.741
	CITOPLASMA	0	
	NÚCLEO/CITOPLASMA	5 (20)	
	NEGATIVO	8 (32)	
E6	NÚCLEO	14 (56)	0.954
	CITOPLASMA	0	
	NÚCLEO/CITOPLASMA	2 (8)	
	NEGATIVO	9 (36)	

LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. LEIAG: lesión escamosa intraepitelial de alto grado. NIC: neoplasia intraepitelial cervical. Datos mostrados en n (%) *p<0.05 calculado por χ^2 .

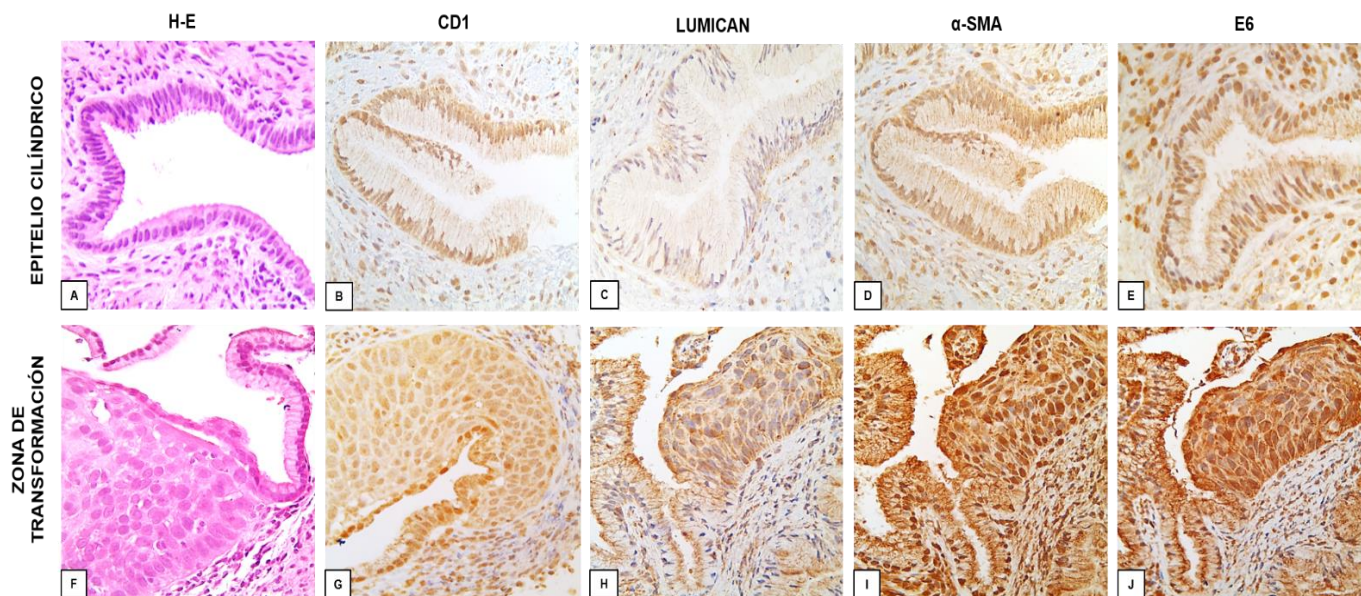


Figura 3. Tinción de inmunohistoquímica para CD1, lumican, α -SMA y E6 en células cilíndricas y la ZT. A) Tinción de H-E de las células cilíndricas. B) Expresión nuclear de CD1 en epitelio cilíndrico. C) Expresión de lumican en algunos núcleos de las células cilíndricas. D) Expresión nuclear de α -SMA en el epitelio cilíndrico. E) Expresión nuclear de E6 en el epitelio cilíndrico. F) H-E de la zona de transformación. G) Núcleos positivos para CD1 en las células de la ZT. H) Tinción positiva de lumican a nivel de citoplasma y algunos núcleos de las células de la ZT. I) Tinción positiva de α -SMA en las células de la ZT. J) Tinción positiva a E6 en las células de la ZT. Técnica: Estreptavidina-Biotina peroxidasa. 40X

El incremento de la expresión de CD1, lumican, α -SMA y E6 se asocia con el grado de lesión histológico

Identificamos un incremento significativo ($p < 0.001$) en la expresión de CD1, lumican y E6 en CCE en comparación con las LEIBG o LEIAG, mientras que no hubo diferencias significativas en la expresión de estos marcadores entre las LEIBG con las LEIAG (Figura 4 A, B, D). por otra parte, la expresión de α -SMA fue significativamente mayor en las LEIAG ($p= 0.021$) y en CCE ($p < 0.001$) en comparación con las LEIBG (Figura 4 C).

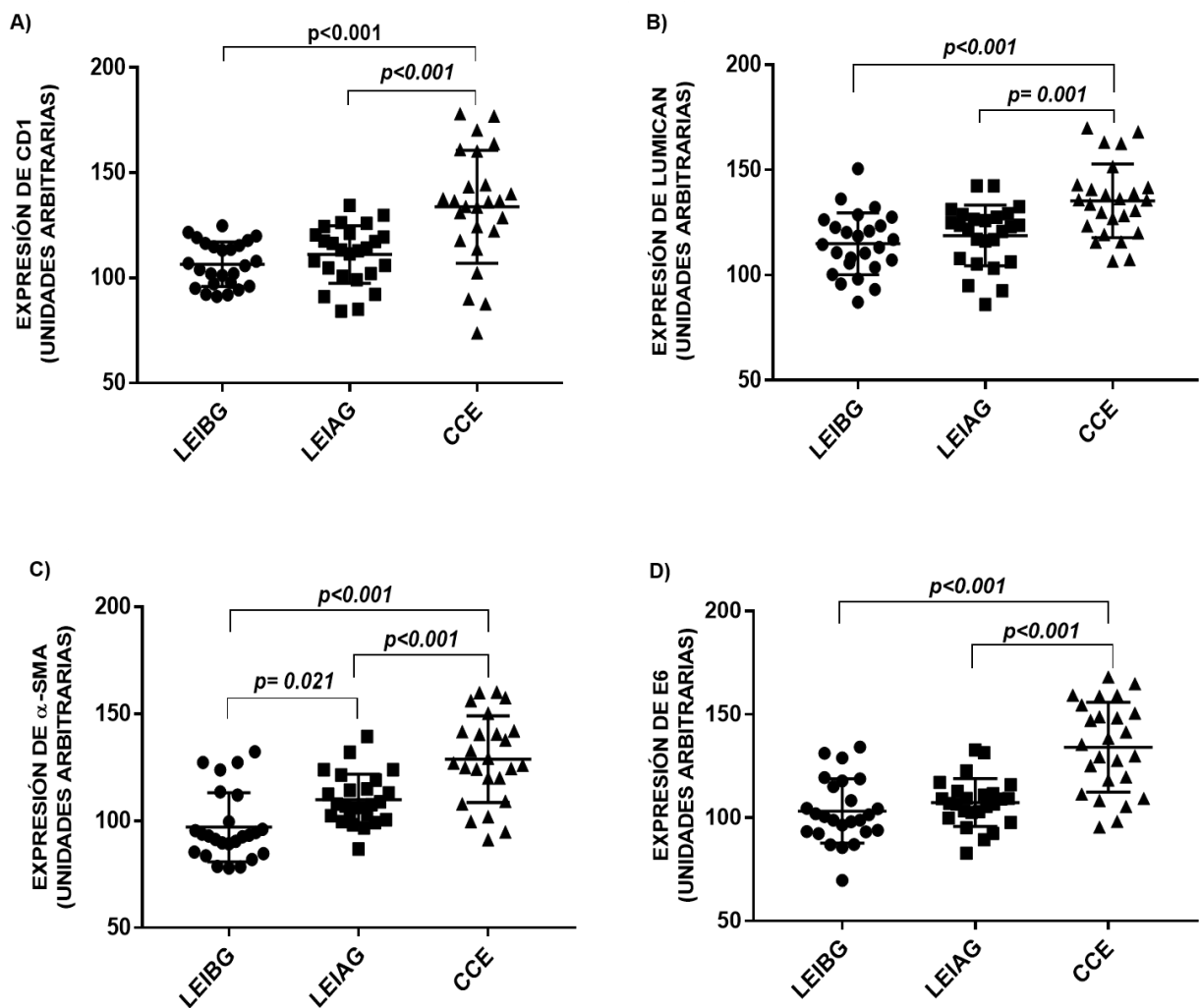


Figura 4. Incremento de la densidad media de CD1, lumican, α -SMA y E6 de acuerdo con el grado de lesión histológico en presencia del VPH-AR. A) Evaluación de la intensidad de tinción para CD1 en las LEI y CCE, mostrando una diferencia estadística significativa de acuerdo con el valor p . B) Densidad media de la expresión de lumican incrementó de acuerdo con el grado de lesión C) Densidad media de la expresión para α -SMA, incrementó de la expresión de acuerdo con el grado de lesión. D) Densidad media de la expresión para E6 observando un incremento de acuerdo al grado de lesión histológico. Media de la densidad obtenida a través del programa Image ProPlus 6 (IPP6.0®). $p < 0.05$ (ANOVA-Bonferroni).

De manera muy interesante, en el 100% de los casos de las LEI y CCE se observó una tinción positiva para lumican, α -SMA y E6 en el estroma, procediendo a cuantificar la expresión de estas proteínas con el fin de identificar posibles diferencias entre la expresión de estos marcadores con el tipo de lesión e infección por los VPH-AR. Los resultados indican un incremento en la expresión de lumican, α -SMA y E6 en CCE en comparación con las LEIBG y LEIAG ($p < 0.001$), sin embargo, no se identificaron diferencias significativas entre los grupos de LEI (Figura 5 A-B). Lumican se expresó en núcleo y citoplasma en los fibroblastos estromales, α -SMA se expresó en las células endoteliales, fibroblastos y miofibroblastos en los tejidos tumorales. E6 mostró una tinción positiva en el núcleo de los fibroblastos estromales.

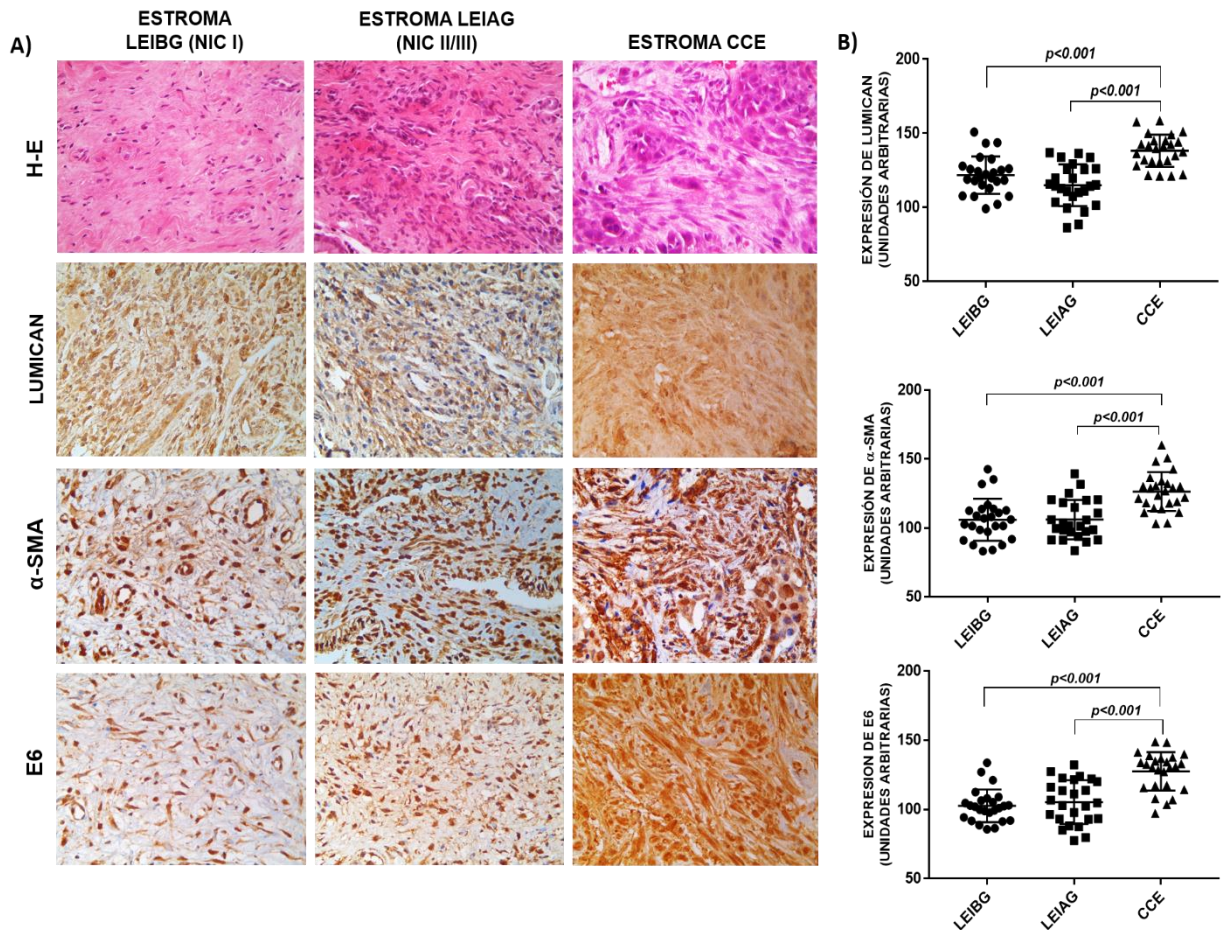


Figura 5. Tinción y evaluación de lumican, α -SMA y E6 por inmunohistoquímica del estroma en las LEI y CCE. A) Imagen representativa de H-E e IHQ para lumican, α -SMA y E6 en los grupos de estudio. B) Evaluación de la densidad media para lumican, α -SMA y E6, mostrando una diferencia estadística significativa de la intensidad de tinción entre las LEI con respecto al cáncer ($p < 0.001$). Media de la densidad obtenida mediante Image ProPlus 6 (IPP6.0®). $p < 0.05$ (ANOVA-Bonferroni). Técnica: Estreptavidina-Biotina peroxidasa. 40X

Sobreexpresión de CD1, lumican, α -SMA y E6 asociada al grado de lesión histológico

En el análisis de los modelos de regresión lineal ajustados por edad, se identificó incremento en el promedio significativo de la expresión de CD1 (4.7) en las LEIAG y en CCE (27.7) en comparación con las LEIBG. Mientras que para lumican se encontró mayor expresión en las LEIAG (3.2) y en CCE (16.8), ambos grupos comparados con las LEIBG. Las mujeres con LEIAG y CCE incremento significativamente en promedio 12.1 y 27.5 unidades la densidad promedio de la expresión para α -SMA en comparación con las pacientes con LEIBG. Por otra parte, la oncoproteína E6 se encontró con mayor expresión en las LEIAG y CCE con un incremento de 4.5 y 33.1 unidades de densidad media, en comparación con las LEIBG (Tabla 5).

Adicionalmente, se evaluó el cambio promedio de la expresión de lumican, α -SMA y E6 en el estroma con el grado de lesión. La expresión de lumican disminuyó en promedio 6.9 unidades de densidad en las pacientes con diagnóstico de LEIAG respecto a las que presentaron LEIBG, contrario a esto, las pacientes con CCE presentaron un aumento de 15.4 unidades en comparación con las LEIBG. Por otro lado, la expresión de α -SMA disminuyó en promedio en 0.1 unidades en las LEIAG e incrementó en 19.2 en CCE. Mientras que la expresión de E6 incrementó significativamente en 2.7 y 25.5 unidades en las LEIAG y CCE, respectivamente (Tabla 5).

TABLA 5. CAMBIO PROMEDIO DE LA EXPRESIÓN DE CD1, LUMICAN, α -SMA Y E6 DE ACUERDO CON EL GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICO.

EVALUACIÓN DEL EPITELIO PLANO				
MARCADOR	LEIAG (NIC II/III) β (IC 95%)	<i>p</i>	CCE β (IC 95%)	<i>p</i>
CD1	4.7 (-5.8, 15.2)	0.375	27.7 (15.9, 39.4)	<0.001
LUMICAN	3.2 (-5.5, 11.9)	0.462	16.8 (6.9, 26.6)	0.001
α -SMA	12.1 (2.9, 21.3)	0.011*	27.5 (17.2, 37.8)	<0.001
E6	4.5 (-4.9, 14.1)	0.345	33.1 (22.5, 43.8)	<0.001

EVALUACIÓN DEL ESTROMA				
MARCADOR	LEIAG (NIC II/III) β (IC 95%)	<i>p</i>	CCE β (IC 95%)	<i>p</i>
LUMICAN	-6.9 (-14.2, 0.2)	0.056	15.4 (7.3, 23.4)	<0.001
α -SMA	-0.1 (-8.4, 8.2)	0.979	19.2 (9.8, 28.4)	<0.001
E6	2.7 (-5.1, 10.3)	0.482	25.5 (16.6, 34.3)	<0.001

LEIBG: LEI de bajo grado. LEIAG: LEI de alto grado. CCE: carcinoma de células escamosas. NIC: neoplasia intraepitelial cervical. β : Coeficiente de regresión por modelo de regresión lineal ajustado por edad. El valor de *p* fue significativo al comparar los grupos de LEIAG y CCE con respecto a LEIBG.

Asociación de la expresión de CD1, lumican, α -SMA y E6 con el estado físico del genoma del virus en la carcinogénesis cervical

La integración del genoma de los VPH-AR modifican la expresión de las proteínas de la célula huésped, por esta razón se evaluó el estado físico del genoma viral por hibridación *in situ* en las biopsias cervicales, sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre la expresión de CD1, lumican, α -SMA y E6 con el estado físico del genoma viral en los tres grupos de estudio (Tabla 6).

TABLA 6. ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CD1, LUMICAN, α -SMA, E6 CON EL DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO Y EL ESTADO FÍSICO DEL VPH-AR

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	CD1	LUMICAN	α -SMA	E6
LEIBG				
MIXTO	106.1 (\pm 2.4)	115.4 (\pm 3.5)	96.8 (\pm 3.9)	103.5 (\pm 4.0)
INTEGRADO	107.9 (\pm 4.6)	113.3 (\pm 6.0)	97.7 (\pm 5.6)	102.5 (\pm 2.9)
*p	0.71	0.76	0.92	0.90
LEIAG				
MIXTO	109.2 (\pm 3.5)	119.4 (\pm 3.9)	112.4 (\pm 3.7)	105.7 (\pm 2.3)
INTEGRADO	112.9 (\pm 4.2)	118.4 (\pm 4.3)	107.63 (\pm 3.0)	108.9 (\pm 3.9)
*p	0.50	0.86	0.33	0.51
CCE				
MIXTO	134.2 (\pm 6.9)	134.4 (\pm 5.5)	139.2 (\pm 5.7)	133.4 (\pm 7.2)
INTEGRADO	133.6 (\pm 7.1)	135.7 (\pm 4.4)	124.7 (\pm 4.9)	134.4 (\pm 5.5)
*p	0.96	0.87	0.11	0.91

LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. LEIAG: lesión escamosa intraepitelial de alto grado. CCE: cáncer de células escamosas. El valor de *p* fue calculado con la prueba de t-student $p < 0.05$ (t-test).

Asociación de E6 de los VPH-AR con la expresión de lumican, α -SMA y CD1.

Para evaluar la asociación de la expresión de la oncoproteína E6 de los VPH-AR con lumican, α -SMA y CD1, se realizó la prueba de correlación de *Pearson*, encontrándose una correlación positiva entre la expresión de E6 y lumican ($r=0.56$, $p < 0.001$), α -SMA ($r=0.65$ y $p < 0.001$), CD1 ($r= 0.78$ y $p < 0.001$), lo que establece un aumento directamente proporcional entre la expresión de E6 y la expresión de las proteínas, con una correlación mayor entre la expresión de E6 y CD1 (Figura 6).

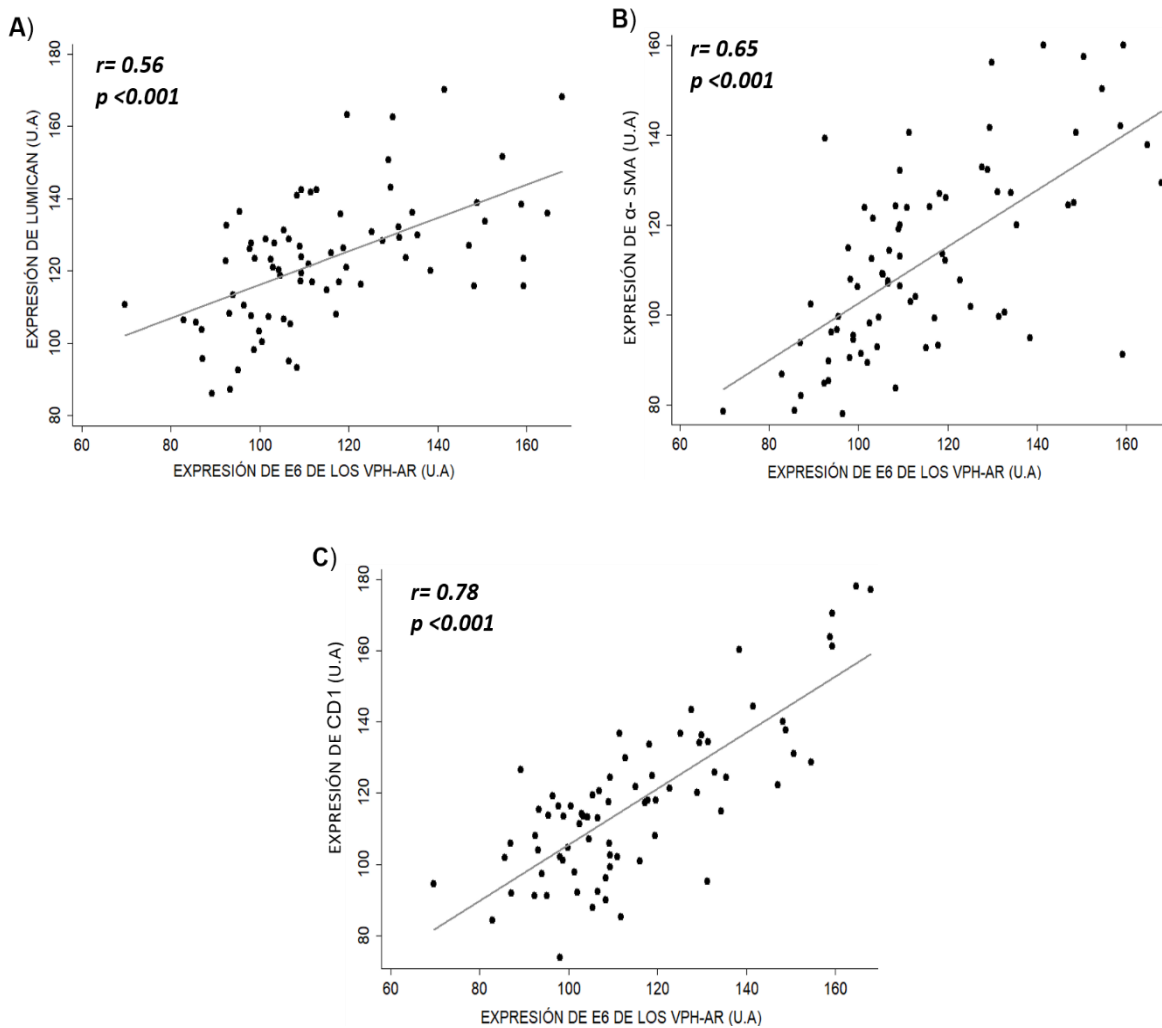


Figura 6. Correlación entre la expresión de la oncoproteína E6 de los VPH-AR y la expresión de lumican, α -SMA, CD1 en LEI y CCE. A) Correlación de E6 y lumican. **B)** Correlación de E6 y α -SMA **C)** Correlación de E6 y CD1. Los valores de r y p se calcularon con la prueba de correlación de *Pearson*. Cada punto indica una paciente y la pendiente establece la correlación de *Pearson*. U.A: Unidades arbitrarias de intensidad neta.

VI. DISCUSIÓN

Las pruebas cito-histológicas muestran baja especificidad en la detección oportuna del riesgo a desarrollar una lesión premaligna debido a la interpretación variada entre observadores. El diagnóstico histológico se basa en la observación de los cambios y alteraciones morfológicas en la célula, sin embargo, hay alteraciones moleculares que esta técnica no puede evidenciar, por lo que la evaluación *in situ* de proteínas asociadas a proliferación y TEM, además de la correlación de éstos cambios en su expresión con diferentes alteraciones en el fenotipo de la célula podrían tener utilidad clínica para la validación del diagnóstico clínico o el pronóstico de lesiones precursoras que podrían progresar a un carcinoma cervical (Walts y Bose, 2009; Tornesello *et al.*, 2013). Tomando como referencia el incremento de lumican y α -SMA reportado por Serafín-Higuera *et al.*, 2016 mediante proteómica en estadios tempranos IB1, IB2 y IIB de 6 muestras del carcinoma de células escamosas con infección por VPH-16 en mujeres guerrerenses, en este trabajo se evaluó la expresión de estas proteínas en biopsias cervicales de LEIBG, LEIAG y CCE además de la expresión de CD1, Ki-67 y su asociación con la expresión de la oncoproteína E6 de los VPH-AR y el estado físico viral.

Nuestros resultados muestran que el 24% de LEIBG y el 28% de estos casos presentaron la expresión de Ki-67 y CD1 respectivamente en los dos tercios profundos del epitelio de LEIBG, lo que nos podría sugerir que estas lesiones que histológicamente se encuentran confinadas en el estrato profundo del epitelio y la presencia de coilocitos en la capa superficial, además dado que la expresión de estas proteínas está detonando alteración en la proliferación celular desde el primer tercio profundo al estrato intermedio del epitelio plano escamoso, podría sugerirse la reevaluación del caso clínico, por lo que este grupo de mujeres potencialmente se encuentra en un grupo de riesgo de que estas LEIBG puedan progresar a una lesión mayor, por lo que se requiere realizar un estudio de seguimiento de estas mujeres para comprobar esta hipótesis de que Ki-67 es un marcador que indica la fracción de crecimiento de un tumor (Aslani *et al.*, 2013).

En cuanto a CD1, se ha asociado a la progresión de las neoplasias cervicales (Conesa-Zamora *et al.*, 2009). Es importante señalar que esta proteína se sintetiza en el citoplasma como una respuesta tardía a muchas señales mitogénicas y se ensambla con su cinasa dependiente de ciclina CDK4-CDK6, después de la activación del complejo CD-CDK4 por fosforilación, ingresa al núcleo, donde se acumula, conduciendo a la célula de la fase G1 a la fase S (Fleischmann *et al.*, 2011).

Los resultados de la evaluación de CD1 en las LEIAG muestran que el 32% de los casos se expresó CD1 en todo el espesor del epitelio, mientras que Ki-67 se expresó en un 64% en todo el espesor del epitelio por lo que las ciclinas de tipo D pueden no ser necesarias para la progresión de G1 en el epitelio cervical transformado por el VPH, ya que la oncoproteína E7 se une e interfiere con la función de pRb, evitando el requerimiento normal de ciclina D1-CDK en el inicio de la entrada del ciclo celular. Como resultado, hay una pérdida del ciclo de retroalimentación positiva y, por lo tanto, una regulación a la baja de CD1 a pesar del aumento concurrente en la proliferación celular (Portari *et al.*, 2013). Los resultados que correlacionan la expresión de E6 y CD1 (Figura 6, C) muestran un aumento directamente proporcional, estos datos validan que el proceso de integración del VPH induce la expresión de E6 y E7, y estos niveles de expresión afectan positivamente a proteínas asociadas con la proliferación celular, entre las que se encuentran las ciclinas.

Otra explicación de la variabilidad en los diferentes niveles de expresión se deben a que la CD1 se encuentra en el núcleo en la fase G1; a partir de entonces, CD1 se fosforila por GSK-3 β y se trasloca al citoplasma en la fase S donde es reconocida por diferentes ubiquitin ligasas de tipo E3 (Fbxo4, Fbxo31, Fbxw8, β -TrCP y APC/C), después de la poliubiquitinación, la CD1 se dirige al proteasoma para la degradación. El aumento en el grado de la lesión cervical se relaciona con el número de células en la fase S cuando la CD1 se encuentra en el citoplasma (Qie y Diehl, 2016).

La evaluación de la inmunexpresión de lumican y α -SMA en las LEI y el CCE permitió observar el comportamiento de las proteínas en presencia de VPH-AR al mismo tiempo se realizó la evaluación de E6, analizando la expresión y su relación con la progresión de las lesiones. Lumican es una proteína estructural de la MEC y debido a los procesos biológicos en los que participa, se le pueden atribuir funciones importantes en la homeostasis del tejido, facilitando los procesos de proliferación, migración, regulación de la secreción de citocinas y de factores de crecimiento (Appunnia *et al.*, 2019).

La inmunexpresión de lumican en las lesiones premalignas se observó aumentada en las LEIBG a nivel de núcleo, mientras que en las LEIAG aumenta la expresión a nivel de citoplasma. En los diferentes estadios del CCE el 100% de los casos está expresando un patrón difuso localizado en la periferia de las células tumorales y en las células que invadieron el estroma. No existen reportes en los que se evalué a lumican como biomarcador en lesiones premalignas del cérvix uterino, sin embargo, si hay reportes de la expresión en diferentes tipos de cáncer. Naito *et al.*, en el 2002 evaluaron la expresión de lumican en cáncer cervical, observando una inmunoreactividad positiva en 21 de 28 casos, y una expresión en el citoplasma de las células cancerosas. Ishiwata *et al.*, en el 2007 evaluaron la expresión de lumican en 53 biopsias de cáncer ductal pancreático, lumican se expresó en el citoplasma de las células de cáncer en 30 de 53 biopsias con cáncer, también se localizó en los tejidos del estroma adyacente a las células cancerosas, en 36 de los 53 pacientes.

Un estudio más reciente realizado por Chen *et al.*, en el 2017, evalúan la expresión de lumican en biopsias de cáncer gástrico, el cual se expresó en 66.4% de los casos de cáncer asociándose con metástasis a órganos, ganglios linfáticos y una supervivencia baja. De acuerdo con nuestros hallazgos lumican podría ser un biomarcador de progresión ya que se observó un aumento de la expresión de 3.2 en las LEIAG y 16.8 en CCE respecto a las LEIBG. Por lo anterior descrito se sugiere que la desregulación y la sobreexpresión de esta proteína puede estar asociada a una progresión de un fenotipo maligno en la célula (Brézillon *et al.*, 2013).

Dependiendo del tejido y los contextos de señalización, las células epiteliales pueden perder algunas características o mostrar propiedades epiteliales y mesenquimales; esto se considera como una transición epitelio-mesénquima (EMT) parcial. De acuerdo con los resultados obtenidos α -SMA se está expresando en un 52% en todo el espesor del epitelio a nivel de núcleo y citoplasma en las LEIBG, en las LEIAG en un 80% en las células displásicas. Un estudio realizado en el 2009 por Li *et al.*, donde evalúan la expresión de α -SMA en biopsias de cérvix normal comparándolas con NIC 1, NIC 2/3 y CCE, reportaron que a medida que aumentaba el grado de la lesión histológica aumentaba la expresión de α -SMA en los miofibroblastos del estroma de manera que, todos los casos de CCE tenían miofibroblastos estromales positivos a α -SMA.

Se sabe que los fibroblastos asociados a cáncer (FAC) o miofibroblastos potencian el desarrollo y la progresión de los cánceres epiteliales. Los fibroblastos pueden distinguirse en función de la etapa de desarrollo tumoral por diferencias en la expresión de α -SMA, que se expresa más en fibroblastos maduros que en células de nueva transición, de manera que en etapas tempranas del cáncer podrían estar expresando fibroblastos maduros (Scanlon *et al.*, 2013). La expresión de α -SMA está controlada por factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular, se incorpora a las fibras de estrés de los fibroblastos, aumentando su capacidad contráctil (Hinz *et al.*, 2012).

Nuestros resultados son interesantes ya que en α -SMA se expresó en células epiteliales de LEI, lo cual nos podría indicar que la célula adquirió un fenotipo mesenquimal, incluso en las células donde no hay cambios morfológicos aparentes que indiquen una alteración hay expresión de este marcador, de manera que se deberían evaluar otros marcadores de TEM que permitan confirmar nuestros hallazgos. Fullar *et al.*, en el 2015 evaluaron la expresión de α -SMA en 29 casos de cáncer con VPH 16 y 18 comparándolo con 27 biopsias de cérvix normal, encontrando un aumento de la expresión de 5.2 veces en el estroma intersticial determinado mediante densitometría, de manera que la expresión de α -SMA tiene una función importante en la activación de los FAC y en el cambio en la estructura

de la MEC, en nuestros resultados también se observa un aumento de la expresión a medida que progresa la lesión tanto en epitelio cervical y estroma por lo que deducimos que la expresión de α -SMA está determinada por la expresión constitutiva de las oncoproteínas E6/E7 de los VPH-AR.

Por otro lado, diversos estudios reportan el importante papel de E6 en la carcinogénesis cervical, debido a la interacción con diversas proteínas modificando el microambiente celular induciendo desdiferenciación celular y evitando que la célula infectada con el virus sea degradada. De acuerdo con los resultados obtenidos E6 se expresó en las LEIBG y en todo el estrato epitelial, lo que nos indica que esas células están propensas a alteraciones en su función y que hay un riesgo a que la lesión progrese. Un estudio del grupo de trabajo realizado por Jiménez-Tagle *et al.*, en el 2015 evaluaron la expresión de la proteína viral E6 en citologías cervicales sin LEI y LEIBG todas con VPH 16, encontrando una mayor expresión de E6 en LEIBG que en el grupo sin LEI, proponiendo que la expresión elevada de E6 puede ser un marcador temprano de progresión del carcinoma cervical. Estos resultados concuerdan con nuestros hallazgos a nivel histológico.

Las células displásicas que expresaron α -SMA en nuestro grupo de LEI de bajo y alto grado expresaron en el mismo estrato del epitelio a E6, si bien no hay evidencia experimental de que E6 promueva la expresión de α -SMA, un estudio realizado en el 2012 por Cheng *et al.*, en una línea celular de cáncer cervical negativa al VPH (Cx) al transfectarla con E6/E7 del VPH-16 (CxWJ) y tratadas con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 2/3 mostro un aumento en la expresión de α -SMA. Estudios realizados por Vishnoi *et al.*, en el 2016 demuestran que las oncoproteínas E6/E7 del VPH-16 promueven la TEM induciendo la expresión de proteínas y factores de transcripción implicadas en el proceso. Jung *et al.*, en el 2013 han evidenciado que la expresión ectópica de E6/E7 del VPH-16 induce el cambio morfológico de tipo epitelial a mesenquimal en la línea celular MDCK y un aumento en la expresión de factores de la transcripción implicados en la TEM (Slug, Twist, ZEB1 y ZEB2).

Por otro lado, Hu *et al.*, proponen que la expresión constitutiva de E6/E7 del VPH-16 promueven la migración y la invasión celular mediante disminución de la expresión de N-cadherina y un aumento en la expresión de P-cadherina.

De acuerdo con nuestros resultados se encontró que la infección múltiple por el VPH-AR y otros de diferente riesgo oncogénico son más frecuentes en las pacientes con LEIBG y LEIAG. Estudios epidemiológicos sugieren que la adquisición de diferentes tipos virales ocurre con más frecuencia al azar que por los factores de riesgo ya establecidos, las coinfecciones con más de un VPH se han asociado con una mayor duración de la infección y un mayor riesgo de desarrollar anomalías citológicas y neoplasias cervical (De Brot *et al.*, 2016). La alta prevalencia de VPH-AR en coinfecciones puede asociarse con una mayor tasa de persistencia en comparación con los VPH-BR.

La integración del genoma del VPH-AR comienza con el daño al DNA o ruptura de la doble cadena por el estrés oxidativo, por las proteínas del virus o por el mecanismo de reparación del daño al DNA (DDR). Los sitios de integración se distribuyen en todo el genoma los cuales se conocen como sitios frágiles cromosómicos, siendo propensos a roturas facilitando así la integración del DNA viral (Senapati *et al.*, 2016). De acuerdo con nuestra evaluación del estado físico del genoma de los VPH-AR, encontramos que el 100% de las biopsias presentan la versión integrada sola o combinado con el estado episomal (mixta). Un estudio realizado en el grupo de trabajo por Vega-Peña *et al.*, 2013 donde evalúan el estado físico del genoma viral en citologías cervicales sin LEI y con LEIBG ambos grupos con VPH 16 reportan que el 83% de las mujeres sin LEI presentan el estado integrado, mientras que las mujeres con LEIBG presentan el estado integrado en un 52%, en otro estudio realizado en el 2013 por Zubillaga-Guerrero *et al.*, evalúan el estado físico del genoma del VPH-AR, reportando que en mujeres sin LEI y con VPH-AR el 20% presentó el estado mixto y el 23.3% el estado integrado, por otro lado en el grupo de LEIBG y VPH-AR presento en un 90% el estado mixto y el 10% la versión integrada.

La integración es un paso característico en la carcinogénesis cervical y su aparición se relaciona con la progresión con las LEI a un cáncer invasivo, al integrarse el genoma del VPH hay una pérdida del gen E2, en consecuencia, una sobreexpresión de E6/E7 involucrados en la transformación celular y mantenimiento de un fenotipo maligno (Schmitz *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran que hay expresión de E6 en el 100% de las LEI con VPH-AR y además todas cuentan con la versión integrada del virus, por lo que esta población de mujeres es un grupo de riesgo que tiene muchas posibilidades de que la lesión progrese a una lesión mayor o cáncer, por ello se requiere un seguimiento estricto para darles un tratamiento oportuno.

A pesar de no encontrar diferencias significativas entre la expresión de lumican, α -SMA, CD1 y E6 con el estado integrado de los VPH-AR, en la actualidad se sabe que la integración no solo modifica la expresión desregulada de las oncoproteínas virales, sino que también altera la expresión de genes del huésped, un estudio realizado por Lu *et al.*, en el 2014 informan que algunos sitios de integración están cercanos a genes supresores de tumor (miR-34a, MSH2, WWOX y TIMP3) y a oncogenes (ROCK2, CD28, EBAG9 and ANGPT1), de manera que la integración del virus propicia las condiciones necesarias para la progresión de las lesiones cervicales.

Las lesiones premalignas en el epitelio glandular no están bien descritas debido a que los cambios morfológicos son sutiles, existe poca evidencia de la historia natural entre la infección del VPH y las lesiones precursoras, McCluggage *et al.*, en el 2013 proponen que las lesiones precursoras glandulares se caracterizan por presentar poca atipia nuclear, disminución de la mucina, núcleos hiper cromáticos con figuras mitóticas y cuerpos apoptóticos ocasionales, sin embargo se debe tener experiencia para poder diferenciar este tipo de lesiones, el uso de biomarcadores como la expresión difusa de p16^{INK4a} apoya al diagnóstico. En nuestro estudio identificamos la expresión de lumican, α -SMA, CD1 y E6 en las LEIBG y LEIAG las cuales pueden ser biomarcadores que apoyen al diagnóstico o seguimiento de las lesiones endocervicales.

De manera interesante encontramos expresión de lumican α -SMA, CD1 y E6 en la ZT en 4 casos de LEIAG, estos hallazgos muestran evidencia de que existe alteración en las células de metaplasia originadas por las oncoproteínas E6/E7 de los VPH-AR. En la actualidad se sugiere que la infección productiva del VPH-AR es favorecida en el ectocérvix y que la formación de lesiones comienza a partir de la infección de una célula madre epitelial de reserva o célula madre cuboidal en la ZT (Schiffman *et al.*, 2016). Por otro lado, Herfs *et al.*, en el 2012 describen la presencia de un grupo de células epiteliales cubicas dentro de la ZT con un perfil de expresión génico único, diferente del epitelio ecto-endocervical en presencia de los VPH-AR, proponiendo que la infección por los VPH-AR modifican el patrón de expresión de las proteínas en esta población de células promoviendo el inicio de las lesiones cervicales en la ZT.

Si bien no se muestra el resultado de la evaluación citológica de las pacientes, es importante mencionar que se caracterizó el patrón inflamatorio cervical, clasificándolo en cervicitis aguda (presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y cervicitis crónica (presencia de PMN, linfocitos e histiocitos). De acuerdo a los resultados el 52% de las pacientes con LEIBG presentaron cervicitis crónica y un 48% cervicitis aguda, mientras que el 68% de las pacientes con LEIAG presentaron cervicitis crónica y el 32% cervicitis aguda, estos hallazgos son muy importantes ya que recientemente se ha descrito que las células estromales promueven este ambiente como cofactores para la carcinogénesis asociada al VPH debido a la intensa comunicación cruzada entre ellas y las células epiteliales, tumorales o inmunitarias en el microambiente del tumor (Rego Barros *et al.*, 2018).

Debido a que lumican se une a receptores tipo Toll (TLR) y tiene la capacidad de reclutar células del sistema inmunológico (neutrófilos y macrófagos) (Karamanou *et al.*, 2018) se infiere que su presencia en el epitelio cervical está promoviendo un ambiente inflamatorio ya que se observó en nuestra evaluación una tinción positiva en los casos de LEI y CCE, no existen reportes de esta asociación en muestras cervicales, pero si hay estudios que demuestran que lumican propicia un ambiente inflamatorio en respuesta a una lesión y cicatrización de la herida, Hayashi *et al.*,

evaluaron la infiltración de neutrófilos en la córnea de ratones knock-out para lumican y ratones que expresaban lumican en el estroma de la córnea, sus resultados mostraron que los PMN no invadieron la córnea lesionada en los ratones knock-out, contrario a esto, se demostró una infiltración de PMN en el estroma de la córnea de los ratones transgénicos positivos a lumican. También se ha detectado a lumican en la superficie de los PMN extraídos del peritoneo de ratones y ausencia de lumican en los PMN de la médula ósea y sangre periférica, esto sugiere que los PMN deben unirse a lumican durante o después de cruzar la barrera endotelial a medida que salen de la circulación, específicamente lumican se une a las integrinas MAC-1 y LFA-1 de los PMN modulando su extravasación (Lee Seakwoo *et al.*, 2009)

El papel del estroma en la carcinogénesis cervical es un área relativamente poco explorada, en la actualidad se reconoce que, gracias a las citocinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular secretadas al epitelio plano le dan las condiciones idóneas para establecer una infección persistente para el VPH-AR y a la progresión de las lesiones premalignas (Spurgeon y Lambert 2017). Se sabe que los factores de crecimiento secretados por los fibroblastos mantienen al genoma viral en estado episomal, esto lo comprueban Dall *et al.*, en el 2008, en cultivos de queratinocitos (W12) que se aislaron a partir de una LEIBG infectada con HPV16, el genoma del HPV estaba en forma episomal, al eliminar los fibroblastos co-cultivados de los queratinocitos promovió la integración del genoma viral. Por otro lado, se ha demostrado que los VPH-AR regula la secreción de las metaloproteasas de matriz (MMP) siendo estas las responsables de la reorganización del estroma. Un estudio realizado en el 2004 por Sato *et al.*, utilizaron células SKG-II positivas al VPH 18 al co-cultivadas con fibroblastos cervicales observaron un incremento en la expresión de las MMP-1 y MMP-3 mientras que Zhu *et al.*, en el 2013 demuestran que el nivel de ARNm de MT1-MMP, MMP-2 y MMP-9 fue significativamente mayor en las células Caski (P <0.01) y SiHa (P <0.001) que en las células C33A negativas para E6 / E7 de VPH16 y los resultados western blot confirmaron la sobre expresión de MT1-MMP, MMP-2 y MMP-9 a nivel de proteína en las células Caski y SiHa, que en células C33A. Otro mecanismo de comunicación entre el epitelio y el estroma cervical es a través de la secreción de exosomas, proporcionando una posibilidad

de intercambio de material genético en forma de ARN siendo un mecanismo que modula la expresión y función de los genes en las células receptoras (Kalluri 2016; Valadi *et al.*, 2007). Un estudio reciente por Chiantore *et al.*, en el 2016 demostraron la presencia de los transcritos de E6 y E7 en exosomas secretados por queratinocitos transfectados con E6/E7 del VPH16 y VPH-39. Los resultados demuestran que existe una comunicación bidireccional entre el epitelio infectado con el VPH-AR y el estroma ya que en el 100% de los casos analizados se encontró una tinción positiva de la oncoproteína E6 en los fibroblastos estromales observándose un incremento de la expresión a medida que aumento la lesión ($p < 0.001$), también se observó una tinción positiva para lumican en los fibroblastos a nivel de núcleo y citoplasma en todos los casos de LEI y CCE al igual que α -SMA mostró una tinción positiva en células endoteliales y fibroblastos del estroma de las LEI y en tejido tumoral en fibroblastos asociados a cáncer.

Se determinó que el 56% de las mujeres con LEI, tuvieron la IM por VPH-AR y el estado integrado del virus y el 60% de estas se presentó inflamación crónica, por lo que sugerimos que todos estos factores son determinantes para la progresión de las LEI y promueven la expresión de proteínas como lumican, α -SMA, CD1 y E6, lo que evidencia grupos de riesgo con posibilidades de progresar a una lesión mayor. En la actualidad no existen reportes que de manera conjunta evalúen este panel de proteínas y todos estos factores y asociándolos a la búsqueda de biomarcadores, por lo que nuestros hallazgos son de gran utilidad para seguir explorando estas y otras proteínas que permitan el diagnóstico oportuno del carcinoma cervical.

Finalmente es importante resaltar que de los 25 casos de CCE analizados se encontró mediante inmunohistoquímica sobreexpresión de lumican y α -SMA, en 17 casos de CCE en estadio (IB, IIB) con VPH 16, 18, 52, 45. Al igual que en 8 casos de CCE en estadio avanzados (IIIA, IIB y IVB) con VPH 16, 18, 39 y 58 (datos no mostrados), estos resultados concuerdan con los hallazgos reportados por Serafín-Higuera *et al.*, en estadios tempranos de CCE (IB1, IB2 y IIB) con VPH 16, sin embargo se requiere homogenizar los grupos de CCE en nuestro estudio para poder analizar el comportamiento de la expresión de las proteínas por estadio clínico.

VII. CONCLUSIONES

- La expresión de lumican, α -SMA y CD1 se incrementó de acuerdo con el grado de lesión cervical y en los casos de CCE y está relacionada con la expresión de E6 de los VPH-AR ($p<0.001$).
- El 100% de la población presenta la versión integrada de los VPH-AR, de los cuales, el 51% tiene el estado mixto ($p=0.003$), siendo este un factor para la progresión de la LEI, por lo que se requiere un seguimiento estricto de los casos.
- La expresión de lumican, α -SMA, CD1 y E6 en las células cilíndricas de los casos de LEI, sugieren alteraciones inducidas por la infección por los VPH-AR en la porción endocervical de la zona de transformación, por lo que se sugiere un control y seguimiento colposcópico estricto de estas mujeres.
- Se encontró un incremento en la expresión de la oncoproteína E6 de los VPH-AR, lumican y α -SMA en el estroma a medida que progresa la LEI ($p<0.001$), lo que nos sugiere alteraciones en el estroma que promueven un ambiente idóneo en la progresión del carcinoma cervical.
- Se comprueba por inmunohistoquímica, la sobreexpresión de lumican y α -SMA en 17 tejidos incluidos en parafina de carcinoma de células escamosas en estadios tempranos (IB y IIB) con infección por VPH-AR incluyendo el VPH-16 en estado físico mixto e integrado.
- Se demuestra la sobreexpresión de lumican y α -SMA en los 8 casos en etapas avanzadas de CCE (IIIA, IIIB y IVB) con infección por VPH-16 único o en coinfección con otro tipo de VPH-AR con estado integrado y mixto de estos virus.

VIII. PERSPECTIVAS.

- Analizar la expresión de lumican, α -SMA y CD1 en células normales sin LEI con infección del VPH-AR o con VPH de bajo riesgo, para comprobar que efectivamente la oncoproteína E6 de los VPH-AR causa un efecto en la expresión de estas proteínas.
- Evaluar la expresión de otras proteínas implicadas en el proceso de transición epitelio mesénquima como E-cadherina, N-cadherina, β -catenina, Vimentina y Hic-5 en el grupo LEI positivas a α -SMA con la finalidad de evaluar las probabilidades de progresión de las lesiones.
- Realizar la evaluación de Ki-67, lumican, α -SMA, CD1 y la oncoproteína E6 de los VPH-AR en conos cervicales y aportar información de la expresión de estas proteínas en la zona de transformación escamocolumnar del cérvix uterino y la persistencia de la lesión residual en las piezas de histerectomía cervical.
- Realizar una evaluación comparativa entre la expresión de lumican, α -SMA y Ki-67 en LEI con VPH-AR en muestras de citología líquida, lo que nos permitirá evidenciar la alteración de la proliferación celular temprana y contribuir con técnicas menos invasivas y complementarias como la inmunocitoquímica en la detección oportuna de las lesiones tempranas del cérvix uterino.
- Se sugiere realizar un control y seguimiento clínico estricto de aquellas mujeres cuyas lesiones se encontró la sobreexpresión de lumican, α -SMA, CD1 y E6 de los VPH-AR en la región endocervical de la zona de transformación escamo cilíndrica del cérvix uterino.

IX. REFERENCIAS

1. **Appunnia S**, Ananda V, Khandelwala M, Gupta N, Rubensc M, Sharma A. (2019) Small Leucine Rich Proteoglycans (decorin, biglycan and lumican) in cancer. *Clinica Chimica Acta*. 491 1–7.
2. **Aslani FS**, Safaei A, Pourjabali M, Momtahan Mozhdeh. (2013) Evaluation of Ki67, p16 and CK17 Markers in Differentiating Cervical Intraepithelial Neoplasia and Benign Lesions. *Iran Journal Medical Science*. 38 15-21.
3. **Brézillon S**, Pietraszek K, Maquart FX, Wegrowski Y. (2013) Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins. *The FEBS Journal* 2369–2381.
4. **Chen L**, Zhang Y, Zuo Y, MA F y Song Hongjiang. (2017) Lumican expression in gastric cancer and its association with biological behavior and prognosis. *Oncology Letters*, 14: 5235-5240.
5. **Cheng YM**, Chou CY, Hsu YC, Chen MJ, Wing LYC. (2012) The role of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncoproteins in cervical epithelial-mesenchymal transition and carcinogenesis. *Oncology Letters*, 3(3) :667–671
6. **Chiantore MV**, Mangino G, Iuliano M, Zangrillo MS, De Lillis I, Vaccari G, *et al.* (2016) Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the expression of cancer-related microRNAs: Additional evidence in HPV-induced tumorigenesis. *Journal Cancer Research. Clinical. Oncology* 142, 1751–1763.
7. **Conesa-Zamora P**, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Ortiz-Reina S, Sahuquillo-Frías L, Acosta-Ortega J, *et al.*, (2009). Effect of Human Papillomavirus on Cell Cycle–Related Proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in Precursor Lesions of Cervical Carcinoma A Tissue Microarray Study. *Am J Clin Pathol*; 132:378-390.
8. **Dall KL**, Scarpini CG, Roberts I, Winder DM, Stanley MA, Muralidhar B, *et al.*, (2008). Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions. *Cancer Research*. 68 8249–8259.
9. **De Brot L**, Pellegrini B, Moretti S, Carraro D, Soares F, Rocha R (2016) Infections With Multiple High-Risk HPV Types Are Associated With High-Grade and Persistent Low-Grade Intraepithelial Lesions of the Cervix *Cancer Cytopathology*, 1:6
10. **Fleischmann A**, Rocha C, Saxer-Sekulic Nikolina, Zlobec I, Sauter Guido, Thalmann G. (2011). High-level cytoplasmic cyclin D1 expression in lymph node metastases from prostate cancer independently predicts early biochemical failure and death in surgically treated patients. *Histopathology*, 58 781–789
11. **Fullár A**, Dudás J, Oláh L, Hollósi P, Papp Zoltán, Sobel G, *et al.*, (2015) Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BioMed Central Cancer*.15 1-18
12. **Galgano MT**, Castle PE, Atkins A, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH (2010). Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies. *Am J Surg Pathol*, 34 1077-1087
13. **Graham SV** (2017). The human papillomavirus replication cycle, and itslinks to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science*, 131 2201–2221.
14. **Han L**, Maimaitiming T, Husaiyin S, Wang L, Wusainahong K, Ma C *et al.*, (2015) Comparative study of HPV16 integration in cervical lesions between ethnicities with high and low rates of infection with high-risk HPV and the correlation between

- integration rate and cervical neoplasia *Experimental and therapeutic medicine* 10: 2169-2174.
15. **Han L**, Maimaitiming T, Husaiyin S, Wang LIN, Wusainahong K, Chunhua M, *et al.*, (2015). Comparative study of HPV16 integration in cervical lesions between ethnicities with high and low rates of infection with high-risk HPV and the correlation between integration rate and cervical neoplasia. *Experimental and Therapeutic Medicine*.**10** 2169-2174.
 16. **Hayashi Y**, Call MK, Chikama T, Liu H, Carlson EC, Sun Y, *et al.*, (2010). Lumican is required for neutrophil extravasation following corneal injury and wound healing. *Journal of Cell Science*.123 (17) 2987-2995
 17. **Herfs M**, Parra-Herran C, Howitt BE, Laury AR, Nucci MR, Feldman S, *et al.*, (2013) Cervical Squamocolumnar Junction–specific Markers Define Distinct, Clinically Relevant Subsets of Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions. *American Journal Surgical Pathology*, **37** 1311- 1318
 18. **Herfs M**, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci M-R., McLaughlin-Drubin M-E, *et al.*, (2012). A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *PNAS*. 109(26): 10516–10521.
 19. **Hinz B**, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, *et al.*, (2012). Recent Developments in Myofibroblast Biology Paradigms for Connective Tissue Remodeling. *The American Journal of Pathology*, 180 (4): 1340-1355.
 20. **Holme A**, Lameiras S, Jeannot E, Marie Y, Castera L, Sastre-Garau X, *et al.*, (2016). Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas. *npj Genomic Medicine*.1 1-16.
 21. **Hu D**, Zhou J, Wang F, Shi H, Li Y, Li B (2015). HPV-16 E6/E7 promotes cell migration and invasion in cervical cancer via regulating cadherin switch in vitro and in vivo. *Send to Arch Gynecol Obstet*. 292(6):1345-1354
 22. **Ishiwata T**, Cho K, Kawahara K, Yamamoto T, Fuji W, Uchida E, *et al.*, (2007) Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer *Oncology Reports* 18: 537-543.
 23. **Jenkins D**. (2007). Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Disease Markers*, 23 199–212
 24. **Jiménez-Tagle DK**, Hernández Sotelo D, Illades-Aguiar B, Leyva-Vázquez MA, Flores Alfaro E, Castro Coronel Y, *et al.*, (2015). Expression of E6, p53 and p21 proteins and physical state of HPV16 in cervical cytologies with and without low grade lesions. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7(1):186-193
 25. **Jung Y-S**, Kato I, Choi Kim H-R (2013). A novel function of HPV16-E6/E7 in epithelial–mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 435 339–344
 26. **Kalluri, R** (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *J. Clin. Investig* 126 1208–1215.
 27. **Karamanou K**, Perrot G, Maquart F-X, Brézillon S. (2018). Lumican as a multivalent effector in wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*.129 344-351.
 28. **Kranjec C**, Holleywood C, Libert D, Griffin H, Mahmood R, Isaacson E, *et al.*, (2017). Modulation of basal cell fate during productive and transforming HPV-16 infection is mediated by progressive E6-driven depletion of Notch. *Journal of Pathology*, 242 448–462

29. **Lee Seakwoo**, Bowrin K, Hamad-Rahim A y Chakravarti S (2009). Extracellular Matrix Lumican Deposited on the Surface of Neutrophils Promotes Migration by Binding to β_2 Integrin. *The journal of biological chemistry*. 284, 23662–23669.
30. **Li Q**, Huang W, Zhou X (2009). Expression of CD34, α -Smooth Muscle Actin and Transforming Growth Factor in Squamous Intraepithelial Lesions and Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. *The Journal of International Medical Research.*, **37**: 446 – 454.
31. **Little L** y Reid Stewart CJ. (2010) Cyclin D1 immunoreactivity in normal endocervix and diagnostic value in reactive and neoplastic endocervical lesions. *Modern Pathology* 23, 611–618
32. **Lu X**, Lin Q, Lin M, Duan P, Ye L, Chen J, et al., (2014). Multiple-Integrations of HPV16 Genome and Altered Transcription of Viral Oncogenes and Cellular Genes Are Associated with the Development of Cervical Cancer. *PLOS ONE*, (9) 7 1:9
33. **McCluggage W-G** (2013) New developments in endocervical glandular lesions. *Histopathology*. 62, 138–160
34. **Mittal, S** y Banks L. (2016) Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutation Research* 772 23-35
35. **Moody CA** (2017). Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes *Viruses*, 9 1-21.
36. **Naito Z**, Ishiwata T, Kurban G, Teduka K, Kawamoto Y, Kawahara K, *et al.*, (2002). Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the periphery of cancer nests. *International Journal of Oncology*, 5: 943–948.
37. **Nikitovic D**, Papoutsidakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN (2014). Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. *Matrix Biology*, 35: 206–214.
38. **Pietras K**, Pahler J, Bergers G, Hanahan D (2008). Functions of paracrine pdgf signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med*, 5 123-138
39. **Portari E**, Russomano B, de Camargo MJ, Machado-Gayer CR, da Rocha-Guillobel H, Santos-Rebouc CB, *et al.*, (2013) Immunohistochemical Expression of Cyclin D1, p16^{Ink4a}, p21^{WAF1}, and Ki-67 Correlates With the Severity of Cervical Neoplasia. *International Journal of Gynecological Pathology*. 32 501-508.
40. **Qie S**, Diehl JA. (2016). Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *Journal of Molecular Medicine*. 16 1475-1493.
41. **Rego Barros Jr M**, Lagos de Melo CM, Rego Barros MLCMG, Pereira de Lima RC, de Freitas AC, Venuti A (2018). Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 37 1-18.
42. **Sato T**, Sakai T, Noguchi Y, Takita M, Hirakawa S, Ito A (2004). Tumor-stromal cell contact promotes invasión of human uterine cervical carcinoma cells by augmenting the expression and activation of stromal matrix metalloproteinases. *Gynecol. Oncol.*, 92, 47–56.
43. **Scanlon CS**, Van Tubergen EA, Inglehart RC, D’Silva NJ. (2013) Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Journal of Dental Research*, (2)92: 114–121.
44. **Schiffman M**, Doorbar J, Wentzensen N, Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, *et al.*, (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews*, 2 1-20

45. **Schmitz M**, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB., Durst M (2012) Non-Random Integration of the HPV Genome in Cervical Cancer. *PLoS ONE*. (7) 6: 1-10.
46. **Sellors JW**, Sankaranarayanan R. (2003). La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical. Organización Panamericana de la Salud 1-133.}
47. **Senapati, R.**, Senapati, N., Dwibedi, B (2016). Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infectious Agents and Cancer*, 59 1: 11.
48. **Serafín-Higuera I**, Garibay-Cerdenares OL, Illades-Aguiar B, Flores-Alfaro E, Jiménez-López MA, Sierra-Martínez P, et al., (2016). Differential proteins among normal cervix cells and cervical cancer cells with HPV-16 infection, through mass spectrometry-based Proteomics (2D-DIGE) in women from Southern México. *Proteome Science*.14: 1–10.
49. **Sheetal P**, Mandal M (2014). Inflammation induced by human papillomavirus in cervical cancer and its implication in prevention. *European Journal of Cancer Prevention*, 23 432–448.
50. **Spurgeon M**, and Lambert P (2017). Human Papillomavirus and the Stroma: Bidirectional Crosstalk during the Virus Life Cycle and Carcinogenesis. *Viruses*. 219 1-21.
51. **Stasiak M**, Boncela J, Perreau C, Karamanou K, Chatron-Colliet A, Prout I, et al., (2016) Lumican inhibits SNAIL-induced melanoma cell migration specifically by blocking MMP-14 activity. *PLoS ONE*.11 1–15.
52. **Tornesello ML**, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P. Buonaguro FM. (2013) Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. *BioMed Research International*. 1:10
53. **Valadi H**, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 9 654–659.
54. **Vega-Peña A**, Illades-Aguiar B, Flores-Alfaro E, López-Bayghen E, Leyva-Vázquez M A, Castañeda-Saucedo E, et al., (2013). Risk of progression of early cervical lesions is associated with integration and persistence of HPV-16 and expression of E6, Ki-67, and telomerase. *Journal of Cytology.*, (30) 4, 226-232.
55. **Vishnoi K**, Mahata S, Tyagi A, Pandey A, Verma G, Jadli M, Singh T, et al., (2016). Human papillomavirus oncoproteins differentially modulate epithelial-mesenchymal transition in 5-FU-resistant cervical cancer cells. *Tumour Biology* (10):13137-13154.
56. **Walts AE**, Bose S (2009) p16, Ki-67, and BD ProEx™C immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia *Human Pathology*, 40 957–964.
57. **Wiebea E**, Dennyb L, Gillian T. (2012) Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 11 100–109
58. **Zhu D**, Ye M, Zhang W (2015). E6/E7 oncoproteins of high risk HPV-16 upregulate MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 and promote the migration of cervical cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*, (8) 4981–4989.
59. **Zubillaga-Guerrero MI**, Illades-Aguiar B, Leyva-Vazquez MA, Flores-Alfaro E, Castañeda-Saucedo E, Muñoz-Valle JF, et al., (2013) The integration of HR-HPV increases the expression of cyclins A and E in cytologies with and without low-grade lesions. *Journal of Cytology*. (30) 1:1-7