



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGIA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“BIOMARCADORES CELULARES Y ESTADO FÍSICO DEL ADN DEL
VPH-16 EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LESIONES
TEMPRANAS DEL CÉRVIX UTERINO DE MUJERES CON
SEGUIMIENTO”

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:
ARIANNA VEGA PEÑA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

CODIRECTORA:

Dra. Berenice Illades Aguiar

Chilpancingo, Gro. Mayo del 2013.

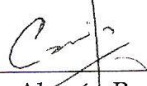



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 11 días del mes de diciembre del dos mil doce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Biomarcadores celulares y estado físico del ADN del VPH-16 en el diagnóstico y pronóstico de lesiones tempranas del cérvix uterino de mujeres con seguimiento", presentada por la alumna Arianna Vega Peña, para obtener el Grado de Doctora 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.

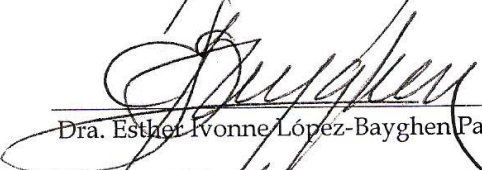
El Comité Tutorial


Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero
Directora de tesis



Dra. Mónica Espinoza Rojo


Dra. Berenice Illades Aguiar

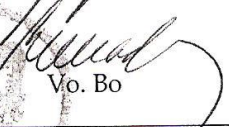

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo


Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño


Vo. Bo


Dra. Isela Farra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias
de Ciencias Biomédicas


Vo. Bo


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

CRÉDITOS AL PROYECTO Y LA INSTITUCIÓN

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación de Citopatología e Histoquímica en colaboración con el Laboratorio de Biomedicina Molecular, ambos de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

y la asesoría de:

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Esther López Bayghen Patiño

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Este proyecto se desarrolló con financiamiento de la Dirección de Investigación Científica de la UAG (2011).

Durante el Doctorado en Ciencias Biomédicas, la C. ARIANNA VEGA PEÑA, recibió una beca como parte del Fortalecimiento al Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UAG, financiado por el Fondo Mixto-Gobierno del Estado de Guerrero (clave 147778), en el periodo de Abril-Agosto del 2011 y la beca del CONACYT en el periodo de Octubre 2011 a Enero 2013.

**BIOMARCADORES CELULARES Y ESTADO FÍSICO DEL ADN DEL VPH-16 EN
EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LESIONES TEMPRANAS DEL CÉRVIX
UTERINO DE MUJERES CON SEGUIMIENTO**

ÍNDICE

RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	11
DISCUSIÓN.....	33
REFERENCIAS.....	39
ANEXOS.....	45

RESUMEN

Las lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) de bajo grado (LEIBG), son las lesiones más tempranas del cérvix uterino que citológicamente presentan coilocitos característicos de la infección por el virus del papiloma humano (VPH), estas lesiones tienen altas probabilidades de regresión, pero, la persistencia e integración del VPH de alto riesgo (VPH-AR) como el tipo 16, son factores claves para la progresión de las LEI. El empleo de biomarcadores celulares y virales podría ser un alternativa predictiva y pronóstica de las LEIBG. El objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre la expresión de E6, Ki-67 y telomerasa con el estado integrado del VPH-16 en la persistencia y progresión de citologías normales y LEIBG en una cohorte de mujeres guerrerenses por un año. Se estudió una cohorte de 75 mujeres, se obtuvieron raspados cervicales al inicio a los 6 y 12 meses, que se conservaron y procesaron por medio de la citología en base líquida (Liqui-Prep). En base al sistema Bethesda se diagnosticaron 25 citologías normales sin VPH, 25 citologías normales y 25 LEIBG ambas con VPH-16. La tipificación del VPH se realizó por medio de PCR/RFLP's. El estado físico se determinó por hibridación *in situ* con amplificación con tiramida (HIS) para VPH-AR y el método inmunocitoquímico (Streptavidina Biotina-Peroxidasa) se usó para determinar la expresión de E6, Ki-67 y telomerasa. De las 25 mujeres con citología normal sin VPH, el 28% adquirió la infección por VPH y desarrolló la LEIBG; de las 25 con citología normal más VPH, el 52% desarrolló la LEIBG y las mujeres con LEIBG, el 96% persistieron con este diagnóstico, lo anterior, resultó de un año de seguimiento, obteniendo una prevalencia final de LEIBG del 58.7% (44). De estas mujeres, el 47.7% (21) presentaba la infección por VPH-16 y solo 12 (57%) presentaban el estado integrado. La expresión intensa de E6, Ki-67 y telomerasa se asoció con la progresión de las lesiones ($p=0.003$; $p=0.008$; $p<0.001$, respectivamente) y con el estado integrado de los VPH-AR ($p=0.001$; $p=0.01$; $p=0.01$, respectivamente). Se concluye que la expresión intensa de E6, Ki-67 y telomerasa, está asociada con la integración del VPH-16, aumentando el riesgo de progresión en mujeres con citología normal y LEIBG asociadas a la infección por VPH-16, sugiriendo que se debe hacer un seguimiento estricto de las mujeres.

INTRODUCCIÓN

Virus del papiloma humano y cáncer cervical invasor

El cáncer cervical invasor (CCI), es causado por la infección por VPH oncogénicos. Más de 100 genotipos de VPH han sido descritos, de los cuales aproximadamente 40 infectan el tracto genital (Muñoz *et al*, 2006). Los VPH de bajo riesgo (VPH-BR) incluye los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81. Los tipos 6 y 11 causan el 90% de los casos de verrugas anogenitales externas y lesiones de bajo grado en el epitelio cervical (Muñoz *et al*, 2003). Los tipos de alto riesgo (VPH-AR) incluyen al 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 y los primeros dos causan aproximadamente el 70% de todos los casos de CCI (Smith *et al*, 2007).

Para 2008 se estima que se presentaron 453 300 nuevos casos de CCI y 242 000 muertes asociadas a este cáncer en países en vías de desarrollo. En América central se reportó una incidencia de CCI de 22.2 casos por cada 100 000 mujeres y una mortalidad de 11.1 (tasas de incidencia y mortalidad estandarizados por edad) (Jemal *et al*, 2011). En México, la tasa de mortalidad por CCI para 2008 fue de 9.1 muertes por cada 100 000 mujeres. Para el estado de Guerrero esta tasa es del 12.5 muertes por cada 100 000 mujeres para este mismo año (SSA, 2008).

Las lesiones premalignas del CCI, citológicamente son denominadas lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) de bajo grado (LEIBG), que equivalen histológicamente a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grado 1 o NIC 1, mientras que los casos de (LEIAG) que corresponden a las NIC 2/3 y carcinoma *in situ* (Woodman *et al*, 2007). Las LEIBG, son las lesiones más frecuentemente diagnosticadas por el método citológico y frecuentemente se han relacionado con la presencia de los VPH-BR como el 6 y 11 principalmente (Wentzensen *et al*, 2009), sin embargo, en estudios recientes el VPH-16 se ha encontrado en casos de ASCUS (en inglés, atypical cells of undetermined significance) y LEIBG que tienen mayor probabilidad de persistencia y progresión a LEIAG (Ho *et al*, 2006; Castle *et al*, 2005; Muñoz *et al*, 2003). Mientras que las LEIAG y CCI son comúnmente asociadas a los VPH-AR, principalmente los tipos 16 y 18 (Smith *et al*, 2007).

Carcinogénesis asociada al VPH-16

La infección por el VPH-16 es la más frecuente en CCI y las LEI alrededor del mundo (Clifford *et al*, 2003). En México, también se ha reportado como el más frecuente en casos de CCI y LEI (Illades *et al*, 2010; Orozco *et al*, 2010; Fernández *et al*, 2007). Se ha reportado que la infección por VPH-16 causa el 50% de todos los casos de CCI (Muñoz *et al*, 2003).

Diversas características del VPH-16 lo hacen el tipo oncogénico más persistente tales como la capacidad de evadir al sistema inmune, la carga viral, la existencia de variantes génicas, la alta capacidad de integración al genoma de la célula y la sobreexpresión de sus oncoproteínas E6 y E7 (Woodman *et al*, 2007).

Se ha reconocido que la persistencia del VPH-16 está asociada a la progresión de la LEIAG y al CCI. Castle y colaboradores (2009), evaluaron la persistencia a corto plazo de VPH-AR en una cohorte de mujeres con lesiones premalignas, reportando que el monitoreo de infecciones persistentes principalmente asociada al VPH-16, puede ser útil para la identificación de mujeres con riesgo de desarrollar lesiones de alto grado. Al igual Schmeink y colaboradores (2011), quienes evaluaron la persistencia de VPH-AR en mujeres jóvenes con lesiones premalignas, encontrando que la persistencia de los VPH-AR está asociada con una mayor probabilidad (12.1%) de desarrollar LEIAG/NIC2, comparada con las mujeres quienes eliminaron la infección por VPH-AR (5.3%) y con las mujeres negativas al VPH-AR (1.6%), después de 12 meses de seguimiento ($p=0.001$).

Por otro lado, se ha reportado que el VPH-16, presenta mecanismos de evasión del sistema inmune que permite prolongar su estancia en el epitelio cervical (Stanley, 2009; Narisawa & Kiyono, 2007), de hecho, se considera que una alta carga viral se asocia con una infección persistente y con un alto riesgo de progresión y de desarrollar CCI (Woodman *et al*, 2007). Un estudio realizado por Saunier y colaboradores (2008), evalúan la carga viral del VPH-16 y el estado integrado en mujeres con LEIAG y casos de CCI por PCR en tiempo real, concluyendo que las mujeres que presentan una alta carga viral (22 000 copias/ 10^3 células) y la integración del VPH-16, tienen mayor probabilidad de desarrollar LEIAG. Similar a lo

reportado por Ho y colaboradores (2006) que utilizando la misma técnica, evaluaron la carga viral y estado físico de VPH-AR en LEIBG y LEIAG y encontraron que una carga viral alta (>15 000 copias E6) se asoció con el riesgo de progresión de LEIBG a LEIAG, mientras que la integración del VPH-16 sólo se encontró en mujeres con LEIAG, considerando la integración como un evento tardío.

En relación al estado físico del ADN del VPH, puede ser episomal, integrado y mixto, es decir ambos (integrado y episomal). Se ha sugerido que el ADN viral episomal conforme se integra al ADN de la célula epitelial favorece la progresión de las lesiones cervicales (Woodman *et al*, 2007). En relación a los casos de LEIBG, se ha reportado que el VPH-AR se encuentra en forma episomal mientras que en LEIAG y casos de CCI, estos virus ya se han integrado a la célula hospedera (Goon *et al*, 2009; Kulmala *et al*, 2006) sin embargo, algunos estudios han demostrado que la integración es un evento temprano en el proceso de carcinogénesis cervical, presentándose en mujeres con citología normal y LEIBG: como los resultados de Kulmala y colaboradores (2006); Gallo y colaboradores (2003).

Nuestro grupo de trabajo ha reportado recientemente en biopsias cervicales de mujeres del estado de Guerrero, México, que el estado integrado VPH-AR se ha encontrado en citologías sin lesión (50%), NIC1 (75%), NIC2 (58.3%) y NIC3 (88%) (Vega *et al*, 2013), mientras que, Zubillaga y colaboradores (2013) utilizando muestras citológicas, encontraron que el 10% de casos de LEIBG presentaron el estado integrado de los VPH-AR y en el 90% de los casos de forma mixta (episomal e integrado).

La persistencia del VPH en el epitelio cervical por largos periodos se ha relacionado con promover la integración del virus y estos eventos están asociados con la progresión a CCI, por lo que la integración viral se ha propuesto como un marcador pronóstico en la carcinogénesis cervical. (Raybould *et al*, 2011; Kulmala *et al*, 2006; Peitsaro *et al*, 2002). La integración se lleva a cabo generalmente por la interrupción y/o eliminación del ORF de las proteínas E1 y E2, que son importantes para la replicación y la transcripción del virus. E2 actúa también como un represor de la transcripción de E6 y E7 y la interrupción de la actividad de E2 permite la

sobreexpresión de E6 y E7, perdiendo la regulación negativa ejercida por E2 sobre la expresión de estas oncoproteínas, resultando en la alteración de funciones celulares como la progresión del ciclo celular e inhibición de la apoptosis ocasionada por la interacción de E6 y E7 con proteínas celulares como p53 y pRb, respectivamente (Ganguly & Parihar, 2009; Muñoz *et al*, 2003).

E6 y E7 en la carcinogénesis cervical

La oncoproteína E6, consiste en 151 aminoácidos, con dos dedos de zinc caracterizada por los motivos CXXC. Es una proteína relativamente pequeña y difícil para su estudio debido a su inestabilidad. E6 contiene dominios que permiten la unión con la proteína E6-AP. Esta proteína, posee dominios funcionales bien caracterizados entre ellos el de unión a E6 y el de unión a p53, el dominio de interacción con receptores nucleares además de su dominio de activación (Narisawa & Kiyono, 2007; Queiroz *et al*, 2006; Murphy *et al*, 2003). Una vez formado el complejo E6/E6-AP, se une a p53, lo marca para su degradación por la vía de la ubiquitinación. Como consecuencia de la unión de E6/AP a p53, la célula no es capaz de inducir apoptosis en presencia de daños al ADN, ocasionando la acumulación de alteraciones en el ADN. Se ha encontrado que la proteína E6 de los VPH-AR, especialmente el tipo 16, puede activar a la telomerasa, esta acción promueve un estado de inmortalización (Liu *et al*, 2008; Bellon & Nicot, 2008; Münger *et al*, 2004).

Por otro lado, la oncoproteína E7 de los VPH-AR, promueve la carcinogénesis uniéndose a pRb, impidiendo la formación de complejos pRb/E2F-1 (Murphy *et al*, 2003). pRb, es una fosfoproteína nuclear, que se encuentra en forma hipofosforilada (forma activa) e hiperfosforilada (forma inactiva). En forma activa, pRb es capaz de regular la actividad de factores de progresión del ciclo celular y replicación del ADN con E2F-1. La unión de pRb/E2F-1 regula la progresión del ciclo celular. Sin embargo, E7 se une a la forma activa de pRb, bloqueando la formación del complejo pRb/E2F-1, resultando en la liberación de E2F-1, permitiendo la transcripción de genes cuyos productos son requeridos para que la célula entre a la fase S del ciclo celular, llevando a un descontrol de la proliferación celular (Doorbar, 2006).

La figura 1 muestra la participación en conjunto de E6 y E7 en el ciclo celular, lo que resulta en una acumulación de mutaciones en el genoma, aumento en la proliferación y promoción a un estado de inmortalización, estos son procesos importantes en la carcinogénesis cervical (Narisawa & Kiyono, 2007; Münger *et al*, 2004).

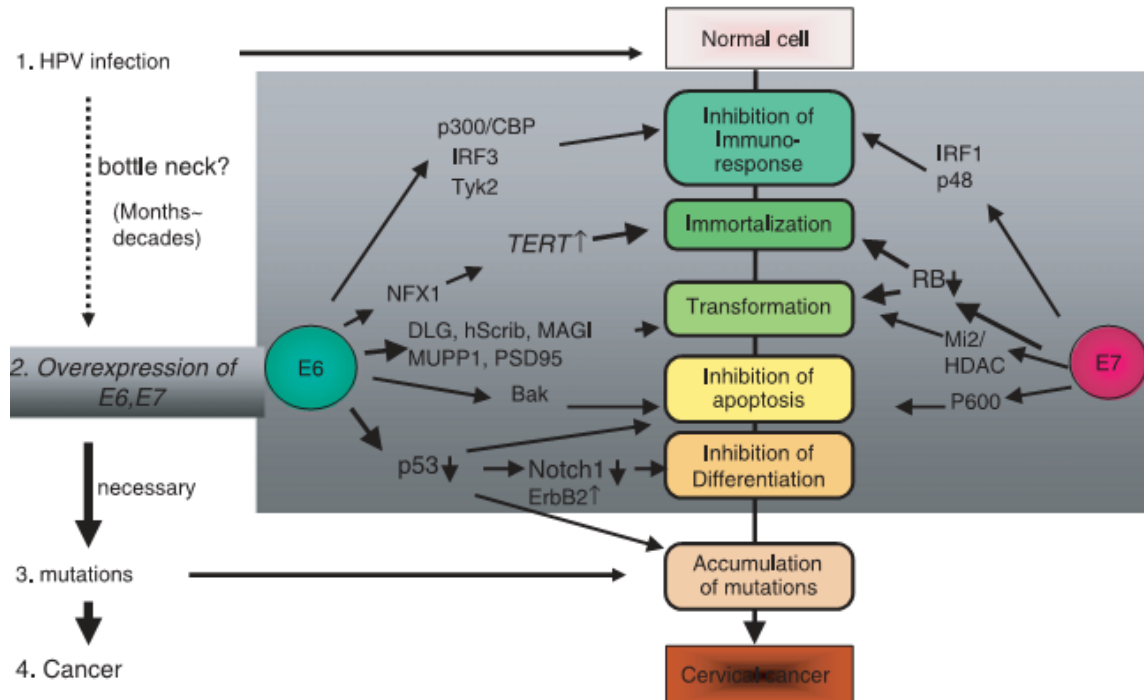


Figura 1. Participación de las oncoproteínas E6 y E7 en la carcinogénesis cervical. Las oncoproteínas virales inhiben la función de las proteínas reguladoras del ciclo celular como p53 y pRB provocando la desregulación del ciclo celular que promueve el desarrollo de lesiones precancerosas que pueden progresar a carcinoma invasor (Narisawa & Kiyono, 2007).

Diagnóstico de VPH y lesiones cervicales

La citología exfoliativa conocida comúnmente como estudio de Papanicolaou, ha demostrado ser muy eficaz como método de tamizaje para la detección oportuna de las LEI, sobre todo en países desarrollados, donde se ha utilizado con mucho éxito. A pesar de sus ventajas, presenta una baja sensibilidad que oscila entre el 50-75% (Brown *et al*, 2012; Cuzick *et al*, 2006), en cambio, el estudio histológico de las lesiones premalignas, se considera el estándar de oro en el diagnóstico confirmativo, lo que orienta al tratamiento adecuado. Este estudio permite la identificación de alteraciones morfológicas del cérvix uterino a través de la biopsia o cono cervical (Hwang & Shroyer, 2012). Sin embargo, a pesar de que el estudio histopatológico es el método confirmativo de la lesión cervical, los índices de falsos negativos de la NIC

han aumentado, debido a la variación diagnóstica entre observadores, sobre todo cuando en el diagnóstico de NIC 1, debe descartarse de una metaplasia atípica o cervicitis crónica y atrófica (Kalof *et al*, 2005).

Otro de los métodos utilizados para el diagnóstico de lesiones cervicales es la colposcopia, que permite la observación de alteraciones cervicales como las áreas blancas aceto-positivas y la atipia vascular, indicadoras de una gran actividad celular, ocasionada por la infección por el VPH además se mejora la sensibilidad al hacer el estudio conjunto con la citología (Apgar *et al*, 2003). La reciente implementación de la citología en base líquida, ha mejorado el tamizaje cervical (Brown *et al*, 2012), sin embargo, las infecciones latentes de los VPH-AR, no pueden ser detectadas por estudios citológicos, histológicos o colposcópicos, por esta razón los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la restricción de fragmentos de longitud polimórficos (RFLP) y captura de híbridos II (CHII), permiten detectar la presencia y tipos de VPH (Dzul-Rosado *et al*, 2004).

Por otro lado, la PCR en tiempo real, puede determinar la cantidad de ADN viral (carga viral) y también permite evaluar el estado físico y se basa en la medición de los valores absolutos de los ORF de E2 y E6 del VPH, se utilizando juegos de iniciadores dirigidos hacia la región E2 y E6. Los resultados se indican por número de copias de E2/E6. La integración es calculada sustrayendo el número de copias de E2 (episomal) del número de copias total de E6 (episomal e integrado), cuando el valor de E2 es menor al de E6 indica la presencia de ambas formas, y un número mayor de E2 indica el estado episomal (Peitsaro *et al*, 2002).

Por otro lado, en cortes de tejido cervical embebidos en parafina y muestras citológicas en base líquida, sin diagnóstico previo de la infección por el VPH por PCR, se puede detectar la presencia y estado físico del ADN del VPH por medio de la hibridación *in situ* con amplificación con tiramida (HIS), técnica que permite saber si el ADN viral se encuentra en estado integrado, episomal o mixto, que son datos importantes para el tratamiento y seguimiento de las pacientes (Guo *et al*, 2008; Coutlée *et al*, 2005; Evans *et al*, 2004). Cooper y colaboradores (2003), encontraron en biopsias de NIC de diferentes grados, que la forma episomal se presenta en un patrón de señal difusa, lo que correlaciona con una infección productiva del VPH y

con los cambios colocíticos vistos en las lesiones de bajo grado, mientras que el estado integrado se manifiesta con un patrón de señal puntiforme, y se relaciona con las NIC de alto grado y con los casos de CCI, lo que podría ser utilizado como marcador de pronóstico y seguimiento de la lesión.

Resultados similares fueron reportados en un estudio de 44 biopsias cervicales, al evaluar el patrón de señal del VPH-AR por HIS en conjunto con la expresión de p16^{INK4A}, concluyen que la señal puntiforme y la sobreexpresión de p16^{INK4A} pueden confirmar las NIC2/3 y que estos marcadores pueden identificar mujeres con NIC1 con alto riesgo de progresión (Kalof *et al*, 2005). En un estudio donde se evaluó la detección del ADN del VPH por medio de HIS en comparación con la PCR en tiempo real en muestras cervicales en base líquida, se resaltan las ventajas de realizar la HIS ya que con este método se puede preservar la arquitectura celular, lo que permite cuantificar la cantidad de núcleos positivos que se correlacionan con las alteraciones citológicas, además de poder distinguir entre el estado integrado y el episomal en una misma muestra (Samama *et al*, 2002).

En la actualidad, se requiere información adicional al diagnóstico citológico, que permita complementar el pronóstico de una lesión premaligna del cérvix uterino y mejore la calidad del tratamiento y seguimiento de los casos. El estado físico del ADN del VPH-AR y la determinación conjunta de proteínas celulares se están evaluando como biomarcadores de pronóstico de lesiones tempranas para identificar mujeres en riesgo de progresión a LEIAG y CCI.

El uso de biomarcadores en lesiones cervicales

Actualmente se sigue evaluando el uso de biomarcadores moleculares, que no solo ayudan en el tamizaje sino en la detección, la evaluación pronóstica, el monitoreo del tratamiento y predicción de la recurrencia, parámetros importantes en la toma de decisiones clínicas (Kyoung, 2006).

Una proteína que ha tomado importancia en años recientes es Ki-67. Se trata de una proteína nuclear con múltiples sitios de fosforilación, se expresa en todas las fases activas del ciclo celular. Se propone que algunas de las funciones de Ki-67 son la organización y mantenimiento de la arquitectura del ADN, la síntesis de los ribosomas durante la mitosis y la progresión del ciclo celular por lo que al antígeno

nuclear Ki-67, se le ha postulado como el mejor indicador de proliferación celular en diferentes tipos de cáncer como el de mama, de cérvix, de ovario, de colon, de próstata entre otros y se ha utilizado para reclasificar y estimar un pronóstico en lesiones premalignas del cérvix uterino (Nam *et al*, 2008; Kruse *et al*, 2001).

En el ciclo celular normal, la expresión de Ki-67 está dada por efecto de E2F; la activación de E2F promueve la transcripción de genes esenciales para la transición de G1 a S, entre estos genes se encuentran p16^{INK4a}, ciclina E, PCNA y Ki-67 (Doorbar, 2006). La expresión de Ki-67, es alterada por la presencia de las oncoproteínas E6 y E7, la acción en conjunto de estas oncoproteínas promueve un estado de constante proliferación celular, reflejado en una sobreexpresión de esta proteína en las capas superiores del epitelio cervical (Doorbar, 2006).

Yu y colaboradores (2010), evaluaron de manera conjunta, la expresión de Ki-67, p16^{INK4a} y L1-VPH en muestras citológicas, encontrando una expresión positiva de Ki-67 en LEIBG (40%), LEIAG (87%) y CC (100%), concluyendo que la evaluación de Ki-67 mejora la detección de lesiones premalignas y la combinación con otros biomarcadores aumenta la eficacia del diagnóstico. También se ha evaluado expresión de Ki-67 junto con p16^{INK4} y el VPH-AR en muestras de NIC concluyendo que la expresión de Ki-67 puede ser utilizado como marcador debido a que los niveles de expresión de la proteína aumentaron con el grado de lesión cervical (Nam *et al*, 2008).

La expresión de Ki-67 se ha evaluado junto con otros biomarcadores para el diagnóstico temprano de lesiones en riesgo de progresión; como los reportados en un estudio donde evalúan la hibridación *in situ* cromosómica, la expresión de Ki-67 y telomerasa en 60 muestras de citología en base líquida. Concluyendo que esta metodología en conjunto puede ayudar a la detección temprana de LEIAG. Sin embargo, el estudio fue limitado por el número de casos incluidos en cada categoría y sugiere ampliar el tamaño de la muestra para confirmar esta propuesta (Cheung *et al*, 2004).

La expresión de Ki-67, p53 y la telomerasa, fue evaluada en presencia de VPH-AR, encontrando que la pérdida de la función de p53 por la presencia de los VPH16 y 18,

promueve la expresión de Ki-67 en casos de LEIAG (72.3%) y en CCI (100%). La expresión de la telomerasa se encontró débilmente en epitelio cervical normal y LEIBG, mientras que en LEIAG se encontró en más del 61% y en el 85% CCI, demostrando que la expresión de telomerasa se correlaciona con la infección por VPH-AR ($p < 0.001$) (Nair *et al*, 2000).

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, se encontró una fuerte asociación entre la expresión intensa de telomerasa, Ki-67 y el estado integrado del ADN del VPH-AR por HIS (OR 64.1, $p < 0.001$ y OR 50.1, $p = 0.001$, respectivamente), sin embargo, se sugiere seguir evaluando la utilidad de la telomerasa como biomarcador en LEIBG con VPH-AR, por la importancia del diagnóstico de estas lesiones y el papel que juega el VPH-AR en el desarrollo, persistencia y progresión de las LEIBG (Vega *et al*, 2013).

La telomerasa ha tomado importancia como biomarcador en los últimos años debido a que la expresión de esta enzima se ha encontrado en altos porcentajes (70 al 90%) en diferentes tumores (Kim *et al*, 1994). La telomerasa, es una enzima multiprotéica que reemplaza pequeñas secuencias nucleotídicas que se eliminan en los extremos teloméricos de los cromosomas con cada replicación celular, consta de dos subunidades, la RNA telomerasa humana (hTR) y la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT), esta última tiene la función catalítica en la replicación de los extremos del ADN lineal (Bravaccini *et al*, 2005).

Se ha demostrado que la oncoproteína E6 de VPH-AR puede activar a la telomerasa a través de la expresión de la hTERT. El promotor de la hTERT contiene elementos que responden a c-myc, se ha comprobado que E6 se une directamente a c-myc; potencializando la activación transcripcional del promotor de hTERT mediada por E6, que lleva a la formación del complejo E6/c-myc que activa la expresión del gen hTERT, siendo esta la subunidad necesaria para la activación de la telomerasa, un paso crítico para la inmortalización celular (Münger *et al*, 2004; Liu *et al*, 2008; Bellon & Nicot, 2008).

Estudios realizados por Frost y colaboradores (2000), reportaron altos niveles de expresión de hTERT por medio de la inmunohistoquímica en casos de LEIAG y en carcinoma de células escamosas, así también, por los resultados encontrados por

Nowak (2000), quien realizó el ensayo TRAP (en inglés, Telomeric Repeat Amplification Protocol) en muestras citológicas, quien indica haber encontrado la actividad de la telomerasa en el 66% de los casos de LEIAG y en el 100% de carcinoma cervical, sugiriendo que este marcador puede ser importante en el diagnóstico y pronóstico del carcinoma invasor.

Por su parte Kailash y colaboradores (2006), encontraron en 154 biopsias una asociación positiva (OR 141.1, $p < 0.001$) entre la expresión de la telomerasa y la infección con los VPH tipo 16/18. Estos resultados coinciden con los informes anteriores de Zheng *et al* (1997), que sugieren la activación de la telomerasa como un evento temprano que ocurre durante la transformación neoplásica cervical, proponiendo que la detección de la expresión de la telomerasa puede servir como una herramienta fiable para el diagnóstico y pronóstico de lesiones del cuello uterino, junto con la citología y la presencia del VPH-AR.

Actualmente se ha centrado la atención en el diagnóstico de LEIBG, al ser el tipo de lesión más temprana y con diversas posibilidades de tratamiento. Sin embargo, la variabilidad diagnóstica entre observadores, errores en la interpretación de resultados y toma de muestra, ha llevado a que este tipo de lesiones sean tratadas inadecuadamente y las mujeres sufran traumatismos innecesarios.

La evaluación citológica constante es importante para el control y seguimiento de las pacientes y la selección de mujeres con verdadero riesgo de progresión a lesiones malignas de aquellas lesiones que tienen más probabilidades de regresar. El uso de nuevas herramientas complementarias al diagnóstico citológico, podría mejorar la sensibilidad de este método, disminuyendo los casos mal diagnosticados, mejorando la eficacia y previniendo tratamientos innecesarios e invasivos a mujeres diagnosticadas con LEIBG.

En este estudio se evaluó si la integración del genoma del VPH-16 así como la expresión de E6, Ki-67 y telomerasa en mujeres con citología normal y LEIBG tienen valor diagnóstico y pronóstico durante un año de seguimiento, seleccionando aquellas lesiones tempranas con verdadero riesgo de progresión a LEIAG de aquellas que tienen más posibilidades de regresar.

CAPÍTULO I

Manuscript Received

From: **Journal of Cytology** <editor@icytol.org>

Date: 2013/4/22

Subject: [JOC]:Acknowledgment of Online Submission

To: luzdelcarmen14@gmail.com

Dear Dr. Alarcón romero,

Journal of Cytology has received your manuscript entitled "Risk of progression of early cervical lesions is associated with integration and persistence of HPV-16 and expression of E6, Ki-67, and telomerase" for consideration for publication. The reference number for this manuscript is "JOC_79_13". Kindly quote this in correspondence related to this manuscript.

The manuscript is being reviewed for possible publication with the understanding that it is being submitted to one journal at a time and have not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere either as a whole or in part. Online submission of this article implies that the corresponding author has the written consent from all the contributors to act as corresponding author.

You are requested to send the signed copyright/contributor form within two weeks. The form can be uploaded as an scanned image from your area. The decision about the manuscript will be conveyed only on receipt of the form. High resolution images are required at the time of acceptance, you should be notified separately for the same, if images uploaded by you are not of printable quality.

The Editors will review the submitted manuscript initially. If found suitable, it will follow a double-blinded peer review. We aim to finish this review process within a short time frame, at the end of which a decision on the suitability or otherwise of the manuscript will be conveyed to you via this system. During this process you are free to check the progress of the manuscript through various phases from our online manuscript processing site <http://www.journalonweb.com/joc>.

We thank you for submitting your valuable work to the Journal of Cytology.

Yours sincerely,
The Editorial Team
Journal of Cytology

Risk of progression of early cervical lesions is associated with integration and persistence of HPV-16 and expression of E6, Ki-67, and telomerase

Arianna Vega-Peña¹, Berenice Illades-Aguilar², Eugenia Flores-Alfaro¹, Esther López-Bayghen⁴, Marco Antonio Leyva-Vázquez², Eduardo Castañeda-Saucedo³ and Luz del Carmen Alarcón-Romero^{1*}

¹Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica; ²Laboratorio de Biomedicina Molecular; ³Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas (UACQB), Universidad Autónoma de Guerrero (UAG), Guerrero, México. ⁴Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN, DF, México.

***Corresponding author**

Luz del Carmen Alarcón-Romero

Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica.

Avenida Lázaro Cárdenas, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, México.

C.P. 39089. Tel/Fax: +52 (747) 4710901. Email: Luzcarmen14@gmail.com

Type of article: Original article

Running title: Integration of HPV-16 is associated with risk of progression of early cervical lesions.

Abstract

Low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) are the earliest lesions of the uterine cervix, the persistence and integration of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) as the type 16, promote the development of more aggressive lesions. *Aim:* To evaluate the utility of E6, Ki-67 and telomerase expression and integrated HPV-16 as markers to identify LSIL with high risk to progress to invasive carcinoma. *Patients and methods:* 75 women were included in the study: 25 with normal cytology and no HPV; 25 with normal cytology with HPV-16; and 25 with LSIL and HPV-16. The presence of HPV was detected by *in situ* hybridization (ISH), and immunocytochemistry was used to determine the expression of E6, Ki-67, and telomerase. *Results:* Of the 25 women with normal cytology without HPV, 28% acquired HPV infection and LSIL developed, of the 25 with normal cytology/HPV+, 52% developed LSIL and women with LSIL, 96% persisted with this diagnosis, during the follow-up, with a final LSIL prevalence of 58.7%. Of these women, 47.7% had infection with HPV-16 and only 57% had integrated state. The intense expression of E6, Ki-67 and telomerase was associated with progression of lesions ($p = 0.003$, $p = 0.008$, $p < 0.001$, respectively) and the state integrated HR-HPV ($p = 0.001$, $p = 0.01$, $p = 0.01$, respectively). *Conclusions:* The intense expression of E6, Ki-67 and telomerase, is associated with the integration of HPV-16, increasing the risk of progression in women with normal cytology and LSIL associated with HPV-16 infection, suggesting that it should strict follow-up of women.

Key words: Low-grade squamous intraepithelial lesions, Human papillomavirus-16, integration, persistence, biomarkers.

Introduction

Invasive cervical carcinoma (ICC) is the second most common cause of death among Mexican women. In 2008, worldwide incidence and mortality for ICC was 19.2 and 9.7 per 100,000 women, respectively. ^[1] In the same year, Mexico's Health Ministry reported a similar death rate (9.1 per 100,000 women). High mortality rates due to this cancer were reported in the same year for Guerrero State, at a rate of 12.5 deaths per 100,000 women. ^[2] High-risk human papilloma viruses (HR-HPV) such as type 16 are most frequently related to development of ICC. ^[3] In women from Guerrero State, HPV-16 is detected in 68.1% of ICC samples; 27.4% of high-risk squamous intraepithelial lesion (HSIL) samples; 10.6% of low-risk squamous intraepithelial lesion (LSIL) samples; and 2.3% of samples with no cervical lesions. ^[4] Fernández *et al.*, ^[5] reported virus detection in 70.6% of LSIL cases, 54.8% of HSIL cases, and in 70.8% of squamous cell carcinoma cases.

HPV-16 infection persists for long periods in the cervical epithelium because the virus evades the immune response. ^[6] Integration of the viral genome into the host DNA is related to lesion persistence and progression, and is considered a late event in cervical carcinogenesis. ^[7,8] However, using real time PCR, a mixed state of integrated HPV-16 was present in four cases of cervical intraepithelial neoplasia 1 (CIN1), and in four samples without cervical lesions. ^[9] Similar findings of integrated viral DNA were reported in 53.8% of LSIL (14) cases. Evans *et al.*, ^[10] detected integrated viral DNA in only 13.6% cases of CIN1 by *in situ* hybridization (ISH) amplified with tyramide and using probes for 13 HR-HPV, a similar study also reported that 75% of CIN1 cases and 50% of samples without cervical lesions presented with integrated HR-HPV. ^[11] Zubillaga-Guerrero *et al.*, ^[12] recently reported the HPV-integrated state individually (10%) and in the mixed form (90%) in LSIL using the same methodology.

Integration usually occurs within fragile areas of the viral E1 and E2 ORF, with the latter being the most frequent. Elimination of E2 expression results in transcriptional over-regulation of the viral oncogenes E6 and E7, leading to increased expression of both viral oncoproteins that target tumor suppressor proteins, p53 and pRb respectively, among others, resulting in loss of cell cycle control. ^[13, 14] E6 forms a complex with E6AP (E6 associated protein), acts as an ubiquitin ligase E3 and causes degradation of p53 by the proteasome. ^[13, 15] E6 prevents telomeric shortening by increasing expression of the human telomerase reverse transcriptase catalytic subunit (hTERT), forming a complex with E6AP and binding directly to the hTERT

promoter, resulting in transcriptional activation followed by telomerase activation. ^[116, 17] Telomerase has become an important biomarker because the activity of this enzyme has been found in >90% of different tumors. ^[18] Among 154 cytological samples, a positive association between telomerase activity and infection with HPV type 16/18 was found (OR 141.1, $p < 0.001$), suggesting that telomerase activity detection may serve as an efficient tool for diagnosis and prognosis of cervical lesions, along with cytology and HPV tests. ^[19] HPV-16 oncoprotein E7 associates with pRb and promotes the release of the E2F transcription factor, which transactivates cell proteins needed for progression to the S-phase of the cell cycle. Overexpression of p16^{INK4a}, MCM, PCNA, Ki-67, p14ARF, and cyclin E, among others, occurs during aberrant proliferation. ^[20] Yu *et al.*, ^[21] evaluated the diagnostic value of Ki-67, p16^{INK4a}, and L1-HPV in cytological samples. They found expression of Ki-67 in 40% of LSIL, 87% of HSIL, and 100% of ICC cases ($p < 0.001$), concluding that Ki-67 evaluation improves detection of premalignant lesions, and that combination with p16^{INK4a} and L1-HPV increases the diagnosis efficacy. Using ISH on CIN2/3 samples, been reported a strong association between intense expression of Ki-67 telomerase and the integrated state of HR-HPV (OR 64.1, $p < 0.001$ and OR 50.1, $p = 0.001$, respectively), demonstrating that more aggressive lesions potentially progress to ICC. ^[11] Follow-up using simultaneous cytological and molecular methods suggests that errors, invasive procedures, and unnecessary expenses could be avoided in diagnosis and prognosis of LSIL. However, this type of testing is not a common practice. The aim of this work was to evaluate whether expression of Ki-67, telomerase and E6 in LSIL in the presence of integrated HPV-16 during a one year follow-up could serve as an early monitoring tool to select women with more aggressive lesions that have a tendency to progression. This would represent an important contribution to understanding cervical cancer pathogenesis and improve diagnosis opportunities among low income Mexican women.

Materials and methods

Patients and sampling: Cytological specimens were collected from 75 women followed for one year, who attended the integral diagnostic service for early detection of cervical-uterine cancer and HPV of the Autonomous University of Guerrero, from July 2010 to April 2012. Each participant gave informed consent approved by the Bioethics Committee of the

University. Two cytological specimens were collected from each patient to assess the squamous-columnar transformation zone; the first specimen, at the beginning of the study and the second, one year later. Each sample was subjected to Papanicolaou cytology and molecular HPV typing. Each patient completed a questionnaire to gather gynecological data.

Cytological specimens were collected in Liqui-Prep™ preservation liquid for cytological diagnosis, HPV typing, and for HPV DNA physical state determination by *in situ* hybridization (ISH). Protein expression was performed using immunocytochemistry. Based on the Bethesda system were diagnosed: 25 women without sign of squamous intraepithelial lesion (Normal cytology: NC) and without HPV; 25 women with NC but a positive test for HPV-16 infection; and 25 women with LSIL and a positive test for HPV-16 infection. Progression risk was assessed only on women with persistent HPV-16 infection after one year of follow up, by evaluating the physical state of viral DNA and protein expression.

Molecular detection and HPV typing: DNA extraction was performed using the SDS-K proteinase-phenol-chloroform standard method. PCR was carried out with 1.5 µg total DNA with degenerate oligonucleotides MY09 and MY11.^[22] PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels and visualized with ethidium bromide. As positive controls, 1 pg and 1 ng of recombinant pHPV16 plasmid DNA was used. As negative control, a reaction with sterile water instead of DNA was used. PCR products of HPV-positive samples were digested with restriction enzymes *BamHI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *PstI*, *RsaI*, and *Sau3AI* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Viral type was determined by interpretation of restriction pattern of polymorphic length (RPPL).^[23] When samples were negative or the HPV type could not be identified by RFPL, the PCR system GP5+/6+ was used,^[24] and the products were sequenced. PCR products were purified using 75% isopropanol Centri-Sep Spin Columns (Applied Biosystems, CA), and sequenced in an automatic sequencer (310 ABI PRISM Genetic Analyzer, Applied Biosystems, CA). All sequences were compared to known sequences for HPV types, available at the NCBI site: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

In situ hybridization: Viral genome detection by ISH was performed using the signal amplification system with tyramide (Dako, Carpintería CA, USA) adjusted to the indicated times. Cytology specimens were permeabilized and enzyme-digested. A drop of biotinylated viral DNA probe (Dako) suited for detecting 13 genotypes of HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39,

45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68) was added. SiHa and CaSki cell cultures were used as positive controls and samples with no probe were used as negative controls. A positive signal pattern was visualized as a brown deposit completely covering the nucleus (diffuse form) indicates the episomal viral DNA state, or a dotted signal corresponding to the integrated viral DNA state. [10]

Immunocytochemistry for E6, Ki-67 and telomerase: E6, Ki-67, and telomerase expression was determined using a streptavidin-biotin peroxidase technique (Cell Marque Corporation, Hot Springs, AR). The following monoclonal antibodies were used: MIB1 (Dako, CA, USA) for Ki-67, 2C4 (Novus Bio, Littleton, CO) for telomerase and C1P5 (Santa Cruz, USA) for E6. Antigen recovery was performed, and the primary antibody was added at a 1:50 dilution for Ki-67 and E6, and at 1:200 for telomerase. An anti-antibody coupled to biotin was added, and then streptavidin peroxidase followed by diaminobenzidine. CaSki cells were used as positive control in each run and the same type of cells without primary antibody were used as negative controls. Evaluation of Ki-67, telomerase, and E6 expression was based on the visualization of cells acquiring brown nuclear staining based on Cheung's criteria: 0-10% cells with basal staining was considered negative, 11-50% positive cells was considered moderate immunostaining, and >50% positive cells was considered strong immunostaining. [25]

Statistical analysis: Correlation of cytological diagnosis, HPV typing, and physical state of viral DNA during one year of follow-up was evaluated. Relative frequency for the different variables was determined and Fisher's exact test was used to evaluate correlation. A logistic regression model for repeated measures adjusted for age was used for to evaluate the association between cytological diagnosis and physical state of HPV-16, and between the latter and expression of E6, Ki-67 and telomerase, obtaining OR with confidence intervals at 95%. A $p \leq 0.05$ value was considered significant. SPSS v13.0 and Stata v11.0 software were used for the statistical analysis.

Results

A cohort of 75 women, with an age range of 14-64 years with a mean age of 39.9 years, were followed for one year, which was follow-up cytological and molecular diagnosis of HPV at the time of the first visit, at 6 and 12 months later. Formed three study groups, the first was a reference, made up of 25 women with normal cytology negative for HPV infection, the second

group consists of 25 women with normal cytology but HPV-16 positive molecularly and finally with 25 women with LSIL and HPV-16 infection.

In these groups the determined physical state of viral DNA and cellular protein expression (Ki-67 and telomerase) and viral (E6). It is noteworthy that women received no treatment for HPV infection or SIL, during the period of the study, but were evaluated by a physician colposcopist.

Follow-up of women with normal cytology without HPV.

Cytological results and the presence of HPV are described in Table 1. Women with normal cytology (NC) and HPV negative, only two moments were evaluated during follow-up (0 to 12 months). Eight women acquired HPV infection after 12 months follow-up, changing this cytological diagnosis of LSIL in NC to 7 of them (P <0.001). Of these women, 16% (4) were infected with HPV type 16. HPV-18 and HPV-6 were presented in a single case and a multiple infection, all present in the episomal state. 68% of women in this group did not develop cytological abnormalities or acquired HPV infection.

Table 1. Follow-up of women with normal cytology without HPV

Follow-up	0 months	12 months			P Value
		NC/HPV-	NC/HPV+	LSIL	
Cytological diagnosis n (%)	25(100)	17(68)	1(4)	7(28)	<0.001
Molecular diagnosis of HPV					
Negative	25(100)	17(68)	0	0	<0.001
HPV-16	0	0	0	4(16)	
HR-HPV	0	0	0	1(4)	
MI	0	0	0	1(4)	
LR-HPV	0	0	1(4)	1(4)	
Physical state					
ND	25(100)	17(68)	1(4)	1(4)	0.001
Episomal	-	-	-	6(24)	
Integrated	-	-	-	-	

CN: normal cytology, LSIL: low squamous intraepithelial lesion grade, HPV human papilloma virus, HR-HPV: High-risk HPV, LR-HPV: low-risk HPV, MI: multiple infections; (-): negative for HPV infection; (+): positive for HPV infection, ND: not determined. P value determined by Fisher's exact test for differences between the cytological diagnosis, molecular diagnosis of HPV and physical state.

Follow-up of women with normal cytology and HPV infection.

At baseline, included a group of 25 women with NC and HPV-16 infection that changed significantly during follow-up (Table 2). Physical status was assessed in these women at the beginning and end of the study in the first evaluation finding integrated state in 60% of cases and episomal state with 40% of all cases associated with HPV-16. After 6 months, 36% of the women developed the LSIL associated with persistent HPV-16 in 24% of cases, and 8% of cases present a new high-risk viral type (HPV-18) and a case with multiple infection. HPV-16 persisted in the 40% of cases of NC after 6 months follow-up.

At 12 months follow-up, 48% (12) of the cases remained unchanged cytology (NC), but the type of HPV change significantly, these cases 20% remained with the HPV-16 and 36% cases (9/12) had the viral genome in an integrated manner. 52% of the remaining cases developed the LSIL, of which 20% present HPV-16 infection. 32% of women who developed LSIL had integrated HPV status compared to 16% women who developed this type of injury and had episomal HPV status. Other HPV types were detected in women who developed LSIL, among which 20% were due to multiple infections, followed by high-risk HPV types (8%) and one case had a viral type of low risk (HPV -6) (P <0.001).

Table 2. Follow-up of women with normal cytology and HPV infection

Follow-up	0 months		6 months		12 months		P Value
	NC/HPV+		NC/HPV+	LSIL	NC/HPV+	LSIL	
Cytological diagnosis							
n (%)	25(100)		16(64)	9(36)	12(48)	13(52)	<0.001
Molecular diagnosis of HPV							
HPV-16	25(100)		10(40)	6(24)	5(20)	5(20)	
HR-HPV	0		4(16)	2(8)	3(12)	2(8)	<0.001
MI	0		2(8)	1(4)	4(16)	5(20)	
LR-HPV	0		0	0	0	1(4)	
Physical state	-						
ND			16(64)	9(36)	0	1(4)	
Episomal	10(40)		-	-	3(12)	4(16)	<0.001
Integrated	15(60)		-	-	9(36)	8(32)	

CN: normal cytology, LSIL: low squamous intraepithelial lesion grade, HPV: human papillomavirus, HR-HPV: High-risk HPV, LR-HPV: low-risk HPV, MI: multiple infections; (+): positive HPV infection; (-): negative HPV infection; ND: not determined. P value determined by Fisher's exact test for differences between the cytological diagnosis, molecular diagnosis of HPV and physical state. In the samples with HPV PCR negative and who had a LR-HPV not determine the status physical, in the first not to present evidence HPV and second for lack of the corresponding probe.

Follow-up women who had LSIL associated with the presence of HPV-16.

Table 3 summarizes the results of follow-up the group of women who initially presented LSIL and HPV-16. At baseline, all women had the LSIL were associated with HPV-16 infection, in these cases, 60% of the women had integrated virus and 40% in episomal form.

After 6 months follow-up, these women unchanged cytologically, but new infections occurred, mainly multiple infections with 16% of cases, followed by HR-HPV with 8% but HPV-16 was presented in 76% of cases of LSIL. At follow-up, only one case change LSIL cytological diagnosis to NC associated episomal state of HPV-16. Of the remaining LSIL (96%), 48% persisted with HPV-16 and HR-HPV new viral types were more common after HPV-16, with 20% of cases.

The integrated state continued to be the most prevalent in 68% of cases with LSIL ($P < 0.001$). Were detected 3 cases of LSIL with the presence of LR-HPV that was not possible physical state assessment of HPV. Follow-up during 44 women had LSIL, of which 20 were new cases.

Table 3. Follow-up of women with LSIL and HPV infection

Follow-up	0 months	6 months	12 months		P Value
	LSIL	LSIL	NC/HPV+	LSIL	
Cytological diagnosis					
n (%)	25(100)	25(100)	1(4)	24(96)	<0.001
Molecular diagnosis of HPV					
HPV-16	25(100)	19(76)	1(4)	12(48)	<0.001
HR-HPV	0	2(8)	0	5(20)	
MI	0	4(16)	0	4(16)	
LR-HPV	0	0	0	3(12)	
Physical state					
ND^a	-	25(100)	-	3(12)	<0.001
Episomal	10(40)	-	1(4)	4(16)	
Integrated	15(60)	-	-	17(68)	

CN: normal cytology, LSIL: low squamous intraepithelial lesion grade, HPV papillomavirus human, HR-HPV: HPV high-risk, LR-HPV: low-risk HPV, MI: multiple infections; (+): positive for HPV infection, ND: not determined. P value determined with the exact test Fisher for differences between the cytological diagnosis, molecular diagnosis of HPV and physical state.

HPV in samples with PCR negative and the showed LR-HPV, physical status not was determined, in the first not to present evidence HPV and second for lack of the corresponding probe.

Association between expression of biomarkers and cytological diagnosis.

The expression of the proteins E6 and telomerase Ki-67 was given 3 times in the follow-up (0, 6 and 12 months), in response to changes in the cytological diagnosis (Table 4) (Figure 1 & 2: A-D).

The expression of the viral oncoprotein E6, at baseline appeared as mainly moderate expression in most of women with NC/HPV+ (80%) and in women with LSIL (76%), maintaining this level of expression until 6 months. It is noteworthy that the intense expression of E6 was detected from the first evaluation and grew, as time progressed and the increase in LSIL cases, the end of the study the expression of E6 was detected in 50% of the women with NC/HPV+ and 54.5% of women with LSIL, showing a strong association between the expression of E6 and cytological abnormalities (OR: 2.6, 95% CI: 1.4-4.9, P= 0.003).

The expression of Ki-67 remained mostly moderate at 0 and 6 months in both women with LSIL as NC. At 12 months follow-up the expression of Ki-67 went from moderate to intense in most NC/HPV(-) samples (71.4%) and LSIL (61.4%), showing a strong association (OR: 2.2, 95% CI: 1.2-3.8, P= 0.008).

Regarding the intense expression of telomerase, this was detected from the first assessment in samples with NC/HPV+ (32%) and LSIL (40%), in the last evaluation, telomerase expression moderate was more frequent in NC cases (85.7%) and an intense expression was detected in LSIL cases (54.5%), (OR: 4.6, 95% CI: 2.1-9.8, P= 0.341).

Table 4. Association between expression of biomarkers and cytological diagnosis, during follow-up

Cytological diagnosis										
Follow-up	0 months			6 months		12 months			OR	P [†]
Expression of biomarkers	NC/HPV- n=25(%)	NC/HPV+ n=25(%)	LSIL n=25(%)	NC/HPV+ n=16(%)	LSIL n=34(%)	NC/HPV- N=17(%)	NC/HPV+ N=14(%)	LSIL N=44(%)	(CI 95%)	Value
E6										
Negative	25(100)					17(100)			1*	
Moderate		20(80)	19(76)	13(81.3)	23(67.6)		7(50)	20(45.5)		
Intense		5(20)	6(24)	3(18.7)	11(32.4)		7(50)	24(54.5)	2.6(1.4-4.9)	0.003
Ki-67										
Negative	25(100)					17(100)			1*	
Moderate		20(80)	19(76)	12(75)	18(53)		4(28.6)	17(38.6)		
Intense		5(20)	6(24)	4(25)	16(47)		10(71.4)	27(61.4)	2.2(1.2-3.8)	0.008
Telomerase										
Negative	25(100)					17(100)			1*	
Moderate		17(68)	15(60)	11(68.7)	14(41.2)		12(85.7)	20(45.5)		
Intense		8(32)	10(40)	5(31.3)	20(58.8)		2(14.3)	24(54.5)	4.6(2.1-9.8)	<0.001

CN: normal cytology, LSIL: low squamous intraepithelial lesion grade, HPV: human papillomavirus, (+): positive for HPV infection, (-): negative for HPV infection.

Expression moderate 11-50% and intense expression: > 50% positive cells to proteins. †: p value determined with a logistic regression model for repeated measures adjusted for age.

* Reference category (negative expression for the 3 proteins). Frequencies are given column.

Association between expression of biomarkers, the presence and physical state of HPV.

Table 5 summarizes the expression of cellular and viral proteins with HPV infection in addition to his physical state (Figure 1D & 2D). E6 expression was associated with HPV infection and physical state during follow-up cases. In the first determination of E6 at 0 months, moderate expression was found in 95% of women presenting the episomal state and in 70% of women with integrated state. The evaluation of the 12 months of E6 expression was intense mainly associating with the presence of oncogenic HPV integrated state (OR: 3.3, 95% CI: 1.2-8.5, P= 0.013).

The evaluation at 0 months, the moderate expression of Ki-67 was found mainly in women with HPV-16 episomal state (90%) and 70% with the integrated state. Over time, the intense expression of Ki-67 was predominant in patients with HPV-16, HR-HPV and MI with the integrated version of the virus (OR: 2.3, 95% CI: 0.9-5.3, P= 0.055). As for the telomerase expression, this remained moderate during follow-up associating with the episomal state of the oncogenic HPV and cases with an intense expression relate to the integrated state of different HPV types in women screened (OR: 1.7, 95% CI: 0.5-4.7, P= 0.341).

From the point of view of the physical state of HPV-16, 13 women with initial diagnosis NC developed the LSIL after 12 months, 38.5% of these women had HPV-16 in episomal state and 61.5% in integrated state and only one case presented a regression of LSIL to NC associated with HPV-16 episomal state (data not shown).

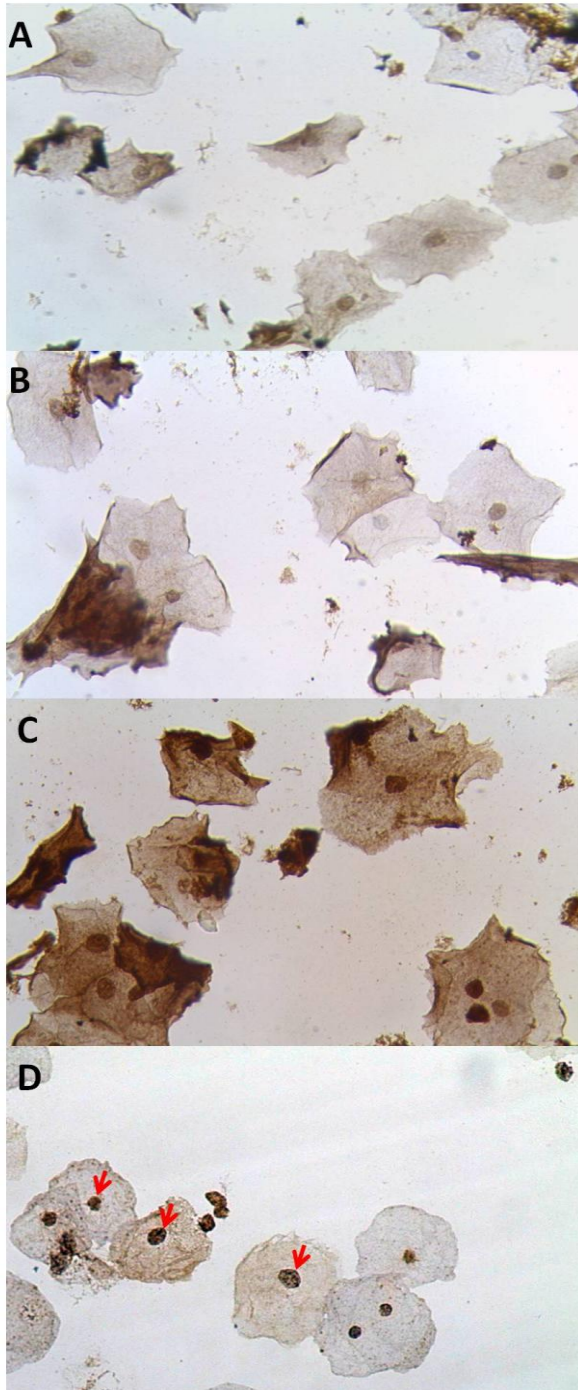


Figure 1. Expression of E6 viral protein, Ki-67, telomerase in normal cytology samples with HPV-16 integrated. Immunostaining for: A. E6 expression. B. Ki-67. C. hTERT in nuclei and cytoplasm. D. Integrated viral DNA (fine dots, red arrows). 40X.

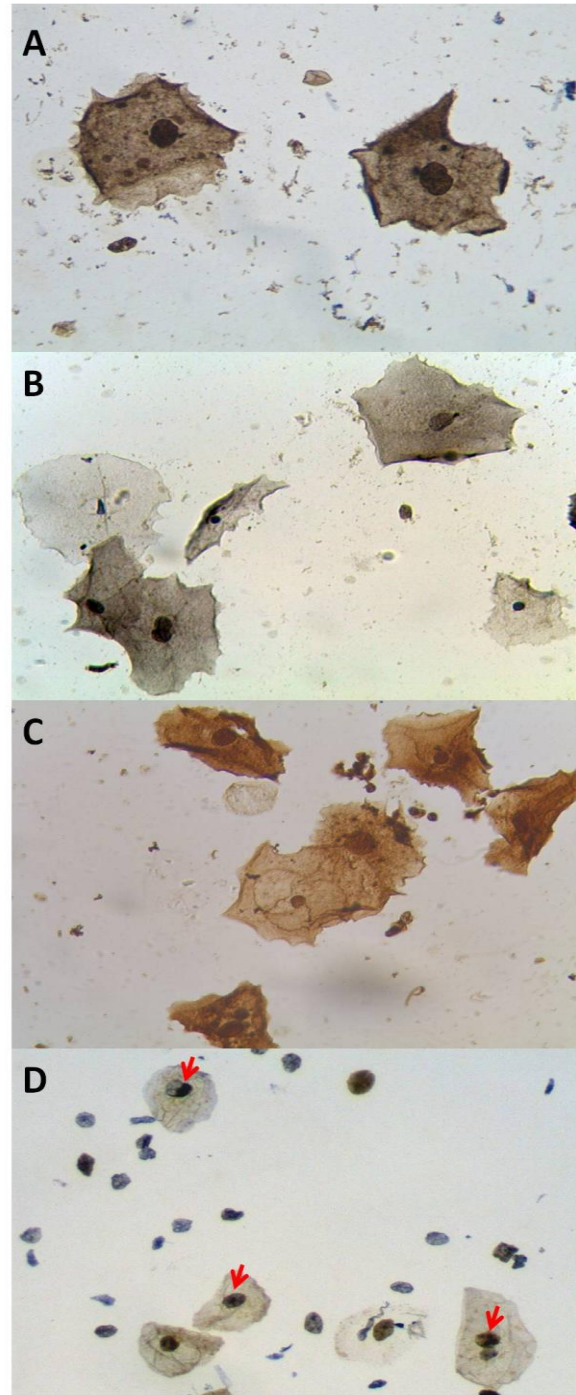


Figure 2. Biomarkers expression in HPV16 positive/LSIL. A. E6 immunostaining in cells with nuclear abnormalities (binucleated). B. Ki-67 in binucleated cells. C. Telomerase in cells with cytomorphological alterations. D. Cells with integrated HPV-16 (punctate signal, red arrows). 40X.

Table 5. Association between expression of biomarkers and the presence and physical state of HPV, during follow-up

Follow-up		0 months				12 months								
Molecular diagnosis of HPV	N	HPV-16			HPV-16		HR-HPV		MI			OR CI (95%)	P [†] Value	
	n=25(%)	n=50(%)			n=27(%)		n=11(%)		n=14(%)					
Physical state	N	E	I	P ^b	E	I	E	I	E	I	P ^b			
Cases, n	25	20	30	Value	10	17	2	9	5	8	Value			
Expression of biomarkers														
E6														
Negative	25(100)											1*		
Moderate		19(95)	21(70)		8(80)	8(47)	1(50)	2(22.2)	3(60)	2(25)				
Intense		1(5)	9(30)	0.02	2(20)	9(53)	1(50)	7(77.8)	2(40)	6(75)	0.001	3.3(1.2-8.5)	0.013	
Ki-67														
Negative	25(100)											1*		
Moderate		18(90)	21(70)		8(80)	10(59)	1(50)	2(22.2)	3(60)	3(37.5)				
Intense		2(10)	9(30)	0.04	2(20)	7(41)	1(50)	7(77.8)	2(40)	5(62.5)	0.01	2.3(0.9-5.8)	0.055	
Telomerase														
Negative	25(100)											1*		
Moderate		17(85)	15(50)		7(70)	9(53)	1(50)	4(44.5)	4(80)	4(50)				
Intense		3(15)	15(50)	0.04	3(30)	8(47)	1(50)	5(55.5)	1(20)	4(50)	0.01	1.7(0.5-4.7)	0.341	

HPV: human papillomavirus, HR-HPV: High-risk HPV, LR- HPV: low-risk HPV, MI: multiple infection, N: negative, E: episomal, I: integrated; Expression moderate 11-50% and intense expression: > 50% positive cells to proteins.*Reference category (negative expression for the 3 proteins). †: p value determined with a logistic regression model for repeated measures adjusted for age. ‡: the P value determined by the Fisher exact test, comparing the expression of the markers between the integrated state with the HPV episomal state. Frequencies are given column.

Discussion

As a screening method, uterine cervix exfoliative cytology has effectively reduced the incidence of ICC in different countries.^[26] However, this technique has a low sensitivity (50-75%) to detect high-risk cervical lesions, has ample variability among observers, and produces a high percentage of false negative results.^[27, 28] Histopathological studies have also shown variability among observers.^[29] It is not only desirable to improve opportune diagnosis but also to provide control and follow-up of cases before instituting possible unnecessary patient treatments. The use of biomarkers in cytological and histological samples has improved the results of cervical screening.^[30]

Our data show that 28% of women without cytological or molecular evidence of HPV developed LSIL related mainly to HPV-16 after a year of follow-up. 52% of cases with normal cytology but with molecular diagnosis of HPV-16 progressed to LSIL, but 96% of women with LSIL showed no further cytological changes during the follow-up year. Several authors report that after two years, 90% of premalignant lesions return.^[30, 31] In this study, we detected a single case of regression (4%) in a woman with LSIL that after one year follow-up showed no signs of injury, yet had the HPV-16 in episomal form. Obtaining a final prevalence of LSIL 58.7%, and 47.7% of these lesions HPV-16 was present ($p < 0.001$), the final persistence of HPV-16 in samples with CN/HPV+ was 20% and 4% in samples with LSIL. Schmeink *et al.*,^[32] found that only 11% of LSIL/CIN1 cases persisted with HR-HPV, among which HPV-16 had a prevalence of 30.2 % in a follow-up period of 12 months, and 54.4 % persisted after two years.

Castle *et al.*,^[33] reported that 21.1% of women with LSIL have infection with HPV-16; Rodríguez *et al.*,^[34] reported HPV-16 persistence in 26.3 % of 209 women, and 12% of these had multiple HR-HPV infections that persisted more than a year. Similar results were found in the present study, with multiple infections present in 16 % of cases, with high-risk viral types (20%) and low risk HPVs (12%) ($P < 0.001$). These results differ from those reported by Fernández-Tilapa *et al.*,^[5] with a prevalence of 0.98% for low-risk HPV and multiple infections in LSIL cases.

In the present study, the integrated state of HPV-16 viral DNA was found most frequently (63%) in cytological samples evaluated by ISH. It was also detected in 75% of normal cytology samples, as well as in 70.8% of LSIL cases. These results are consistent with those reported in other studies.^[11] Similar to that reported by Kulmala *et al.*,^[35] this supports the hypothesis that integration is an early event in cervical carcinogenesis. While that the integrated state of HPV-16 in early lesions has been associated with progression to HSIL and ICC.^[36, 7, 9]

ISH technique amplified with tyramide has high sensitivity, capable of detecting as few as two copies of integrated HPV-16 DNA in SiHa cells,^[37] which makes it useful for cytological samples in liquid base, conserving cell morphology. Besides HPV physical state diagnosis (differentiating between the episomal and integrated states), is a useful technique.^[38,40] While evaluating the expression of cellular and viral proteins by means of semi-quantify immunocytochemistry allows these proteins in both tissues as cellular material, making this a feasible in the primary diagnosis of various cancers.

In this study, we found that in the presence of the integrated state, there is a strong association between the expression of E6 (OR 3.3; IC 95%: 1.2-8.5, $p=0.013$) and Ki-67 (OR 2.3; IC 95%: 0.9-5.8, $p=0.055$). This demonstrates the importance of integration in the cell proliferation process mediated by E6, resulting in an increase of Ki-67 expression in cervical cells infected by HPV-16. Nam *et al.*,^[41] and Yu *et al.*,^[21] proved that Ki-67 is the most important indicator of cell proliferation in cervical lesions, and may be used as an additional marker of cytological diagnosis. However, the intense expression of telomerase is present in early stages of HPV infection, suggesting that telomerase expression is independent of the integration of the viral genome (OR 1.7, 95% CI 0.5-4.7, $p = 0.341$). These results are similar to those of Kailash *et al.*,^[19] suggesting that telomerase expression starts at early stages of infection by HPV 16/18 and progresses to the degree of injury, also may serve as a tool for diagnosis and prognosis of cervical lesions.

In conclusion, overexpression of E6, Ki-67 and telomerase was associated with the presence of integrated HPV-16 and the development of new cases of LSIL, which promotes viral persistence and increases the risk of progression to high-grade lesions in women with normal cytology and LSIL. This study is based on data from 75 patients, but it suggests the need to

confirm these relationships in a larger population with a longer follow-up period to identify early uterine cervical lesions with a high risk of progression associated with HR-HPV, which are becoming more frequent in LSIL.

References

1. International Agency for Research on Cancer World Health Organization: The Global Project. (Thomas CA ed.), 2008.
2. Secretaria de Salud. Dirección General de Información en Salud. 2008.
3. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
4. Illades-Aguilar B, Alarcon-Romero Ldel C, Antonio-Vejar V, Zamudio-Lopez N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, *et al.* Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol Oncol* 2010; 117: 291-96.
5. Fernandez-Tilapa G, Illades-Aguilar B, Martínez-Carrillo DN, Alarcon-Romero LC, Vences-Velazquez A, Terán-Porcayo MA, *et al.* Prevalence of human papillomavirus types among Mexican women with intraepithelial lesions and cervical cancer: detection with MY09/MY011 and GP5+/GP6+ primer systems. *A J Inf Dis* 2007; 3: 1-6.
6. Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res* 2009; 130: 266-76.
7. Li W, Wang W, Si M, Han L, Gao Q, Luo A, *et al.* The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 1355-61.
8. Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, *et al.* 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* 2008; 46: 3678-85.
9. Peitsaro P, Johansson B, and Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 886-91.
10. Evans MF, Mount SL, Beatty BG, and Cooper K. Biotinyl-tyramide-based in situ hybridization signal patterns distinguish human papillomavirus type and grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 2002; 15: 1339-47.
11. Vega-Peña A, Illades-Aguilar B, Flores-Alfaro E, López-Bayghen E, Reyes-Maldonado E, and Alarcón-Romero LDC. Correlation of Ki-67 and telomerase expression with in-

- situ hybridization for high risk Human Papillomavirus. Archives of Biological Sciences, Belgrade 2012; 65: 81-90.
12. Zubillaga-Guerrero MI, Illades-Aguilar B, Leyva-Vazquez MA, Flores-Alfaro E, Castañeda-Saucedo E, Muñoz-Valle JF, *et al.* The integration of HR-HPV increased the expression of Cyclins A and E in cytologies with and without low-grade. J Cytol 2013; 30:1-7.
 13. Ganguly N and Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. J Biosci 2009; 34: 113-23.
 14. Raybould R, Fiander A, and Hibbitts S. Human Papillomavirus Integration and its Role in Cervical Malignant Progression. The Open Clinical Cancer Journal 2011; 5: 1-7.
 15. Klingelhutz AJ and Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. Virology 2012; 424: 77-98.
 16. Liu X, Dakic A, Zhang Y, Dai Y, Chen R, and Schlegel R. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 18780-85.
 17. Narisawa-Saito M and Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. Cancer Sci 2007; 98: 1505-11.
 18. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 266: 2011-5.
 19. Kailash U, Soundararajan CC, Lakshmy R, Arora R, Vivekanandhan S, and Das BC. Telomerase activity as an adjunct to high-risk human papillomavirus types 16 and 18 and cytology screening in cervical cancer. Br J Cancer 2006; 95: 1250-7.
 20. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond) 2006; 110: 525-41.
 21. Yu L, Wang L, Zhong J, and Chen S. Diagnostic value of p16INK4A, Ki-67, and human papillomavirus L1 capsid protein immunochemical staining on cell blocks from residual liquid-based gynecologic cytology specimens. Cancer Cytopathol 2010; 118: 47-55.
 22. Bauer HM, Greer CE, and Manos MM. Determination of genital human papillomavirus infection by consensus PCR amplification. *In: Diagnostic molecular pathology: A practical approach* (Herrington CS, McGee JO eds.). United Kingdom: Oxford: Oxford University Press, 1992. pp. 131-52.
 23. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, and Wheeler CM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J Infect Dis 1994; 170: 1077-85.
 24. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, and Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent

- highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76 (Pt 4): 1057-62.
25. Cheung AN, Chiu PM, Tsun KL, Khoo US, Leung BS, and Ngan HY. Chromosome in situ hybridisation, Ki-67, and telomerase immunocytochemistry in liquid based cervical cytology. *J Clin Pathol* 2004; 57: 721-27.
 26. van der Aa MA, Pukkala E, Coebergh JW, Anttila A, and Siesling S. Mass screening programmes and trends in cervical cancer in Finland and the Netherlands. *Int J Cancer* 2008; 122: 1854-8.
 27. Adamopoulou M, Kalkani E, Charvalos E, Avgoustidis D, Haidopoulos D, and Yapijakis C. Comparison of cytology, colposcopy, HPV typing and biomarker analysis in cervical neoplasia. *Anticancer Res* 2009; 29: 3401-09.
 28. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, *et al.* Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006; 119: 1095-01.
 29. Walts AE and Bose S. p16, Ki-67, and BD ProEX (TM) C immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Human Pathology* 2009; 40: 957-64.
 30. Brown CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, and Malinowski DP. Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. *J Oncol* 2012; 289315.
 31. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, and Wheeler CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* 2007; 195: 1582-9.
 32. Schmeink CE, Melchers WJ, Siebers AG, Quint WG, Massuger LF, and Bekkers RL. Human papillomavirus persistence in young unscreened women, a prospective cohort study. *PLoS One* 2011; 6: e27937.
 33. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, and Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1066-71.
 34. Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, *et al.* Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 513-7.
 35. Kulmala SM, Syrjanen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, *et al.* Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* 2006; 59: 513-17.
 36. Boulet GA, Benoy IH, Depuydt CE, Horvath CA, Aerts M, Hens N, *et al.* Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2992-99.

37. Evans MF, Aliesky HA, and Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Clin Pathol* 2003; 3: 2.
38. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, and Cooper K. p16INK4A immunoeexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 674-9.
39. Montag M, Blankenstein TJ, Shabani N, Bruning A, and Mylonas I. Evaluation of two commercialised in situ hybridisation assays for detecting HPV-DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 284: 999-05.
40. Samama B, Plas-Roser S, Schaeffer C, Chateau D, Fabre M, and Boehm N. HPV DNA detection by in situ hybridization with catalyzed signal amplification on thin-layer cervical smears. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 1417-20.
41. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, *et al.* Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol* 2008; 19: 162-8.

Discusión

El cáncer cervical invasor (CCI), puede evitarse cuando el diagnóstico y tratamiento de las lesiones precursoras se establece tempranamente. En el estado de Guerrero, México se ha reportado que los casos de CCI están asociados con la infección por VPH-AR, principalmente el 16, 18 y 31 (Illades *et al*, 2010; Fernández *et al*, 2007).

La identificación del ADN del VPH-AR por métodos moleculares como la PCR, ha aumentado la sensibilidad del tamizaje cervical, al realizarse de manera conjunta con del estudio citológico de Papanicolaou que se considera, presenta una baja sensibilidad (50-75%) para detectar lesiones cervicales, debido a la gran variabilidad entre observadores y un alto porcentaje de falsos negativos (Brown *et al*, 2012; Adamopoulou *et al*, 2009; Cuzick *et al*, 2006). También el estudio histopatológico ha reportado variabilidad entre observadores en el diagnóstico de las lesiones premalignas del cérvix uterino (Walts & Bose, 2009).

El uso de biomarcadores en muestras citológicas e histológicas ha mejorado los resultados del tamizaje cervical (Brown *et al*, 2012). Diversos autores han evaluado la utilidad de biomarcadores en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento de lesiones cervicales asociadas a la infección, integración y carga viral de los VPH-AR y principalmente el tipo 16 y 18 (Brown *et al*, 2012; Hwang & Shroyer, 2012; Kumar & Verma, 2006).

En este estudio nosotros evaluamos la relación entre el estado integrado del VPH-16 y la expresión de proteínas celulares y virales en el pronóstico de progresión de lesiones cervicales tempranas. Para esto, se trabajó con un grupo de mujeres guerrerenses cuyas muestras citológicas fueron diagnosticadas con una LEIBG y un grupo de mujeres con muestras de citología sin LEI, ambas con la infección por VPH-16, además de un grupo de mujeres cuyas muestras citológicas fueron sin LEI y sin VPH.

Después de un año de seguimiento, el 28% de las mujeres con diagnóstico citológico y molecular negativos al VPH, desarrollaron una LEIBG relacionada principalmente al VPH-16, mientras que el 52% de las citologías normales sin cambios por VPH pero con diagnóstico molecular inicial de VPH-16, progresaron a LEIBG; estos cambios se relacionaron con la persistencia e integración del VPH-16.

En este estudio, el 96% de las mujeres con LEIBG se mantuvo sin cambios citológicos durante el año de seguimiento, estos resultados difieren a los reportados por Oh *et al*, (2008), que demuestran en 26 jóvenes coreanas, que el 87% de infecciones por VPH-AR fueron eliminadas en un año y medio de seguimiento y esto resulta de los mecanismos de defensa del sistema inmune de estas mujeres, que juega un papel importante en el establecimiento de la infección por VPH.

Otros estudios, también reportan que después de 2 años, el 90% de las lesiones premalignas (LEIBG) asociadas a VPH-AR muestran regresión (Brown *et al*, 2012; Plummer *et al*, 2007), en nuestro estudio encontramos un caso de regresión (4%) en una mujer con LEIBG durante el año de seguimiento, esto en la mitad del tiempo en el que se reportan la mayoría de los casos de regresión (2 años). Esta mujer presentaba el estado episomal del VPH-16 y una expresión moderada de los biomarcadores, que puede estar relacionada con la expresión temprana de las oncoproteínas virales E6 y E7 durante la proliferación celular y esto puede estar contribuyendo con la persistencia viral en el epitelio cervical.

Se obtuvo una prevalencia final de LEIBG del 58.7% (44), de estos casos en el 47.7% (21) estuvo presente el VPH-16. De los casos inicialmente diagnosticados con LEIBG más VPH-16, el 48% persistió durante el año de seguimiento, estos resultados son similares a los reportados por Schmeink *et al* (2011), encontraron que solo el 11% de los casos de LEIBG/NIC1, persistieron con la infección por VPH-AR, entre estos el VH-16 presentó una prevalencia del 30.2% en 12 meses de seguimiento y el 54.4% persistió después de 2 años de seguimiento.

Es importante mencionar que varios autores reportan que, el seguimiento de las mujeres con infección por VPH-AR, proporciona información necesaria para conocer la historia natural de esta infección, evaluar progresión, persistencia, regresión e incidencias de los VPH-AR más frecuentes y además de las co-infecciones con otros tipos virales (Oh *et al*, 2008; Insinga *et al*, 2007; Castle *et al*, 2005).

También Rodríguez *et al* (2008), reportan en 209 mujeres que el 26.3% persistió con el VPH-16, además el 12% de estas mujeres presentaban una infección múltiple por

VPH-AR persistentes por más de un año. Resultados similares encontramos en este estudio, al detectar infecciones múltiples en el 16% de los casos, además de tipos virales de alto riesgo, (20%) y bajo riesgo (12%) entre las mujeres con LEIBG ($p < 0.001$), estos resultados difieren con los reportados Fernández *et al*, (2007), que reportan una prevalencia de 0.98% para los VPH-BR e infecciones múltiples en casos con LEIBG.

Siendo los VPH-AR los más asociados con el desarrollo de LEIAG y CCI (Smith *et al*, 2007; Muñoz *et al*, 2003), debido a su capacidad de integración (Raybould *et al*, 2011). Sin embargo, las infecciones múltiples son consideradas como potenciales factores que incrementan el riesgo de desarrollo de LEIBG, debido a la presencia de los principales tipos de VPH-AR o en combinación con otros tipos virales (VPH-BR)(López *et al*, 2012).

Nuestros resultados, demuestran al estado integrado del VPH-16 como el más frecuente (63%) seguido del estado episomal con un 37% entre las muestras citológicas evaluadas con HIS. Entre la mujeres con LEIBG, el estado integrado fue el más frecuente con el 70.8% y en mujeres con CN más VPH la integración se presentó en el 75% de los casos, al final del seguimiento.

Similar a lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo donde el 50% de muestras de tejido epitelial sin lesión, presentaron el estado integrado del VPH-AR, y el 75% de NIC I, el 58.3% de NIC 2 y el 88% de casos de NIC 3, (Vega *et al*, 2013). También Kulmala *et al*, (2006), han reportado el VPH-16 integrado en muestras sin lesión (11%), LEIBG (7.7%) y en ASC-US (18.2%), lo que soporta la hipótesis de que la integración es un evento temprano en la carcinogénesis cervical.

La técnica de HIS con amplificación con tiramida, presenta alta sensibilidad al detectar las 2 copias del ADN integrado del VPH-16 en las células SiHa (Evans *et al*, 2003), permitiendo su uso en muestras citológicas en base líquida, conservando la morfología celular. Además de poder diferenciar entre el estado episomal e integrado en una muestra, la hace una técnica útil, para el diagnóstico del estado físico del ADN viral (Samama *et al*, 2002; Kalof *et al*, 2005; Montag *et al*, 2011). El estado

integrado del VPH-16 en lesiones tempranas, se ha asociado con progresión a LEIAG y CCI (Peitsaro *et al*, 2002; Li *et al*, 2008; Boulet *et al*, 2009).

Por otro lado, en este estudio se demuestra que durante el seguimiento el estado integrado de los VPH oncogénicos se asocia fuertemente con la expresión de E6 (OR 3.3; IC 95%: 1.2-8.5, $p=0.013$) y Ki-67 (OR 2.3; IC 95%: 0.9-5.8, $p=0.055$), lo que demuestra la importancia de la integración en el proceso de proliferación celular mediada por E6, lo que resulta en un aumento en la expresión de Ki-67 en células cervicales con la infección por VPH-16 integrado.

Nuestros resultados demuestran que la expresión de E6 está directamente asociada al estado integrado del VPH-16 ($p=0.001$) y esto puede ser fácilmente determinado por inmunocitoquímica y el uso de la hibridación *in situ*. Sin embargo, la evaluación inmunocitoquímica de E6 ha sido poco valorada por la falta de reproducibilidad de los anticuerpos diseñados anteriormente contra esta oncoproteína. Actualmente el anticuerpo C1P5 (Santa Cruz, USA) se ha usado en cáncer de pulmón y esófago, demostrando la expresión de esta oncoproteína exitosamente al igual que en nuestro estudio (Aguayo *et al*, 2007; Cheng *et al*, 2007; Qi *et al*, 2006).

Con respecto a la expresión de Ki-67, se encontró una fuerte asociación entre esta proteína, el diagnóstico citológico ($p=0.008$) y la presencia e integración de VPH-16 favorecen la expresión significativa de Ki-67 en el epitelio cervical maduro ($p=0.01$), reportes previos por otros autores como Yu *et al*, (2010) y Nam *et al*, (2008), comprueban que Ki-67, es el indicador más importante de proliferación celular en lesiones cervicales y puede ser usado como marcador adjunto del diagnóstico citológico e histológico. Walts & Bose (2009), reportan que la evaluación de Ki-67 en combinación con $p16^{INK4a}$ y ProExC, mejoran la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de los casos de NIC asociados al VPH-AR, también Faoro *et al*, (2012), evaluaron la expresión de E7 en conjunto con L1, p53, Ki-67, hTERT, ubiquitina y $p16^{INK4a}$ en lesiones cervicales, demostrando que Ki-67 es un buen marcador en el diagnóstico de LEIBG y LEIAG ($p<0.001$).

La expresión intensa de telomerasa se presentó desde el inicio del seguimiento asociándose principalmente con la presencia del estado integrado de los VPH-AR (OR 1.7; IC 95%: 0.5-4.7, $p=0.341$). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la telomerasa es un marcador temprano de la infección por diferentes tipos de VPH-AR, pero es necesario ampliar el tamaño de la muestra para seguir evaluando los mecanismos biológicos que conducen a su expresión.

Por su parte Kailash *et al* (2006), que reportaron por medio del ensayo TRAP (en inglés, Telomeric Repeat Amplification Protocol), que la expresión de telomerasa se encuentra en el 63.6% de los casos de displasia leve y en el 100% de los casos de displasia moderada, severa y CCI ($p<0.001$) asociadas a la infección por VPH 16/18, sugiriendo que la expresión de la telomerasa aparece en etapas tempranas en presencia de la infección por estos virus y su expresión se relaciona con la progresión de la lesión cervical, además se sugiere que la expresión de la telomerasa puede ser un marcador útil en el diagnóstico y pronóstico de lesiones cervicales. También Bravaccini *et al* (2005), evaluaron la expresión de la telomerasa en muestras de NIC 1-3, por inmunohistoquímica (IHQ) y el ensayo TRAP, resaltan que la evaluación *in situ* de la telomerasa tiene una mayor precisión en la identificación de células displásicas, pero no ayuda a mejorar la precisión del diagnóstico citológico.

Sin embargo, son pocos los estudios que evalúen el estado integrado de los VPH-AR con la expresión de proteínas celulares involucradas con la proliferación celular, nosotros demostramos en un estudio previo una fuerte asociación entre la expresión de Ki-67 (OR: 64.1, $p<0.001$) y telomerasa (OR: 50.1, $p=0.001$) con el estado integrado del VPH-AR, evidenciando lesiones con alto riesgo de progresión a CCI y proponiendo el uso de estos marcadores en el pronóstico de lesiones tempranas en muestras citológicas (Vega *et al*, 2013), mientras que los resultados del presente estudio demuestran que la persistencia e integración de los VPH-AR y principalmente el tipo 16 juega un papel clave en la progresión de lesiones tempranas a lesiones más agresivas.

En este estudio, se pudo identificar mujeres con características cito-moleculares asociadas a la progresión de la lesión como la persistencia de la infección por VPH, VPH oncogénicos como el VPH-16, el estado integrado del virus, la presencia de alteraciones citológicas y la expresión alterada de proteínas celulares y virales. Las mujeres que desarrollaron la LEIBG en presencia del VPH-16 en forma episomal más la expresión intensa de uno o más marcadores, presentan mayor probabilidad de persistencia del VPH-16 en el epitelio cervical por largos periodos siendo susceptible a alteraciones morfológicas y moleculares, como la integración.

Nuestros resultados muestran que la expresión de E6, Ki-67 y telomerasa está relacionada con las alteraciones citológicas y la presencia del VPH-16 integrado, permitiendo que la LEIBG persista durante más tiempo y aumente el riesgo de progresión a lesiones más agresivas, por lo que la evaluación conjunta de marcadores aumenta la sensibilidad del estudio citológico para detectar LEI asociadas a la infección por VPH-AR, además, de seleccionar un grupo de mujeres candidatas a un tratamiento quirúrgico.

En conclusión, la sobreexpresión de telomerasa se asoció con el desarrollo de LEIBG y la infección por VPH-16, sugiriendo que la telomerasa se expresa desde el inicio de la infección por VPH-16 y va aumentando su expresión conforme avanza la lesión, pero su expresión debe seguir siendo evaluada en lesiones tempranas para establecer su relación con el proceso de integración del VPH.

La sobreexpresión de E6 y Ki-67, se relaciona significativamente con el proceso de integración del VPH-16, debido a que aumentan su expresión como resultado de la actividad de las oncoproteínas de virus integrados, promoviendo el riesgo de progresión de las mujeres con citología normal y LEIBG, por lo que se recomienda que las mujeres con este riesgo reciban un control y seguimiento clínico estricto.

Es importante sugerir aumentar el número de casos de LEIBG para seguir confirmando esta relación y realizar un seguimiento a largo plazo para identificar aquellas lesiones tempranas del cérvix uterino con alto riesgo de progresión en presencia de los VPH-AR que cada vez más frecuentemente encontrados en casos de LEIBG en mujeres guerrerenses.

Referencias

- Adamopoulou M, Kalkani E, Charvalos E, Avgoustidis D, Haidopoulos D and Yapijakis C. (2009). Comparison of cytology, colposcopy, HPV typing and biomarker analysis in cervical neoplasia. *Anticancer Res*; 29: 3401-3410.
- Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, *et al.* (2007). Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *B J Cancer*; 97: 85-91.
- Apgar PS, Brotzman GL, Spitzer M. (2002). Colposcopía principios y práctica. México, D.F. Editorial McGraw-Hill Interamericana: 43-45, 58-63.
- Bellon M, Nicot C. (2008). Regulation of telomerase and telomeres: human tumor viruses take control. *J Natl Cancer Inst*; 100:98-108.
- Boulet GAV, Benoy IH, Depuydt CE, Horvath CAJ, Aerts M, Hens N, *et al.* (2009). Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: Biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 18:2992-2999.
- Bravaccini S, Sanchini MA, Amadori A, Medri L, Saragoni L, Calistri D, *et al.* (2005). Potential of telomerase expression and activity in cervical specimens as a diagnostic tool. *J Clin Pathol*; 58:911-4.
- Brown CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, and Malinowski DP: (2012). Role of Protein Biomarkers in the Detection of High-Grade Disease in Cervical Cancer Screening Programs. *J Oncol*, ID 289315, 11.
- Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, *et al.* (2009). Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *BMJ*, 339: 1-13.
- Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM, for the ALTS Group. (2005). Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst*, 97: 1066-1071.
- Cheng Y-W, Wu M-F, Wang J, Yeh K-T, Goan Y-G, Chiou H-L *et al.* (2007). Human Papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res*; 67:10686-10693.
- Cheung AN, Chiu PM, Tsun KL Khoo US, Leung BSY, Ngan HYS, *et al.* (2004). Chromosome in situ hybridisation, Ki-67, and telomerase immunocytochemistry in liquid based cervical cytology. *J Clin Pathol*; 57:721-7.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N and Franceschi S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 88: 63-73.
- Cooper K, Evans M and Mount S. (2003). Biology and evolution of cervical squamous intraepithelial lesions: A hypothesis with diagnostic prognostic implications. *Advn Anat Pathol*; 10: 200-203.

Coutlée F, Rouleau D, Ferenczy A, Franco E. (2005). The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*; 16:83-91.

Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, *et al.* (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*; 119: 1095-1101.

Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*; 110:525-41.

Dzul-Rosado KR, Puerto-Solís M, Gonzalez-Losa MR. (2004). Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. *Rev Biomed*; 15:233-241.

Evans MF, Aliesky HA and Cooper K. (2003). Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Clin Pathol*; 3: 1-17.

Evans MF, Cooper K. (2004). Human papillomavirus integration: detection by in situ hybridization and potential clinical application. *J Pathol*; 202:1-4.

Faoro V, Barbazza R, Bonin S, Brunetti D, Sulfaro S, and Stanta G. (2012). Detection of HPV E7 oncoviral protein in cervical lesions by a new antibody. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*; 00:000–000.

Fernández-Tilapa G, Illades-Aguiar B, Martínez-Carrillo D.N, Alarcón-Romero LdC, Vences-Velázquez A, Teran-Porcayo MA, *et al.* (2007). Prevalence of human papillomavirus types among Mexican women with intraepithelial lesions and cervical cancer: detection with MY09/MY011 and GP5+/GP6+ primer systems. *A J Inf Dis*, 3:1-6.

Frost M, Bobak JB, Gianani R, Kim N, Weinrich S, Spalding DC, *et al.* (2000). Localization of telomerase hTERT protein and hTR in benign mucosa, dysplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. *Am J Clin Pathol*; 114:726-34.

Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR *et al.* (2003). Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol*; 56: 532-536.

Ganguly N and Parihar S. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci*; 34:113-123.

Goon P, Stanley J, Ebmeyer L, Steinsträsser T, Upile W, Jerjes MB, *et al.* (2009). HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol*; 1:36: 1-8.

Guo M, Gong Y, Deavers M, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, *et al.* (2008). Evaluation of a commercialized in situ hybridization assay for detecting human papillomavirus DNA in tissue specimens from patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *J Clin Microbiol*; 274–280.

Ho C-M, Cheng W-F, Chu T-Y, Chen C-A, Chuang M-H, Chang S-F *et al.* (2006). Human papillomaviral load changes in low-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Br J Cancer*; 95:1384-1389.

Hwang SJ and Shroyer KR. (2012). Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. *J Oncol*; doi:10.1155/2012/507286.

- Illades-Aguiar, Alarcón-Romero LDC, Antonio-Véjar V, Zamudio-Lopez N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, *et al.* (2010). “Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico” *Gynecologic Oncology*; 17: 291–296.
- Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH, Liaw KL and Barr E. (2007). Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women. *Infectious Agents and Cancer*; 2:15.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011). Global cancer statistics. *Ca Cancer J Clin*, 61:69-90.
- Kailash U, Soundararajan CC, Lakshmy R, Arora R, Vivekanandhan S and Das BC. (2006). Telomerase activity as an adjunct to high-risk human papillomavirus types 16 and 18 and cytology screening in cervical cancer. *B J Cancer*; 95:1250–1257.
- Kalof AN, Cooper K. (2006). p16INK4a immunoreexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol.*; 13:190-4.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, *et al.* (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*; 266:2011-5.
- Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, *et al.* (2001). Ki-67 immunorequantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol*; 193: 48–54.
- Kulmala A, Syrjanen S M, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, *et al.* (2006). Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*; 59:513-517.
- Kumar D and Verma M. (2006). Molecular markers of cervical squamous cell carcinoma. *J Gynecol Oncol*; 11: 41-60.
- Liu X, Dakic A, Chen R, *et al.* (2008). Cell-restricted immortalization by human papillomavirus correlates with telomerase activation and engagement of the hTERT promoter by Myc. *J Virol*; 82:11568-76.
- Lopez RMG, Medel FMO, Villalba MJD, Sanchez MV. (2012). Prevalence of human papillomaviruses in women from Mexico city. *Infect Dis Obstet Gynecol*; doi: 10.1155/2012/384758.
- Montag M, Blankenstein T, Shabani N, Brüning A and Mylonas I. (2011). Evaluation of two commercialised in situ hybridisation assays for detecting HPV-DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Gynecol Obstet*; 284:999-1005.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, *et al.* (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*; 78:11451-60.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose´ S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, *et al.* (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348: 518–27.

Muñoz N, Castellsague X, Berrington de González A, Gissmann L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24S3:1–10.

Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, *et al.* (2003). p16INK4a as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ smears. *J Clin Pathol*; 56:56-63.

Nam E J, Kim J W, Hong J W, Jang H S, Lee S Y, Jang S Y, *et al.* (2008). Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol*; 19:162-168.

Narisawa-Saito M and Kiyono T. (2007). Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*, 98:1505-1511.

Nowak JA. (2000). Telomerase, cervical cancer, and human papillomavirus. *Clin Lab Med*; 20:369-82.

Oh J-K, Ju Y-H, Franceschi S, Quint W and Shin H-R. (2008). Acquisition of new infection and clearance of type-specific human papillomavirus infections in female students in Busan, South Korea: a follow-up study. *BMC Infectious Diseases*; 8:13, doi:10.1186/1471-2334-8-13.

Orozco-Colin A, Carrillo-Garcia A, Mendez-Tenorio A, Ponce-de-Leon S, Mohar A, Maldonado-Rodriguez R, *et al.* (2010). Geographical variation in human papillomavirus prevalence in Mexican women with normal cytology. *Int J Infect Dis*, 14: e1082-e1087.

Peitsaro P, Johansson B and Syrjänen S. (2002). Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *J Clin Microbiol*; 40: 886-91.

Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D and Wheeler CM. (2007). A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis*; 195:1582-9.

Qi ZL, Huo X, Xu XJ, Zhang B, Du MG, Yang HW, *et al.* (2006). Relationship between HPV16/18 E6 and p53, p21WAF1, MDM2, Ki67 and cyclin D1 expression in esophageal squamous cell carcinoma: Comparative study by using tissue microarray technology. *Exp Oncol*; 28: 235-240.

Queiroz C, Correia T, Alves V, Villa L, Costa M, Travassos A, *et al.* (2006). p16INK4a expression as a potential marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol*; 202:77-83.

Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlee F *et al.* (2010). Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infect Dis*; 10: 1-12.

Raybould R, Fiander A and Hibbitts S. (2011). Human papillomavirus integration and its role in cervical malignant progression. *Open Clin Cancer J*, 5: 1-7.

Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, *et al.* (2008). Rapid clearance of HPV should lead to clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*; 100:513-7.

Sahebali S, Depuydt CE, Boulet GAV, Arbyn M, Moeneclaey LM, Vereecken AJ, *et al.* (2006). Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *Int J Cancer*; 118: 1254-1260.

Samama B, Plas-Roser S, Schaeffer C, Chateau D, Fabre M and Nelly Boehm. (2002). HPV DNA detection by in situ hybridization with catalyzed signal amplification on thin-layer cervical smears. *J Histochem Cytochem*; 50: 1417–1420.

Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D *et al.* (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: 3678-3685.

Schmeink CE, Melchers WJG, Siebers AG, Quint WGV, Massuger LFAG and Bekkers RLM. (2011). Human papillomavirus persistence in young unscreened women a prospective cohort study. *PLoS ONE*, 6:e27937. doi:10.1371/journal.pone.002793.

Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. Mexico, 2008. Available from URL: <http://sinais.salud.gob.mx/> [Last accessed: 2012 Nov 8].

Smith DL, Soria JC, Morat L, Yang Q, Sabatier L, Liu DD, *et al.* (2004). Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and Ki-67 are better predictors of survival than established clinical indicators in patients undergoing curative hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg Oncol*; 11:45-51.

Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, *et al.* (2007) “Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update,” *Int J Cancer*, 121: 621-632.

Stanley MA. (2009). Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*, 130: 266-276.

Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, Speich N, Schmitt C, Griefingholt H, *et al.* (2008). Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: Diagnostic and prognostic implications. *Oncol Rep*; 19:457-465.

Vega-Peña A, Illades-Aguiar B, Flores-Alfaro E, López-Bayghen E, Reyes-Maldonado E y Alarcón-Romero LDC. (2013). Correlation of Ki-67 and telomerase expression with in-situ hybridization for high risk Human Papillomavirus. *Arch Biol Sci*; 65:81-90.

Walts AE and Bose S. (2009). p16, Ki-67 and BD ProEX C immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplásica. *J Hum Path*; 40: 9957-964.

Wentzensen N, Schiffman M, Dunn S. T, Zuna R E, Walker J, Allen R A, *et al.* (2009). Grading the severity of cervical neoplasia based on combined histopathology, cytopathology, and HPV genotype distribution among 1700 women referred to colposcopy in Oklahoma. *Int J Cancer*, 15; 124(4): 964-969.

Woodman C, Collins S and Young L. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature*, 7:11-22.

Yu L, Wang L, Zhong J, and Chen S. (2010). Diagnostic value of p16INK4A, Ki-67, and human papillomavirus L1 capsid protein immunochemical staining on cell blocks from residual liquid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer Cytopathol*; 47-55, doi: 10.1002/cncy.20061.

Zheng PS, Iwasaka T, Yamasaki F, Ouchida M, Yokoyama M, Nakao Y, et al. (1994). Telomerase activity in gynecologic tumors. *Gynecol Oncol*; 64:171–175.

Zubillaga-Guerrero MI, Illades-Aguiar B, Leyva-Vazquez MA, Flores-Alfaro E, Castañeda-Saucedo E, and Muñoz-Valle JF et al. LDC: The integration of HR-HPV increased the expression of Cyclins A and E in cytologies with and without low-grade. *J Cytol* 2013; 30: 1-7.

ANEXOS

Artículo: Correlation between Ki-67 and telomerase expression with in situ hybridization for high-risk human papillomavirus

Durante la Maestría en Ciencias Biomédicas, se elaboro un artículo con los resultados de la tesis: “Expresión de Telomerasa, Ki-67 y el virus de papiloma humano oncogénico en Neoplasias intraepiteliales cervicales”. Una vez revisado y aceptado se publicó en la revista: **ARCHIVES OF BIOLOGICAL SCIENCES, BELGRADE.**

Descarga electrónica en: <http://archonline.bio.bg.ac.rs/>