



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN
MICROBIOLOGÍA**

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“EXPRESIÓN DE Ki-67, TOPOISOMERASA 2A/
MCM2 Y EL ESTADO FÍSICO DEL VPH-AR EN
LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES
CERVICALES.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

IDANYA RUBÍ SERAFÍN HIGUERA

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2010.

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

Bajo la dirección de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

La Tutoría de:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

La Asesoría de:

Dra. Berenice Íllades Aguíar

Dra. Esther López Bayghen

Dra. Amalia Vences Velázquez

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Durante el periodo en que se curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Idanya Rubí Serafín Higuera recibió la beca CONACYT.

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

Asimismo se agradece al Banco Santander Serfín por la beca otorgada de Movilidad Santader Universia, durante el periodo agosto a diciembre de 2010.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero le agradezco profundamente por confiar en mí y poner este proyecto en mis manos; por todo su tiempo y esfuerzo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Berenice Íllades Aguiar por sus valiosas aportaciones, por apoyo y sus consejos en momentos más difíciles.

A la Dra. Gloria Fernández Tilapa por todas las aportaciones a este trabajo y por el esfuerzo que realizó como tutora al orientarme en la correcta redacción, no solo de este trabajo.

A la Dra. Esther López-Bayghen Patiño por su disposición y sus valiosas aportaciones.

A la Dra. Amalia Vences Velázquez por sus valiosas aportaciones y su colaboración en la realización de este proyecto.

A la M. en C. Eugenia Flores Alfaro por su tiempo, su apoyo y su orientación en el desarrollo de este trabajo.

A la Bióloga Paola, por todo su trabajo y esfuerzo para tener todos nuestros papeles en orden. Gracias.

A todas ustedes por sus consejos, paciencia y opiniones que sirvieron para que me sienta satisfecha en mi participación dentro de este proyecto de investigación, y porque son un gran ejemplo para nosotras las mujeres. *Gracias !!!*

DEDICATORIAS

Dios, te doy gracias por este día. Sé que aún no he logrado todo lo que esperas de mí y si esa es la razón por la cual me bañas en el fresco rocío de otro amanecer. Me siento muy agradecida...

A mis padres Nicolás y Modesta por sus oraciones y por darme la estabilidad emocional, económica, sentimental; para poder llegar hasta este logro, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ustedes.

A Jorge por ser mi amigo y compañero en las pruebas tan complicadas que hemos vivido juntos.

A Daphne Alejandra y José Eduardo por hacerme tan feliz, recordarme cual es la meta que un día nos propusimos y porque nunca creí que esos dos pequeños seres tendrían tanto entusiasmo para sacar adelante a alguien. Gracias por ser mis hijos.

A mis hermanos Addiel y Emir por su apoyo sin condiciones y sus palabras de aliento en todos los momentos más difíciles de toda mi vida.

A mis compañeros y amigos por compartir muchos buenos y malos momentos en esta etapa académica, en especial a **Arianna**, por ser mi mejor amiga en el laboratorio y apoyarme, aún cuando el trabajo parecía interminable; a **Rossy y Omar** por brindarme su confianza.

A la sra. **Bertha, Lupita** y al sr. **Isidoro** por el apoyo recibido a mi familia.

EXPRESIÓN DE Ki-67, TOPOISOMERASA 2A / MCM2 Y EL ESTADO FÍSICO DEL VPH-AR EN LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES CERVICALES.

ÍNDICE.

	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	7
V. RESULTADOS	11
VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	20
VII. REFERENCIAS	25

I. RESUMEN.

Introducción. Existe una interacción entre las proteínas virales (E6 y E7) de los virus del papiloma de alto riesgo (VPH-AR) y los productos de los principales genes celulares involucrados en el control de ciclo celular, por lo que la expresión de las proteínas Ki-67 y TOP2A/MCM2 (de la fase S), podrían monitorear la actividad proliferativa, para establecer pronóstico más certero. **Objetivo.** Relacionar la expresión de las proteínas Ki-67, TOP2A/MCM2 y el estado físico del ADN del VPH-AR en lesiones escamosas intraepiteliales cervicales (LEI) en biopsias de mujeres guerrerenses. **Metodología.** Se realizó un estudio transversal comparativo en un total de 107 biopsias de tejido cervical cuyo diagnóstico fue de 29 de LEI de bajo grado (LEIBG), 34 de alto grado (LEIAG) y 44 biopsias de tejido cervical negativo a LEI. La expresión de las proteínas Ki-67 y TOP2A/MCM2 se analizó por inmunohistoquímica y la detección del estado físico del ADN del VPH-AR por hibridación *in situ* con amplificación con tiramida. **Resultados.** La expresión de Ki-67 en el 1/3 inferior del epitelio se asoció significativamente con la señal difusa a nivel nuclear o estado episomal (OR=18; $p<0.001$) y puntiforme o estado integrado (OR=548; $p<0.001$) del ADN del VPH-AR; la expresión en los 2/3 profundos del epitelio (OR=1.5; $p<0.001$) y en todo el espesor del epitelio (OR=187; $p<0.001$) se asociaron solo con el estado integrado. La expresión de TOP2A/MCM2 se asoció significativamente con la presencia del estado integrado del VPH-AR en 1/3 inferior (OR=2; $p<0.001$) y 2/3 del epitelio (OR=3; $p<0.001$). En el grupo de las LEIBG el patrón de expresión de TOP2A/MCM2 se relacionó con el estado integrado del ADN del VPH-AR ($p=0.01$). **Conclusión.** Existe una asociación significativa entre la expresión de Ki-67, TOP2A/MCM2 con el estado integrado en relación al grado de LEI, lo que permite evidenciar que estos biomarcadores podrían ayudar a establecer el diagnóstico y pronóstico de una LEI en biopsias cervicales.

Palabras claves: Antígeno nuclear Ki-67, TOP2A/MCM2, lesión escamosa intraepitelial cervical, estado físico del ADN del VPH-AR.

II. ABSTRACT.

Introduction. The interaction between viral proteins (E6 and E7) of papillomavirus high-risk (HR-HPV) and the products of the major cellular genes involved in cell cycle control, so that the expression of Ki-67 and TOP2A/MCM2 (S phase) proteins could monitor the proliferative activity, to establish more accurate prognosis.

Objective. Relate the expression of Ki-67, TOP2A/MCM2 proteins and the physical state of HR-HPV DNA in cervical squamous intraepithelial lesions (SIL) in biopsies of Guerrero women's.

Methodology. We performed a transverse comparative study and included 107 biopsies of cervical tissue biopsies whose diagnosis was 29 SIL low grade (LSIL), 34 high grade (HSIL) and 44 negative for SIL. We determined the protein expression of Ki-67 and TOP2A/MCM2 by immunohistochemistry and detection of physical status of virus DNA high-risk human papillomavirus (HR-HPV) by *in situ* hybridization with tyramide amplification.

Results. The state integrated HR-HPV was associated with increased expression of nuclear antigen Ki-67. The expression of Ki-67 in the lower 1/3 of the epithelium was significantly associated with the presence of diffuse signal (OR=18, $p < 0.001$) and punctate signal (OR= 548, $p < 0.001$) of HR-HPV DNA. The expression in the 2/3 depth of the epithelium (OR=1.5, $p < 0.001$) and throughout the thickness of the epithelium (OR = 187, $p < 0.001$) were associated only with the punctate signal. The TOP2A/MCM2 expression was significantly associated with the presence of HR-HPV punctate in lower 1/3 (OR=2, $p = < 0.001$) and 2 / 3 of the epithelium (OR=3, $p = < 0.001$). In the LSIL group pattern Top 2 A/MCM2 expression was related to the integrated state of HPV DNA-AR ($p=0.01$).

Conclusion. A significant association between expressions of Ki-67, TOP2A/MCM2 integrated with the state regarding the degree of LEI, allowing them to show that these biomarkers could help establish the diagnosis and prognosis of cervical biopsies LEI.

Keywords: nuclear antigen Ki-67, TOP2A/MCM2, cervical squamous intraepithelial lesion, physical status of virus DNA HR-HPV.

III. INTRODUCCIÓN

El carcinoma invasor del cérvix uterino (CaCU) es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer a nivel mundial y en países en vías de desarrollo es la primera causa de mortalidad femenina (López-Revilla *et al.*, 2008). En México en el 2009 la tasa de mortalidad fue de 14.1 muertes por cada 100 mil mujeres de 25 años o más (Ortíz Domínguez 2009). Zur Hausen, propuso y demostró que los virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) son los agentes infecciosos necesarios en la transformación neoplásica de la zona de transformación del cérvix uterino por lo que son una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo del carcinoma invasor (zur Hausen, 2002). La inducción de la inestabilidad cromosómica debida a la expresión de los oncogenes E6 y E7 de los VPH-AR, es el factor principal de la persistencia de estos virus y progresión de las lesiones cervicales al carcinoma invasor. La afinidad que presentan estas oncoproteínas con factores reguladores del ciclo celular, como p53, promueve su degradación y en consecuencia la pérdida del punto de control G1/S así como el arresto en G1 después de daño al ADN (zur Hausen, 2000). Se ha demostrado que las proteínas E6 o E7 de los VPH-AR, pero incrementan la frecuencia de integración del ADN en el genoma del hospedero como se ha observado en los casos de neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (NIC III) (zur Hausen, 2006; Feller *et al.*, 2009). Las mutaciones e integración del genoma viral en el cromosoma del hospedero, son factores esenciales para la inmortalización, transformación y carcinogénesis celular inducida por los VPH-AR (Narisawa-Saito y Kiyono, 2007; Burd, 2003). La integración usualmente resulta de una disrupción específica del gen viral E1 y/o E2. La proteína E2 regula negativamente la transcripción de los oncogenes E6 y E7, (Teissier, *et al.*, 2007) mediante la represión del promotor P97 (VPH-16) o P105 (VPH-18), este promotor está próximo a la caja TATA y es el encargado de la transcripción de las oncoproteínas (Rivera, *et al.*, 2006). Varios estudios han sugerido, que las lesiones premalignas que presenten integrado el genoma viral, tienen un riesgo alto para progresar a carcinomas invasivos (Vinokurova, *et al.*, 2008; De Marchi Triglia *et al.*, 2009). Diferentes pruebas se han usado para detectar el ADN del VPH en tejido cervical,

como PCR e Hibridación *in situ* (HIS) con amplificación con tiramida, este último permite evidenciar el estado físico del ADN del VPH en la célula infectada, con la ventaja de preservar la arquitectura celular y evidenciar *in situ* el ADN viral. Con este método, se ha encontrado que el patrón de expresión difuso a nivel nuclear, se ha asociado con el estado episomal y el patrón de expresión puntiforme con el estado integrado de los VPH-AR, por lo que se considera que el patrón de señal puede ser un marcador para predecir la progresión de las lesiones precancerosas (Guo, *et al.*, 2008; Evans and Cooper, 2004). La integración del VPH-AR se ha encontrado asociada con lesiones de alto grado y carcinoma invasivo y ha sido determinado por HIS como una señal puntiforme a nivel nuclear (Kalof *et al.*, 2005; De Marchi triglia *et al.*, 2009). La histopatología es el método de elección para confirmar el diagnóstico de lesión a través de la biopsia cervical, sin embargo, al igual que la citología están sujetas a variación e interpretación subjetiva de las muestras (Pinto *et al.*, 2008; Zuna *et al.*, 2001). La inmunohistoquímica ha revolucionado la histopatología, ya que con el uso de anticuerpos monoclonales se ha logrado el estudio detallado de diversos antígenos, la identificación de proteínas tisulares, la detección de complejos inmunitarios, la localización de antígenos virales en células infectadas y de antígenos tumorales en diversas neoplasias. Se han evaluado diferentes proteínas como Ki-67 que son de gran utilidad en el diagnóstico y como factores pronósticos y predictivos en diversos tumores (Buys, *et al.*, 2007). El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear no histónica de 395 a 345 kD, ensamblada por cadenas de polipéptidos (Gerdes *et al.*, 1991), codificada por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25) y expresada en las células durante las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, M), pero ausente en las células en estado de reposo o quiescentes (G0) (Al-saleh *et al.*, 1995). La localización del antígeno Ki-67 dentro del núcleo parece ser ciclo dependiente. Durante la interfase se localiza en la región perinucleolar, aunque existe un fino granulado fuera del nucléolo. En la profase, durante la mitosis, se localiza en la superficie de la cromatina condensada y durante la metafase en la superficie de los cromosomas, formando una especie de retícula. Tras la división celular y antes de que se forme el nuevo nucléolo se localiza en el

nucleoplasma, desapareciendo rápidamente. Tras retirar el ADN y las histonas de la célula por fraccionamiento *in situ*, es posible detectar Ki-67, ello sugiere que el antígeno está asociado a los filamentos intermedios de la matriz nuclear (Moyano Calvo *et al.*, 2000). En la actualidad, la medición de la tasa de proliferación puede ser evidenciada por la expresión del antígeno nuclear Ki-67, cuya expresión permite evaluar el índice de proliferación tumoral y correlacionarlo con variables clínico-patológicas. (Roa *et al.*, 2003). La expresión de este antígeno está estrictamente asociado con proliferación celular y progresión del ciclo celular, por lo que es considerado un marcador en la evaluación del grado de malignidad, la recurrencia y pronóstico del carcinoma hepatocelular (Qin and Tang, 2002), del carcinoma de células escamosas de esófago (Youssef *et al.*, 1995), del CaCU entre otros (Brown and Gatter, 2002; Agoff *et al.*, 2003; Ancuța *et al.*, 2009)

Recientemente, se ha desarrollado PROEX™ C, nombre comercial de un cóctel de anticuerpos recombinantes que detectan las proteínas topoisomerasa 2A (alfa) y la proteína de mantenimiento del minicromosoma 2, las cuales se han encontrado sobre-expresadas en el CaCU (Kelly *et al.* 2006; Badr *et al.*, 2008; Siddiqui *et al.*, 2008; Shroyer *et al.*, 2006) y ha mostrado alta sensibilidad y especificidad en distinguir LEIAG de células de metaplasia escamosa endocervical (Sanati *et al.*, 2009). Beccati *et al.*, 2008) Estudios realizados por Conesa-Zamora *et al.*, 2009a reportaron una asociación significativa entre la expresión de Top 2 A/MCM2 los casos de LEI con infección por VPH-16, lo que podría ser un complemento útil para la identificación de LEIBG y LEIAG en secciones histológicas cuando se expresa en más del tercio inferior del epitelio. La ADN topoisomerasa 2A está constituida por un peso molecular de 170 KDa (mc Clendon *et al.*, 2005), su gen se localiza en el cromosoma 17 17q21-22 (Durbecq *et al.*, 2004). Es una enzima nuclear que participa en la replicación, transcripción, recombinación, reparación y condensación cromosomal al controlar el estado topológico del ADN (Gruber *et al.*, 2006), esta enzima puede ser sobrerregulada durante la proliferación celular y es fuertemente asociada con los cromosomas en la mitosis, también en la segregación de los cromosomas (mc Clendon *et al.*, 2005). No es detectable en células en fase G0, pero su actividad incrementa durante la fase S, con picos en

G2-M y entonces desciende. Es nucleolar y también se encuentra en el nucleoplasma (Hellemans *et al.*, 1995); mientras que, MCM2 es uno de los seis miembros de la familia del mantenimiento del minicromosoma (MCM), muestra un motivo c-terminal conservado que tiene homología con otros hexámeros ADN helicasa y contiene un dominio ATPasa. El dominio c-terminal es indispensable para la actividad helicasa y conduce el movimiento a lo largo del ADN en dirección 3' a 5' (Nosedá and Karsan, 2006). Es abundante en todo el ciclo celular en el que el ADN genómico debe ser multiplicado solo una vez dentro del período definido como fase S (Tan *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2007).

La progresión del NIC hacia el cáncer invasivo es objeto de controversias, desconociéndose con precisión cuales lesiones regresarán espontáneamente y cuales progresarán hasta convertirse en neoplasias malignas, sean invasivas o no. La falta de reproducibilidad intra e interobservador en el diagnóstico histopatológico de la neoplasia intraepitelial cervical han llevado a investigar marcadores objetivos para la identificación de células displásicas (Kalof and Cooper 2007; Shi *et al.*, 2007). Actualmente se están validando una serie de biomarcadores tumorales que permitan identificar aquellas pacientes con infección por el VPH-AR y cuya presencia provoque alteraciones celulares que evolucionen al carcinoma invasor, por lo que en años recientes se ha sugerido, la evaluación de proteínas como Ki-67 y TOP2A/MCM2 que se encuentran sobre-expresadas en LEIAG y el carcinoma invasor, como consecuencia del efecto de la oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR (Beccati *et al.*, 2008; Halloush *et al.*, 2008; Badr *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2007). El uso del reactivo ProExTMC (utilizado para la detección de TOP2A/MCM2) ha sido estudiado en muestras de citologías de base líquida como en cortes histológicos sin embargo, aún es limitada la información de la expresión de estas proteínas en ambos tipos de muestras y su relación con la integración del ADN del VPH-AR en mujeres mexicanas, por lo que el propósito de este trabajo fue relacionar la expresión de las proteínas Ki-67, Topoisomerasa 2A/MCM2 y el estado físico del ADN del VPH-AR en lesiones escamosas intraepiteliales cervicales en biopsias de mujeres guerrerenses. Los resultados contribuirán a mejorar la evaluación diagnóstica y pronóstica de las lesiones precancerosas del

cuello uterino así como detectar las lesiones más agresivas que tengan el potencial de progresar a un carcinoma invasor.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

En el período comprendido de julio del 2009 a enero del 2010, se realizó un estudio observacional de tipo transversal comparativo en 107 biopsias incluidas en parafina de mujeres que acudieron al Instituto Estatal de Cancerología con diagnóstico histológico de diferentes grados de lesión escamosa intraepitelial sin tratamiento y un grupo de mujeres sin LEI en tejidos provenientes de piezas quirúrgicas de cérvix extraídos por miomas. Se eliminaron fragmentos de tejidos incompletos, mal etiquetados, procesamiento histológico inadecuado y de muestra insuficiente.

De cada una de las biopsias, se obtuvieron 4 cortes seriados de 3 micras de espesor con un micrótopo rotario LEICA RM 2125RT y se colocaron en laminillas silanizadas (solución de amino-propyl-tri-ethoxy-silano- Marca Dako).

Para la clasificación de las lesiones precancerosas del cérvix se utilizó la clasificación de Bethesda incluida en la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvicouterino y se dio equivalencia con la clasificación de NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) de Richart 1990. El diagnóstico histopatológico estuvo a cargo del patólogo del Instituto Estatal de Cancerología.

Método inmunohistoquímico para la detección de la expresión de las proteínas Ki-67 y TOP2A /MCM2

Para la expresión y localización de la proteína Ki-67 se utilizó el anticuerpo monoclonal MIB1 (Dako, Carpintería CA, USA) y para Topoisomerasa 2A y MCM2, ProEx™ C (Tripath Imaging, Burlington, NC) que incluye anticuerpos monoclonales recombinantes con las clonas MCM2 26H6.19, MCM2 27C5.6,

TOP2A SWT3D1. El sistema de detección inmunohistoquímico utilizado fue el ImmunoDetector HRP/DAB (BioSB, Inc, Santa Bárbara, CA, EUA).

Los cortes histológicos de 3 μ m, se desparafinaron colocándolos previamente en un horno a 60 °C durante 30 min y se metieron en xilol por 10 min. Después de la desparafinación, los cortes se sometieron a recuperación antigénica (ImmunoDNA Retriever con citratos para Ki-67; BioSB, Inc, Santa Bárbara, CA, EUA; y para Pro ExTM C EDTA Decloaker, 5X Bio Care Medical Walnut Creek, CA), introduciéndose en una olla de presión (PASCAL-DaKo) a presión de 120°C durante 5 minutos para Ki-67 y 40 segundos para TOP2A/MCM2 . Posteriormente se adicionó el anticuerpo primario en una dilución de 1:50 para Ki-67 (MIB-1 Dako, Carpinteria CA, EUA) y TOP2A/MCM2 (Pro ExTM C Tripath Imaging, Burlington, NC); se incubó a 37° C durante 30 min y 3 respectivamente. Se adicionó el anti-anticuerpo acoplado a biotina y se incubó a 37° C durante 15 y 40 minutos, se agregó la estreptavidina peroxidasa, incubando a 37° C durante 15 y 40 minutos, posteriormente se agregó la diaminobencidina, durante 30 s. Por último se hizo una contratinción con Hematoxilina de Mayer (Merck), y se montaron con Entellan (MERCK), para su observación al microscopio.

Para la estandarización y validación en cada corrimiento del método inmunohistoquímico, se utilizaron las siguientes condiciones: como control positivo para Ki-67 un caso de cáncer de mama, y para TOP2A/ MCM2 se utilizó un corte histológico conocido de carcinoma de células escamosas de cérvix uterino que por PCR fue VPH tipo 16 que previamente se estandarizó. Como control negativo para ambos se utilizarán los mismos cortes a los cuales no se les agregó el anticuerpo primario.

La evaluación de Ki-67 y TOP2A/MCM2 en los cortes histológicos incluyó la distribución del marcaje positivo de la reacción en función de la capa del tejido epitelial y tipo celular (células basales, células parabasales, primer tercio profundo, dos tercios profundos o en todo el espesor del epitelio dependiendo del caso a estudiar) y la reacción se consideró positiva, cuando las células presentaron una coloración marrón a nivel nuclear. La expresión de las proteínas Ki-67 y

TOP2A/MCM2 se evaluó en función del espesor del epitelio de acuerdo a los criterios de evaluación de Sánchez-Rosales et al., 2004; Conesa-Zamora et al., 2009a como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios de evaluación de la expresión de las proteínas Ki-67 y TOP2A/MCM2 en el espesor del epitelio cervical.

Patrón de expresión	Interpretación
0	La inmunotinción se encontró solamente en algunas células basales profundas o parabasales del cérvix.
1+	Inmnomarcaje en 1/3 profundo del epitelio.
2+	Inmunomarcaje en 2/3 profundos del epitelio.
3+	Inmunomarcaje en observado en todo el espesor del epitelio escamoso cervical, incluyendo las células superficiales.

Método de hibridación *in situ* con amplificación con tiramida

La detección del genoma viral y el estado físico del ADN del VPH-AR por hibridación *in situ* (HIS), se realizó con el sistema de amplificación de señal de tiramida GenPoint de DaKo Cytomation, según el procedimiento propuesto por DAKO (Carpinteria, CA, USA) ajustados en los tiempos que se indican.

Los cortes histológicos se montaron en laminilla silanizadas y se sometieron a digestión enzimática colocándolos en proteinasa K por 1.5 min a 37° C, se lavaron con 2 cambios de agua destilada por 5 min cada uno. Posteriormente se aplicó una gota de reactivo prueba (DNA viral biotilado) que contiene pares de bases homólogos para 13 genotipos de VPH-AR que incluye los VPH tipo16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Se cubrieron con un cubreobjetos y se colocaron por 10 min a 95° C a desnaturalizar y 20 h a 37° C en condiciones de humedad para la hibridación, en un hibridizador (110v, Dako; No.cat.S245030), se colocaron las laminillas en la solución astringente (dilución 1:50) a 55° C durante 20 min. Se cubrieron las laminillas con el anticuerpo primario estreptavidina

peroxidasa (dilución 1:50), durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó la biotil tiramida durante 20 min y después se cubrió con el anticuerpo secundario estreptavidina durante 20 min. Finalmente la laminilla se cubrió con el cromógeno diaminobencidina (DAB), y se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer (MERCK) por un minuto y se montaron en resina entellan.

Para la estandarización y validación en cada corrimiento del método de HIS, se utilizaron las siguientes condiciones: como control positivo, un caso de carcinoma de células escamosas del cérvix uterino con VPH-16 que presentó la versión puntiforme del virus (Patrón integrado). Como control negativo se utilizó el mismo corte al cual se le omitió la sonda en la hibridización.

Los resultados se reportaron según Kalof *et al.*, 2005. Como sigue:

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

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

Análisis estadístico

Para la comparación de las frecuencias se utilizó la prueba exacta de Fisher. Se evaluaron modelos de regresión logística multinomial para determinar la relación de la expresión de Ki-67, TOP2A/MCM2 con el estado físico del DNA del VPH-AR las lesiones cervicales. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. El análisis estadístico fue realizado en el software STATA v.9.2.

V. RESULTADOS

Diagnóstico histológico y la edad

En este estudio se incluyeron 107 biopsias de tejido cervical incluidas en bloque de parafina de mujeres que acudieron al Instituto Estatal de Cancerología; 29 casos fueron de LEIBG y 34 de LEIAG, además de 44 biopsias de tejido cervical que fueron negativas a LEI y que fueron procedentes de piezas quirúrgicas de miomas de mujeres con leiomiomatosis, que sirvieron como grupo control.

El intervalo de edad de las mujeres incluidas fue de 20 a 59 años, con una media de 34.14 años (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de casos por diagnóstico histopatológico y edad de mujeres guerrerenses que acudieron al Instituto Estatal de Cancerología.

Grupos de edad	Diagnóstico histopatológico		
	Negativo a LEI n (%)	LEIBG n (%)	LEIAG n (%)
20-30 años	15 (34.09)	10(34.48)	13 (38.24)
31-40 años	20 (45.45)	18 (62.07)	12 (35.29)
41-50 años	9 (20.45)	1 (3.45)	6 (17.65)
51-60 años	0	0	3 (8.82)
Total	44 (100)	29 (100)	34 (100)

LEI Lesión escamosa intraepitelial

LEIBG Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado

LEIAG Lesión escamosa intraepitelial de alto grado

Expresión del antígeno nuclear Ki-67

A expresión de Ki-67 fue analizada mediante inmunohistoquímica; se observó una localización nuclear en color café para este antígeno. El 100% de las biopsias fueron presentaron esta tinción y fueron consideradas (Figura 1). En el cuadro 3, se muestran los datos obtenidos para la localización de Ki-67 en los grupos estudiados. En el epitelio negativo a LEI, la localización de Ki-67 se presentó en algunas células basales y parabasales al igual que en el tejido epitelial sin LEI adyacente a los casos de LEIBG y LEIAG. La expresión de Ki-67 en los casos de LEIAG se observó en el 82% en todo el espesor del epitelio y en las LEIBG, el 66% expresaron Ki-67, en el primer tercio profundo del epitelio (Figura 1 a-d) siendo estas diferencias significativas. El grado de LEI se encontró relacionado con el aumento de la expresión de Ki-67 en el espesor del epitelio ($p < 0.001$).

Cuadro 3. Expresión de Ki-67 en relación al diagnóstico histopatológico.

Localización de la expresión de Ki-67 en el epitelio.	Diagnóstico histopatológico				
	Negativo a lesión n (%)	LEIBG n (%)	Valor de <i>p</i>	LEIAG n (%)	Valor de <i>p</i>
Células basales y parabasales	44 (100)	6 (20.69)	<0.001	0	<0.001
1/3 del epitelio	0	19 (65.52)		5 (14.71)	
2/3 del epitelio	0	3 (10.34)		1 (2.94)	
Todo el espesor del epitelio	0	1 (3.45)		28 (82.35)	
P de tendencia					<0.001
Prueba exacta de Fisher					
LEIBG Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado					
LEIAG Lesión escamosa intraepitelial de alto grado					

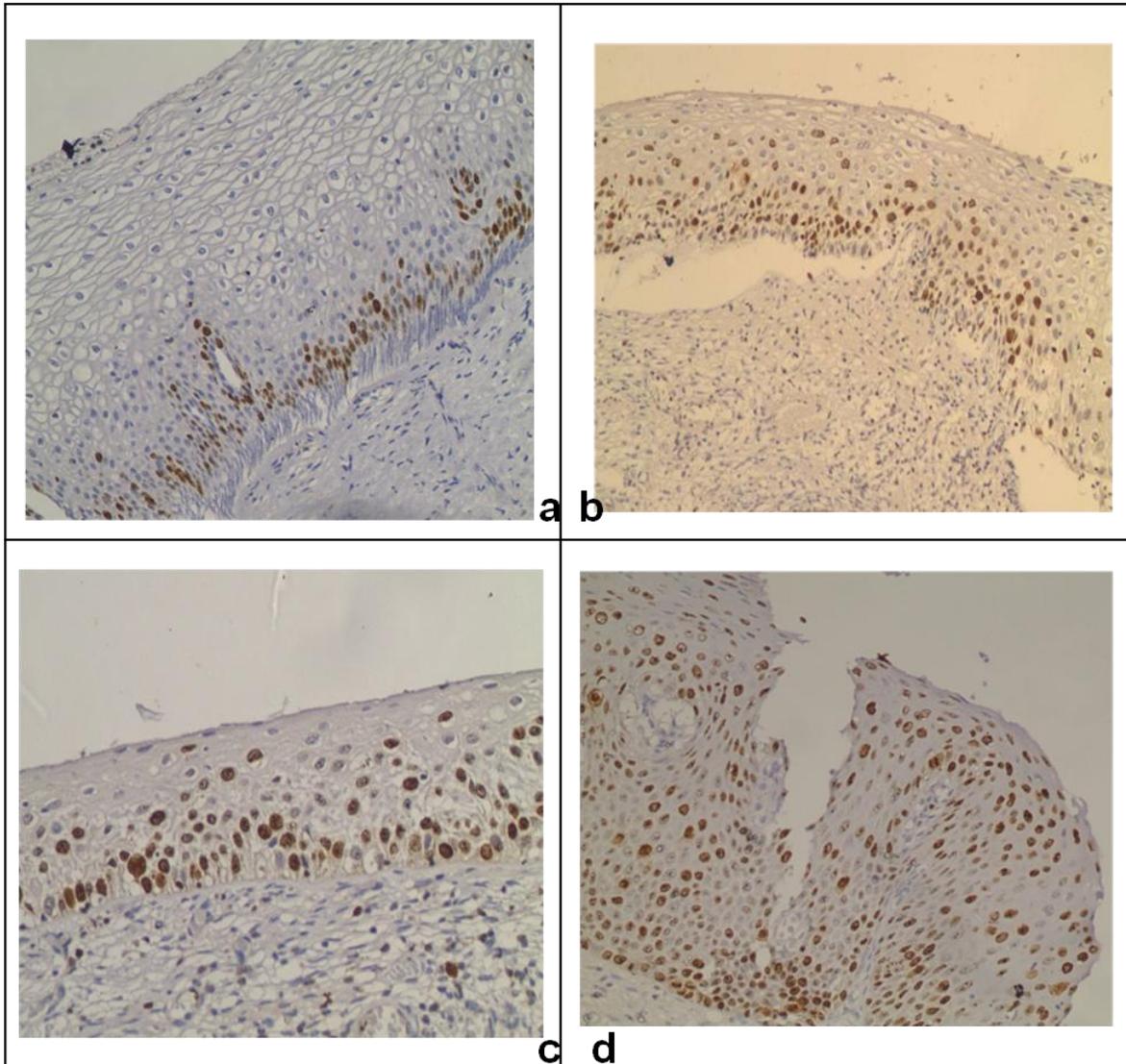


Figura 1. Expresión de Ki-67 en relación al grado de LEI. (a) Expresión de Ki-67 en algunas células parabasales y basales profundas en el tejido negativo a LEI. 20x. (b) Expresión de Ki-67 en el primer tercio profundo del epitelio en LEIBG (NIC I).10x. (c) Los 2/3 del epitelio en LEIAG (NIC II), expresaron Ki-67 20x. (d) Todo el espesor del epitelio en LEIAG, expresó Ki-67 20x. Método inmunohistoquímico: Estreptavidina peroxidasa.

Expresión de las proteínas Topoisomerasa 2A/MCM2

La expresión de las proteínas TOP2A/MCM2 se analizó por inmunohistoquímica y se detectó a nivel nuclear en un color café (Figura 2). En las biopsias evaluadas mediante ProEx™ C (cuadro 4), se observó que el 70% de los tejidos negativos a LEI expresaron TOP2A/MCM2 en algunas células parabasales y basales profundas confinadas en el primer tercio profundo del epitelio, en cambio, en los casos de LEIBG estas proteínas se expresaron principalmente en el primer tercio profundo del epitelio en comparación con las LEIAG, en las cuales la expresión de TOP2A/MCM2, se presentó en algunos casos desde los dos tercios profundo e intermedio hasta todo el espesor del epitelio en otros. Cabe mencionar que en el tejido aledaño normal a los casos de LEI, solo existió expresión en escasas células basales y parabasales (Figura 2a-e). Todas estas diferencias fueron significativas. El aumento en el grado de LEI, se relacionó al aumento en la expresión de topoisomerasa 2A/MCM2 ($p < 0.001$).

Cuadro 4. Expresión de la proteínas TOP2A/MCM2 en relación al diagnóstico histopatológico.

Localización de la expresión de TOP2A/ MCM2 en el epitelio	Diagnóstico histopatológico				
	Negativo a lesión n (%)	LEIBG n (%)	Valor de p	LEIAG n (%)	Valor de p
Células basales y parabasales	31 (70.45)	7 (24.14)	<0.001	3 (8.82)	<0.001
1/3 del epitelio	8 (18.18)	13 (44.83)		8 (23.53)	
2/3 del epitelio	5 (11.36)	8 (27.59)		13 (38.24)	
Todo el espesor del epitelio	0	1 (3.45)		10 (29.41)	
P de tendencia					
Prueba exacta de Fisher TOP2A Topoisomerasa 2 alfa MCM2 Proteína del mantenimiento del minicromosoma 2 LEIBG Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado LEIAG Lesion escamosa intraepitelial de alto grado					

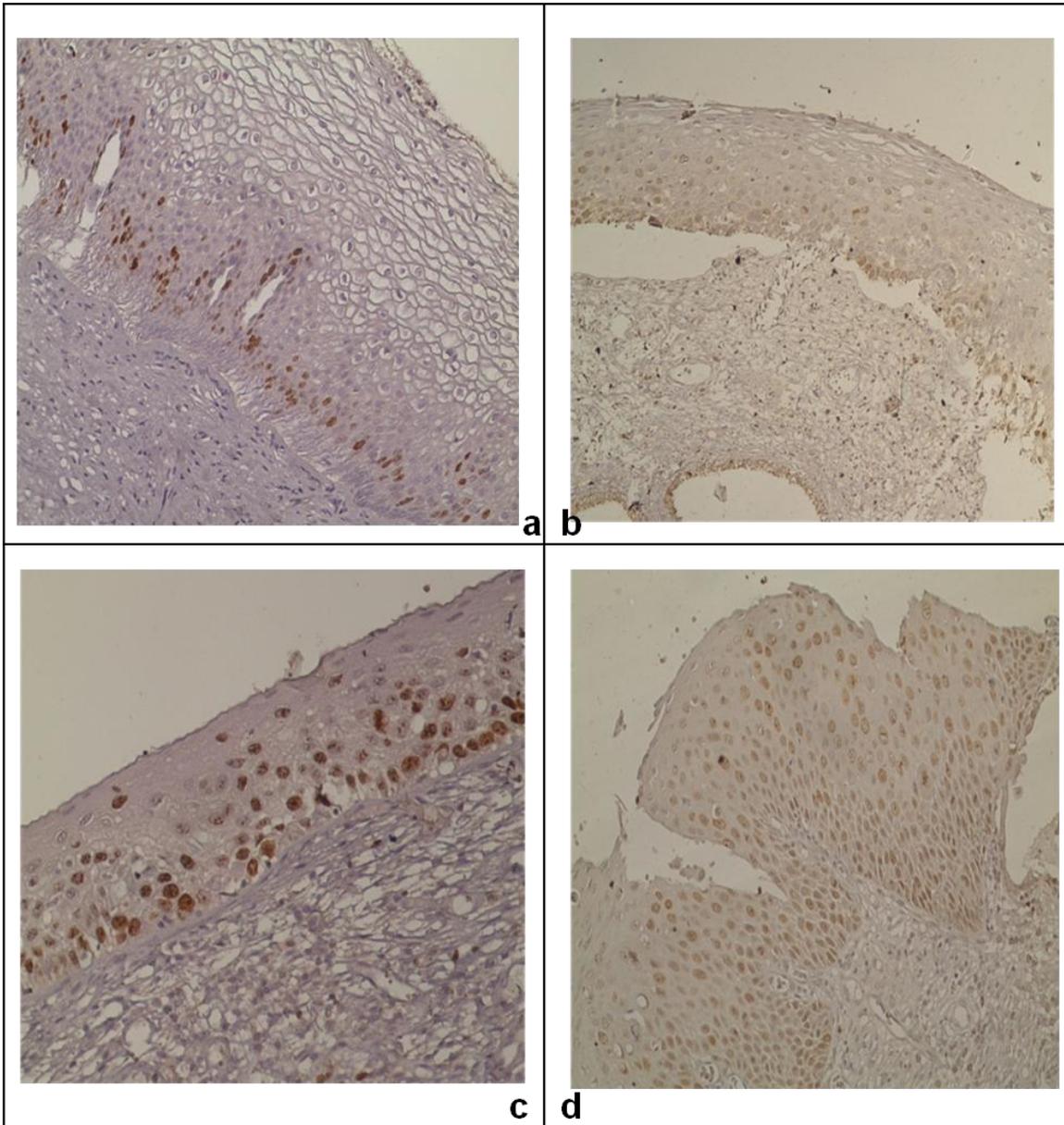


Figura 2. Expresión de TOP2A/MCM2 en LEI. (a) Expresión de TOP2A/MCM2 en células parabasales y basales profundas en tejido negativo a LEI 20x. (b) Expresión en el primer tercio profundo del epitelio en LEIBG (NIC I) 10x. (c) Expresión de las proteínas en 2/3 del epitelio en LEIAG (NIC II) 20x. (d) Expresión de las proteínas en la totalidad del epitelio en LEIAG. 20x. Método inmunohistoquímico: Estreptavidina peroxidasa.

Detección del ADN del VPH-AR por Hibridación *in situ*

Para la detección del VPH-AR los cortes se hibridaron con una mezcla de sondas que pueden detectar 13 genotipos de VPH-AR (Figura 3), esto incluye los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Las muestras positivas presentaron una coloración color marrón a nivel nuclear con patrón de expresión difuso (patrón episomal) y puntiforme (patrón integrado) (Figura 3a y b). En 70.59% de los casos de LEIAG, y en el 41.38 % de las LEIBG se encontró el patrón integrado (versión puntiforme), mientras que, el 100% de los tejidos sin LEI, no se encontró la presencia del ADN del VPH-AR por lo que fueron considerados negativos a este marcador viral. Las diferencias son significativas entre estos grupos (Cuadro 5). Se encontró asociación entre el incremento del grado de LEI con la presencia del ADN integrado del VPH-AR ($p < 0.001$).

Cuadro 5. Presencia del ADN del VPH-AR en relación con el diagnóstico histopatológico en tejidos cervicales.

ADN del VPH-AR	Diagnóstico Histopatológico				Valor de p
	Negativo a lesión n (%)	LEIBG n (%)	Valor de p	LEIAG n (%)	
Negativa	44 (100)	3 (10.34)	<0.001	5 (14.71)	<0.001
Positiva difusa (estado episomal)	0	14 (48.28)		5 (14.71)	
Positiva puntiforme (estado integrado)	0	12 (41.38)		24 (70.59)	
Total	44 (100)	29 (100)		34(100)	

Prueba exacta de Fisher
P de tendencia <0.001
LEIBG Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
LEIAG Lesión escamosa intraepitelial de alto grado

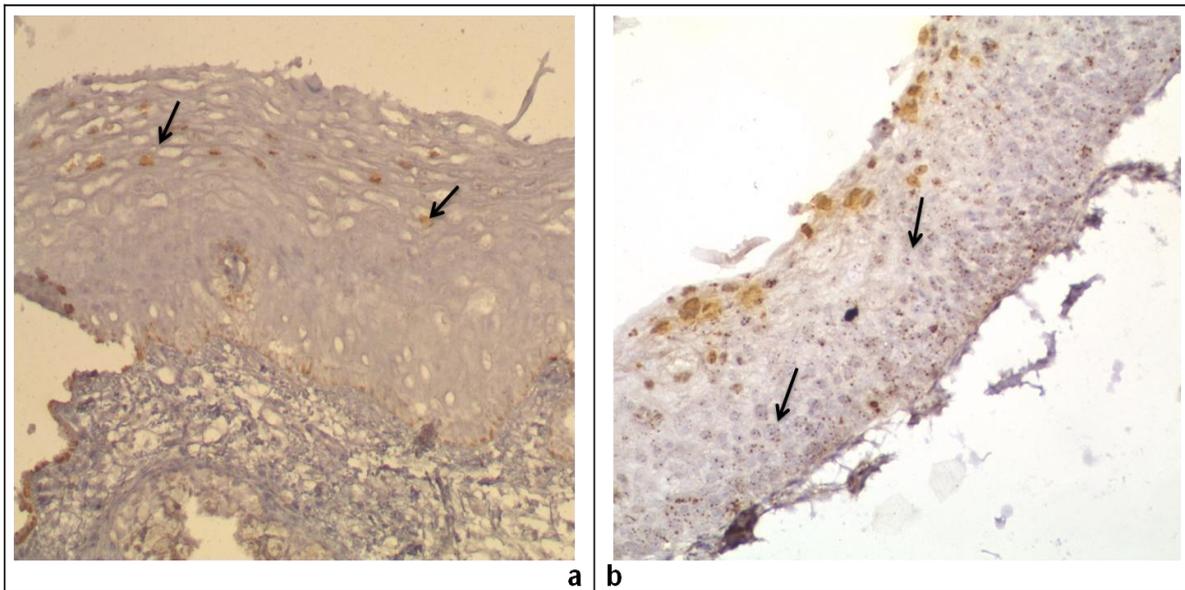


Figura 3. Presencia del ADN del VPH-AR en tejido cervical. (a) Señal difusa (estado episomal) en células superficiales (coilocitos) del epitelio cervical en una LEIBG. (b) Señal puntiforme (estado integrado) en núcleos de más de los 2/3 del epitelio el espesor del epitelio (flechas) y estado episomal en capa superficial de la LEIAG (NIC II). Técnica Hibridación *in situ* con amplificación con tiramida. 20 x.

Asociación de la expresión de Ki-67, TOP2A/MCM2 con el VPH-AR

La expresión de Ki-67 en el primer tercio profundo del epitelio se asoció significativamente con la presencia del estado físico del ADN del VPH-AR, puntiforme (OR=548; $p<0.001$) y difusa (OR=18; $p<0.001$). La expresión de Ki-67 en los dos tercios profundos del epitelio (OR=1.5; $p<0.001$) y en todo el espesor del epitelio (OR=187; $p<0.001$) se asociaron con la señal puntiforme.

Con respecto a la expresión de TOP2A/MCM2 el primer tercio profundo (OR=2; $p<0.001$) y los dos tercios del epitelio (OR=3; $p<0.001$) se asociaron significativamente con la versión integrada que corresponde al patrón puntiforme del VPH-AR (Cuadro 6).

Cuadro 6. Asociación de la expresión de Ki-67 y TOP2A/MCM2 con el estado físico del VPH-HR en tejido cervical.

Localización en el epitelio	VPH-AR						
	Negativo	Difuso	OR (IC al	Valor de p	Puntiforme	OR (IC al	Valor de p
	n (%)	n (%)	95%)		n (%)	95%)	
Ki-67							
Negativo	46 (88.46)	3 (15.79)	1.0*		1 (2.78)	1.0*	
1/3 del epitelio	1 (1.91)	12 (63.16)	181 (17-1907)	<0.001	11 (30.56)	548 (30-98.86)	<0.001
2/3 del epitelio	0	0	sd		4 (11.11)	1.5 (9-∞)	<0.001
Totalidad del epitelio	5 (9.62)	4 (21.05)	12 (2-71)	0.005	20 (55.56)	187(19-1770)	<0.001
TOP2A/MCM2							
bpb+	34 (65.38)	7 (36.84)	1.0*		0	1.0*	
1/3 del epitelio	9 (17.31)	7 (36.84)	4 (1-14)	0.04	13 (36.11)	2 (4-∞)	<0.001
2/3 del epitelio	6 (11.54)	4 (21.05)	3 (0.73-15)	0.118	16 (44.44)	3 (6-∞)	<0.001
Totalidad del epitelio	3 (5.77)	1 (5.26)	1.68 (0.15-18)	0.42	7 (19.44)	di	

Modelo de regresión multinomial ajustado por edad.

IC Intervalo de confianza. * Categoría de referencia. **sd** sin datos. **di** datos insuficientes. **LEIBG** lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. **LEIAG** lesión escamosa intraepitelial de alto grado. **TOP2A** Topoisomerasa 2 alfa. **MCM2** proteína del mantenimiento del minicromosoma 2.

Relación de la expresión de Ki-67 y TOP2A/MCM2 con el estado físico del VPH-AR en LEI

Se analizó la existencia de alguna relación entre el patrón de expresión de Ki-67, TOP2A/MCM 2 y el estado físico el estado físico del ADN del VPH-AR en cada grupo de LEI. Existe una relación significativa entre el aumento de expresión de TOP2A/MCM2 y la integración del ADN del VPH-AR en las LEIBG. Dentro del grupo de las LEIAG no se encontró relación de la expresión de los biomarcadores y el estado integrado del VPH-AR.

Cuadro 7. Relación de la expresión de las proteínas Ki-67, TOP2A/MCM2 con el ADN del VPH-AR y el grado de LEI en tejido cervical.

		Negativo a LEI	LEIBG				LEIAG			
ADN del VPH-AR		Negativo n (%)	Negativo n (%)	Difuso n (%)	Puntiforme n (%)	Valor de p	Negativo n (%)	Difuso n (%)	Puntiforme n (%)	Valor de p
Localización en el epitelio										
Expresión de Ki-67										
Negativo		44 (100)	2 (67)	3 (21)	1 (8)	0.08	0	0	0	1.0
1/3 del epitelio		0	1 (33)	11 (79)	7 (58)		0	1 (20)	4 (17)	
2/3 del epitelio		0	0	0	3 (25)		0	0	1 (4)	
Totalidad del epitelio		0	0	0	1 (8)		5 (100)	4 (80)	19 (79)	
Expresión de TOP2A/ MCM2										
bpb+		31 (70.4)	2 (67)	5 (36)	0	0.01	1 (20)	2 (40)	0	0.105
1+		8 (11.3)	0	6 (43)	7 (58)		1 (20)	1 (20)	6 (25)	
2+		5 (18.1)	0	3 (21)	5 (42)		1 (20)	1 (20)	11 (46)	
3+		0	1 (33)	0	0		2 (40)	1 (20)	7 (29)	

Prueba exacta de Fisher

LEIBG lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. LEIAG lesión escamosa intraepitelial de alto grado. TOP2A topoisomerasa 2 alfa.

MCM2 Proteína del mantenimiento del minicromosoma 2.

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Actualmente se reconoce que el VPH-AR es un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo del carcinoma invasor del cérvix uterino (zur Hausen 2000). La aplicación inconsistente de criterios morfológicos y la existencia de cambios que mimetizan estas lesiones, resultan en una amplia variabilidad intra e interobservador en el diagnóstico histopatológico, esto hace muy importante la búsqueda de biomarcadores celulares y virales que puedan evidenciar las alteraciones del ciclo celular en presencia de los VPH-AR (Keating *et al.*, 2001). En este estudio se encontró una relación entre el patrón de expresión de Ki-67 y el grado de lesión histológica estudiado, se registró una concordancia entre las características morfológicas como discariosis, cariomegalia y la ausencia de la diferenciación celular. Cerca del 63% de los casos de LEIBG, mostraron expresión en la totalidad de las células del primer tercio profundo del epitelio, relacionándose con el diagnóstico histopatológico. La importancia de identificar estas células radica en que el 57% de NIC I, mostraron regresión en mujeres americanas, no así cuando se sobre-expresa Ki-67, debido a que después de un corto tiempo, esta proliferación y maduración anormal ser podría extender a las capas intermedia y superficial, tal como se encontró en el 85% de los casos de LEIAG, esto según el estudio de Baak *et al.*, 2006 (Baak *et al.*, 2006; Boone *et al.*, 1992; Sánchez-Rosales *et al.*, 2004). La sobreexpresión de Ki-67 lo largo del epitelio, permite identificar fácilmente a las células anormales. Además se considera que la evaluación de la expresión de este antígeno en epitelio infectado por el VPH-AR, podría predecir la progresión de las lesiones precursoras del cérvix uterino, lo que puede deberse a que las células displásicas se pueden reconocer por su persistencia en el ciclo celular en comparación con las células epiteliales normales que salen del ciclo celular durante la maduración y diferenciación celular (Roa, 2003). En el caso de las 44 muestras de tejido que no presentaron LEI desde el punto de vista histológico (grupo control), la expresión de Ki-67, sólo se presentó en algunas células parabasales y basales profundas de la capa profunda del epitelio escamoso normal, reflejando que esta característica puede atribuirse a aquellas células que tuvieron la capacidad de proliferar en la división mitótica a

diferencia de aquellas células hijas que no mostraron expresión debido a que entran en un proceso de diferenciación en el cual poco a poco van ascendiendo a capas de células de la superficie morfológica y funcionalmente distintas a las que se quedan para mantener la integridad de la capa basal (Feller *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que el 90% de las LEIBG (Cuadro 4) fueron positivas a la sonda de VPH-AR por HIS, lo que pone de manifiesto la actividad proliferativa de estos virus. De forma similar al trabajo publicado por Anju and Madhu, 2008, en este estudio, encontramos un caso de LEIBG con una alta actividad proliferativa (mayor que el diagnóstico histológico de esta lesión) y 3 casos más LEIBG, que presentaron la expresión de Ki-67 hasta la capa intermedia del epitelio escamoso, es decir abarcando desde el primer tercio profunda hasta el intermedio, lo que indica que puede ser un biomarcador sensible de progresión de estas lesiones tempranas del cérvix uterino (Kruse *et al.*, 2001). Además, los 4 casos antes mencionados, presentaron integración del genoma de uno o más de los 13 genotipos del VPH-AR por HIS, lo que justifica la expresión de la proteínas más allá de la capa profunda del epitelio (Cuadro 7).

Pro ExTM C es el nombre del reactivo, que contiene anticuerpos monoclonales recombinantes dirigidos a las proteínas TOP2A y MCM2. Se considera que la sobreexpresión de estas proteínas podría marcar sensiblemente las lesiones escamosas cervicales asociadas al VPH-AR (Badr, *et al.*, 2008) y ser un buen marcador de la inducción aberrante de fase S. En este estudio se encontró que el aumento de la expresión de estas proteínas en el epitelio de los casos analizados, está asociado con el incremento del grado de lesión histológico, y la presencia de las proteínas indica actividad proliferativa de las células debida a la expresión de TOP2A/MCM2 en el tejido cervical. Los resultados muestran que el 30% (Cuadro 4) de los casos de LEIBG, que presentaron la tinción de las capas intermedia y superior, presentaron alteraciones parecidas a las de LEIAG similar a los resultados de Beccati *et al.*, 2008 en LEIBG. La expresión de estas proteínas indica una alteración por la progresión del ciclo celular del punto de restricción G1-S a la

fase S en donde actúa la topoisomerasa 2 alfa y MCM2 (Conesa-Zamora *et al.*, 2009b). Por otro lado, es importante mencionar el hallazgo del 24% de LEIBG y 9% de LEIAG, donde la expresión de las proteínas se limitó a algunas células basales y parabasales lo que podría indicar que estas lesiones son biológicamente menos agresivas y que se hizo un diagnóstico equivocado de displasia leve en el caso de las LEIAG que presentaron tinción en el tercio profundo del epitelio (Tambouret *et al.*, 2007). También, el hallazgo de aproximadamente el 30% de tejidos diagnosticados histopatológicamente como negativos a LEI y que expresaron Topoisomerasa 2A y MCM2 hasta en algunas células del primero tercio profundo y dos tercios profundo e intermedio de estos tejidos, puede ser explicado por la existencia de procesos de reparación del ADN en los que se induce la expresión de TOP2A y no evidenciados mediante Ki-67, ya que la expresión de esta proteína no se induce en procesos reparativos (Gruber *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2005). Asimismo no se puede descartar que estos tejidos presenten la infección latente por algún otro VPH-AR no incluidos en los 13 genotipos de las sondas utilizadas, o por VPH-BR que no fueron evaluados en este estudio. En el 91% de las LEIAG se expresó TOP2A/MCM2, estos resultados fueron significativos y sugieren no sólo que la actividad proliferativa es mayor, sino también que todas las células proliferantes se encuentran en fase-S de manera anormal y prolongada (David *et al.*, 2009). Los resultados encontrados en estudio indican la posibilidad de usar en conjunto los biomarcadores Ki-67 y TOP2A/MCM2 en el diagnóstico de la LEI; esta conclusión está soportada en los hallazgos similares mostrados en los resultados de Walts and Bose 2009.

La identificación de marcadores vinculados a la infección por VPH-AR que ocurren en el proceso neoplásico, permiten aumentar la especificidad clínica para la detección de las lesiones cervicales. En este estudio también se evaluó la relación entre el estado físico del ADN de VPH-AR encontrándose una relación entre el estado episomal de la infección de 1 ó más de los 13 genotipos de VPH-AR presentes en la sonda utilizadas y las LEIBG, al igual que el estado integrado y las LEIAG, los datos de este estudio apoyan la hipótesis de que el ADN del VPH- AR

puede fácilmente integrarse en el genoma de la célula mediante la ruptura en E2 dando lugar a la sobreexpresión de las proteínas virales E6 y E7, que son necesarias para el mantenimiento del fenotipo transformado en lesiones de alto grado. Los efectos de E6 y E7 en p53 y pRb así como en muchas otras proteínas celulares, interfieren con importantes mecanismos de control celular del ciclo celular, como la inducción anormal de la fase S, apoptosis y el mantenimiento de la estabilidad cromosómica. La integración facilita por la activación de procesos de reparación, que se dan comúnmente en células cromosómicamente inestables de las lesiones de bajo grado. En consecuencia, la integración del VPH es más frecuente en las zonas inestables del genoma de manera paralela en múltiples clones de células, por lo tanto el estado integrado del ADN del VPH-AR determinado mediante hibridación *in situ* con amplificación por tiramida principalmente en la capa basal, es un evento importante en el desarrollo de lesiones de alto grado y puede ser utilizado como un marcador útil en la determinación de la progresión al carcinoma invasor del cérvix uterino así como en su recurrencia como lo han propuesto diversos estudios (Mürger *et al.*, 2004; Wentzensen *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2002), de tal manera que en este estudio se encontró una asociación entre el estado episomal del VPH-AR y la sobreexpresión de Ki-67 y Top2 A/MCM2 en el tercio profundo del epitelio, además de que el patrón integrado se asoció con la expresión de Ki-67 hasta en la totalidad del epitelio y de manera similar con la expresión hasta en los dos tercios profundos del tejido epitelial de las proteínas Top 2 A y MCM2, que han demostrado estar sobre-expresados en cánceres cervicales (Walts and Bose 2010). Es importante señalar que en el 14.7% de los casos de LEIAG se presentó el estado episomal (señal difusa), al respecto Kalof *et al.*, 2005, considera que la señal difusa podría enmascarar la señal puntiforme en los casos de LEIAG.

Por otro lado, en los casos determinados como negativos mediante HIS (cuadro 6), pero con expresión de de las proteínas TOP2A/MCM2, se podrían explicar por la presencia de otro genotipo de VPH-AR no detectado con nuestro juego de sondas (Evans *et al.*, 2002) al igual que los casos de LEIBG que sólo presentaron

expresión de estas proteínas en algunas células basales y parabasales, que también podrían deberse a tipos de VPH-BR (Walts and Bose 2009).

El manejo de las pacientes con LEI, varía alrededor del mundo; la mayoría de los tratamientos resultan ser invasivos, de alto costo afectan la fertilidad. Es necesario detectar sólo aquellas lesiones que con mayor probabilidad progresarán a un carcinoma invasor, por lo que, finalmente consideramos, que la evaluación conjunta de Ki-67 y Topoisomerasa 2A/MCM2 en las LEI de mujeres guerrerenses, podría ser útil para identificar el aumento de la actividad proliferativa de las células que albergan el ADN integrado del VPH-AR, ya que permite evidenciar aquellas lesiones que están en alto riesgo de desarrollo de una lesión mayor. Esto tiene relevancia clínica muy clara para optimizar el manejo de aquellas pacientes con mayor probabilidad de progresión al carcinoma invasor del cérvix uterino, particularmente para aquellas mujeres que están entre las edades 20 a 40 años, que fueron las edades más frecuentemente referidas por las mujeres incluidas en este estudio. Nuestros resultados demuestran una relación directa entre la sobreexpresión de TOP2A/MCM2 mediante inmunohistoquímica, el estado integrado del VPH-AR y el grado de lesión histológica. Estos hallazgos confirman la utilidad de estos biomarcadores celulares y virales para distinguir cérvix reactivo sin LEI de una LEIBG, y a su vez de estas, las LEIAG, dichos biomarcadores podrían implementarse para complementar el diagnóstico histológico y ayudar a establecer el pronóstico de una LEI.

VIII. REFERENCIAS

AL-SALEH, W., DELVENNE, P., GREIMERS, R., FRIDMAN, V., DOYEN, J., BONIVER, J. (1995) Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Correlation with the histologic grade and human papillomavirus type. *Am J Clin Pathol* 104, 154-60.

AGOFF, S.N., LIN, P., MORIHARA, J., MAO, C., KIVIAT, N. B., KOUTSKY, L. A. (2003) p16 (INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 16, 665-73.

ANCUȚA, E., ANCUȚA, C., COZMA, L. G., IORDACHE, C., ANGHELACHE-LUPAȘCU, I., ANTON, E., CARASEVICI, E., CHIRIEAC, R. (2009) Tumor biomarkers in cervical cancer: focus on Ki-67 proliferation factor and E-cadherin expression. *Rom J Morphol Embryol* 50,413-418.

ANJU, M & MADHU, G. (2008) Assessment of monoclonal antibody MIB-1 labeling indices in cervical intraepithelial lesions of the uterine cervix in paraffin section. *J Obstet Gynecol India* 58, 327-332.

BAAK, J. P. A., KRUSE, A-J, ROBBOY, S. J., JANSSEN, E. A. M., VAN DIERMEN, B., SKALAND, I. (2006) Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol* 59, 1017–1028.

BADR, R. E., WALTZ, A. E., CHUNG, F., BOSE, S. (2008) BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. *Am J Surg Pathol* 32, 899–906.

BECCATI, M. D, BURIANI C, PEDRIALI M., ROSSI, S., NENCI, I. (2008) Quantitative detection of molecular markers ProEx C (minichromosome maintenance protein 2 and topoisomerase IIa) and MIB-1 in liquid-based cervical squamous cell cytology. *Cancer*.114, 196–203

BOONE, C. W., KELLOFF, G. J., STEELE, V. E., (1992) Natural History of Intraepithelial Neoplasia in Humans with Implications for Cancer Chemoprevention Strategy. *Cancer Research* 52, 1651-1659.

BROWN, D.C. & GATTER, K. C. (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40, 2-11

BURD, E. M. (2003) Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* . 16, 1-17.

BUYS, D. L. J., LARA, C. O., ORTIZ, C. (2007) Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patología* 45, 126-40.

MOYANO CALVO, J.L., DE MIGUEL RODRÍGUEZ, M., ORTIZ GAMIZ, A., POYATO GALÁN, J.M., SÁNCHEZ SÁNCHEZ, E., BLANCO PALENCIANO, E., ARRIBAS RODRÍGUEZ, J.M. GALERA DAVIDSON, H., CASTIÑEIRAS FERNÁNDEZ, J. (2000) Determinación de ploidía de ADN mediante citometría de flujo, índice Ki-67 y

sobreexpresión de proteína p53 en 121 carcinomas superficiales de vejiga t1. estudio retrospectivo correlación con las variables clásicas. *Actas Urol Esp* 24, 785-795,

CONESA-ZAMORA, P., DOMÉNECH-PERIS, A., ORTIZ-REINA, S., ORANTES-CASADO, F. J., ACOSTA-ORTEGA, J., GARCÍA-SOLANO, J., PÉREZ-GUILLERMO, M. (2009). Immunohistochemical evaluation of ProEx C in human papillomavirus-induced lesions of the cervix. *J. Clin. Pathol* 62, 159-162

CONESA-ZAMORA, P., DOMÉNECH-PERIS, A., ORANTES-CASADO, F.J., ORTIZ-REINA, S., SAHUQUILLO-FRÍAS, L., ACOSTA-ORTEGA, J., GARCÍA-SOLANO, J., PÉREZ-GUILLERMO, M. (2009) Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma. A tissue microarray study. *Am J Clin Pathol* 132, 378-390

DAVID, O., CABAY, R.J., PASHA, S., DIETRICH, R., LEACH, L., GUO, M., MEHROTRA, S. (2009) The role of deeper levels and ancillary studies (p16(Ink4a) and ProExC) in reducing the discordance rate of Papanicolaou findings of high-grade squamous intraepithelial lesion and follow-up cervical biopsies. *Cancer Cytopathol.* 117, 157-66.

DE MARCHI TRIGLIA R, METZE K, ZEFERINO LC, LUCCI DE ANGELO ANDRADE LA. (2009). HPV in situ hybridization signal patterns as a marker for cervical intraepithelial neoplasia progression. *Gynecol Oncol.* 112,114-118.

DURBECQ, V., *et al.*, (2004.) Topoisomerase-II (alpha) expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. *Mol. Cancer Ther* 3, 1207-1214.

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

EVANS, M. F., MOUNT, S. L., BEATTY, B. G., AND COOPER, K. (2002) Biotinyl-Tyramide-Based *In Situ* Hybridization Signal Patterns Distinguish Human Papillomavirus Type and Grade of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Mod Pathol*; 15, 1339-1347

FELLER, L., KHAMMISSA, R. A. G., WOOD, N. H., LEMMER, J. (2009) Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infectious Agents and Cancer* 4, 1-9

GERDES, J., *et al.* (1991) Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol* 138, 867-873.

GRUBER, B.M., *et al.* (2006) Topoisomerase II alpha expression and cytotoxicity of anthracyclines in human neoplastic cells. *Acta Pol Pharm,* 63, 15-8.

GUO M, GONG Y, DEEVERS M, SILVA EG, JAN YJ, COGDELL DE, LUTHRA R, LIN E, LAI HC, ZHANG W, SNEIGE N. (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* 46, 274-80.

HELLEMANS, P., *et. al.* (1995) Immunohistochemical study of topoisomerase II-alpha expression in primary ductal carcinoma of the breast. *J. Clin. Pathol.* 48, 147-150.

KALOF, A. N., EVANS, M. F., SIMMONS-ARNOLD, L., BEATTY BG, COOPER, K. (2005) p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 29, 674-9.

KALOF, A. N. AND COOPER, K. (2007) Our approach to squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 60, 449-455.

KEATING, J.T., *et al.* (2001) Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 25, 884-91.

KELLY, D., KINCAID, E., FANSLER, Z., ROSENTHAL, D. L., CLARK, D. P. (2006) Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions from cytologic samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx C). *Cancer* 108, 494-500.

KRUSE A-J, BAAK J P A, DE BRUIN P C, VAN DE GOOT F R W, KRUSE N K. (2001) Relationship between the presence of oncogenic HPV DNA assessed by polymerase chain reaction and Ki-67 immunoquantitative features in cervical intraepithelial neoplasia *The Journal of Pathology*. 195, 557 - 562

LOPEZ-REVILLA, R., MARTINEZ-CONTRERA, L.A. AND SANCHEZ-GARZA, M. (2008) Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infect Agent Cancer* 3,3

McCLENDON, A.K., A.C. RODRIGUEZ, AND N. OSHEROFF. (2005) Human Topoisomerase II (alpha) Rapidly Relaxes Positively Supercoiled DNA: Implications For Enzyme Action Ahead Of Replication Forks. *J. Biol. Chem* 280, 39337-39345.

MUKHERJEE, G., *et al.* (2007) MCM immunocytochemistry as a first line cervical screening test in developing countries: a prospective cohort study in a regional cancer centre in India. *Br J Cancer* 96, 1107-1111.

MÜNGER K, BALDWIN A, EDWARDS K M, HAYAKAWA H, NGUYEN C L, OWENS M, GRACE M AND HUH K W. (2004) Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal Of Virology* 11451–11460

NARISAWA-SAITO, M. AND T. KIYONO, (2007) Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 98, 1505-11.

NOSEDA, M. AND KARSAN, A. (2006) Notch and minichromosome maintenance (MCM) proteins: integration of two ancestral pathways in cell cycle control. *Cell Cycle* 5, 2704-2709.

ORTIZ DOMÍNGUEZ, M. E. Rendición de cuentas 2009. Obtenida en diciembre de 2010 de www.dged.salud.gob.mx

PINTO A P, SCHLECHT N F, WOO T YC, CRUM C P AND CIBAS E S. (2008) Biomarker (ProEx C, p16INK4A, and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. *Modern Pathology* 21, 1067–1074

QIN, L.X. AND TANG, Z.Y. (2002). The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 8, 385-92.

RICHART, R. M. (1990) A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 75, 131-3.

RIVERA, Z., R., DELGADO, D., PAINEL, P., BARRERO, R., LARRAÍN, H. (2006) Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol* 71, 135-140

ROA, J.C., MARTÍNEZ, R., MONTENEGRO, S., ROA, I., CAPURRO, V., IBACACHE, S., MELO, A. (2003) Inestabilidad microsatelital en lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino. Correlación con el genotipo del virus papiloma humano. *Rev. Méd. Chile* 135, 195-199

SANATI, S., HUETTNER, P., YLAGAN, L. R. (2010) Role of ProExC: a novel immunoperoxidase marker in the evaluation of dysplastic squamous and glandular lesions in cervical specimens. *Int J Gynecol Pathol.* 29, 79-87.

SÁNCHEZ-ROSALES, M., OSORIO-MORALES, S., DÍAZ-ARAUJO, F. (2004) Evaluación de los marcadores inmunohistoquímicos PCNA y MIB-1 en el diagnóstico de lesiones de bajo grado del cuello uterino. *Invest. Clín* 45, 213-220.

SHROYER, K. R., HOMER, P., HEINZ, D., SINGH, M. (2006) Validation of a Novel Immunocytochemical Assay for Topoisomerase II-a and Minichromosome Maintenance Protein 2 Expression in Cervical Cytology. *Cancer Cytopathology* 108, 324-330

SIDDIQUI M T, HORNAMAN K, COHEN C, NASSAR A. (2008) ProEx C Immunocytochemistry and High-Risk Human Papillomavirus DNA Testing in Papanicolaou Tests With Atypical Squamous Cell (ASC-US) Cytology. Correlation Study With Histologic Biopsy. *Arch Pathol Lab Med* 132, 1648-1652

TAMBOURET, R. H., MISDRAJI, J., WILBUR, D.C. (2008) Longitudinal clinical evaluation of a novel antibody cocktail for detection of high-grade squamous intraepithelial lesions on cervical cytology specimens. *Arch Pathol Lab Med* 132, 918-25.

TAN, P.H., BAY, B.H., YIP, G., SELVARAJAN, S., TAN, P., WU, J., LEE, C.H., LI, K. B. (2005) Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol* 18, 374-81.

TAN, D.F., *et. al.*, (2001) MCM2--a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study. *BMC Cancer* 1, 6.

VINOKUROVA, S., WENTZENSEN, N., KRAUS, I., KLAES, R., DRIESCH, C., MELSHEIMER, P., KISSELJOV, F., DÜRST, M., SCHNEIDER, A., DOEBERITZ, M. K. (2008) Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Res* 68, 307-313.

WALTS A E, AND BOSE S. (2010) Is the Expression Pattern of BD ProExC the Same as Ki-67?. A Comparative Analysis in Cervical Biopsies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18, 262–267

WALTS, A. E., AND BOSE, S. (2009) p16, Ki-67, and BD ProEx™C immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Human Pathology.* 40, 957–964

WENTZENSEN N, VINOKUROVA S AND VON KNEBEL M. (2004) Systematic Review of Genomic Integration Sites of Human Papillomavirus Genomes in Epithelial Dysplasia and Invasive Cancer of the Female Lower Genital Tract. *Cancer Research* 64, 3878 –3884

YOUSSEF E M, MATSUDA T, TAKADA N, OSUGI H, HIGASHINO M, KINOSHITA H, WATANABE T, KATSURA Y, WANIBUCHI H AND FUKUSHIMA S. (1995) Prognostic Significance of the MIB-1 Proliferation index for Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. *Cancer* 3, 358-366

ZUNA, R.E., MOORE, W. AND DUNN, S.T.. (2001) HPV DNA testing of the residual sample of liquid-based Pap test: utility as a quality assurance monitor. *Mod Pathol* 14, 147-51.

ZUR HAUSEN, H. (2006) Infections causing human cancer. Wiley-VCH verlag GmbH and Co. KGaA *Nat Rev Cancer* 145-190.

ZUR HAUSEN, H. (2000) Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion from Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 690-698

ZUR HAUSEN H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342-50.