



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“EXPRESIÓN DE p16^{INK4a} EN LESIONES PREMALIGNAS
DE BAJO GRADO CON INFECCION POR VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

YULIANA PAULINA ARREOLA CASTRO.

DIRECTOR DE TESIS: Dra. LUZ DEL CARMEN ALARCON ROMERO.

CHILPANCINGO, GRO., DICIEMBRE DE 2008.

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

Bajo la dirección de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero.

La asesoría de:

Dra .Berenice Illades Aguiar.

Dra. Esther I. López Bayghen Patiño.

Dra. Gloria Fernández Tilapa.

M en C. Adolfo Román Román.

En colaboración con la Dra. Berenice Illades Aguiar, jefe del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero; la Dra. Elba Reyes Maldonado, jefe del Laboratorio de Citología, Departamento de Morfología, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, D.F; la Dra. Esther I. López-Bayghen Patiño, jefe del Laboratorio Genética y Biología Molecular, IPN-CINVESTAV, México D.F y la MSP Eugenia Flores Alfaro, jefe del Laboratorio de Enfermedades Crónico Degenerativas de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas de la U.A.G.

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento otorgado por el apoyo a la reincorporación exbecarios PROMEP-SEP. Folio UAGRO-EXB-106. No. PROMEP/103.5/07/2424.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el (la) C. Yuliana Paulina Arreola Castro, recibió beca del CONACYT y Beca otorgada de Movilidad Santander Universia, Banco Santander Serfin en el periodo: Agosto-Enero 2008, a quienes agradece el otorgamiento de dichas becas.

INDICE

	RESUMEN.....	i
	ABSTRACT.....	ii
I	INTRODUCCIÓN.....	1
II	MATERIALES Y METODOS.....	5
III	RESULTADOS.....	10
IV	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	19
V	REFERENCIAS.....	25

RESUMEN

Antecedentes. La proteína p16^{INK4a} es un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que desacelera el ciclo celular por inactivación de las CDK involucradas en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb). Se considera que la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) es un factor de riesgo necesario para la progresión de las lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) del cérvix uterino, además se ha descrito que la sobreexpresión de p16^{INK4a} es inducida por la oncoproteína E7 de los VPH-AR. Diversos estudios aseguran que p16^{INK4} es un marcador potencial de las LEI. **Objetivo.** Determinar la expresión de la proteína p16^{INK4a} en muestras citológicas en base líquida de mujeres con LEI de bajo grado (LEIBG) y correlacionar la expresión de la proteína p16^{INK4a} con la presencia y tipos de VPH encontrados en las LEIBG. **Metodología.** Se incluyeron 260 mujeres que acudieron al laboratorio de Citopatología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Se realizó citología en base líquida (LiquiPREP), la técnica de Papanicolaou para el diagnóstico citológico, el método inmunocitoquímico para determinación de la expresión de la proteína p16^{INK4a} (clona 16PO4/JC2) y se hizo la detección del DNA del VPH por PCR con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5+/GP6+, y la tipificación del VPH por RFPLP o secuenciación. **Resultados.** Se diagnosticaron 115 citologías normales y 145 LEIBG, de estas 139 presentaron cambios coilocíticos de la infección por VPH, y 6 con displasia leve más coilocitos. Se tipificaron 28 tipos virales diferentes y el VPH-16 fue el más frecuentemente encontrado. De las 260 muestras analizadas, 92 (40.2%) con LEIBG expresaron p16^{INK4a} y tuvieron VPH-AR, con una asociación significativa (OR=51.6; IC95% 7.9-2130.8). **Conclusión.** La expresión de p16^{INK4a} permite la identificación de las LEIBG con infección por VPH-AR mostrando ser una alternativa para mejorar la detección oportuna de carcinoma invasor del cérvix uterino a través del método de citología en base líquida.

PALABRAS CLAVES: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, p16^{INK4a}, virus del papiloma humano.

ABSTRACT

Background. The protein p16^{INK4a} is an inhibitor of cyclin-dependent kinases (CDKs) that slows the cell cycle by inactivating CDKs involved in the phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb). Infection with high-risk human papillomavirus (HPV-HR) is a risk factor for the progression of squamous intraepithelial lesions (SIL) of the uterine cervix. It has been described that the overexpression of p16^{INK4a} is induced by the presence of HPV-HR E7 oncoprotein, and has been suggested that p16^{INK4a} is a potential marker of the SIL. **Objective.** To determine the expression of p16^{INK4a} in liquid-based cytologic samples of women with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), and to correlate the expression of p16^{INK4a} with the presence and types of HPV. **Methodology:** We included 260 women who attended the Laboratorio de Citopatología de la unidad académica de Ciencias Químico-Biológicas. Samples were collected for liquid-based cytology (Liquid-PREP) and analyzed by the Papanicolaou technique. Expression of the protein p16^{INK4a} was determined by immunocytochemistry (16PO4/JC2 clone) and the presence of HPV was analyzed by PCR with oligonucleotides MY09/MY11 and GP5+/GP6+ and HPV type determined by RFLPs or sequencing. **Results.** 115 patients were diagnosed as normal cytology and 146 LSIL, 141 of these presented coilocytic changes typical of HPV infection, and 6 presented mild dysplasia plus coilocytes. 28 different viral types were identified, being HPV-16 the most frequently detected. Of the 260 samples analyzed, 92 (40.2%) with LSIL expressed p16^{INK4a} and had high-risk HPV, with a significant association (OR= 51.6, 95% CI 7.9-2130.8). **Conclusions.** The expression of p16^{INK4a} allows the identification of LSIL infected with HPV-HR. Our results suggested that p16^{INK4a} is an alternative to improve the timely detection of invasive carcinoma of the uterine cervix on liquid-based cytology samples.

PALABRAS CLAVES: low-grade squamous intraepithelial lesions, p16^{INK4a}, human papillomavirus.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero por haberme permitido ser parte de la realización de este proyecto, por la confianza que tuvo en mí. Mil gracias por su apoyo y por compartir sus conocimientos conmigo e inspirar en mi mucha admiración.

A la Dra. Berenice Illades Aguiar por que además de ser participe en este proyecto como sinodal, y ser la coordinadora del programa de Maestría, nos asesoró en seminario de investigación y gracias a ella, mis compañeros y yo supimos llevar a buen termino nuestros proyectos. Gracias por su valiosa colaboración en el mejoramiento de este proyecto.

A la Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño por sus valiosas aportaciones y sugerencias. Por todo el apoyo brindado con el fin de mejorar el desarrollo del proyecto, además de ser un ejemplo de profesionalidad para mí.

A la Dra. Gloria Fernández Tilapa por dedicar parte de su tiempo en la revisión de este trabajo y por sus valiosos comentarios.

Al M. en C. Adolfo Roman Roman por su participación en la evaluación de este proyecto y haber sido mi tutor a lo largo de dos años, gracias por su apoyo en los momentos difíciles y por sus palabras de aliento.

A la MSP. Eugenia Flores Alfaro, por sus excelentes aportaciones en el diseño y desarrollo de la parte estadística del proyecto.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Investigación en Citopatología: A la Q.B.P. Rosario Reyes Reyes por todo el apoyo brindado, por sus enseñanzas y por su amistad. A los jóvenes que han realizado su servicio social y a los que están en el desarrollo de sus proyectos, gracias por todos los agradables momentos que compartimos como grupo de trabajo.

A mis compañeros de la generación de la Luz 2006-2008, por todo lo bueno y malo que compartimos a lo largo de estos dos años..... MUCHA SUERTE.

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme terminar otra etapa importante en mi vida. Por todo el amor con el que me rodeas.

A lo largo de toda mi vida he tenido la oportunidad de conocer a muchas personas, de las cuales algunas llegaron a ser muy especiales y ayudaron a forjar mi carácter... hoy pues me toca dedicarles este presente como agradecimiento por su apoyo, comprensión, amistad, amor y compañía brindados sin pedir nada a cambio. Algunas están aquí conmigo, otras en mis recuerdos... sin importar donde estén mil gracias por formar parte de mi, por todo lo que me han brindado.

A MIS PADRES:

A ustedes quienes pudieron darme el mejor regalo que pudiera existir: la vida. Gracias a Juan Arreola Reyes y a Rita Castro Cortes.

A ti mamá:

*Por ser tan fuerte en los momentos difíciles, el pilar que me sostuvo en los momentos de debilidad.
Por estar a mi lado siempre y ser una amiga incondicional.
Y lo más importante por existir.... te quiero mucho.*

A MIS HERMANOS:

*Hilda, Paty, Criss y Joan... por todo su cariño, apoyo y comprensión.
Por que de cada uno de ustedes he aprendido cosas valiosísimas.
Por que a pesar de los momentos difíciles, hemos tratado de estar juntos.
Siempre estaré agradecida con Dios por tenerlos como familia.*

A MIS AMIGOS:

A esas personitas especiales que me han brindaron su amistad tanto de la licenciatura como de la Maestría, especialmente a Kim, Cristy, Rubí y a mi amigo del alma Pedro... los quiero mucho nunca los olvidaré.

Y a todos aquellos que no nombré... de antemano saben que los llevo en mi corazón

I. INTRODUCCIÓN

El carcinoma invasor del cérvix uterino, representa el primer lugar de morbimortalidad en la población de mujeres mexicanas. Este padecimiento está precedido por cambios histopatológicos conocidos como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de diferentes grados,^{1,2} denominadas citológicamente como lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) y alto grado (LEIAG)^{3,4}. Estas lesiones inician en la zona de transformación escamocilíndrica, la cual es susceptible a cambios hormonales, de pH vaginal y a infecciones causadas por el virus del papiloma humano.^{1,5}

Los virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) son un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo del carcinoma invasor.⁶⁻¹⁰ Sin embargo, el primer paso para la carcinogénesis cervical es la infección persistente por VPH-AR, además de la capacidad de la integración del DNA viral dentro del DNA celular están fuertemente asociadas con la transformación maligna⁷. De igual manera la persistencia o resolución de la infección están asociadas a la carga viral y las variantes de los VPH.⁸ Los VPH-AR tienen la capacidad de inmortalizar a los queratinocitos, debido a que sus oncoproteínas E6 y E7, tienen mayor afinidad por proteínas reguladoras del ciclo celular que las oncoproteínas de los VPH de bajo riesgo.¹¹⁻¹³

La proteína del retinoblastoma (pRb), producto del gen supresor de tumor *Rb*, en su estado activo, actúa como freno del ciclo celular en el paso de la fase G1 a la fase S. La pRb interactúa reversiblemente con miembros de la familia del factor de transcripción E2F^{14,15} y la formación del complejo pRb/E2F conduce a la pérdida de la activación de genes regulados por Rb^{16,18}. Cuando la célula recibe el estímulo de factores de crecimiento, la proteína pRb es inactivada gracias a la fosforilación (pRb-P) que ejercen las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), por lo que el freno desaparece y la célula atraviesa el punto de control G1-S^{13,14}. La ausencia de pRb o pérdida de su capacidad funcional, ya sea por mutación, eliminación o inactivación,

elimina el freno del ciclo celular y la célula pasa libremente a la fase de síntesis de DNA¹⁹. La fosforilación de pRb es regulada por inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (ICDK), entre los cuales se encuentra la familia INK4, que comprende cuatro proteínas: p14, p15, p16 y p18. Estas proteínas inhiben selectivamente los complejos ciclina D/CDK4-CDK6, formando complejos selectivos con las CDK.^{14,17,20,21}

La proteína p16^{INK4a}, es una fosfoproteína de 156 aminoácidos codificada por el locus génico CDKN2, el cual está compuesto por cuatro exones: 1α, 1β, 2 y 3. Este locus génico utiliza diferentes marcos de lectura abiertos traslapados que codifican dos mensajeros diferentes a partir de diferentes promotores. Cada mensajero tiene un exón específico en la posición 5'. Los mensajeros de CDKN2 codifican proteínas con actividad supresora de tumor denominadas p16 y p14ARF. La proteína p16^{INK4a} es producto de los exones 1α, 2 y 3, la cual puede reprimir transcripcionalmente al promotor del gen de la ciclina D y causar arresto de la célula tanto en G1 como en G2/M del ciclo celular.²¹⁻²³

Algunos estudios muestran que el VPH-AR contribuye a la progresión neoplásica a través de la interacción de las oncoproteínas virales E6 y E7 con proteínas importantes en la regulación del ciclo celular como p53 y pRb^{1,12,20}. E6 y E7 tienen funciones complementarias, mientras E6 induce la progresión de los tumores a estadios malignos previniendo la inducción de la apoptosis a través de su asociación con p53,²⁴⁻²⁶ E7 promueve el estado de carcinogénesis uniéndose a pRb, impidiendo la formación de complejos pRb/E2F.¹⁸ La sobreexpresión de E6 y E7 es un factor importante en el desarrollo del carcinoma invasor del cérvix uterino y del adenocarcinoma.²⁷

La expresión de p16^{INK4a} y pRb se encuentran mutuamente contrareguladas con el objeto de mantener la inhibición del crecimiento celular, por lo que las mutaciones o eliminaciones que afecten a uno de estos genes supresores de tumor inducirá la sobreexpresión del otro. Así, la expresión de p16^{INK4a} es detectada y a menudo

elevada cuando Rb está mutada, eliminada o inactivada y se encuentra reducido o ausente en células que contienen pRb normal^{24,28}. Khleif *et al.*¹⁶ encontraron que la acumulación intracelular de p16^{INK4a} puede ocurrir como respuesta a los niveles elevados de E2F libre ocasionado por la ausencia de pRb funcional.

Estudios realizados por Murphy *et al.*¹⁸ sugieren que la expresión de p16^{INK4a} puede ser un marcador de lesiones displásicas del tejido cervical, tanto de células escamosas como glandulares concluyendo que la expresión es directamente proporcional al grado de displasia. Los resultados de este estudio muestran que la expresión de p16^{INK4a} fue nuclear en las NIC I, en tanto que en los casos de NIC II, III y carcinoma invasor, la inmunoreactividad se encontró tanto en el núcleo como en citoplasma de estas lesiones. Sin embargo, no hubo expresión de p16^{INK4a} en tejidos cervicales normales, hecho similar al reportado por Sano *et al.*¹¹

Volgareva *et al.*¹⁹ demostraron la sobreexpresión de p16^{INK4a} en muestras de displasia y carcinoma cervical. Por su parte Bibbo *et al.*²⁹ realizaron la inmunotinción en muestras citológicas en base líquida, observando concordancia de la expresión de p16^{INK4a}, tanto en muestras citológicas como en muestras histológicas. Saqi *et al.*³⁰ encontraron también en muestras citológicas en base líquida una relación entre la expresión de p16^{INK4a} y el efecto citopático causado por el VPH en las células infectadas concluyendo que la sobreexpresión de p16^{INK4a} es un indicador de actividad patogénica de VPH.

Se reconoce mundialmente que la morbimortalidad por el carcinoma invasor del cérvix uterino ha disminuido gracias al empleo de la citología cervicovaginal de Papanicolaou³¹, sin embargo, la frecuencia de errores en la toma de muestra así como la presencia de abundante sangre y detritos celulares que pueden obstaculizar la visualización correcta del material celular, ha conducido a la búsqueda de estudios adicionales que permitan realizar un diagnóstico más confiable, acorde con la situación clínica de las pacientes. Considerando que son pocos los estudios enfocados en el papel potencial de la proteína p16^{INK4a} en la identificación de LEIBG

causadas por la infección por VPH-AR, el objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de la proteína p16^{INK4a} en muestras citológicas en base líquida de mujeres con LEIBG y correlacionar la expresión de la proteína p16^{INK4a} con la presencia y tipos de VPH encontrados en las LEIBG. Además corroborar que la proteína p16^{INK4a} es un biomarcador útil de células con cambios displásicos inducidos por VPH-AR, mejorará el diagnóstico oportuno de lesiones premalignas para la aplicación de un tratamiento adecuado y evitar la progresión al carcinoma invasor.

II. MATERIALES Y METODOS.

Población en estudio.

Se realizó un estudio transversal comparativo que incluyó a 260 mujeres que acudieron al Servicio de Detección Oportuna de Cáncer Cérvico Uterino del Laboratorio de Investigación en Citopatología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Mismas que aceptaron participar en el estudio, con previo consentimiento informado, durante el periodo comprendido de Septiembre del 2007 a Marzo del 2008.

Colección de muestras.

Todas las muestras fueron colectadas asegurando material celular de la zona de transformación escamocilíndrica del cérvix uterino, realizando la doble toma con espátula de madera y cepillo cervical, depositando parte del material colectado en solución salina para el diagnóstico molecular del VPH a través de la PCR y la otra parte del material se depositó en un frasco con líquido de preservación para realizar la citología líquida, utilizando el kit Liqui-PREP™.

Método de citología en base líquida (Liqui-PREP™).

Una vez depositada la muestra en el frasco de solución de conservación, se procedió a agitarla en el Vortex. Posteriormente se centrifugó el material a 3500 rpm, decantando el sobrenadante evitando eliminar material celular. Se preparó una dilución 1:5 del material celular en 100 microlitros (µl) de solución encapsuladora, de esta mezcla obtenida se realizaron dos extendidos en laminillas silanizadas uno de los cuales se utilizó para efectuar el diagnóstico citológico y el otro para realizar el método inmunocitoquímico para la proteína p16^{INK4a}.

Diagnóstico citológico.

Las citologías en base líquida se tiñeron con la técnica de Papanicolaou, para su posterior observación al microscopio.

Resultado de la tinción de Papanicolaou: Núcleos color morado y citoplasma azul verdoso (para células intermedias y basales profundas) y color rojo (para células superficiales).

Los resultados fueron informados de acuerdo a la clasificación citológica del Sistema Bethesda⁴ como sigue:

Citología normal (CN):

Muestras sin cambios atípicos de infección por VPH, ni displasia y negativos a malignidad.

Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG):

- a) Muestras con cambios morfológicos característicos de la infección por VPH (coilocitos).
- b) Muestras con coilocitos más displasia leve (discariosis y acentuada binucleación).

Detección y genotipificación del VPH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El DNA fue extraído de acuerdo al método estándar SDS-proteinasa K-fenol cloroformo. Se sometieron a PCR 1.5 µg del DNA total, con dos juegos de oligonucleótidos degenerados MY09 (5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3') y MY11 (5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG3') que amplifican un fragmento de aproximadamente 450 pares de bases de la región L1.³² El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50µL con 2 mM de MgCl₂, 1.25 U Taq DNA polimerasa

Gold y oligonucleótidos iniciadores MY09 y MY11 10µM. la amplificación se realizó en un termociclador en las siguientes condiciones: un ciclo a 95°C durante 10 min, seguido por una amplificación de 40 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por un min, 72 °C durante un min, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se visualizaron con bromuro de etidio.

Como controles positivos se utilizaron 1pg y 1ng de DNA plasmídico recombinante pVPH6, como controles de sensibilidad y especificidad de la PCR. Como control negativo se utilizó una reacción en la que se adicionó agua estéril en lugar de DNA.

Tipificación del VPH.

Los productos de la PCR de la muestras positivas a VPH se sometieron a digestión con las enzimas de restricción BamHI, Ddel, HaeIII, HinfI, PstI, RsaI y Sau3AI (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el tipo viral se determinó por la interpretación del patrón de restricción de fragmentos polimórficos (RFLPs).³³

Secuenciación

Cuando las muestras analizadas con el sistema MY09/11 fueron negativas o el VPH no pudo ser genotipificado por RFLPs, la presencia de DNA viral fue valorado utilizando el sistema general de PCR GP5+/6+.³⁴ Los productos de PCR GP5+/6+ se sometieron a secuenciación. Después de la purificación de los productos de PCR utilizando isopropanol al 75% y columnas (Centri-Sep Spin Columns, Applied Biosystems, Foster City, CA), estas fueron secuenciadas en el secuenciador automatizado (310 ABI PRISM Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas las secuencias se compararon con secuencias conocidas para los tipos de VPH disponibles en el sitio NCBI. Los tipos de VPH fueron clasificados como de alto riesgo en comparación bajo riesgo de acuerdo con la clasificación de Muñoz *et al.*⁸

La detección, la genotipificación del VPH por PCR, la tipificación por RFLPs y secuenciación se realizaron en el Laboratorio de Biomedicina molecular de la unidad académica antes mencionada.

Método inmunocitoquímico para la detección de la expresión de la proteína p16^{INK4a}.

La expresión de p16^{INK4a} se determinó a través de la técnica Streptavidina Biotina Peroxidasa, utilizando el sistema de detección Cytoscan HRP/DAB Cell (Cell Marque Corporation, Hot Springs, AR). Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-p16^{INK4a}, clona 16PO4 conocida como JC2 (Cell Marque Corporation, Hot Springs, AR catalogo No. CMC812).

Las laminillas preparadas por citología líquida, se fijaron en acetona. La recuperación antigénica (ImmunoDNA retriever con citratos; BioSB, Inc, Santa Barbara, CA), fue realizada en una olla Pascal (DaKo) a presión de 120° C durante 20 min. El anticuerpo primario (clona 16PO4) fue diluido 1:100 en diluyente de anticuerpo (BioSB, Inc, Santa Barbara, CA) y se incubó a 37° C en una cámara húmeda. Las laminillas se contratiñieron con Hematoxilina de Mayer y se deshidrataron en alcoholes de 96%, alcohol absoluto, xilol y se montaron con Entellan (MERK).

Se utilizaron como control positivo en cada corrimiento, las líneas celulares HeLa (carcinoma del cérvix uterino con VPH 18) y Caski (carcinoma del cérvix uterino con VPH 16) y como controles negativos las mismas líneas celulares omitiendo el anticuerpo primario durante el corrimiento.

La evaluación de la expresión de p16^{INK4a} se basó en la visualización de las células que adquirieron la tinción marrón o café ocre, en el núcleo y/o en el citoplasma o en ambos y consistió en realizar un conteo de 100 células a 40X en base a los criterios de Saqi *et al.*, 2003 como sigue:

Positiva: cuando se observe un número igual ó mayor a 10 células teñidas.

Negativa: cuando no se observe ninguna célula teñida.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATA v.9.2, obteniendo medianas y rango intercuartil (percentil 5 y 95) para las variables cuantitativas continuas y frecuencias absolutas y relativas para variables cualitativas (categóricas). Para determinar las diferencias de medianas se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. Se obtuvieron OR a través de regresión logística múltiple para conocer la asociación entre la expresión de p16^{INK4a} con el grado de lesión citológica y con la presencia y grupo oncogénico de los VPH con intervalos de confianza (IC) al 95%.

III. RESULTADOS.

Características generales de la población estudiada.

El rango de edad de las 260 mujeres incluidas en el estudio se ubicó entre 16 y 73 años, con un promedio de 37 años. El inicio de vida sexual activa (IVSA) de mujeres con diagnóstico de LEIBG (coilocitos más displasia leve) inició a una edad menor en comparación con los grupos de citología normal (CN) y de LEIBG (coilocitos sin displasia). El número de partos fue mayor en mujeres con LEIBG sin displasia. No se encontraron diferencias significativas entre las variables de riesgo incluidas en el estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Características generales de la población estudiada.

Características	Diagnóstico citológico			Valor de p^a
	Citología normal (CN) n=115	LEIBG (coilocitos sin displasia) n=139	LEIBG (coilocitos más displasia leve) n=6	
Edad *	37 (23-56)	36 (22-53)	36 (16-50)	0.40
IVSA *	21 (15-29)	21 (15-29)	18 (15-22)	0.22
Número de partos n(%)				
Ninguno	18 (15.7)	27 (19.4)	1 (16.7)	0.80
1 ó 2 hijos	44 (38.3)	51 (36.7)	3 (50.0)	
Más de 2 hijos	53 (46.0)	61 (43.9)	2 (33.3)	

*Los datos son mediana (rango intercuartil; percentil 5 y 95). ^aEl valor de p se calculó por el método de Kruskal Wallis para medianas no paramétricas. CN, Citología Normal. IVSA, Inicio de Vida Sexual Activa. LEIBG, Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado.

Diagnóstico citológico.

Se realizó la tinción de Papanicolaou a los extendidos en monocapa obtenidos por citología en base líquida, los cuales fueron limpios, delgados y homogéneos sin detritos celulares, ni eritrocitos. Todas las muestras contaron con riqueza celular a base de la presencia de células del epitelio plano, cilíndrico y de metaplasia escamosa endocervical (Figura 1A). Se detectaron 115 muestras que no presentaron cambios atípicos por VPH, ni displasia y se diagnosticaron como citologías normales (CN) negativas a malignidad (Figura 1A y 1B), mientras que 139 casos que

presentaron cambios coilocíticos característicos de la infección por VPH se caracterizaron por el hallazgo de algunas células intermedias y superficiales que presentaron cariomegalia, halos perinucleares y leve binucleación con borramiento nuclear, clasificadas como LEIBG con coilocitos (Figura 2A Y 2B). Además de 6 casos que se diagnosticaron como LEIBG más displasia leve que presentaron tanto las características de la infección por VPH antes señaladas, como leve discariosis o agrandamiento nuclear, cromatina fina y acentuada binucleación (Figura 3) (Tabla 1).

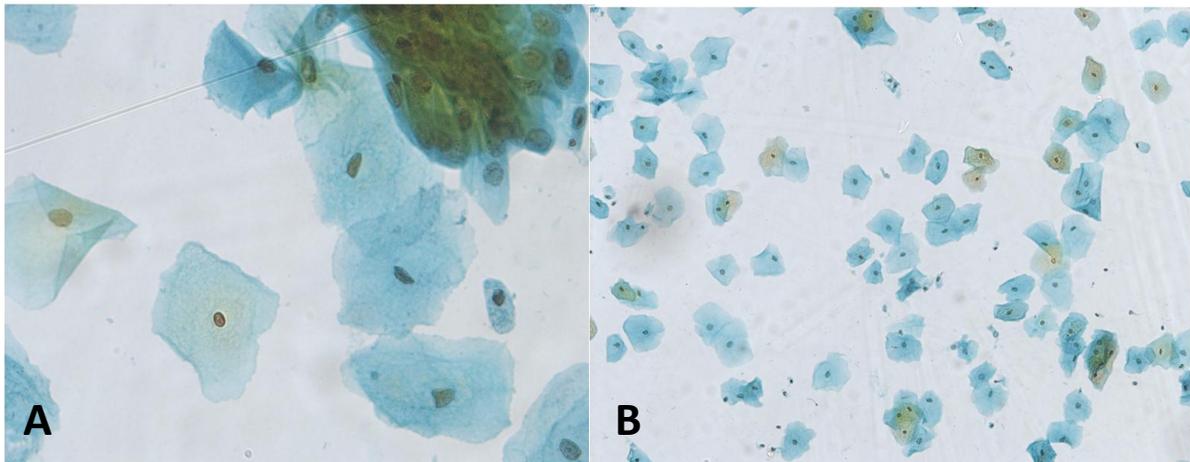


Figura 1. Tipos celulares presentes en los extendidos de monocapa obtenidos por citología líquida: **A.-** Células del epitelio plano y cilíndrico sin alteraciones (40x); **B.-** Células normales negativas a malignidad (10X). Tinción: Papanicolaou.

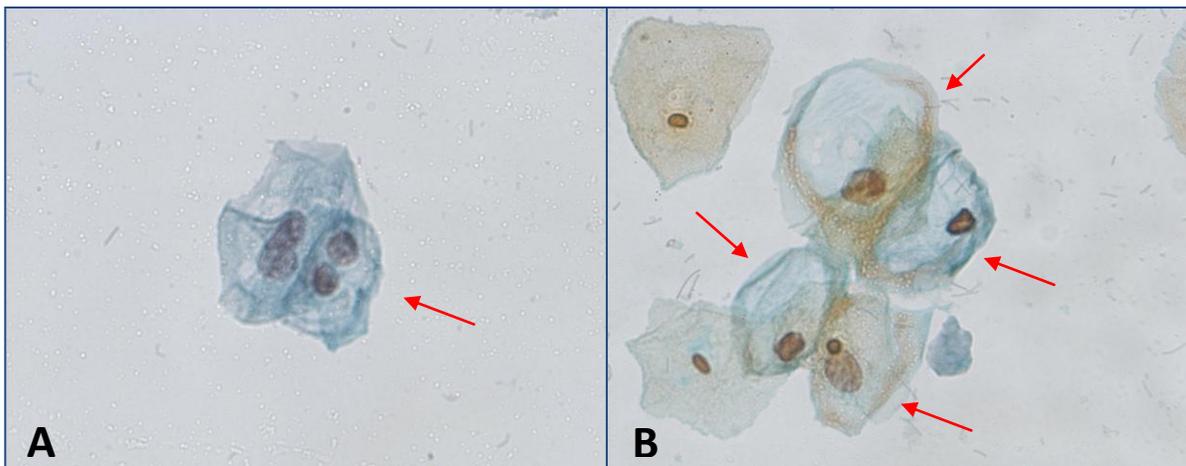


Figura 2. Citología con cambios coilocíticos característicos de la infección por VPH (LEIBG). Flechas en rojo. Método: Citología en base líquida. Tinción: Papanicolaou. 100X.

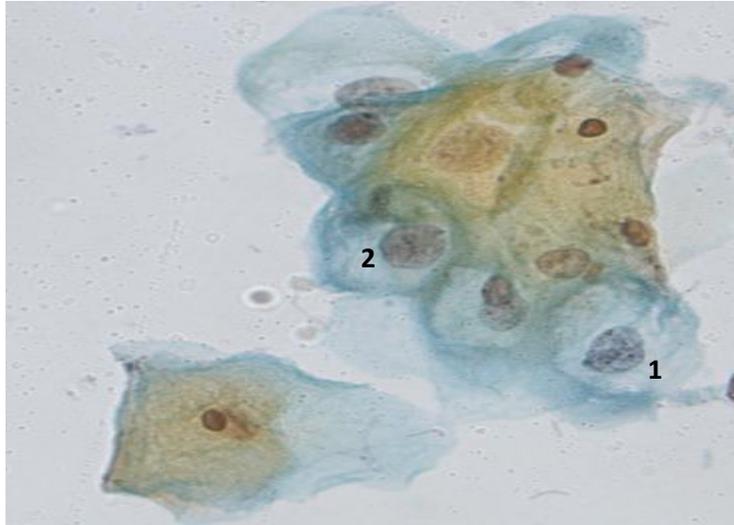


Figura 3. Citología con cambios coilocíticos característicos de la infección por VPH más displasia leve. Presencia de leve discariosis (1) y acentuada binucleación (2) compatible con displasia leve (LEIBG). Método: Citología en base líquida. Tinción: Papanicolaou. 100X.

Tipos de VPH.

De las 115 mujeres incluidas en el grupo de citología normal, 84 fueron positivas al VPH por PCR, al igual que los 145 casos diagnosticados con LEIBG. Se detectaron 28 genotipos diferentes de VPH, trece tipos son de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 53, 58, 59, 66, 68 y 102), 9 de bajo riesgo (6, 11, 13, 54, 61, 70, 72, 81 y 89) y 6 de riesgo no determinado (62, 83, 84, 86, 90 y 97) (Tabla 2).

Del total de mujeres VPH positivas el 73.8% (169/229) tuvieron un solo tipo viral, el 9.2% (21) infección múltiple y en el 17% (39) de las mujeres no se pudo caracterizar el tipo viral. De los 169 en los que se pudo determinar el tipo viral, 114(67.4%) presentaron genotipos de alto riesgo y el mayor porcentaje lo ocupó el VPH-16 tanto en las CN como en las LEIBG. En CN y LEIBG (coilocitos sin displasia) el VPH 6 ocupó el segundo lugar con 11(6.5%) y 13(7.7%), respectivamente, mientras que en LEIBG (coilocitos más displasia leve) los tipos 18, 66 y 6 ocuparon el segundo lugar en frecuencia (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de tipos de VPH entre mujeres con CN y LEIBG.

Distribución de VPH	Citología normal (CN)	LEIBG (coilocitos sin displasia)	LEIBG (coilocitos más displasia leve)	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	
	n= 115	n= 139	n = 6	
Infección por VPH				
Negativa	31(26.9)	0(0)	0(0)	31 (11.8)
Positiva	84(73.1)	139(100)	6(100)	229(87.2)
Por grupo oncogénico				
Tipos de alto riesgo	37(16.1)	26(11.3)	1(0.4)	27.8
Tipos de bajo riesgo	18(8.0)	72(31.4)	4(1.7)	41.1
Tipos no determinado	1(0.4)	10(4.4)	0(0)	4.8
Infección múltiple	8(3.5)	13(5.7)	0(0)	9.2
VPH-X	20(8.7)	18(8.0)	1(0.4)	17.1
Tipos virales*				
Tipos de alto riesgo				
16	28(12.2)	50(21.8)	2(0.9)	80(34.9)
18	3(1.3)	10(4.4)	1(0.4)	14(6.1)
31	1(0.4)	0	0	1(0.4)
33	1(0.4)	0	0	1(0.4)
39	0	1(0.4)	0	1(0.4)
45	1(0.4)	3(1.3)	0	4(1.7)
52	0	2(0.9)	0	2(0.9)
53	1(0.4)	1(0.4)	0	2(0.9)
58	0	1(0.4)	0	1(0.4)
59	0	1(0.4)	0	2(0.9)
66	1(0.4)	1(0.4)	1(0.4)	3(1.3)
68	0	1(0.4)	0	1(0.4)
102	1(0.4)	1(0.4)	0	2(0.9)
			Total	114(49.8)
Tipos de bajo riesgo				
6	11(4.8)	13(5.7)	1(0.4)	25(10.9)
11	0	1(0.4)	0	1(0.4)
13	0	1(0.4)	0	1(0.4)
54	0	1(0.4)	0	1(0.4)
61	0	1(0.4)	0	1(0.4)
70	1(0.4)	1(0.4)	0	1(0.4)
72	0	1(0.4)	0	1(0.4)
81	6(2.6)	7(3.0)	0	13(5.7)
89	1(0.4)	0	0	1(0.4)
			Total	45(19.7)
Tipos de riesgo no determinado				
62	0	1(0.4)	0	1(0.4)
83	0	2(0.9)	0	2(0.9)
84	0	2(0.9)	0	2(0.9)
86	0	1(0.4)	0	1(0.4)
90	0	3(1.3)	0	3(1.3)
97	0	1(0.4)	0	1(0.4)
			Total	10(4.4)
Infección múltiple	8(3.5)	13(5.7)	0	21(9.2)
VPH-X	20(8.6)	18(7.8)	1(0.4)	39(17.0)
Total	84(36.3)	139(60.2)	6(2.5)	229(100)

*El porcentaje por tipo viral en cada diagnóstico se calculó tomando en cuenta solo a las mujeres VPH positivas. CN, Citología Normal. VPH-X, VPH no caracterizado. LEIBG, Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado.

Expresión p16^{INK4a} por diagnóstico citológico.

La expresión de p16^{INK4a} se encontró en 19 (16.5%) casos con CN, 68 (48.9%) casos de LEIBG (coilocitos sin displasia) y 5 (83.3%) casos de LEIBG (coilocitos más displasia leve) (Tabla 3).

Tabla 3. Inmunoexpresión de p16^{INK4a} y su relación con el diagnóstico citológico.

Expresión de p16 ^{INK4a} n(%)	Citología normal (CN)	LEIBG (coilocitos sin displasia)	LEIBG (coilocitos más displasia leve)	total
	n= 115	n= 139	n = 6	
Negativa	96(83.5)	71(51.1)	1(16.7)	168(64.6)
Positiva	19(16.5)	68(48.9)	5(83.3)	92(35.4)
TOTAL	115(100)	139(100)	6(100)	260(100)

CN, Citología Normal. VPH-X, VPH no caracterizado. LEIBG, Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado.

La expresión de p16^{INK4a} se observó en núcleo y citoplasma de células VPH-positivas, en células intermedias con cariomegalia, en algunas células basales profundas y en algunas células de metaplasia escamosa endocervical, además en algunos casos de LEIBG fueron positivas las células cilíndricas (Figura 4A, B, C y H). En cambio en células con cambios coilocíticos característicos de la infección por VPH, la expresión de p16^{INK4a} se observó en el núcleo (cariomegalia) ya que los halos perinucleares no fueron positivos a este marcador sólo el contorno citoplásmico de estas células (Figura 4D, E y F). También las células con discariosis y binucleación características de la displasia leve fueron positivas a p16^{INK4a} (Figura 4G). Además, en los casos de LEIBG en las células donde no se visualizó lesión citológica, no se presentó reactividad para dicho marcador. Cabe mencionar que en todas las citologías con diagnóstico de CN fueron negativas al VPH por PCR, también fueron negativas al p16^{INK4a} (Figura 4-I).

Por otro lado, las células HeLa (Línea celular de carcinoma del cérvix uterino con VPH 18) y las células CaSki (Línea celular con VPH-16) fueron positivas a p16^{INK4a} (Figura 7).

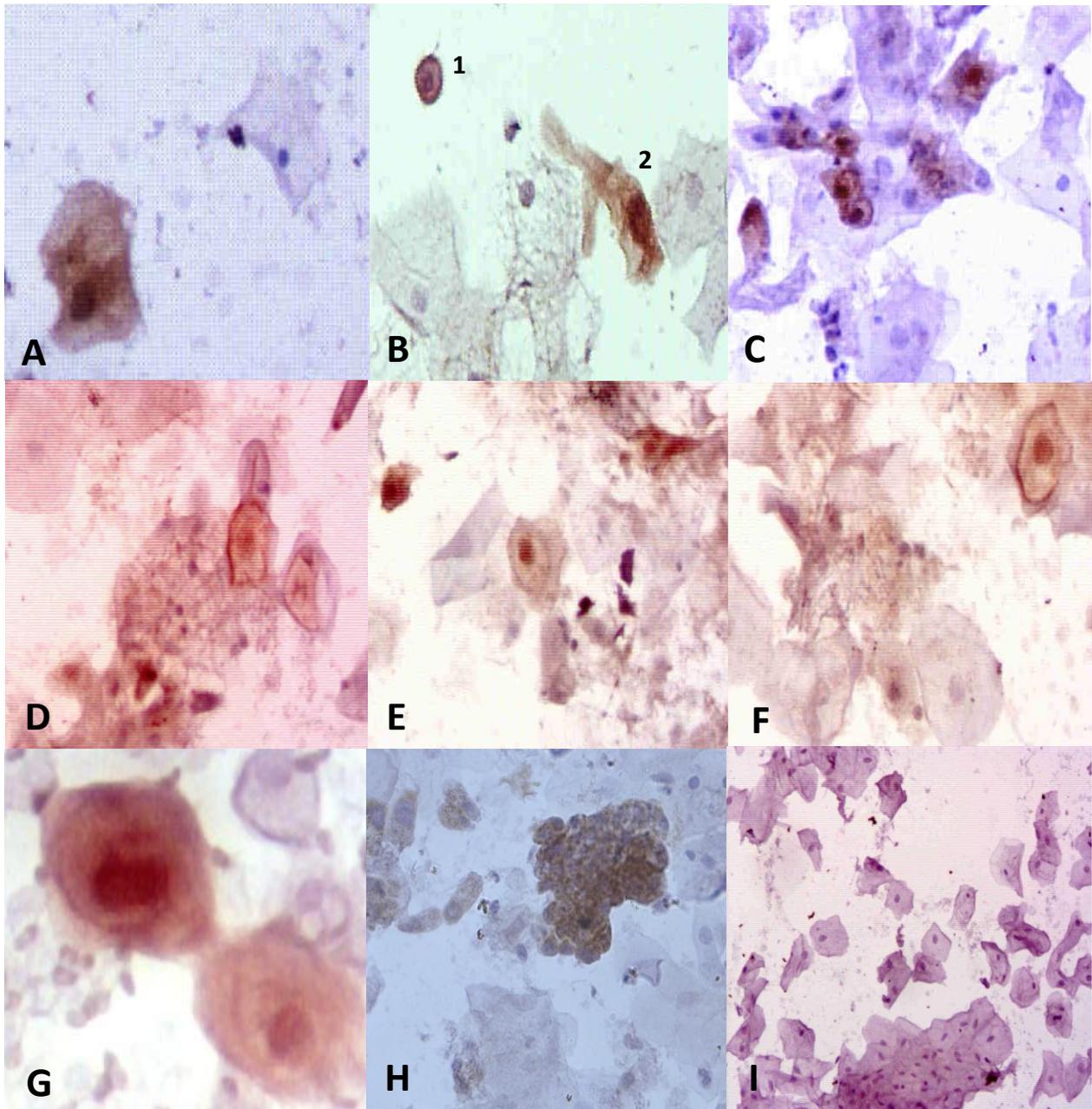


Figura 4. Expresión de p16^{INK4a} en diferentes extendidos celulares de citología líquida en presencia del VPH-16. A) Célula intermedia con cariomegalia, **B)** Célula basal profunda (1) y célula intermedia con cariomegalia (2), **C)** Células de metaplasia escamosa endocervical, **D, E y F)** Citología con coilocitos; **G)** Citología con coilocitos más displasia leve, **H)** Células cilíndricas y **I)** Células del epitelio plano normales sin cambios coilocíticos negativas a la expresión de p16^{INK4a}. Método: Citología en base líquida. Técnica: Streptavidina Biotina Peroxidasa.

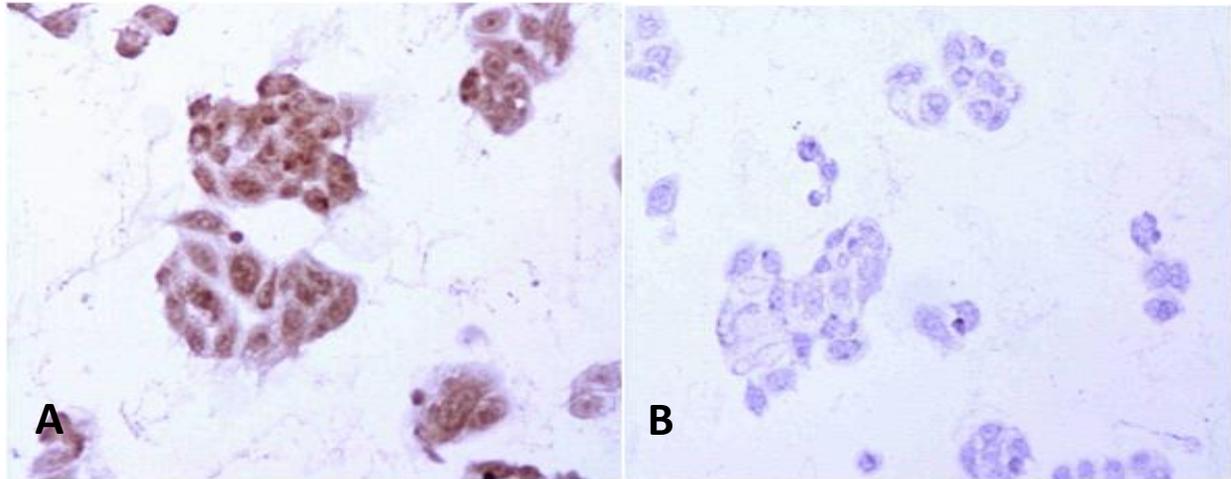


Figura 5. Control positivo y negativo de la expresión de p16^{INK4a}. A) Células CaSki (Línea celular de carcinoma de cérvix uterino con VPH 16), positivas a p16^{INK4a}; B) Ausencia de expresión de p16^{INK4a} en la misma línea celular sin el anticuerpo primario (Control negativo). Técnica: Estreptavidina Biotina Peroxidasa. 40x.

Expresión de p16^{INK4a} y su relación con el diagnóstico citológico y el tipo de VPH.

Se encontró que 10 (35.7%) casos de CN, 36 (72.0%) casos de LEIBG (coilocitos sin displasia) y dos casos de LEIBG (coilocitos más displasia leve) presentaron el VPH tipo 16 y fueron positivos a p16^{INK4a}. Por otro lado, 10 de las 21 citologías que presentaron infección múltiple fueron positivas a p16^{INK4a} de las cuales 7 fueron LEIBG (coilocitos sin displasia) (Tabla 5). Es importante mencionar que la expresión de p16^{INK4a} fue positiva en algunos casos con infección por virus del papiloma humano de bajo riesgo (VPH-BR), de los cuales se encontró un caso con CN positivo a VPH-89, seis casos con LEIBG (coilocitos sin displasia) positivos a los tipos 6, 11 y 81 y una con LEIBG (coilocitos sin displasia) con VPH-6 pero con una tinción que fue de menor intensidad en la coloración comparada con los VPH-AR.

Tabla 5. Expresión de p16^{INK4a} y su relación con el diagnóstico citológico y el tipo de VPH.

Tipo viral	Citología normal CN n=115		LEIBG (coilocitos sin displasia) n=139		LEIBG (coilocitos más displasia leve) n=6	
	(-) n(%)	(+) n(%)	(-) n(%)	(+) n(%)	(-) n(%)	(+) n(%)
Negativo	31(100)					
Alto riesgo						
16	18(64.3)	10(35.7)	14(28.0)	36(72.0)		2(100)
18	2(66.7)	1(33.3)	4(40)	6(60)		1(100)
31	1(100)					
33		1(100)				
39				1(100)		
45		1(100)		3(100)		
52				1(50)		
53		1(100)		1(100)		
58				1(100)		
59			1(100)			
66		1(100)				1(100)
68				1(100)		
102	1(100)					
Bajo riesgo						
6	11(100)		12(92.3)	1(7.7)		1(100)
11				1(100)		
13			1(100)			
54			1(100)			
61			1(100)			
70	1(100)		1(100)			
72			1(100)			
81	6(100)		3(42.9)	4(57.1)		
89		1(100)				
Riesgo no determinado						
62				1(100)		
83			2(100)			
84			1(50)	1(50)		
86				1(100)		
90			2(66.7)	1(33.3)		
97			1(100)			
Inf. múltiple	5(62.5)	3(37.5)	6(46.2)	7(53.8)		
VPH-X	20(100)		17(94.5)	1(5.5)	1(100)	

CN, Citología Normal. VPH-X, VPH no caracterizado. LEIBG, Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado.

Correlación de la expresión de p16^{INK4a} con el riesgo oncogénico de VPH

Al correlacionar la expresión de p16^{INK4a} con el grupo oncogénico del VPH, se encontró que la frecuencia de la expresión de p16^{INK4a} aumentó dependiendo del tipo viral presente. La infección por VPH-AR se asoció significativamente con la expresión de p16^{INK4a} (OR=51.6; IC95% 7.9-2130.8) (Tabla 6).

Tabla 6. Asociación entre la expresión de p16^{INK4a} con el riesgo oncogénico de VPH

<u>Grupo oncogénico</u>	Expresión de p16 ^{INK4a}			OR	IC (95%)
	Negativo n(%)	Positivo n(%)	Total		
Negativo	31(100)	0(0)	31(100)	*1.0	
Alto riesgo	43(37.4)	70(61.6)	113(100)	51.6	7.9-2130.8
Bajo riesgo	37(82.1)	8(17.8)	45(100)	7.6	0.94-342.3
Riesgo no determinado	8(72.7)	3(27.3)	11(100)	29.3	3.38-1300.3
Infección múltiple	11(52.4)	10(47.6)	21(100)	0.014	0.00-0.163
VPH-X	38(97.3)	1(2.7)	39(100)	1.64	0.81-99.8
Total	168(63.8)	92(36.2)	260(100)		

*Categoría de referencia. VPH-X, VPH no caracterizado.

Correlación de la expresión de p16^{INK4a} con el diagnóstico citológico.

En este estudio la frecuencia de la expresión de p16^{INK4a} aumenta gradualmente de acuerdo a la presencia de coilocitos característicos de la infección por VPH, así la presencia de estos cambios morfológicos con o sin displasia se asociaron significativamente con la frecuencia de la expresión de p16^{INK4a} (OR=4.8; IC95% 2.6-9.27) y (OR=25; IC95% 2.5-1206.4) respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Asociación entre la expresión de p16^{INK4a} y el diagnóstico citológico.

<u>Diagnóstico citológico</u>	Expresión de p16 ^{INK4a}			OR	IC (95%)
	Negativo n(%)	Positivo n(%)	Total		
CN	96(83.5)	19(16.5)	115(100)	*1.0	
LEIBG sin displasia	73(51.1)	68(48.9)	139(100)	4.8	2.6-9.27
LEIBG más displasia leve	1(16.7)	5(83.3)	6(100)	25.0	2.5-1206.4
Total	168(63.8)	92(36.2)	260 (100)		

*Categoría de referencia. CN, Citología Normal. LEIBG, Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado.

IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

A pesar de que el estudio de citología convencional de Papanicolaou detecta oportunamente el carcinoma invasor del cérvix uterino, permitiendo reducir el índice de morbilidad por esta enfermedad en muchos países desarrollados,^{30,31} en México este cáncer ocupa el primer lugar como causa de defunción en las mujeres³⁵. El estado de Guerrero presenta una de las tasas más altas de mortalidad por esta causa, registrándose 10.9 muertes por cada 100 000 mujeres,³⁶ por esta razón se diseñó este estudio en 260 mujeres guerrerenses.

Las etapas premalignas conocidas comúnmente como displasias o lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) de bajo (LEIBG) y alto grado (LEIAG), tienen un comportamiento multifactorial al igual que el carcinoma invasor del cérvix uterino y los factores de riesgo para el desarrollo de estas lesiones son el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), la edad de las mujeres, el inicio de vida sexual activa (IVSA) a temprana edad, el número de compañeros sexuales y la multiparidad, entre otros^{7,8,24,37}. En este estudio es importante señalar que los casos de LEIBG (coilocitos más displasia leve) se encontraron en mujeres que refirieron haber iniciado su vida sexual a una edad promedio de 18 años a diferencia de aquellas con diagnóstico de citología normal (CN) cuya IVSA fue a los 22 años. También las mujeres con LEIBG sin displasia refirieron haber tenido más partos que los demás grupos. Ninguno de estos factores fue de riesgo significativo, pero consideramos que pudieron haber influido en el desarrollo de las LEBG encontradas en esta población.

Es importante resaltar que a pesar de que las mujeres incluidas refirieron tener una pareja sexual (dato no mostrado), 229 (87.2%) de las 260 mujeres fueron VPH positivas por PCR, encontrándose 28 tipos diferentes de VPH de las cuales el 49.8% tuvieron VPH-AR siendo el más frecuente el VPH-16 seguido del VPH-18, al respecto se conoce que el VPH se transmite sexualmente y la pareja sexual masculina puede presentar la infección de manera asintomática o tener varias parejas sexuales. Lo cual se considera un factor de riesgo para el desarrollo de las lesiones premalignas, por lo que es importante obtener información epidemiológica de los varones,

compañeros sexuales de las mujeres con estas lesiones y el monitoreo de la mucosa uretral para el control y seguimiento de la infección por VPH en ambos.^{7,24,38}

El estudio citológico mediante el método de Papanicolaou (citología cervicovaginal convencional) ha sido una técnica muy eficiente para detectar de forma temprana el carcinoma invasor del cérvix uterino, pero los errores en la toma de muestra de la zona de transformación escamocolumnar, lugar donde inician las lesiones premalignas y malignas del cérvix uterino, es una de las principales causas más importantes del diagnóstico inadecuado por este método. Actualmente se señala que una alternativa en el diagnóstico citológico es la citología en base líquida, la cual representa una ventaja técnica comparada con la citología convencional ya que permite la conservación de la muestra para realizar estudios posteriores como la inmunocitoquímica^{29,39-41}, razón por la cual se utilizó en el presente estudio. Es importante señalar que la mayoría de las pacientes sangraron a la toma de muestra y/o presentaban mucho moco vaginal, sin embargo, los extendidos en monocapa obtenidos por citología en base líquida estuvieron libres de eritrocitos y detritos celulares, permitiendo la obtención de extendidos limpios, que facilitaron la visualización de la expresión de p16^{INK4a}, que no hubiéramos logrado con el método convencional.

La infección por VPH es un factor determinante para la progresión de carcinoma invasor del cérvix uterino y se ha descrito que la expresión de p16^{INK4a} es inducida por las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo^{2,13,15,28,31}. De todas las muestras analizadas aquellos casos que fueron negativos a la infección de VPH tanto por citología como por PCR fueron negativos a la expresión de p16^{INK4a}. De las 84 muestras que fueron citológicamente normales pero que fueron positivas a la infección del VPH por PCR, 19 (26.6%) fueron positivas a la expresión de p16^{INK4a}; así como también fueron positivas a p16^{INK4A} 68(48.9%) casos de 139 con LEIBG sin displasia y 5(83.3%) de 6 casos con LEIBG mas displasia leve, lo que permite deducir que la sobreexpresión de p16^{INK4a} podría ser consecuencia de la infección por VPH.

Con el propósito de encontrar un método que permita identificar de forma temprana la transformación celular, ocasionada por la presencia de VPH-AR, se ha propuesto la utilización de anticuerpos monoclonales como una herramienta para la detección de biomarcadores, que permitan distinguir células neoplásicas de células normales. Además de que se considera que los criterios morfológicos no son suficientes para distinguir lesiones que pueden revertir de aquellas que pueden persistir y progresar. Se ha encontrado que la expresión de p16^{INK4a} en cortes histológicos, se incrementa a medida que avanza la lesión en el cérvix uterino y que es un marcador potencial de lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado^{18,19}. En este estudio se encontró que los casos con LEIBG expresaron p16^{INK4a} tanto en el núcleo como en el citoplasma. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Saqi *et al.*³⁰ y Bibbo *et al.*²⁹ quienes también realizaron la inmunotinción de p16^{INK4a} en muestras citológicas en base líquida. No se detectó la expresión de p16^{INK4a} en células normales sin LEIBG ni VPH por PCR, lo que concuerda con resultados obtenidos por Volgareva *et al.*¹⁹ Es importante señalar que muestras citológicas que fueron negativas para este marcador son fáciles y rápidamente interpretadas como negativas sin cambios displásicos y/o del VPH. En relación a las citologías normales sin cambios displásicos o coilocíticos que tuvieron tipos virales de alto riesgo por PCR y que no expresaron p16^{INK4a}, podemos atribuir el hecho de que el virus se encuentre en estado no productivo, donde el genoma viral se establece como plásmido nuclear (estado episomal), con un número bajo de copias donde no hay expresión de genes que codifican para proteínas virales como E6 y E7. Además es importante mencionar muchos estudios señalan que existen polimorfismos en los genes virales E6 y E7 que codifican proteínas con mayor o menor afinidad por p53 o pRb, respectivamente, lo que explicaría en parte que muchas mujeres infectadas con algún tipo de VPH, incluso de alto riesgo, presenten una citología cervical normal.⁴²⁻⁴⁴ Por lo que sería necesario el monitoreo y seguimiento no sólo citológico, sino colposcópico y molecular más estrecho para vigilar este proceso, ya que en muchos de estos casos, podría desaparecer la infección por VPH sin tratamiento.

En los casos de LEIBG con cambios colicitos característicos de la infección por VPH se encontró que algunas células fueron positivas a la expresión de p16^{INK4a}, además fueron positivas a este marcador células basales profundas, parabasales y en células de metaplasia escamosa endocervical. Estos hallazgos son relevantes ya que las células basales y parabasales profundas están en constante proliferación, lo que pudiera sugerir la activación de oncogenes virales en células que son susceptibles a transformación neoplásica. Además las células de metaplasia escamosa endocervical que están en constante recambio celular del epitelio cilíndrico a epitelio plano en la zona de transformación escamocilíndrica son susceptibles a los efectos mutagénicos de los oncogenes E6 y E7 de los VPH-AR.

Otro aspecto que es importante señalar en este estudio, es el hallazgo de que en algunos casos de LEIBG con VPH-AR, las células cilíndricas con cambios reactivos fueron positivas a p16^{INK4a} tanto en el núcleo como en el citoplasma. Al respecto, Negri *et al*⁴⁵ encontraron que los casos de adenocarcinoma invasor y adenocarcinoma *in situ* sobreexpresaron p16^{INK4a} a diferencia de las células cilíndricas con cambios reactivos que fueron negativas al marcador, por lo que nuestros resultados muestran que estas pacientes requieren una vigilancia más estrecha debido a que las células cilíndricas son precursoras del adenocarcinoma y dicho cáncer es el segundo más frecuente en el cérvix uterino.⁴⁶ Así mismo, la evaluación de p16^{INK4a} podría ser relevante en el diagnóstico de atipias glandulares endocervicales y adenocarcinoma *in situ* ya que son de difícil detección al no localizarse en la parte externa del cérvix uterino, sino en el canal endocervical. Lo cual dificulta su detección no sólo por citología convencional sino por colposcopia, además, de que las características patognomónicas de la infección por VPH que se observan en las células del epitelio plano escamoso son difíciles de observar en las células cilíndricas, de ahí la importancia de seguir analizando la utilidad de biomarcadores como p16^{INK4a} en lesiones endocervicales y su relación con los VPH-AR para diferenciar lesiones de alto grado en el canal endocervical, dada la importancia de esta zona en el desarrollo del adenocarcinoma invasor, el cual es de peor pronóstico y compromete la vida de las pacientes en menor tiempo. Además,

este tipo de cáncer también está relacionado con el VPH tipo 16 y 18, a nivel mundial y en población mexicana.

Se observó claramente que la mayoría de las LEIBG que fueron positivos a la expresión de p16^{INK4a} presentaron tipos VPH-AR siendo más evidente en aquellos casos donde había presencia del VPH-16, en 36 (70.6%) casos con LEIBG sin displasia y en 2 (100%) muestras con LEIBG mas displasia leve. Estos resultados son similares a los obtenidos por Klaes *et al*,³⁰ quienes consideran que la expresión de p16^{INK4a} se atribuye a los tipos de VPH oncogénicos y que la expresión de esta proteína puede ser un marcador sustituto de la expresión de E6 y E7, ya que p16^{INK4a} no es evidente en células normales.

Se observó que la expresión de p16^{INK4a}, aumentó de acuerdo con las alteraciones celulares observadas en las citologías, así los casos con LEIBG sin displasia tuvieron una asociación significativa con la expresión de p16^{INK4a} (OR=29.8; IC95% 4.7-1231.9), También se observó asociación significativa (OR=96; IC95% 5.7-4535.5) en los casos con LEIBG mas displasia leve. Concluyendo que la detección de la expresión de p16^{INK4a} en LEIBG VPH-AR positivas en las muestras citológicas en base líquida puede contribuir a diferenciar lesiones tempranas más agresivas con potencial de progresión a LEIAG, que deben ser vigiladas más estrechamente. Por lo que, consideramos que, dado que el inmunomarcaje para p16^{INK4a} es fácil y rápidamente reproducible e identifica las LEIBG con infección por VPH-AR, este puede ser una alternativa para mejorar y/o complementar la detección oportuna de carcinoma invasor del cérvix uterino a través del método de citología en base líquida. Así, aunado al diagnóstico molecular de los tipos de VPH, permiten orientar el diagnóstico de la LEIBG y mejorar la elección de tratamientos adecuados que permitan de forma oportuna mejorar la situación clínica de las pacientes.

Con base a los resultados obtenidos sugerimos que para aumentar el valor predictivo y pronóstico de p16^{INK4a}, es necesario incrementar el tamaño de la muestra e incluir lesiones de alto grado para su implementación en los programas de tamizaje

cervical. También sería importante seguir explorando en muestras de citología en base líquida la relación de los VPH-BR y la expresión de p16^{INK4a} para conocer si hay diferencias entre los VPH-AR en LEIBG.

V. REFERENCIAS.

1. Bravo J, Vitoria ME. Ciclo celular y carcinogénesis: Expresión de la proteína p16 en lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas del cuello uterino. *Acta Científica Estudiantil* 2006;4:176-187.
2. Kalof AN, Evans MF, Simmons L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4a Inmunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns. *Am J Pathol.* 2005;29:674-679.
3. Lacruz PC. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolaou a Bethesda 2001). *Rev Esp Patol* 2003;36:5-10.
4. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287:2114-2119.
5. Casanova G, Alonso P, Arredondo JL, Narcio ML. La infección del virus del papiloma humano, (VPH) en la zona de transformación del cérvix uterino. *Perinatol reprod hum.* 1992;6:40-44.
6. Evans MF, Cooper K. Human papillomavirus integration: detection by in situ hybridization and potential clinical application. *J Pathol.* 2004;202:1-4.
7. Benevolo M, Mottolise M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, et al. Immunohistochemical expression of p16^{INK4a} is predictive of HR-VPH infection in cervical low-grade lesions. *Modern Pathol.* 2006;19:384-391.
8. Muñoz N, Castellsagué X, Berrington A, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24:1-10.
9. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer C, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:244-265.
10. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angström T, Lindström MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer.* 2004;10:2407-2414.
11. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J of Patology.* 1998;153:1741-1748.
12. Queiroz C, Correia T, Alves V, Villa L, Costa M, Travassos A, et al. p16^{INK4a} expression as a potential marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol.* 2006;202:77-83.
13. Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. 2007;7:1-11.
14. De Putte G, Holm R, Lie K, Tropé C, Kristensen G. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Ginecol Oncol.* 2003;89:140-147.
15. Braden WA, Lenihan JM, Lan Z, Scott K, Zargoski W, Bosco E, et al. Distinct action of the retinoblastoma Phatway on the DNA replication machinery defines specific roles for cyclin-dependent kinase complexes in prereplication complex assembly and S-phase progression. *Mol cell boil.* 2006;26:7667-7680.

16. Kheif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR. Inhibition of cyclin D-CDK4, CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Natl Acad Sci.* 1996;93:4350-4354.
17. Michalides RJ. Cell cycle regulators: mechanisms and their role in etiology, prognosis and treatment of cancer. *J Clin Pathol.* 1999;52:555-558.
18. Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16^{INK4a} as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrepTM smears. *J Clin Pathol.* 2003;56:56-63.
19. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer.* 2004;4:1-10.
20. Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecologic oncology.* 2001;82:238-46.
21. Pientong C, Ekalaksananan T, Swadpanich U, Kongyingoes B, Kripetcharat O, Yuenyao P. Immunocytochemical detection of p16INK4a protein in scraped cervical cells. *Acta Citol.* 2003;47:616-623.
22. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon C, Beach D, DePinho R. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell.* 1996;85:27-37.
23. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16^{INK4a}-RB pathway: molecular link between molecular senescence and tumor suppression. *J of Medical Invest.* 2004;51:146-153.
24. Murphy N, Ring M, Heffron C, King B, Killalea AG, Hughes C, et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2005;58:525-534.
25. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol.* 2004;78:11451-460.
26. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Advances in anatomic pathology.* 2001;8:83-92.
27. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32:7-15.
28. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K, et al. Overexpression of p16 INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J of Gynecol Cancer.* 2006;16:347-353.
29. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4a antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol.* 2002;46:24-29.
30. Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P. Overexpression of p16INK4a in liquid-based specimens (surepathTM) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagnostic Cytopatol.* 2002;27:365-370.
31. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry KU. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001;92:276-284.
32. Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital human papillomavirus infection by consensus PCR amplification. In: Herrington CS, McGee JO, eds. *Diagnostic molecular pathology: A practical approach*, Oxford: Oxford University Press; 1992:131-152.

33. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;170:1077-85.
34. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, 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;76:412-17.
35. Lazcano P, Herrero LR, Muñoz N, Cruz A, Shah K, Alonso P et al. Epidemiology of HPV infection among mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91:412-420.
36. Mejia LS, Rangel G, Hernández M, Lazcano E. Cervical cáncer, a disease of poverty: mortality differences between urban and areas in Mexico. *Salud Pública Méx.* 2003;45 :315-325.
37. Castellsague X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002;89:191-199.
38. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Frascchi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;88:63-73.
39. Sotelo R, Flores L, Ibarra M, Solorza G, Osorio M, García A. Estudio comparativo preliminar entre citología cervicouterina convencional y en monocapa. *Gamo* 2005;4:24-27.
40. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S, Knebel M. Evaluation of nuclear score for p16^{INK4a}-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer cytopatol* 2005; 105:461-467.
41. Trunk M, Hellweg G, Ridder R, Petry KU, Ikenberg H, Schneider V, et al. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol.* 2004;48:771-782.
42. Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tegaonkar V, Lui Y, Androphy EJ and Stanley MA. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol* 2004;78:5934-5945.
43. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP and Wheeler CM. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer* 1997;89:796-802.
44. Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Cancer Inst.* 2000;92:690-698.
45. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A et al. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *American Journal of Surgical Pathology*, 2003, 27: 187–193.
46. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Fu E. Expression of p16INK4a in pap smears containing atypical glandular cells from cervix uterine. *Acta Cytol.* 2004, 48:173-180.