



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

“Expresión de COX-2, MMP-9 y VEGF en lesiones premalignas de cérvix uterino e infección por el virus del papiloma humano”

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

P R E S E N T A:
MED. MIRNA AZALEA ROMERO HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. AMALIA VENCES VELÁZQUEZ
CODIRECTORA: DRA. LAURA SIERRA LÓPEZ

Chilpancingo, Gro. Noviembre de 2009.



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

APROBACIÓN DE TESIS

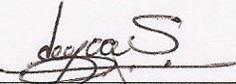
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de julio de dos mil nueve, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Expresión de COX-2, MMP-9 Y VEGF en lesiones premalignas de cérvix uterino e infección por el virus del papiloma humano", presentada por la alumna Mirna Azalea Romero Hernández, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

~~El Comité Tutorial~~

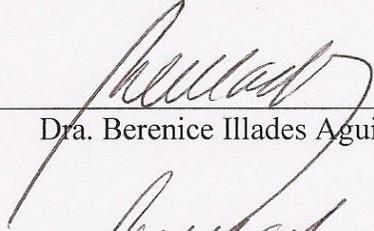
Dra. Amalia Wences Velázquez
Dirección de tesis



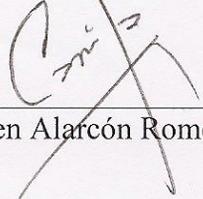
Dra. Laura Sierra López
Codirección de tesis



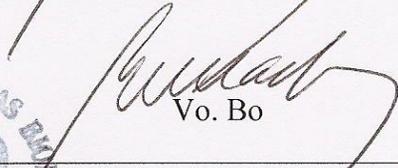
Dra. Emma Rosalba Leyva Salgado



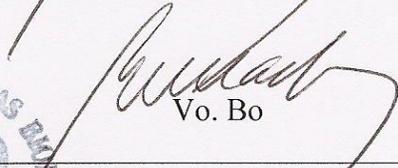
Dra. Berenice Illades Aguiar



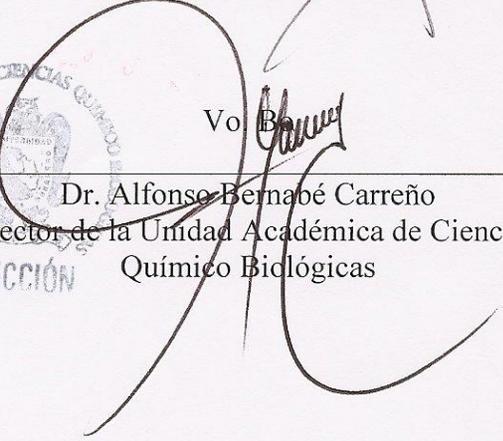
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero



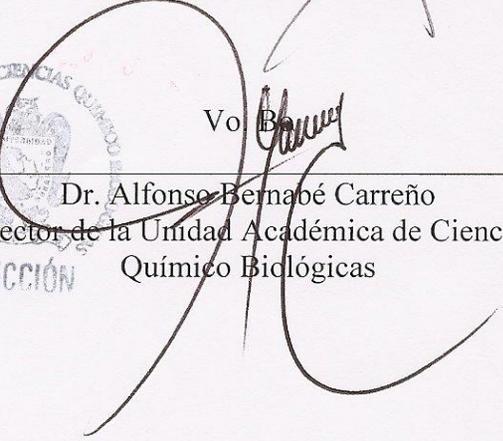
Vo. Bo



Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



Vo. Bo



Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología y Diagnóstico Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Amalia Vences Velázquez
Dra. Laura Sierra López

La asesoría de:

Dra. Laura Sierra López
Dra. Emma Rosalba Leyva Salgado
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero
Dra. Berenice Illades Aguiar

Con la colaboración de:

Área de patología quirúrgica del Hospital General Regional “Vicente Guerrero” del Instituto Mexicano del Seguro Social en Acapulco Guerrero.

Dra. Laura Sierra López y Dra. Cristina Ochoa.

Esta investigación se desarrolló con financiamiento otorgado a **exbecarios PROMEP UAGRO-EXB-107** por la Subsecretaría de Educación Superior en el Programa de Mejoramiento del Profesorado (**PROMEP/ 203-5/07/2424**).

Durante el periodo de curso de la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Mirna Azalea Romero Hernández, recibió la beca del **CONACYT**.

AGRADECIMIENTOS:

A toda mi familia por su apoyo, comprensión pero sobre todo paciencia, a mi hermanito Billy por brindarme espacio en su hogar indispensable en para la etapa inicial de la maestría.

A la Dra. Amalia por la absoluta confianza y libertad para desarrollarme en este proyecto.

A la Dra. Laura Sierra López por su inmenso apoyo, comprensión en el desarrollo de este trabajo en el sentido profesional y personal, por su tiempo, además de la persistencia y optimismo.

A la Dra. Christina Ochoa y Dr. José Francisco Coppe por su atención y tiempo dedicado al análisis de este proyecto.

A mis sinodales: Dra. Emma Rosalba Leyva Salgado, Luz del Carmen Alarcón Romero, Berenice Illades Aguiar.

A mi tutora Dra. Adakatia Armenta Solís por sus atenciones.

Al histotecnólogo Enrique Villavicencio Cruz, Al Dr. Martín Morrugares y su esposa QBP. Kenia Sánchez Villamil, a la técnica Rebeca Rojas López por su apoyo técnico en este proyecto.

A Laboratorio de Investigación en Citopatología ginecológica en especial a la MC. Ariana Vega Peña por su entrenamiento, tiempo y espacio dedicado.

A todas las personas del laboratorio de Biología celular del Cáncer: Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, MC. Miguel Mendoza Catalán, QBP. Gema Cristobal M., y QBP. Jesús Adame G., por su ayuda y brindarme un espacio en los momentos de crisis.

A mis compañeros de la MCB: Alinne, Ariana, America, Adriana, Jazmin, Luz, Kimberly, Yazmin, Yuliana, Miguel, Lucio, Daniel, Luilli, Jorge, Julio por su aceptación, compañía y compañerismo, fue una etapa fabulosa gracias a ustedes.

A todos mis profesores de MCB, por su empeño en las clases, consideraciones y sonrisas.

A la Biol. Paola Ramírez Macedo y QBP. Anahí Barales Mara por su esfuerzo y asombrosa dedicación en todo lo referente a los alumnos de MCB, y sus atenciones personales.

Bendiciones a todos.

DEDICATORIAS

A mi mejor amigo y maestro Dr. **Luis Arturo Velasco Rodríguez**, por apoyarme hasta el exceso, aconsejarme y ser el demonio siempre a mi derecha. Te quiero mucho.

A mi mamy Juana por ser ejemplo del valor de una mujer, a mi mamy Mary por tenerme en sus sueños, a mi papá Alfonso por enseñarme a ser amazona, los tres por estar cada vez que vuelvo a empezar.

A mis hermanos Luis Alfonso, Bernardo Axel, Ulises, Indira Katia, Sandino Armando, Hermes, Tonantzín Arcadia y Adriana por su paciencia, amor y respeto.

A mis bebés: Ulises, Ponchito, Axel, Erick, Alexa, Eleazar y Valeria por sus sonrisas y travesuras que aminoran mis tristezas, y me comparten la magia de la niñez.

A mis amigos: Miguel y Adriana que me mantuvieron de pie, a Lucio, Luz, América, Ariana, por su constancia, cariño y cuidado, hay como los re-quiero, son otros nombres más en la lista que sigue creciendo.

A mis amigos que siguen siendo parte del presente: Mariela, Alejandra, Norberto, Alfredo, Beatriz Rojas, Beatriz Hernández, Sonia, Silvia, Salvador, David, Jesús Gálvez, Jesús Sánchez, Rhode, Ulianov.

Y Adriana Contreras otra vez, por que para ella nunca es suficiente.

A mis amigos del laboratorio de Inmunobiología: Hector, Vanesa, José Antonio, Adelina, Josefina, Mayra, mi Little brother Jorge, Nayely, Heisy, Liz y Enedina, por los buenos ratos, compartir el espacio; Buena suerte en sus trabajos.

ÍNDICE

	PÁGINAS
I. RESUMEN	
II. ABSTRACT	
III. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	5
III. RESULTADOS	11
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	19
V. REFERENCIAS	25

RESUMEN

Antecedentes: El CaCU sigue siendo la primera causa de morbilidad y mortalidad de los cánceres femeninos en México. La inflamación crónica se ha relacionado con la génesis y progresión de CaCU, varios autores han reportado a la ciclooxigenasa-2 (COX-2) asociada a la carcinogénesis cervical, por acción directa y por medio de la producción de prostaglandinas (PGs), PGE2 está relacionada principalmente con la proliferación celular e inhibición de la apoptosis, promoción de angiogénesis por estimulación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y con la metástasis a través de la degradación de la membrana basal por inducción de metaloproteinasa-9 (MMP-9). Por otro lado, la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) está relacionado con la expresión de COX-2, MMP-9 y VEGF.

Objetivo: Evaluar la expresión de COX-2, MMP-9 y VEGF y su asociación con la presencia de VPH-AR y el grado de las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado.

Material y métodos: La expresión de COX-2, MMP-9 y VEGF se determinó por medio de inmunohistoquímica; la presencia del ADN del VPH se evidenció mediante hibridación *in situ* con amplificación con tiramida en los tejidos de cérvix uterino, en biopsias y conos de 120 pacientes procedentes del Hospital Vicente Guerrero de Instituto Mexicano del Seguro Social de la Cd. de Acapulco. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba exacta de Fisher, correlación de contingencia, y regresión logística múltiple y lineal.

Resultados: Se encontró asociación significativa con la intensidad de expresión de COX-2, MMP-9 y VEG entre LEIBG (OR= 12.4, 8.4 y 8.1) y LEIAG (OR= 6.8, 5.7 y 25.8); se encontró asociación entre la infección por VPH-AR y la intensidad de la expresión de COX-2, MMP-9 y VEGF (OR= 1.6, 3.1 y 4.9).

Conclusiones: COX-2 se sobreexpresa en LEIBG; MMP-9 y VEGF son potenciales biomarcadores de progresión de lesión escamosa intraepitelial y además están asociados con la infección del virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico.

ABSTRACT

Background: Low-grade (LSIL) and high-grade (HSIL) squamous intraepithelial lesions represent premalignant stages of cervical cancer. Cervical cancer represents the first cause of cancer-associated deaths among Mexican women. Chronic inflammation has been associated with the genesis and progression of cervical cancer. Cyclooxygenase-2 (COX2) expression is associated with cervical cancer progression, due to its direct role on the production of prostaglandins (PGs). Production of prostaglandin E2 (PGE2) by tumor cells has been associated with an increase in cell proliferation, inhibition of apoptosis, increase angiogenesis mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF) production, induction of metalloproteinase-9 (MMP9) and basal membrane degradation, and metastasis.

Objective: To determine the association of COX2, MMP-9 and VEGF expression, the presence of LSIL and HSIL, and the presence of high-risk HPV. Evaluate if these proteins as potential markers for cervical cancer progression.

Methods: The expression of COX-2, MMP-9 and VEGF was evaluated using Immunohistochemistry. The detection of HR-HPV DNA was done by tyramide amplification-based in situ hybridization. We included 120 cervical biopsies from woman who attended the "Vicente Guerrero" Hospital (IMSS) in Acapulco, during August 2008 and April 2009. The statistical analyses used were Fisher's exact test, contingency correlation's, and logistic regression.

Results: we found a significant association between the expression of COX-2, MMP-9 and VEGF (OR= 6.8, 5.7 and 25.8, respectively) and the presence of HSIL. We also found an association between the presence of HR-HPV and the expression of COX-2, MMP-9 and VEGF (OR= 1.6, 3.1 and 4.9, respectively).

Conclusions: COX-2 is express in LSIL, MMP-9 and VEGF are potential biomarkers of evolution of Scamous intraepitelial lesions and are to raise for the papillomavirus high risk infections.

I. INTRODUCCIÓN

La inflamación es un mecanismo de defensa que participa en la resolución fisiológica de procesos patológicos, por medio de una red multifactorial de señales químicas que activan y reclutan a los leucocitos. Un grupo de leucocitos, los neutrófilos, coordinan la migración de células inflamatorias al sitio de la lesión, produciendo la remodelación de la matriz extracelular y la fijación de éstas a la superficie endotelial, inducen la activación de metaloproteinasas (MMPs) que facilitan la transmigración de células inflamatorias al sitio de la lesión ¹. Los macrófagos tisulares producen factores de crecimiento, citocinas, inducen la síntesis y liberación de histamina, complejos de proteasas, proteoglicanos sulfatados, mediadores lipídicos por mastocitos, COX-1 y 2, PGE2 y factores proangiogénicos. La producción y liberación de estos factores es autolimitada, y cuando esta regulación falla, ocasiona persistencia de la respuesta inflamatoria en el microambiente^{1,2}, dando como resultado un proceso inflamatorio crónico ³. El proceso de inflamación crónica, se ha observado en enfermedades como la artritis reumatoide, enfermedad de Bowen, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y esófago de Barrett, las cuales han correlacionado ampliamente con el desarrollo de diversos cánceres humanos²⁻⁵. La infección por el virus del papiloma humano está relacionado con la cervicitis y con el cáncer cérvicouterino (CaCU) ^{5,6}.

Desde el punto de vista molecular, se ha sugerido que algunos de los factores producidos y secretados durante un proceso inflamatorio, están asociados con el desarrollo de neoplasias. La enzima ciclooxigenasa (COX) induce la producción de prostaglandinas (PGs) a partir del ácido araquidónico de la membrana lipídica en el sistema fagocítico mononuclear. Tiene dos isoformas, COX-1 y COX-2, la segunda aumenta su expresión ante situaciones fisiopatológicas como estímulos inflamatorios, factores de crecimiento, oncogenes y promotores de tumor ⁷⁻⁹. La sobreexpresión de COX-2 es considerada como un factor que influye en la génesis y progresión de diferentes tipos de tumores cancerosos humanos como el colorectal, mama, ovario, y de cérvix uterino (CaCU), entre otros ¹⁰⁻¹².

Uno de los mecanismos mediante los cuales COX-2 participa en la oncogénesis es la producción de PGE2. PGE2 induce inmunosupresión, inhibición de la apoptosis por la activación de la vía IPK 3/Akt, sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 y Mc1-1^{8,11,13}, inhibe a la proteína p27¹⁴, sobreexpresa al factor de crecimiento endotelial (VEGF)⁷, un potente mitógeno endotelial que además promueve la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de células endoteliales¹⁵, es considerado por sí mismo como un factor de mal pronóstico¹⁶, estimula la degradación de la matriz extracelular a través de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y produce la pérdida de E-caderina¹³. Por otro lado, la gelatinasa B o MMP-9 está implicada en la angiogénesis durante la carcinogénesis del páncreas, aumentando la asociación de VEGF con su receptor VEGFR2,^{17,18} además confiere inmunosupresión al hacer corte en el receptor IL2-R α disminuyendo la regulación y capacidad proliferativa de los linfocitos T citotóxicos¹⁹. La actividad de MMP-9 está correlacionada con la invasión linfovascular y enfermedad recurrente, mal pronóstico en carcinoma hepatocelular, pancreático, renal y de ovario²⁰.

La lesión escamosa intraepitelial (LEI) de bajo grado (LEIBG) y alto (LEIAG) son alteraciones previas del CaCU. Las LEI se caracterizan por presentar alteración de la arquitectura celular, en la relación núcleo citoplasma y en la maduración escamosa. En la mayoría de los casos, las LEIBG pueden revertirse a un epitelio sano, mediante la acción del sistema inmunitario y con la influencia de diversos factores aun no comprendidos del todo, y sólo un porcentaje bajo progresa a LEIAG²¹. Algunos estudios han encontrado asociación entre la persistencia del proceso inflamatorio en muestras de citología cervical y el desarrollo de LEIAG^{21,22}.

A pesar de que el CaCU es 100% prevenible por medio de la detección oportuna de LEI, por diversas razones la incidencia del CaCU sigue siendo alta en los países en vías de desarrollo, en México sigue siendo la principal causa de muerte de entre los cánceres ginecológicos; las LEI en el año 2007 ocuparon el vigésimo lugar como causa de enfermedad en mujeres de 25 a 44 años, con una tasa de incidencia de

172.39 por 100 000 mujeres mexicanas. El estado de Guerrero ocupó el cuarto lugar nacional con 3, 383 nuevos casos, y en la actualidad las investigaciones están centradas en la búsqueda de un panel de biomarcadores moleculares como las proteínas que participan en la regulación del ciclo celular, la inflamación, angiogénesis, metástasis entre otras, que permitan predecir la evolución de LEI.

La infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), es uno de los factores de mayor importancia bajo la premisa de ser causa necesaria pero no suficiente para desarrollar CaCU, además la infección por VPH tiene alta incidencia en México ²³.

COX-2 se ha sugerido como factor pronóstico de comportamiento clínico agresivo, baja respuesta al tratamiento oncológico⁸, predictor potencial de metástasis y baja supervivencia a CaCU⁹⁻¹³. Por medio de PGE2 estimula la proliferación de células tumorales, promoviendo la exacerbación del cáncer, metástasis tumoral y especialmente la angiogénesis^{7,11}. Pero también se ha reportado su acción de manera independiente de PGs, actuando sobre p53, p27, p21^{14,24}. COX-2 es referido por varios autores en la participación de la carcinogénesis de CaCU, al reportarse aumento de su expresión en los diferentes grados de LEI ^{7,13,25}. Se ha reportado a la proteína E5 del VPH 16 como inductora de los receptores EP4 de PGE2 aumentando la disponibilidad del receptor incrementando los niveles de cAMP activando la proteína cinasa A (PKA), que fosforila al elemento de respuesta al cAMP (CRE) y la proteína de unión a CRE (CREB), que se unirá al sitio promotor del receptor de PGE (EP4); por otro lado, a través de la vía de los receptores de EGFR inducen a COX-2 y a su vez la producción de PGE2 que favorecen la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), creando un circuito de retroalimentación positiva entre COX-2, PGE2 y del receptor EP4 potenciando la progresión de la enfermedad ²⁶. También las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 interactúan con el sitio promotor del gen COX-2 favoreciendo su sobreexpresión ²⁷.

La angiogénesis es esencial para el desarrollo de los tumores sólidos, VEGF es uno de los principales factores proangiogénicos, como participante en la carcinogénesis de diferentes cánceres como CaCU, se considera como factor pronóstico de progresión tumoral, metástasis y supervivencia^{16,28-32}, algunos estudios lo refieren como factor pronóstico de fenotipo celular maligno, ya que se ha reportado correlacionado de manera positiva con el grado de LEI de cérvix uterino y en CaCU^{7,33}. La angiogénesis se ha relacionado también con el VPH, y se ha reportado que la oncoproteína regula los sitios SP-1 de la región promotora de los receptores de VEGF³⁴⁻³⁶, también E6 y E7 inducen por otro lado al HIF-1 α promoviendo indirectamente a VEGF³⁷.

MMP-9 se ha propuesto como indicador de fenotipo maligno en CaCU³⁸⁻⁴¹. El aumento de la actividad proteolítica de MMP-9, está correlacionada con la progresión de CaCU, por lo que es considerado como factor de mal pronóstico^{39,42}, recurrencia, y metástasis^{20,32}. Se ha encontrado sobreexpresada en los diferentes grados de LEI con correlación significativa, además está fuertemente asociado con el proceso inflamatorio crónico⁴¹.

En el presente estudio se evaluó la expresión las proteínas COX-2, MMP-9 y VEGF, en muestras de mujeres sin alteraciones neoplásicas (sanas), y otras que cursaban con LEIBG, LEIAG, además se estudió la presencia de la infección por el VPH-AR. Se determinó la asociación entre la sobreexpresión de COX-2, VEGF y MMP-9 con el grado de LEI y VPH-AR, que puedan en un futuro ser biomarcadores de uso clínico como predictores de progresión, para orientar al seguimiento y manejo de mujeres con este padecimiento.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio transversal comparativo de análisis retrospectivo durante el periodo agosto 2008-abril 2009. Se incluyeron 120 casos entre biopsias y conos de tejido cervical uterino incluidas en parafina clasificadas por diagnóstico histopatológico, se utilizó la clasificación de Richard de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y se le dio equivalencia con el sistema Bethesda: lesión escamosa intraepitelial (LEI), obteniendo tres grupos: tejido cervical sano, LEIBG y LEIAG. Los diagnósticos confirmados fueron proporcionados por dos patólogas certificadas.

Tratamiento de muestras, recolección y conservación. Una parte del muestreo se realizó en el área de quirófano del Hospital General Regional Vicente Guerrero (de pacientes sometidas a histerectomía por causas distintas de alteraciones neoplásicas) y fueron fijadas en formol amortiguado, para posteriormente ser incluidas en parafina (sanos), otras muestras provenían de bloques de parafina de biopsias y conos cervicales tomadas bajo guía colposcópica en el consultorio de detección oportuna del CaCU, y fueron enviadas al departamento de patología para valoración por el servicio de Patología Quirúrgica del Hospital General Regional (HGR) Vicente Guerrero del IMSS de la ciudad de Acapulco, Gro. La selección de las muestras se llevó a cabo con base en el diagnóstico histopatológico. A partir de las muestras incluidas en parafina, se hicieron cortes de 3 μ m de espesor con un micrótopo Spencer 820 de American Optical Corporation, y fueron colocados en portaobjetos previamente silanizados, para trasladarlas al Laboratorio de Inmunobiología y Diagnóstico Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas en Chilpancingo Gro., donde fueron procesadas.

Consideraciones éticas y de bioseguridad

Las muestras trabajadas fueron de manejo confidencial etiquetadas por número de folio de acuerdo a la recolección, designado en el Servicio de Patología del Hospital General Vicente Guerrero del IMSS para su valoración, manejando como único dato adicional la edad de la paciente.

En este estudio se respetaron tres principios fundamentales de la Bioética principialista: 1. Dignidad de la persona humana, 2. Beneficencia no maleficencia y 3. Justicia.

Entendiéndose como dignidad de la persona humana a la consideración bio-psico-social y espiritual de la persona, , beneficencia no maleficencia a la búsqueda de un beneficio sin ocasionar daño, únicamente producir un mal menor.

Los materiales biológicos fueron tratados como muestras potencialmente infecciosas y el desecho de los RPBI se realizó de acuerdo a lo estipulado en la norma NOM-087-ECOL-2002.

INMUNOHISTOQUÍMICA:

Para determinar la expresión y localización celular de las proteínas COX-2, VEGF y MMP-9, se utilizaron las siguientes clonas de anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano de la clona CX-294, isotipo IgG1 kappa para COX-2, anticuerpo monoclonal anti-VEGF, clona VG1, isotipo IgG1 kappa, y un anticuerpo policlonal de conejo anti MMP-9 de DAKO. El revelado se llevó a cabo con el sistema de detección Dako LSAB+ System-HRP.

Los cortes histológicos de 3µm se colocaron en el horno a 60°C durante 30 minutos, se rehidrataron, posteriormente se realizó la recuperación antigénica con solución recuperadora (DakoCytomation target retrieval solution, citrate pH6, code No. S2369, Denmark A/S), (1:10) con pH de 6.0 para COX-2, y pH 9.0 para VEGF y MMP-9, se colocó en la olla de vapor EXOTIC moulinex a 100°C por 40 minutos, se dejaron

enfriar para posteriormente ser lavados en agua destilada y se bloqueó la peroxidasa endógena, mediante la aplicación de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 15 minutos, se realizó lavado en PBS por 5 min y se realizó bloqueo de sitios inespecíficos con aplicación de albúmina sérica bovina al 1% en PBS por 30 minutos, seguido por un lavado con agua destilada y se adicionó el anticuerpo primario, con diluyente de anticuerpo (DakoCytomation Antibody Diluent code S0809), en dilución 1:100 para COX-2 y MMP-9, y 1:50 para VEGF. Las muestras se incubaron a 28°C en cámara húmeda durante 45 minutos para COX-2, 30 minutos a 22°C para MMP-9, y 1 hora a 22°C para VEGF, posteriormente se aplicó el anti-anticuerpo acoplado a biotina por 30 minutos en cámara húmeda a 22°C, se agregó la peroxidasa de rábano (HRP) por 15 minutos en cámara húmeda a 28°C para COX-2, a 22°C para MMP-9 y VEGF y se hizo el revelado con diaminobencidina (DAB) durante 5 minutos. Finalmente, se contratiñó con hematoxilina de Meyer y se realizó el montaje con resina sintética (HYCEL), para su posterior observación al microscopio.

Para la evaluación de COX-2, MMP-9 y VEGF, se tomaron como positivas las células que presentaron una coloración café a nivel de citoplasma, y se clasificaron en función del tercio teñido en el espesor del epitelio escamoso estratificado, y la intensidad de la inmunotinción. Los tercios del epitelio fueron clasificados en 4 categorías 0 (negativo), primer tercio (capa basal y parabasal), segundo tercio (capa intermedia) y tres tercios (todo el espesor); de la misma manera la intensidad tuvo 4 categorías señaladas con intensidad de cruces 0- (negativo), 1+ (leve), 2+ (moderada), 3+ (fuerte).

Controles de validación:

Para estandarizar y validar los resultados en cada corrimiento del método inmunohistoquímico, se utilizaron cortes histológicos conocidos que sobreexpresaron cada una de las proteínas en estudio, se usó un corte de adenocarcinoma de colon para COX-2 y VEGF, carcinoma ductal de mama para MMP-9, y de CaCU invasor

para COX-2, VEGF y MMP-9. Como control negativo se usaron para cada marcador cortes de tejido de cérvix de recién nacida (RN) figura 1.

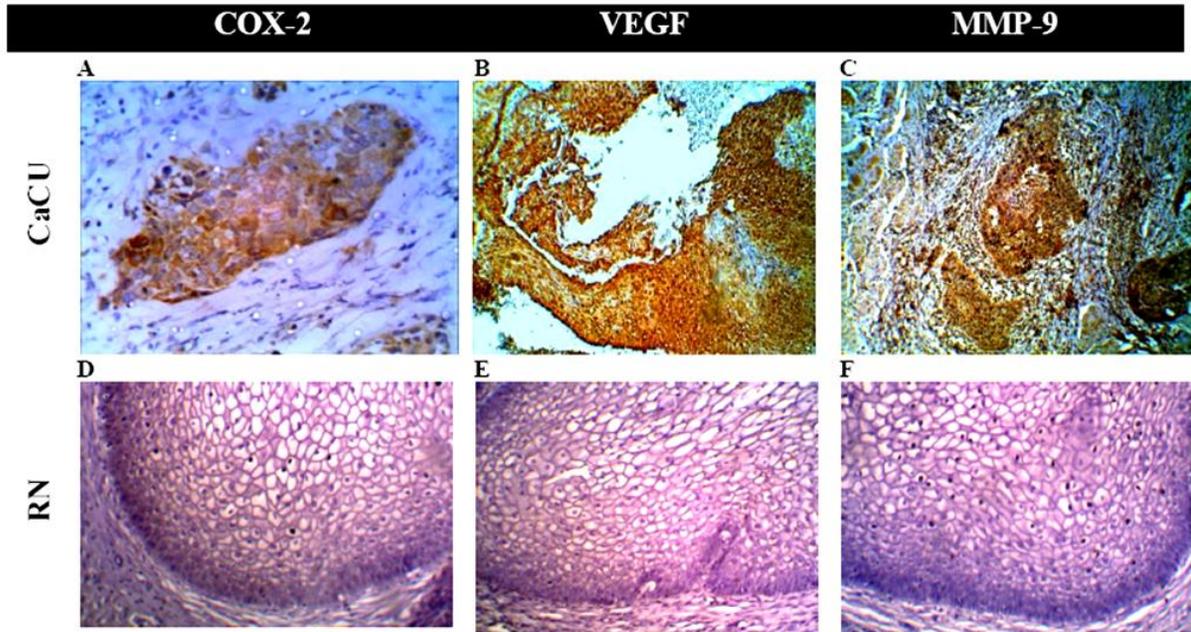


Figura 1. Microfotografía de controles positivos: **A, B, C.** Cáncer cervicouterino (CaCU) de células escamosas de cérvix uterino **A)** expresión difusa en citoplasma de COX-2, **B)** expresión difusa en citoplasma de VEGF, **C)** expresión difusa en citoplasma de MMP-9. Controles negativos cérvix de recién nacida (RN) **D, E** y **F,** con ausencia de expresión de COX-2, VEGF y MMP-9 respectivamente. Técnica inmunohistoquímica streptavidina-biotina aumento 10X (excepto **A,** 40X).

Detección de VPH-AR mediante el Método de hibridación *in situ* con amplificación con tiramida.

La detección del genoma viral por hibridación *in situ* se realizó con el sistema de amplificación de señal de tiramida GenPoint de DaKo Cytomation, con algunas modificaciones (Carpinteria, CA, USA).

Los cortes de 3 μ m de grosor se colocaron en láminas previamente silanizadas, se desparafinaron con calor a 60°C y luego se colocaron en xilol absoluto por 24 hrs. Se rehidrataron con pases sucesivos en concentraciones decrecientes en alcohol, se realizó la recuperación antigénica en solución de citratos con pH de 6.0 por 6 minutos a 120°C, se realizó la digestión enzimática con proteinasa K (1:5000) por 3 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron con agua destilada y TBST, se deshidrataron y se

aplicó una gota de la solución que contiene la sonda de ADN viral con pares de bases homólogos para los siguientes genotipos de VPH-AR: 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Se colocó un cubreobjetos sobre el corte y luego se sometieron a desnaturalización en el hibridizador (110v, Dako (No.cat.S245030) por 10 minutos a 95°C. Posteriormente se incubaron por 20 horas a 37°C para la hibridación, se colocaron en solución astringente (1:50) a 55°C durante 20 minutos y se retiró el cubreobjetos. Se recubrieron los cortes con el anticuerpo primario estreptavidina peroxidasa (1:50), durante 40 minutos a temperatura ambiente, luego se agregó biotil-tiramida por 20 minutos y finalmente se cubrió con anticuerpo secundario estreptavidina por 20 minutos, se cubrió el corte con el cromógeno diaminobencidida (DAB), se contratiñeron con Hematoxilina de Meyer (MERCK), se deshidrataron y montaron con resina sintética.

Control de validación: Se utilizó un extendido de la línea celular CaSki como control positivo (cortesía del Laboratorio de Investigación en Citopatología Ginecológica), y como control negativo un corte de cérvix uterino de recién nacida (figura 2).

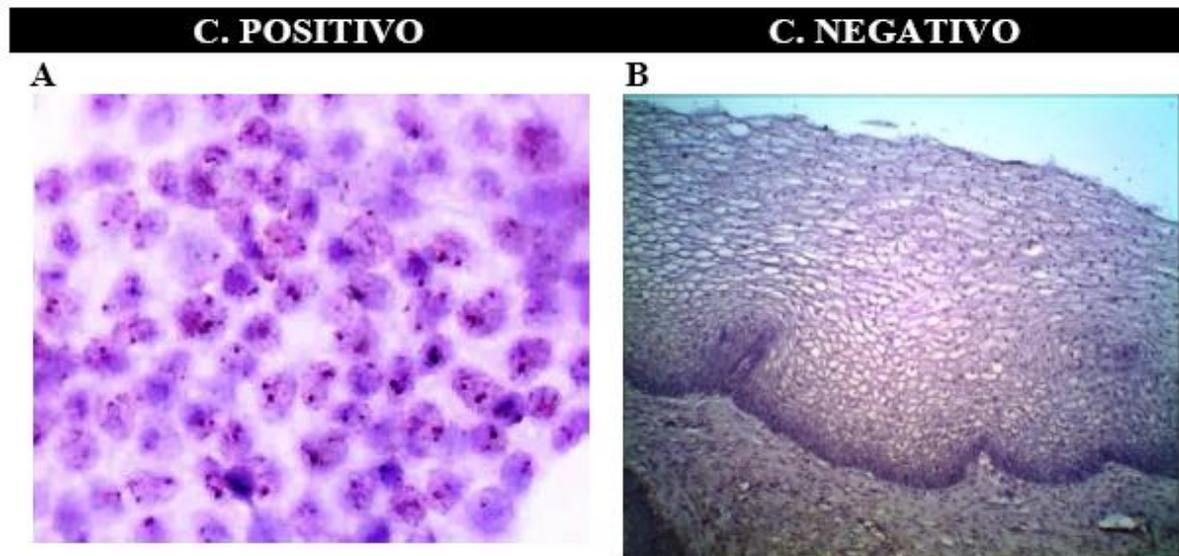


Figura 2. Microfotografías A) extendido de línea celular CaSki positiva a VPH-AR, B) Cérvix de recién nacida que no presenta expresión de señal de sonda biotinilada de VPH-AR aumento 40X y 10X.

Análisis estadístico: La captura de datos se realizó con el software SPSS versión 12.0. Para la descripción de los datos se utilizaron medidas de tendencia central, frecuencias absolutas y relativas, así como prueba exacta de Fisher para determinar las diferencias estadísticas entre las categorías de las variables evaluadas. Se realizó análisis de correlación de contingencia para evaluar la relación lineal entre los niveles de expresión de cada proteína con el grado de LEI y la infección por VPH-AR. Para medir la fuerza de asociación entre las variables, se realizó un modelo de regresión logística múltiple y simple, dicho modelo fue ajustado por edad. El análisis se llevó a cabo con el paquete estadístico STATA versión 9.2.

III. RESULTADOS

Se analizaron muestras de biopsias y conos cervicales incluidas en parafina, clasificadas por diagnóstico histopatológico en epitelio sano, LEIBG y LEIAG, las muestras fueron proporcionadas por el departamento de patología del HGR “Vicente Guerrero” del IMSS, de la Cd. de Acapulco Gro., las muestras fueron recolectada en el periodo de agosto 2008-abril 2009. La edad media de las pacientes fue de 38 años con desviación estándar de 11 años. La distribución de grupos para cada marcador fue la siguiente: para COX-2, se analizaron un total de 116 muestras de cérvix, de las cuales 16 fueron de tejidos sanos, 50 LEIBG y 50 LEIAG, para VEGF se analizaron 120 muestras, 16 tejidos sanos, 56 con LEIBG y 48 de LEIAG, y para MMP-9 se analizaron 114 muestras, 17 tejidos sanos, 57 muestras de LEIBG, 49 muestras de LEIAG. (Cuadro 1).

EXPRESIÓN DE COX-2, MMP-9 Y VEGF EN TEJIDOS SANOS Y LEI:

TEJIDOS CERVICALES SANOS

El 81.25% (Figura 3) de los tejidos no presentó expresión citoplásmica de COX-2, los tres casos positivos (17.75%) presentaron intensidad leve, dos ocuparon el primer tercio, y uno todo el espesor, y fueron negativos para VEGF, MMP-9 y VPH-AR. El 75% de las muestras fueron negativas a la expresión citoplásmica de VEGF, cuatro casos fueron positivos (25%) a expresión citoplásmica y, presentaron intensidad leve, tres ocuparon todo el espesor (entre estos un caso expresó también MMP-9 en el citoplasma de todo el espesor con intensidad moderada), el cuarto caso se localizó hasta el segundo tercio, el cual también presentó expresión citoplásmica para MMP-9 hasta dos tercios con intensidad moderada. En el análisis de la expresión de MMP-9 el 70.59% fueron negativos, cinco casos (29.41%) fueron positivos, de los cuales dos se localizaron en el primer tercio y tuvieron intensidad leve, un caso expresó hasta el segundo tercio con intensidad moderada, el cual coincide con positividad de VEGF, los dos restantes expresaron en todo el espesor

uno con intensidad leve y el otro moderada caso que también expresó VEGF (Cuadro 1).

LEIBG: COX-2 se expresó en el 28% de los casos con intensidad moderada y en el 30% se ocupó el primer tercio, para VEGF el 33.93% mostraron intensidad leve y el 30.36% se localizaron en el primer tercio, MMP-9 mostró expresión en 50.88% con intensidad leve, y el 35.9% localizado en todo el espesor (Cuadro 1, figura 3).

LEIAG: COX-2 se expresó con intensidad leve en el 34% de los casos y se presentó en todo el espesor en el 32% de los casos. VEGF fue expresado en el 43.75% ocupando todo el espesor, y en el 45.83% tuvo intensidad leve. MMP-9 tuvo tinción leve en el 40.82%, se localizó en todo el espesor en el 51.02% de los casos (cuadro 1, Figura 3).

Asociación entre COX-2, VEGF y MMP-9 con LEI

Al analizar la asociación entre la expresión de las proteínas y LEIBG encontramos que COX-2 se asocia con LEIBG cuando la expresión se presenta hasta el segundo tercio (OR=7.5), y cuando la intensidad de expresión es moderada (OR=12.4). Para el caso de VEGF, se asoció cuando la expresión ocupa hasta el segundo tercio (OR=10.13) y cuando la intensidad es fuerte (OR=8.4). MMP-9 también tuvo fuerte asociación cuando se expresa hasta el segundo tercio (OR=10.9), y cuando la intensidad es leve (OR=8.1).

Para la asociación con LEIAG, COX-2 se asocia cuando se expresa en todo el epitelio (OR=3.7) y cuando la intensidad es moderada (OR=6.8), VEGF se asoció de manera importante cuando la expresión ocupa todo el epitelio (32.7) y cuando la intensidad es fuerte (25.8). MMP-9 se asoció cuando la expresión está en todo el epitelio (OR=9.3) y cuando la intensidad es moderada (OR=5.7). No todos los valores fueron significativos a un nivel de confianza de 95%. (Cuadro 1).

Se evaluó la correlación entre la expresión de COX-2, VEGF y MMP-9 con el grado de LEI, encontrando en todos los casos correlación positiva entre ellos, es decir, hay

aumento proporcional entre el grado de LEI y la expresión de las proteínas, analizados con la prueba exacta de Fisher donde también encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos de localización de la expresión proteica y la intensidad de COX-2, VEGF y MMP-9 (Cuadro1).

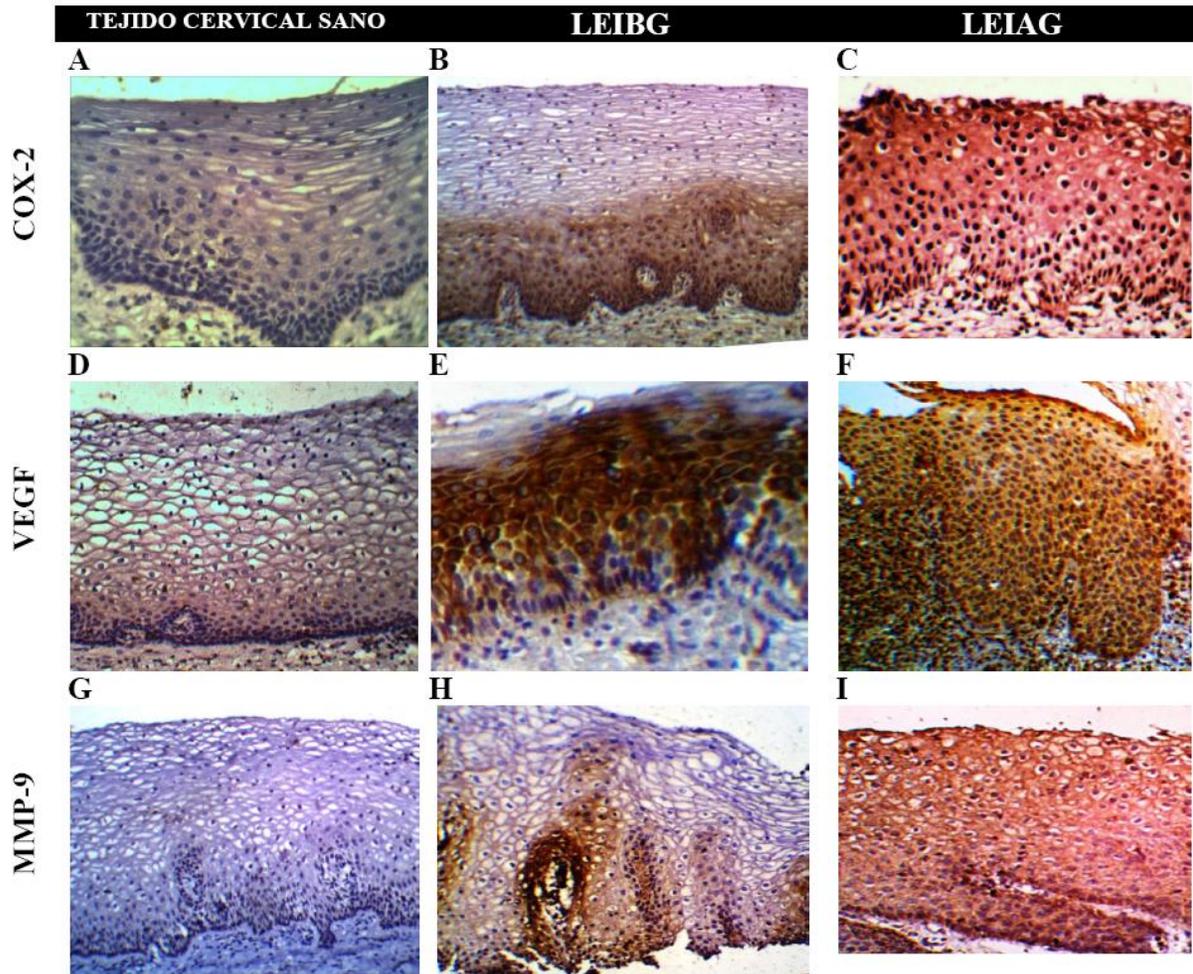


Figura 3. **A, D y G** Tejidos sanos, muestran la ausencia de expresión para COX-2, VEGF y MMP-9. **B, C** con expresión de **COX-2**, **B**, la expresión ocupa hasta el segundo tercio del espesor del epitelio, con intensidad fuerte (3+), **C**, presenta expresión en todo el espesor con intensidad moderada (2+), **E y F** con expresión de **VEGF** **E**, observamos expresión que ocupa entre el segundo y tercer tercio con intensidad de tinción fuerte (3+), **F**, presenta expresión de todo el espesor con intensidad fuerte (3+), **H e I**, con expresión para MMP-9, **H**, presenta expresión de primer tercio con intensidad fuerte (3+), **I**, con expresión en todo el espesor con intensidad moderada (2+). Técnica inmunohistoquímica streptavidina-biotina aumento 10X.

Cuadro 1. Asociación de la expresión de COX-2, VEGF, MMP-9 con el grado de LEI.

PROTEÍNA	r	TEJ. CERVICAL SANO n (%)	LEIBG n (%)	LEIAG n (%)	LEIBG OR (p)*	LEIAG IC	OR (p)*	IC
COX-2								
Intensidad								
Nula		13 (81.25)	18 (36)	20 (40)	1.0		1.0	
Leve		3 (18.75)	13 (26)	17 (34)	2.4 (0.25)	(0.52-11.28)	3.0 (0.14)	(0.68-13.11)
Moderada	0.10	0 (0)	14 (28)	9 (18)	12.4 (0.03)	(1.2-121.78)	6.8 (0.10)	(0.71-65.78)
Alta		0 (0)	5 (10)	4 (8)	2.8 (0.39)	(0.26-31.54)	2.1 (0.53)	(0.19-23.56)
total		16 (100)	50 (100)	50 (100)				
Localización								
Negativo		13 (81.25)	18 (36)	20 (40)	1.0		1.0	
1 tercio		2 (12.50)	6 (12)	15 (30)	1.5 (0.65)	(0.24-9.69)	3.7 (0.13)	(0.68-20.20)
2 tercio	0.38	0 (0)	10 (20)	4 (8)	7.5 (0.09)	(0.73-76.60)	2.7 (0.42)	(0.24-28.95)
todo		1 (6.25)	16 (32)	11 (22)	6.0 (0.04)	(1.05-34.90)	3.7 (0.14)	(0.66-20.87)
total		16 (100)	50 (100)	50 (100)				
VEGF								
Intensidad								
Nula		12 (75.0)	10 (18.2)	12 (24.5)	1.0		1.0	
Leve		4 (25)	15 (27.3)	6 (12.2)	4.5 (0.04)	(1.03-19.54)	15.1 (0.00)	(3.09-74.10)
Moderada	0.38	0 (0)	10 (18.2)	6 (12.2)	5.5 (0.15)	(0.55-54.76)	17.2 (0.01)	(1.60-185.95)
Alta		0 (0)	20 (36.4)	25 (51.1)	8.4 (0.07)	(0.86-81.50)	25.8 (0.00)	(2.45-270.93)
total		16(100)	56 (100)	48 (100)				
Localización								
Negativo		12 (75.0)	16 (28.57)	5 (10.42)	1.0		1.0	
1 tercio		0 (0)	17 (30.36)	9(18.75)	4.5 (0.00)	(0.78-25.97)	7.5 (0.04)	(1.09-51.28)
2 tercio	0.45	1 (6.25)	9 (16.0725)	13(27.08)	10.1 (0.04)	(1.02-100.20)	32.7 (0.00)	(3.04-352.17)
todo		3 (18.75)	12 (21.43)	21 (43.75)	4.1 (0.10)	(0.77-21.79)	22.6 (0.00)	(3.9-130.31)
total		16 (100)	56 (100)	48 (100)				
MMP-9								
Intensidad								
Nula		12 (70.59)	11 (19.30)	12 (24.49)	1.0		1.0	
Leve		3 (17.65)	29 (50.88)	20 (40.82)	8.1 (0.00)	(1.77-37.27)	5.3 (0.03)	(1.18-24.27)
Moderada	0.37	2 (11.76)	15 (26.32)	13 (26.53)	7.0 (0.03)	(1.17-41.46)	5.7 (0.05)	(0.98-32.97)
Alta		0 (0)	1 (3.51)	4 (8.16)	1.1 (0.93)	(0.08-16.46)	2.2 (0.52)	(0.19-16.39)
total		17(100)	27 (100)	59 (100)				
Localización								
Negativo		12 (70.59)	11 (19.30)	12 (24.49)	1.0		1.0	
1 tercio		2 (11.76)	15 (26.32)	6 (12.24)	4.4 (0.07)	(0.90-21.95)	1.7 (0.53)	(0.32-9.03)
2 tercio	0.40	1 (5.88)	11 (19.30)	5 (12.24)	10.9 (0.04)	(1.09-110.60)	5.6 (0.14)	(0.54-57.46)
todo		2 (11.76)	20 (35.09)	25 (51.02)	7.6 (0.02)	(1.35-43.45)	9.3 (0.01)	(1.70-50.79)
total		17 (100)	57 (100)	49(100)				

n=número de casos

r=coeficiente de correlación de contingencia

a Valor de p asociado a la prueba exacta de Fisher

*OR= riesgo ajustado por edad

IC=intervalo de confianza

Infección por VPH-AR y LEI

Para determinar la presencia de VPH-AR se realizó la técnica de hibridación *in situ*, en 111 muestras de cérvix uterino, 12 de tejido sano, 51 LEIBG y 48 LEIAG. En tejidos cervical sano el 83.33% fue negativo, 16.67% positivos, se encontró correlación positiva entre la presencia de la infección por VPH-AR y el grado de lesión con $r = 0.47$ (cuadro 2) con patrón de señal difuso, y fueron negativos a la expresión de COX-2, VEGF y MMP-9. Para LEIBG el 74.51% fue positivo, de los cuales 33.33% presentó el patrón de señal difuso, y el 23.53% patrón de señal puntiforme. Para LEIAG el 93.75% fue positivo, de estos el 43.75% presentó patrón mixto. Se encontraron diferencias significativas ($p=0.00$) entre los casos que presentan infección por VPH-AR y los que no la presentan, así como diferencias estadísticas significativas entre los diferentes patrones de señal: puntiforme, difuso y mixto (figura 4).

Se realizó un análisis bivariado donde se encontró asociación estadística significativa entre la presencia de la infección por VPH-AR con LEIBG (OR=12.8), y con LEIAG (OR= 69.0), con una $p=0.00$ (Cuadro 2). Además de asociación con los diferentes patrones de señal difuso, puntiforme y mixto con LEIBG (OR=5.2, 9.3 y 5.9) datos no significativos; para LEIAG obtuvimos asociación con el patrón de señal difuso, puntiforme y mixto (OR= 21.8, 27.7 y 64.0) valor significativo ($P=0.00$) (Cuadro 3).

VPH-AR y expresión de COX-2, MMP-9 y VEGF

Para COX-2 se estudiaron 97 muestras de cérvix, de las cuales 25 fueron negativos y 72 positivos para la infección de VPH-AR. En la expresión de VEGF, se estudiaron 100 muestras de cérvix, de las cuales 25 fueron negativos y 75 positivos para VPH-AR. En la expresión de MMP-9, se estudiaron 102 muestras de cérvix, 26 fueron negativas y 76 positivas a VPH-AR. La edad media fue de 37 años con desviación estándar de 10 años.

Para los casos negativos a VPH-AR, el 48% de los tejidos no presentó expresión de COX-2, el 40% no expresó VEGF y el 42.31% no expresó MMP-9, de los casos positivos a VPH-AR, el 26.39% tuvieron expresión de COX-2 en todo el espesor y el 30.56% con intensidad leve, el 29.33% expresó VEGF en todo el espesor, el 36% con intensidad leve, para MMP-9 el 43.42% expresaron en todo el espesor y el 50.0% con intensidad leve.

Se encontró relación entre la localización de la expresión proteica y la intensidad con la infección por VPH-AR además de diferencias significativas. Se determinó la asociación entre COX-2, VEGF y MMP-9 con VPH-AR para lo que se realizó un análisis multivariado donde se encontró un OR de 1.2 cuando COX-2 es expresado en todo el epitelio y 1.0 cuando la intensidad es alta, la expresión de VEGF tuvo una asociación de 2.1 cuando la expresión ocupa todo el espesor y de 4.9 cuando la expresión es alta, de la misma manera MMP-9 tuvo una asociación de 3.1 cuando se expresa en todo el epitelio y de 3.1 cuando la expresión es alta, no todos los valores son significativos con un nivel de confianza de 95% (Cuadro 4).

Cuadro 2. Asociación de la expresión de VPH-AR Y LEI

Diagnóstico VPH-AR	r	TEJ. CERVICAL SANO n (%)	LEIBG n (%)	LEIAG n (%)	LEIBG *OR (p)	IC	LEIAG *OR (P)	IC
	0.47		$p < 0.000^a$					
NEGATIVO		10 (83.33)	13 (25.49)	3 (6.25)	1.0		1.0	
POSITIVO		2 (16.67)	38 (74.51)	45 (93.75)	12.8 (0.00)	(2.26-72.7)	69.0 (0.00)	(9.9-481.1)
TOTAL		12 (100.00)	51(100.00)	48 (100.00)				

n=número de casos.

r=coeficiente de correlación de contingencia

a =valor asociado a la prueba exacta de Fisher

*OR= riesgo ajustado por edad.

IC= intervalo de confianza

Cuadro 3. Asociación del patrón de señal de VPH-AR Y LEI

Diagnóstico VPH-AR	TEJ. CERVICAL SANO n (%)	LEIBG n (%)	LEIAG n (%)	LEIBG *OR (p)	IC	LEIAG *OR (p)	IC
		$p < 0.000^a$					
NEGATIVO	10 (83.33)	13 (25.49)	3 (6.25)	1.0		1.0	
PUNTIFORME	0 (0.00)	12 (23.53)	9 (18.75)	9.3 (0.73)	(0.82-77.62)	27.7 (0.01)	(2.4-322.48)
DIFUSO	2 (16.67)	17 (33.33)	15 (31.25)	5.2 (0.66)	(0.90-29.94)	21.8 (0.00)	(3.02-158.39)
MIXTO	0 (0.00)	9 (17.65)	21 (43.75)	5.9 (0.13)	(0.60-58.17)	64.0 (0.00)	(5.80-706.0.0)
TOTAL	12 (100.00)	51 (100.00)	48 (100.00)				

n=número de casos.

a =valor asociado a la prueba exacta de Fisher

OR*= riesgo ajustado por edad.

IC= intervalo de confianza

PATRÓN DE SEÑAL DE VPH-AR

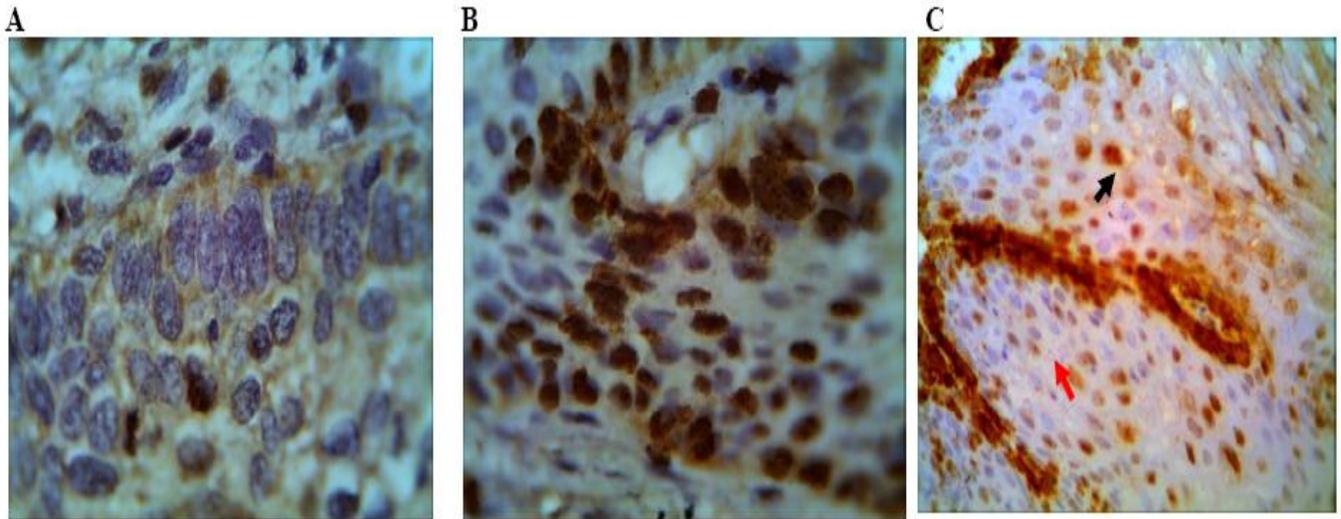


Figura 4. A) Muestra el patrón de expresión puntiforme B) muestra el patrón difuso C) presenta el patrón mixto (flecha roja puntiforme, flecha negra difusa). Técnica de hibridación *in situ* con amplificación con tiramida aumento A y B 100X y C 10X.

Cuadro 4. Asociación de la expresión de COX-2, VEGF, MMP-9 y VPH-AR

Proteína	r	NEGATIVO n (%)	POSITIVO n (%)	OR ajustado (p)*	IC
COX-2					
Intensidad $p=<0.791^a$					
Nula		12 (48.00)	30 (41.67)	1.0	
Leve		8 (32.00)	22 (30.56)	1.1(0.23)	(0.33-3.91)
Moderada	0.10	3 (12.00)	15 (20.83)	1.6 (0.59)	(0.29-8.81)
Alta		2 (8.00)	5 (06.94)	1.2 (0.67)	(0.40-4.04)
total		25 (100.00)	72 (100.00)		
Localización $p=<0.972^a$					
Negativo		12 (48.00)	30 (41.67)	1.0	
1 tercio		5 (20.00)	15 (20.83)	1.0 (0.36)	(0.36-3.07)
2 tercio	0.06	2 (08.00)	8 (11.11)	2.0 (0.50)	(0.50-8.75)
todo		6 (24.00)	19 (26.39)	1.2 (0.96)	(0.15-5.73)
total		25 (100.00)	72 (100.00)		
VEGF					
Intensidad $p=<0.206^a$					
Nula		10 (40.00)	18 (24.00)	1.0	
Leve		10 (40.00)	27 (36.00)	1.5 (0.46)	(0.51-4.33)
Moderada	0.21	3 (12.00)	11 (14.67)	1.8 (0.42)	(0.41-8.38)
Alta		2 (08.00)	19 (25.33)	4.9 (0.06)	(0.93-25.71)
total		25 (100.00)	75 (100.00)		
Localización $p=<0.529^a$					
Negativo		10 (40.00)	18 (24.00)	1.0	
1 tercio		4 (16.00)	18 (24.00)	2.1 (0.28)	(0.54-8.33)
2 tercio	0.16	5 (20.00)	17 (22.67)	1.8(0.36)	(0.51-6.44)
todo		6 (24.00)	22 (29.33)	2.1 (0.22)	(0.63-7.02)
total		25 (100.00)	75 (100.00)		
MMP-9					
Intensidad $p=0.102^a$					
Nula		11 (42.31)	15 (19.74)	1.0	
Leve		8 (30.77)	38 (50.00)	2.7 (0.15)	(0.69-10.58)
Moderada	0.24	7 (26.92)	20 (26.32)	2.1 (0.29)	(0.53-8.40)
Alta		0 (0.00)	3 (03.93)	3.1 (0.05)	(0.96-9.93)
total		26(100.00)	76 (100.0)		
Localización $p=0.157^a$					
Negativo		11 (42.31)	15 (19.74)	1.0	
1 tercio		4 (15.38)	16 (21.05)	2.7 (0.15)	(0.69-10.58)
2 tercio	0.23	4 (15.38)	12 (15.79)	2.1 (0.29)	(0.53-8.40)
todo		7 (26.92)	33 (43.42)	3.1 (0.05)	(0.96-9.93)
total		26 (100.00)	76 (100.00)		

n=número de casos

r=coeficiente de correlación de contingencia

a Valor de p asociado a la prueba exacta de Fisher

*OR= riesgo ajustado por edad

IC= intervalo de confianza

Discusión y conclusiones:

COX-2 es una enzima clave en el proceso inflamatorio con la producción de PGs, principalmente PGE2 que se ha reportado sobreexpresada en diferentes cánceres humanos como el de colon, mama, hígado, y CaCU^{10,11}, ha sido asociada al comportamiento tumoral clínico agresivo por su importante implicación en inducción de moléculas antiapoptóticas como Bcl y Mc1-1^{8,11}, inducción de VEGF promoviendo angiogénesis⁷, y por otro lado a la síntesis de MMPs^{19,43}. Castle *et al.*, 2001⁶ y Sheu *et al.*, 2003²⁰ reportaron asociación del proceso inflamatorio crónico con el desarrollo de LEI. Estas son algunas razones por la que en este trabajo se decidió evaluar la expresión de COX-2, MMP-9 y VEGF en LEI.

No se expresaron COX-2, VEGF y MMP-9 en más del 70% de las muestras con epitelio cervical sano, en las muestras que mostraron expresión COX-2 se presentó con intensidad leve en el primer tercio principalmente, VEGF se presentó en todo el epitelio con intensidad leve, y MMP-9 se expresó con intensidad leve a moderada en los tres diferentes tercios. COX-2 es una enzima inducible, secretada principalmente por fibroblastos y mastocitos ante las agresiones del medio ambiente, participa además en la etapa premenstrual, MMP-9 es influenciada por el estradiol y la disminución de la progesterona en la etapa premenstrual y en la primera fase del ciclo menstrual. VEGF por su parte está ligado a la regeneración del endometrio en el ciclo menstrual, influenciado por los estrógenos. Al considerar que estas observaciones pueden explicar la presencia de la expresión en los tejidos sanos, debido a que no se obtuvo el dato sobre la fase del ciclo menstrual que cursaban las pacientes al momento de la toma de muestra.

En los casos de LEIBG se encontró asociación con COX-2 cuando la intensidad es moderada y se localiza hasta el segundo tercio, (OR= 12.4 y 7.5), para VEGF cuando la intensidad es alta y ocupa todo el espesor (OR=8.4 y 10.1), y MMP-9 cuando la intensidad es leve y ocupa hasta el segundo tercio (OR=8.1 y 10.9). Sin embargo, para los casos de LEIAG la asociación fue en menor grado para COX-2 comparado con LEIBG, no así en el caso de MMP-9 y VEGF, pero se pudo observar que el

grado de asociación de VEGF con LEIBG se duplicó en el caso de LEIAG, cuando la intensidad es fuerte y ocupa hasta el segundo tercio (OR= 25.8 y 32.7). Nuestros resultados coinciden con Dursun *et al.*, 2007⁸ quien reportó en carcinoma de células escamosas (CCS) y neoplasia intraepitelial cervical (NIC3) diferencias significativas en la expresión de COX-2, sugiriendo su participación en estados previos a CaCU, aun cuando Sarian *et al.*, 2006⁴⁴ no encontraron asociación en la expresión de COX-2 con todos los grados de NIC, CaCU y tejido normal. Por otro lado, al observar los resultados obtenidos, se encontró principalmente mayor asociación de VEGF con LEIBG y LEIAG en comparación con COX-2 y MMP-9, con este hallazgo coincidimos con Tangjitgamol *et al.*, 2005⁴⁵ quienes reportaron la mayor expresión de VEGF en comparación con COX-2 en carcinoma neuroendócrino de cérvix uterino, también Vences *et al.*, 2007⁴⁶ encontraron predominio de la expresión de VEGF en comparación con COX-2⁴⁶, de manera inversa a lo que reportan Dai *et al.*, 2005⁷, quienes evaluaron VEGF, COX-2 y PGE en lesiones premalignas y reportaron que COX-2 se expresaba en los diferentes grupos y VEGF se presentó principalmente en células cancerosas, por lo que el marcador dominante fue COX-2, lo mismo que Hames *et al.*, 2008⁴⁷, quienes evaluaron c-fms, COX-2 y VEGF, en lesiones premalignas, donde COX-2 fue el biomarcador que se expresó en la mayor cantidad de casos de la población estudiada. Por lo tanto, en este estudio la expresión de COX-2 al estar asociado principalmente con LEIBG y en menor grado con LEIAG, implica la participación del proceso inflamatorio en el desarrollo de LEI.

Varios autores han evaluado la expresión de VEGF, por la inducción de la PGE₂, generada a partir de COX-2^{7,11,13,25,28,45,47}. Sin embargo, en el presente estudio VEGF esta sobreexpresado de manera superior a COX-2; VEGF es promovido principalmente por el factor inductor de hipoxia uno alfa (HIF-1 α) y otras moléculas como IL-1 β , TNF- α , IL 6 y 8, el óxido nítrico y mutaciones en oncogenes como Ras, Src y los receptores cinasa de erB2/Her-2, EGF^{4,34}, así como el estradiol y los estrógenos. Tomando en cuenta estas observaciones podemos sugerir que la sobreexpresión de VEGF en la población de estudio, no es sólo influida por COX-2.

Es considerado que VEGF participa en la carcinogénesis de diferentes cánceres, entre ellos el CaCU, y es sugerido como factor pronóstico de progresión tumoral, metástasis y supervivencia^{16,28,37}. Aunque algunos autores como Song *et al.*, 2009³³ no encontraron diferencias significativas de la expresión de VEGF y COX-2 con el grado de lesión, ellos sólo compararon grupos de NIC2 y NIC3. Sin embargo, la población estudiada fueron mujeres asiáticas y el número de casos es un poco más de la mitad que el que nosotros estudiamos; Hames *et al.*, 2008⁴⁷, sugieren que para este tipo de estudios es necesario tomar en cuenta todos los grupos de LEI, además de grupos de tejido sano y CaCU, para poder establecer grupos de comparación y asociar biomarcadores de progresión. Por lo tanto con base en los hallazgos presentados en este trabajo sugerimos la utilidad de VEGF como biomarcador de progresión de LEI.

Las MMPs participan en la remodelación y degradación de la matriz extracelular en condiciones benignas y cáncer, por su amplia capacidad de degradar varios compuestos de la matriz extracelular y de la membrana basal, facilitan la invasión local de células tumorales y la subsecuente invasión vascular. En este estudio se encontró asociación significativa en la sobreexpresión de MMP-9 y los diferentes grados de LEI con intensidad y localización de la expresión, coincidiendo con lo reportado por de Sheu *et al.*, 2003²⁰ otros autores^{20,32,38,39,41} quienes evaluaron la expresión MMPs en LEI y CCS, observaron aumento de la expresión en relación con el grado de lesión, y nula expresión en tejido sano. Por lo tanto, las células que expresan MMP-9 tienen más posibilidades de avanzar hacia los distintos tercios del epitelio escamoso, modificando la polaridad celular característica del epitelio escamoso estratificado.

Davidson *et al.*, 1999³⁹ reportaron diferencia de intensidad en la expresión de MMP-9 entre los grupos celulares que tuvieron mal comportamiento clínico y los que no, además tener ausencia de expresión de MMP-9 en el grupo de tejidos sanos, con lo que sugieren que MMP-9 es un marcador de fenotipo celular maligno. Argüello *et al.*,

2004³⁸ encontraron diferencias significativas entre la expresión de MMP-9 con el tipo histológico de CaCU, donde MMP-9 y 3 fueron predominantemente expresadas en adenocarcinoma de cérvix uterino (AdC) en comparación con CCS. Nosotros aunque no evaluamos respuesta clínica, encontramos también negatividad en el 70% de nuestro grupo de tejidos sanos, y sobreexpresión para LEIBG y LEIAG, 80% y 75% respectivamente. Se considera que el aumento de MMPs en los casos de LEI e incluso en CaCU etapa I (según la clasificación de la federación internacional de gineco-obstetricia, "FIGO") con alta intensidad de expresión puede ser suficiente para degradar la matriz extracelular de manera local, pero no para metastatizar; Davidson *et al.*, 1999³⁹ evaluaron la expresión y actividad enzimática de MMP-9, y encontraron que no en todos los casos había actividad a pesar de presentar fuerte intensidad, en conclusión, es posible encontrar sobreexpresión de MMP-9 en LEIBG, sin embargo, puede no estar en forma activa por lo que no necesariamente deba haber metástasis en esta etapa³⁹. Con estos resultados y los antecedentes de otros autores que han evaluado la expresión de MMP-9 con otras técnicas como ELISA y Zimografía, entre otras, los resultados sugieren a MMP-9 como marcador temprano de progresión de LEI, y en las etapas del CaCU según la clasificación de la FIGO³². Sugerimos por tanto a MMP-9 como biomarcador de progresión de LEI, que puede sugerir vigilancia estricta en las pacientes que la expresan.

La infección por VPH tiene alta incidencia entre las enfermedades de transmisión sexual en México, es un factor necesario pero no suficiente para desarrollar CaCU, estos virus están clasificados por su efecto oncogénico como de bajo, indeterminado, alto y probable alto riesgo oncogénico, de estos últimos los de mayor importancia son los tipos 16 y 18 por su capacidad para integrarse al genoma celular, en este aspecto radica la importancia de identificar el genotipo viral cuando la infección está presente, aun cuando no se aprecien alteraciones morfológicas y como ampliamente se ha documentado se encontró también alta asociación entre el VPH-AR con LEIAG (OR=69, p=0.00).

El VPH se ha relacionado ampliamente con el proceso inflamatorio^{5,21}, de manera que algunos autores han estudiado las formas en que el virus puede influir sobre

este, así Subbaramaiah *et al.*, 2007²⁷ reportaron la actuación de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 en el sitio promotor de COX-2 favoreciendo su sobreexpresión, a estas observaciones se suma Young *et al.*, 2008¹³, quienes agregan que dicha participación es por vía del receptor EGF-R, sumados a la asociación significativa entre VPH16 y COX-2 que reportó Sarian *et al.*, 2006⁴⁴. En el presente estudio se encontró asociación con VPH-AR cuando COX-2 presenta expresión hasta el segundo tercio y cuando la intensidad es moderada (OR= 2.0 y 1.6) datos no significativos, además de correlación positiva entre la expresión y los casos positivos de VPH-AR.

Para la expresión de VEGF también hay reportes de la influencia de las oncoproteínas E6 de VPH-16 y 18^{34,35,48,49}, la actuación de estas en el sitio SP-1 de la región promotora de VEGF producen sobreexpresión de este, por otro lado evitan la degradación del IHF-1 α por inhibición de la vía de ubiquitinas, estimulando indirectamente a VEGF^{37,50}, además la proteína E5 de VPH-16 induce a VEGF a través de la vía MEK/ERK y PIK3/AKT⁵¹. Nosotros encontramos correlación positiva y asociación entre la infección de VPH-AR y expresión de VEGF cuando la intensidad de expresión es alta (OR=4.9) datos no significativo, coincidiendo con los hallazgos de Shi *et al.*, 2007²⁸ quienes encontraron asociación entre las líneas celulares de Hela y la expresión de VEGF, así también Song *et al.*, 2007³³ encontraron asociación entre la carga viral de VPH-AR y VEGF.

Sobre la relación entre el VPH con MMP-9 se ha reportado poca información, en este estudio se encontró asociación significativa entre la expresión de MMP-9 y VPH-AR. Así también Katori *et al.*, 2006⁵² reportaron asociación entre VPH y MMP-9 y 2, con lesiones premalignas de carcinoma nasal⁵², sugiriendo participación de estas MMPs en la carcinogénesis de mucosa nasal, por otro lado Cardeal *et al.*, 2006⁵³ encontraron la sobreexpresión de MMP-9 en líneas celulares Hela, SiHa y Caski, donde la expresión mayor fue en células CasKi.

La técnica de HIS de amplificación con tiramida nos permite detectar la presencia del genoma del VPH mostrándonos su localización física en el epitelio cervical uterino y

sitio específico dentro de la célula, Cooper *et al.*,1991⁵⁴ implementaron la técnica de hibridación *in situ* e hicieron un análisis comparativo acerca del patrón de señal observado en las laminillas tratadas, donde comentan sobre la forma de expresión puntiforme (puntos observados en el núcleo), con la infección por el VPH en su forma integrada, al patrón difuso (todo el núcleo teñido) donde se considera representa la presencia de la infección por VPH en estado episomal, y la forma mixta donde se presentan ambos patrones y se considera es una transición del estado episomal al integrado.

En el presente estudio se observó la localización de expresión principalmente en células basales, coincidiendo con el ciclo del VPH, debido a su tropismo por las células con capacidad de replicarse, en cuanto a la relación entre el patrón de señal y el grado de LEI, el patrón de señal difuso (33.33%) predominó en los casos de LEIBG, pero también se presentó el patrón puntiforme (23.53%) y en menor medida el mixto (17.65%), en el caso de LEIAG predominó el patrón mixto (43.75%) seguido del difuso (31.25%) y puntiforme (18.75%) respectivamente. Esto nos habla de los casos con LEIBG que mostraron patrón de señal puntiforme y difuso tienen mayor predisposición a progresar a LEIAG en comparación con las que presentaron patrón difuso. Omori *et al.*, 2007⁵⁵ reportaron al patrón puntiforme a partir de NIC2 y este fue mayor en NIC3, a diferencia de nuestros resultados donde el patrón puntiforme, se expresó desde los casos de LEIBG, por su parte Guo *et al.*,2008⁵⁶ encontraron que el patrón puntiforme de HIS fue más frecuente conforme aumentaba el grado de lesión, además reportaron células positivas a VPH-16 en el 50% de las lesiones, y estas fueron localizadas en las capas superficiales de NIC1, la expresión entre el segundo tercio y todo el espesor fue para NIC 2, 3 y CaCU. Por lo que en los casos de LEIBG que mostraron patrón de señal puntiforme y el patrón mixto en LEIAG tienen mayores posibilidades de progresar a carcinogénesis.

Las muestras con LEIBG y LEIAG que no presentaron señal, fueron consideradas negativas, ya que no se detecta ninguno de los tipos virales de la sonda que aplicamos, sin embargo, esto no excluye la posibilidad de la presencia de otro

genotipo viral de los otros subgrupos, por lo que se sugieren otros estudios con sondas que incluyan los demás genotipos virales.

Con base en los resultados presentados podemos sugerir la importancia de MMP-9 y VEGF como biomarcadores predictores de progresión en LEI, y la participación de COX-2 en el desarrollo de LEIBG, además de que su interrelación con el proceso inflamatorio los convierte en blancos terapéuticos factibles para el uso de tratamiento profiláctico en LEI, ahora que se cuenta una gama de productos como los antiinflamatorios no esteroideos, con costos accesibles, de entre los cuales están los inhibidores selectivos de COX, así como drogas antiangiogénicas, que se encuentran en estudios preclínicos, con resultados prometedores, sea cualquiera de los tres marcadores pueden ser inhibidos directa o indirectamente, permitiéndonos actuar en los casos de LEI, cuando presenten sobreexpresión de COX-2, VEGF y MMP-9, y en el tratamiento de CaCU como terapéutica adyuvante. El tipo de técnicas utilizadas en este trabajo tienen la factibilidad de montarse en un laboratorio prescindiendo de equipos demasiado costosos, los reactivos se pueden adquirir comercialmente, y se pueden aplicar de manera retrospectiva, utilizando material de archivo, que se obtiene dentro de la cadena de estudios implicados en el programa de detección oportuna de CaCU, por lo que resulta una herramienta accesible y de complementación clínica, agregado a esto no se requiere someter a las pacientes a procedimientos invasivos adicionales.

En conclusión COX-2 se sobreexpresa en LEIBG; sugerimos VEGF y MMP-9 como biomarcadores que al estar relacionados con la respuesta inflamatoria participan de forma clave en la carcinogénesis de CaCU, y puedan ser usados con valor pronóstico en el manejo y vigilancia de las mujeres que cursan con algún grado de LEI.

El VPH-AR está asociado a la expresión de COX-2, VEGF y MMP-9, de manera que ejerce influencia sobre la expresión de estas tres proteínas.

REFERENCIAS

1. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:860-7.
2. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. Volume 56: ASPET, 2004:387-437.
3. Herschman HR, Hall W. Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1994;13(3):241-56.
4. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. Volume 11: FASEB, 1997:457-65.
5. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. Volume 4: AACR, 2006:221-33.
6. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, et al. An Association of Cervical Inflammation with High-Grade Cervical Neoplasia in Women Infected with Oncogenic Human Papillomavirus (HPV) 1. Volume 10: AACR, 2001:1021-7.
7. Dai Y ZX, Peng Y, Wang Z. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. *Gynecol Oncology*. 2005;97:96-103.
8. Dursun P YK, Usubutun A, Ayhan A. Cyclooxygenase-2 expression in cervical intraepithelial neoplasia III and squamous cell cervical carcinoma, and its correlation with clinicopathologic variables. *Int J Gynecol Cancer*. 2007.;17:164-73.
9. Kim GE KY, Cho NH, Chung HC, Pyo HR, Lee JD, Park TK, Koom WS, Chun M, Suh CO. Synchronous coexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in carcinomas of the uterine cervix: a potential predictor of poor survival. *Clin Cancer Research*. 2004;10:1366-74.
10. Ferrandina G RF, Legge F, Gessi M, Salutari V, Distefano MG, Lauriola L, Zannoni GF, Martinelli E, Scambia G. Prognostic role of the ratio between cyclooxygenase-2 in tumor and stroma compartments in cervical cancer. *Clin Cancer Research*. 2004;10:3117-23.
11. Lee JS CY, Lee JH, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Kim HS, Min KW. Expression of cyclooxygenase-2 in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and tumor growth. *Gynecol Oncology*. 2004;95:523-9.
12. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, et al. Cyclooxygenase-2 Is Overexpressed in Human Cervical Cancer 1. Volume 7: AACR, 2001:429-34.
13. Young JL, Jazaeri AA, Darus CJ, Modesitt SC. Cyclooxygenase-2 in cervical neoplasia: a review. *Gynecologic Oncology*. 2008;109(1):140-5.
14. Farley J, Uyehara C, Hashiro G, Belnap C, Birrer M, Salminen E. Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure. *Gynecologic Oncology*. 2004;92(2):596-602.
15. Braunwald E. Principios de medicina interna. 15 ed. Volume 1; 2001. 3097 p.
16. Lee IJ, Park KR, Lee KK, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2002;54(3):768-79.
17. Bohórquez-Sierra JC. Metaloproteinasas de matriz: su implicación en las enfermedades vasculares periféricas. *Angiología*. 2006;58(4):269-77.

18. Giraudo E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(5):623-33.
19. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A Novel Role of Metalloproteinase in Cancer-mediated Immunosuppression 1. *Volume 61: AACR*, 2001:237-42.
20. Sheu BC, Lien HC, Ho HN, et al. Increased Expression and Activation of Gelatinolytic Matrix Metalloproteinases Is Associated with the Progression and Recurrence of Human Cervical Cancer 1. *Volume 63: AACR*, 2003:6537-42.
21. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, et al. An Association of Cervical Inflammation with High-Grade Cervical Neoplasia in Women Infected with Oncogenic Human Papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2001;10(10):1021.
22. Gaitán Duarte H, Ja RR. Eslava Schmalbach J. Asociación de la citología cérvico-vaginal inflamatoria con la lesión intraepitelial cervical en pacientes de una clínica de salud sexual y reproductiva en Bogotá, Colombia 1999-2003. *Volume 6*, 2004:253-69.
23. Richard R. How will HPV vaccines affect cervical cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6:753-63.
24. Zahner G, Wolf G, Ayoub M, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits platelet-derived growth factor-induced mesangial cell proliferation through induction of the tumor suppressor gene p53 and the cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf-1/cip-1 and p27kip-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(12):9763-71.
25. Toyoki H, Fujimoto J, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in uterine endometrial cancers. *Volume 16: Eur Soc Med Oncology*, 2005:51-5.
26. Oh JM, Kim SH, Lee YI, et al. Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells. *Carcinogenesis*. 2009;30(1):141.
27. Subbaramaiah K DA. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Research*. 2007;67(8):3976-85.
28. Shi X, Chen G, Xing HUI, Weng D, Bai X, Ma D. VEGF-C, VEGFR-3, and COX-2 enhances growth and metastasis of human cervical carcinoma cell lines in vitro. *Oncology reports*. 2007;18(1):241-7.
29. Loncaster JA, Cooper RA, Logue JP, Davidson SE, Hunter RD, West CML. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advanced carcinoma of the cervix. *British journal of cancer*. 2000;83(5):620-5.
30. Cheng WF, Chen CA, Lee CN, Wei LH, Hsieh FJ, Hsieh CY. Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma. *Obstetrics and gynecology*. 2000;96(5 Pt 1):721-6.
31. Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene*. 2000;19(53):6122.

32. Noriyuki M, Sumi T, Zhi XU, et al. Vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and cyclooxygenase-2 influence prognosis of uterine cervical cancer in young women. *Int J Oncol.* 2007;31(3):531-6.
33. Song SH LJ, Hur JY, Kim I, Saw HS, Park YK. The expression of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2, and cyclooxygenase-2 in relation to human papilloma viral load and persistence of human papillomavirus after conization with negative margins. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Nov-Dec;16(6):2009-17.
34. López-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene.* 2001;19.:4611-4620.
35. Branca M, Giorgi C, Santini D, et al. Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. *Volume 59: Assoc Clin Pathol,* 2006:40-7.
36. Johung K, Goodwin EC, DiMaio D. Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence. *J Virol.* 2007 Mar;81(5):2102-16.
37. Tang X, Zhang Q, Nishitani J, Brown J, Shi S, Le AD. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2007 May 1;13(9):2568-76.
38. Arguello-Ramirez J, Perez-Cardenas E, Delgado-Chavez R, Solorza-Luna G, Villa-Trevino S, Arenas-Huertero F. Matrix metalloproteinases-2,-3, and-9 secreted by explants of benign and malignant lesions of the uterine cervix. *International Journal of Gynecological Cancer.* 2004;14(2):333.
39. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, et al. Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix—Clinicopathologic Study Using Immunohistochemistry and mRNA in Situ Hybridization. *Gynecologic Oncology.* 1999;72(3):380-6.
40. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *European Respiratory Journal.* 1994;7(11):2062.
41. Yang SF, Wang PH, Lin LY, et al. A Significant Elevation of Plasma Level of Matrix Metalloproteinase 9 in Patients With High-Grade Intraepithelial Neoplasia and Early Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Reproductive Sciences.* 2007;14(7):710.
42. Nuovo GJ. Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Research.* 1995;55(2):267-75.
43. Muller M SK, Katz AA, Jabbour HN. Seminal plasma promotes the expression of tumorigenic and angiogenic genes in cervical adenocarcinoma cells via the E-series prostanoid 4 receptor. *Endocrinology.* 2006;147(7):3356-65.
44. Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, De Angelo Andrade LAL. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity

- and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecologic Oncology*. 2006;102(3):537-41.
45. Tangjitgamol S RP, Sun CC, See HT, Jhingran A, Kavanagh JJ, Deavers MT. Expression of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2, estrogen receptor, and progesterone receptor in small cell and large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathologic and prognostic study. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15:646-56.
 46. Vences-Velazquez A. Expresión de ciclooxigenasa-2 y el factor de crecimiento del endotelio vascular en cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. México D.F.: Instituto Politecnico Nacional, 2007. 73 p.
 47. Hammes LS, Tekmal RR, Naud P, et al. Up-regulation of VEGF, c-fms and COX-2 expression correlates with severity of cervical cancer precursor (CIN) lesions and invasive disease. *Gynecologic Oncology*. 2008;110(3):445-51.
 48. Mathur RS, Mathur SP. Vascular endothelial growth factor (VEGF) up-regulates epidermal growth factor receptor (EGF-R) in cervical cancer in vitro: this action is mediated through HPV-E6 in HPV-positive cancers. *Gynecologic Oncology*. 2005;97(1):206-13.
 49. Clere N, Bermont L, Fauconnet S, et al. The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Experimental Cell Research*. 2007;313(15):3239-50.
 50. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1. *Genes & development*. 2000;14(1):34-44.
 51. Kim SH, Juhn YS, Kang S, et al. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ERK1, 2 and PI3K/Akt. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2006;63(7):930-8.
 52. Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 and human papilloma virus infection are associated with malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *Journal of surgical oncology*. 2006;93(1):80-5.
 53. Cardeal LBS, Brohem CA, Corrêa TCS, et al. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochemistry and Cell Biology*. 2006;84(5):713-9.
 54. Cooper K, Herrington CS, Stickland JE, Evans MF, McGee JO. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic in situ hybridisation. *British Medical Journal*. 1991;44(12):990-6.
 55. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, et al. Estimation of Prognoses for Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 by p16INK4a Immunoreexpression and High-Risk HPV In Situ Hybridization Signal Types. *American journal of clinical pathology*. 2007;128(2):208.
 56. Guo M, Gong Y, Deavers M, et al. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(1):274-80.

