



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



**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE  
PEROXIREDOXINA- III, MCM2/TOP2 $\alpha$  Y SU RELACIÓN  
CON EL ESTADO FÍSICO DEL VPH-AR EN LA  
CARCINOGENESIS CERVICAL”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**Q.B.P. ROSALÍA CAMPOS MALDONADO**

DIRECTORA DE TESIS: Dra. LUZ DEL CARMEN ALARCÓN ROMERO

CODIRECTORA DE TESIS: Dra. YANETH CASTRO CORONEL



CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2018



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

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 27 días del mes de junio de dos mil diecisiete se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “Evaluación de la expresión de Peroxiredoxina-III, MCM2/TOP2 $\alpha$  y su relación con el estado físico del VPH-AR en la carcinogénesis cervical”, presentada por la alumna Rosalía Campos Maldonado, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero  
Dirección de tesis

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Ana Laura Pereira Suárez

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro  
Coordinación del

Dra. Isela Parra Rojas  
Directora del Posgrado de la Facultad de  
Ciencias Químico Biológicas  
Coordinación 2014-2018

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro  
Coordinación de

Dra. Analía Vences Velázquez  
Directora de la Facultad de Ciencias Químico  
Biológicas  
DIRECCIÓN 2014-2018

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

**Bajo la dirección de:**

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

**En codirección de:**

Dra. Yaneth Castro Coronel

**La asesoría de:**

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dra. Mónica Espinoza Rojas

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Ana Laura Pereira Suárez

Rosalía Campos Maldonado fue beneficiaria de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de CVU: 529528, perteneciente al Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas, UAGro.

Fue beneficiaria de la beca FOMIX-CONACyT-GUERRERO clave 249719 para realizar una estancia de investigación en el Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Ana Laura Pereira Suárez.

Esta investigación forma parte del financiamiento del Conacyt: fondo sectorial de Investigación en Salud y seguridad social: Diseño de un panel de biomarcadores para la detección temprana de cáncer cérvicouterino a partir de una sola toma de muestra. 2014 (dos años). Clave: 201579. Y por recursos financieros del Cuerpo Académico consolidado "BIOMEDICINA MOLECULAR" clave UAGRO-CA-109.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero** por permitirme realizar este proyecto bajo su dirección; por el esfuerzo y tiempo empeñado para la culminación del mismo. Gracias por la oportunidad de involucrarme en todos los aspectos del laboratorio para bien del proyecto. Y sobre todo, agradezco la amistad que hay al trabajar con usted.

A la **Dra. Yaneth Castro Coronel** por su confianza y el apoyo incondicional que hubo en el transcurso del proyecto, por sus aportaciones y por estar disponible siempre. Sobre todo por su disposición de orientarme, y agradezco la amistad que me ofreció.

A la **Dra. Eugenia Flores Alfaro** por su apoyo incondicional para el análisis estadístico, por las aportaciones asertivas al escrito, y por la disposición de ayudar a realizar la estancia de investigación. Agradezco su persona y amistad.

A la **Dra. Mónica Espinoza Rojas** por su apoyo en el transcurso del escrito, por sus aportaciones y por apoyarme en el transcurso de la maestría, por su amistad y cariño.

A la **Dra. Berenice Illades Aguiar** por apoyarme a seguir superándome y por la confianza en realizar la Maestría, por sus aportaciones al trabajo y el cariño.

A la **Dra. Ana Laura Pereira Suárez**, por permitirme realizar la estancia de investigación en su laboratorio, por el apoyo incondicional durante y fuera de la estancia, por la amistad que me brindó.

Al **Dr. Napoleón Navarro Tito** por el apoyo, su tiempo y aportaciones para mejorar como persona y estudiante en el transcurso de la maestría.

A la **Dra. Olga Delia Garibay, Julio Ortíz, Mónica Ruano, Hilda Jiménez** y **Dra. Berenice Illades** por su apoyo para ingresar al posgrado.

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

A mis compañeros de laboratorio y de generación por compartir los conocimientos, sus consejos y la amistad brindada en el transcurso de la maestría.

## DEDICATORIAS

A mis padres, **Isabel Maldonado González y Pablo Campos Martínez:**

Por su apoyo incondicional durante el transcurso de este proyecto, por su amor, cariño, confianza y por todos los consejos para no desistir de esta meta en la vida. Gracias por las enseñanzas para ser mejor persona en la vida, el amor de familia, respeto lo aprendí de ustedes. Son mi mayor ejemplo de esfuerzo, perseverancia, amor, sacrificio, respeto, tolerancia y humildad. Los Amo.

A mis hermanos, **Bellarmina, Pablo, Edith, Osvelia, Ariadna y Kevin:**

Por sus palabras de aliento, su compañía, por todos los buenos momentos y el gran apoyo que todos me han brindado en el transcurso de este tiempo y amor de siempre. Los amo.

A **Carlos Alberto Candia Ponce:**

Por tu apoyo incondicional, por las alegrías, palabras de aliento y la confianza para culminar esta meta. Te agradezco por la compañía y las enseñanzas, gracias por hacerme mejor persona.

A Dios, mi familia y amigos, por las alegrías y el cariño de siempre.

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE  
PEROXIREDOXINA-III, MCM2/TOP2 $\alpha$  Y SU RELACIÓN  
CON EL ESTADO FÍSICO DEL VPH-AR EN LA  
CARCINOGENÉNESIS CERVICAL**

## ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT .....	2
III.	INTRODUCCIÓN.....	3
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
V.	RESULTADOS .....	10
VI.	DISCUSIÓN.....	20
VII.	CONCLUSIONES.....	31
VIII.	PERSPECTIVAS.....	33
IX.	REFERENCIAS .....	34

## I. RESUMEN

**Introducción:** El carcinoma de células escamosas (CCE) se relaciona causalmente con las oncoproteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), varios estudios han sugerido el papel del estrés oxidativo en la progresión de una lesión escamosa intraepitelial (LEI) a CCE, al inducir daño al ADN y la integración del VPH-AR, que está asociado a la sobreexpresión de proteínas específicas. **Objetivo:** Evaluar la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  en muestras cito-histológicas de la misma paciente y conocer si existe una relación entre la expresión de las proteínas con el estado físico del VPH-AR. **Materiales y métodos:** Se analizaron muestras cito-histológicas de 100 mujeres; 20 citologías en base líquida con células sin LEI/sin VPH, 20 sin LEI/con VPH, 20 citologías y 20 biopsias con LEI de bajo grado (LEIBG), 20 citologías y 20 biopsias de LEI de alto grado (LEIAG) y 20 biopsias de CCE. El genotipo viral se determinó por INNO-LiPA-HPV Genotyping Extra II Amp. La expresión de las proteínas se evaluó mediante inmunocito-histoquímica y se cuantificó con el Software Image Pro Plus 6.0. El estado físico del VPH-AR por hibridación *In Situ* con amplificación con tiramida. **Resultados:** Se identificaron 10 tipos de VPH-AR, siendo el más frecuente el VPH-16 con el 35.9%. La expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  incrementó de acuerdo al grado de lesión cito ( $p < 0.001$ ) e histológica ( $p < 0.001$ ). El estado físico del VPH-AR se asoció con el grado de la lesión ( $p < 0.001$ ). No se observaron diferencias significativas entre el estado integrado y los niveles de expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$ . **Conclusión:** La expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$ , tanto citológica como histológica, incrementó de acuerdo al grado de lesión en presencia del VPH-AR, lo que evidencia la alteración en la proliferación celular y el desbalance redox mitocondrial, por lo cual, se sugiere que estas proteínas podrían ser potenciales biomarcadores de la progresión de la lesión, utilizando la citología en base líquida e inmunocitoquímica y se podría en el seguimiento de los casos, descartar una lesión mayor y de manera oportuna. **Palabras claves:** Lesiones escamosas intraepiteliales, carcinoma de células escamosas, Peroxiredoxina-III, MCM2/TOP2 $\alpha$ , VPH-AR, estado físico viral.

## II. ABSTRACT

**Introduction:** Squamous cell carcinoma (SCC) is causally related to the high-risk human papilloma virus (HR-HPV) oncoproteins E6 and E7, several studies have suggested the role of oxidative stress in the progression of a squamous intraepithelial lesion (SIL) to SCC, by inducing DNA damage and the integration of HR-HPV, which is associated with overexpression of specific proteins. **Objective:** To evaluate the expression of Prx III and MCM2/TOP2 $\alpha$  in cyto-histological samples of the same patient and to know if there is a relationship between the expression of proteins with the physical state of HPV-AR. **Materials and methods:** Cyto-histological samples from 100 women were analyzed; 20 liquid based cytologies with cells without SIL/without HPV, 20 without SIL/with HPV, 20 cytologies and 20 biopsies with SIL of low grade (LSIL), 20 cytologies and 20 biopsies with high grade (HSIL) and 20 biopsies of SCC. INNO-LiPA-HPV Genotyping Extra II Amp determined the viral genotype. The expression of the proteins was evaluated by immunocyto-histochemistry and quantified with the Software Image Pro Plus 6.0. The physical state of HR-HPV by *In Situ* hybridization with tyramide amplification. **Results:** were identified 10 types of HR-HPV, being the most frequent HPV-16 with 35.9%. The expression of Prx III and MCM2/TOP2 $\alpha$  increased according to the degree of cyto ( $p < 0.001$ ) and histological ( $p < 0.001$ ). The physical state of the HR-HPV was associated with the degree of the lesion ( $p < 0.001$ ). No significant differences observed between the integrated state and the expression levels of Prx III and MCM2/TOP2 $\alpha$ . **Conclusion:** The expression of Prx III and MCM2/TOP2 $\alpha$ , both cytological and histological, increased according to the degree of injury in the presence of HR-HPV, which shows the alteration in cell proliferation and mitochondrial redox imbalance, so it is suggested that these proteins could be potential biomarkers of the progression of the lesion, using the liquid-based cytology and immunocytochemistry and could be in the follow-up of the cases, rule out a major injury and in a timely manner.

**Key words:** Intraepithelial squamous lesions, Squamous cell carcinoma, Peroxiredoxin III, MCM2/TOP2 $\alpha$ , HR-HPV, viral physical state.

### III. INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células escamosas (CCE) representa la tercera causa de muerte en mujeres a nivel mundial con una incidencia del 15.5% y una mortalidad del 12.8%; y la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas (Torre, *et al.*, 2012). El CCE se relaciona causalmente con la sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) (Saunier, *et al.*, 2008), el más frecuente es el VPH-16 (Ferlay, *et al.*, 2012), asimismo, el estrés oxidativo (EO) generado por las infecciones bacterianas puede contribuir a la iniciación y/o progresión de la LEI (Mitra, *et al.*, 2016).

Las infecciones bacterianas como *Gardnerella vaginalis* promueven la inflamación crónica, que junto con las oncoproteínas virales E6 y E2 del VPH-AR pueden condicionar una infección persistente, que favorece la presencia de EO. El EO puede ser cofactor en la estimulación de la integración viral promoviendo la desregulación de los oncogenes celulares y virales durante la progresión del CCE, en consecuencia, la proliferación celular, invasión y metástasis (Senapati *et al.*, 2016).

El EO afecta a las células como resultado del incremento de las especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), por pérdida de la función antioxidante o por falla en los mecanismos de reparación del daño oxidativo (Gulam, *et al.*, 2006; Kim, *et al.*, 2009). El EO ocasiona daños a proteínas, lípidos y al ADN (Ding, *et al.*, 2007), al respecto, Chen y cols., reportaron que la isoforma de E6 del VPH-16, la E6 estrella (E6\*) es capaz de incrementar los niveles de ROS al inhibir la gamma glutamil sintetasa (gamma GCS), enzima que cataliza el primer paso de la síntesis del glutatión, causando EO y en consecuencia, daño al ADN, este evento favorece la integración del VPH-16 (Chen, *et al.*, 2016).

La integración del ADN viral en el genoma del huésped se postula como un evento temprano en la carcinogénesis cervical, dado que el estado integrado del VPH-AR se reportó en casos de lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) de bajo grado

(LEIBG) (Kulmala *et al.*, 2006). El grupo de trabajo encontró la integración del VPH-16 en muestras de células sin LEI, así como en LEIBG de mujeres guerrerenses (Vega-Peña *et al.*, 2013). La integración del ADN del VPH-AR elimina o interrumpe el fragmento de la región E1 y E2 y la sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 del genoma viral; que inactivan las funciones de los genes supresores de tumor p53 y Rb respectivamente así como la activación de oncogenes en el genoma del huésped (Adams *et al.*, 2014).

La importancia del diagnóstico de las LEI ha llevado a la búsqueda de marcadores involucrados en la persistencia e integración viral, relacionados con el EO. Dado que la integración favorece la alteración de la expresión de genes involucrados en la carcinogénesis cervical (Pinto *et al.*, 2012); es importante analizar biomarcadores implicados en condiciones específicas; tal es el caso de la Peroxiredoxina-III, enzima antioxidante, que regula los niveles de ROS al metabolizar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de tioredoxina, ya que se encontró sobreexpresada en NIC I-III y en cáncer cervical (Kim, *et al.*, 2009), puesto que permite evaluar un contexto redox mitocondrial (Cox, *et al.*, 2010; Whitaker, *et al.*, 2013).

Por otro lado, la persistencia de la lesión y el monitoreo de las pacientes es importante, por ello un marcador que nos permita evaluar la tasa de proliferación en relación al VPH-AR es de suma importancia, dentro de este contexto, MCM2/TOP2 $\alpha$  son proteínas implicadas en la progresión de la LEI en presencia del VPH-AR, ya los oncogenes E6 y E7 del VPH-AR promueven la sobreexpresión de MCM2/TOP2 $\alpha$ . MCM2 es una enzima involucrada en la formación de horquillas de replicación y en el reclutamiento de otras proteínas relacionadas con la replicación del ADN, mientras que TOP2 $\alpha$  participa en procesos como la condensación cromosómica, la separación de cromátidas y el alivio del estrés por torsión que se produce durante la transcripción y replicación del ADN (Brown, *et al.*, 2012). Se ha sugerido que la evaluación de MCM2/TOP2 $\alpha$  puede evidenciar la progresión de la LEIBG a LEIAG, por lo que es necesario detectar aquellas lesiones que puedan progresar a una lesión mayor (Brown, *et al.*, 2012).

Por lo que nos pareció importante evaluar la expresión de Prx III que denota un contexto de EO mitocondrial y por otro lado MCM2/TOP2 $\alpha$  nos habla de la infección persistente del VPH, que juntas pueden coadyuvar para favorecer la persistencia, integración y progresión de las lesiones premalignas y malignas del cérvix uterino. Por ello, en este estudio se evaluó la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  y su relación con el estado físico del VPH-AR, en muestras citohistológicas de cada una de las pacientes y determinar si la integración del VPH-AR incrementa la expresión de dichas proteínas y de esta manera contribuir con resultados complementarios en el diagnóstico oportuno de las LEI y CCI, de esta manera aportar información acerca de grupos de riesgo que puedan progresar una lesión mayor a través de métodos menos invasivos como la citología en base líquida.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Pacientes y muestras*

Se estudiaron mujeres que acudieron al servicio de colposcopia para la toma de muestra cito-histológica del servicio clínica de displasias del Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón” (H.G.R.A.A) de la ciudad de Chilpancingo, Gro., también el Instituto Estatal de Cancerología “Arturo Beltrán Ortega” de la ciudad de Acapulco, Gro., proporcionó biopsias de carcinoma de células escamosas y se tomaron muestras citológicas de mujeres que asistieron al Servicio de diagnóstico integral de cáncer cérvico uterino y VPH de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Cada participante del proyecto firmó el formato de consentimiento informado y respondió una encuesta con el fin de obtener la información clínica y sociodemográfica.

De manera general, la toma de muestra cito-histológica de cada una de las pacientes fue dirigida por colposcopia y el ginecólogo emitió su diagnóstico colposcópico. La muestra citológica se obtuvo de la lesión que se diagnosticó colposcópicamente asegurando la zona de transformación escamocolumnar y se realizó el extendido convencional y se obtuvo una muestra para citología en base líquida (liquid-PREP™) (LPT). Después se realizó una toma de muestra de estas zonas para realizar el estudio molecular para la detección y tipificación del VPH. Finalmente se realizó la biopsia del sitio de donde se emitió el diagnóstico colposcópico. Las muestras citológicas se tiñeron por la técnica de Papanicolaou y el diagnóstico citológico se emitió con base al Sistema de Bethesda, se clasificaron cuatro grupos: 1) citologías con células sin LEI/sin VPH (n=20), 2), citologías con células sin LEI/con VPH (n=20), 3) Citologías y biopsias de LEIBG (n=40), 4) Citologías y biopsias de LEIAG (n=40) y 5) Biopsias de CCE (n=20). En la muestra de citología convencional se caracterizó el patrón inflamatorio cervical, clasificándolo en cervicitis aguda, mediante la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y cervicitis crónica cuando estaban presentes los PMN más los histiocitos. También se realizaron las pruebas de KOH y pH vaginal para

el diagnóstico presuntivo de vaginosis bacteriana utilizando los criterios clínicos de Amsel y *Cols*.

Las muestras de biopsias se almacenaron en formol neutro amortiguado en buffer de fosfatos al 10% para su posterior procesamiento con la técnica de inclusión en parafina obteniéndose los cortes de 3  $\mu$ m de grosor, los cuales se desparafinaron en un horno a 70 °C durante 10 min y se preservaron en xilol por 15 días para realizar la tinción de H-E para el diagnóstico histopatológico. Los demás cortes se reservaron para las inmunohistoquímicas. El diagnóstico histológico para la clasificación de los carcinomas fue en base a los criterios de la Federación de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y se utilizó la clasificación de las neoplasias intrepiteliales cervicales (NIC) para emitir la equivalencia histológica de las lesiones premalignas del cérvix uterino.

#### *Tipificación viral*

El tipo viral fue detectado y tipificado por INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II (Innogenetics) que permite la tipificación de 28 genotipos de VPH por PCR-SPF10 seguido de una hibridación reversa con sondas de oligonucleótidos específicos para la identificación de cada tipo viral.

#### *Inmunocitoquímica*

Las muestras de citología en base líquida se sometieron a recuperación antigénica en una olla de presión (PASCAL-DaKo) en buffer de Citratos (pH 6) (Santa Bárbara, CA, EE.UU.) durante 6 minutos a 120 °C para Prx III (Abcam, Cambridge, UK) y 15 minutos a 120 °C para ProEx<sup>TM</sup> C (Tripath Imaging, Burkington, NC), para detectar el complejo MCM2/TOP2 $\alpha$  que incluye anticuerpos monoclonales recombinantes con las clonas MCM2 26H6.19, MCM2 27C5.6, TOTP2A SWT3D1. La actividad endógena de peroxidasa fue bloqueada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% por 1 hora. Se incubó el anticuerpo ProEx<sup>TM</sup> C durante 2 horas y Prx III (1:200) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se visualizaron usando el Kit HRP/DAB (Cell Marque Corporation, Hot Springs, AR, EE. UU) y contrateñidas

con Hematoxilina de Mayer. La línea celular SiHa (VPH-16) se utilizó como control positivo. La misma línea, pero omitiendo el anticuerpo primario, se utilizó como control negativo. Como controles para evaluar la expresión de Prx III, se indujo estrés oxidativo a una muestra del grupo sin LEI/sin VPH mediante el uso de *Ter-Butyl-hydroperoxide* (TBHP) a una concentración de 20  $\mu$ M. Se evaluó el porcentaje de células positivas de acuerdo a los criterios de Cambruzzi *et al.*, 2005; 1-10%, 11-50% y >50%.

### *Inmunohistoquímica*

Las biopsias se preservaron en formol al 10% amortiguado en buffer de fosfatos durante 1 mes. Se realizaron cortes de 3 micras de espesor. Se realizó Hematoxilina y Eosina (HE). La exposición de los epítopes se logró en una olla de presión (PASCAL-DaKo) en buffer de citratos (pH 6) (Santa Bárbara, CA, EE.UU.) a 120°C durante 10 minutos para Prx III y 15 minutos para ProEx™ C. La actividad endógena de peroxidasa fue bloqueada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% por 1 hora. Las muestras se incubaron con su respectivo anticuerpo; ProEx™ C durante 2 horas, Prx III (1:200) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron visualizadas usando el Kit HRP/DAB (Cell Marque Corporation, Hot Springs, AR, EE. UU) y contrateñidas con Hematoxilina de Mayer. Los cortes histológicos se evaluaron tomando en cuenta los criterios establecidos por Sánchez-Rosales *et al.*, 2004; Conesa-Zamora *et al.*, 2009: 0 (La inmunotinción se encuentra solamente en algunas células basales profundas o parabasales del cérvix), 1+ (Inmunomarcaje en 1/3 profundo del epitelio), 2+ (Inmunomarcaje en 2/3 profundo del epitelio) y 3+ (Inmunomarcaje observado en todo el espesor del epitelio escamoso cervical, incluyendo las células superficiales).

### *Análisis densitométrico*

Se capturaron 5 imágenes de diferentes campos mediante un microscopio óptico (Leica DM1000 LED) acoplada a una cámara digital (Leica EC3). Las imágenes se analizaron en el Software Image-Pro Plus 6.0® (IPP6) (Media Cybernetics, Silver

Spring, MD. USA). Los datos numéricos se presentan como densidad media óptica relativa  $\pm$  DE.

### *Hibridación in situ*

La detección del genoma viral se realizó con un sistema de amplificación de señal con tiramida (GenPoint Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EE.UU). Las células se sometieron a digestión enzimática con proteinasa K (1: 1000) seguido del reactivo (ADN viral biotilnado) que contiene sondas para los 13 genotipos del VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Las muestras se desnaturalizaron durante 10 minutos y se sometieron a hibridación durante 20 horas (Hybridizer Dako, Carpinteria, CA, EE.UU.). Después se colocan en una solución astringente (dilución 1:50) a 55°C durante 20 minutos y el resultado fue visualizado usando el Kit HRP/DAB (Cell Marque Corporation, Hot Springs, AR, EE. UU) y contrateñidas con Hematoxilina de Mayer. La reacción positiva se visualizó con un color marrón en el interior del núcleo y de acuerdo con el tipo de señal se clasificó como difusa (estado episomal), puntiforme (estado integrado) o mixto (episomal e integrado). La línea celular SiHa (VPH-16) se utilizó como control positivo que tiene el estado integrado; la misma línea celular sin la sonda se utilizó como control negativo.

### *Análisis estadístico*

La información obtenida de los estudios citológicos, histológicos, tipificación y datos de las encuestas fueron capturados en el programa STATA versión 12. Se evaluó la relación entre las proteínas y el estado físico del VPH-AR. Se determinó la frecuencia relativa para las diferentes variables y se utilizó la prueba ANOVA y Chi2 para evaluar la correlación. Para determinar la relación entre la expresión de Prx III, MCM2/TOP2 $\alpha$  con el grado de la lesión se utilizó un modelo de regresión lineal obteniendo los coeficientes  $\beta$  con intervalos de confianza del 95%. Se consideró un valor significativo de  $p \leq 0.05$ .

## V. RESULTADOS

En el presente estudio, se incluyeron un total de 100 mujeres; 20 muestras de citologías con células sin LEI/sin VPH, 20 muestras de citologías con células sin LEI/con VPH, 20 citologías y biopsias de LEIBG, 20 citologías y biopsias de LEIAG y 20 biopsias de CCE. Las pacientes con CCE no recibieron tratamiento de quimioterapia o radioterapia antes de la toma de muestra. La edad promedio fue de 42.47 ( $\pm 13.50$ ) años. En la Tabla 1 se muestran las características generales de la población, como edad ( $p < 0.001$ ), I.V.S.A ( $p = 0.003$ ), número de partos ( $p < 0.001$ ) y la respuesta inflamatoria que presenta cada paciente ( $p < 0.001$ ). Estas variables muestran diferencias significativas de acuerdo al grado de la LEI.

**Tabla 1. Características generales de la población de estudio**

Variables	Sin EI/sin VPH n=20	Sin LEI/con VPH n=20	LEIBG n=20	LEIAG n=20	CCE n= 20	Total n=100	Valor de p
<sup>1</sup> Edad	40.05 ( $\pm 9.68$ )	39.45 ( $\pm 10.68$ )	40.6 (12.04)	37.4 ( $\pm 11.34$ )	54.85 ( $\pm 16.13$ )	42.47 ( $\pm 13.50$ )	<b>&lt;0.001</b>
<b>*I.V.S.A</b>							
<14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (6.25)	1 (1.04)	<b>0.014</b>
14-20	10 (50)	10 (50)	17 (85)	17 (85)	16 (81.25)	67 (69.79)	
>21	10 (50)	10 (50)	3 (15)	3 (15)	2 (12.50)	28 (29.17)	
<b>*N° de compañeros sexuales</b>							
1	14 (70)	12 (60)	11 (55)	12 (60)	11 (68.75)	60 (62.50)	0.856
>2	6 (30)	8 (40)	9 (45)	8 (40)	5 (31.25)	36 (37.50)	
<b>*N° de partos</b>							
0	12 (60)	10 (50)	0 (0)	5 (25)	1 (5)	28 (28)	<b>&lt;0.001</b>
>1	8 (40)	10 (50)	20 (100)	15 (75)	19 (95)	72 (72)	
<b>*Hábito de fumar</b>							
Si	2 (10)	4 (20)	0 (0)	2 (10)	1 (5)	9 (9)	0.251
No	18 (90)	16 (80)	20 (100)	18 (90)	19 (95)	91 (91)	
<b>*Hábito de beber alcohol</b>							
Si	7 (35)	9 (45)	4 (20)	2 (10)	1 (5)	23 (23)	0.013
No	13 (65)	11 (55)	16 (80)	18 (90)	19 (95)	77 (77)	
<b>*Respuesta inflamatoria</b>							
Negativa	1 (5)	2 (10)	0 (0)	1 (5)		4 (5)	<b>&lt;0.001</b>
Leve	2 (10)	5 (25)	0 (0)	0 (0)	**	7 (8.75)	
Moderada	16 (80)	13 (65)	17 (0)	12 (60)		58 (72.50)	
Intensa	1 (5)	0 (0)	3 (15)	7 (35)		11 (13.75)	
<b>Patrón microbiano</b>							
Ninguno	18 (90)	18 (90)	17 (85)	14 (70)	**	68 (82.95)	0.382
Células clave	2 (10)	2 (10)	3 (15)	6 (30)		13 (16.05)	

<sup>1</sup>Edad en media ( $\pm$ DE), valor de  $p < 0.05$  (ANOVA). \*Datos mostrados en n (%) son frecuencias de las variables  $p < 0.05$  (Chi2). I.V.S.A: Inicio de Vida Sexual Activa. LEI: lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, LEIAG: Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado, CCE: Carcinoma de células escamosas, \*\* (Sin datos).

En la muestra de citología convencional se caracterizó el patrón inflamatorio cervical, clasificándolo en cervicitis aguda (presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN); del grupo sin LEI/sin VPH, el 85% tuvo cervicitis aguda, el 10% cervicitis crónica (presencia de PMN, linfocitos e histiocitos) y 10% sin respuesta inflamatoria. Del grupo sin LEI/con VPH; 90% tuvo cervicitis aguda y 10% sin respuesta inflamatoria. Dentro de las LEIBG; el 65% tuvo cervicitis aguda y 35% cervicitis crónica y respecto a las LEIAG; el 45% tuvo cervicitis aguda y el 55% cervicitis crónica. También se realizaron las pruebas de KOH y pH vaginal para el diagnóstico presuntivo de vaginosis bacteriana utilizando los criterios clínicos de Amsel y *Co/s*. Del grupo sin LEI/sin VPH y sin LEI/con VPH; sólo el 10% y del grupo de LEIBG y LEIAG; el 25% presentaron vaginosis bacteriana (Tabla 2).

**Tabla 2. Características citológicas en los extendidos convencionales**

	Sin LEI/sin VPH n=20 (%)	Sin LEI/con VPH n=20 (%)	LEIBG n=20 (%)	LEIAG n=20 (%)
Patrón microbiano				
Ninguno	11 (55)	15 (75)	7 (35)	3 (15)
Bacilo de Döderlein	7 (35)	3 (15)	8 (40)	12 (60)
Células clave	2 (10)	2 (10)	5 (25)	5 (25)
Patrón Inflamatorio				
Ninguno	2 (10)	2 (10)		
Cervicitis aguda	17 (85)	18 (90)	13 (65)	9 (45)
Cervicitis crónica	1 (5)	0 (0)	7 (35)	11 (55)

LEI: lesión escamosa intraepitelial; LEIBG: LEI de bajo grado; LEIAG: LEI de alto grado; VPH-AR: Virus de Papiloma Humano de alto riesgo.

### *Frecuencia de los genotipos del VPH*

La presencia y tipos de VPH-AR fueron analizadas por el método de INNO-LiPA HPV Genotyping. El grupo de citologías sin LEI/sin VPH fueron negativos a la presencia del VPH, mientras que el 35.9% de las muestras fueron positivas para VPH-16, 3.85% de VPH-18, 31 y 51, 2.56% entre otros, además, 38.46% de las muestras tienen infección múltiple por VPH (que incluyó VPH-AR y VPH-BR) (Tabla 3). Estos datos demuestran que el VPH-16 sigue siendo uno de los más frecuentes en la carcinogénesis cervical.

**Tabla 3. Frecuencia de los VPH-AR en la población de estudio**

Tipos de VPH-AR	Sin LEI/con VPH n=20	LEIBG n= 20	LEIAG n= 20	CCE n=20	Total
16	4 (20)	2 (10)	3 (16.67)	19 (95)	28 (35.9)
18	1 (5)	1 (5)	1 (5.56)	0 (0)	3 (3.85)
31	1 (5)	2 (10)	0 (0)	0 (0)	3 (3.85)
39	1 (5)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	2 (2.56)
45	1 (5)	0 (0)	1 (5.56)	0 (0)	2 (2.56)
51	3 (15)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3.85)
52	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2.56)
53	1 (5)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	2 (2.56)
56	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2.56)
66	0 (0)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	1 (1.28)
IM POR VPH (AR y BR)	4 (20)	13 (70)	12 (66.67)	1 (5)	30 (38.46)

Datos mostrados en n (%). LEI: lesión escamosa intraepitelial, LEIBG: Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, LEIAG: Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado, CCE: Carcinoma de células escamosas, I.V.S.A: Inicio de Vida Sexual Activa, IM: Infección múltiple, VPH-AR: Virus del papiloma de alto riesgo, VPH-BR: Virus del papiloma de bajo riesgo.

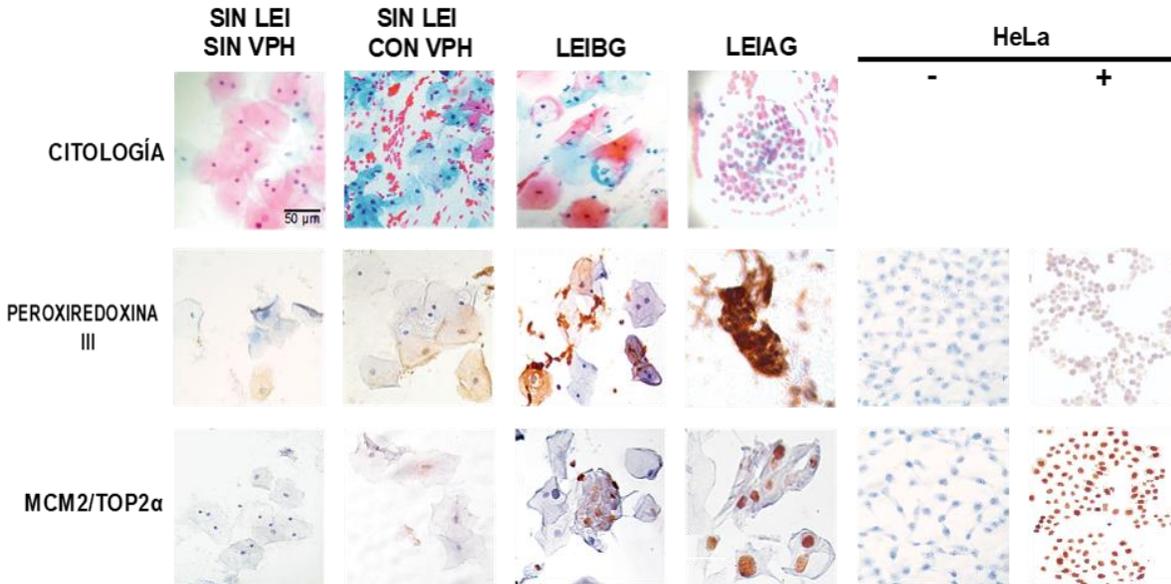
#### *Expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$ en citologías en los grupos de estudio*

El nivel de expresión de Prx III se encontró leve en el 80% de los casos sin LEI/ sin VPH, al igual que en el grupo sin LEI/con VPH. En los casos de las LEIBG, el 75% de las muestras presentaron expresión moderada, el 65% de los casos de LEIAG, presentó expresión intensa. La expresión de Prx III incrementó de acuerdo al grado de la lesión ( $p < 0.001$ ) (Tabla 5 y Figura 2). Respecto a la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$ , el 30% de las células sin LEI/con VPH presentó una expresión leve de éstas proteínas, mientras el 95% de los casos de LEBG tuvieron expresión moderada de MCM2/TOP2 $\alpha$ , pero el 35% de los casos de LEIAG, presentó una expresión intensa (Tabla 5 y Figura 2). Estos resultados muestran el incremento de la expresión respecto al grado de la lesión citológica ( $p < 0.001$ ).

**Tabla 5. La expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  incrementan de acuerdo al grado de la lesión premaligna en muestras citológicas**

Nivel de expresión	DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO				* <i>p</i>
	sin LEI/sin VPH n=20	sin LEI/con VPH n=20	LEIBG n=20	LEIAG n=20	
<b>Prx III</b>					
Negativo	0 (0)	2 (10)	0 (0)	0 (0)	<0.001
Leve (1-10%)	16 (80)	16 (80)	0 (0)	0 (0)	
Moderado (11-50)	4 (20)	2 (10)	15 (75)	7 (35)	
Intenso (Más del 50%)	0 (0)	0 (0)	5 (25)	13 (65)	
<b>MCM2/TOP2<math>\alpha</math></b>					
Negativo	20 (100)	14 (70)	0 (0)	0 (0)	<0.001
Leve (1-10%)	0 (0)	6 (30)	0 (0)	0 (0)	
Moderado (11-50)	0 (0)	0 (0)	19 (95)	13 (65)	
Intenso (Más del 50%)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	7 (35)	

LEI: lesión escamosa intraepitelial. LEIBG: LEI de bajo grado. LEIAG: LEI de Alto Grado. VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo. Datos mostrados en n (%). Diagnóstico mediante los criterios de Cambuzzi *et al.*, 2005, \**p*<0.05 (chi2)



**Figura 2. Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  incrementan de acuerdo al grado de la LEI en presencia del VPH-AR.** Citología en base líquida teñida con la tinción de Papanicolaou, representa las características de la lesión. Expresión citoplasmática de Prx III en muestras sin LEI/sin VPH, sin LEI/con VPH, LEIBG y LEIAG. Expresión nuclear de MCM2/TOP2 $\alpha$  en muestras sin LEI/con VPH, LEIBG y LEIAG. Control: Células HeLa; expresión citoplasmática de PRX III y nuclear de MCM2/TOP2A. Técnicas: Estreptavidina biotina-Peroxidasa; Citología en base líquida. 50 $\mu$ m.

### *Expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$ en muestras histológicas de NIC y CCE*

Previo al análisis inmunohistoquímico, la tinción de Hematoxilina-Eosina mostró que el 20% de los cortes que tuvieron el diagnóstico colposcópico de LEIBG y el 15% de LEIAG, sólo presentaron epitelio cilíndrico, por lo que no fueron representativos de la lesión colposcópica que se diagnosticó, en estos casos, la expresión de las proteínas sólo se evaluó en las células cilíndricas de epitelio y glándulas endocervicales presentes en las biopsias dirigidas por colposcopia. Sólo MCM2/TOP2 $\alpha$  se expresó en las células cilíndricas (Figura 3).

La evaluación de la expresión de las proteínas en las lesiones premalignas muestra que la expresión de Prx III se encontró en un 62.5% en el primer tercio profundo del epitelio de las LEIBG (NIC I), mientras que MCM2/TOP2 $\alpha$  se observó solo en el 25% en el mismo estrato epitelial de estos casos (Tabla 6 y Figura 3), pero en el 62.5% de las lesiones tempranas, la expresión se encontró en los tercios profundo e intermedio.

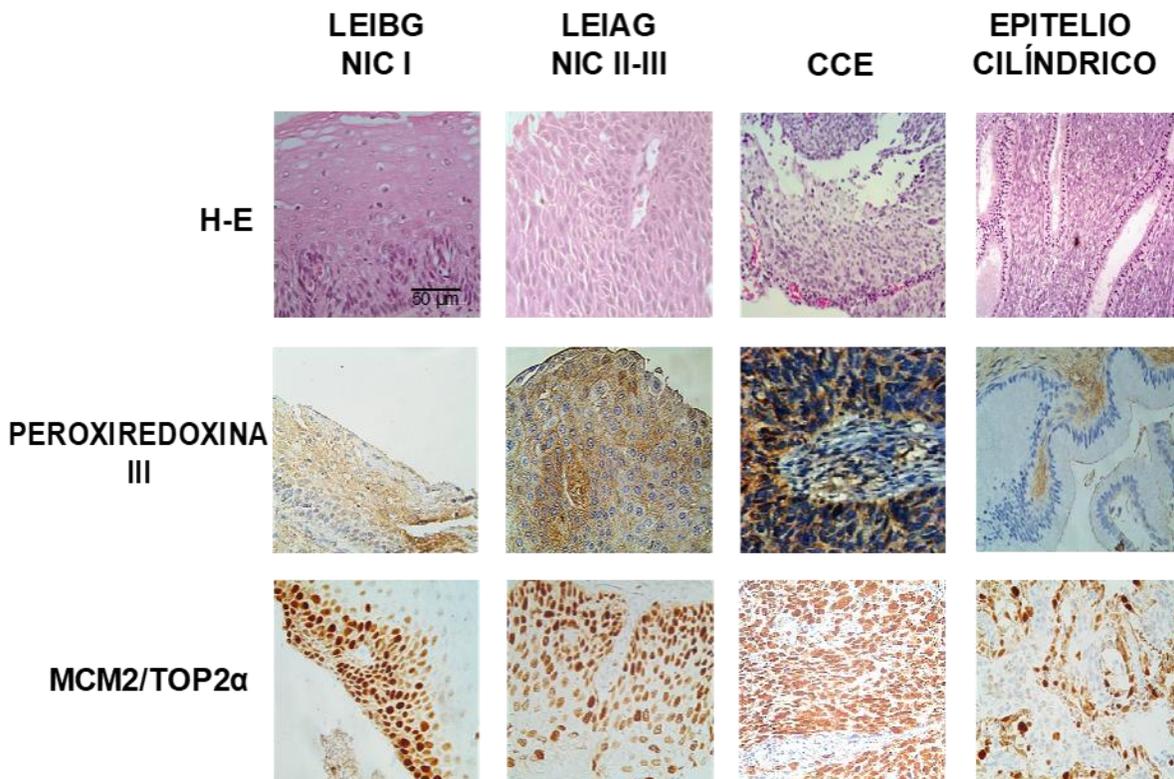
En los casos de LEIAG (NIC II-III), Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  mostraron expresión en los dos tercios profundos del epitelio en un 35.29% y 82.35 respectivamente, mientras que el 58.82% y 17.65% respectivamente, la expresión de estas proteínas se encontró en todo el espesor del epitelio (Tabla 6 y Figura 3).

El 100% de los casos de CCE presentaron expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  en núcleos pleomórficos de nidos tumorales en el estroma cervical (Tabla 6), tanto Prx III como MCM2/TOP2 $\alpha$  mostraron un incremento de la expresión de acuerdo al grado de la lesión ( $p < 0.001$ ). Respecto al estroma cervical, también se observó expresión de Prx III en todos los casos de las lesiones premalignas.

**Tabla 6. La expresión de Prx III y MCM2/TOP2α incrementan de acuerdo al grado de la lesión premaligna en muestras histológicas**

	<b>DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO</b>			<i>*p</i>
	LEIBG (NIC I) n=16	LEIAG (NIC II-III) n=17	CCE n=20	
<b>Prx III</b>				
1/3 del epitelio	10 (62.5)	1 (5.88)	0 (0)	
2/3 del epitelio	5 (31.25)	6 (35.29)	0 (0)	
Todo el espesor del epitelio	1 (6.25)	10 (58.82)	0 (0)	<0.001
Nidos tumorales en el estroma	0 (0)	(0)	20 (100)	
<b>MCM2/TOP2α</b>				
1/3 del epitelio	4 (25)	0 (0)	0 (0)	
2/3 del epitelio	10 (62.5)	14 (82.35)	0 (0)	
Todo el espesor del epitelio	2 (12.5)	3 (17.65)	0 (0)	<0.001
Nidos tumorales en el estroma	(0)	(0)	20 (100)	

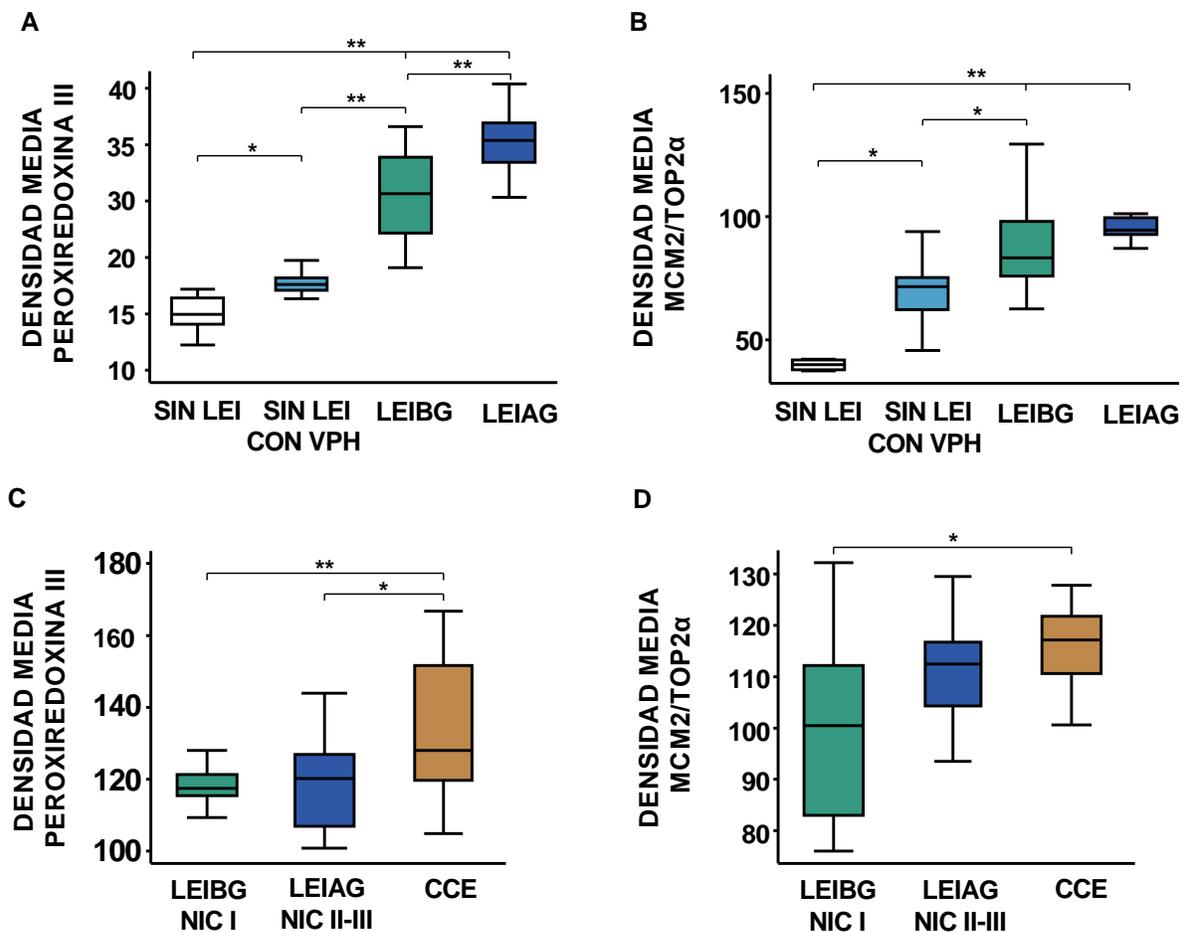
LEI: lesión escamosa intraepitelial. LEIBG: LEI de bajo grado. LEIAG: LEI de Alto Grado. CCE: carcinoma de células escamosas. NIC: neoplasia intraepitelial cervical. VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo. Datos mostrados en n (%). Diagnóstico mediante los criterios de Sánchez-Rosales *et al.*, 2004; Conesa-Zamora *et al.*, 2009, *\*p*<0.05 (chi2).



**Figura 3. Expresión de Prx III y MCM2/TOP2α incrementan de acuerdo a la NIC y CCI.** Expresión de Prx III y MCM2/TOP2A en 2/3 del epitelio en una LEIBG (NIC I). Expresión de Prx III y MCM2/TOP2α en todo el epitelio en una LEIAG (NIC III) y células pleomórficas en el estroma en CCI. Método: Estreptavidina biotina peroxidasa, 50μm.

*Cuantificación de la expresión de Prx III y MCM2/TOP2α en los grupos de estudio*

Se cuantificó la expresión de Prx III y MCM2/TOP2α a nivel cito-histológico y se observó que la expresión de ambas proteínas respecto al grupo sin LEI y entre los grupos es estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ) a nivel citológico (Figura 4A-B), sin embargo, en los casos de histología, la densidad media de la expresión de Prx III sólo es estadísticamente significativo entre los casos de LEIBG y CCE, LEIAG y CCE (Figura 4C). Respecto a MCM2/TOP2α, la densidad media de la expresión sólo es estadísticamente significativo entre los casos de LEIBG y CCE (Figura 4D).



**Figura 4. Prx III y MCM2/TOP2α incrementan de acuerdo al grado de la lesión en presencia del VPH-AR.** Expresión a nivel citológico: **A)** Densidad media de la expresión de Prx III, incremento de la expresión de acuerdo al grado de la lesión ( $*p=0.006$   $**p<0.001$ ). **B)** Densidad media de la expresión de MCM2/TOP2α, incremento de la expresión de acuerdo al grado de la lesión ( $*p=0.02$   $**p<0.001$ ). Expresión a nivel histológico: **C)** Densidad media de la expresión de Prx III, incremento de la expresión de acuerdo al grado de la lesión ( $*p=0.006$   $**p<0.003$ ). **D)** Densidad media de la expresión de MCM2/TOP2α, incremento de la expresión de acuerdo al grado de la lesión ( $*p=0.001$ ). Los bordes inferior y superior de las cajas son los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los valores de la media se muestran mediante la línea dentro de la caja. La anchura de la caja es proporcional al número de la muestra. Media  $\pm$ DE obtenida mediante Image Pro Plus 6 (IPP6.0®).  $p < 0.05$  (ANOVA-Bonferroni).

*Modelo de regresión lineal de la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$* 

El modelo de regresión lineal muestra que las mujeres sin LEI/con VPH, LEIBG y LEIAG incrementan significativamente en promedio 2.9, 10 y 15.1 unidades la densidad promedio de la expresión de Prx III en comparación con las pacientes que no tuvieron LEI ni infección por VPH (citología). A nivel de histología, el modelo muestra que las pacientes con CCE incrementan significativamente en promedio 19 unidades la densidad promedio de la expresión de Prx III a diferencia de aquellas con una LEIBG (Tabla 7). Mientras que las mujeres sin LEI/con VPH, LEIBG y LEIAG incrementan significativamente en promedio 32, 50.5 y 61.3 unidades la densidad promedio de la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$  en comparación con las pacientes que no tuvieron LEI ni infección por VPH (citología). A nivel de histología, el modelo muestra que las pacientes con una LEIAG y CCE incrementan significativamente en promedio 10 y 13.7 unidades respectivamente la densidad promedio de la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$  a diferencia de aquellas con una LEIBG (Tabla 7).

**Tabla 7. Cambio promedio de la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  de acuerdo al grado de la LEI**

Marcador	<b>DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO</b>					
	sin LEI/con VPH $\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	LEIBG $\beta$ (IC 95%)	<i>P</i>	LEIAG $\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<i>Prx III</i>	2.9 (1.2, 4.6)	0.001	10 (8.4, 11.7)	<0.001	15.1 (13.4, 16.9)	<0.001
<i>MCM2/TOP2<math>\alpha</math></i>	32 (11.2, 52.7)	0.003	50.5 (30.9, 70)	<0.001	61.3 (41.6, 81.1)	<0.001
	<b>DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO</b>					
	LEIAG (NIC II-III) $\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	CCE $\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>		
<i>Prx III</i>	1.4 (-8.4, 11.3)	0.77	19 (8.6, 29.5)	0.001		
<i>MCM2/TOP2<math>\alpha</math></i>	10 (.8, 19.1)	0.033	13.7 (4.2, 23.1)	0.006		

LEI: lesión escamosa intraepitelial. LEIBG: LEI de bajo grado. LEIAG: LEI de Alto Grado. CCE: carcinoma de células escamosas. NIC: neoplasia intraepitelial cervical. VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo.  $\beta$ : Coeficiente de regresión por modelo de regresión lineal ajustado por edad.

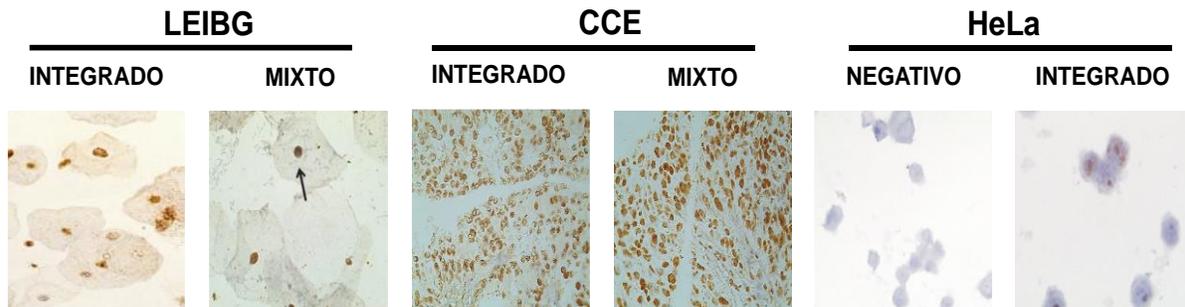
### Estado físico del VPH-AR en los grupos de estudio

Todas las muestras estudiadas presentaron el estado integrado solo o en combinación con el estado episomal (estado mixto). Cabe destacar que el estado integrado se presentó en el 40% de las muestras citológicas sin LEI/con VPH y aumentó a 65% en las LEIBG, 45% en los casos de LEIAG y en el 15% de los casos de CCE ( $p < 0.001$ ) (Tabla 4 y Figura 1).

**Tabla 4. Estado físico del VPH-AR**

Estado físico	Sin LEI- sin VPH n=20 (%)	Sin LEI con VPH n=20 (%)	LEIBG n=20 (%)	LEIAG n=20 (%)	CCE n=20 (%)	TOTAL n=100 (%)	<i>p</i>
<b>Negativo</b>	20 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (20)	
<b>Integrado</b>	0 (0)	8 (40)	13 (65)	9 (45)	3 (15)	33 (33)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Mixto</b>	0 (0)	12 (60)	7 (35)	11 (55)	17 (85)	47 (47)	

LEI: Lesión Escamosa Intraepitelial. LEIBG: Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado. LEIAG: Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado. CCE: Carcinoma de células escamosas. VPH: Virus del Papiloma Humano. Datos mostrados en n (%). \* $p < 0.05$  (chi2).

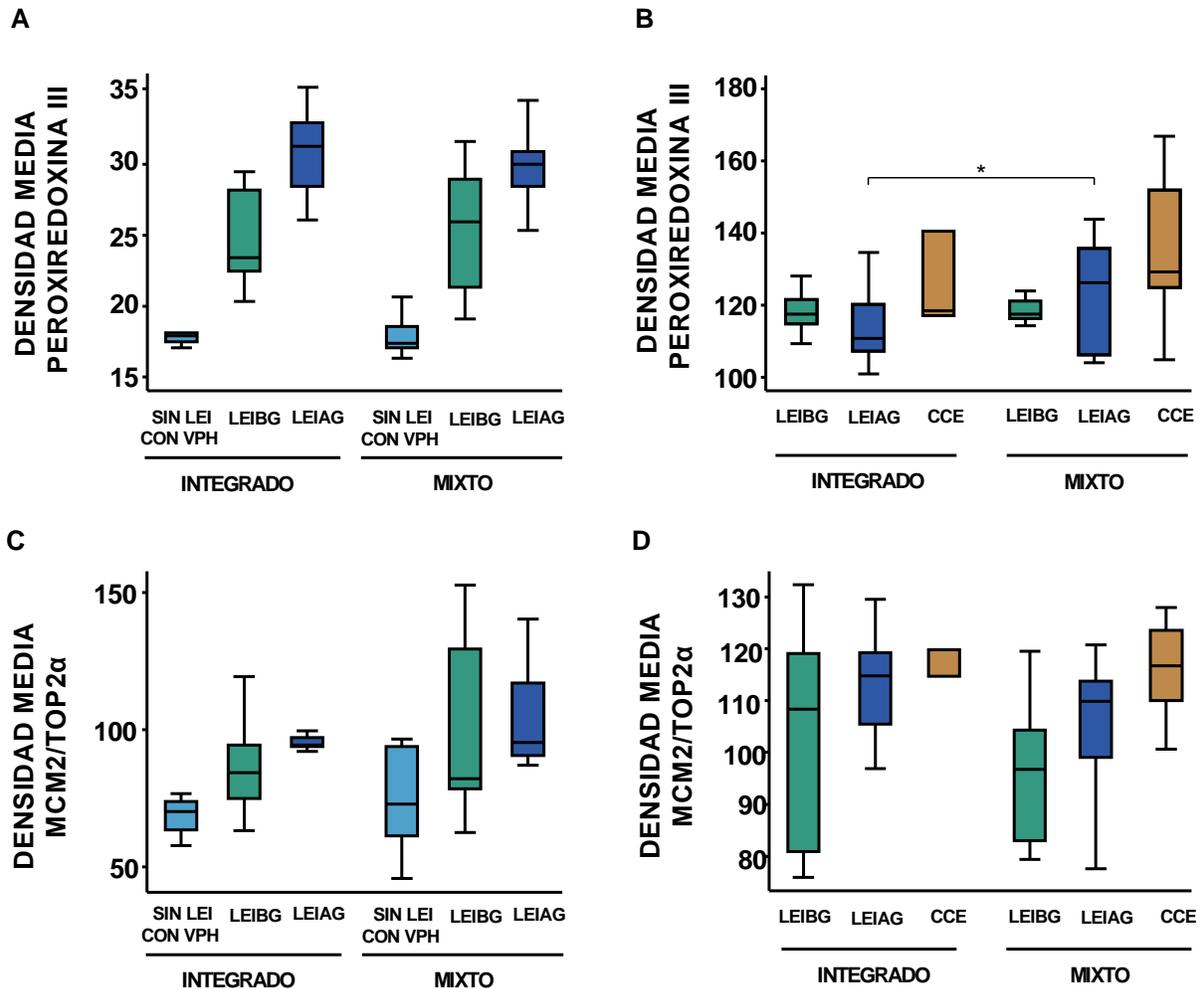


**Figura 1. Estado físico del VPH-AR.** Imágenes representativas de la forma integrada y mixta en una LEIBG y CCE. Señal difusa correspondiente al estado episomal, señal puntiforme correspondiente al estado integrado del genoma viral. Ambas señales corresponden al estado mixto. Línea celular SiHa (VPH16), 1-2 copias integradas. Técnica de hibridación *in situ* con amplificación con tiramida, 50μm.

### Asociación de la expresión de Prx III y MCM2/TOP2α con el estado físico del VPH-AR en la carcinogénesis cervical

En la Figura 5 se observa la expresión de las proteínas a nivel cito-histológico, respecto al estado físico del VPH-AR, sólo en el grupo de LEIAG (NIC II-III) hubo diferencias significativas entre el estado integrado y mixto, se observa un aumento de expresión de Prx III tanto el estado integrado como el mixto, dicho comportamiento se observa tanto en las citologías como en las histologías.

A pesar de que no hubo diferencias significativas en los demás grupos, se puede observar que hay mayor expresión de Prx III con el estado mixto, y MCM2/TOP2α incrementa respecto al estado integrado. Además, la expresión de ambas proteínas incrementa ya sea el estado integrado o mixto, respecto al grado de la LEI y de la NIC.



**Figura 5. Expresión de Prx III, MCM2/TOP2α con el estado físico del VPH-AR. A y B)** Expresión de Prx III en muestras citológicas e histológicas). **C y D)** Expresión de MCM2/TOP2α en muestras citológicas e histológicas (\* $p=0.007$ ). No hubo ningún caso con sólo estado episomal. Los bordes inferior y superior de las cajas son los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los valores de la media se muestran mediante la línea dentro de la caja. La anchura de la caja es proporcional al número de la muestra. Media  $\pm$ DE obtenida mediante Image Pro Plus 6 (IPP6.0®).  $p<0.05$  (t-test).

## VI. DISCUSIÓN

El diagnóstico e interpretación de las LEI es importante para proporcionar un tratamiento oportuno, sin embargo, en la actualidad ésta interpretación es variable entre observadores, además, el diagnóstico definitivo es guiado por una biopsia; método invasivo para las pacientes, por ello se han buscado métodos menos invasivos, tal como lo es el uso de marcadores que determinen un proceso celular específico y que se puedan evaluar mediante la CBL, procesos que sean alterados cuando se desarrolla una LEI, tal es el caso de las proteínas Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  que se evaluaron en este estudio mediante la citología líquida y en cortes histológicos de la misma paciente.

La importancia de este estudio fue evaluar la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  en lesiones premalignas y malignas del cérvix uterino y su relación con el estado físico del VPH-AR, en muestras cito-histológicas de cada una de las pacientes y determinar si la expresión de estos biomarcadores se puede relacionar con el estado físico, particularmente con la integración y de esta manera contribuir con resultados complementarios en el diagnóstico oportuno del CCE y aportar información acerca de grupos de riesgo que puedan progresar a una lesión mayor a través de métodos menos invasivos como la citología en base líquida.

La infección y persistencia del VPH-AR depende de diversos factores; de los cuales se han descrito edad, el inicio temprano de las relaciones sexuales, el número de parejas sexuales, el comportamiento sexual de la pareja (Almonte, *et al.*, 2008), la inmunodeficiencia, el uso prolongado de anticonceptivos orales y la exposición a productos químicos del alcohol y tabaco (Wei, *et al.*, 2014; Mitra, *et al.*, 2016). En este estudio se encontró asociación con la edad ( $p < 0.001$ ), I.V.S.A ( $p = 0.003$ ), número de partos ( $p < 0.001$ ) y la respuesta inflamatoria que presenta cada paciente ( $p < 0.001$ ) de acuerdo al grado de la LEI.

Respecto a la edad, se reportó que las infecciones por VPH-AR son más altas en mujeres entre 15 y 25 años (Moscicki, *et al.*, 2008), la disminución en la tasa de

infección por el VPH con el aumento de la edad probablemente se deba a alguna combinación de la disminución de la exposición al VPH, la naturaleza autolimitada de la mayoría de las infecciones y la resistencia a la reinfección (Ribeiro, *et al.*, 2015), el mayor riesgo de infección por VPH entre las mujeres más jóvenes se ha relacionado con la falta de respuesta inmune adaptativa y/o el área relativamente más grande del epitelio cervical sometidos a metaplasia escamosa (Dempsey, *et al.*, 2010). Estructuralmente, el cuello uterino adolescente es diferente al de las mujeres adultas ya que tiene mayores áreas de inmadurez, descritas como un predominio del epitelio cilíndrico y metaplásico. Un ejemplo de la fragilidad de esta área es la presencia común de sangre cuando se obtienen frotis cervicales en adolescentes que tienen grandes áreas de ectropión (Moscicki, *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2009).

Respecto a la respuesta inflamatoria, existe evidencia de que la inflamación juega un papel importante en la carcinogénesis cervical, inducida por el desequilibrio microbiano de la microbiota normal (disbiosis) (Mitra, *et al.*, 2016). Los estudios clínicos han demostrado que los niveles de citocinas proinflamatorias vaginales son más elevados en las mujeres con disbiosis (Hedges, *et al.*, 2006), lo que puede provocar una inflamación crónica; un factor conocido en la carcinogénesis de numerosos tejidos, incluido el CCE. La disbiosis provoca la alteración de las proteínas clave del citoesqueleto del epitelio vaginal, con un aumento de muerte celular, lo que implica daño y descamación de las células epiteliales. Este cambio podría crear un ambiente que facilite la entrada del VPH en las células epiteliales basales de la zona de transformación cervical, sitio donde se promueve el ciclo de vida viral, la persistencia de la infección y en última instancia el desarrollo de una NIC (Doorbar, 2005). Por ello, en este estudio se evaluó la presencia de vaginosis bacteriana y la respuesta inflamatoria.

En este estudio se encontró que a medida que avanza la LEI, la presencia de células clave indicadoras de *Gardnerella vaginalis* aumentó, de la misma manera la cervicitis aguda a crónica en LEIBG y LEIAG, respectivamente. Diversos estudios han relacionado el avance de la LEI con la presencia de diversas

bacterias vaginales y una disminución de *Lactobacillus spp* (Mitra, *et al.*, 2016), lo cual favorece la inmunosupresión local al incrementar los niveles del ARNm de IL-4 y TGF-1 $\beta$ , de esta manera sugieren que el VPH pudiera evadir la respuesta inmune y favorecer el desarrollo de la LEI (Audirac-Chalifour, *et al.*, 2016). Existe la hipótesis de que la microbiota vaginal patógena pueden inducir EO y eventualmente daño oxidativo al ADN, esto correlaciona con la presencia de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG); un biomarcador de daño oxidativo al ADN. Romano, *et al.*, (2000) reportó que la presencia del daño oxidativo al ADN es mayor en LEIBG en comparación con pacientes sin LEI, datos similares no publicados del grupo de investigación encontraron el aumento del 8-OHdG de acuerdo al grado de la LEI. Estos datos sugieren la presencia de EO en las lesiones premalignas, y anteriormente, se reportó que durante la inducción y progresión del cáncer cervicouterino, las ROS juegan un papel fundamental; en presencia de altos niveles de ROS pueden generar daño oxidativo en macromoléculas y promover mutaciones al ADN, dañar la función y actividad de proteínas que eventualmente conlleven al desarrollo de un tumor. Por otro lado algunos autores sugieren que la inestabilidad genómica inducida por EO puede condicionar un ambiente favorable para la integración viral (Chen *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2014).

La integración viral se ha asociado con infecciones persistentes, y posiblemente, las coinfecciones por distintos VPH puedan influir en la persistencia. Respecto a la genotipificación viral, las pacientes que no presentaron una LEI a nivel citológico, se les realizó el estudio molecular para determinar el genotipo viral. El VPH-16 fue más frecuente en la población de estudio, principalmente, en el grupo de CCE. Estos resultados concuerdan con los reportados por Illades-Aguilar *et al.*, (2007) y sugieren la importancia de detectar del genotipo viral en las mujeres, ya que el VPH-16, ha sido asociado con el desarrollo del CCE con mayor frecuencia, por ello, éstas pacientes requieren tratamiento y seguimiento oportuno (Moberg, *et al.*, 2005; Pett, *et al.*, 2007). Interesantemente, se encontró que el 38.46% de las pacientes tienen infección múltiple por virus de BR y AR. Se ha reportado en estudios epidemiológicos que las pacientes infectadas por un tipo viral de AR,

tienen mayor riesgo de adquisición de nuevos tipos de VPH, en comparación con aquellas que son VPH negativas, por ejemplo; el riesgo de adquirir VPH-58 es hasta siete veces mayor en mujeres con una infección por VPH-16 o VPH-18 en comparación con las mujeres que no están infectadas con estos tipos (Mendez, *et al.*, 2005). Además, las coinfecciones por VPH-AR y BR generan mayor cantidad de ROS, en consecuencia EO.

El EO es particularmente importante en el contexto de la persistencia e integración del ADN del VPH, ya que las ROS y las especies reactivas del nitrógeno (RNS) tienen el potencial de crear las RDC (Syed, *et al.*, 2007; Wei, *et al.*, 2009; Ziech, *et al.*, 2011) que pueden a su vez permitir la integración viral, entonces, las pacientes con niveles altos de EO podrían iniciar o progresar a una LEI. Chen y cols., en 2016 reportaron que la isoforma de E6 del VPH-16, la E6 estrella (E6\*) es capaz de incrementar los niveles de ROS al inhibir la gamma GCS, enzima que cataliza el primer paso de la síntesis del glutatión, causando EO, que promueve daño al ADN y en consecuencia, la integración. La integración del VPH-AR implica la disrupción del gen E1/E2 y esto representa el fin del ciclo de vida del VPH (Kessiss, *et al.*, 1996). Sin embargo, para que el VPH se integre, es necesario un conjunto de enzimas y proteínas, se propone que lo provee la replicación viral extracromosomal (McKinney, *et al.*, 2015).

A través del método de hibridación *in situ* con amplificación con tiramida, se logró detectar que el 100% de las muestras sin LEI/con VPH tienen tanto el estado integrado sólo o combinado con el estado episomal (mixto), de los cuales, el 40% de las muestras sin LEI/con VPH tienen sólo el estado integrado, estos resultados confirman lo propuesto por Kumala, *et al.* (2006), que la integración del genoma viral es un evento temprano en la carcinogénesis cervical. Es posible que la presencia de EO (debido a factores intrínsecos o extrínsecos de la paciente) presente en las LEI puedan favorecer la persistencia e integración viral en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical. A diferencia de las muestras de CCE donde el 85% fue mixto. Estos resultados podrían sugerir que el estado mixto en una LEIBG es necesario para que el VPH-AR siga replicándose y de esta manera

infectar nuevas células del estrato del epitelio, se sabe que E1 y E2 no se expresan durante el estado integrado, por ello, el estado episomal representa la replicación viral para proveer la integración. Se sugiere que la integración del genoma del VPH en el genoma huésped pueda ser un evento mucho más frecuente que la iniciación de la transformación, y además, en la mayoría de los casos este proceso es aleatorio (Chen, *et al.*, 2016).

Se ha reportado que las oncoproteínas E2, E6, E6\* Y E7 del VPH-AR son capaces de promover daño al ADN e inestabilidad genómica (Duensing, *et al.*, 2002; Bermudez, *et al.*, 2009). Además, la interacción de las oncoproteínas virales con las citoquinas inflamatorias pueden promover una infección persistente por evasión inmune continua que promueve la progresión de la lesión y finalmente conduce a la malignidad (Senapati, *et al.*, 2016). La respuesta al interferón posiblemente facilite la selección de integrantes y la sobreexpresión de E6/E7 a través de la disminución del ADN episomal. Una vez que se expresan los genes tempranos E6/E7, TLR9 es regulado negativamente y la respuesta a IFN deteriorada resulta en un medio propicio para la evasión inmune y la infección persistente. La alteración de la ruta del interferón conduce a una regulación a la baja de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH I) en la superficie celular. Como resultado, las células T CD8 citotóxicas no pueden activarse y no pueden iniciar la respuesta de las células T. La sobreexpresión de E6 y E7 en la célula confiere resistencia a la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  y el efecto antiproliferativo. NF- $\kappa$ B, un modulador clave de la inflamación crónica, se activa por el dominio de unión a PDZ de E6 del VPH (Senapati, *et al.*, 2016). Este proceso de evasión inmune continua puede conducir finalmente a la persistencia de la infección y la carcinogénesis.

La importancia del diagnóstico y seguimiento de las lesiones tempranas es crucial, por ello, se analizaron biomarcadores implicados en condiciones específicas; tal es el caso de la Peroxiredoxina-III, enzima antioxidante que cataliza la reducción del peróxido en presencia de tioredoxina para mantener la homeostasis mitocondrial, es considerado un antioxidante principal en la mitocondria que regula

los niveles fisiológicos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cox, *et al.*, 2010; Whitaker, *et al.*, 2013), sin embargo, a nivel de citologías, este es el primer estudio donde se evalúa la Prx III a este nivel. La expresión de Prx III se ha encontrado sobreexpresada en NIC I-III y en cáncer cervical (Kim, *et al.*, 2009), Jing y cols reportaron que la Prx III se encuentra sobreexpresada en cáncer cervical y que el patrón de expresión fue consistente con el biomarcador de proliferación Ki67, sugiriendo una participación activa en la proliferación inducida por EO en cáncer cervical. Algunos autores sugieren a la Prx III como un potencial biomarcador de progresión (Basu *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la expresión de Prx III incrementó de acuerdo al grado de la lesión cito-histológica, la regresión lineal concuerda con estos resultados, al observar que la expresión de Prx III incrementa de acuerdo al grado de la LEI. Es importante resaltar que la expresión de Prx III se observó en pacientes sin LEI, sin y con VPH, posiblemente, la expresión de Prx III se relaciona con la presencia de vaginosis bacteriana, ya que se observó que a medida que avanza la LEI, la presencia de vaginosis bacteriana se presentó en algunas pacientes, así como el incremento de inflamación aguda a crónica y una disminución de la presencia de bacilos de *Döderlein*. Actualmente no es claro si el desequilibrio de la microbiota vaginal actúa sinérgicamente con el VPH para desregular las proteínas blanco como p53 o pRb, o si es de forma independiente, sin embargo, hay evidencia que apunta hacia la probabilidad de que determinadas especies bacterianas tienen un papel patológico en la adquisición y persistencia del VPH, tal es el caso de *Gardnerella vaginalis*, que se presenta a menudo en mujeres adolescentes. Se sabe que el cuello uterino adolescente inmaduro es más susceptible a la infección por VPH en comparación con las mujeres mayores, y esto se correlaciona positivamente con la tasa de metaplasia escamosa. Es plausible que los niveles más altos de *Gardnerella vaginalis* puedan desempeñar un papel durante este período de mayor susceptibilidad y generar mayor EO (Mitra, *et al.*, 2016). Esto posiblemente pasó en algunas de las pacientes que se evaluaron y por ello, además de los factores de riesgo, al adquirir la infección del VPH, este persistió, se integró el VPH y progresó la LEI.

Por otro lado, se ha reportado la integración cerca del gen c-Myc, c-Myc coopera con E6/E7 del VPH-AR para la transformación maligna del epitelio cervical (Riethdorf *et al.*, 2001). Como un gen blanco de c-Myc, Prx III juega un papel importante en la transformación maligna (Wonsey, *et al.*, 2006). Su contribución a la progresión del cáncer y las metástasis se debe principalmente a su capacidad para afectar el crecimiento celular independiente del anclaje, la transición epitelio mesenquimal (TEM), la angiogénesis de novo y la apoptosis a través de la modulación de la ruta fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3-quinasa)/Akt (Nicolussi, *et al.*, 2016).

Debido al crecimiento rápido y al suministro relativamente bajo de oxígeno en las células cancerosas, la producción de ROS en la mitocondria es exagerada hasta el punto que abruma las defensas antioxidantes, como el glutatión (Mayor, *et al.*, 2010), que dan lugar al EO. En respuesta al EO, Prx III es regulada en las células cancerosas para eliminar las ROS e inhibir la apoptosis, que proporciona un microambiente favorable para la proliferación celular maligna (Pei, *et al.*, 2010). Un resultado interesante fue la expresión de la Prx III en el estroma de todos los casos de LEI y CCE, la expresión de Prx III puede estar relacionada con la proliferación de las células estromales, puede desempeñar un papel en la vigilancia constante, eliminando las ROS endógenas y exógenas, formando un microambiente favorable para el desarrollo del tumor o la invasión.

Whitaker *et al.*, (2013) indicó que el gen PRDX-3 puede tener una función antiapoptótica en las células cancerosas y promover su supervivencia, debido a que la regulación positiva ocurre a nivel de proteína, pero no al nivel de ARNm, lo que sugiere que la regulación de PRDX-3 se produce en la traducción o nivel de proteína y esto es consistente con un aumento en la forma oxidada de PRDX-3.

Las células cancerosas secretan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las cuales se pueden enmascarar como células del sistema inmune (neutrófilos y macrófagos), que son los principales productores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que potencia aún más la inflamación y el daño del ADN. El EO en los fibroblastos asociados al cáncer impulsa la evolución del tumor y el

estroma, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> secretado por células cancerosas y la producción de ROS, desde células cancerosas hasta fibroblastos, crea un "campo mutagénico" creciente de la producción de ROS, debido al daño resultante en el ADN. Las células cancerosas secretan inicialmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, transfiriendo la producción de ROS de las células cancerosas a los fibroblastos estromales adyacentes (Martínez, *et al.*, 2011).

Por otro lado, en el sistema inmune, los neutrófilos y macrófagos producen la mayor cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proporcionando otro vínculo entre cómo la inflamación puede proporcionar "suelo fértil", induciendo daño al ADN y cambios metabólicos en el microambiente tumoral a través del EO (Martínez, *et al.*, 2011). Se ha comprobado que la mayor parte de la producción de ROS ocurre en fibroblastos estromales adyacentes, por lo tanto, podría haber un extenso daño al ADN en el estroma tumoral. En apoyo a estas predicciones, Fukino y cols han documentado claramente que el daño al ADN y la inestabilidad genómica ocurren en el estroma tumoral, y que este fenotipo de daño del ADN estromal es predictivo de metástasis (Fukino, *et al.*, 2007). Posiblemente, la Prx III esté modulando los niveles de ROS en el estroma cervical, por ello, en este estudio se encontró en todas las muestras histológicas.

También se evaluó la expresión de proteínas del ciclo celular, relacionadas con la presencia del VPH-AR. La integración del VPH-AR promueve la desregulación de la expresión de proteínas del ciclo celular, tales como de p16<sup>INK4a</sup>, ki-67, ciclina D1 y MCM2/TOP2 $\alpha$ , entre otros, que pueden indicar la progresión de la LEI relacionada con el VPH-AR (Lin, *et al.*, 2014; Brown, *et al.*, 2012). En este estudio se evaluó la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$ , proteínas implicadas en procesos de replicación, necesarias para la transición de la fase G1-S del ciclo celular. MCM2 es una enzima que está involucrada en la formación de horquillas de replicación y en el reclutamiento de otras proteínas relacionadas con la replicación del ADN. Esta proteína forma un complejo con MCM4, 6 y 7, y se ha demostrado que regula la actividad helicasa del complejo, mientras que TOP2 $\alpha$  participa en procesos como la condensación cromosómica, la separación de cromátidas y el alivio del estrés por torsión que se produce durante la transcripción y replicación del ADN,

cataliza la rotura transitoria y la unión de dos cadenas de ADN dúplex que permite que las cadenas pasen unas a través de las otras, alterando así la topología del ADN (Brown, *et al.*, 2012).

Se observó la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$  a partir de muestras sin LEI con VPH e incrementó de acuerdo al grado de la lesión, tanto citológica como histológica, es importante resaltar que la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$  en muestras sin LEI con VPH coincide con lo reportado anteriormente, que a pesar de que no se observan cambios atípicos celulares, el virus está presente, y en algunos casos con la forma integrada, posiblemente esto de inicio con la desregulación de la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$ .

El modelo de regresión lineal mostró incremento del nivel de expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$  conforme avanza el grado de la lesión de manera significativa. Se considera que la sobreexpresión de MCM2/TOP2 $\alpha$  podría marcar sensiblemente las LEI asociadas al VPH-AR (Brown, *et al.*, 2012; Badr, *et al.*, 2008). Además, estudios clínicos demostraron que la expresión de este marcador ha sido consistente en las muestras de LEIAG y negativo en muestras normales (Siddiqui, *et al.*, 2008; Shroyer, *et al.*, 2006). De los casos sin epitelio plano, se evaluó la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$  en el epitelio cilíndrico, esto es importante porque se conoce que el adenocarcinoma invasor se desarrolla en el epitelio cilíndrico y se caracteriza por no presentar lesiones precursoras (Tjalma, *et al.*, 2005), por ello es importante el diagnóstico oportuno en éstas pacientes tanto a nivel citológico como molecular.

En tejidos, el 50% de los tejidos muestran expresión en 2/3 del epitelio en una muestra que se diagnosticó como una NIC I, estos datos resultan interesantes, ya que MCM2/TOP2 $\alpha$  se expresa en más de 1/3 del epitelio, lo cual podría reclasificar a estas pacientes con una NIC II, de acuerdo al estrato donde se observe la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$ , este marcador podría ser de gran ayuda para el diagnóstico de las lesiones tempranas.

Es sumamente importante cuantificar la expresión de las proteínas mediante un software, que permita un diagnóstico más confiable, ya que se ha visto la pobre reproducibilidad mediante el diagnóstico entre observadores. En este estudio se observó un incremento significativo de la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  de acuerdo al grado de la lesión citológica, sin embargo, a nivel histológico, a pesar que se observó incremento de la expresión respecto a la lesión, esto no fue significativo. Posiblemente esto se deba a que el tejido cervical se conforma por células normales, cancerosas en conjunto con el estroma cervical y esto no se compara con el hecho de cuantificar la expresión a nivel de células mediante la citología en base líquida.

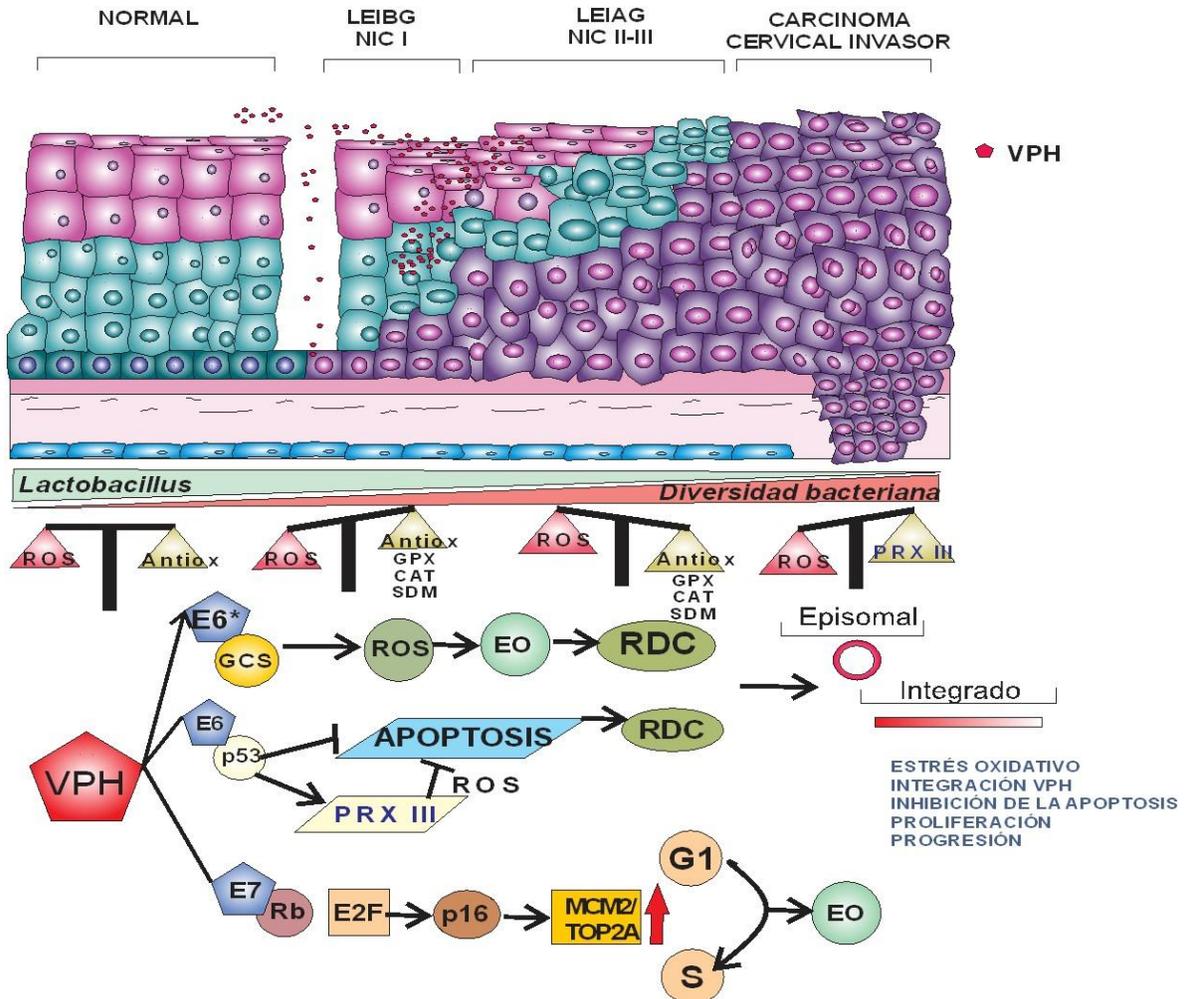
A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre la expresión de las proteínas con el estado integrado del VPH-AR, esto puede argumentarse de que el estado integrado es importante para iniciar la transformación maligna, como lo es el estado episomal, ya que permite concentrar las proteínas y enzimas necesarias para la integración del VPH-AR.

Las proteínas analizadas en este estudio podrían evaluarse en una población mayor, de esta manera, el sesgo estadístico se reduciría al tener una población grande. Independiente de esto, las pacientes que resultaron con una LEI tienen que recibir un estricto control y seguimiento, dependiendo del diagnóstico, será el tratamiento que se asigne.

Se propone evaluar los biomarcadores Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  en pacientes con lesiones premalignas dado que la sobreexpresión de dichos biomarcadores indica situaciones específicas; por un lado, la inducción de Prx III es en respuesta al aumento de las ROS en LEI y cáncer cervical y por otro lado, MCM2/TOP2 $\alpha$  indica la presencia del VPH-AR y la desregulación de sus proteínas blanco que están implicadas en la progresión de la lesión.

Encontrar sobreexpresión de estos biomarcadores indica que las pacientes podrían progresar a una lesión mayor, la información obtenida en este estudio ayudará a impactar en el diagnóstico y tratamiento oportuno. En la Figura 6 se

propone la relación de la expresión de Prx III y MCM2/TOP2α con el estado físico del VPH-AR en la carcinogénesis cervical.



**Figura 6. Relación de la expresión de Prx III y MCM2/TOP2α con el estado físico del VPH-AR en la carcinogénesis cervical.** Las oncoproteínas E6, E6\* y E7 del VPH-AR contribuyen a generar un ambiente de EO en las células cervicales y en el estroma cervical. En el epitelio normal, hay presencia abundante de lactobacilos que mantienen un pH equilibrado, pero cuando el pH se desequilibra, condiciona un ambiente favorable para las infecciones por hongos, bacterias y VPH. A medida que disminuyen los lactobacilos, incrementa la diversidad bacteriana e incrementa la producción de ROS, el sistema antioxidante se abruma y se genera EO, también E6\* del VPH-AR inhibe la GCS y promueve incremento del ROS y por consiguiente EO, el EO promueve la RDC del ADN del huésped y del VPH-AR y por consiguiente la integración del VPH-AR y por otro lado, E7 del VPH-AR promueve la sobreexpresión de MCM2/TP2α, y con ello la transición de la fase G1 a S. Prx III y MCM2/TOP2α junto con el VPH-AR contribuyen a la progresión de la lesión, ya que Prx III mantiene un ambiente de desbalance redox mitocondrial que puede contribuir a la progresión de las células cancerosas.

## VII. CONCLUSIONES

- La expresión de Prx III es una respuesta antioxidante inducida por el aumento de las ROS mitocondrial lo que sugiere EO en LEI y CCE, por lo que la sobreexpresión de Prx III en lesiones tempranas denota un desbalance redox mitocondrial que puede contribuir a la progresión de la lesión, además que podría indicar grupos de riesgo en la población.
- La expresión de Prx III incrementó de acuerdo al grado de lesión citohistológica ( $p < 0.001$ ) y CCE, lo que sugiere a esta proteína como un marcador de progresión inducido por EO.
- Se propone a Prx III como un marcador para monitorear a las pacientes que sobreexpresen esta proteína en lesiones tempranas y promover el tratamiento con antioxidantes para reducir el EO.
- La expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$  incrementó de acuerdo al grado de la lesión en presencia del VPH-AR ( $p < 0.001$ ), tanto citológica como histológica, lo que sugiere la proliferación activa en las células en presencia del VPH-AR, que puede contribuir a la progresión de la lesión.
- La evaluación de la expresión conjunta de estas proteínas puede ser útil como un estudio complementario utilizando la citología en base líquida y la inmunocitoquímica, además se podría descartar en el seguimiento de los casos, una lesión mayor y de manera oportuna.
- El 100% de la población tiene el estado integrado del VPH-AR, de los cuales, el 47% tiene el estado mixto ( $p < 0.001$ ), lo que puede ser un factor para la progresión de la LEI, por lo que se requiere un seguimiento estricto de los casos.

- Se encontró el estado integrado en el 40% de citologías sin LEI/con VPH-AR y el 65% de LEIBG con diferentes tipos de VPH-AR en infección múltiple o con un tipo viral, estos datos muestran que la integración es un evento temprano en la carcinogénesis cervical.
- A pesar de que no hubo diferencias significativas entre la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  con el estado físico del VPH-AR, se observó que la expresión de ambas proteínas incrementó ya sea sólo con el estado integrado o mixto. Esto sugiere una relación de la sobreexpresión de las proteínas con la presencia del VPH-AR en respuesta al EO, por ello, se requiere que cada una de las mujeres lleven un control y seguimiento estricto de los casos para descartar una lesión mayor.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Incrementar la población de muestras tanto cito como histológicas de mujeres a estudiar en una sola toma de muestra para evaluar la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  y determinar su papel como marcadores e implementarlo en la clínica.
- Cuantificar la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  en muestras cito-histológicas y sugerirlo como complemento al diagnóstico de las lesiones.
- Determinar la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  en presencia del estado episomal de los VPH-AR, para conocer el patrón de expresión de dichas proteínas.
- Hacer un estudio de seguimiento de los casos para evaluar la expresión de Prx III y MCM2/TOP2 $\alpha$  en pacientes que presenten la persistencia viral del VPH-AR.
- Se sugiere realizar un control y seguimiento clínico estricto de aquellas mujeres cuyas lesiones sobreexpresaron las proteínas en presencia del VPH-AR y la integración viral y que presentaron la expresión de MCM2/TOP2 $\alpha$  en la región endocervical.

## IX. REFERENCIAS

- Adams** AK, Wise-draper TM. and Wells SI. (2014). Human papillomavirus induced transformation in cervical and head and neck cancers. *Cancers (Basel)*; 6: 1793-820.
- Almonte** M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G (2008). Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*; 11:16–36.
- Audirac-Chalifour** A, Torres-Poveda K, Bahena-Roman M, Tellez-Sosa J, Martinez Barnetche J, Cortina-Ceballos B, Lopez-Estrada G, Delgado-Romero K, Burguete-Garcia AI, Cantu D, et al. Cervical microbiome and cytokine profile at various stages of cervical cancer: a pilot study. *PLoS One*. 2016; 11(4):e0153274.
- Badr** RE, Walts AE, Chung F and Bose S. (2008). BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. *Am J Surg Pathol*; 32: 899-906.
- Basu** A, Banerjee H, Rojas H, Martinez SR, Roy S, Jia Z, Lilly MB, De Leon M, Casiano CA (2011) Differential expression of peroxiredoxins in prostate cancer: consistent upregulation of PRDX3 and PRDX4. *The Prostate* 71(7): 755–765.
- Beevi** SS, Rasheed MH and Geetha A (2007). Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*; 375: 119-123.
- Bermudez-Morales** VH, Peralta-Zaragoza O, Guzman-Olea E, Garcia-Carranca A, Bahena-Roman M, Alcocer-Gonzalez JM and Madrid-Marina V (2009). HPV 16 E2 protein induces apoptosis in human and murine HPV 16 transformed epithelial cells and has antitumoral effects in vivo. *Tumour Biol*; 30: 61-72.
- Brown** CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F and Malinowski DP. (2012). Role of Protein Biomarkers in the Detection of High-Grade Disease in Cervical Cancer Screening Programs. *Journal of Oncology*; 289-315.
- Castle** PE and Giuliano AR. (2003) Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients-assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*; 29-34.
- Castle** PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, *et al.* (2001). An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 10:1021-1027.
- Chen** WY, Filippova M, Vonetta MW, Filippov V, and Duerksen-Hughes PJ (2016). Chronic oxidative stress increases the integration frequency of foreign DNA and human

papillomavirus 16 in human keratinocytes. *American Journal of Cancer Research*; 6:764-780.

**Chen Y**, Williams V, Filippova M, Filippov V and Duerksen-Hughes P. (2014). Viral Carcinogenesis: Factors Inducing DNA Damage and Virus Integration. *Cancers (Basel)*; 6: 2155-2186.

**Cox AG**, Winterbourn CC and Hampton MB. (2010). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J*; 425: 313-325.

**Dempsey AF**, Mendez D (2010). Examining future adolescent human papillomavirus vaccine uptake, with and without a school mandate. *J Adolesc Health*; 47:242-8.

**Ding B**, Sung GC, Se HK, Suki KJ, Ho C, Dong SK and Nam HC (2007). Role of p53 in antioxidant defense of HPV-positive cervical carcinoma cells following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. *Journal of Cell Science*; 120: 2284-2294.

**Duensing S** and Munger K. (2002). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res*; 62: 7075-7082.

**Doorbar J** (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*; 32 Suppl 1:S7–S15.

**Ferlay J**, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet] International Agency for Research on Cancer, Lyon, France; 2010. Available at: <http://globocan.iarc.fr> [Acceso en noviembre de 2017].

**Fukino K**, Shen L, Patocs A, Mutter GL, Eng C (2007). Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma. *JAMA* 2007; 297:2103-11.

**Gulam W** and Haseeb A. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*; 5: 1-8.

**Hedges SR**, Barrientes F, Desmond RA, Schwebke JR (2006). Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora. *J Infect Dis*; 193(4): 556–62.

**Hwang LY**, Ma Y, Benningfield SM, Clayton L, Hanson EN, Jay J, et al. (2009) Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cervix in healthy young women. *J Adolesc Health*; 44:103.

**Illades AB.**, Ter NP and Reyes ME (2007). Prevalence of human papillomavirus types among Mexican women with intraepithelial lesions and cervical cancer: Detection with MY09/MY011 and GP5+/GP6+ primer systems. *American Journal of Infectious Diseases*; 3; 62.

- Jing** XH, Qun G and Lianqin L (2013). Peroxiredoxin 3 is a novel marker for cell proliferation in cervical cancer, *Biomedical reports* 1: 228-230.
- Kessis** TD, Connolly DC, Hedrick L and Cho KR (1996). Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene*; 13: 427-431.
- Kim** K, Yu M, Han S, Oh I, Choi YJ, Kim S, Yoon K, Jung M and Choe W (2009). Expression of human peroxiredoxin isoforms in response to cervical carcinogenesis. *Oncology Reports*; 21: 1391-1396.
- Kulmala** SA, Syrjänen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, and Johansson BC (2006). Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low-grade cervical cytology and histology. *Journal of clinical pathology*, 59(5), 513-517.
- Lin** JA, AE, Qin J, Andreas MK and AM (2014). Prognostic Significance of Overexpressed p16INK4a in Patients with Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 9:1-7.
- Martínez** UO, Zhao Lin, Casey T, Neal F, Chenguang W, Stephanos P, Richard GP, Anthony H, Federica S and Lisanti MP (2011). Cancer cells metabolically “fertilize” the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect. *Cell Cycle*; 10(15): 2504-2520.
- Mayor** RO (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Inst. Med. Trop*; 5(2): 23-29.
- McKinney** CC, Hussmann KL and McBride AA (2015). The Role of the DNA Damage Response throughout the Papillomavirus Life Cycle. *Viruses*; 7: 2450-2469.
- Mendez** F, Muñoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, Ronderos M *et al.*, (2005). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J. Infect. Dis*; 192 (7): 1158-1165.
- Mitra** A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, Bhatia R, Lyons D, Paraskevaidis E, Li JV, et al. (2016). Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep*; 5:16865.
- Moberg** M, Gustavsson I, Wilander E and Gyllensten U (2005). High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer*; 92: 891-894.
- Moscicki** AB, Ma Y, Wibbelsman C, Powers A, Darragh TM, Farhat S, et al. (2008). Risks for cervical intraepithelial neoplasia-3 among adolescents and Young women with abnormal cytology. *Obstet Gynecol*; 112:1335–42.
- Nicolussi** A, D'inzeo S, Capalbo C, Giannini G and Coppa A. (2016). The role of peroxiredoxins in cancer (Review). *Molecular and clinical oncology*; 6: 139-153.

- Pei** JC, Eng HL, Yingnan Y, George WCY, Puay HT and Boon HB (2010). Silencing the Peroxiredoxin III gene inhibits cell proliferation in breast cancer. *International journal of oncology*; 36: 359-364.
- Pett** M and Coleman N. (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol*; 212: 356-367.
- Ribeiro** AA, Costa MC, Alves RRF, *et al.* (2015). HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. *Infectious Agents and Cancer*; 10:16.
- Riethdorf S**, Riethdorf L, Schulz G, *et al* (2001). Relationship between telomerase activation and HPV 16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 20: 177-185.
- Romano** G, Sgambato A, Mancini R, Capelli G, Giovagnoli MR, Flamini G, Boninsegna A, Vecchione A, Cittadini A (2000). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cervical cells: correlation with grade of dysplasia and human papillomavirus infection. *Carcinogenesis*; 21(6):1143-7.
- Pinto** AP, Degen VLL and Cibas ES (2012). Immunomarkers in gynecologic cytology: the search for the ideal 'biomolecular Papanicolaou test'. *Acta Cytol*; 56: 109-21.
- Saunier** M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, Kantelip B, Schwarz E, Mouglin C and Prétet JL. (2008). Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load and Physical State for Identification of HPV16-Infected Women with High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma. *J Clin Microbiol*; 46: 3678-3685.
- Seo** MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG (2000). Identification of a new type of mammalian Prx that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* 275: 20346–20354.
- Senapati** R, Senapati NN, Dwibedi B. (2016) Molecular mechanisms of neoplastic progression mediated by HPV. *Infectious agents and cancer*; 11: 59.
- Shroyer** KR, Homer P, Heinz D, and Singh M. (2006). Validation of a novel immunocytochemical assay for topoisomerase II- $\alpha$  and minichromosome maintenance protein 2 expression in cervical cytology *Cancer*; 108: 324–330.
- Siddiqui** MT, Hornaman K, Cohen C, and Nassar AM. (2008). ProEx C immunocytochemistry and high-risk human papillomavirus DNA testing in papanicolaou tests with atypical squamous cell (ASC-US) cytology: correlation study with histologic biopsy, *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*; 132: 1648–1652.
- Syed** SB, Muzib HR, Arumugam G. (2007). Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*; 375: 119–123.

- Tjalma** WA, Van Waes TR, Van den Eeden LE and Bogers JJ (2005). Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*; 19: 469-483.
- Torre** LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A., (2012). *CA Cancer J Clin. Global cancer statistics*; 65 (2):87–108.
- Vega** PA, Illades AB, Flores AE, López BE, Leyva VM, Castañeda SE, y Alarcón RL (2013). Risk of progression of early cervical lesions associated with integration and persistence of HPV-16 and expression of E6, Ki-67, and telomerase. *J Cytol*; 30 (4): 226-232.
- Wonsey** DR, Zeller KI, and Dang CV (2002). The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6649-6654.
- Wei** L, Gravitt PE, Song H, Maldonado AM and Ozbun MA (2009). Nitric oxide induces early viral transcription coincident with increased DNA damage and mutation rates in human papillomavirus-infected cells. *Cancer Res*; 69: 4878-4884.
- Wei** L, Griego AM, Chu M and Ozbun MA (2014). Tobacco exposure results in increased E6 and E7 oncogene expression, DNA damage and mutation rates in cells maintaining episomal human papillomavirus 16 genomes. *Carcinogenesis*; 35 (10): 2373-2381.
- Whitaker** HC, Patel D, Howat AY, Day JD, Sangan T, Marioni JC, Mitchell J, Aldridge S, Luxton HJ, Massie C, Lynch AG and Neal DE. (2013). Peroxiredoxin-3 is overexpressed in prostate cancer and promotes cancer cell survival by protecting cells from oxidative stress. *British Journal of Cancer*; 109: 983–993.
- Williams** VM, Filippova M, Filippov V, Payne KJ and Duerksen HP (2014). Human papillomavirus type 16 e6\* induces oxidative stress and DNA damage. *J Virol*; 88:6751-6761.
- Ziech** D, Franco R, Pappa A and Panayiotidis MI (2011). Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res*; 711: 167-173.