

***DNA ploidias y virus del papiloma humano
de alto riesgo como indicadores pronósticos
de respuesta al tratamiento
en pacientes con carcinoma cervicouterino tipo
epidermoide estadio clínico IB.***

CBS

Tesis presentada a la
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa para obtener el
grado de Maestro en Biología Experimental

1997

Víctor M. Valdespino Gómez,

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa se encuentra dentro del Patrón de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología..

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, número 91816

9/18/06/08/12

10/18/06/08/12

Este trabajo de investigación fue realizado
bajo la tutoría de:

Dra. Rocío Ortiz Muñiz
Dr. Alejandro García Carrancá;

y la asesoría de:
Dr. Vianney Ortiz Navarrete

en los laboratorios de:

Biología Celular del Departamento de Ciencias de la
Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
UAM - Iztapalapa, y
Biología Molecular del Departamento de Biología
Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas
C.U. - UNAM.

3. Citometría de flujo	38
3.1. Citometría de flujo y Carcinoma Cervicouterino	44
4. Papilomavirus humano (HPV)	46
4.1. Biología del HPV	47
4.1.1 Región temprana (E)	50
4.1.2 Región tardía L1, L2	53
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
5.1. Identificación de productos amplificados por la PCR	59
5.2. Análisis de dot blot / slot blot de productos de PCR	59
5.3. Amplificación de productos de la PCR obtenidos de tejidos fijados en parafina	60
5.4. Detección y tipificación de HPV's genitales	61
6. Biología molecular del cáncer cervical y sus precursores	64
6.1. Interacción de los HPV's con diversos cofactores	69
6.2. Persistencia del virus en la propagación de la enfermedad	69
6.3. Carga viral y enfermedad cervical	71
6.4. Otros factores o eventos celulares que afectan la carcinogénesis cervical	71
6.5. Alteraciones cromosómicas	71
6.6. Pérdida de la heterocigocidad	72
6.7. Otras alteraciones celulares	72
6.8. Respuesta inmunológica contra la infección de HPV y el cáncer cervical	73
6.8.1 Respuesta inmune al HPV	75
6.8.2 Medición de anticuerpos en la respuesta a HPV	75
6.8.3 Respuesta inmune al HPV durante la progresión del cáncer cervical	76
6.9. Perspectivas en la Biología molecular del cáncer cervical	77
CAPITULO II.	
7. Planteamiento del problema	78
7.1. Objetivo general	80
7.2. Hipótesis general	80
7.2.1 Hipótesis particulares	80
CAPITULO III.	
8. Material y Métodos	
8.1. Tipo de estudio	81
8.1.1 Logística de selección de muestra	82
8.2. Trabajo experimental	84
8.2.1 Determinación de DNA-ploidias, índice de DNA, e índice de	

proliferación celular por medio de citometría de flujo	84
8.2.1.1 Obtención y tinción de núcleos tumorales	84
8.2.1.2 Calibración del citómetro de flujo	85
8.2.1.3 Calibración con la muestra control y lectura de las muestras de tejido tumoral	86
8.3. Detección de Papilomavirus humano y caracterización de genotipos de alto riesgo en células de carcinoma cervicouterino	87
8.3.1 Obtención de DNA de células de carcinoma conservados en parafina	87
8.3.2 Purificación del DNA por extracción con fenol-cloroformo y su precipitación con etanol	87
8.3.3 Medición de la concentración de DNA extraído	88
8.3.4 PCR con "primers" degenerados MY11/MY09 y GP5/GP6 para la detección de HPVs	89
8.3.5 Identificación de HPV del producto del amplificado de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%	90
8.3.6 PCR con "primers" específicos para la identificación de HPV 16 y 18	91
8.4. Análisis estadístico	91
CAPITULO IV.	
9. Resultados	92
9.1. Resultados comparativos entre casos de pacientes con carcinoma cervicouterino controlados con el tratamiento y en quienes presentaron recurrencia tumoral	95
9.2. Asociación significativa entre variables	95
9.3. Asociación de las variables con las curvas de sobrevida	113
9.4. Análisis multivariable de DI y HPVs con los tiempos de sobrevida	113
CAPITULO V.	
10. Discusión y conclusiones	117
CAPITULO VI.	
11. Bibliografía	124

INDICE DE FIGURAS

Figura	página	
Fig. 1	Esquema simplificado del epitelio estratificado del exocérvix	20
Fig. 2	Esquema y correlación de las lesiones precursoras y cáncer cervical	23
Fig. 3	Fases del ciclo celular y puntos de control	31
Fig. 4	Activación de la cinasa CDK ₄	33
Fig. 5	Participación de las diferentes CDKS en el ciclo celular	35
Fig. 6	DNA-Histograma de una población diploide	42
Fig. 7	Organización genética de los papilomavirus humanos	49
Fig. 8	Diagrama esquemático de la amplificación con PCR (1)	55
Fig. 9	Diagrama esquemático de la amplificación con PCR (2)	57
Fig. 10	Efectos de la unión de E6 con p53	66
Fig. 11	Efectos de la unión de E7 a Rb	68
Fig. 12	Factores de riesgo en la historia natural del cáncer cervical	70
Fig. 13	Registro citométrico de la población adyacente no tumoral	96
Fig. 14	Selección de la zona con población uninuclear	97
Fig. 15	Registro y análisis de una población celular tumoral con SOBR (1)	98
Fig. 16	Registro y análisis de una población celular tumoral con SOBR (2)	99
Fig. 17	Registro y análisis de una población celular tumoral con POLY	100
Fig. 18	Registro y análisis de una población celular tumoral con RFIT	101
Fig. 19	Estandarización de la PCR-MYs con DNA de HeLa	102
Fig. 20	Estandarización de la PCR-LCR ₁₈ con DNA de HeLa	103
Fig. 21	Identificación de HPV en tejido tumoral con PCR-MYs (1)	104
Fig. 22	Identificación de HPV en tejido tumoral con PCR-MYs (2)	105
Fig. 23	Identificación de HPV en tejido tumoral con PCR-GPs	106
Fig. 24	Caracterización de HPV ₁₆ en tejido tumoral con PCR-LCR ₁₆	107
Fig. 25	Caracterización de HPV ₁₈ en tejido tumoral con PCR-LCR ₁₈	108
Fig. 26	Gráfica de asociación entre los casos con DI mayor de 1.05 y la presencia de HPVs 16 y 18	112
Fig. 27	Curva de Kaplan-Meier de recurrencia tumoral estratificada por valores de DI	114
Fig. 28	Curva de Kaplan-Meier de recurrencia tumoral estratificada por tipos de HPVs	115

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Sistema de clasificación de la FIGO del Ca Cu	25
Cuadro 2.	Alteración de los reguladores en el control del ciclo celular	37
Cuadro 3.	Cálculo del DI y tipos de ploidías	41
Cuadro 4.	DNA-ploidías como factor pronóstico en neoplasias humanas	45
Cuadro 5.	Asociación de tipos de HPVs con lesiones benignas y malignas	48
Cuadro 6.	Secuencia de los "primers" concenso MYs	62
Cuadro 7.	Secuencia de las sondas específicas de algunos HPVs	63
Cuadro 8.	DI e índice de proliferación en pacientes con Ca Cu IB	109
Cuadro 9.	Determinación de tipos de HPVs en pacientes con Ca Cu IB	110
Cuadro 10.	Asociación entre DI y HPVs 16 y 18	111
Cuadro 11.	Recurrencia tumoral de 54 pacientes con Ca Cu IB analizados con el modelo de regresión de Cox	116

RESUMEN

El cáncer del cérvix uterino (CaCu) representa un problema de Salud Pública en los países en desarrollo. En México, el CaCu provoca la mayor tasa de morbimortalidad de todo el conjunto de neoplasias malignas.

La histerectomía radical o la radioterapia con 7500 cGys en el tratamiento de las pacientes con carcinoma cervical estadio IB dan como resultado el control de la enfermedad en un 80% de los casos.

El análisis de factores clínicos y anatomopatológicos de las pacientes no han sido determinantes suficientes para estimar el riesgo de recurrencia tumoral post tratamiento.

El objetivo del estudio es buscar la asociación entre algunos indicadores de la cinética de proliferación celular tumoral, como el tipo de DNA ploidía, índice de DNA e índice de proliferación; y de indicadores moleculares de inmortalización y transformación celular mediante identificación de la integración del DNA viral de los HPVs al DNA de las células tumorales; con la respuesta clínica de las pacientes con carcinoma cervical estadio IB de tipo epidermoide al tratamiento.

Los parámetros celulares se determinaron mediante la metodología de citometría de flujo, y la identificación y tipificación de HPV mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

El estudio incluyó 54 pacientes con carcinoma cervicouterino E IB tipo epidermoide comparándose 2 grupos: 31 casos controlados con el tratamiento y 23 que presentaron recurrencia tumoral post tratamiento. Las muestras fueron obtenidas de tejido tumoral conservado en parafina.

La comparación de los valores promedio de DI entre ambos grupos, demostró diferencia con valor de p de 0.015, y no hubo diferencia entre los valores promedio del índice de proliferación.

En relación a la presencia de los distintos tipos de HPV, los tipos 16 y 18 comparativamente con otros tipos, se asocian a recurrencia tumoral post tratamiento con valor de p de 0.04. Mediante modelos de regresión logística se identificó asociación entre los valores de DI mayores de 1.04 y la identificación de HPVs 16 y 18 con un valor de p de 0.036.

Con la curva de Kaplan- Meier y la prueba de Logrank de dos colas para recurrencia tumoral a 120 meses; se determinó p de 0.035 para los casos con valores de DI mayores de 1.04 y de 0.0054 para los pacientes con presencia de HPV 16 y 18 en sus células tumorales.

Con el modelo de Cox se encontró que los pacientes con DI mayor de 1.04, y con presencia de HPV 16 y 18 integrado a DNA genómico de las células tumorales tuvieron un riesgo relativo mayor para presentar recurrencia tumoral post tratamiento de 1.97 veces y de 3.61 veces respectivamente, si ambos factores coinciden en un mismo caso, el riesgo se eleva a 7.15 veces.

Concluimos que en nuestro estudio los valores de DI mayores de 1.04 y la presencia de HPV de tipo 16 y 18 son factores significativos asociados a la presencia de recurrencia tumoral post tratamiento en pacientes con carcinoma cervicouterino E IB de tipo epidermoide.

Agradecimientos

Es una gran lista a quienes quisiera agradecer por su ayuda y apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradecer a la Dra. Rocío Ortiz Muñiz y al Dr. Alejandro García Carrancá su confianza por aceptarme como estudiante en sus correspondientes laboratorios.

Mi amplia gratitud a la Dra. Rocío Ortiz por ser la tutora con máxima dedicación para orientarme en lo competente a la metodología de citometría de flujo, en la corrección iterativa del escrito de la tesis, y en permitirme trabajar en ella en un ambiente de gran cordialidad y apoyo académico.

Mi gran reconocimiento y agradecimiento al Dr. Alejandro García Carrancá por ser mi tutor en lo correspondiente a la metodología de PCR para la identificación de HPV, tanto como su apoyo externo que me permitió desarrollar estancia de formación en el área de Biología molecular y Virología en Sao Paulo, Brasil; cabe destacar que además de su gran calidad académica y reconocimiento científico, el Dr. García Carrancá es un humanista fuera de serie.

Muchas gracias al Dr. Vianney Ortiz por la importante asesoría que me otorgó durante el desarrollo del trabajo.

Mi gratitud para los médicos cirujanos, Héctor Moreno Lara y Sonia Labastida. El M.C. Héctor Moreno Lara, especialista en Anatomía patológica participó en el trabajo de investigación realizando la identificación y caracterización histopatológica de cada uno de los casos revisados, y la M.C. Sonia Labastida realizó el análisis estadístico uni y multivariado.

Mi agradecimiento al gran grupo de compañeros del Hospital de Oncología CMN SXXI IMSS, José Guerrero, y Felipe García, quienes me ayudaron a localizar las laminillas y bloques de parafina de las muestras de tejido tumoral., a Mari Pastor y Patricia Quintanar que realizaron los cortes microscópicos de las muestras; a

Carmelo Pérez, Eduardo López, Rosa Silva y Leticia Murillo que ayudaron en la localización de los expedientes clínicos, y a Elia Palacios que realizó la localización telefónica de las pacientes para completar el seguimiento clínico; asimismo gracias a Agustín Muñoz por su apoyo en la búsqueda documental y a Agustín Bravo quien estuvo a cargo del trabajo fotográfico. Dentro de este grupo quiero remarcar mi agradecimiento al Dr. Pedro Gómez Cruz de la Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas, quien me apoyó importantemente en la construcción del anteproyecto.

Mi agradecimiento al grupo de compañeros del Laboratorio de Biología Molecular, al Maestro Jorge Alejandro, Dra. Marcela Lizano, Dra. Leticia Rocha, y Maestra Ana Laura Pereira por sus importantes orientaciones y ayuda. También a Benito, Nestor, Manuel, Salomón, Karla, Fabio y Daniel por sus orientaciones.

En especial, mi agradecimiento a la Técnico académico Biol. Miriam Guido quien inicialmente me adiestró y me asesoró en las distintas técnicas moleculares utilizadas.

Dentro del Departamento de Biología Molecular aunque fuera del laboratorio, mi agradecimiento a la Dra. Blanca H. Ruiz y a los técnicos académicos, Gabriel y Jesus por su ayuda y apoyo incondicional.

Así mismo mi agradecimiento a mis compañeros del Laboratorio de Biología Celular de la Dra. Rocío Ortiz, por sus importantes orientaciones: al Dr. Miguel Betancourt, Maestro Edmundo Bonilla, Maestro Eduardo Casas, Edith Cortés, y Leticia Cortés.

Muchas gracias a la Dra. M. Concepción Gutierrez y al brillante grupo de profesores de la Maestría en Biología Experimental

Finalmente mi profundo agradecimiento a algunos integrantes de mi familia quienes participaron en la edición, corrección de estilo, impresión de figuras, etc. de la tesis; gracias a Margarita, Bernardo y Patricia Valdespino.

Gracias a la Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco y al Instituto Mexicano del Seguro Social por permitirme la oportunidad de realizar esta grata experiencia, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su gran apoyo.

Dedicatoria

- A mi familia cercana: Margarita, mi esposa; Patricia y Claudia, mis hijas; Edmundo y Bernardo, mis hijos.
- A mis padres Don Manuel y Doña Enriqueta (q.e.p.d.)
- A mi familia; hermanos, cuñados, sobrinos:
Enrique,
Martha y Fernando, Fernandito y Angélica, Héctor y Ricardo y Angeliquita.
José Luis y Angela, Tita y Anita.
Marco Antonio y Rosario, Marquito, Augusto y Chayito.
- A mis compañeros oncólogos
- A mis compañeros universitarios
- Al paciente oncológico

ABREVIATURAS

APC	gen supresor tumoral alterado en pacientes con poliposis adenomatosa familiar
BD	Becton Dickinson
bp	pares de bases
CaCu	Carcinoma cervical
CAK	quinasas que activan a las CDK
CDC25	Fosfatasas que desfosforilan a las CDK
CDI	inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas
CDK	cinasa dependiente de ciclina
CellFit	software del citómetro de flujo BD para análisis del ciclo celular
CEN	núcleos de eritrocitos de pollo
cGy	centiGrays
cip-kip	CDI específicos
CTN	núcleos de timocitos de ternera
CV	coeficiente de variación de la fase G 1
DI	índice de cantidad de DNA
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTP	desoxinucleótidos trifosfatados
DRB y DQB	haplotipos de HLA
E1 a E 7	Proteínas tempranas del HPV
EBV	Virus de Epstein Barr
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
E2F	Factor de transcripción relacionado a la proteína de Rb
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FL1-FL3	canales del citómetro de flujo para detectar emisiones de fluorescencias de 515 nm, 585 nm, y 677 nm respectivamente
FSC	desviación mínima de la luz (forward light scatter)
HCMV	citomegalovirus humano
HLA	Antígeno leucocitario humano
HPV	Virus del papiloma humano
HSV-2	Virus simple del herpes tipo 2
Ink	CDI específicos

Kd	kilodalton
L1, L2	proteínas tardías del HPV
LCR	región larga de control
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ml	militros
μl	microlitros
NIC	neoplasia intraepitelial cervical
nm	nanómetros
ORF	marco de lectura abierto
p53	gen supresor tumoral
PBS	amortiguador salino de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PE	ficoeritrina
PI	yoduro de propidio
Rb	producto del gen retinoblastoma
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sodio
SIL	lesión escamosa intraepitelial
SSC	desviación de la luz hacia los lados, cercano a 90 grados, (side - scattered light)
SV40	virus 40 del simio
TBE	amortiguador tris-borato-EDTA
TE	amortiguador tris-EDTA
TFP	tejido fijado en parafina
TGF-β	factor de crecimiento de transformación beta
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
URR	región reguladora río arriba

CAPITULO I.

1. INTRODUCCION Y ANTECEDENDES

1.1. Carcinoma Cervicouterino como Problema de Salud Pública

El cáncer del cérvix uterino (Ca Cu) representa la segunda neoplasia más común entre las mujeres del mundo, y en los países en desarrollo constituye la primera causa de muerte por cáncer entre ellas (Parkin y col. 1992, Tapia y col. 1996).

La incidencia relativa varía alrededor del mundo desde 10 x 100 000 habitantes hasta más de 40 x 100 000 en algunos países latinoamericanos y sudafricanos (Bosch y col. 1995).

Más de 500 000 nuevos casos de Ca Cu son reportados anualmente y de estos más del 80% son registrados en países en desarrollo (Parkin y col. 1988) . La raza, la condición socioeconómica, cultural, y el comportamiento sexual, son factores de riesgo para el desarrollo de este tumor. Diversas observaciones han confirmado que pacientes con enfermedades venéreas y prostitutas, tienen mayor riesgo , mientras que judíos, mormones y monjas tienen menor riesgo.

Los programas nacionales de diagnóstico oportuno de Cáncer Cervicouterino han demostrado una insuficiente cobertura en la población de mayor riesgo, se ha obtenido casi permanentemente estabilidad en las cifras de incidencia y una mínima tendencia de descenso en la tasa de mortalidad (Camacho y col. 1993).

1.2. Epidemiología del Ca Cu en México

En nuestro país el cáncer cervicouterino es el que persistentemente provoca la mayor tasa de morbimortalidad nacional, con una tasa bruta de mortalidad de 7.5 por 100,000 habitantes y una tasa ajustada por edad -mayores de 45 años- de hasta 73.47, siendo los estados de Yucatán , Nayarit, Colima, Tamaulipas, Oaxaca y Morelos, los más afectados. En la población femenina del Distrito Federal este carcinoma corresponde al 29.5% de morbilidad de todo el conjunto de tumores malignos (Secretaría de Salud 1992)

La transición epidemiológica en México, mediante el descenso de tasas de morbimortalidad de las enfermedades infecciosas con un ascenso de las correspondientes de las enfermedades crónico degenerativas y neoplásicas, ha transformado al carcinoma cervicouterino como un problema de Salud Pública desde hace más de 2 décadas, el cual a pesar del esfuerzo del Sector Salud en cuanto a campañas de detección oportuna persiste, provocando las mayores cifras de morbilidad y la primera tasa de mortalidad en las mujeres mexicanas (Secretaría de Salud 1992)

Siendo un cáncer eminentemente controlable, los programas de prevención y detección oportuna desarrollados por el Sector Salud, solo cubren de manera parcial a la población total, lo que conduce a que la prevalencia se mantenga prácticamente con las mismas tasas en los últimos 10 años.

Recientes análisis de datos contenidos en los registros hospitalarios muestran que el mayor número de casos atendidos corresponden a lesiones avanzadas (Mohar y col. 1993)

1.3. Factores de Riesgo

1.3.1 Papilomavirus Humano

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado la asociación existente entre el Papilomavirus Humano (HPV) Genital y el Ca Cu. Más de 35 distintos tipos de HPV infectan el tracto genital, de ellos más de 20 están asociados al cáncer. Los HPV parecen representar el agente sexual más comúnmente transmitido, estudiado a la fecha.

Se ha determinado que la asociación entre HPV y cáncer cervical es más alta que la asociación que existe entre fumar y el cáncer pulmonar (Villa 1997). Con metodologías sencillas y específicas de Biología Molecular como PCR, el DNA de HPV se ha detectado en 93% de los tumores (Bosch y col. 1995); sin embargo en diferentes estudios transversales de mujeres jóvenes sanas sexualmente activas, se detecta infección de HPV en un 20-40 % (Bosch y col. 1995).

Es claro que el HPV juega un papel etiológico clave en la neoplasia cervical, sin embargo la frecuencia de infecciones por HPV en mujeres asintomáticas y la falta de detección de HPV en algunos tumores cervicales, muestra que la infección por

HPV es factor esencial pero no es suficiente por si mismo para el desarrollo de neoplasias malignas cervicales .

En general el HPV 16 es el tipo mas común encontrado en el cáncer cervical con una incidencia mayor de 50%, seguido del HPV 18 con incidencia del 14% y los HPV 45 (8%) y HPV 31 (5%)

1.3.2. Factores sociodemográficos

Se ha demostrado que el Ca Cu afecta predominantemente a mujeres de un medio social donde predomina bajo nivel educacional (Brinton y col.1987) y bajos ingresos económicos (Hildeshem y col. 1993) . La razón de esta asociación está relacionada con la dificultad para acceder a cuidados médicos adecuados y a los programas disponibles de diagnóstico oportuno (citología cervical), debido al bajo incentivo educacional y social .

1.3.3. Otros factores de riesgo asociados

Es ampliamente aceptado que el riesgo de Ca Cu es fuertemente influido por el comportamiento sexual. El riesgo se ve aumentado por factores como: relaciones sexuales iniciadas antes de los 16 años, primer parto en esa edad y multiparidad (Bosch y col.1992, Mukherjee y col.1994) .

Existen estudios controversiales acerca del posible papel del número de compañeros sexuales (Bosch y col. 1992, Junega y col. 1995) , es posible que, además del número, el riesgo esté relacionado con las medidas higiénicas genitales individuales.

La promiscuidad sexual ha sido considerada como factor de riesgo en diferentes estudios: esposos de pacientes con Ca Cu tuvieron significativamente mayor número de compañeras , que los esposos de las mujeres sin el padecimiento (Agarwal y col. 1993) .

La asociación entre fumar y Ca Cu ha sido encontrada solo en la variedad epidermoide (Brinton y col.1986) el mecanismo por el cual favorece la aparición de este tumor no está bien definido , sin embargo se ha propuesto que el HPV actúa de manera sinergista con los productos del tabaco y de esta forma se permite la

penetración del HPV que causa inmunosupresión local del cérvix (Barton y col. 1986) .

Los datos reportados acerca del efecto de los contraceptivos en el desarrollo de neoplasias cervicales son inconsistentes; sin embargo, parece que el consumo prolongado de ellos incrementa el riesgo (Devet y col. 1994), se ha sugerido que los estrógenos incrementan la transcripción de las proteínas del HPV una vez que la infección ha ocurrido, y se ha observado que el efecto de su uso es más importante en el Ca Cu de tipo de adenocarcinoma (Ursin y col 1994)

La ingesta deficiente de beta carotenos se relaciona con la neoplasia intraepitelial cervical y el CaCu (Herrero y col. 1991)

Mujeres indígenas americanas en quienes la ingesta de Vitamina C, ácido fólico y Vitamina E es baja, se incrementa el riesgo de desarrollar displasia (Buckley y col. 1992), por lo que diferentes evidencias acumuladas sugieren que algunos componentes de frutas y vegetales pueden ser factores protectores contra el desarrollo de CaCu

Evidencias clínicas y epidemiológicas muestran asociación del CaCu con otros agentes transmitidos sexualmente como Chlamydia trachomatis, citomegalovirus humano (HCMV), y virus del herpes simple-2 (HSV-2).

Se ha observado que pacientes inmunodeprimidas se encuentran más propensas a infecciones por HPV. Comparando con mujeres normales, las mujeres HIV positivas tienen mayor riesgo de desarrollar lesiones cervicales premalignas (Levejoy y col. 1994)

Poca atención se le ha dado a la incidencia de CaCu familiar. Diferentes investigaciones han observado la asociación de alelos o haplotipos del antígeno leucocitario humano (HLA) con el cáncer invasor, entre ellos, haplotipos de HLA tipo II como las DRB1-1501, y DQB1-0602 (Apple y col. 1994).

1.4. Características anatómicas e histológicas del cuello uterino

El cuello uterino junto con la vagina y la vulva conforman la porción baja del aparato genital femenino.

El cérvix uterino puede ser dividido en 2 porciones: una externa o exocérvix, cubierto por epitelio plano estratificado no queratinizado, y el endocérvix, es decir el conducto que comunica la porción externa con el cuerpo uterino, provisto de repliegue mucoso revestido por una capa de células cilíndricas secretoras de moco.

El orificio externo del cérvix representa la unión macroscópica visible entre el exocérvix y endocérvix y corresponde a la zona de unión escamocolumnar, es decir la conjunción del epitelio plano estratificado y cilíndrico secretor de moco.

El cérvix uterino se remodela de manera continua, durante la vida prenatal y la infancia el epitelio cilíndrico normalmente presente en el orificio cervical puede extenderse al exocérvix, lo que determinaría que la unión de ambos epitelios se localice en el exocérvix; el epitelio cilíndrico regresa más tarde hacia el interior del conducto endocervical y es reemplazado por epitelio plano escamoso. El área situada entre la unión escamocolumnar original y escamocolumnar ulterior es denominada zona de transformación. El tejido glandular es reemplazado por células pavimentosas metaplásicas en respuesta a diversos estímulos -pH local, hormonas-. En el inicio la capa de células pavimentosas es delgada e inmadura y se caracteriza por núcleos voluminosos y escaso citoplasma, con el transcurso del tiempo estas células proliferan, se estratifican y desplazan a las células glandulares, al mismo tiempo este epitelio pavimentoso metaplásico muestra maduración nuclear progresiva observándose depósito o acumulación de glucógeno en el citoplasma que finalmente les permite ser indiferenciables de las células originales del epitelio plano estratificado local (Robboy y col. 1990).

El epitelio plano estratificado del exocérvix está constituido por 5 capas o estratos: basal, espinoso profundo y superficial, granuloso, y superficial o córneo (Figura 1); y el epitelio cilíndrico mucosecretante solamente por una capa de células cilíndricas. El estrato basal está conformado por una hilera de células pequeñas cúbicas con núcleo grande y obscuro, normalmente con figuras mitóticas; el estrato espinoso profundo es conocido como la capa parabasal y consiste en diferentes capas de células de mayor tamaño y núcleo intermedio; en el estrato espinoso superficial las células tienden a ser aplanadas; y en los dos últimos estratos las células son muy

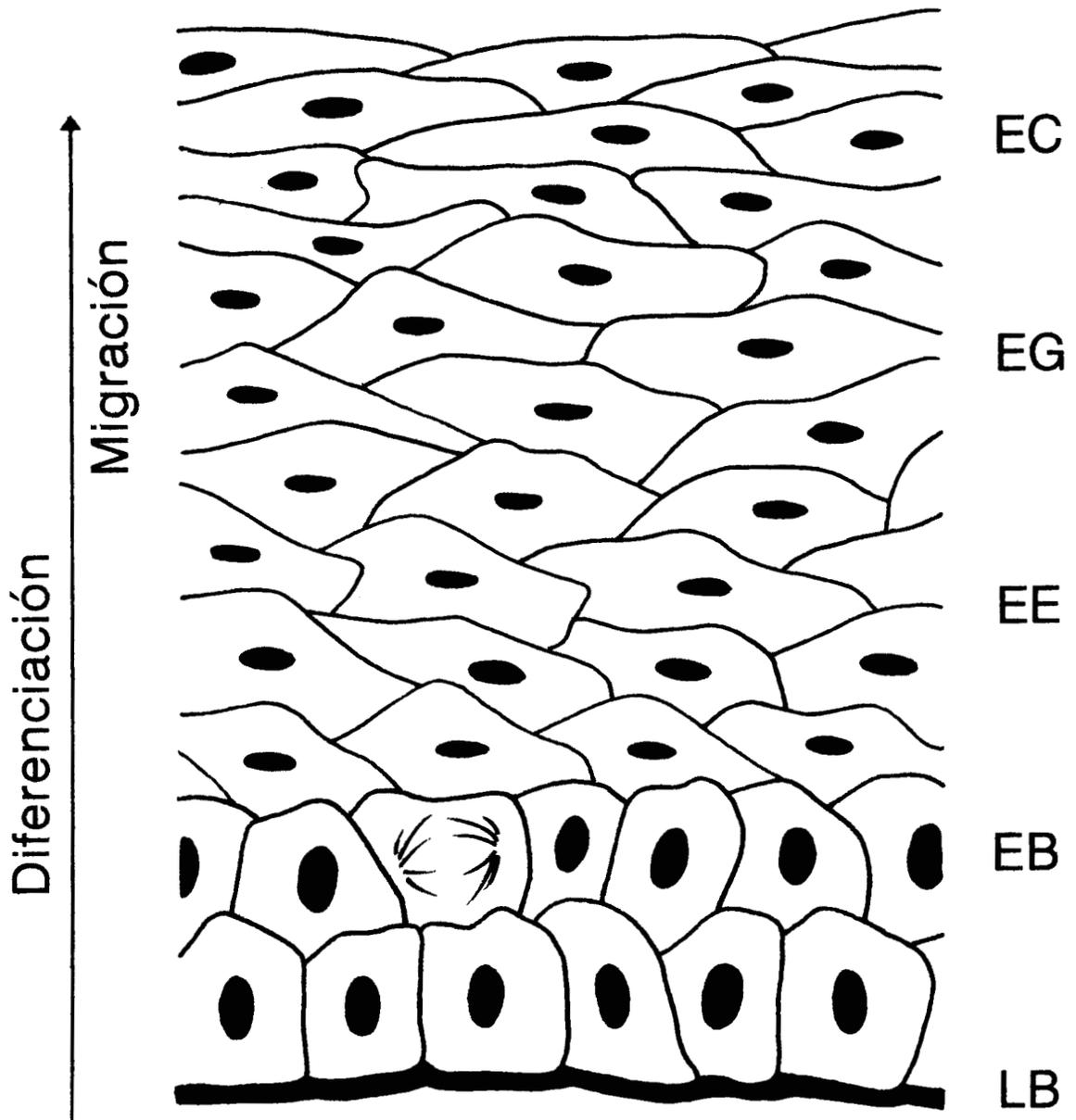


Figura 1. Esquema simplificado del epitelio plano estratificado del exocérnix, solo se muestran 4 capas o estratos: EB basal, EE espinoso, EG granuloso, EC córneo, y la lamina basal LB. (Tomado de Laimins, 1993).

aplanadas, grandes, y el núcleo se reduce hasta convertirse en un núcleo picnótico (Figura 1).

1.5. Patogénesis del cáncer cervical

Separando los epitelios del estroma subyacente se encuentra la lámina basal, constituida por una malla de matrix extracelular compuesta por colagena tipo IV, proteoglucanos, laminina y entactina.

La zona de transformación es el sitio donde la mayoría de las neoplasias intraepiteliales o invasoras se desarrollan.

Las neoplasias cervicales intraepiteliales (NIC) aparecen frecuentemente en la zona de unión o transición de los epitelios, así como en la zona de transformación, sitio donde ocurre un proceso de metaplasia escamosa preexistente, la cual llega a ser atípica.

Los conceptos de displasia, NIC, lesión escamosa intraepitelial (SIL) y carcinoma in situ, representan diferentes denominaciones para identificar la transformación maligna gradual de los epitelios normales del exo y endocérvix.

El término de displasia significa crecimiento anormal, implica una alteración de las características morfológicas celulares a malignizarse, se clasifica en leve, moderada y severa, y es el término mas ampliamente utilizado desde el advenimiento de los programas de detección masiva mediante la obtención de frotis citológicos cervicales teñidos con la técnica de Papanicolaou .

El carcinoma in situ, designa una lesión maligna confinada al epitelio, es decir una lesión que no ha invadido el estroma adyacente.

El término de NIC fue introducido para destacar que entre la displasia y el carcinoma in situ existen diversos estadios de un espectro continuo y no dos entidades independientes. Las NIC son definidas como una gama de alteraciones intraepiteliales que comienzan con una atipia global mínima y progresan a través de estadios de mayor anormalidad intraepitelial hasta un carcinoma epidermoide invasor. El diagnóstico de NIC se establece generalmente mediante la obtención de un fragmento de tejido, el diagnóstico de displasia mediante la obtención de un frotis citológico cervical.

La determinación o grado de NIC es caracterizado de acuerdo al grado de alteración morfológica estructural en el epitelio: NIC 1 solo a las células en el tercio basal del

epitelio, NIC 2 con afectación a los dos tercios inferiores, y NIC 3 con imagen de todo el espesor de células basaloideas indiferenciadas no estratificadas.

Existe una correlación de NIC 1 con displasia leve, NIC 2 con displasia moderada y NIC 3 con displasia severa y carcinoma in situ.

SIL corresponde a una nueva clasificación de alteraciones intraepiteliales cervicales propuesta por el Sistema de Bethesda, en la cual se engloban tanto imágenes de frotis como de biopsias: SIL de bajo grado conjuntando imágenes de displasia leve y CIN 1, y SIL de alto grado conjuntando imágenes de displasia moderada a severa y CIN 2 y 3, (Figura 2) justificando este agrupamiento por razones de que existe gran dificultad por parte de los observadores de distinguir entre lesiones CIN 2 y 3 (Ferenczy 1995)

El examen histopatológico de la biopsia debe considerarse obligatorio para definir la naturaleza precisa de la lesión neoplásica y para la confirmación del diagnóstico citológico (Grubb y col. 1988).

El 80% de las lesiones displásicas iniciales muestran datos citológicos de infección por HPV tanto en el epitelio escamoso como en el columnar. Los cambios patognomónicos inducidos por la infección de HPV se observan en las células escamosas intermedias y consisten en un halo perinuclear, que se considera como la huella de HPV, a estas células afectadas se les refiere como coilocitos. En los coilocitos el núcleo es agrandado, irregular, hipercromático y la binucleación es característica común. Otros cambios adicionales no específicos incluyen queratinización de células individuales, disqueratosis y núcleos gigantes.

La manifestación morfológica frecuente de la infección del HPV en el tracto ginecológico inferior son las verrugas únicas o condilomas benignos clásicos, o condilomas múltiples o acuminado. En muchas ocasiones las lesiones son muy pequeñas solo de pueden identificar mediante la colposcopia.

La lesión histopatológica de la verruga es esencialmente una hiperplasia epitelial benigna con marcada acantosis y considerable papilomatosis, en las lesiones de condiloma plano se presenta la papilomatosis.

1.5.1. Carcinoma in situ

Se considera que la mitad de todas las displasias involucionan, que un poco mas del 10% progresan hacia un carcinoma in situ y un 2% evolucionan hacia un cáncer invasor.

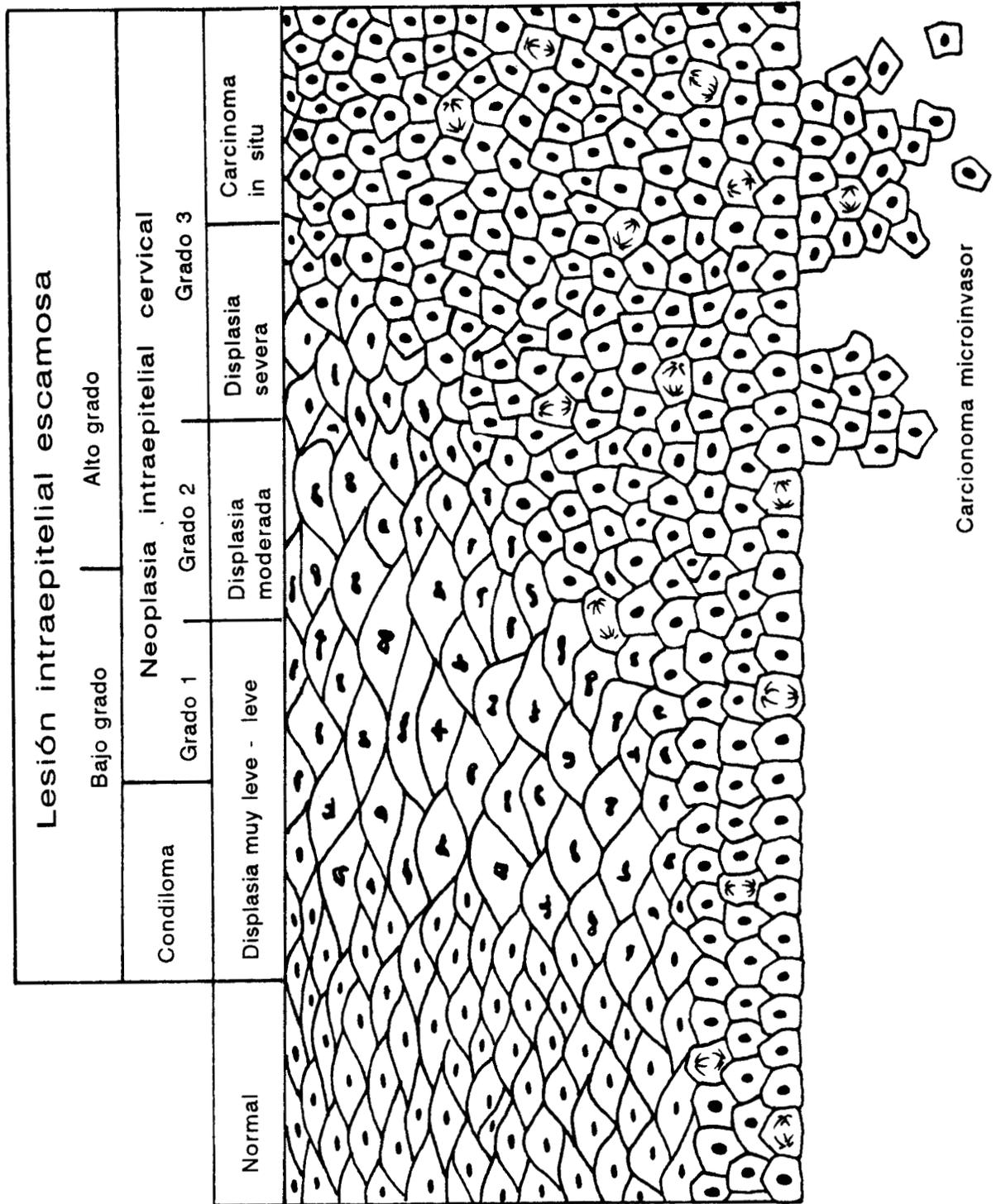


Figura 2.
Esquema y correlación de las lesiones precursoras y cáncer cervical (Tomado de Shah, Howlwy 1996).

El índice de progresión hacia una mayor potencialidad maligna depende del grado de displasia, NIC y SIL; grados mas altos progresan mas rápido hacia un carcinoma in situ. Se cree que el tiempo medio para que las displasias evolucionen a un carcinoma in situ es del orden de 10 años.

El carcinoma in situ se piensa que es un estadio preinvasor del cáncer cervical.

La imagen histológica de malignidad incluye las pérdidas de la estratificación y de la polaridad, pleomorfismo celular y un aumento anormal de la actividad mitótica del epitelio en su tercio basal; la principal característica del carcinoma in situ en el endocérvix es que involucra la superficie y la luz glandular del cérvix sin invadir el estroma.

1.5.2. Carcinoma microinvasor

El carcinoma microinvasor representa el estadio mas temprano del cáncer cervical invasor , la Federacion Internacional de Gineco-Obstetricia (FIGO) lo identifica como estadio I A, y se caracteriza por mínima invasión del estroma por parte de las células neoplásicas, se reconocen dos categorias: I A-1, que corresponde a una invasión mínima microscópica no mayor de un milímetro a partir de la lámina basal o de la superficie del epitelio cilíndrico, y I A-2, en el cual se observa la invasión de un área no mayor de 5 milímetros de profundidad con una invasión horizontal no mayor de 7 milímetros En el Cuadro 1 se indica la clasificación de los estadios clínicos del Ca Cu.

1.5.3. Carcinoma invasor

Las lesiones invasoras del cérvix pueden aparecer como pequeñas y superficiales, o extensas ulceraciones de uno o varios cuadrantes del cérvix. Lesiones mas grandes tienen apariencia exofítica o de grandes ulceraciones necróticas, pueden tener también apariencia de lesiones endofíticas o infiltrantes al canal endocervical y al estroma del cérvix.; el tumor puede infiltrar a los tejidos blandos vecinos: vagina, parametrios, recto, vejiga.

DIFERENTES ETAPAS CLINICAS DEL CARCINOMA CERVICOUTERINO

Etapa 0	Carcinoma in situ, intraepitelial
Etapa IA	Carcinoma invasor, diagnóstico solo microscópico
IA1	Invasión limitada al estroma no mayor de 3 mm. de profundidad y no mas de 7 mm. en anchura
IA2	Invasión limitada al estroma entre 3-5 mm. de de profundidad y no mas de 7 mm. en anchura
IB	Carcinoma invasor confinado al cérvix, diagnóstico macroscópico.
IB1	Tumor no mayor de 4 cm.
IB2	Tumor mayor de 4 cm.
Etapa II	Tumor que se extiende por fuera del cervix, sin llegar a la pared pélvica o 1/3 inf. de vagina
IIA	Sin invasión parametrial
IIB	Con invasión parametrial
Etapa III	Tumor que se extiende a la pared pélvica o 1/3 inferior de la vagina, además todos los casos que presenten hidronefrosis o exclusión renal.
IIIA	Invade tercio inferior de vagina
IIIB	Se extiende a la pared pélvica
Etapa IV	Se extiende al recto y vejiga, o a órganos distantes
IVA	Invade la mucosa de la vejiga o del recto
IVB	Presenta metástasis en órganos distantes

Cuadro 1. Sistema de clasificación de la FIGO - 1994

Los principales tipos de carcinoma invasor identificados en el cérvix humano son el carcinoma epidermoide, el adenocarcinoma y menos frecuente el tipo mixto; de ellos el 75-90% de los casos corresponde al tipo epidermoide.

Las lesiones mas frecuentemente asociadas con el carcinoma invasor son la cervicitis crónica, displasia severa, NIC 2 y 3, SIL de alto grado y carcinoma in situ. De acuerdo al tipo de células que lo conforman, el carcinoma epidermoide puede presentar células grandes queratinizadas , células grandes no queratinizadas y células pequeñas, siendo poco frecuente este último tipo (Hoskins y col 1993).

En general los carcinomas cervicales diseminan por vía linfática hacia los ganglios linfáticos locorreionales y ocasionalmente por via hematogena. La diseminación linfática regional o hematogena puede ocurrir dependiendo del estadio del tumor. El cérvix tiene una rica red de vasos linfáticos , que es mas abundante en sus capas musculares, una vez que el tumor ha invadido estas estructuras existe una mayor probabilidad de diseminación hacia los ganglios pélvicos. La diseminación hematogena ocurre en etapas avanzadas, los sitios metastásicos mas comunes del cáncer cervical son los ganglios linfáticos distantes, el pulmón, los huesos y el hígado

1.6. Historia natural de la paciente con cáncer cervical invasor

Como se mencionó, las pacientes con CaCu frecuentemente cursan con historia larga de cervicitis crónica, displasia severa, NIC 2-3, SIL de alto grado y carcinoma in situ. La progresión a la invasión local puede tomar de 10 a 20 años.

El proceso maligno rompe la lámina basal del epitelio e invade el estroma cervical, la lesión progresa localmente invadiendo los tejidos adyacentes y disemina inicialmente a los ganglios pélvicos locales, y posteriormente a los ganglios distantes y eventualmente a otros sitios periféricos -pulmón, huesos-

1.6.1. Manifestaciones clínicas

Se pueden agrupar en manifestaciones clínicas incipientes o inespecíficas y en sospechosas y avanzadas, de acuerdo principalmente a la invasión local o locorreional.

Pacientes asintomáticas con factores de riesgo bajo, pacientes asintomáticas con factores de riesgo alto (sección 1.3), y/o con manifestaciones inespecíficas como flujo transvaginal de varios meses de evolución, pueden ser detectadas a través de la exploración ginecológica -visualización de cérvix uterino, palpación pélvica- y toma de frotis citológicos cervicales periódicos.

Para aumentar la eficiencia de visualización del cérvix se utiliza la prueba de Schiller, que es una técnica sencilla que consiste en teñir al exocérvix mediante el colorante de lugol -solución yodoyodurada- que se basa en el principio de afinidad del epitelio sano al colorante por la presencia de glucógeno y por lo tanto se obtiene coloración café oscura homogénea de todo el exocérvix, por el contrario las zonas con baja o no afinidad por el lugol de manera inespecífica corresponden a áreas anormales inflamatorias, premalignas o malignas de las cuales es conveniente tomar biopsia.

Una metodología complementaria para establecer el diagnóstico con mayor certeza es la Colposcopia, la cual consiste en la observación directa del cuello uterino a través de un sistema óptico que permite amplificar la imagen del exocérvix y de la zona de transición de los epitelios de entre 10 a 15 veces, a semejanza del lugol, en la realización de la colposcopia, se aplica al exocérvix solución de ácido acético al 3% con la doble finalidad de remover el moco e identificar lesiones aceto-blancas que corresponderían a zonas donde el epitelio presenta anomalías inespecíficas, conduciendo con ello a seleccionar el o los sitios potencialmente malignos para la toma de biopsia.

La obtención de material citológico del canal endocervical requiere del uso de cepillos endocervicales para la toma, y la obtención de un fragmento mediante legrado-biopsia.

Con la adecuada realización de estas técnicas podríamos certificar la representatividad del tejido a estudiar, y validar casi al 100% nuestro diagnóstico.

Una frecuente manifestación clínica de carcinoma cervical incipiente es el sangrado postcoito.

En pacientes con carcinoma invasor la presencia de flujo transvaginal serohemático es lo común, tornándose hemático, persistente y progresivo en cuanto crece la neoplasia, agregándose además fatiga y otros síntomas relacionados con síndrome anémico.

En el desarrollo de la enfermedad progresivamente las pacientes se pueden acompañar con dolor en la región lumbosacra y en esos casos la posibilidad de crecimientos ganglionares periaórticos que se extienden a las raíces nerviosas

lumbosacras o comprimen el drenaje de los ureteros deben ser consideradas. Síntomas urinarios o rectales pueden aparecer en estadios avanzados como consecuencia de la invasión de la vejiga o del recto por la neoplasia.

El diagnóstico se corrobora a través de la exploración física pélvica, de la obtención de la biopsia y de exámenes complementarios de imagen y de determinación de niveles séricos de diferentes componentes y metabolitos bioquímicos, determinándose el estadio clínico correspondiente (Cuadro 1) para establecer el diagnóstico clínico integral final y planear y realizar el tratamiento correspondiente

1.6.2. Estadiaje clínico de pacientes con Ca Cu

El sistema de estadiaje propuesto por la FIGO esta basado en la evaluación clínica -inspección, palpación-, valoración del tórax, riñones, vejiga, recto, retroperitoneo, esqueleto, así como de biopsia; los diversos estadios se muestran en el Cuadro 1

1.6.3. Principios generales de tratamiento

La decisión de tratamiento depende de la severidad de la propia lesión.

Para lesiones premalignas el tratamiento de elección consiste en ablación local o en excisión quirúrgica; para lesiones invasoras el tratamiento es fundamentalmente mediante el uso de radiaciones ionizantes; en particular en los estadios I B o II A la histerectomía radical (extirpación del útero, tercio superior de vagina y tejido que se extiende hacia la pared pélvica, y linfadenectomía pélvica) o el tratamiento con radiaciones. Ante la falla de la radioterapia, en casos muy seleccionados se utiliza cirugía radical de rescate y/o quimioterapia.

1.6.3.1. Tratamiento de lesiones premalignas y pre-invasoras:

En SIL de bajo grado, displasia leve o NIC 1 se recomiendan tratamientos conservadores, y enfocados a la coincidencia de procesos inflamatorios y vigilancia

En SIL de alto grado, displasia moderada/severa mas NIC 2-3 menores de 2.5 cm., se recomienda excisión con asa electroquirúrgica o crioterapia (Ferenczy 1995). En lesiones SIL de alto grado mayores de 2.5 cm., conización terapéutica; la excisión

con asa electroquirúrgica puede ser usada en conjunción con la conización para remover mayores áreas (Jordan 1990).

El tratamiento recomendado para el CaCu in situ o CIN 3 es la conización terapéutica. Si la lesión es mayor de 3 cm. e involucra el fondo de saco vaginal, multicéntrico o coexiste con condiciones de fibromatosis uterina, menorragia, prolapso uterino o paridad satisfecha, el tratamiento recomendado es la histerectomía simple.

El tratamiento recomendado para CaCu en estadio I A es: en subetapa 1, histerectomía simple, y con subetapa 2, histerectomía radical con linfadenectomía pélvica.

1.6.3.2. Tratamiento del CaCu estadio IB y II A

El tratamiento del CaCu en estadio IB y IIA puede ser alternativo, ya que la histerectomía radical o el tratamiento con radiaciones ionizantes provoca el mismo beneficio; en pacientes jóvenes es preferible realizar cirugía para preservar los ovarios y la flexibilidad de la vagina, así mismo se prefiere en pacientes con estas etapas que coinciden con embarazo. La dosis utilizada de radioterapia es de 7000-8000 cGy fragmentados en las modalidades de irradiación externa y aplicación de material intracavitario.

El resultado de los tratamientos, cirugía radical o radiaciones en pacientes con Ca Cu estadio clínico IB produce como resultado el control de la enfermedad en el 80% de los casos a 5 años

2.1. Ciclo celular y cáncer humano

El ciclo celular es la secuencia de eventos a través del cual una célula duplica su material genético y se divide en dos células hijas (Poon 1997).

El ciclo celular está dividido en 4 fases: después de la división celular la célula hija pasa por un periodo de crecimiento G1, donde la mayoría de las proteínas celulares, RNA, membranas y otras macromoléculas son sintetizadas. G1 es seguida de un

período de síntesis de DNA, fase S y luego por otro periodo de crecimiento G2, esta última es seguida por la mitosis, fase M en la cual los cromosomas se condensan, la envoltura nuclear se rompe, se forman los husos mitóticos, los cromosomas se colocan unidos a los husos mitóticos y ocurre la separación de las cromátidas hermanas.

Se llama interfase a todas las fases del ciclo a excepción de la fase M o mitosis. El ciclo celular se completa mediante la separación de dos células hijas, evento denominado citocinesis. Las células que no se dividen salen del ciclo celular en la fase G1 y se mantienen en un estado quiescente o de reposo denominado G0.

Se podría determinar que una célula se encuentra en ciclo celular si la identificáramos en las fases S o M. La identificación de las células en fase S puede lograrse mediante la administración de ^3H -timidina, o bromodeoxiuridina, que es un análogo artificial de la timidina; el núcleo celular incorpora el compuesto marcado y este puede ser reconocido por medio de autoradiografía, y en el segundo caso por medio de la tinción del anticuerpo anti-bromodeoxiuridina. Asimismo de manera clásica podemos observar mediante microscopía de luz la fracción aproximada de células en mitosis por medio del índice mitótico.

Alternativamente, a través de la medición del contenido de DNA se puede valorar si la célula se encuentra en ciclo celular por la citometría de flujo. Diferentes colorantes fluorescentes que se unen al DNA, lo tornan fluorescente, por lo que la cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de DNA contenido en cada célula (Alberts y col.1994).

El sistema de control que regula el ciclo celular en cada tipo celular es muy complejo y consiste en una maquinaria de diferentes proteínas, cinasas e inhibidores de cinasas.

Las células de animales multicelulares como los mamíferos parecen tener el mismo control básico del ciclo celular que las células de eucariontes inferiores como las levaduras, a través de dos puntos de control, en G1 y G2 (Figura 3), sin embargo guardan diferencias importantes como el ser influidos por diferentes factores de crecimiento que regulan la proliferación celular a través de redes complejas de señales intracelulares.

2.1.1. Defectos génicos en el control del ciclo celular y el cáncer humano

Estudios recientes indican que las proteínas reguladoras del ciclo celular, principalmente las ciclinas y los genes relacionados con las ciclinas pueden ser el principal blanco durante la oncogénesis. La alteración de estos genes puede perturbar la progresión del ciclo celular y el control del crecimiento celular

Desde los años de 1970s ha habido una serie de descubrimientos que nos han permitido entender mejor la complejidad de los mecanismos de control en la progresión ordenada del ciclo celular en células de mamíferos. La maquinaria está compuesta por proteínas complejas que son activadas de manera ordenada. Lo más importante de esta maquinaria es una familia de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales son reguladas por una familia de proteínas activadoras positivas llamadas ciclinas y por una familia de inhibidores negativos llamados inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDIs).

En suma las CDK son reguladas por otras cinasas y fosfatasa. Estos complejos CDK son formados y activados en las fases específicas del ciclo celular y pueden fosforilar a un número de moléculas blanco lo cual permite llevar a cabo finalmente la replicación del DNA y la división celular

Las CDK son una familia de serina/treonina cinasas, sus niveles se mantienen en un exceso constante a través del ciclo celular y la regulación de su actividad catalítica es post-traducciona, activación mediante la unión con su apropiada ciclina y de su inactivación con la asociación con su específico CDI.

La activación de las CDK es regulada positivamente por la fosforilación de una treonina en los residuos 160, 161 o 172 de esta proteína por una cinasa que activa a las CDK llamada también CAK, y por la defosforilación de un par de aminoácidos, treonina-14 y tirosina-15 mediante una serie de CDC25-fosfatasa. El mecanismo contrario previene que las CDK sean activadas. Otros múltiples mecanismos regulan este sistema de control: p53, envejecimiento y diferenciación a través de p21, factor de crecimiento de transformación beta ($TGF\beta$) o inhibición por contacto celular a través de p27, retroalimentación de Rb por p16, y nuevamente $TGF\beta$ por p15.

Las diferentes ciclinas unidas con sus CDK específicas actúan en diferentes fases del ciclo celular permitiendo rebasar los sitios de control, por ejemplo, en el punto de control de G1 el complejo D-CDK4 fosforila a la proteína Rb, la cual puede liberar los factores de transcripción E2F y con ello realizarse la activación transcripcional y progresar de la fase G1 a la fase S (Figura 4).

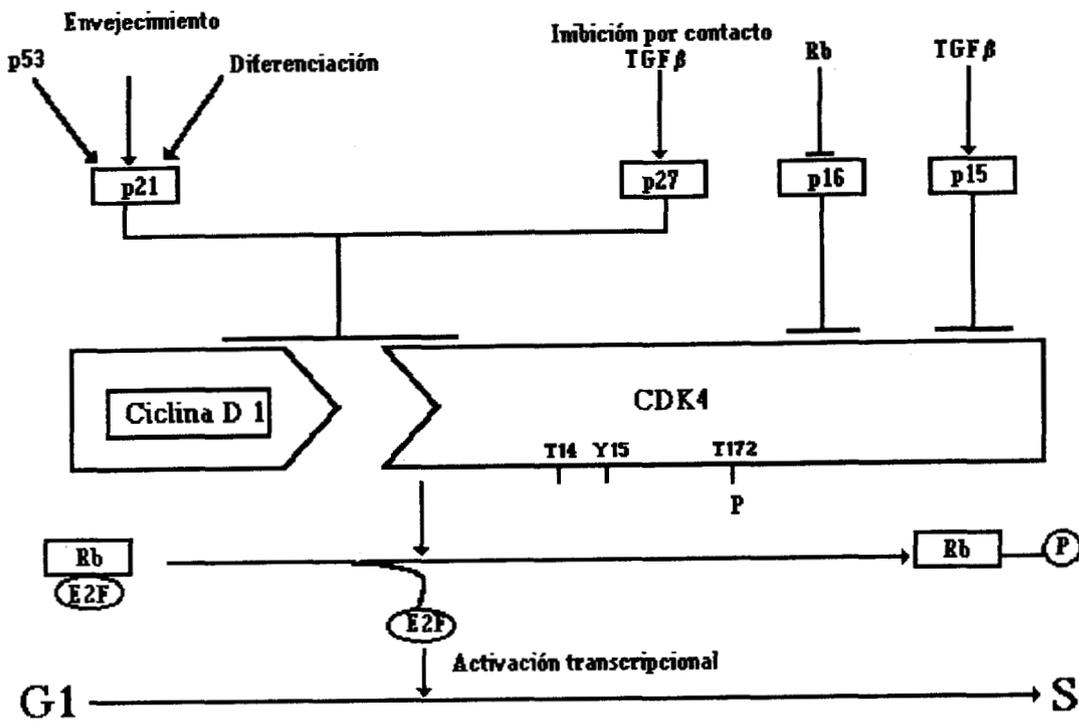


Figura 4.
Esquema de los múltiples mecanismos que regulan la activación de la cinasa dependiente de ciclina DI-CDK4, la cual puede liberar la síntesis de DNA en la fase S (Tomado de Weinstein y Zhou 1997).

Se han identificado en organismos eucariontes más de 30 tipos de ciclinas, estas se pueden agrupar dependiendo en la fase del ciclo celular que participan:

En G1, ciclinas C, D1, D2, D3 y E

En S, ciclinas tipo A

En G2/ M, ciclinas B1 y B2

Las ciclinas H se asocian con las CAK, y las ciclinas G se asocian con el producto del gen supresor p53. Uno de los mecanismos de degradación de las ciclinas es la ubiquitinación

Las CDK dependientes de ciclina D ejercen su acción durante la última mitad de la fase G1 (Figura 5). La interferencia de la función de la ciclina D1 mediante la microinyección de plásmidos antisentido o anticuerpos a fibroblastos normales o células tumorales durante la fase G1, previene que las células progresen a la fase S. Así la pérdida de la regulación de la expresión del gen de la ciclina D1 puede causar alteraciones en el control del ciclo celular y en la vía de señales mitógenas, lo cual podría contribuir a su capacidad de aumentar la transformación celular y la tumorigenicidad.

La ciclina D1 se asocia con diferentes CDKs, 1-2-4-5-6, y diferentes datos sugieren que juega un papel importante en los mecanismos de inhibición del crecimiento celular.

Los CDIs son proteínas que inhiben los complejos de cinasas activos CDKs, permitiendo un control negativo de crecimiento y de regulación del punto de control en G1, y su pérdida o inactivación podría conducir a la proliferación celular encontrada en las células cancerosas. Estos inhibidores incluyen 2 categorías: los Cip/Kip 21, 27 y 57 que influyen a diferentes CDKs y los inhibidores encontrados en células de mamífero Ink 16, 15, 18 y 19, que contienen cuatro secuencias repetidas de ankirinas.

Diferentes evidencias sugieren que algunos CDIs pueden comportarse como proteínas supresoras de tumores.

2.1.2. Reguladores del ciclo celular y cáncer

Distintos estudios de la función celular de protooncogenes y genes supresores de tumores indican que la mayoría de estos regulan vías de señales de traducción tanto

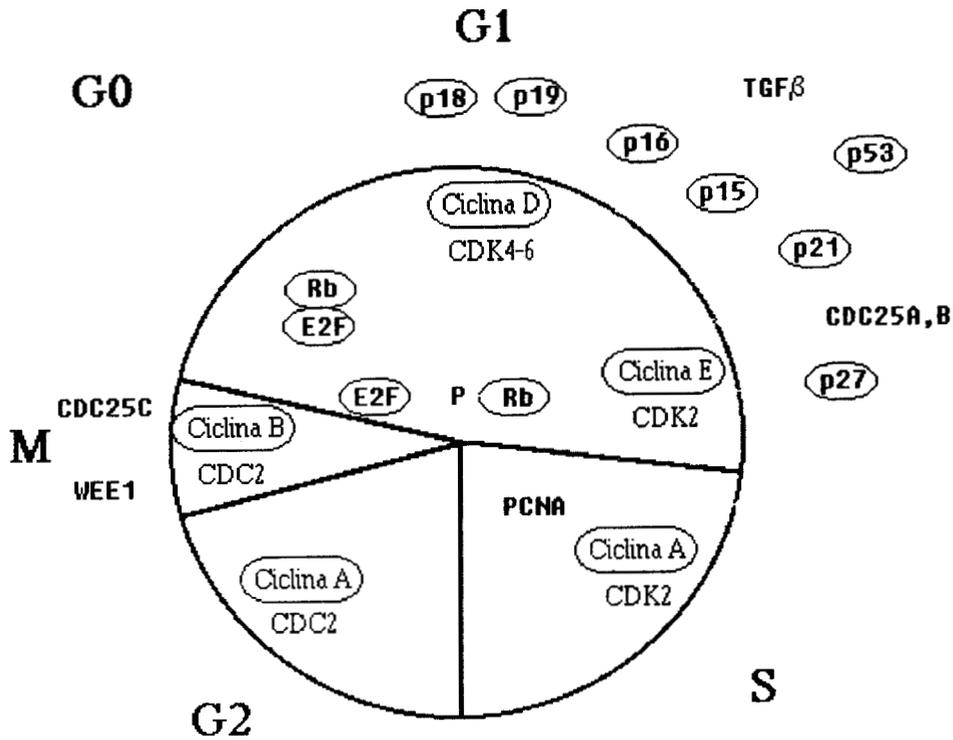


Figura 5
 Resumen global de participación de diferentes cinasa dependientes de ciclinas (CDKs) que se activan en el ciclo celular. No se muestra la participación de los inhibidores de cinasa dependientes de ciclinas (CDIs) (Tomado de Poon 1997).

como del control del ciclo celular, jugando con esto un papel muy importante en la proliferación y diferenciación celular y en la oncogénesis (Weinberg y col.1996)

Uno de los más importantes puntos de control ubicado en la porción tardía de la fase G1 está a menudo alterado en las células tumorales debido a cambios en la activación secuencial de complejos específicos de ciclina-CDKs. Esta pérdida de la regulación puede resultar tanto de la sobreexpresión de reguladores positivos como ciclinas y CDKs, como de la pérdida de reguladores negativos como los CDIs (Cuadro 2).

El gen de la ciclina D1 localizado en la banda 11q13 del cromosoma humano sufre un rearrreglo en casos de adenoma paratiroideo y esta amplificado y sobreexpresado en alta proporción en múltiples carcinomas. La presencia de amplificación de esta banda en estos tumores también se ha relacionado con menor sobrevida y con la presentación de cánceres indiferenciados.

Experimentalmente la sobreexpresión de la ciclina D1 mas la activación de oncogenes ras y/o myc en ratones transgénicos inducen a la presentación de linfomas de células B

La capacidad de revertir el fenotipo transformado de algunas líneas celulares de carcinoma esofágico humano con un cDNA D 1-ciclina antisentido sugiere que la actividad cinasa de la ciclina D1 o de la D1-CDK 4 puede usarse como blanco en la terapia del cáncer.

Las ciclinas D ejercen su efecto en la regulación del ciclo celular a través de la proteína supresora de tumor Retinoblastoma (Rb). La Rb normalmente actúa asociándose a una variedad de proteínas celulares, entre ellas a la familia de los factores de transcripción E2F. La unión de Rb con E2F previene o evita que E2F active la transcripción de varios genes que incluyen los involucrados en la síntesis del DNA y en la progresión del ciclo a la fase S, como c-myc, ciclina A, dihidrofolatoreductasa y timidilato sintetasa (ver figura 11).

Entre los CDIs, el p16Ink4, es el mas notable en el papel de supresor tumoral, está mutado, deletado o rearrreglado en gran variedad de cánceres. Otros estudios han demostrado la importancia del p15Ink4b, que es un efector potencial del TGFβ que detiene el ciclo en fase G1; el p27 es activado tanto por el TGFβ como por el efecto de la inhibición por contacto celular (Figura 5).

ALTERACION DE LOS REGULADORES EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR

Relacionados con las ciclinas:

Ciclina D1 Amplificación del gene y aumento de su expresión: mama, esófago, pulmón, hígado, etc.
Incremento de su expresión, sin amplificación del gene: mama, colon.

Ciclina E Incremento de su expresión: mama, colon, etc.

Relacionados con cinasas dependientes de ciclinas

CDK4 Amplificación e aumento de expresión: gliomas, sarcomas

Relacionados con fosfatasas

CDC25B Aumento de su expresión: mama

Relacionadas con los inhibidores de las CDKs

p16 ink4 Pérdida de su expresión debido a deleciones, mutaciones puntuales o metilación del DNA: páncreas, esófago, gliomas, leucemias, etc.

p21 cipi Inducción dañada después del daño del DNA en células mutantes en p53: numerosos tipos de cáncer

Relacionadas con los proteínas de los puntos de control G1/ S

p53 y Rb Pérdida de la heterocigocidad, mutaciones puntuales inactivación por oncoproteínas virales: numerosos tipos de cáncer

Cuadro 2. Genes, tipo de alteración y cáncer específico

2.1.3. Relevancia clínica de los factores que regulan el ciclo celular

La naturaleza ubicua de todas estas proteínas en el cáncer humano sugieren que se podrían utilizar para mejorar la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer.

El incremento de la ciclina D1 puede ser detectada por inmunohistoquímica en lesiones precursoras de cáncer; en cuanto a tratamiento se podrían utilizar secuencias antisentido de ciclina, inhibidores de ciclinas, o manipulación de genes de las ciclinas (Weinstein y col. 1997).

3. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una metodología con gran potencial para el estudio de poblaciones celulares y actualmente es una herramienta para la investigación básica y clínica.

Consiste en la medición de células individuales a través de colocarlas en un sistema de flúidos exponiéndolas a un haz de luz excitador -laser- que al sufrir desviación, nos proporcionan a través de su registro, información cuantitativa sobre sus características particulares.

El citómetro de flujo por lo tanto utiliza una combinación de componentes fluidicos, ópticos y electrónicos. La información que se puede obtener es, tamaño celular relativo, granularidad o complejidad interna, e intensidad relativa de emisión de fluorescencia relacionada con el tipo y cantidad de ácidos nucleicos; estas características son detectadas usando un sistema acoplado óptico-electrónico que registra cómo las células desvían la luz del laser y cómo emiten fluorescencia.

Para que las células o partículas sean analizadas en el citómetro, deben ser colocadas en suspensión, si las células provienen de tejidos sólidos deben ser disgregadas antes de ser analizadas.

Las células o núcleos son aspirados y conforman un flujo laminar con el paso individual de ellos en donde es enfocado el rayo laser y por sus características celulares desviado, si alguna molécula fluorescente se encuentra presente en la célula o partícula analizada, se registrará la emisión de fluorescencia, la cual es captada por lentes colocados apropiadamente que la conducen a detectores, donde es

convertida a una señal electrónica para poder digitalizarla y realizar el análisis por el software de la computadora.

La desviación mínima de la luz hacia delante entre 1 y 10 grados -forward light scatter- (FSC), generalmente se relaciona con el área de la superficie celular y por ende con el tamaño celular.

La desviación mayor de la luz, hacia los lados, cercano a 90 grados -side scattered light- (SSC), varía en relación a la estructura fina y granularidad de la célula o partícula.

Diferentes componentes celulares, como los núcleos tienen afinidad por los colorantes fluorescentes. Los compuestos fluorescentes como el yoduro de propidio (PI), ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), absorben la energía luminosa en un intervalo de longitud de onda específico, y la emiten en un rango diferente, generalmente mayor; por ejemplo la PE es excitada a 488 nm y tiene un espectro de emisión de 585 nm. El fluorocromo PI tiene un espectro de excitación a 535 nm y de emisión a 630 nm, se une específicamente a los ácidos nucleicos de doble cadena.

De acuerdo a la emisión de fluorescencia en diversos intervalos de longitudes de onda, el sistema de óptico del citómetro de flujo los detecta en canales diferentes: FL1 las emisiones de 515 nm, FL2 de 585 nm y FL3 de 677 nm mediante tubos fotomultiplicadores los cuales contienen filtros específicos para dejar pasar longitudes de onda de intervalos limitados.

Los detectores de luz generan una señal eléctrica con voltaje proporcional a la intensidad de desviación de la luz provocada por la partícula analizada.

El perfil del registro de las partículas analizadas es graficado y presentado como un histograma, donde el eje horizontal representa el intervalo de intensidad en los canales y el eje vertical denota el número de eventos por canal; los eventos con mayor señal se colocan a la derecha y aquellos con menor señal a la izquierda (Figura 6).

El umbral electrónico para captar niveles de señal puede ser conseguido antes que el citómetro acepte la señal, si marcáramos a FSC como límite; las señales por debajo de cierto tamaño serían eliminadas del registro, por ejemplos las fracciones subcelulares o residuos.

Por lo tanto el citómetro de flujo puede detectar cinco parámetros: FSC, SSC, FL1, FL2, y FL3 (Haynes y col. 1988, Becton -Dickinson 1993).

Las aplicaciones más importantes de la citometría de flujo son poder determinar inmunofenotipos celulares y poder realizar análisis cuantitativo del ciclo celular.

Las células diploides-2n contienen 7.14 pg de DNA en su núcleo durante la fase G1, durante la fase S el contenido de DNA aumenta progresivamente de 7.14 a 14.28 pg. En las fases G2/M el contenido de DNA es 4 n.

En G0- G1, el índice de DNA (DI) es de 1, correspondiente a 2n, DNA diploide o 46 cromosomas; en las fases G2/M el DI es 2, correspondiente a 4 n, o 46 cromosomas bivalentes.

Los métodos de cuantificación del DNA contenido en células individuales o grupos de ellas permite identificar el patrón de ploidía celular (Becton-Dickinson 1993) (Cuadro 3). La distribución del contenido del DNA en poblaciones celulares puede analizarse por medio de citometría de flujo y registrarse a través de un histograma.

En el histograma el DNA de células diploides predomina el pico de la fase G0-G1, ya que en una población celular en ciclo celular, el 85% de su población total se encuentra en la fase G1 conteniendo en promedio 7.14 pg o 2n, y solo el 15% del total de las células se encuentra en las fases F, G2 y M (Figura 6) (Ross y col. 1996); la cifra de índice de DNA (DI) de 1 corresponde específicamente a las células diploides en fase G1, y generalmente se registra alrededor del canal 200. Las poblaciones celulares con DI menor a 1 corresponden a células hipodiploides, y con DI de 1.1 a 2 a poblaciones hiperdiploides.

Al registrar el histograma de la población celular en fase G1 podemos observar la variación inherente de contenido de DNA en sus núcleos celulares, el cual es reflejado en la base amplia o estrecha del registro de G1; la anchura representa dicha variabilidad y el software lo calcula como coeficiente de variación de G1 (CV), cuyas cifras de 6 a 12 se consideran adecuadas.

En relación al contenido de DNA, la DNA-aneuploidía es definida como la variación del DNA en un población celular contenido en la fase G1 comparándola con la correspondiente población celular diploide de referencia. (Cuadro 3).

Una de las aplicaciones más usadas de la citometría de flujo es la medición del DNA de las células de tumores sólidos; esto puede ayudar a discriminar tumores benignos y malignos, puede ayudar en el seguimiento y la vigilancia de la progresión de la enfermedad y en la predicción de la respuesta al tratamiento.

Indice de DNA, y tipo de ploidías

$$DI = \frac{\text{Contenido de DNA de las células tumorales en G1-G0}}{\text{Contenido de DNA de las células normales en G1-G0}}$$

Ploidias en relación con el Índice de DNA

Diploide	igual a 1
Aneuploide	diferente a 1
Hiperdiploide	mayor a 1
Hipodiploide	menor a 1

Cuadro 3. Fórmula para obtener DI, y tipos de ploidías de acuerdo a su valor.

222858

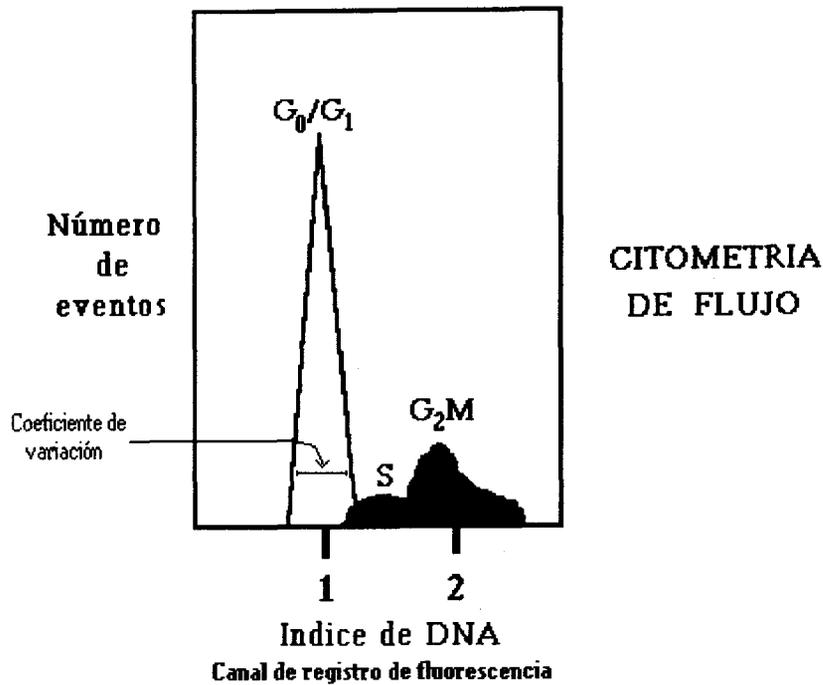


Figura 6.

DNA histograma de una población con ciclo celular normal. En la imagen del histograma, 85% de las células totales se encuentran en fase G₀/G₁, con 7.14 picogramos de DNA como promedio, correspondiendo a un índice de DNA de 1. Generalmente el pico G₀/G₁, es leído en el eje de las abscisas como aproximadamente en el canal 200. También se muestra el coeficiente de variación de las poblaciones el cual indica la dispersión / homogeneidad de dicha población (Tomado de Roos 1996).

El contenido del DNA es comunmente estudiado tiñendo los núcleos con PI, fluorocromo que puede ser excitado con el laser de argón.

La medición de las células en fase S generalmente se puede realizar por un software que estima la proporción de células en fase S usando una variedad de modelos matemáticos que ayudan a ajustar los datos crudos registrados tanto de la fase S como de G2/M. Los modelos empleados por el software CellFIT (Beckton-Dickinson 1993) son: RFIT, que analiza los eventos de la fase S en un área de un rectángulo; SFIT, correspondiente a un polinomio de segundo orden; SOBR, correspondiente a la suma de rectángulos gaussianos sobrepuestos, y POLY, que los analiza considerándolos como la suma de polígonos.(Brown y col. 1995).

El software CellFIT nos permite identificar poblaciones de núcleos individuales, dobletes y triplete, principalmente para distinguir poblaciones de núcleos individuales hiperdiploides versus dobletes, y esto se realiza mediante la calibración del instrumento usando partículas estandarizadas, como núcleos de eritrocitos de pollo (CEN) y núcleos de timocitos de ternera (CTN).

La determinación del contenido de DNA de tumores sólidos por citometría de flujo ha sido mas frecuentemente utilizado en tejidos conservados en parafina, al comparar sus resultados con los obtenidos en tejido fresco, se ha obtenido que el CV es menos preciso y por tanto con valores mas altos (Ross y col.1996), sin embargo los resultados son equivalentes para ambos tipos de muestras (Shankey y col. 1993). La calidad de los resultados obtenidos en las muestras de tejido conservado en parafina esta influido por las condiciones de fijación.

Recapitulando, la citometría de flujo del DNA es comunmente usada para determinar dos parámetros: contenido de DNA celular a través del DI, y actividad de proliferación celular a través de los porcentajes de células en fase G1, S, y G2/M; y desafortunadamente es una metodología realizada en solo escasos hospitales para obtener información adicional al estudio histopatológico y para estimar riesgos de pronóstico clínico y predicción de respuesta al tratamiento.

Diversos estudios en cáncer de vejiga y de colon sugieren que la presencia de aneuploidía o de alta proporción de células en división son importantes para el apoyo diagnóstico; mientras en linfomas, cáncer mamario y vesical ayudan en consideraciones pronósticas y predicción de respuesta al tratamiento (O'reilly y col. 1995)

Se han identificado múltiples variables que pueden modificar la determinación del contenido de DNA total en neoplasias humanas: volumen total y proporcional de

células tumorales, conservación y fijación de la muestra, preparación y disgregación de tejido, tinciones para análisis de DNA, diferentes células controles y estándares de calibración, experiencia del operador, interpretación del histograma, heterogenicidad celular del tumor, técnicas, instrumentos y modelos para análisis de DNA, agrupamiento numérico de DI y porcentajes en las diferentes fases del ciclo celular , etc.

Por la falta de acuerdos universales en la estandarización de estas variables, los resultados de diferentes estudios con citometría de flujo en relación a ploidías, no son absolutamente comparables.

3.1. Citometría de flujo y Ca Cu

En general el uso de la determinación del estado de ploidía por medición de DNA como parámetro independiente de señal diagnóstica de malignidad, no ha sido significativamente específica, ya que diferentes tumores benignos presentan aneuploidía

Sin embargo la ploidía determinada por medición del DNA ha sido reconocida como factor predictivo en la agresividad biológica tumoral. Diferentes estudios de seguimiento clínico en pacientes con neoplasias malignas han permitido agrupar correlaciones significativas y no significativas entre la valoración de ploidías por medición del DNA y el pronóstico clínico (Cuadro 4)

Generalmente los tumores con grandes anormalidades en el contenido de DNA o aneuploides son biológicamente más agresivos que los tumores con contenido de DNA normal o diploide (Hedley y col.1993).

Sin embargo cuando a la determinación de la ploidía se agrega el índice de DNA y la fracción de células en fase S, e índice de proliferación, estos en conjunto aumentan su sensibilidad de asociación con el comportamiento biológico del tumor.

La distribución del DNA del tejido fresco comparativamente con el tejido fijado en parafina es similar en tumores sólidos, aunque en este último tipo disminuye mínimamente el porcentaje de núcleos con DNA aneuploide (Hitchcock y col. 1993).

En carcinoma cervicouterino, los estudios de citometría de flujo son relativamente escasos; los valores del índice de DNA (Raber y col. 1988) así como de las

DNA-Ploidías como factor pronóstico en neoplasias humanas

Correlación excelente con el seguimiento clínico de la enfermedad:

Diagnóstico citológico del carcinoma de células transicionales

Clasificación y pronóstico del linfoma no Hodgkin

En los cánceres de próstata, ovario, endometrio, renal, hueso y sarcomas de partes blandas, melanoma maligno, y tumores del estroma de mama y gastrointestinales.

Correlación excelente, mediante la relación inversa entre estado de ploidía y supervivencia

Neuroblastoma, Meduloblastoma, Leucemia linfoblástica aguda en niños, y ciertos subtipos de linfoma no Hodgkin

Correlación buena con el seguimiento clínico:

Carcinomas de mama, escamosos de cabeza y cuello, adenocarcinomas gástrico y colorectal, hepatocarcinoma, esofágico

Correlación inconstante con el seguimiento clínico:

Carcinoma epidermoide del cérvix uterino, cáncer pulmonar de células no pequeñas, mesotelioma maligno, tumores ováricos del estroma, cánceres papilares y foliculares del tiroides

Correlación limitada o no significativa con el seguimiento clínico

Enfermedad de Hodgkin, leucemia aguda, cáncer pulmonar de células pequeñas, tumores carcinoides, etc.

(Tomado de Ross J. 1996. DNA ploidy and cell cycle analysis in Pathology. Igaku-Shoin Med Publ Inc. New York, 118-119)

Cuadro 4. Evaluación pronóstica de DNA-ploidías en neoplasias humanas

proporciones de las células en fase S y de ploidias son controvertidas con relación a factor pronóstico (Zanetta 1991, Strang y col. 1991, Kenter y col. 1990 y Nguyen y col.1993). Diferentes estudios permiten determinar una correlación inconsistente y por ende con utilidad clínica incierta. Los estudios son frecuentemente contradictorios y el consenso actual se orienta a la consideración de que los diferentes resultados se han obtenido de análisis univariados y en ocasiones de poblaciones tumorales heterogéneas, y por lo tanto se requiere de estudios multivariados con diseños metodológicos estrictos para comparar poblaciones muestrales homogéneas y poder resolver estas discrepancias (Strang y col.1991, Nguyen y col.1993, Lai y col. 1993)

4. Papilomavirus Humano (HPV)

De acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía de Virus, los papilomavirus pertenecen a la familia de los papovaviridae, en la cual también se encuentran los virus SV 40 y los poliomavirus.

Los papiloma virus infectan a los humanos y a múltiples animales, guardan todos ellos características en común como tamaño pequeño, virión no envuelto, cápside icosaédrica, doble cadena de DNA genómico circular y que su multiplicación se realiza en el núcleo. Miden 55 nm de diámetro y su genoma es de 8000 pares de bases (bp); la partícula viral tiene una densidad de 1.34 g/ml en cloruro de cesio (Shah y col. 1996).

Aunque los papilomavirus humanos y de animales muestran organización genómica parecida, son altamente específicos para infectar solo una especie, y debido a que las proteínas de su cápside son antigénicamente similares, estos virus no se subdividen en serotipos, sino solo en genotipos y subtipos basados en muy pequeñas diferencias de su DNA. La homología del DNA entre los genotipos -secuencias de marcos de lectura abiertos de E6, E7 y L1- es de 90%; entre los subtipos de entre el 90 a 98%, y finalmente entre las variantes es de más del 98% (Van Ranst y col. 1993)

4.1. Biología del HPV

Los papilomavirus humanos tienen tropismo por los epitelios, su infección está íntimamente asociada al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales escamosas. En su ciclo de vida el HPV además de replicar su DNA implica la síntesis de las proteínas de su cápside, y su ensamblaje solo se realiza en el ambiente que permiten los queratinocitos terminalmente diferenciados. Las observaciones de cortes de sección infectados muestran que la transcripción viral empieza en la parte basal del epitelio, y que la expresión en conjunto se incrementa de las células basales hacia la superficie.

Cuando se inicia la infección el genoma del HPV se localiza en las células basales en estado episomal y luego se replica coordinadamente con la replicación celular; como las células infectadas maduran y migran para formar el estrato espinoso y luego el estrato córneo, en este último es donde se produce la cápside protéica, la cual se ensambla para formar otra vez el virus completo.

Más de 70 tipos de papilomavirus han sido reconocidos que infectan a humanos. De acuerdo al sitio de infección los HPVs pueden ser clasificados en dos grupos principales:

cutáneos, encontrados en verrugas cutáneas y epidermodisplasia verruciforme, y en mucosas, encontrados predominantemente en lesiones anogenitales; los tipos de HPV comúnmente encontrados en lesiones benignas son considerados "virus de bajo riesgo" como los tipos 6 y 11; los tipos de HPVs encontrados en lesiones malignas se les reconoce como "virus de alto riesgo", como los 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51, y 52 (Cuadro 5).

En la actualidad 22 genomas de HPVs han sido completamente secuenciados y otra gran cantidad de manera parcial, dichas secuencias están disponibles en el Gene Bank.

La organización genética de los HPVs es similar en todo el grupo, y consiste en 8 marcos de lectura abiertos (ORFs) localizados en la misma cadena de DNA, que han sido clasificados en tempranos-early (E) y tardíos-late (L) basados en su localización del genoma (Figura 7). Los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 son regiones que contienen la información necesaria para la replicación viral y eventualmente la transformación celular. Los genes L1 y L2 son regiones que solo pueden expresarse en queratinocitos diferenciados y codifican las proteínas estructurales de la cápside viral.

Genotipos de HPV y su asociación con lesiones epiteliales

En piel:

1,4	Verruga plantar
2,4	Verruga vulgar
3,10	Verruga plana
5,8,14,17,20	Epidermodisplasia verruciforme y carcinoma de células escamosas
7	Verruga del carnicero
9,12,15,19,21-25	
36,46,47	Epidermodisplasia verruciforme
41	Carcinoma de células escamosas

En mucosas:

6	Condiloma acuminado, NIC
11	Papiloma laríngeo, NIC
13,32	Hiperplasia focal epitelial
16,18,31,33,35, 45,51,52,56	NIC, carcinoma cervical
30	NIC, carcinoma laríngeo
39	NIC, carcinoma cervical, NIP
34,58,61,62	NIC
40	NIC, NIP
42,43,44	NIC, papiloma, hiperplasia, condiloma vulvares
57	NIC, papiloma invertido
59	NIV

NIC, NIP, NIV= neoplasia intraepitelial cervical, peneana vulvar.

(Tomado de Fiels y col. 1996)

Cuadro 5. Principales tipos de HPVs asociados a lesiones benignas / malignas

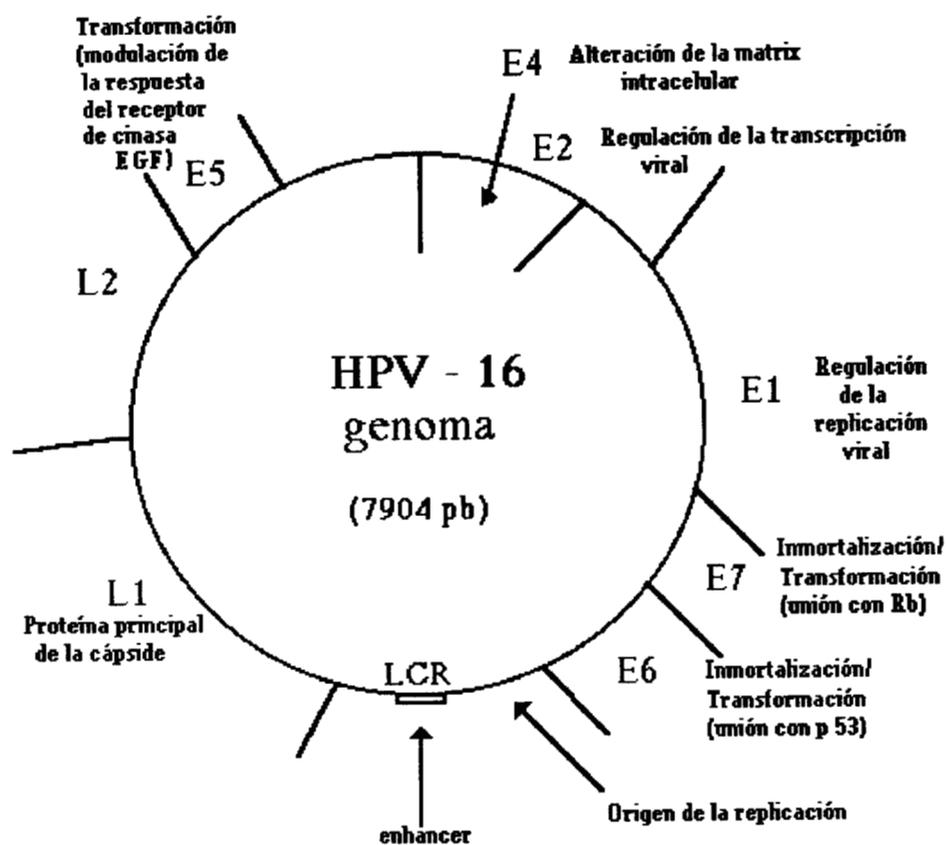


Figura 7.
Organización genética y las funciones de los genes de los papilomavirus humanos, se ejemplifica con el HPV 16 (Tomado de O'Connor y col. 1997).

Una región, no codificante, localizada entre la terminación del ORF de L1 y el inicio del ORF E6, denominada región larga de control-long control region (LCR), también es llamada región no codificante o región reguladora río arriba-upstream regulatory region (URR). La LCR es una zona de aproximadamente 400 bp en donde se inicia el origen de la replicación, contiene el arreglo de varios sitios donde se unen diferentes activadores y represores de la transcripción. La LCR regula la transcripción de las regiones tempranas y tardías y controla la producción de proteínas virales y sus partículas infectantes, puede jugar un papel fundamental para determinar la extensión de la infección viral del huésped.

La transcripción del papilomavirus es compleja debido a la presencia de múltiples promotores, tanto como de múltiples alternativas de patrones de ensamblamiento o splicing del RNA mensajero. En la LCR se han identificado secuencias de amplificadores-enhancers que actúan como cis-reguladores de la expresión del HPV; los transcritos virales de los oncogenes E6 y E7 son controlados por esos "enhancers" o amplificadores.

4.1.1. Región temprana (E)

La región temprana está localizada río abajo de la región LCR (Figura 7) y está compuesta por 6 ORFs

El gen E1 codifica una fosfoproteína nuclear que se une al origen de la replicación y es requerida para mantener la integridad episomal. La proteína E1 es capaz de formar un heterodímero con E2 y así regular la replicación extracromosomal del DNA y completar el ciclo viral

E2. Los productos de E2 son factores multifuncionales involucrados en la transcripción y replicación del DNA viral, tanto como en su regulación de expresión de las proteínas oncogénicas virales E6 y E7.

La proteína E2 es una proteína nuclear que se une como dímero al DNA mediante dos dominios: COOH terminal y la función amino inicial, conectados por una bisagra flexible, el ORF de E2 codifica al regulador más importante de la transcripción de papilomavirus.

En HPVs el ORF de E2 puede codificar un represor transcripcional, que se une específicamente a 4 sitios identificados donde existe una secuencia palindrómica

ACCN₆GGT de 12 pares de bases, 2 de estos sitios están localizados a 4bp río arriba de la caja TATA de los promotores E6/E7. La modulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7 (vease más adelante E6 y E7) puede involucrar tanto regulación positiva como negativa y tiene implicaciones importantes para la progresión maligna.

En lesiones benignas y premalignas el DNA viral se encuentra en estado episomal o extracromosomal, en cambio en las lesiones malignas el DNA viral se ha integrado al DNA del huésped. Se ha sugerido que la integración de HPV a los cromosomas humanos no es un evento al azar, ocurre preferentemente cuando los niveles de los E1 y E2 dejan de reprimir a los genes E6 y E7, produciéndose en consecuencia una sobreexpresión de estas oncoproteínas (Saewha y col.1995). Por esta razón, la integración del DNA viral es considerado como un importante paso en la progresión de las lesiones de HPV al cáncer (Kristiansen y col.1994), sin embargo se ha encontrado que entre el 13 al 90% en los cánceres cervicales el HPV además de estar integrado, se encuentra en forma episomal; aun esta pendiente la clarificación de este punto.

E4. Aunque el ORF de E4 está localizado dentro de la región temprana, se expresa en las etapas tardías junto con L1 y L2. En algunos casos como verrugas de la piel inducidas por HPV 1, la proteína E 4 es el componente más abundante de las células infectadas. Las proteínas E4 no se asocian con propiedades de transformación en los queratinocitos humanos. E4 induce el colapso de la red de citoqueratina facilitando la liberación de partículas virales y esto podría causar el característico halo nuclear de las células infectadas y productivas; la imagen observada histológica y citológica de estas células es la de coilocitos.

E5. En algunos reportes se ha descrito que la actividad de la E5 puede participar en la iniciación de la transformación maligna, a través de afectar la actividad de los receptores de factores de crecimiento como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

E6. El ORF del HPV 16 codifica a una proteína de 150 aminoácidos que se relaciona con la proteína E1B de adenovirus. Todas las E6 tienen el potencial de formar 2 grandes dedos de zinc, su tamaño es de aproximadamente 16 Kd y están localizadas principalmente en el núcleo.

222358

La proteína E6 es capaz de unirse a la proteína del gen supresor de tumores p53. el cual en su forma silvestre normalmente esta involucrado en la supresión de la transformación celular.

La unión de E6 a p53 es dependiente de la proteína asociada a E6 (E6-AP) lo que conduce a un incremento en la inestabilidad de la proteína p53, por lo tanto E6 inhibe la actividad de transactivación transcripcional de p53

La unión de E6 de los HPVs 16 y 18 a p53 resulta con la pérdida de la actividad de p53 dentro de la célula, E6 estimula la degradación de p53 a través de una vía proteolítica dependiente de ubiquitina, conduciendo a que bajen los niveles celulares de p53

Comparando la proteína E6 de los HPVs 16 y 18 con la de HPVs de bajo potencial oncogénico, la E6 de virus oncogénicos se unen a p53 con mayor afinidad y por lo tanto aceleran su degradación. Asimismo E6 puede inhibir la función regulatoria normal de p53

Se sabe que en la infección de HPVs, pocos transcritos codificados por E6 y E7 son detectados en la capa basal de los epitelios, donde p53 es expresado. Los niveles de p53 en células inmortalizadas con E6 o en células de carcinoma cervical infectadas con HPV son en promedio de 2 a 3 veces menores, comparadas con células normales, la vida media de p53 en queratinocitos humanos que expresen E6 es de 3 horas, 20 minutos

E7 El ORF de E7 codifica a la proteína E7 que es la mas importante en la transformación tumoral. es una fosfoproteína de 98 aa localizada en el nucleo y específicamente en la matrix nuclear. en su estructura contiene 2 secuencias repetitivas de cis-xxx-cis, las que se ha demostrado que juegan un papel muy importante en cooperación con el oncogén ras activado en la transformación de fibroblastos embrionarios de rata expuestos a HPV 18

Las proteínas E7 han sido encontradas en carcinomas cervicales y en líneas celulares derivadas de ellas. En modelos de células humanas se ha demostrado que E7 junto con E6 de HPVs oncogénicos son necesarios y suficientes para inmortalizar los queratinocitos requiriendo generalmente la participación de un segundo oncogen que puede ser ras, c-myc o p53 mutado

Algunas regiones conservadas en la secuencia de los aminoácidos en E7 se unen al producto del gen retinoblastoma (Rb), mismo que se relaciona con las proteínas p107 y p130

En células normales las proteínas Rb, p107 y p130 forman complejos con los factores de transcripción E2F en la fase G1 del ciclo celular. Estos complejos regulan negativamente el crecimiento celular por medio de la represión de la transcripción de los genes E2F cuyos productos se requieren para la síntesis del DNA; para que la replicación se realice los complejos E2F-Rb deben disociarse.

La proteína E7 del HPV 16 altera el mecanismo de control de crecimiento celular por su unión al Rb y la disociación del complejo E2F-Rb, causando la liberación del E2F transcripcionalmente activo y consecuentemente se replica el DNA celular, esto último se observa en queratinocitos humanos suprabasales que no están ciclándose, en los cuales el programa de diferenciación celular no está alterado.

Las proteínas E7 de HPV6 tienen 10 veces menor afinidad de unión al Rb que las de los HPVs 16 y 18, esta diferencia se debe a la simple sustitución de algunos aminoácidos encontrados en las proteínas de los virus oncogénicos; asimismo se ha observado que la mutación de la E7 del HPV 6 en estos sitios, permite un aumento dramático en la unión de esta proteína con el Rb, observándose con ello un incremento en la actividad transformadora celular.

Normalmente el estado de fosforilación de la proteína Rb es regulado a través del ciclo celular; siendo hipofosforilado-Rb en la fase G0/G1, y fosforilado-ppRb durante las fases S, M, por unión a E7. La fosforilación de pRb se realiza en residuos de serina por una o varias CDKs (Figura 4).

4.1.2. Región tardía. L1, L2

La región tardía contiene 2 ORFs separados y codifica las proteínas L1 y L2, que forman la cápside viral. La proteína L1 es la proteína viral más abundante que contiene las determinantes antigénicas que son similares en los diferentes grupos de HPVs.

La síntesis de proteínas de la cápside más el ensamblaje del virión ocurren en los queratinocitos diferenciados.

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Durante las últimas tres décadas han surgido una serie de metodologías que facilitan el análisis del DNA, entre ellas la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la que probablemente ha tenido el mayor impacto en el avance reciente de la biología molecular. Esta metodología permite amplificar a gran escala regiones específicas del DNA y facilita la manipulación posterior de los fragmentos amplificados. El principio de la PCR se basa en el uso de oligonucleótidos sintéticos que son complementarios a secuencias que flanquean una región específica del DNA molde. Así por medio de ciclos de termoamplificación, que comprenden cambios de temperatura repetidos, permiten el alineamiento de oligonucleótidos específicos o "primers" con las secuencias complementarias y la replicación del fragmento de DNA de interés, mediante el uso de la taq DNA polimerasa; con esto es posible obtener amplificaciones numéricas del fragmento de interés entre 1000 a 1000,000 de veces.

Esto aumenta significativamente la probabilidad de detectar secuencias génicas blanco de la compleja mezcla del DNA, facilitando la clonación y secuenciación de genes (Bej y col.1991).

Las características de la PCR se modifican de acuerdo a las necesidades específicas según el campo donde se aplique. Su utilización tiene numerosas aplicaciones en el diagnóstico patológico, especialmente en los campos de la microbiología, medicina forense, oncología, etc. (Remick y col. 1990).

Las implicaciones en la amplificación de los ácidos nucleicos han aumentado la información acerca de diferentes problemas médicos y biológicos.

Posterior al descubrimiento de las enzimas de restricción durante la década de 1970, surgieron una serie de técnicas que permitieron detectar genes o zonas específicas de DNA mediante el uso de sondas moleculares que se apareaban o hibridaban a las secuencias complementarias. La hibridación DNA-DNA tipo Southern presenta diversas dificultades para su ejecución y tiene baja sensibilidad.

En 1985 Kary Mullis descubrió la PCR, cuya sensibilidad es muy alta , y su ejecución, a partir del uso de los termocicladores automatizados la coloca como una metodología altamente reproducible y específica.

La PCR es una metodología que permite amplificar secuencias específicas de DNA

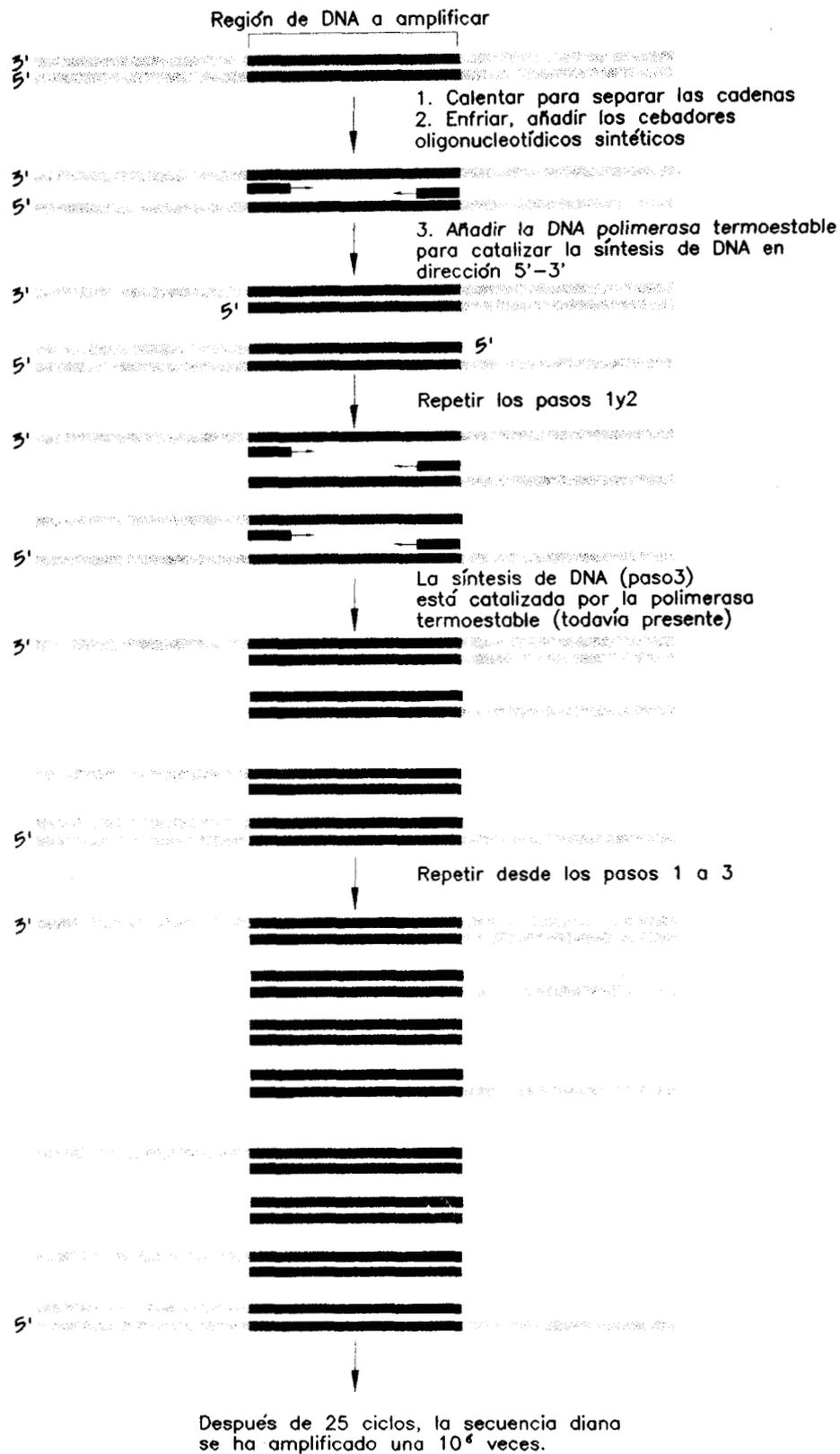


Figura 8. Diagrama esquemático de la amplificación con PCR

o RNA imitando el proceso de replicación del DNA en vivo.

Los componentes básicos requeridos son: el DNA molde de cadena sencilla, los "primers" que son oligonucleótidos con secuencias complementarias específicas que se unen a los extremos de una secuencia molde de DNA; desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) y la enzima DNA-polimerasa (Figura 8).

El método consiste en llevar a cabo ciclos repetitivos de desnaturalización del DNA, alineamiento de los "primers" y la extensión de DNA por la polimerasa. Los 2 primers hibridan las 2 cadenas del DNA de la secuencia blanco, y así la cadena se sintetiza de la región entre los primers, replicando el segmento de DNA. El producto de cada ciclo de PCR es complementario al DNA molde previo, así la cantidad de DNA sintetizado es el doble por cada ciclo sucesivo. El molde original de DNA puede estar en forma pura o ser una pequeña parte de una mezcla compleja de DNA (Bej y col. 1991).

El gen humano de la beta globina fue la primer secuencia de DNA que fue amplificado por PCR (Saiki y col. 1985).

Se pueden obtener las cadenas sencillas de DNA mediante desnaturalización con calor

Los "primers" se pueden obtener a través del aparato "oligosintetizador". Se utilizan soluciones amortiguadoras o buffers que contienen cationes monovalentes de Mg, y algunos co-solventes.

Los co-solventes ayudan a estabilizar la enzima e influyen en su procesividad o la capacidad de adicionar nucleótidos antes que se disocie la polimerasa, y/o en la temperatura de desnaturalización del DNA. La introducción de la Taq DNA polimerasa estable al calor, permitió un mejoramiento importante para la automatización de los métodos de PCR. La mayoría de las DNA-polimerasas usadas en PCR son estables a temperatura entre 95°C y 97°C.

La PCR requiere de 3 pasos: 1) desnaturalización del duplex de DNA a 92^o-96^o C, 2) alineación de los "primers" al molde complementario de DNA a temperaturas entre 45^o-72^o C, y 3) extensión del " primer" y adición sucesiva de los dNTPs a 72^oC. El esquema de desnaturalización, alineación y extensión a través de un período de tiempo específico se llama ciclo. La repetición de los ciclos permite la amplificación de la cadena del DNA de interés. La síntesis exponencial de un fragmento de DNA esta directamente relacionada con el número de ciclos de amplificación y con el número de copias de la secuencia a amplificar del molde original de DNA (Figura 9).

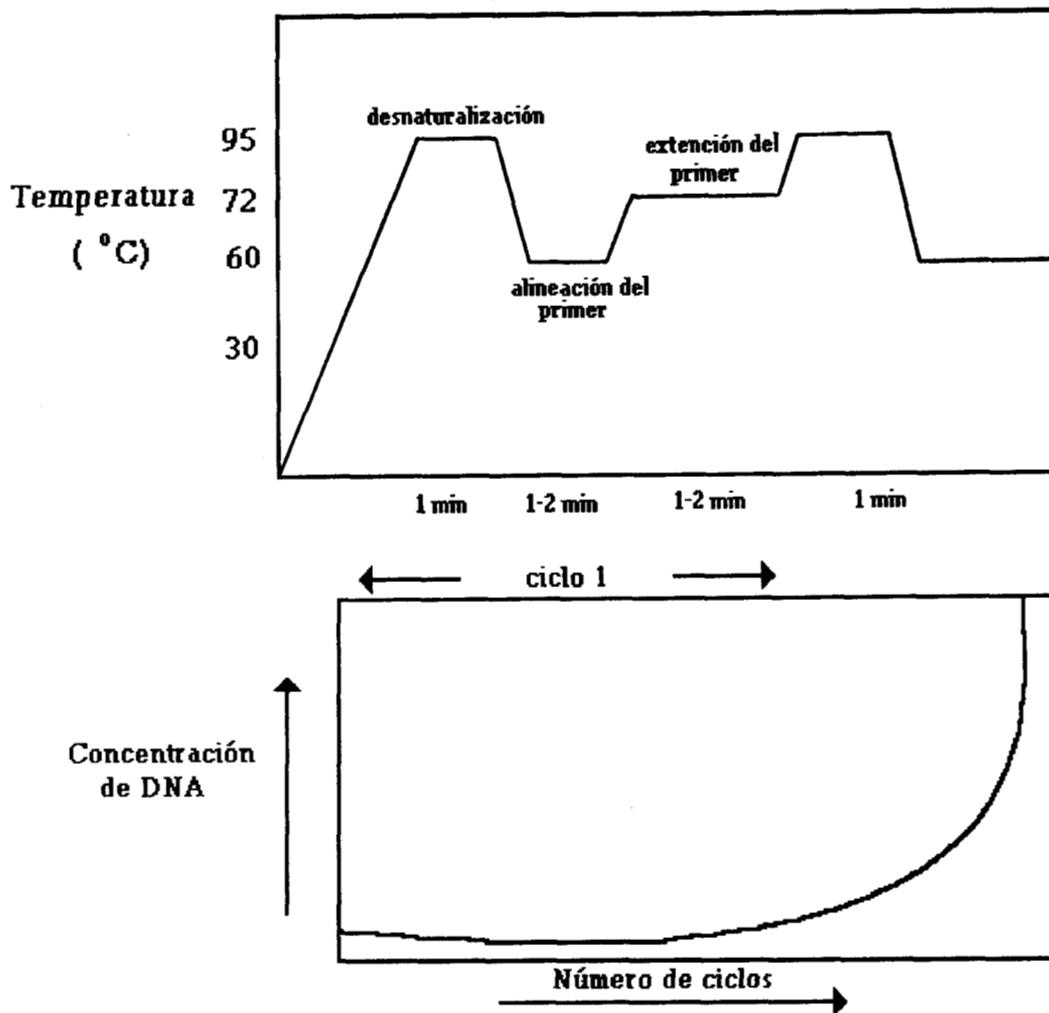


Figura 9.
 Diagrama esquemático de la amplificación con PCR. Se muestra el orden típico de un ciclo de termoamplificación, así como se incrementa exponencialmente el DNA amplificado con el número de ciclos (Tomado de Bej 1991).

Durante los 2 primeros ciclos los amplificadores tienen una longitud indeterminada; a partir del 3o. ciclo los fragmentos blanco sintetizados del DNA limitan su longitud programada por ambos "primers", por lo que después del 4o. ciclo ocurre la amplificación de estos fragmentos blanco.

Tanto los diferentes componentes físicos y químicos de la PCR pueden ser factor que modifique el nivel de amplificación del fragmento blanco de DNA, estos factores están interrelacionados e incluyen principalmente: equipo -por ejemplo el tipo de termociclador-, la temperatura y el número de ciclos, concentración y tipo de DNA polimerasa, incluyendo su buffer y co-solventes, concentración de dNTPs, tipo y concentración de "primers", cantidad y pureza del DNA de la muestra, tamaño y estructura del producto de amplificación (para completar esta sección se recomienda consultar a Rolfs y col. 1992)

Debido al enorme poder de amplificación de la PCR, debe de guardarse gran cuidado en su realización para evitar contaminaciones accidentales de las soluciones y de las micropipetas utilizadas, tanto como de la muestra por un DNA exógeno. Deben realizarse constantemente controles negativos para verificar la pureza de las soluciones usadas en dicha metodología.

Aunque insignificantes también se han encontrado errores en la replicación/amplificación durante la PCR, como la inserción de A por G y T por C (Dunning y col.1988).

En la mayoría de las aplicaciones de la PCR, la secuencia y la combinación de los "primers" pueden determinar el éxito de la reacción . Dependiendo del propósito de la PCR la longitud del primer puede variar de 14 a 40 bases, con un contenido de G+ C entre 40 y 75%.

La temperatura de alineación de los "primers" puede ser calculada usando la fórmula:

$$T_a = 2(A+T) + 4(G+C) - 5^{\circ} C \quad (\text{Bej y col.1991})$$

Una guía general para el diseño de "primers" es: los "primers" deben diseñarse a través de regiones altamente conservadas del genoma de las especies analizadas; las terminaciones 3' de los "primers" deben codificar aminoácidos conservados evitando codones degenerados -triptofano y metionina- ; las terminaciones 3' de los "primers" deben evitar complementaridad para evitar la formación de dímeros entre los "primers" , por lo que no deben contener en su terminación secuencias

palindrómicas, los "primers" deben ser carentes de estructura secundaria, deben evitarse la distribución desbalanceada de los dominios G/C y A/T, y los "primers" deben ser específicos para un miembro único de una familia de genes (Rolfs 1992).

5.1. Identificación de productos amplificados por la PCR

Los fragmentos generados por la PCR pueden ser valorados en geles de electroforesis, pero esto usualmente no es suficiente para comprobar la especificidad de una PCR.

El gel debe ser rutinariamente transferido a un blot para realizarle mas tarde el análisis de hibridación; esta identificación es usualmente mucho mas sensible que verificar la identidad de los fragmentos de DNA solo a través de observar la fluorescencia de la banda teñida con bromuro de etidio.

La sensibilidad de la detección en un gel de agarosa depende entre otras cosas de la resolución de las bandas de los fragmentos de DNA y de la transparencia del gel. La concentración máxima de agarosa que permite la migración del DNA difiere de los tipos y marcas de agarosa. En resoluciones altas del gel, podemos detectar distintos fragmentos que pueden contener menos de 2-4 ng de DNA. Deben usarse solo geles de agarosa frescos, ya que la resolución de las bandas se reduce significativamente en geles usados después de 12 a 24 hrs.

Las cadenas dobles de DNA con bromuro de etidio intercalado dan un máximo de fluorescencia a 302 nm con el transiluminador ultravioleta.

Diferentes marcadores de peso molecular pueden ser útiles para la cuantificación aproximada y poder analizar el tamaño de los productos de la PCR. Por lo menos 2 diferentes cantidades de un fragmento de DNA deben ser analizados en un gel para estimar la concentración de DNA del control positivo de la muestra..

5.2. Analisis de dot blot / slot blot de productos de PCR

En la identificación de la hibridación de la muestra de DNA, se puede utilizar DNA de esperma de salmón de cadena simple como control negativo. Generalmente diferentes sondas de hibridación individualmente son mezcladas con el producto del DNA amplificado, se requieren controles positivos específicos , ya que muchas muestras pueden ser negativas. El volumen depositado en los pozos para dot o slot blot depende del tipo de aparato.

Los pasos necesarios son: desnaturalizar el DNA del producto de amplificación de la PCR; e hibridar con las sondas específicas marcadas previamente, si estas fueron marcadas con biotina (nucleótidos biotilados), se puede revelar la hibridación por medio de quimioluminiscencia. Aparentemente la combinación de la mezcla de hibridación con fosfatasa alcalina o con dioxetano como sustrato, cuando este se encuentra en estado electrónicamente excitado permiten la mayor sensibilidad en el sistema de luminiscencia

5.3. Amplificación de productos de la PCR obtenidos de tejidos fijados en parafina

La gran sensibilidad de la PCR permite realizar estudios moleculares en tejido fijado en parafina (TFP), que combinados con los diferentes métodos de hibridación subsecuentes o con secuenciación, logran detectar la identificación de agentes infecciosos y alteraciones genéticas de manera mas sensible y específica.

La preparación de estos tejidos es teóricamente simple, disolver la parafina de las rebanadas de tejido y subsecuentemente tratar los tejidos deshidratados para liberar el DNA.

El éxito de cualquier estudio de PCR basado en TFP depende de múltiples factores: sustancias fijadoras usadas en el procesamiento de tejidos, la duración de la fijación, edad del bloque y longitud del fragmento de DNA a ser amplificado.

Las mejores sustancias fijadores de tejidos que permiten las siguientes amplificaciones con la PCR son acetona, etanol, omnifix seguidas de formalina al 10% en buffer neutro (Greer y col 1991).

Diferentes estudios han demostrado que la capacidad para amplificar productos largos de PCR -1000 bp- disminuye con la mayoría de sustancias fijadoras a excepción del etanol, acetona y omnifix; los fijadores no ácidos permiten la amplificación de fragmentos de 536 bp o más. En varios laboratorios rutinariamente la fijación de los tejidos es de 24 horas o menos, sin embargo cuando este periodo aumenta el DNA es comprometido, considerando que con la PCR solo podrían amplificarse productos de menos de 200 bp (Neubaver y col. 1992).

En la Universidad de Nuevo Mexico se estudiaron 240 TFP cruzando 2 variables: años o edad del especimen conservado en parafina con 3 pares de "primers" diferentes para amplificar fragmentos de 268 bp, 536 bp y 986 bp. del gen de beta globina; los resultados demostraron que entre mayor sea el fragmento por

amplificar, su amplificación decae rápidamente después de los primeros 3 años de conservación (Greer y col. 1995)

De tal forma que además de las variables reconocidas en la amplificación de DNA de las muestras de tejido en fresco: demasiada o escasa cantidad de DNA, incompleta inactivación de la proteinasa K que resulta en la digestión de la Taq polimerasa, ciclos e intervalos de termociclos insuficientes, demasiada cantidad de primer específico, presencia de sustancias inhibitoras en la muestra; en la PCR de tejidos conservados en parafina se agrega que el DNA sea demasiado degradado o de baja calidad

5.4. Detección y tipificación de HPVs de genitales

Los HPVs de genitales son un grupo de mas de 20 tipos distintos , que se asocian a verrugas, condilomas, displasias, cáncer in situ y cáncer invasor. Dentro de éste grupo existen tipos específicos asociados a lesiones benignas y otros a lesiones malignas, llamados por esto de alto riesgo ; mediante la PCR podemos detectarlos y tipificarlos.

Los genomas de HPVs de genitales son únicos, sin embargo presentan secuencias homólogas particularmente en los ORFs de L1. Aunque mas de 20 se han identificado, solo en 6 se ha reportado la secuencia completa del DNA. Comparando la secuencia de los HPVs de genitales 6, 11, 16, 18 y 33; se han identificado regiones de homología en fragmentos de 20 a 25 pb, dichas regiones se denominan señales consenso y sirven como "primers" en la PCR

Estos "primers" consenso denominados MY11 para la cadena positiva y MY09 para la cadena negativa, son degenerados en varias posiciones, contienen uno u otro nucleótido en algunas posiciones, permitiendo la complementaridad de 5 secuencias de los HPVs de genitales (Cuadro 6).

La región amplificada entre los "primers" MY11 y MY09 tiene una longitud de 450 pb, es una región conservada y es usada para detectar la secuencia de L1 consenso de los HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, y 56 (Ho y col. 1995).

Otros nucleótidos específicos para cada tipo de HPV se denominan MY12, MY13, MY14, WD74 y MY16, y se utilizan como sondas específicas para tipificar las secuencias de estos 5 tipos de virus (Cuadro 7).

Asimismo existen otros "primers" consenso parecidos a los anteriores denominados

222858

Primers consenso de L1 para HPVs 6, 11, 16, 18 y 33

Clave: M = A + C ; R = A + G
W = A + T ; Y = C + T

Primer de la cadena positiva:

MY11 GCMCAGGGWCATAAYAATGG

Posición de la primera base

HPV 16 6584

HPV 18 6558

Primer de la cadena negativa:

MY09 CGTCCMARRGGAWACTGATC

Posición de la primera base

HPV 16 7035

HPV 18 7012

Tamaño de los productos de L1 por PCR

HPV 16 451 pb

HPV 18 454 pb

(Tomado de Ting 1990. Detection and typing of genital HPV)

Cuadro 6. Tamaño de los productos, secuencia y posición de la primera base de MY11 y MY09

Sondas específicas de L1 para identificar HPVs 6, 11, 16, 18 y 33

Sonda	HPV	Secuencia	Posición
MY12	06	CATCCGTA ACTACATCTTCCA	6813-6833
MY13	11	TCTGTGTCTAAATCTGCTACA	6800-6820
MY14	16	CATACACCTCCAGCACCTAA	6926-6945
WD74	18	GGATGCTGCACCGGCTGA	6905-6922
MY16	33	CACACAAGTAACTAGTGACAG	6628-6648

(Tomado de Ting 1990. Detection and typing of genital human papillomaviruses, en PCR Protocols: A guide to methods and applications)

Cuadro 7. Secuencias de sondas específicas para productos de PCR de algunos HPVs.

GP5 y GP6, que son degenerados como los MY11 y MY09, y que también detectan secuencias de L1 consenso, cuyo alineamiento de su primer nucleótido está ubicado cerca de los MYs y amplifican fragmentos mas pequeños de 140 bp.

Para analizar los productos de la PCR generados por estos "primers", se pueden utilizar geles para electroforesis de acrilamida o agarosa teñidos con bromuro de etidio, permitiendo visualizar productos que contengan por lo menos 200 copias de los HPVs.

El análisis de hibridación con su sonda específica puede realizarse mediante Southern blot o dot-slot blot (Ting y Manos 1990).

6. Biología molecular del cáncer cervical y sus precursores

Estudios moleculares y epidemiológicos han conducido en los últimos años a reconocer que ciertos tipos de HPVs son los agentes etiológicos del cáncer cervical y de las lesiones precursoras. De más de 70 HPV descritos, la mitad han sido aislados de las mucosas genitales ; la asociación de ciertos tipos con tejidos normales y lesiones benignas en oposición a tipos asociados a cáncer, ha permitido el concepto de bajo y alto riesgo oncogénico de los HPVs.

La expresión de las proteínas oncogénicas interfiere con las funciones del control del crecimiento celular. Como consecuencia de la expresión continua de estos genomas virales, puede ocurrir inestabilidad cromosómica conduciendo a la completa transformación celular o inmortalización y crecimiento celular independiente de anclaje (Park y col. 1995, Shah y col.1996); ya que las células normales adultas o neonatales suspendidas en gel de agar líquido o semisólido detienen su proliferación, y las células tumorales crecen continuamente en estas condiciones.

Mientras que la mayoría de las infecciones de HPV son transitorias y no parecen ser importantes en carcinogénesis cervical, diferentes estudios indican que la persistencia de HPVs de alto riesgo pueden determinar la progresión a estados más severos de la enfermedad cervical. El riesgo de que la enfermedad progrese parece también estar asociada con la carga viral (Villa 1997), así como a las estrategias del virus para la evasión de la respuesta inmune del huésped (Smith y col. 1994).

Como lo ha anotado Franco y col. (1995) la magnitud de asociación entre el HPV y el cáncer cervical es más alta que la encontrada entre el fumar y el cáncer pulmonar, y muy cercana a la asociación del estado de portador crónico de la hepatitis viral B con el cáncer hepático.

Los HPV constituídos de cerca de 8000 nucleótidos se mantienen episomales en el núcleo de las células normales infectadas, sin embargo en CINs y aún más frecuentemente en cánceres, el genoma del HPV se encuentra integrado a los cromosomas de la célula huésped (Cullen y col. 1991). Mientras que este evento parece ocurrir en sitios azarosos del genoma celular, la integración del DNA viral involucra los genes E1 y E2, ocasionando consecuencias importantes en la regulación de la expresión génica viral como la immortalización y transformación celular.

Los genes E6 y E7 están localizados en el extremo 5' final de la región temprana E; estos genes codifican para proteínas multifuncionales que interfieren con el crecimiento celular y son transcritos por el mismo promotor produciendo un mRNA policistrónico. Las proteínas codificadas por los genes de E6 y E7 de HPV de alto riesgo están directamente involucrados en la transformación celular, sin embargo esto lo realizan solo en presencia de otro oncogén activo como ras o myc (Park y col. 1995). Otra característica importante de las proteínas E6 y E7 es su capacidad para immortalizar queratinocitos de piel humana o de epitelio cervical; asimismo estas proteínas pueden influir en la transcripción de diferentes promotores virales y celulares produciendo inestabilidad genómica y provocando fenotipos de malignidad.

La proteína E6 de HPVs de alto riesgo se une a la proteína supresora tumoral p53, induciendo su degradación por ubiquitinación y con esto eliminando el control dependiente de p53 en el ciclo celular (Figura 10), un importante gen activado por p53 es WAF1/cip 1, el cual es un inhibidor de las CDKs.

La fosfoproteína nuclear E7 se asocia con la proteína supresora tumoral Rb que es un control negativo del crecimiento celular. La unión de E7 a Rb permite la liberación de los factores de transcripción E2F, que activan la transcripción de varios genes involucrados en la progresión de las células de la fase G1 a S en el ciclo celular; E7 también interactúa con la ciclina A y la CDK-2 perturbando la progresión del ciclo celular (Figura 11).

Otro gen involucrado en la estimulación del crecimiento y en la transformación

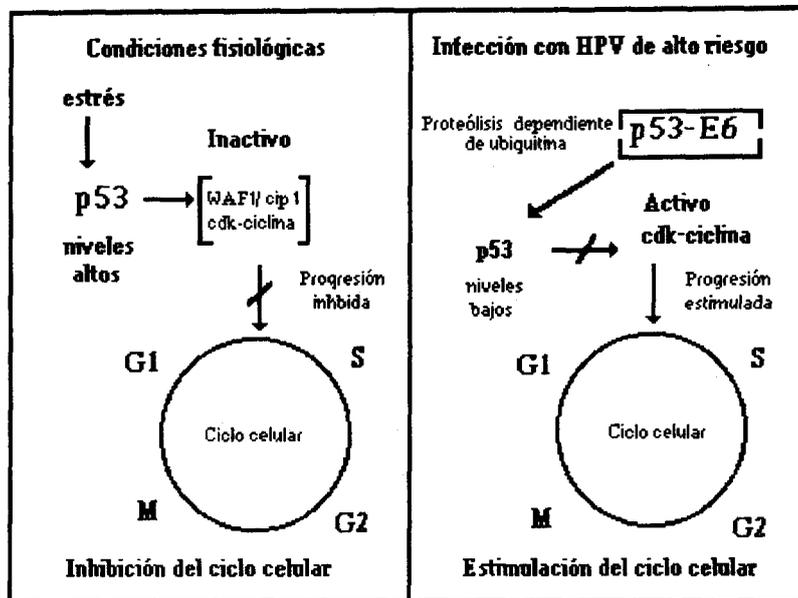


Figura 10.

Efectos de la unión de E6 con p53. En el lado izquierdo la respuesta fisiológica al estrés; en el lado derecho el efecto por la infección con un HPV de alto riesgo oncogénico (Tomado de Park y col. 1995).

celular es el E5, su proteína se une a la membrana celular y se sinergiza con el EGF, en la estimulación de la proliferación celular probablemente a través de que aumenta la fosforilación de los receptores para EGF.

Los productos del gen E2 están involucrados en la regulación transcripcional del genoma HPV, cuando éste gen está interrumpido como resultado de la integración del genoma viral, se observan niveles altos de E6 y E7 tanto en lesiones cervicales intraepiteliales como en cánceres; asimismo el incremento de E6 y E7 se correlaciona con un incremento de la actividad de immortalización en los cultivos celulares.

El sitio donde el HPV se integra al DNA de la célula huésped es altamente variable, sin embargo en algunas líneas celulares tumorales se ha mapeado, localizándolo en sitios frágiles, tanto como en sitios cercanos a oncogenes celulares como c-myc y N-myc.

Aunque la integración del DNA viral en el huésped hospedero parece ser un paso importante para muchos cánceres cervicales, puede no serlo necesariamente, ya que algunos tumores lo contienen sólo de manera episomal; de manera que el modelo propuesto de la alteración física del ORF de E2 y la sobreexpresión de E6 y E7 que conducen a la transformación celular sea probablemente un modelo bastante simplista (Park y col. 1995).

Diversos estudios epidemiológicos han indicado claramente que tanto la infección de HPV y el cáncer cervical están fuertemente influenciados por las características de la actividad sexual en la mujer y en su pareja.

Como se observa en la Figura 12, las infecciones persistentes de HPVs de alto riesgo son determinantes importantes para las SIL de alto grado, sin embargo otros factores adicionales contribuyen al proceso polietápico del cáncer cervical

Condiciones que permiten estados de inmunosupresión y variables como paridad uso de anticonceptivos orales, y tabaquismo que influyen en el desarrollo del cáncer cervical

Los HPVs de genitales son típicamente divididos en 2 grupos:

Los tipos 6, 11, 26, 42, 44, 54, 70 y 73 corresponden a bajo riesgo, y

Los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66, y 68, corresponden a alto riesgo en la asociación con el cáncer cervical

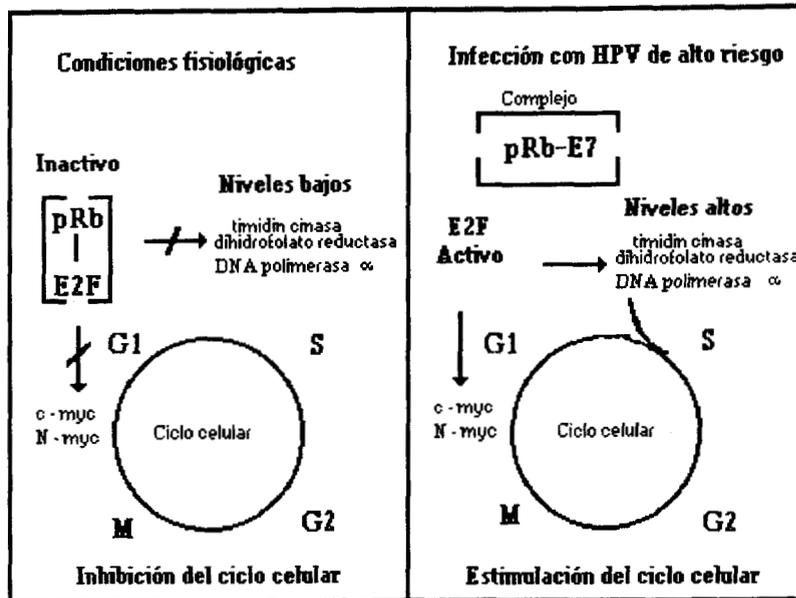


Figura 11.

Efecto de la unión de E7 a Rb. En el lado izquierdo, en condiciones fisiológicas las células se detienen en G1 en el ciclo celular; en el lado derecho por el efecto de la infección con HPV de alto riesgo oncogénico las células entran a ciclo celular (Tomado de Park y col. 1995).

6.1. Interacción de los HPVs con diversos cofactores.

Diferentes mutágenos e inmunosupresores como los constituyentes del tabaco, pueden cooperar con los HPV en la inducción de malignidad mediante la facilitación de la persistencia viral, o participando en la transformación de las células inmortalizadas.

Los tejidos cervicales contienen receptores para estrógenos y progesterona. La interacción de los HPVs con diferentes hormonas modifican su expresión. La región río arriba de la LCR se ha demostrado que tiene secuencias similares a la región de respuesta a los glucocorticoides y, es inducible por hormonas esteroideas; en células de ratones infectadas por HPV 16, la tumorigénesis se produce en presencia de dexametasona. Sin embargo se requieren estudios adicionales para establecer la relevancia de asociación entre hormonas sexuales y sus receptores en relación a la transformación maligna provocada por HPV in vivo.

6.2. Persistencia del virus en la progresión de la enfermedad.

Es conocido desde hace años la persistencia del genoma de HPV en los tumores malignos tanto como en sus líneas celulares derivadas; sin embargo poco se sabe acerca de los factores determinantes que favorecen la persistencia de la infección por HPV.

El DNA viral se puede detectar en el 10 al 50% de las mujeres asintomáticas en edad reproductiva, sin embargo cuando se hace seguimiento de dichas pacientes, se ha observado que la mayoría de las infecciones son transitorias y solo una pequeña proporción de las mujeres tienden a mantener el mismo tipo de HPV. Se ha demostrado que la persistencia es mayor en mujeres post-menopáusicas y con infección de HPVs de tipos de alto riesgo. Estos hallazgos pueden sugerir que solo las infecciones persistentes del epitelio cervical activan el desarrollo del tumor, lo cual se ha comprobado con estudios epidemiológicos (Schiffman y col. 1995, Ho y col.1995), estos resultados concluyen que la persistencia de HPVs de alto riesgo conduce a la progresión de las lesiones cervicales (Figura 12).

En los últimos años se ha empezado a comparar diferentes variantes de HPVs de alto riesgo de los tipos 16 y 18 en relación a progresión tumoral (Xi y col.1995, Lizano y col. 1997), sin embargo se requieren mas estudios para probar esta posibilidad.

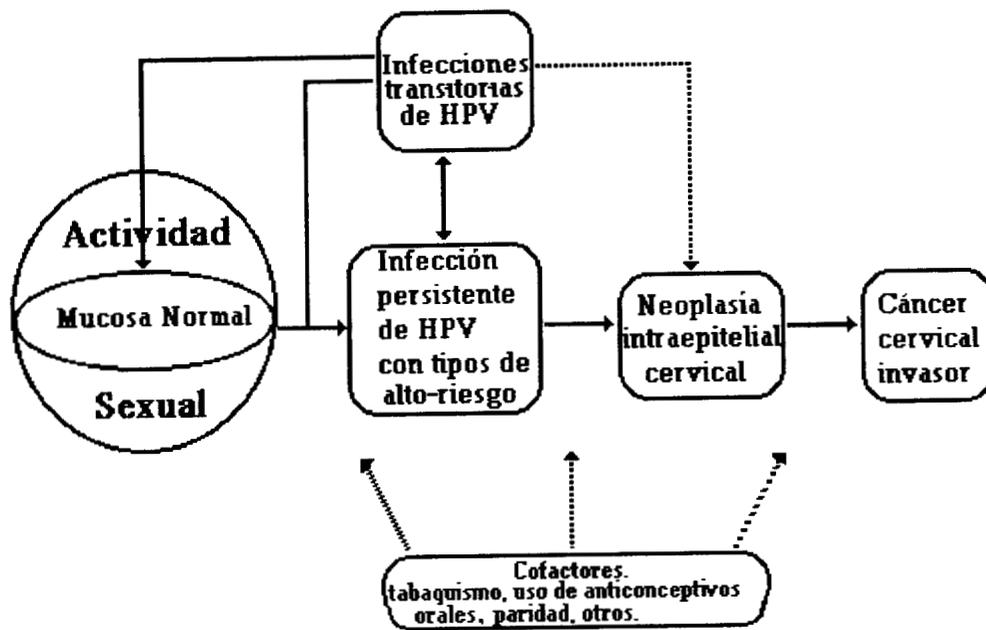


Figura 12.
 Interrelación de factores de riesgo en la historia natural de las infecciones de HPV y el cáncer cervical (Tomado de Villa 1997).

6.3. Carga viral y enfermedad cervical

El número de genomas de HPV presentes en las células ha demostrado que se correlaciona con la severidad de la enfermedad cervical, mediante la técnica de la PCR cuantitativa, se determinaron niveles mayores de HPV 16 en CIN comparados con lesiones de bajo grado (Cuzick y col. 1994). La evidencia sugiere que la mayor carga viral puede predecir la persistencia de la infección de HPV, en las subsiguientes muestras (Ho y col. 1995). Caballero y Villa en 1995 propusieron recientemente un método cuantitativo basado en una PCR de baja especificidad o astringencia para medirla.

6.4. Otros factores o eventos celulares que afectan la carcinogénesis cervical

Los virus del herpes simple (HSV 2) han recibido atención como cofactor potencial. En un estudio de casos y controles en Latinoamérica, la presencia de anticuerpos contra HSV 2 fue asociado con el desarrollo de cáncer invasor, con un riesgo relativo de 1.6. Mujeres con HSV seropositivas y presencia de HPV 16 o 18, tienen el doble riesgo de presentar Ca Cu, comparado con mujeres que solo presentan HPV 16 o 18, sugiriendo un posible sinergismo entre HSV 2 y HPV

6.5. Alteraciones cromosómicas

El desarrollo del cáncer de cualquier sitio involucra un proceso de pasos múltiples de adquisición y acumulación de varias alteraciones genéticas. El cáncer cervical es un modelo clásico de pasos múltiples en carcinogénesis porque se desarrolla de lesiones precursoras que perduran mucho tiempo

Debido a las dificultades técnicas asociadas a la obtención de preparaciones de bandeos de cromosomas de buena calidad en tumores sólidos, se han realizado estudios citogenéticos solo en un número limitado de casos; sin embargo estos han identificado alteraciones estructurales y numéricas complejas en diferentes cromosomas y no específicas.

Las más comúnmente observadas han sido en el cromosoma 1, pero de manera ocasional se han encontrado en los cromosomas 4, 5, 6, 11, 13, 17, 18, y 21; Sreekantaiah y col. (1988) encontraron alteraciones en el 95% en el cromosoma 1,

en número, deleciones, isocromosomas, y translocaciones; siendo las regiones 1p11-p13, y 1q21-q32 las más afectadas.

6.6. Pérdida de la heterocigocidad.

Los estudios clásicos citogenéticos han sido completados con el desarrollo de técnicas moleculares, que usan análisis de alotipos para detectar alteraciones genéticas. Una de las ventajas de estos métodos es que ayudan a identificar regiones de cromosomas que pueden contener los genes supresores de tumor. Solo una copia es necesario para mantener la función normal celular. En la mayoría de tumores en los que se pierde la función del gen supresor tumoral como Rb o APC -gen alterado en pacientes con poliposis adenomatosa familiar-, se asocia con la mutación de un alelo del gen Rb y se acompaña por la pérdida del otro alelo no mutado. La pérdida del alelo no mutado se acompaña frecuentemente con la pérdida de otros segmentos vecinos a la secuencia de DNA. La combinación de la mutación de un alelo con la deleción del otro no mutado conduce a la homocigocidad del alelo mutado recesivo o pérdida de la heterocigocidad.

El análisis de alotipos en cáncer cervical ha identificado la pérdida de heterocigocidad en diferentes locis de varios cromosomas, predominantemente en los cromosomas 3, 5 y 11. Diferentes estudios indican la presencia de genes supresores en el brazo corto del cromosoma 3, en la región 3p13-21.3, la pérdida de este alelo se detecta frecuentemente en cáncer cervical, así como en otra gran variedad de cánceres -mamario, renal, carcinomas de cabeza y cuello y adenocarcinoma pulmonar-.

6.7. Otras alteraciones celulares.

Existen observaciones controversiales de la importancia sobre las alteraciones de los proto-oncogenes c-myc, c-Ha-ras en la carcinogénesis cervical. Algunos estudios consideran que la amplificación de c-myc esta relacionada con el riesgo de recurrencia temprana, independiente de otros factores pronósticos (Riou y col. 1987, Bourhis y col. 1990), sin embargo otros estudios lo descartan.

6.8. Respuesta inmunológica contra la infección de HPV y el cáncer cervical.

Las infecciones de HPV están favorecidas en pacientes inmunodeprimidos, tornándose en infecciones persistentes.

Los pacientes con respuesta inmunológica alterada muestran alta prevalencia de tumores benignos y malignos inducidos por HPV. Se han encontrado anticuerpos séricos contra proteínas tempranas y tardías en estos pacientes, pero la interpretación global de estas observaciones aun no es concluyente:

a) no hay acuerdo general de cuales antígenos son blanco de anticuerpos, b) no se ha establecido correlación entre los anticuerpos circulantes y la regresión de lesiones inducidas por HPV, y ningún estudio ha demostrado aumento de títulos de anticuerpos contra alguna proteína de HPV en infecciones aguda, c) pacientes con alteraciones inmunológicas caracterizadas por falla en producción de anticuerpos, generalmente muestran piel normal y verrugas genitales. La baja prevalencia de anticuerpos de proteínas específicas de algún tipo de HPV no estimula al uso de determinaciones serológicas para propósitos de diagnóstico. Sin embargo estudios epidemiológicos recientes sugieren fuertemente que existe una respuesta inmunológica humoral a la proteína L1 de la cápside después del desarrollo de lesiones y a la proteína E7 en pacientes con cáncer invasor cervical.

Pacientes con inmunidad celular alterada, como aquellos que son transplantados, con infección de HIV, o con enfermedad de Hodgkin, tienen un incremento importante de la incidencia de verrugas de piel y genitales, sugiriendo esto que las infecciones por papilomavirus son controladas por la respuesta celular inmune .

La respuesta celular inmune consiste en 2 clases de células, linfocitos T ayudadores (helper) y linfocitos T citotóxicos (killer); los primeros presentan a los antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II a los linfocitos B como pequeños péptidos, y los segundos pueden matar selectivamente a las células infectadas, y presentan a los antígenos por medio del MHC clase I.

La inmunización de ratones con células singénicas no tumorales transfectadas con los genes E6 y E7 de HPV les confieren protección contra las células tumorales singénicas HPV-positivas, la protección es mediada por las células T-asesinas; por lo tanto se podría considerar que las proteínas E6 y E7 podrían ser blanco para desarrollar vacunas terapéuticas.

Sin embargo mucho trabajo tiene que realizarse para mapear los epítopes inmunogénicos de las diferentes proteínas de HPV, ya que por ejemplo el epítipo de

E7 de ratón falla en humanos, por lo que se requiere gran cantidad de ensayos para evitar las restricciones impuestas por el MHC.

El MHC es altamente polimórfico, en los humanos su loci y sus productos llevan el prefijo HLA. Los genes del HLA-clase I incluyen los loci HLA-A, B y C; y los de HLA-clase II incluyen los loci HLA-DR, DQ y DP.

Los antígenos HLA clase I son virtualmente expresados en todas las células, aunque a diferentes niveles y presentan los péptidos antigénicos a los linfocitos T-asesinos. Las moléculas HLA-clase II le presentan los péptidos a los linfocitos T-ayudadores y solo son expresados en la superficie de las células del sistema inmune.

Las lesiones cutáneas por HPV se caracterizan por una reducción importante o pérdida de la beta 2-microglobulina (cadena ligera del un antígeno HLA clase I). La pérdida de la expresión de uno o mas alelos en el locus de HLA-A y B se encuentra en mas del 60% de pacientes con cáncer cervical, mientras que la pérdida completa de la expresión de HLA-clase I ha sido reportada en células de carcinoma cervical. Las células epiteliales normales son HLA-clase II negativas, sin embargo mas del 80% de las células de carcinoma cervical expresan HLA-clase II.

Diferentes alelos de HLA presentan diferentes péptidos al sistema inmune, cualquier alteración en alelos individuales puede influir en el curso de la respuesta inmune. Ciertos haplotipos HLA-DQ y DQ-DR pueden ser asociados con la susceptibilidad o resistencia al cáncer cervical.

Las células de Langerhans, cuya función en la piel y mucosas es el de células presentadoras de antígenos no parece cambiar en SIL de bajo grado, en contraste con SIL de alto grado en donde existe menor densidad de dichas células entre el tejido.

En suma, las proteínas HPV tienen propiedades antigénicas, y la respuesta inmunológica parece estar limitada a epitopes inmunodominantes. Esto hará posible diseñar vacunas basadas en péptidos sintéticos para fomentar la respuesta terapéutica de las células T, mientras que la respuesta profiláctica por células B puede ser estimulada a través del uso de proteína L1 nativa. Sin embargo, también a partir de la modulación del complejo MHC o de moléculas accesorias de expresión se pudiera tener un impacto decisivo en inmunización o terapia génica, dirigiendo la regulación de las moléculas presentadoras de antígeno (O.Connor y col. 1997).

222858

6.8.1 Respuesta inmune al HPV

Algunos estudios experimentales de la respuesta inmune al HPV se realizaron usando animales como modelos, dentro de ellos se han empleado principalmente conejos y ganado vacuno. El papiloma del conejo cola de algodón, induce inicialmente lesiones benignas al cabo de 8 a 14 meses, y mas tarde carcinomas en el 25 al 80% de los casos; en algunos animales se presenta regresión espontánea y en otros persistencia de lesiones benignas por toda la vida del animal.

Existen múltiples observaciones relacionadas a estos comportamientos:

La regresión de las lesiones esta relacionada con la respuesta inmunológica mediada por células, cuando se presenta infiltración leucocitaria de la dermis, ello se asocia con regresión.

Los anticuerpos contra las proteínas virales L1 y L2 se incrementan en la progresión de papilomas a carcinomas.

La vacunación con extractos crudos de verrugas o vacunas recombinantes induce la producción de anticuerpos neutralizantes.

La vacunación con E6 en el ratón, provoca la formación de anticuerpos específicos y la proliferación de linfocitos T citotóxicos; la aplicación de proteína de E6 y E7 recombinantes resulta en el desarrollo de reacción de hipersensibilidad retardada, asimismo la respuesta depende de la secreción de linfocinas específicas que atraen y activan a las células inmunológicas en el sitio de la infección.

6.8.2. Medición de anticuerpos en la respuesta a HPV

La infección de HPV induce la generación de anticuerpos dirigidos contra varios antígenos virales como L1,L2, E2, E6, y E7.

En estudios recientes llevados a cabo en Colombia y España utilizando proteínas recombinantes L1 y L2 de HPV 16 para detectar anticuerpos en pacientes con CIN 3 y Ca Cu, encontraron anticuerpos Ig G en 55% en tumores invasores y 78% en CIN 3.

En relación a la proteína E4, las determinaciones de prevalencia de anticuerpos han sido de 43% en carcinoma invasor y de 39% en CIN, y en lo correspondiente a E6 y E7, su determinación ha sido alta en cáncer y baja en lesiones benignas.

Sin embargo existe divergencia del porcentaje de positividad de anticuerpos contra E6 y E7, ésto relacionado con la diferente metodología utilizada y especialmente con el tipo de proteína usada como antígeno-blanco. La mayoría de la información sugiere que los anticuerpos E6 y E7 pueden ser considerados como marcadores de cáncer cervical y pueden reflejar el curso de la enfermedad (Rocha 1996).

6.8.3 Respuesta inmune al HPV durante la progresión del cáncer cervical

En general se acepta que la progresión de las lesiones inducidas por HPV al cáncer cervical involucran una serie de eventos continuos que finalmente producirán la transformación maligna de las células afectadas. Durante la infección temprana el DNA viral es mantenido extracromosomal, solo episomal estable. La selección de la transcripción viral así como de la expresión de los oncogenes virales esta controlada por la proteína moduladora E2. Desde el punto de vista inmunológico se observa una reacción leve local representada principalmente por la presencia de Ig A dirigida hacia varios antígenos de HPV, lo cual se ha comprobado en diferentes observaciones en pacientes con condiloma, los cuales no presentan anticuerpos séricos, así como también en las pacientes sanas quienes no presentan Ig A local.

En lesiones premalignas tempranas NIC 1-2, el tamaño de las lesiones que contiene virus activos crece progresivamente, trayendo como consecuencia aumento en el nivel de antígenos virales disponibles; en este tipo de lesión el DNA viral se mantiene en estado episomal, por lo que los oncogenes E6 y E7 son aún controlados por los productos de E2. Debido que la regulación de E6 y E7 es mediada por E2, existe una activa expresión de los productos del gen E2, esto permitiría que exista un incremento en la presencia de esta proteína y por lo tanto nivel alto de anticuerpos contra esta, y simultáneamente un bajo nivel de anticuerpos contra E6 y E7.

Diferentes estudios sobre E6 y E7 han encontrado anticuerpos en un 14% en NIC, comparados con un 35% en cáncer cervical, y aumentos progresivos de acuerdo al estadio del tumor, hasta alcanzar 60-100% en tumores avanzados. En este punto, durante el desarrollo natural de las lesiones premalignas, un gran número de factores de transformación celular y virales interactúan juntos para generar el tumor maligno, entre estos, la integración del DNA del HPV en el cromosoma del hospedero se ha puntualizado como esencial.

En la mayoría de las lesiones NIC 3 y en casi todos los carcinomas cervicales, los genomas virales están integrados al DNA celular, aunque en algunos casos las copias episomales coexisten con las formas integradas.

La integración invariablemente ocurre a nivel de los ORFs de E1 y E2, alterando estos genes, pero conservando intactos los ORFs de E6 y E7.

Una consecuencia probable de la integración del HPV, puede ser la pérdida de la represión de los oncogenes E6 y E7, permitiendo la sobreexpresión de sus productos transformantes. La integración debe ser también relevante para el desarrollo de los eventos inmunológicos. Si la expresión de los productos de E2 ha sido alterada, mientras que los de E6 y E7 han sido sobreexpresados, se esperaría observar una disminución del nivel de anticuerpos contra E2 y un incremento en la producción contra E6 y E7 en las lesiones malignas.

Diferentes marcadores inmunológicos virales relacionados con cánceres han probado su utilidad en su diagnóstico y seguimiento, por ejemplo anticuerpos IgA contra proteínas del virus Epstein Barr (EBV) en carcinoma nasofaríngeo.

En el cáncer cervical asociado a HPV, se ha propuesto que los anticuerpos contra las proteínas E6 y E7 fueran los marcadores de enfermedad, y que los anticuerpos contra las proteínas L1 y L2 pudieran funcionar como indicadores de HPV; Rocha en 1996 ha comprobado que la determinación de anticuerpos contra la proteína E2 en la población inglesa puede ser útil para valorar la progresión de lesiones premalignas a malignas.

6.9. Perspectivas en la biología molecular del cáncer cervical

La identificación y caracterización de alteraciones genéticas y moleculares en cánceres cervicales se ha iniciado. Se reconoce actualmente que los HPVs como el agente etiológico primario en la carcinogénesis cervical.

Se requieren estudios multidisciplinarios de la historia natural de las infecciones por HPVs, y de los factores que puedan influir en su persistencia y en la progresión de la enfermedad.

Considerando la gran cantidad de información que se genera de los diferentes estudios alrededor del mundo, se espera que en un futuro próximo se apliquen nuevas estrategias de tamizaje, detección masiva o "screening" para la prevención, el diagnóstico y terapéutica del cáncer cervical. El desarrollo próximo de vacunas tanto profilácticas como terapéuticas podrá contribuir al control tanto de la infección del HPV como del cáncer cervical (Villa 1997).

Capítulo II.

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..

La alta tasa de incidencia, morbilidad y mortalidad provocada por el cáncer cervical invasor en las mujeres mexicanas durante los últimos 30 años lo han convertido en un problema de Salud Pública, aunado a que su presentación afecta a mujeres adultas principalmente entre la cuarta y sexta década de la vida, su tasa de años de vida potencialmente perdidos en ellas es elevado, en dichas etapas cronológicas de la vida una buena proporción son económicamente activas y son el pilar social y afectivo fundamental de la familia; además tomando en consideración que cuando falla el tratamiento sus condiciones de sobrevivencia son deplorables, justifican el interés de su estudio.

Sin dejar de considerar el interés en los niveles clásicos de investigación clínica, epidemiológica y psicológica, el proyecto se orienta hacia la investigación básica aplicada.

Por la condición anatómica de fácil acceso a la exploración clínica y obtención de material celular del cérvix uterino, su estudio ha permitido identificar morfológicamente lesiones preinvasoras e invasoras del Ca Cu.

Con la obtención y distribución de diferentes líneas celulares tumorales desarrolladas a partir de los diversos cánceres cervicales, se han utilizado modelos celulares y moleculares reproducibles en los distintos laboratorios de investigación en todo el mundo, que sirven de control y/o referencia para estudios experimentales. El conocimiento de los mecanismos de control del ciclo celular y principalmente la identificación de la participación de los HPVs en la carcinogénesis cervical, ayudan a construir un panorama más preciso de los cambios moleculares permitiendo así, la construcción de explicaciones progresivamente más válidas sobre la Biología molecular del cáncer cervical y de sus precursores.

El poder sistematizar la fisiopatología celular/molecular de las diferentes clonas celulares que conforman un determinado carcinoma cervical nos permitirá obtener un nuevo paradigma cognoscitivo para establecer asociaciones entre los determinantes moleculares y su comportamiento biológico del huésped-parásito.

Diferentes estudios celulares y moleculares en cáncer cervical, como el índice de DNA, ploidías, índice de proliferación, trastornos cromosómicos, presencia y grado de traducción de oncogenes y genes supresores de tumor, calidad y tipos de productos génicos como los factores de crecimiento y sus receptores, componentes funcionales en la matrix extracelular y sus proteasas, ciclinas, oncogenes de HPVs relacionados con la inmortalización y la transformación celular, nos podrían facilitar entender los mecanismos de carcinogénesis, invasión local, diseminación ganglionar y hematogéna, falla a los tratamientos convencionales y asimismo establecer nuevas estrategias para su prevención, diagnóstico y tratamiento.

De manera particular hemos escogido para acercarnos a esta gran problemática, un modelo que implica el análisis de un grupo de pacientes con carcinoma epidermoide del cérvix clasificados en la etapa clínica I B, lesión inicial invasora maligna cuya caracterización celular /molecular de sus componentes es menos heterogénea que la existente en lesiones clínicamente más avanzadas, ya que en estas pacientes a pesar de que la lesión tumoral local es relativamente poco voluminosa, alrededor de 2-5 cm, el tratamiento convencional falla en un 10-20%.

Desde el punto de vista de estudios celulares/moleculares, seleccionamos la determinación de algunos indicadores terminales del control del ciclo celular: índice de DNA, tipo de ploidía e índice de proliferación, determinaciones que se realizarán mediante el uso de la citometría de flujo; y determinación de HPVs de alto riesgo tipos 16 y 18 como indicadores moleculares parciales, identificándolos mediante su amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa.

Analizando estos dos tipos de determinaciones celulares/moleculares en tumores de pacientes con Ca Cu E IB que respondieron exitosamente al tratamiento (Grupo 1) con pacientes similares que no respondieron exitosamente al tratamiento o presentaron recurrencia tumoral (Grupo 2), podríamos obtener asociaciones entre los 2 distintos comportamientos biológicos, intentando con esto mejorar el grado de estimación de pacientes con mayor riesgo a la recurrencia post tratamiento; para que, finalmente, de manera aplicativa prospectiva modificar las estrategias de tratamiento actual y/o seguimiento clínico de las pacientes con mayor riesgo a la recurrencia de acuerdo a estas determinaciones.

7.1.OBJETIVO GENERAL

Establecer la asociación entre las variables de cinética de proliferación celular y la integración del papilomavirus humano de alto riesgo al genoma celular en las células tumorales de las pacientes con Ca Cu tipo epidermoide E 1B, comparando el grupo de pacientes sin, y con recurrencia post tratamiento

7.2. HIPOTESIS GENERAL

La recurrencia tumoral de las pacientes con carcinoma cervicouterino tipo epidermoide E I B aumenta en más de 2 veces cuando su población celular tumoral presenta DI mayor de 1.4 y se detecta la presencia de HPV tipos 16 y 18 en su genoma celular

7.2.1. HIPOTESIS PARTICULARES

El riesgo de recurrencia tumoral mediata o tardía de los casos de pacientes con carcinoma cervicouterino en etapa clínica IB que recibieron tratamiento ortodoxo está aumentado por lo menos en dos veces cuando en la población celular tumoral índice de DNA es mayor de 1.4, y el índice de proliferación celular es de mayor de 0.5.

Los casos de pacientes con Ca Cu IB en quienes se detecta los HPV's tipos 16 y/o 18 integrados a su genoma celular cursan dos veces con mayor riesgo de recurrencia tumoral post tratamiento, comparativamente con los casos en donde otros tipos de HPV's se integraron a su genoma celular.

Capítulo III

8. MATERIAL Y METODOS

8.1 Tipo de estudio: Encuesta comparativa.

Muestra : Cortes de tejido incluidos en parafina de pacientes atendidas en el Hospital de Oncología del CMN SXXI I.M.S.S. entre los años 1980-1984 (con seguimiento clínico de 10 años)

Número total de muestras: 50

Obtención del tejido tumoral: producto de biopsia, de conización y/o histerectomía.

Variable independiente o de referencia:

RESPUESTA AL TRATAMIENTO ORTODOXO 2 GRUPOS:

1. pacientes controladas (curadas)
- 2a pacientes que presentaron recurrencia tumoral mediata (0 a 2 años)
- 2b pacientes que presentaron recurrencia tardía (local o con metástasis, entre 2 y 10 años post tratamiento)

VARIABLES dependientes o de análisis:

3 TIPOS: a) INDICE DE CANTIDAD DE DNA

b) INDICE DE PROLIFERACION CELULAR

c) PRESENCIA DE HPV DE ALTO RIESGO: 16 y 18

El análisis comparativo se estructurará mediante bloques

Número de muestras por grupo: 25 del grupo 1

15 del grupo 2a

10 del grupo 2b

Instituciones donde se realiza el estudio:

Hospital de Oncología CMN SXXI I.M.S.S. (Selección de pacientes y obtención del tejido tumoral incluido en parafina)

Laboratorio de Biología Celular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa UAM (Obtención de los núcleos celulares y realización de la citometría de flujo)

Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. (Obtención del DNA, identificación del HPV y caracterización de su genotipo)

8.1.1. Logística de selección de las muestras: Selección polietápica

a) Búsqueda y registro de los casos a partir del Archivo del Departamento de Anatomía Patológica, y Archivo clínico del Hospital de Oncología (HO)

Criterio de inclusión: Casos registrados con diagnóstico de Ca Cu E IB de los cuales se localizaron los bloques de tejido incluidos en parafina.

Criterio de exclusión: casos cuya cantidad de tejido tumoral (al ser descritos por el anatomopatólogo) fue menor a 0.8 x 0.8 x 0.8 cm.

b) Búsqueda de los expedientes y registro de la información del Archivo clínico del HO.

Criterio de inclusión: Verificación del diagnóstico de carcinoma cervical E IB

Criterio de exclusión: Los casos en los cuales no se encontró el expediente clínico, o con información incompleta.

c) Selección de los casos de acuerdo a los criterios de las etapas I y II.

Verificación de seguimiento clínico por lo menos de 5 años, se contó con el apoyo del Servicio de Trabajo Social para la localización de pacientes del grupo I (controladas o curadas)

d) Registro de las variables clínicas

1. estadio clínico de acuerdo a la FIGO

2. edad

3. tamaño aproximado del tumor

4. tratamiento realizado

5. tiempo y condiciones de su seguimiento:

e) Estudio histológico de los cortes de tejido (biopsias o piezas quirúrgicas), a través de la revisión actualizada por el anatomopatólogo

1. grado histológico
2. número y porcentaje de invasión ganglionar
3. extensión parametrial
4. profundidad de la invasión del estroma cervical
5. permeación vascular y linfática del tumor cervical
6. tipo de células
7. invasión al canal endocervical y estroma endometrial
8. tumor residual post histerectomía
9. imagen de coilocitosis
10. grado de desmoplasia
11. infiltración por eosinófilos
12. grado de pleomorfismo celular
13. índice mitótico

f). Estudios celulares y moleculares

1. Determinación de ploidía, fracción de células en la fase S o de síntesis de DNA en el ciclo celular, índice de DNA e índice de proliferación celular (fracciones celulares en fase S + fase G2/ M) determinados por citometría de flujo.
2. Presencia de HPV mediante PCR con "primers" consenso y electroforesis de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, y determinación de genotipos 16 y 18 mediante PCR con "primers" específicos .

g). Verificación de la representatividad de la muestra

Se realizó análisis histopatológico de las laminillas de cada uno de los casos, aquellos en los cuales el producto fue solo biopsia generalmente una, en los casos productos de conización, histerectomía o histerectomía radical, hasta 15-20 laminillas; de cada caso se seleccionó la laminilla o laminillas (2) en donde hubiera material representativo de carcinoma epidermoide en mayor o menor proporción. Una vez realizado esto, se localizó el bloque de tejido incluido en el cubo de parafina , se identificó el área del bloque que corresponde a la zona identificada en la laminilla, se secciona el sobrante , y finalmente de esta zona se obtuvieron rebanadas de tejido, y se registró el porcentaje proporcional de tejido tumoral con respecto al 100% de tejido rebanado. Asimismo con técnica similar se identificaron

laminillas y bloques correspondientes de tejido cervical adyacente no tumoral que servirían de muestras controles para considerarlas como poblaciones diploides
Se obtuvieron 5 rebanadas de 10 micras de tejido fijado por parafina por duplicado de cada caso.

8.2. Trabajo experimental.

8.2.1. Determinación de DNA-ploidías , índice de DNA, índice de proliferación celular por medio de citometría de flujo

La determinación se hizo de acuerdo a la técnica descrita por Nguyen* y col. 1993 y Hedley y col. 1989 y Becton Dickinson (1993)

8.2.1.1. Obtención y tinción de los núcleos tumorales

Se certifica la representatividad del tejido tumoral por el anatomopatólogo.

Se utilizan 5 rebanadas de tejido de 10 μm de espesor, obtenidas de bloques de parafina, se depositan en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

El tejido se desparafina con xileno por 20-30 minutos a 37°C , se requieren al menos 3 cambios , o repetir hasta que las secciones sean transparentes. La suspensión debe agitarse frecuentemente con vortex a media intensidad, al terminar cada cambio, la suspensión se centrifuga por 2 minutos a 10 000 revoluciones por minuto (rpm), y cuidadosamente se tira el sobrenadante, sin alterar la pastilla.

Se rehidrata exponiéndolo por 15 minutos a 100, 95, 70 y 50% de etanol a concentraciones descendentes. Se mantiene en temperatura de 37°C, la suspensión se agita frecuentemente con vortex a baja intensidad, se centrifuga y decanta el sobrenadante en las mismas condiciones anotadas.

Se lava con agua destilada en las mismas condiciones, y se deja toda la noche o 24 - 48 hrs. en agua destilada a temperatura ambiente. Al cabo de esto, se agita con vortex a mediana intensidad, se centrifuga, se decanta el agua y se resuspende la pastilla con buffer fosfato salino (PBS) 1 X. Se realiza disgregación enzimática, se incuba por 60 minutos la pastilla con 2 ml de pepsina al 0.5% (pH 1.5 ajustado con HCl), en baño a 37°C con agitación continua.

Se agita 10 minutos con vortex a alta velocidad y la suspensión celular se filtra a través de tela de tejido fino -organza- y se deposita en otro tubo de 12 x 75 mm. Se enjuaga el tubo original de la muestra con 2 ml de PBS, y se deposita este volumen filtrado en el tubo de falcon de 12 x 75 mm..

Las células son centrifugadas a 400 x g, y cuidadosamente se extrae el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Se resuspende cuidadosamente la pastilla celular en 1 ml de PBS, se agita con el vortex a mediana intensidad y se obtiene una alícuota de 20 μ l, a la que se agregan 40 μ l de PBS 1X y 40 μ l de colorante -eosina. Se realiza cuenta celular de esta suspensión mediante hemocitómetro utilizando microscopio de luz y una cámara de Neubauer.

Se prepara una suspensión de 500,000 células por ml. Si la concentración es mayor, se hace una proporción agregando PBS; debe quedar como volumen final 1 ml

Se centrifuga la pastilla a 400 x g por 5 minutos, se decanta cuidadosamente el sobrenadante hasta la última gota.

Se agrega a la pastilla celular, 250 μ l de tripsina en solución amortiguadora (Solución A del kit de Becton Dickinson) se mezcla suavemente por 10 minutos a temperatura ambiente.

Se agregan al tubo 200 μ l del inhibidor de tripsina y RNAasa en solución amortiguadora (Solución B de BD) mezclándola suavemente por 10 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente se agregan 200 μ l de yoduro de propidio en solución fría, entre 2 a 8°C (Solución C de BD) se mezcla suavemente y se incuba por 10 minutos en la oscuridad y en hielo o en refrigeración.

Se filtra la muestra a través de un malla de nylon de 35 μ m, y los núcleos filtrados en la suspensión se transfieren a un nuevo tubo de falcon 12 x 75 mm, asimismo a esta suspensión se le agrega 350 μ l de PBS, para obtener un volumen final de 1 ml.

Los núcleos teñidos se corren en el citómetro antes de 3 horas de añadirse la sol. C, conservándose en la oscuridad y a 2-4°C de temperatura.

8.2.1.2. Calibración del citómetro de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo FACScan TM Becton Dickinson Immunocytometry Systems equipado con láser de argón, con doble fotomultiplicador para emisiones de 520 y 630 nm.

El citómetro se calibra globalmente mediante el software AUTOCOMP, utilizando perlas de calibración de 2 μm de BD.

Para el análisis del ciclo celular de los núcleos obtenidos se emplea el software CellFit. Ahora el citómetro se calibra con núcleos de eritrocito de pollo (CEN) y con núcleos de timocitos de carnero (CTN) de Becton Dickinson, ambos teñidos con yoduro de propidio. Mediante la lectura de los CEN se verifica el CV.

Para leer CTN se utilizan los detectores FSC, SSC y FL2, mediante este último registrando en el eje horizontal FL2-W (width= ancho) y en eje vertical FLA-2 (área). Esto permite identificar en la impresión puntos o eventos en zonas limitadas, las cuales se eligen y se encierran manualmente en un rectángulo. El área de puntos alrededor del canal 200 de la escala, corresponde habitualmente a la zona de núcleos únicos, la cual es marcada y analizada para descartar dobletes, tripletes o conjuntos mayores de agrupamiento de núcleos. Una vez seleccionada, el área es analizada construyéndose el histograma de las distintas fases del ciclo celular de acuerdo a la cantidad de DNA nuclear. De manera específica se marca el pico más alto de la población en fase G1 y el pico correspondiente a la fase G2 (valor del canal aproximado al doble del correspondiente al pico de G1), se selecciona el modelo RFIT y se analiza, el software registra distribución porcentual de la población de CTN en las distintas fases del ciclo celular, la cual debe coincidir con la correspondiente marcada en el Kit de calibración de BD.

8.2.1.3. Calibración con la muestra control y lectura de las muestras de tejido tumoral

Para el análisis de los datos de las células tumorales, en cada sesión se obtiene un control interno mediante la lectura de núcleos de células similares no malignas de tejido adyacente al tumor; el valor del canal en G1, servirá como el valor del denominador al obtener el índice de DNA.

En la mayoría de los núcleos tumorales analizados el modelo matemático utilizado fue el SOBR, por coincidir con poblaciones con alto porcentaje de CV y poblaciones celulares con fase S elevada.

8.3. Detección de papilomavirus humano y caracterización de genotipos de alto riesgo en células de carcinoma cervicouterino

8.3.1. Obtención de DNA de células de carcinoma conservadas en parafina

(De acuerdo a las técnicas descritas por van Bommel y col. 1992 , Willis y col. 1992, Baver y col.1993, y Wright y Manos 1990.)

Se obtienen 5 rebanadas de 10 μm de grosor del bloque de parafina del tejido tumoral representativo, y se colocan en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Se desparafinan con n-octano, mezclando frecuentemente en vortex a baja intensidad por 20 minutos a 37°C ; se centrifuga en microfuga a 10 000 rpm por 8 minutos y cuidadosamente se decanta el sobrenadante, sin alterar la pastilla celular. Repetir este procedimiento por lo menos 3 veces.

Se repite el paso anterior de 2 a 5 veces utilizando ahora etanol al 100% en lugar de n-octano y nuevamente de 2 a 5 veces, ahora utilizando etanol al 70%.

Se escurre la última gota de alcohol, y se expone la pastilla al medio ambiente durante toda la noche para que se evapore totalmente el etanol al 70%.

La pastilla celular se somete a digestión completa mediante buffer de lisis a base de una solución de proteinasa K, tween y nonidet a pH 8, se agrega 200 μl de esta solución por 3 horas a 55°C o toda la noche a 37°C, debe mezclarse frecuentemente con vortex a mediana intensidad.

Después de esta incubación, se calientan los tubos a 95°C durante 10 minutos con la finalidad de inactivar la proteinasa K.

8.3.2. Purificación del DNA por extracción con fenol-cloroformo y su precipitación con etanol.

(De acuerdo a la técnica descrita por Maniatis y col. 1989)

Después de la inactivación de la proteinasa K, los restos celulares en solución se aforan a 350 μl con buffer de TE (Tris y EDTA).

Se agrega un volumen de fenol (350 μl) y se mezclan utilizando vortex a media intensidad por 5 minutos; se centrifuga con microfuga a 10 000 rpm durante 3

minutos y se extrae la fase acuosa superior que se transfiere a un nuevo tubo; el volumen de la fase acuosa se afora a 350 μ l, si fuera necesario, y se agrega medio volumen de fenol, (175 μ l) y medio volumen de cloroformo-alcohol isoamílico, se repite el paso anterior.

Al nuevo volumen de la fase acuosa se le agrega cloroformo-alcohol isoamílico y se vuelve a repetir el paso anterior.

El DNA es recuperado por precipitación en alcohol: el volumen obtenido de la fase superior se afora a 300 μ l con buffer de TE, se colocan 15 μ l de NaCl 4 M y dos volúmenes y medio de etanol al 100%, se mezclan suavemente y se colocan los tubos verticalmente a temperatura de -70°C por 30 minutos. El DNA se recupera mediante la centrifugación con microfuga a 10 000 rpm por 10 minutos y se decanta con mucho cuidado el sobrenadante.

A la pastilla de DNA se le colocan 750 μ l de etanol al 70%. que se mezclan suavemente, utilizando vortex a baja intensidad, se centrifuga por 5 minutos y se decanta el sobrenadante. Estos lavados son con la intención de eliminar el NaCl, y se repite en 3 ocasiones. Se elimina la última gota de etanol, se deja secar unos minutos, y finalmente la pastilla se resuspende en 100 μ l de buffer de TE.

8.3.3. Medición de la concentración de DNA extraído

Se utiliza el espectrofotómetro BECKMAN DU-600, realizando la lectura a 260 nm de longitud de onda.; en varias muestras asimismo se registraron gráficas de "scan", con intervalos de longitud de onda de 220 a 320 nm, para determinar la proporción de DNA/proteínas y la contaminación de fenol por la muestra.

Se utiliza 20 como factor de dilución, es decir de la suspensión final de 100 μ l, se tomó una alícuota de 5 μ l y se aforaron a 100 μ l con buffer de TE.

De acuerdo a la medición de la concentración del DNA en el buffer de TE, se determinan el volumen en μ l que equivalen a 200 ng de DNA, para ser utilizada en la PCR.

8.3.4. PCR con "primers" degenerados MY11/MY09, y GP5/GP6 para la detección de HPVs.

(De acuerdo a Ting y col. 1990, Manos y col. 1989 y Husman y col. 1995).

Reactivos para preparar la mezcla de PCR con volumen final de 20 μ l, distribución de volumen para un tubo:

Buffer de PCR 10 X	2	μ l
dNTP 10 mM.....	2	"
MgCl ₂ 3 mM.....	2.4	"
MY11 50pM.....	0.4	"
MY09 50pM.....	0.4	"
Taq Pol 1 unidad.....	0.2	"
Agua bidest. necesaria para aforar a 10.....	2.6	"

A este volumen de 10 μ l se agrega otro volumen de 10 μ l constituido por 200 ng. de DNA que correspondió a volúmenes entre 0.5 y 10 μ l; cuando el volumen es menor a 10 μ l se afora con agua bidestilada.

A cada serie de reacciones, generalmente en número de 12 muestras, se agregan 2 reacciones mas correspondientes al control negativo (agua en lugar de DNA) y al control positivo (200 ng de DNA de células HeLa).

Las mismas concentraciones fueron utilizadas para realizar la mezcla de la PCR con los "primers" GP5, GP6; la única diferencia fue que se utiliza menor cantidad de MgCl₂ al 3 mM, de 2.4 μ l a 1.6 μ l, con la correspondiente compensación de volumen de agua bidestilada.

Para valorar la calidad o integridad del DNA obtenido de las muestras donde no se presenta amplificación del HPV mediante ambos "primers", se utilizan 2 tipos de "primers" que amplifican a fracciones de genes universalmente presentes en todas las células: ras y beta globina. Para ras se utilizaron los "primers" Kras A y Kras B, y para beta globina los "primers" HP20 y GH20; ambos en condiciones semejantes de volúmenes y concentraciones de los de GP5 y GP6.

De manera ocasional la integridad del DNA de las muestras de tejido tumoral se comparó con la integridad del DNA del bacteriófago lambda.

Los 20 μ l de la mezcla de PCR para amplificar HPV (10 μ l de mix) y el DNA de las células de Ca Cu (10 μ l, equivalente a 200 -400 ng de DNA, en volumen aforado) se colocaron en tubos eppendorfs para 100 μ l, utilizándose el termoamplificador GeneAmp PCR System 2400 o 9600 de Perkin Elmer.

Los ciclos de amplificación correspondieron a temperatura de desnaturalización de 95° C por 30 segundos, temperatura de alineamiento (MYs y beta globina de 55° C, GPs de 43° C, y ras de 58 °C) por 30 segundos y temperatura de extensión a 72.°C por un minuto. El número total de ciclos correspondió a 35.

El programa integral en el termociclador fue:

- 1o. fase: a 95 °C por 5 minutos
- 2o. fase: los 35 ciclos anotados
- 3o. fase: un ciclo a 95 °C por un minuto, temperatura de alineamiento específico por un minuto, y 72 °C por 5 minutos
- 4o fase: conservar a 4 °C en las siguientes horas.

8.3.5 Identificación del HPV del producto del amplificado de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

(De acuerdo la técnica descrita por Maniatis y col. 1989)

Se prepara el gel de agarosa, colocándose 2 g de agarosa en 100 ml de buffer de TBE al 0.5%, se calienta a 100 °C para fundirse y entonces se agrega 4 μ l bromuro de etidio de una solución de 10 mg/ml. Se vacía el gel en el contenedor de la cámara de electroforesis, se coloca el peine que sirve de molde a los pocitos, los cuales deben quedar cerca del borde eléctrico negativo. La cámara de electroforesis se llena de buffer TBE al 0.5% y se conecta a la fuente de poder. En cada pocito se colocan 6 μ l del amplificado del producto de PCR que se mezclan con 2 μ l de jugo azul - glicerol al 50% + azul de bromofenolal 0.1% y xilencianol al 0.1%. Se verifica que además de las muestras y sus controles, se coloque de la misma manera el marcador de pesos moleculares empleando solo 1 μ l mas el correspondiente jugo azul; todo esto se realiza con la placa de agarosa cubierta por el buffer.

Se corre la electroforesis con los siguientes estándares de la fuente: voltaje 100 volts, miliamperaje mínimo y wattaje mínimo, generalmente 45 minutos (el tiempo promedio requerido). El desplazamiento del DNA se observa de manera indirecta a través de bandas azules.

Terminado el corrimiento las bandas del DNA de interés se identifican llevando la placa de gel al transiluminador de luz ultravioleta; y generalmente se fotografía.

Los amplificados de MYs corresponden a 450 pb, los de GPs a 140 pb, los de Kras a 128 pb, y los de beta globina a 260 pb. En uno de los carriles de corrimiento de la electroforesis se coloca el marcador de pesos moleculares, cuyas bandas con pesos conocidos se utilizan comparativamente para identificar los productos amplificados tanto de la muestra control como de las muestras en estudio.

8.3.6 PCR con “primers” específicos para la identificación de HPV 16 y 18

(De acuerdo a lo descrito por Manos y col. 1989.)

De manera similar a lo descrito en la sección 8.3.4 se amplifican fragmentos de 320 pb para el HPV tipo 18 y de 360 pb para el tipo 16 de la región larga de control (LCR), mediante “primers” específicos: LCR 18a / LCR 18b, y LCR 16a / LCR 16b, las condiciones de termoamplificación son similares, siendo la única diferencia que la temperatura de alineamiento es de 54 °C para estos “primers”

8.4 Análisis estadístico

Utilizando el paquete SPSS versión 6.1.2, se realiza el análisis estadístico como el utilizado por Burger y col. 1996.

La asociación de la edad, estadio clínico, grado de diferenciación, índice de DNA, índice de proliferación, y tipos de HPV son evaluados mediante el uso de la prueba de Ji cuadrada, su ajuste se realiza por múltiples comparaciones por el método de Bonferroni. La asociación entre variables como tipos de HPV, el DI, el índice de proliferación y otras variables clinicopatológicas por medio del modelo de regresión logística. Las curvas de seguimiento son analizadas por el método de Kaplan-Meier, usándose la prueba de logrank de 2 colas. Mediante el uso del modelo de Cox de riesgos proporcionales se realiza el análisis multivariado para determinar el impacto

independiente en el tiempo de recurrencia del tipo de HPV , del DI, y del índice de proliferación celular y de ambas variables clinicopatológicas.

Para todas las pruebas estadísticas, el nivel de significancia es fijado en 0.05.

Capítulo IV.

9. RESULTADOS

Bajo una búsqueda intensiva de los casos, y de acuerdo a los criterios de inclusión (sección 8.1.1.), fueron seleccionados 54 casos para estudio; 25 de ellos correspondieron a pacientes controladas por el tratamiento, 7 de ellos a pacientes que presentaron recurrencia tumoral mediata y los 11 restantes presentaron recurrencia tumoral tardía. En 11 casos con información incompleta, por no haberse determinado la presencia y el tipo de HPV en ellos debido a que el DNA del tejido tumoral se encontraba mal conservado (sección 5.3.), de ellos 6 correspondieron a pacientes controladas por el tratamiento y 5 a casos de pacientes que presentaron recurrencia tumoral post tratamiento.

De 25 casos planeados de pacientes con Ca Cu IB tratadas que tuvieron recurrencia tumoral hubo dificultad no superable, y solo se encontraron 11 ; este obstáculo se resolvió incluyendo en este grupo 13 pacientes en estadios clínicos inmediatos progresivos; del estadio IIA se incluyó un caso y del estadio clínico II B se incluyeron 11 casos.

Asimismo es importante mencionar que en un 83% de los casos de pacientes que presentaron recurrencia tumoral posterior al tratamiento, las muestras de tejido tumoral que se encontraron para las determinaciones de presencia y genotipo de HPVs así como DI e índice de proliferación fueron producto de biopsia post tratamiento, tanto de la recurrencia tumoral pélvica (13%) , como del tejido de la metástasis del carcinoma cervical (70%: óseo, pulmonar, ganglionar).

De acuerdo a lo planeado en la sección 6.2.1, el registro de diferentes variables clínicas y anatomopatológicas tuvieron algunas limitantes.

La edad promedio del conjunto de pacientes fue de 48.2 años, con un intervalo de 30 a 68 años.

En cuanto al tamaño clínico del tumor, en la mayoría de los expedientes de pacientes con Ca Cu estadio IB no se registró; en uno de los casos en el cual el tumor midió 5 cm., esta paciente presentó recurrencia tumoral posterior al tratamiento. De manera indirecta conocemos el tamaño del tumor a través de la variable histopatológica-medición de la profundidad de invasión tumoral al estroma cervical (véase mas adelante).

Los diferentes esquemas terapéuticos correspondieron a: histerectomía radical 35.1% (sección 1.6.3.2.), radioterapia 42.6%, histerectomía radical mas radioterapia 13% e histerectomía simple mas radioterapia 9.3% (casos con diagnóstico de Ca Cu etapa clínica I B oculto).

El seguimiento clínico de la mayoría de las pacientes fue por 10 años.

En los 54 casos analizados, los tipos de especímenes anatomopatológicos fueron diversos: el 48.1% de los casos fueron productos de cirugía radical, el 9.3% productos de histerectomía simple, el 9.3% productos de conización cervical, el 27.7% producto de resección del tejido metastásico, y el 5.5% de productos de biopsia incisional con pinza cortante de la recurrencia tumoral pélvica. Por esta gran variación de muestras de tejidos tumorales, solamente se lograron analizar en conjunto las siguientes variables histopatológicas: grado histológico, permeación vascular y linfática, tipo de célula, imagen de coilocitosis, grados de desmoplasia y pleomorfismo e índice mitótico.

El grado de diferenciación predominante fue el moderadamente diferenciado (células grandes no queratinizadas) con 72%, seguido de bien diferenciado (células grandes queratinizadas) con 14%, el grado poco diferenciado (células pequeñas) fue mínimo.

En las pacientes a quienes se les realizó histerectomía radical, en el producto de la linfadenectomía se encontraron ganglios positivos tumorales en el 12 % y extensión parametrial en 18%.

El promedio de la medición de invasión tumoral al estroma cervical en el conjunto de pacientes que se les realizó histerectomía fue de 9.56 mm., con desviación estandar de 4.6 mm.; se identificó permeación vascular y linfática en 88.6%, determinándose como intensa en el 13% de los casos. En todos los casos se identificó infiltración tumoral al canal endocervical y sólo en uno de todos los casos, infiltración al endometrio. Asimismo se determinó coilocitosis de alto riesgo en 75% de los casos.

En todas las lesiones tumorales se identificó desmoplasia, eosinofilia y pleomorfismo, cada una de ellas en diferentes proporciones: desmoplasia leve 42%, moderada 30.8% e intensa 27%; eosinofilia leve 23%, moderada 34.6% e intensa 42.3%; pleomorfismo leve 23%, moderado 36.6% e intenso 42.4%. El índice mitótico correspondió a leve 7.6%, moderado 27% e intenso 65.4%.

El DI promedio fue de 1.038 con desviación estándar de 0.145, la población porcentual promedio de células en fase G1 del ciclo celular fue 44.4% con desviación estándar de 16.36%, y el promedio del índice de proliferación fue de 54.6% (S + G2/M), con desviación estándar de 17% , el CV promedio fue de 9.77, con desviación estándar de 6.02. Los valores promedio de la población celular control o adyacente no tumoral fueron analizados con el modelo RFIT, tuvieron un coeficiente de variación de 7 y las poblaciones celulares en fase G0/ G1 fueron de 80%, en fase S de 17.8% y en fases G2 + M de 0.2% (Figura 13), a través de seleccionar la zona de registro de eventos marcando una zona rectangular con base estrecha alrededor del canal 200 (Figura 14). La mayoría de las poblaciones celulares estudiadas tuvieron proporciones celulares altas en fase S, por lo que de acuerdo a las recomendaciones de Becton Dickinson (sección 3) fueron analizadas con el modelo matemático SOBR. En las figuras 15 y 16 se muestra el análisis citométrico de 2 casos con el modelo SOBR, y en las figuras 17 y 18 se analizan 2 diferentes casos tanto con el modelo POLY como con el modelo RFIT

Se detectó la presencia de HPV en el 89.1% de casos de la serie, del cien por ciento de las pacientes con HPV se identificaron el tipo 16 con 31.7%, el tipo 18 con 22%, y el resto de otros genotipos (sección 5.4) con el 46.3%. Como control y estandarización de la PCR para la amplificación de los HPVs con los "primers" consenso MYs y específicos LCR 18, se utilizaron diferentes concentraciones de DNA de células HeLa (HPV 18, con aproximadamente 50 copias por célula).

La estandarización del DNA amplificado para visualizar la bandas en el gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio se llevó a cabo utilizando diferentes concentraciones conocidas de DNA de células HeLa tanto para los "primers" consenso Mys (Figura 19), como para los "primers" específicos LCR 18 (Figura 20). La identificación de la presencia de HPVs en las muestras de tejido tumoral incluidas en parafina se realizó mediante el uso de los "primers" consenso MYs con bandas de 450 pb (Figuras 21 y 22) y con "primers" consenso GPs con bandas de 140 pb (Figura 23).

La caracterización de los HPVs tipos 16 y 18 para las muestras positivas a la presencia de HPVs, se realizó mediante PCR con "primers" específicos, LCR 16 con control de DNA de células tumorales SiHa (HPV 16, con una copia por célula) (Figura 24), y con los "primers" específicos LCR 18 con control positivo de DNA de células tumorales HeLa (Figura 25).

9.1. Resultados comparativos entre casos de pacientes con Ca Cu controlados con el tratamiento y en quienes presentaron recurrencia tumoral

La edad promedio de las pacientes sin recurrencia tumoral fue de 43.68 años con desviación estandar de 9.39 años, mientras que la correspondiente al grupo que presentó recurrencia fue de 53.13 años con desviación estándar de 11.74 años, la diferencia de edad tuvo valor de p de 0.32; el resto de variables clínicas no fueron comparables, por información incompleta.

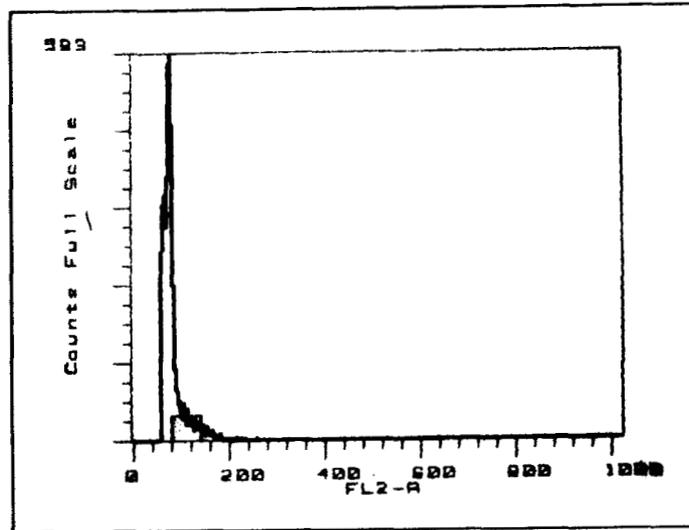
El análisis estadístico comparativo de cada una de las variables histopatológicas tampoco fue comparable, por la heterogeneidad del tipo de muestra.

La comparación de los valores promedios del DI entre ambos grupos mediante Ji cuadrada demostró diferencia con p de 0.015 ; y entre los valores promedios del índice de proliferación no hubo diferencia (Cuadro 8)

Al comparar la presencia de los HPVs tipos 16 y 18 con otros tipos, su presencia es significativa con valor de p de 0.04 en relación al seguimiento clínico de las pacientes con recurrencia tumoral (Cuadro 9); también es significativa en relación a los casos con valores de DI mayores de 1.05, con p de 0.04 (Cuadro 10); y no se presenta significancia cuando se compara con grupos de edades de menor y mayor de 45 años o con el grado de diferenciación del Ca Cu.

9.2. Asociación significativa entre variables

Mediante modelos de regresión logística se identificó asociación entre los valores de DI mayores de 1.05 y la detección de HPVs 16 y 18 con un valor de p de 0.036 , obteniéndose un gráfica de asociación demostrativa (Figura 26)



Datos:	Parámetros calculados	Estadísticas de la población en ciclo celular
Población celular: control	Pico de G1 79	Fase G1 82.2%
Fecha de prep: 03-05-96	Pico de G2+M 140	Fase S 17.7%
Modelo utilizado: RFIT	G1 CV 8.9	Fase G2+M 0.1%
No. de eventos: 13547		

Figura 13. Histograma y valores de la población celular control o adyacente no tumoral del cérvix uterino (tejido conservado en parafina contemporaneo a las muestras tumorales estudiadas).

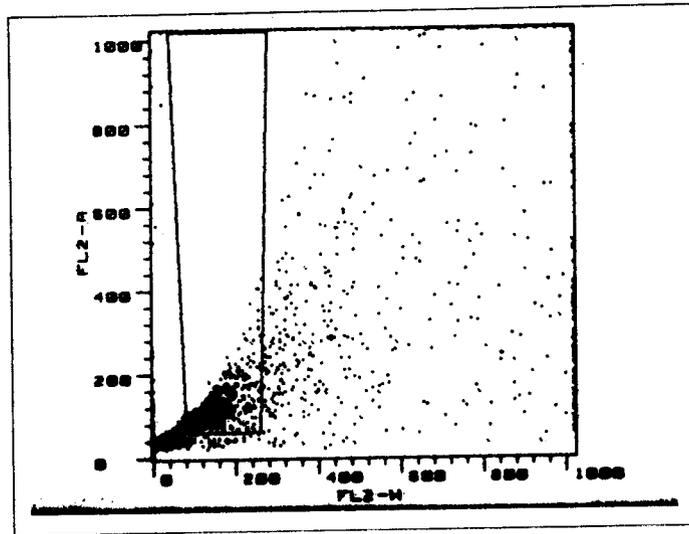
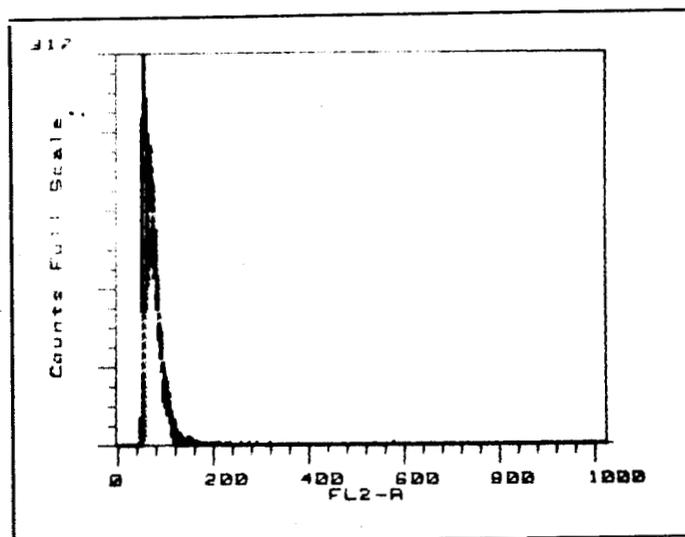


Figura 14. Para poder obtener el análisis de poblaciones celulares uninucleares de todo el conjunto, se selecciona una zona rectangular de base estrecha alrededor del canal 200, como se muestra en la fotografía. El perfil de ésta área permanece constante como control durante la sesión del mismo día de análisis de las poblaciones tumorales.



Datos:

Población tumoral:
 CaCu
 Fecha de prep: 28-08-96
 Modelo utilizado: SOBR
 No. de eventos: 8443

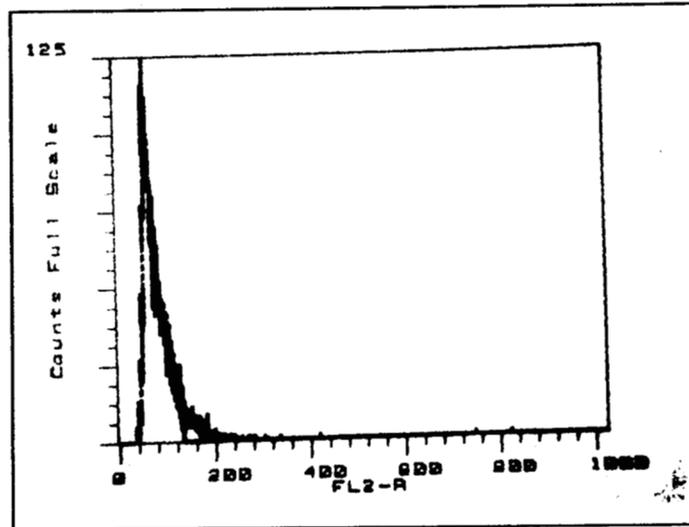
Parámetros calculados	Inicial Final	
	Pico de G1	56
Pico de G2+M	101	97.4
G1 CV	17	9.4

Estadísticas de la población en ciclo celular

Fase G1	18.9%
Fase S	61.0%
Fase G2+M	20.1%

Indice de DNA=1.2

Figura 15. Análisis citométrico del caso 85-4637



Datos:

Población tumoral:
CaCu
Fecha de prep: 14-11-96
Modelo utilizado: SOBR
No. de eventos: 4654

Parámetros calculados

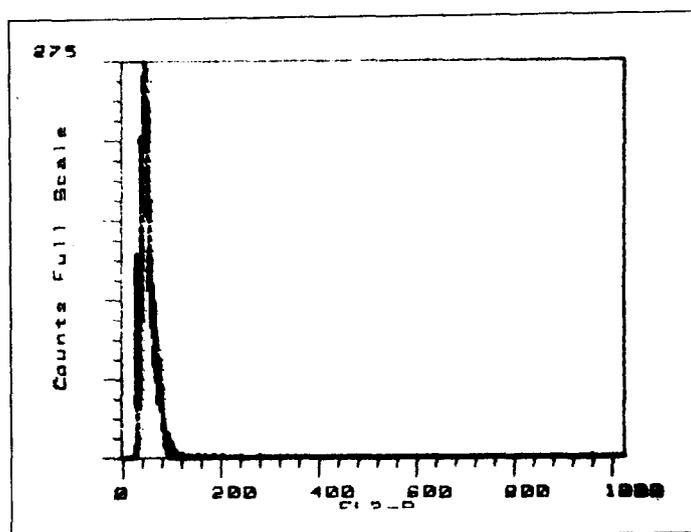
	Inicial	Final
Pico de G1	58	60.7
Pico de G2+M	82	104.0
G1 CV	14.7	13.6

Estadísticas de la población en ciclo celular

Fase G1	55.0%
Fase S	23.2%
Fase G2+M	21.9%

Indice de DNA=1.1

Figura 16. Análisis citométrico del caso 91-4981



Datos:

Parámetros calculados

Estadísticas de la población en ciclo celular

Población tumoral:

Población 1

CaCu

Fase G1 42.6%

Fecha de prep: 13-09-96

Pico de G1 42.2

Fase S 22.9%

Modelo utilizado: POLY

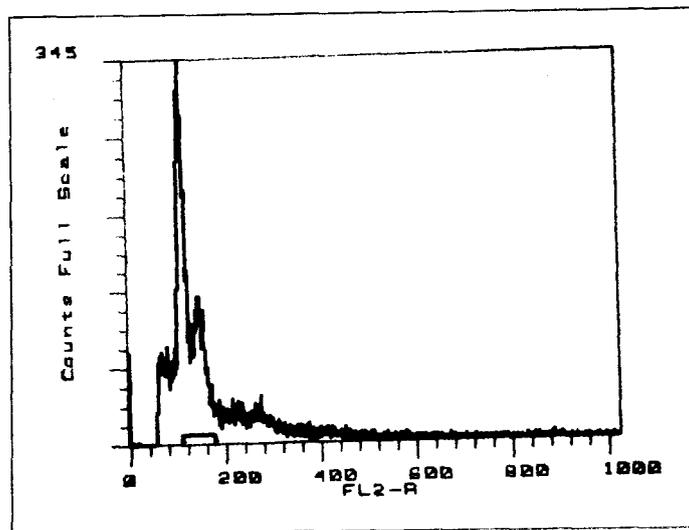
Fase G2+M 34.1%

No. de eventos: 7190

G1 CV 15.5

Indice de DNA=1.0

Figura 17: Análisis citométrico del caso 83-3597



Datos:

Población tumoral:
 CaCu
 Fecha de prep: 03-05-96
 Modelo utilizado: RFIT
 No. de eventos: 20000

Parámetros calculados

Pico de G1 109
 Pico de G2+M 175
 G1 CV 7.3

Estadísticas de la población en ciclo celular

Fase G1 71.5%
 Fase S 8.0%
 Fase G2+M 20.6%

Indice de DNA=1.1

Figura 18. Análisis citométrico del caso 81-2689

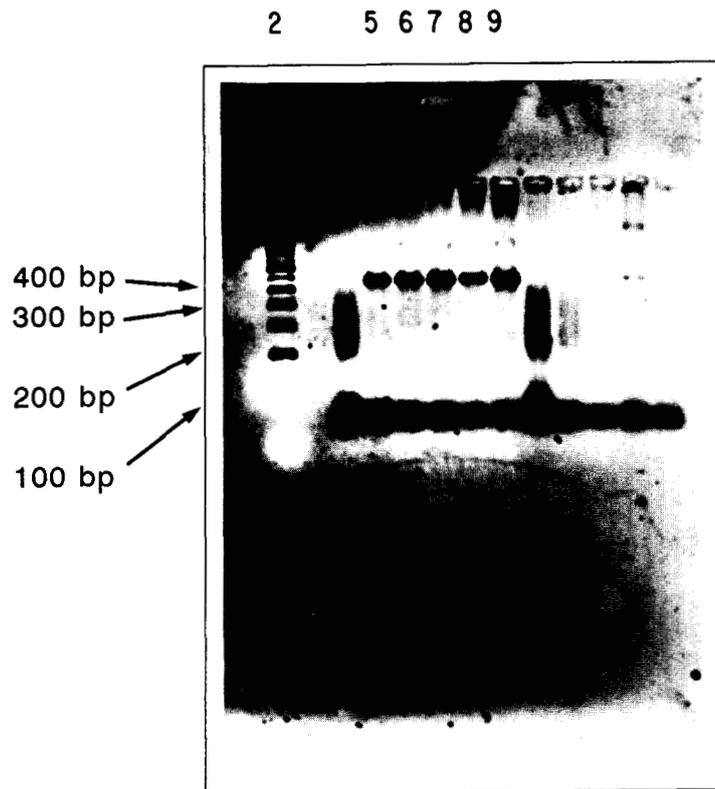


Figura 19. Estandarización de la PCR - MYs con DNA de células HeLa utilizando diferentes concentraciones. En el carril 2 se colocó el marcador de pesos moleculares; en los carriles 5,6,7,8 y 9 las respectivas concentraciones de DNA fueron de 25, 50, 100, 200, 400 ng/ μ l.

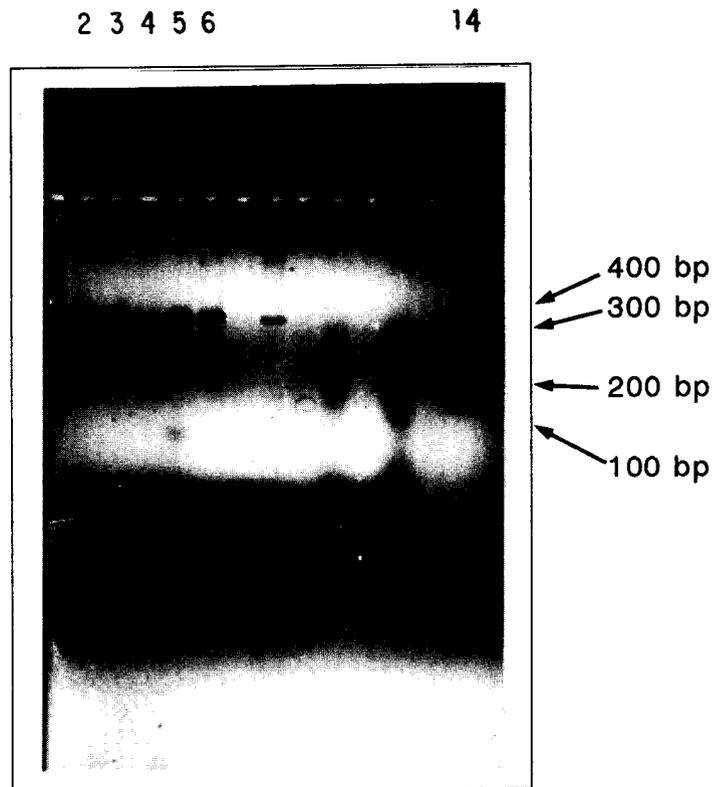


Figura 20. Estandarización de la PCR - LCR18 con DNA de células Hela utilizando diferentes concentraciones.

En el carril 14 se colocó el marcador de pesos moleculares; en los carriles 6,5,4,3,2 las respectivas concentraciones de DNA fueron de 12.5, 25, 50, 100, y 200 ng/ μ l.

En el carril 8 se colocó DNA de una muestra de tejido en fresco de CaCu.

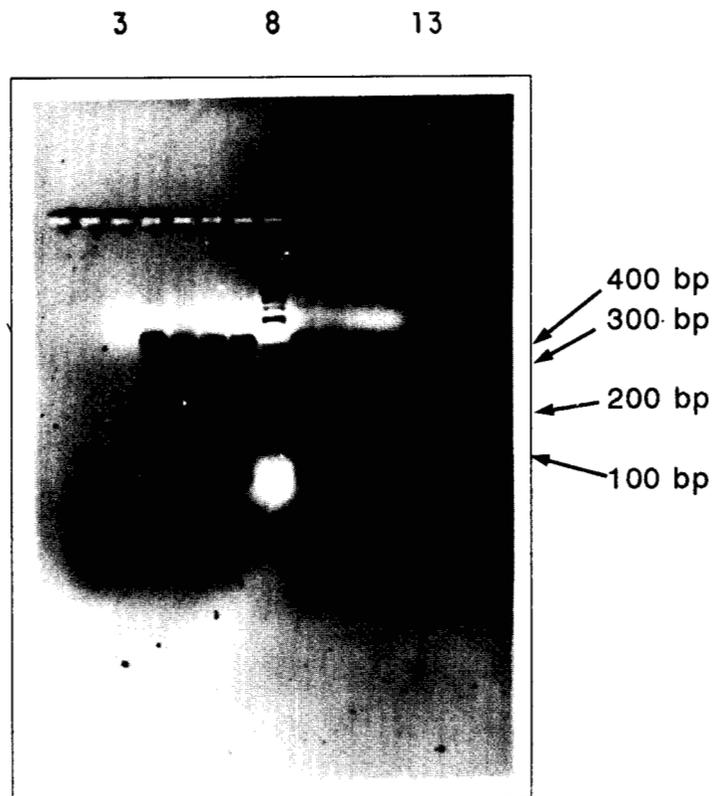


Figura 21. Electroforesis del amplificado de PCR - MYs de tejido tumoral incluido en parafina.
Bandas de 450 bp.
En el carril 8 se colocó el marcador de pesos moleculares.
En el carril 3 fue el control negativo, en el carril 13, el control positivo con DNA de células HeLa.
Todas las 8 muestras de esta serie fueron positivas para HPV.

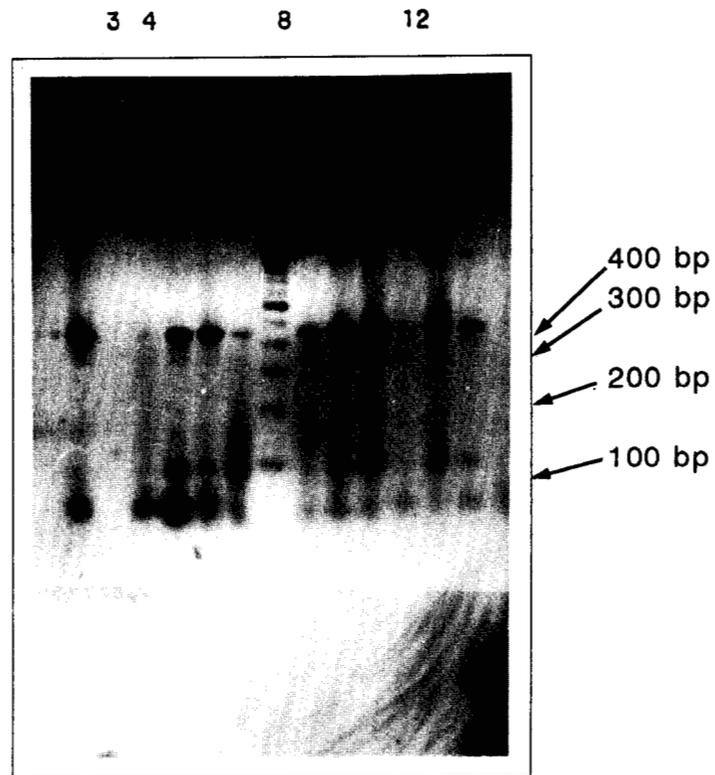


Figura 22. Electroforesis del amplificado de PCR - MYs de tejido tumoral incluido en parafina.
 Bandas de 450 bp.
 En el carril 8 se colocó el marcador de pesos moleculares.
 En el carril 3 fue el control negativo, en el carril 12, el control positivo con DNA de células HeLa.
 Todas las muestras de esta serie fueron positivas para HPV a excepción de los carriles 4 y 12.

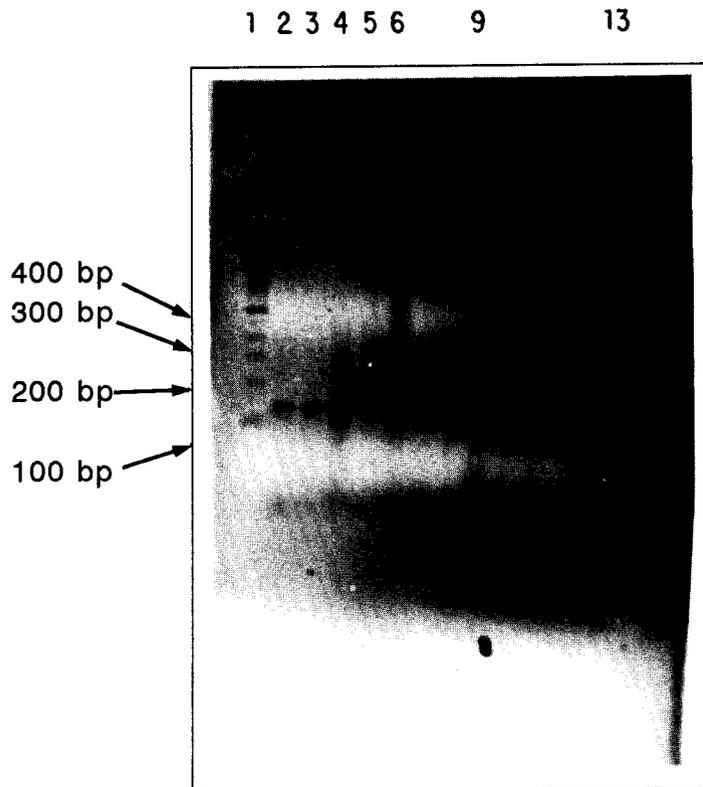


Figura 23. Electroforesis del amplificado de PCR - GPs de tejido tumoral incluido en parafina.

Bandas de 140 bp.

En el carril 1 se colocó el marcador de pesos moleculares.

En el carril 13 fue el control negativo, en el carril 14, el control positivo con DNA de células HeLa.

Las muestras de los carriles 2,3,4, 5,6,9 fueron positivas para HPV.

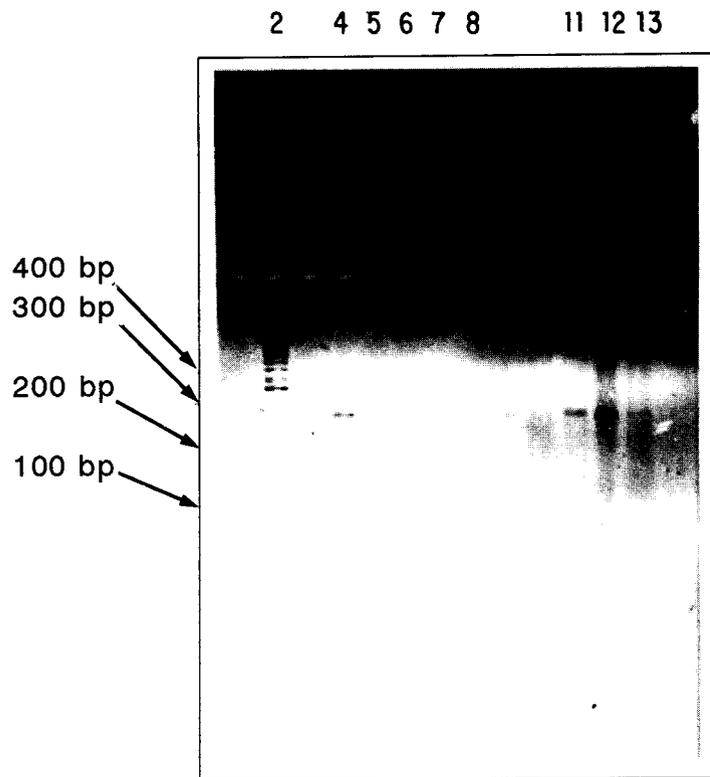


Figura 24. Electroforesis del amplificado de PCR - LCR16 de tejido tumoral incluido en parafina.
 Bandas de 360 bp.
 Se utilizó el DNA de células SiHa como control positivo.
 En el carril 2 se colocó el marcador de pesos moleculares. En el carril 3 fue el control negativo, en el carril 12, el control positivo.
 Las muestras de los carriles 4,5,6,7,8,11 y 13 fueron positivas para HPV16.

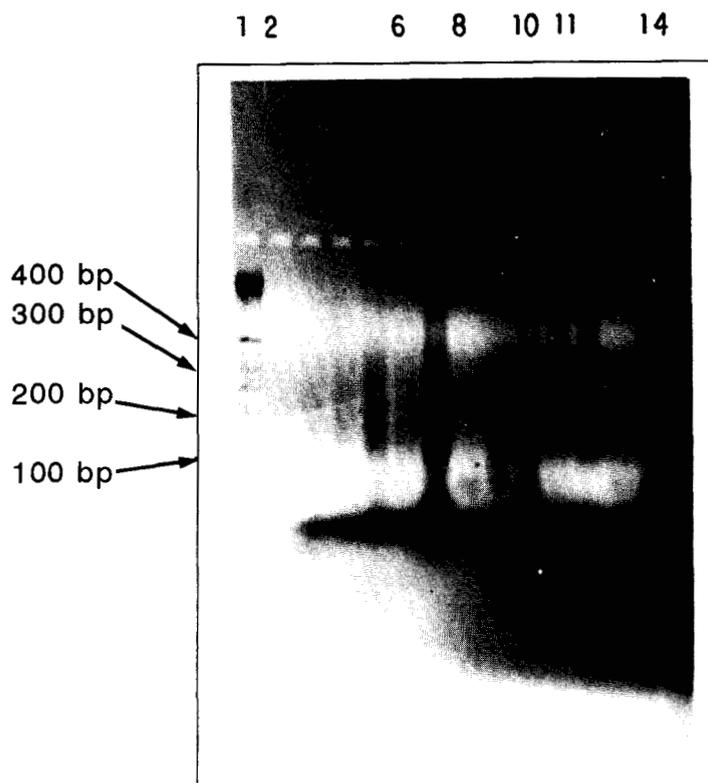


Figura 25. Electroforesis del amplificado de PCR - LCR18 de tejido tumoral incluido en parafina.

Bandas de 320 bp.

Se utilizó el DNA de células HeLa como control positivo.

En el carril 1 se colocó el marcador de pesos moleculares. En el carril 2 fue el control negativo, en el carril 14, el control positivo.

Las muestras de los carriles 6,8,10 y 11 fueron positivas para HPV18.

DI, índice de proliferación en pacientes con Ca Cu IB epidermoide

Respuesta al tratamiento	Indice de DNA	Indice de proliferación
Sin recurrencia	0.98	0.52
Con recurrencia	1.11	0.56
	p= .01	p= .09

Cuadro 8. Valores promedios de DI e IP celular analizados con Ji cuadrada

DETERMINACION DE HPV's DE ALTO RIESGO EN PACIENTES CON CACU IB EPIDERMÓIDE

Respuesta al tratamiento	HPV 16	HPV 18	Otros HPV	HPV neg.
Sin recurrencia	4	3	18	2
Con recurrencia	7	5	0	3
	p= .04	p= .04		

Cuadro 9. Análisis estadístico mediante Ji cuadrada

Asociación de HPVs de alto riesgo con DI en pacientes con Ca Cu IB epidermoide

Indice de DNA	HPV 16	HPV 18	Otros HPVs	HPV neg.
≤ 0.95	2	2	8	
0.96- 1.04	3	3	5	
≥ 1.05	5	3	5	5

Cuadro 10. Distribución de tipos de HPV en relación a los valores de DI

RESIDUALES ESTANDARIZADOS

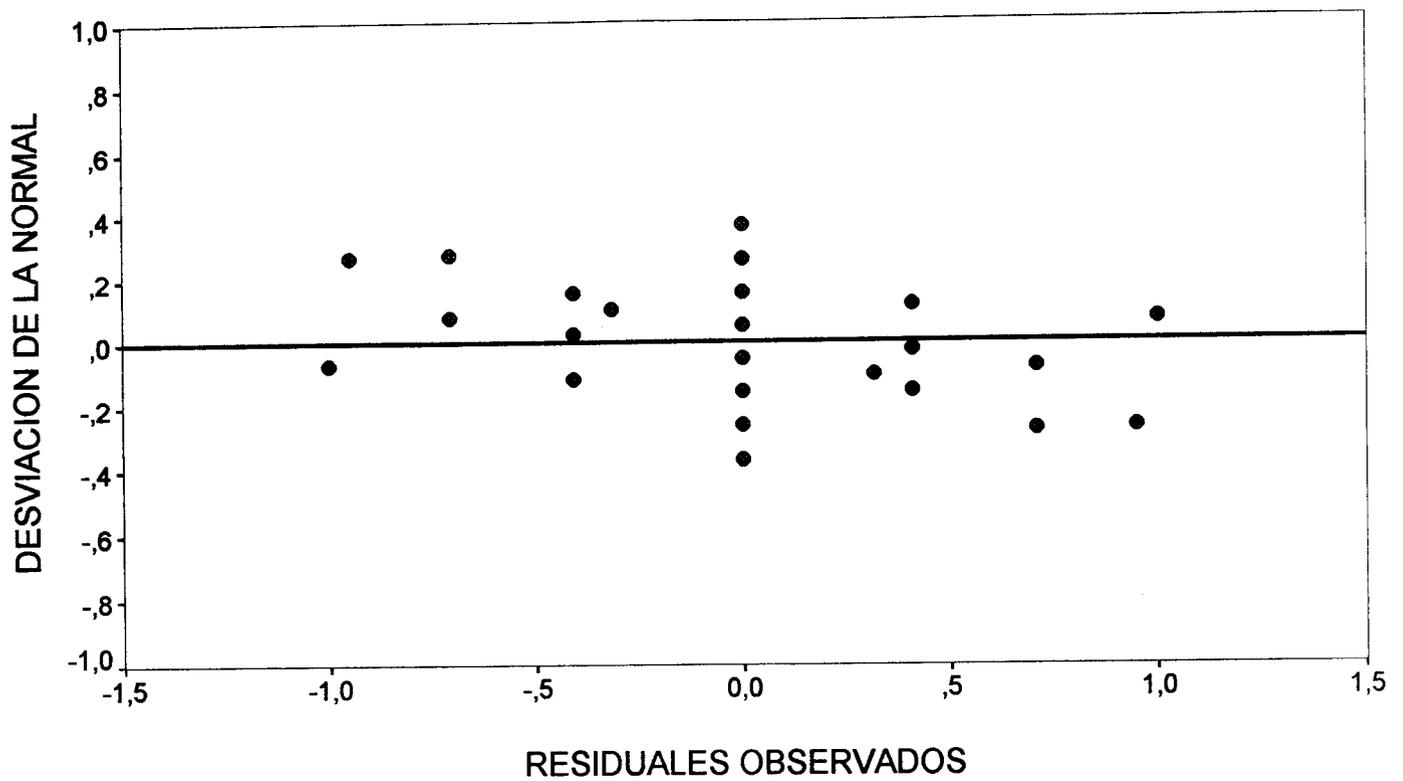


Figura 26. Gráfica de asociación entre los casos con DI mayor de 1.05 y la presencia de HPV's tipos 16 y 18.

9.3 Asociación de las variables con las curvas de sobrevida

Mediante el método de Kaplan-Meier, y la prueba de logrank de 2 colas se determinó p de 0.035 en los casos con valor de DI mayor de 1.04 comparandolos con valores de DI menores (Figura 27), de igual forma p de 0.0054 al comparar los HPVs tipo 16 y 18 con la presencia de otros tipos de HPVs en cuanto al tiempo de recurrencia tumoral (Figura 28).

9.4 Análisis multivariable con los tiempos de sobrevida

Mediante el modelo riesgos proporcionales o de regresión de Cox (Cuadro 11) se encontro que los pacientes con DI mayor de 1.04 y los pacientes con HPV 16 y HPV 18 tienen riesgo mayor para la recurrencia tumoral

El riesgo relativo estimado de recurrir para los pacientes con DI mayor de 1.04 es de 1.97 veces mas alto que para los pacientes con valor de DI menor a 1.04; y los pacientes con HPVs tipos 16 y 18 tienen un riesgo mayor de recurrir de 3.61 veces en comparación con los que tienen otros tipos (Cuadro 11).

Los errores estándar de los coeficientes de regresión no son muy pequeños, debido posiblemente al pequeño número de la muestra.

Si se consideran los dos factores simultáneamente, el riesgo relativo de recurrir para un paciente que tiene un índice de DNA mayor de 1.04 y se le determina los HPVs tipos 16 o 18, es de 7.15 veces mas alto, comparado con los que tienen otros HPVs y un DI menor a 1.04.

SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECURRENCIA

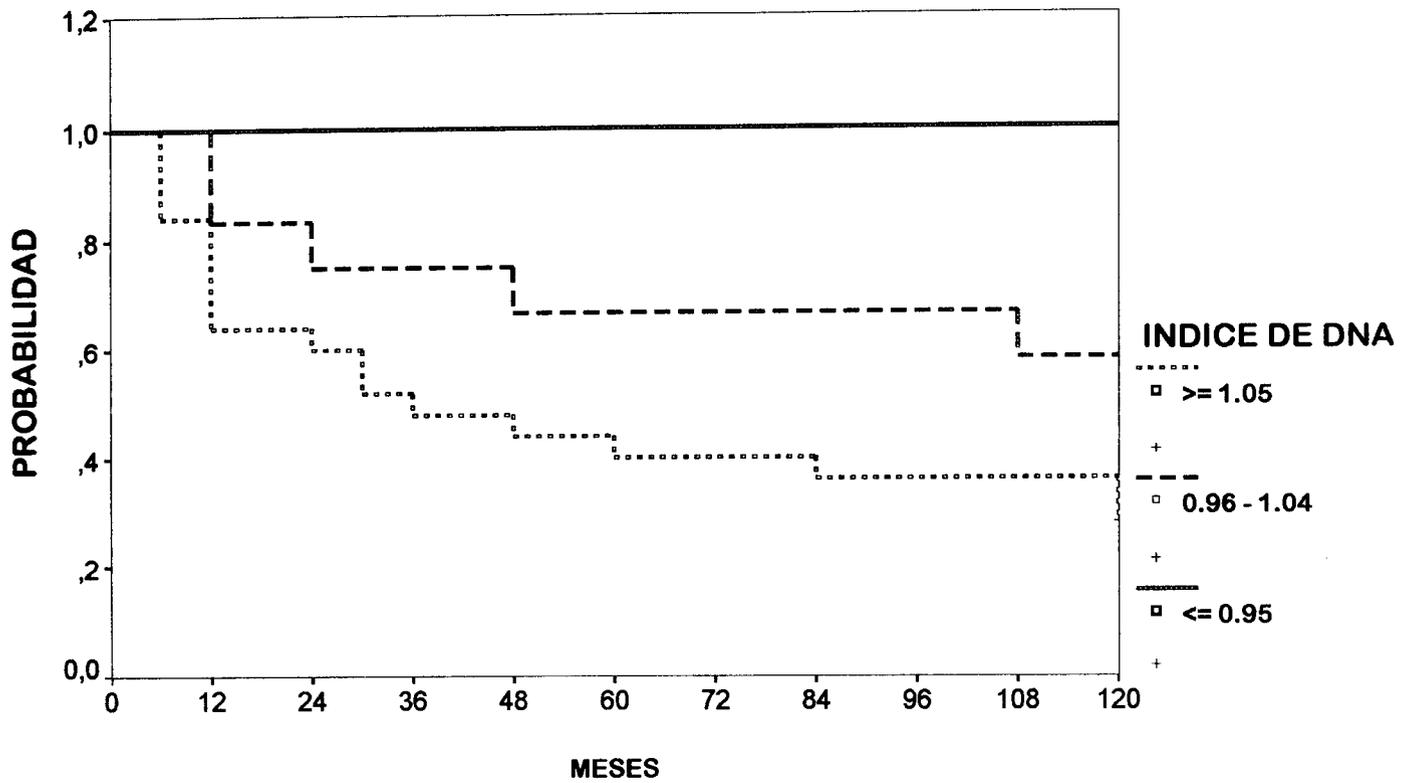


Figura 27. Curva de Kaplan Meier de recurrencia tumoral estratificada por los valores de índice de DNA

SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECURRENCIA

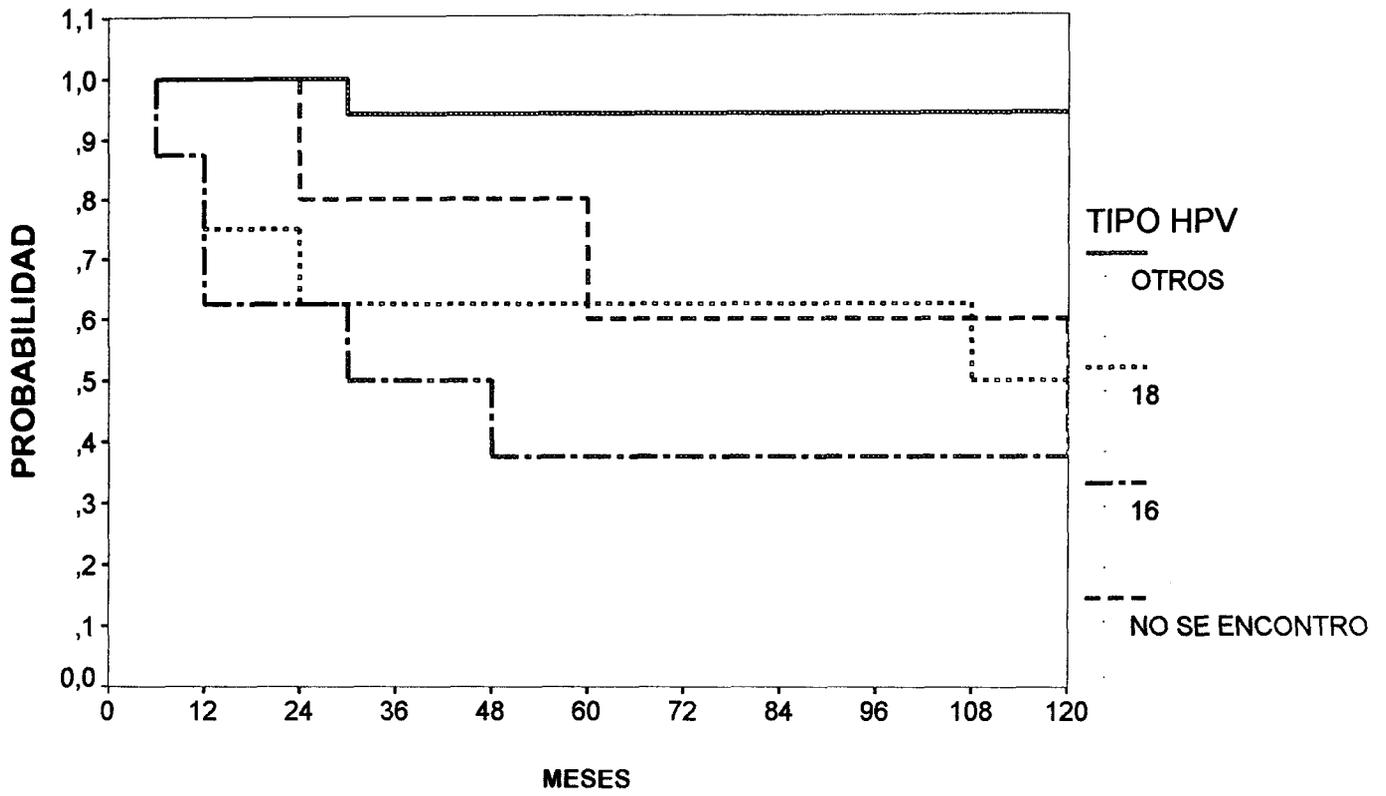


Figura 28. Curva de Kaplan-Meier de recurrencia tumoral estratificada por tipos de HPVs.

DI y tipos de HPVs asociados a riesgo de recurrencia tumoral en CaCu

Factores	Coefficiente de regresión	Error estándar	Valor de p	Riesgo relativo
DI > 1.04	0.6817	0.317	0.031	1.97
HPVs 16,18	1.2847	0.527	0.015	3.61

Cuadro 11. Análisis multivariado con el modelo de regresión de Cox

Capítulo V.

10.DISCUSION Y CONCLUSIONES

La integración de las variables clínicas y básicas que coinciden en el paciente en estimaciones de normalidad y enfermedad no es fácil, es necesario obtener una imagen lo mas completa posible de esta interrelación que nos permitiría mejor nivel de entendimiento de dicha condición; en el presente estudio, en el cual se intentan asociar características ordinales y nominales en el nivel clínico, anatomopatológico celular y molecular en pacientes con carcinoma cervicouterino podríamos rebasar las explicaciones actuales del problema y obtener mayor grado de interpretación, validez y reproducibilidad.

En cada uno de los enfoques biomédicos específicos a investigar se presentaron innumerables obstáculos a superar, se comentan algunos de ellos.

Por ser un estudio retrospectivo con seguimiento clínico entre 5 y 10 años en promedio, a pesar de que en las enfermedades oncológicas la vigilancia horizontal por 5 años es la norma, los tiempos de control clínico en una baja proporción de las pacientes fueron mas limitados requiriéndose en algunos de ellas de su localización por vía telefónica con apoyo de la Trabajadora Social; asimismo la información clínica y anatomopatológica fue incompleta a partir de que en el primer rubro algunas de sus características no se registraron, entre las que destacan lo correspondiente al volumen tumoral. La caracterización anatomopatológica se realizó mediante la revisión actualizada por parte de uno de nosotros, lo que nos permitió sistematizar cada uno de los casos a través de la valoración y registro de mas de 10 subvariables histopatológicas planeadas, sin embargo esto sólo se alcanzó en los casos de las pacientes a quienes se les realizó histerectomía radical.

La obtención del tejido tumoral incluido en parafina de los casos clínicos presentó cierto grado de dificultad, los Archivos Clínico y del Departamento de Anatomía Patológica fueron reubicados años anteriores, lo cual limitó la localización de expedientes clínicos y principalmente de laminillas y bloques de parafina de los

casos por extravío de algunos, consecuentemente en el 20 % de los casos el tejido obtenido para los estudios citométricos y moleculares fueron de lesiones metastásicas de carcinoma cervical.

La metodología con citometría de flujo siendo aparentemente un algoritmo ordenado y progresivo de por lo menos 8 pasos progresivos para su realización, en cada uno de estos existe una cierta diversidad que puede conducir a resultados de discreta a moderadamente variabilidad (sección 3.). Las condiciones de la metodología y análisis citométricos realizados por Huey* y col. (1993) relacionados al uso del citometro FACScan de Becton Dickinson fueron similares a las de nuestro estudio, por esta condición utilizamos la mayoría de sus recomendaciones en el desarrollo de esta metodología, así como sus recomendaciones para la organización del análisis de los tipos de ploidías, sin embargo adoptamos para análisis de agrupamiento de ploidías intervalos de valores de DI mas pequeños de acuerdo a que la variabilidad de los valores encontrados fueron comparativamente mas pequeños.

La metodología de la PCR comparativamente cuenta con mayor grado de reproducibilidad, es mas practicada, y menos automatizada, no requiere que la muestra sea interpretada por un software específico y su metodología es universalmente mas sistematizada; hemos utilizado la recomendaciones de Ting y Manos(1990) para su desarrollo, sin embargo, debido a que empleamos el DNA obtenido de tejido tumoral conservado en parafina por varios años, provocó que en una moderada proporción de los casos perdiera su integridad y el DNA se rompiera en fragmentos pequeños de 200, 300, 400 bp (Ohara 1992) impidiendo ocasionalmente la amplificación de oligonucleótidos de 450 bp (Greer y col. 1995), por lo que alternativamente utilizamos como estrategia la búsqueda complementaria de HPV mediante el uso de "primers" que amplifican oligonucleótidos mas pequeños de 140 bp, de manera similar a Kristensen y col. (1966).

El estudio realizado compara predominantemente a los casos de pacientes con Ca Cu tipo epidermoide etapa clinica IB que recibieron tratamiento con finalidades curativas las cuales fueron controladas y no controladas de la enfermedad, corresponde a un grupo selectivo de pacientes con seguimiento de 120 meses; los resultados obtenidos por tanto, los compararemos con aquellos correspondientes a solo una sección de otros estudios menos selectivos, ya que en la mayoría de estos se analizan pacientes en distintos estadios clínicos y o con dos o tres tipos

histopatológicos.

El resultado del análisis de los factores clinicopatológicos realizado por Kamura y col. (1992) , Thoms y col. (1995) y Burger y col. (1996), donde asocian el estadio clínico, la edad de la paciente, la presencia de ganglios linfáticos, el grado histológico del tumor y la profundidad de la invasión con el mal pronóstico, no podemos compararlo, por no contar con un número suficiente de casos de pacientes que presentaron recurrencia tumoral con datos correspondientes. Solo coincidimos parcialmente en el dato clínico de la edad, ya que entre nuestros grupos analizados hubo una diferencia de 10 años en promedio entre ambos, coincidiendo con Burger y col. 1996, quienes encontraron que a mayor edad de las pacientes se presenta con mayor frecuencia recurrencia tumoral post tratamiento.

Jarrell y col. , Kenter y col., e Isacson y col. han abordado la problemática que plantea este estudio, han realizado diferentes estudios relacionados a la cinética de proliferación celular así como simultáneamente la identificación de los HPVs de alto riesgo; los dos primeros utilizando citometría de flujo, e Isacson mediante determinación de antígeno nuclear Ki 67 e índice apoptótico.

Jarrell y col. 1992 estudiando muestras de TCF en 127 casos encontró que tanto los HPVs 16 y 18, como el DI no fueron significativos como factores pronósticos. Kenter y col. en 1993 estudiaron 69 casos enfocando su estudio solo al HPV 16, encontrando que su presencia se asociaba solamente a casos con mujeres post menopáusicas , sin encontrar tampoco diferencia del DI y del HPV 16 en cuanto a pronóstico; Cheu y col. en 1996 al estudiar 153 casos con muestras de tejido fresco, encontró que las mujeres post menopáusicas con Ca Cu se asociaban con tumores diploides y que el DI y el tipo de HPV no era significativo para el pronóstico.

En nuestro medio nacional este tipo de estudio combinado tanto de cinética celular tumoral asociado a la identificación de HPVs de alto riesgo es novedoso; estudios en relación al estudio de HPV son escasos, Berumen y col. 1994 analizan el número de copias de E1 y E2 en relación al estadio clínico y el tipo histopatológico, y Lizano y col. 1997 trabajaron sobre la asociación de variantes de los HPVs 16, 18, y 45 con los diferentes tipos histopatológicos del Ca Cu. No se encontraron artículos de autores nacionales en relación a estudios de citometría de flujo de Ca Cu u otros cánceres, lo que indica que somos pioneros en su realización.

Se comentan los resultados de investigaciones entre la cinética celular del cáncer

cervical de TFP con citometría de flujo: Strang y col. en 1990 y Zanetta y col. en 1992, demostraron que el aumento en la cantidad de células en fase S durante el ciclo celular, se asoció con mal pronóstico de las pacientes, y en cambio los análisis de las investigaciones de Nguyen y col. 1992 y Huey y col. 1993 y Huey* y col. 1993 encontraron que DI elevados entre 1.3 y 1.7 se asociaban a mal pronóstico clínico, mientras que al comparar los índices de proliferación no fueron significativos.

Nosotros obtuvimos resultados similares a esta última serie de investigaciones, cabe mencionar que la metodología usada por Huey* en su estudio fue muy parecida a la que realizamos, sin embargo al comparar las poblaciones tumorales nosotros utilizamos células epiteliales adyacentes no tumorales TFP de las mismas piezas estudiadas como control de referencia, con ello encontramos intervalos de valores de DI mas estrechos (0.8 a 1.3), conduciendo esto a organizar los valores de DI en tres grupos: poblaciones hipodiploides = menores de 0.95, poblaciones diploides y peridiploides= 0.96 - 1.04, y poblaciones hiperdiploides= mayores de 1.04. Asimismo en nuestra serie analizada, el 72% de los casos correspondieron a lesiones tumorales con grado de diferenciación moderado, y esto también nos explicaría probablemente el porque no hubo diferencias en el índice de proliferación

Hemos considerado previamente (sección 3) la diversidad de variables que intervienen en la realización y análisis del estudio de poblaciones celulares de tejido tumoral mediante citometría de flujo, creemos que además de la diversidad existe entre los subgrupos del mismo tipo histopatológico, con las características particulares relacionadas al grado de diferenciación y al estadio clínico, deberán normarse indicaciones o recomendaciones universales en el desarrollo de esta metodología en su uso clínico (Shankey y col. 1993, Brown y col. 1996), que permitan darle cualidades de estricta reproducibilidad .

Recientemente se han iniciado nuevas determinaciones de parámetros de cinética celular en carcinoma cervical, y seguramente en los próximos años estas se asociarán a las determinaciones de DI e índice de proliferación, una de ellas es el índice apoptótico, el cual es de cero en el epitelio normal, y es bajo, pero medible en lesiones tumorales de alto grado histopatológico (Isacson y col. 1996). Otra área potencial de estrecha relación con el DI e índice de proliferación son las determinaciones de niveles moleculares de ciclinas, CDKs y CDIs relacionados principalmente con los puntos o sitios de control durante el ciclo celular

Respecto a la asociación de la presencia de los distintos tipos de HPVs con el pronóstico clínico: van Bommel y col. en 1992, al estudiar 64 casos de muestras tumorales TFP, y Kristensen y col. en 1996 de una serie de 223 casos en todas las etapas clínicas en muestras de tejido en fresco no encontraron diferencias.

Burnet y col en 1992, con 21 casos con muestras TFP, Zhang y col. en 1995 al estudiar 80 casos con lesiones TFP y Burger y col. en 1996 en 171 casos con Ca Cu en etapas tempranas con muestras en tejido fresco, encuentran asociación significativa entre presencia de HPV 18 con la condición de recurrencia tumoral post tratamiento.

Nuestros resultados en cuanto a la presencia o prevalencia de HPV en pacientes con carcinoma cervical fueron similares a los reportados en un estudio de prevalencia en el mundo reportado por Bosch y col. 1995, así como en diversos trabajos recientes.

En la proporción de los tipos de HPVs encontrados en nuestro estudio destaca una elevación importante del tipo HPV 18 al compararla con estudios de prevalencia (Bosch y col. 1995) o con las series en las que no se demostró asociación entre los tipos de HPV y el pronóstico (van Bommel y col. 1992, Kristensen y col. 1996).

Sin embargo cuando las comparamos con los resultados encontrados por Burnet y col. 1992, Zhang y col. 1995 y Burger y col. 1996 resultan muy cercanos

Por lo tanto si aceptamos la asociación de la presencia del HPV 18 en pacientes con carcinoma epidermoide del cérvix que presentan mal pronóstico clínico, en nuestra serie por diseño experimental, casi la mitad de las pacientes tuvieron recurrencia tumoral a un seguimiento de 10 años, esto nos explicaría esta alta incidencia del HPV 18 encontrada.

Sin embargo dado que aún los resultados son controversiales entre la asociación de la presencia del HPV 18 con carcinoma epidermoide de pacientes con mal pronóstico clínico, convendría repetir y ampliar este tipo de estudio comparando grupos selectivos similares utilizando muestras de material tumoral en fresco

Es conveniente y necesaria la realización de estudios clínicos prospectivos similares al presente.

No obstante se considera pertinente que las pacientes en quienes se detectaran los factores de riesgo clinicopatológicos reconocidos y/o las determinaciones de DI mayor de 1.05 o presencia de HPV 18 tuvieran vigilancia clínica semestral con

seguimiento clínico de 10 años.

Es muy probable que para entender aun mejor los aspectos de biología molecular del Ca Cu se requieran de estudios multidisciplinarios de la historia natural de las infecciones de HPVs y de los factores que puedan influir en su persistencia y en la progresión de la enfermedad, al respecto Carter y col. 1996 mediante un análisis de cohorte de mujeres universitarias, midiendo anticuerpos contra L1 de HPV estimó en 8 meses el tiempo de las infecciones transitorias de HPV 16.

Utilizando PCR cuantitativa la carga viral del DNA genómico celular ha sido calculada en diferentes infecciones virales, por ejemplo se ha demostrado asociación significativa entre los niveles del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) con el desarrollo de la enfermedad (Schittman y col. 1990). La carga viral de HPV en las células del cáncer cervical podría ser un marcador de su comportamiento biológico, ciertos tipos de PCR cuantitativas como la PCR de baja especificidad o astringencia (Villa y col. 1995, Caballero y col. 1995) prometen ser una metodología potencial para determinarla.

La identificación de las variantes de los tipos y subtipos de los HPVs (Xi y col. 1995, Lizano y col.1997) en los cánceres cervicales podría asimismo asociarse con el comportamiento tumoral y abriría nuevas explicaciones.

El determinar cuantitativamente la carga viral identificando las formas episomales y las integradas al genoma sería otro panorama importante.

La identificación de nuevas rutas moleculares donde intervengan los genes o productos de transcripción de los HPVs podría ser potencial para entender aun mejor su oncogenicidad.

Todo ello mas la caracterización de la respuesta inmune al HPV durante la progresión del Ca Cu, nos orientará sobre futuras estrategias en la prevención, diagnóstico y terapéutica del cáncer cervical.

En el presente estudio el número de muestras fue limitado, ya que la inversión económica que implicó el desarrollo de las metodologías celulares y moleculares solo fueron financiados por los propios laboratorios donde se desarrolló.

CONCLUSIONES

En nuestro estudio comparativo de muestras de tejido tumoral fijadas en parafina de pacientes con carcinoma cervicouterino etapa clínica I B de tipo epidermoide con variable de referencia de recurrencia tumoral en su seguimiento clínico por 10 años, encontramos que el índice de DNA (p de 0.015) y la presencia de los HPVs tipos 16 y 18 (p de 0.04) fueron significativos para predecir recurrencia tumoral post tratamiento, siendo el riesgo estimado de 1.97 veces en los casos de pacientes con población tumoral con DI mayor de 1.04 y de 3.47 veces con presencia de DNA-HPV 16 y 18 integrado al genoma de las células neoplásicas.

Asimismo se identificó asociación directa significativa entre los valores de DI mayores de 1.05 con la presencia de los HPVs 16 y 18 en la población celular tumoral de las pacientes que tuvieron recurrencia tumoral post tratamiento.

Aunque nuestros resultados demuestran que los valores de DI y la presencia de HPV 16 y 18 son factores significativos asociados a la presencia de recurrencia tumoral en pacientes con carcinoma cervicouterino E I B; consideramos que es muy importante la continuación de este estudio mediante el análisis de una casuística mas numerosa .

Capítulo VI.

11. BIBLIOGRAFIA

- Agarwal S, Sehgal A, Sardana S, Kumar A, Luthra U.** 1993. Role of male-behavior in cervical carcinogenesis among women with one lifetime sexual partner. *Cancer*; 72:1666-69
- Alberts. B,** Bray D, Lewis J, Raff M, Soberts K, Watson J . 1994. *Molecular Biology of the cell.* Garland Pub Inc. 3th ed. New York/London, 863-910
- Apple RJ,** Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. 1994. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature Genetics*; 6: 157-62
- Baver HM,** Manos MM. 1993. PCR detection of genital human papillomavirus. en Persing D, Smith T, Tenover F, White T. *Diagnostic Molecular Microbiology.* American Society of Microbiology. Washington USA: 407-13
- Becton Dickinson. 1993. *Flow cytometry workshop. DNA analysis.* Mexico
- Bej BK,** Mahbubani MH, Atlas RM. 1991. Amplification of nucleic acids by Polymerasa chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit R Bioch Mol Bio*; 26 (3/4): 301-34
- Berumen J,** Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia-Carranca A. 1994. Genoma amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer*; 56: 640-45
- Bosch X,** Muñoz N, de San Jose S et al. 1992. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer*; 52: 750-58
- Bosch X,** Manos M M y col. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer . A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst*; 87: 796-802
- Bourhis J,** y col. 1990. Pronostic value of c-myc proto-oncogene over expression in early invasive carcinoma of cervix. *J Clin Oncol*; 8: 1789-96
- Brinton L,** Schairer C, Haenzel W y col. 1986. Cigarette smoking and invasive cervical cancer. *JAMA*; 255: 3265-69
- Brinton L,** Hamman R, Huggins y col. 1987. Sexual and reproductive risk factors for invasive squamous cell cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*; 79: 23-30

- Brown RO** y col. 1996. The effect of number of histogram events on reproducibility and variation of flow cytometric proliferation measurements. *Am J Clin Pathol*; 105: 696-704
- Buckley D**, McPherson R, North C, Becker T. 1992. Dietary micronutrients and cervical dysplasia in southwestern American-Indian women. *Nutr Cancer Int J*; 17: 179-85
- Burger R A**, Monk B J. y col. 1996. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*; 88, 19: 1361-68
- Burnett AF**, Barnes WA y col. 1992. Prognostic significance of polymerase chain reaction detected human papillomavirus of tumors and lymph nodes in surgically treated stage IB cervical cancer. *Gynecol Oncol*; 47: 343-47
- Caballero OL**, Villa LL, Simpson AJG. 1995. Low stringency-PCR (LS-PCR) allows entirely internally standardized DNA quantitation. *Nucleic Acids Res*; 23:192-93
- Camacho RR**, Caceres CD, Rodriguez AS. 1993. Evaluación de algunos aspectos del programa nacional de diagnóstico precoz del cáncer cervicouterino en Cuba 1993. *Rev Ins Nal Cancerol Mex*; 39,3:1855-59
- Carter JJ**, Koutsky LA. 1996. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis*; 174: 927-36
- Chen TM**, Chen YH y col. 1996. Factors influencing tumor cell kinetics in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*; 122, 8: 504-8
- Cullen AP**, Read R, Champion M, Lorincz AT. 1991. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol*; 65: 606-612
- Cuzick J**, Terry G, Ho L.. 1994. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as predictor of high grade CIN. *Br J Cancer*; 69: 167-171
- Devet H**, Sturmans F. 1994. Risk factors for cervical dysplasia. Implications for prevention. *Public Health*; 108: 241-49
- Dunning A M**, Talmud P, Humphries S E. 1988. Errors in the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*; 16: 10393-95
- Ferenczy A**. 1995. Management of patients with high grade squamous intraepithelial lesions. *Cancer*; 76: 128-33
- Franco EL**. 1995. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*; 87: 779-80

- Gray JW**, Dolbeare F, Pallavicina MG. 1990. Flow cytometry and sorting. 2nd Ed. Wiley-Liss Inc; 445-67
- Greer CE**, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. 1991. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol*; 95:117-24
- Greer CE**, Wheeler CM, Manos MM. 1995. PCR amplification from paraffin embedded tissues: sample preparations and the effects of fixation. en Dieffenbach C, Dieksler G. PCR Primer. A Laboratory Manual. CSHL Press. Printed in USA: 99-112
- Haynes JL**. 1988. Principles of flow cytometry. *Cytometry suppl* 3: 7-17
- Grubb Ch** 1988. Diagnostic cytopathology. A text and colour atlas. Churchill Livingstone. Medical division of Longman Group UK Ltd. U. K.
- Hedley DW** y col. 1993. Findings and recommendations of DNA cytometry for breast cancer. *Cytometry*; 14: 482-9
- Herrero R**, Potischman N, Brinton L, Reeves W et al. 1991. A case control study of nutrient status and invasive cancer. I. Dietary indicators. *Am J Epidemiol*; 134: 1335-45
- Hildesherm A**, Gravitt P, Schiffman M y col. 1993. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-income women in Washington D.C. *Sex Transm Dis*; 20: 279-85
- Hitchcock CL**, Ensley JF. 1993. Technical considerations for dissociation of fresh and archival tumors. en Baver KD, Duque RE, Shankey VT. *Clinical flow cytometry*. Williams/Wilkins, Baltimore, USA: 93-109
- Ho GYF**, Burk RD y col. 1995. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*; 87: 1365-71
- Hoskins NJ**, Perez CA, Young RC. 1993. Gynecologic tumors. en De Vita VT, Hellman S, Rosenberg S. *CANCER. Principles and Practice of Oncology*. JB Lippincott Co. 4th Ed. Philadelphia: 1013-41
- Huey CL**, Chyi H C y col. 1993. Prognostic factors and impacts of adjuvant therapy in early stage cervical carcinoma with pelvic node metastases. *Gynecol Oncol*; 51:390-96
- Huey CL***, Hsueh S y col. 1993. The uses and limitations of DNA flow cytometry in stage IB or II cervical carcinoma. *Cancer*; 72:3655-62
- Husman AM**, Walboomer JMM, van den Brule AJC, Meijor CJLM, Snijders PJF. 1995. The use of general "primers" GP5 and GP6 elongated at their 3' end eith

adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*; 76: 1057-62

Isacson C, Kessis T D, Hedrick L, Cho K R. 1996. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Research*; 56: 669-74

Jarrell MA, Heintz N y col. 1992. Squamous cell carcinoma of the cervix: HPV 16 and DNA ploidy as predictors of survival. *Gynecol Oncol*; 46: 361-66

Jordan J. 1990. The management of CIN, VAIN and VIN. en Shepherd , Monaghan. *Clinical gynaecological oncology*. 2nd Edition. Blackwell Scientific Publications Oxford. U.K. 48-63

Juneja A, Murthy N, Sharma S y col. 1995. Role of degree of sexual activity in cervical carcinogenesis. *Cancer J* ; 8: 10-12

Kamura T, Tsukamoto N y col. 1992. Multivariate analysis of the histopathologic prognostic factors of cervical cancer in patients undergoing radical hysterectomy. *Cancer*; 69: 181-86

Kenter GG y col. 1990. DNA ploidy level as prognostic in low stage carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*; 39: 181-85

Kenter GG, Cornelisse CJ y col. 1993. Human papillomavirus type 16 in tumor tissue of low stage squamous carcinoma of the uterine cervix in relation to ploidy grade and prognosis. *Cancer*; 71: 397-401

Kristensen GB, Karlsen F, Jenkins A, Kaern J, Abeler VM, Trope CG. 1996. Human papilloma virus has no prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer*: 32A, 8: 1349-53

Kristiansen E, Jenkins A, Holm R. 1994. Coexistence of episomal and integrated HPV 16 DNA in squamous cell carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol*; 47: 253-56

Lai Ch, Chang Hc, Chang TC, Huesh S, Tang SG. 1993. Prognostic factors and impacts of adjuvant therapy in early stage cervical carcinoma with pelvic node metastases. *Gynecol Oncol*; 51: 390-96

Laimins L. 1993. The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infect Agents Dis*; 2: 74-86

Lizano M, Berumen J, Guido M, Casas L, Garcia CA. 1997. Association between human papillomavirus type variants and the histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* (en prensa)

Lovejoy N, Anastasi J. 1994. Squamous cell cervical lesions in women with and without AIDS. Biochemical risk factors, prevention and policy. *Cancer Nursing*; 17: 294-307

- Maniatis T**, Fritsch E F, Sambrook J. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd. Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Manos MM**, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. 1989. Use of polimerasa chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells*; 7: 209-14
- Mohar BA** y col. 1993. Epidemiología descriptiva del cáncer cervicouterino. *Rev Inst Nal Cancerol Mex*: 39, 3: 1849-53
- Mukherjee B**, Sengupta S, Chaudhuri S, Biswas L, Maiti P. 1994. A case control study of reproductive risk-factors associated with cervical cancer. *Int J Cancer*; 59: 476-82
- Neubaver A** y col. 1992. Analysis of gene amplification in archival tissue by differential polymerase chain reaction. *Oncogene*; 7: 1019-25
- Nguyen HN** y col. 1993. The role of index as prognostic factor in early cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*; 50: 54-59
- Oreilly SM**, Richards MA. 1995. Flow cytometry. en Peckham M, Pinedo HM, Veronesi U. *Oncology*. Oxford Med Publ. Oxford: 367-369
- O'Connor M**, Apt D, Bernard HU. 1997 DNA tumor viruses: Papiloma. en *Encyclopedia of cancer*. Academic Press, Inc: 520-31
- Park TW**, Fujiwara H, Wright TC. 1995. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer*: 76: 1902-13
- Parkin DM**, Laara E, Muir CS. 1988. Estimates of the worldwide frequency of sixteen mayor cancers in 1980. *Int J Cancer*; 41: 184-97
- Parkin DM**, Muir CS, Whelan SL y col. 1992. Cancer incidence in five continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ*; 120: 45-173
- Poon RYC** 1997. Cell cycle control. en *Encyclopedia of cancer*. Academic Press Inc: 246-255
- Raber MN**. 1988. Clinical aplicaciones of flow cytometry. *Oncology*; 2: 35-39
- Remick DG** y col. 1990. Theory and applications of the polimerasa chain reaction. *Am J Clin Pathol*, 93 (suppl 1): 549-54
- Riou G**, Barrois M, Le MG, George M, Le Doussal V, Hare C. 1987. c-myc protooncogen expresion and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *Lancet*: 761-3
- Robboy SJ**, Duggan MA, Kurman R J. 1990. Patología ginecológica. en Rubin E, Farber J H. *Patología*. Ed Med Panamericana, Buenos Aires: 860-65

- Rocha L Z.** 1996. Immune response to human papillomavirus (HPV) in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. Tesis de doctorado. Fac of Medicine. University of Manchester U K.
- Rolfs A,** Schuller I, Finckh, Welber-Rolfs I. 1992. PCR:clinical diagnostic and research. Springer Lab. Berlin: 1-131
- Ross JS.** 1996. DNA ploidy and cell cycle analysis in Pathology. IGAKU-SHOIN, New York/ Tokyo: 1-120
- Saewha J,** Lambert P. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implication for cervical carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA; 92: 1645-58
- Saiki R,** Scharf S, Faloona F y col. 1985. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science; 230: 1350-54
- Schiffman MH,** Brinton L. 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. Cancer;76: 1888-901
- Schittman SM,** Greenhouse J J y col. 1990. Increasing viral burden in CD4⁺ T cells in patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. Ann Int Med; 113: 438-43
- Secretaria de Salud. 1992. Compendio de información epidemiológica de Cáncer 1982-1988. Dirección General de Epidemiología SSA: 20-22, 63, 211, 217, 221
- Shah K V,** Howlwy PM. 1996. Papillomavirus en Fields DM, Knipe PM, Howley y col. Fields Virology. 3th Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, 2077-2109
- Shankey TV,** Rabinovitch PS y col. 1993. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. Cytometry; 14: 472-77
- Smith GL** 1994. Virus strategies for evasion of the host response to infection. Trends Microbiol; 2, 3: 81-88
- Sreekantaiah C,** Bhargava MK, Shetly NJ. 1988. Chromosome 1 abnormalities in cervical carcinoma. Cancer: 62: 1317-24
- Strang P,** Stendahl U, Bergstrom R, Frankendal B, Tribukait B. 1991. Prognostic flow cytometric information in cervical squamous cell carcinoma: A multivariate analysis of 307 patients. Gynecol Oncol; 43: 3-8
- Strang P,** Bergstrom R, Stendahl U. 1992. Prognostic factors in cervical carcinoma. Anticancer Res; 12: 1919-20
- Tapia R** y col. 1996. Registro histopatológico de neoplasias malignas en Mexico. Dir Gral Epid. Secretaria de Salud: 37-42

- Ting Y, Manos MM.** 1990. Detection and typing of genital human papillomavirus. en Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White T J. PCR. Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press Inc. San Diego, USA: 356-67
- Thoms WW, Unger ER y col.** 1995. Cervical cancer in a high risk urban populations. *Cancer*; 76: 2518-23
- Ursin G, Peters RK, Henderson BE y col.** 1994. Oral contraceptive use and adenocarcinoma of cervix. *Lancet*; 344: 1379-80
- vam Bommel PF y col.** 1993. HPV DNA presence and HPV genotypes as prognostic factors in low stage squamous cell cervical cancer. *Gynecol Oncol*; 48: 333-37
- Van Ranst M, Tachezy R, Delius H, Burk R.** 1993. Taxonomy of the human papillomavirus. *Papillomavirus Rep*; 4: 61-65
- Villa LL, Caballero OL, Levi JE, Pena SD, Simpson AJG.** 1995. An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. *Mol Cel Probes*; 9: 45-48
- Villa LL** 1997. Human papillomavirus and cervical cancer. *Adv Cancer Res* (en prensa)
- Weinberg RA.** 1996. How cancer arrises. *Scientif american* : 275, 3: 32-40
- Weinstein BI, Zhou P** 1997. Cell cycle control gene defects and human cancer. en *Enciclopedia of cancer*. Academic Press Inc: 256-267
- Willis G, Jwnnings B, Ball RY, New E, Gibson I.** 1993. Analysis of ras point mutations and human papillomovirus 16 y 18 in cervical carcinomata and their metastases. *Gynecol Oncol*; 49: 359-64
- Wright DK, Manos MM.** 1990. Sample preparation form paraffin embedded tissues en Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. White T J. PCR Protocols. A Guide to methods and applications. Academic Press Inc. San Diego USA: 153-58
- Xi LF, Demers GW y col.** 1995. The analysis of human papillomavirus type 16 variant indicates establishment of persistent infection. *J Infect Dis*; 172: 747-55
- Zanetta GM.** 1992. Flow cytometric DNA analysis of stages IB and IIA cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*; 46: 13-19
- Zhang J, Rose BR y col.** 1995. Associations between oncogenic human papillomavirus and local invasive patterns in cervical cancer. *Gynecol Oncol*; 57: 170-77

Esta tesis fue aprobada por el Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, el día 31 del mes de julio de 1997



DRA. A. ROCIO ORTIZ MUÑIZ

DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ



DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE