

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PRESENCIA DE LAS PROTEÍNAS bcl-2, p53 y p16 COMO  
INDICATIVOS DE LA PROGRESIÓN A CÁNCER  
CERVICOUTERINO.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**MARÍA MONSERRAT ROMÁN LARA**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PRESENCIA DE LAS PROTEÍNAS bcl-2, p53 y p16 COMO  
INDICATIVOS DE LA PROGRESIÓN A CÁNCER  
CERVICOUTERINO.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**MARÍA MONSERRAT ROMÁN LARA**

**DIRIGIDA POR**

**DRA. GUADALUPE ZALDÍVAR LELO DE LARREA**

**SINODALES**

**Dra. GUADALUPE ZALDÍVAR LELO DE LARREA.** \_\_\_\_\_  
DIRECTORA

**Dr. CARLOS FRANCISCO SOSA FERREYRA** \_\_\_\_\_  
SINODAL

**M. en C. JAVIER ÁVILA MORALES** \_\_\_\_\_  
SINODAL

**M. en IBB. JOSÉ CÁRMEN GUDIÑO ROSALES** \_\_\_\_\_  
SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1Cáncer cervicouterino	3
II.2 Virus del papiloma humano	7
II.3 Proteína bcl-2	14
II.4 Proteína p53	15
II.5 Proteína p16	17
III.HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
IV.1 General	20
IV.2 Específicos	20
V. METODOLOGÍA	21
V.1 Materiales y reactivos	21
V.1.1 Material biológico	21
V.1.2 Materiales y equipo de laboratorio	21
V.1.3 Reactivos	22
V.2 Métodos	23
V.2.1 Procesamiento de las muestras	23
V.2.2 Extracción de proteínas totales	23
V.2.3 Electroforesis	23

V.2.4 Western blot	23
V.2.5 Análisis estadístico	24
VI. RESULTADOS	25
VI.1 Detección de bcl-2	27
VI.2 Detección de p53	28
VI.3 Detección de p16	30
VII. DISCUSIÓN	32
VIII. CONCLUSIÓN	38
IX. BIBLIOGRAFÍA	39

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Estadísticas descriptivas de los valores de bcl-2	27
2	Estadísticas descriptivas de los valores de p53	29
3	Estadísticas descriptivas de los valores de p16	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	La zona de transformación cervical	4
2	Principales pasos en el desarrollo del cáncer cervicouterino	5
3	Organización del genoma del VPH y el ciclo de vida del virus	9
4	Estimulación de la progresión del ciclo celular por VPH de alto riesgo	11
5	Progresión a cáncer cervicouterino modulado por VPH	14
6	Prueba de especificidad de los anticuerpos monoclonales	25
7	Expresión de las proteínas bcl-2, p53 y p16	26
8	Detección de bcl-2	28
9	Detección de p53	29
10	Detección de p16	31

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa en México el segundo lugar de muertes en mujeres por tumores malignos, con 4,134 fallecidas al año. El CaCu es una enfermedad curable si se detecta a tiempo. La causa necesaria para el desarrollo del CaCu es la infección por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo. Desde el inicio de la prueba de Papanicolaou, para la detección oportuna de lesiones premalignas, se logró disminuir la mortandad; sin embargo la prueba tiene sensibilidad limitada; obteniendo resultados erróneos o ambiguos. Además el examen citológico es incapaz de distinguir cuáles de las lesiones progresarán a cáncer invasivo. Las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH son las principales proteínas que alteran el ciclo celular del huésped. E7 se asocia a pRb impidiendo su unión a E2F, promoviendo la proliferación y la sobreexpresión de p16; E6 marca a p53 para su degradación bloqueando la apoptosis. En este estudio se analizó de forma semi-cuantitativa por medio de Western blot la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular: bcl-2, p53 y p16, en muestras de pacientes en los diferentes estadios de las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), cáncer cervicouterino *in situ* y sanas para ver si esas proteínas eran indicativas de la progresión a cáncer. Se logró detectar las proteínas en todos los estadios sin encontrar diferencias significativas entre ellas. Como conclusión no se encontraron diferencias significativas en el grado de expresión de las proteínas bcl-2, p53 y p16, entre las muestras de pacientes con los diferentes grados de lesión.

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema mundial de salud pública, las estadísticas publicadas por el INEGI en el 2006 a propósito del día Mundial contra el Cáncer, reportaron al cáncer como la tercera causa más frecuente de defunciones en México. Las defunciones por tumores malignos representaron 11.3% del total de fallecimientos en los varones y 14.9%, en las mujeres. En éstas últimas, 13.9% de las defunciones por tumores malignos corresponden al del cuello del útero (cervicouterino) y 15% al de mama; el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó 9.2% de las muertes. La mortalidad por cáncer cervicouterino (CaCU) es mayor en países en desarrollo que en países desarrollados, con cerca de 200 000 muertes reportadas por año, comparadas con 70 000 en países desarrollados. Los países con programas de detección bien organizados para detectar y tratar lesiones precancerosas en estadios iniciales pueden prevenir más del 80% de ésta enfermedad. Sin embargo los programas de detección efectiva y el seguimiento de mujeres con pruebas positivas han sido difíciles de implementar sobre todo en países en vías de desarrollo.

La Secretaría de Salud en el 2005 reporta una tasa de 15.46 defunciones por CaCu en mujeres mayores de 25 años a nivel nacional. Para el estado de Querétaro la tasa en el mismo año fue de 12.4 defunciones por cada 100 000. La población de mujeres de más de 25 años en Querétaro es de 395,000 la cual finalmente representa la población en riesgo.

La causa principal del CaCU es la infección con el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo. El ADN del VPH ha sido detectado en más del 99% del CaCU epidermoide y en una pequeña proporción de adenocarcinomas. En Estados Unidos, los virus oncogénicos más comunes encontrados en CaCU, en orden decreciente son VPH 16, 18, 31, 33 y 45. El VPH16 es el tipo oncogénico más prevalente, responsable de más de la mitad de todos los tumores. El VPH18 es responsable del 20%. Sin embargo, la mayoría de las infecciones presentan regresión espontánea o progresan sólo durante un largo periodo de latencia. Como



resultado, el número de infecciones es mucho mayor que el número de mujeres que desarrollarán cáncer.

El diagnóstico de lesiones premalignas por medio de la prueba de Papanicolaou ha logrado disminuir la mortalidad, sin embargo debido a la falta de control de calidad en los sistemas, la falta de entrenamiento adecuado en el personal que practica la toma de muestras, y la gran variabilidad que representan factores como la objetividad del observador hace que la prueba tenga sensibilidad, especificidad y precisión limitadas. Esto acarrea que se obtengan resultados erróneos o ambiguos, especialmente en casos de lesiones de bajo grado o en lesiones en el umbral del carcinoma. Además, en las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), el examen citológico es incapaz de distinguir cuáles de éstas progresarán a cáncer invasivo, ya que estas lesiones se comportan de manera muy diferente entre los individuos, y en la vasta mayoría habrá regresión espontánea. Sólo un bajo porcentaje desarrollará CaCu en los 24 meses posteriores a la prueba. La infección por VPH de alto riesgo es la causa principal del CaCu, pero la progresión a malignidad requiere de la sobreexpresión de los genes E6 y E7 del genoma del VPH. Por tanto, la utilización de los marcadores moleculares es necesaria para distinguir las lesiones de alto riesgo que podrían progresar a cáncer. De esta manera el tratamiento que se le sugiera a la paciente estaría bien sustentado en cuanto al riesgo de que sus lesiones progresen a cáncer invasivo. Lo ideal sería contar con una prueba útil que detectara la transición de las células infectadas con proliferación simple en respuesta a las proteínas oncovirales, a células viralmente transformadas, las cuales han acumulado cambios adicionales genéticos y epigenéticos. Actualmente, no hay ningún marcador molecular conocido capaz de detectar esta transición. Sin embargo hay marcadores moleculares del ciclo celular, como bcl-2, p53 y p16 que detectan la proliferación celular y la ausencia de apoptosis. El presente estudio pretende encontrar si algunos de los marcadores moleculares empleados permiten determinar la progresión de neoplasias intraepiteliales a CaCu.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Cáncer Cervicouterino

Los cánceres escamosos o epidermoides del tracto genital: cérvix, vagina y la vulva son enfermedades de transmisión sexual, con graves consecuencias médicas, sociales, económicas y psicológicas en las mujeres, ya que ellas desarrollarán con más frecuencia esta neoplasia en comparación con el varón, siendo un problema de salud pública nacional, debido a que afecta al 85% de la población sexualmente activa (Alaniz-Sánchez y col., 2009).

El cáncer cervicouterino (CaCu) constituye un problema de salud pública en el ámbito mundial, ya que es la segunda neoplasia que más muertes ocasiona entre la población femenina (Aguilar-Pérez y col., 2003). El número de muertes por CaCu en México es preocupante, con 4 134 mujeres fallecidas en el año 2006 (Palacio-Mejía y col., 2009).

El agente etiológico que se ha involucrado en la génesis del CaCu es el virus del papiloma humano (VPH) que interactúa con el epitelio de la zona de transformación (Figura 1), alterando su estructura por el daño al ADN celular, ocasionando la denominada displasia cervical, la cual es una lesión precursora temprana, con pérdida de estructura del epitelio y alteraciones en la morfología de sus componentes celulares. El impacto de estas infecciones es magnificado por su potencial para facilitar su propagación con prácticas sexuales de riesgo y sin protección (Alaniz-Sánchez y col., 2009).

El CaCu surge a través de una serie de cuatro pasos: transmisión del VPH, persistencia viral, progresión de una clona de células infectadas persistentes a pre-cáncer e invasión. El cigarro, el tener parejas múltiples y el uso prolongado de anticonceptivos orales puede doblar o triplicar el riesgo de pre-cáncer y cáncer en mujeres infectadas con tipos de VPH carcinogénicos (Schiffman y col., 2007).

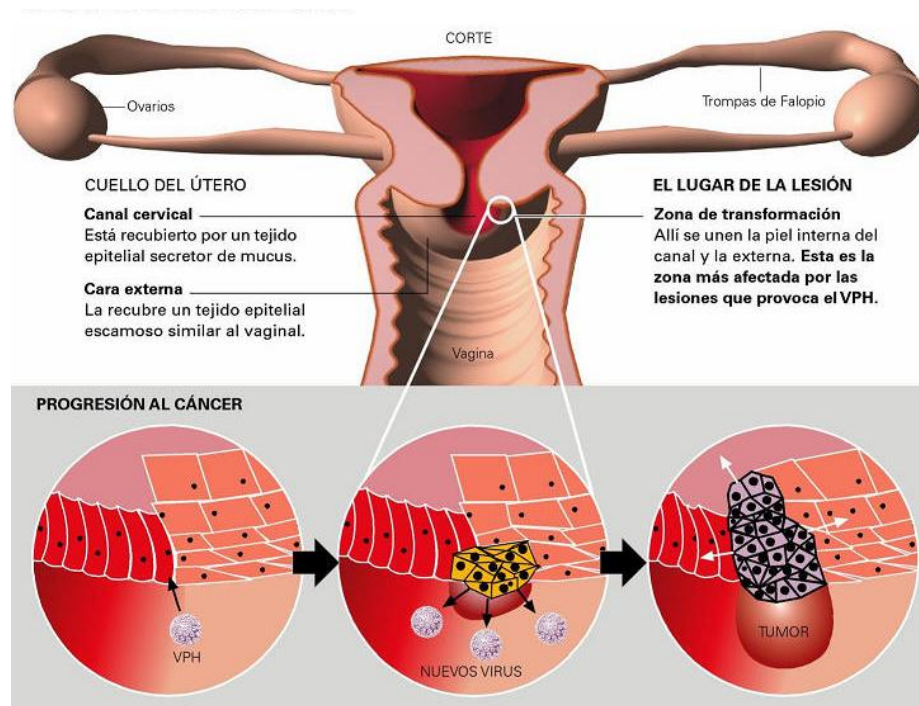


Figura 1. La zona de transformación cervical. La zona de transformación cervical es un anillo de metaplasia escamosa activa donde el epitelio escamoso estratificado del ectocérvix se desestabiliza progresivamente y reemplaza el epitelio glandular del endocérvix. Por razones desconocidas, el tejido metaplástico es especialmente susceptible al potencial carcinogénico de infecciones por VPH persistente (Schiffman y col., 2007).

El CaCu es una enfermedad prevenible cuando su diagnóstico es oportuno y cuando se realiza un tratamiento adecuado de las lesiones premalignas (Aguilar-Pérez y col., 2003). La prevención del CaCu incluye: muestreo, diferenciación de resultados equivocados; colposcopia de resultados de muestreos anormales; la decisión si se va a tratar; tratamiento; y post-tratamiento de seguimiento (incluyendo muestreos de rutina) (Schiffman y col., 2007).

El concepto tradicional con respecto a la historia natural del CaCu considera a la neoplasia intraepitelial cervical 1, NIC 1 (displasia leve), NIC 2 (displasia moderada) y NIC 3 (displasia severa y carcinoma *in situ*) como las etapas de una enfermedad progresiva (Figura 2). La interpretación histopatológica de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) es subjetiva y propensa a variaciones considerables.

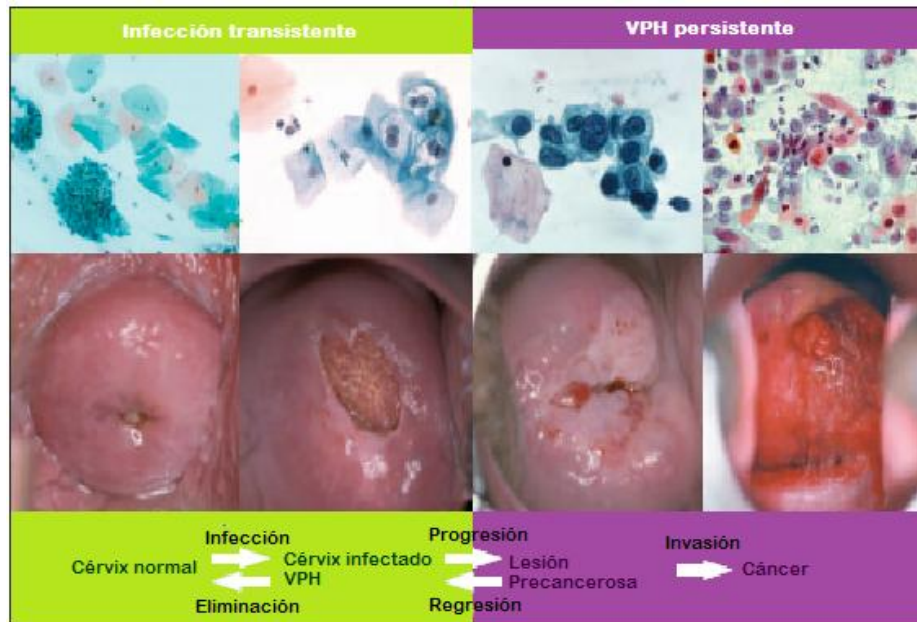


Figura 2. Principales pasos en el desarrollo del cáncer cervicouterino. Las fotografías de arriba son de una citología, las fotografías de abajo son de una colposcopia (Schiffman y col., 2007).

En general, hay un acuerdo excelente entre patólogos para las lesiones invasivas, moderadamente bueno para NIC 3, y muy pobre para NIC 1 y NIC 2. Esto resulta en marcadas dificultades para separar biopsias normales de NIC 1 y en distinguir entre NIC 2 y NIC 3 basados sólo en la histopatología (Zhang y col., 2006). En el pre-cáncer, NIC 3, las células indiferenciadas con anomalías genéticas fijas han reemplazado casi la mayoría del grosor del epitelio cervical. En NIC 2 es heterogéneo: a veces es producido por tipos de VPH no-carcinogénicos y por lo tanto, no tiene potencial cancerígeno. NIC 1 es un signo histopatológico insensible de infección por VPH y no es pre-cancerígeno (Schiffman y col., 2007). Además estudios recientes han demostrado que en la mayoría de las mujeres con diagnóstico NIC 2 o NIC 3, no muestran alteraciones que sugieran que NIC 1 fue detectado en previos exámenes. Esto puede indicar que NIC 1 y NIC 2/ NIC 3 representan diferentes procesos de la enfermedad, siendo NIC 1 la manifestación morfológica de la infección por VPH, mientras que NIC 2/ NIC 3 representan, en adición a la manifestación morfológica de la infección de VPH, una lesión verdadera, premaligna, del carcinoma cervical (Godoy y col., 2008).

Específicamente, la inhabilidad de distinguir el NIC de alto grado con el potencial para progresar a cáncer invasivo o displasia regresiva contribuye a un tratamiento excesivo innecesario, donde los falsos negativos no son eliminados (Steinau y col., 2007). El Programa de Prevención y Control del Cáncer Cervicouterino, desarrollado en México por la Secretaría de Salud, informa que la edad promedio en que se detectan las displasias se ubica entre los 25 y 30 años en el caso de la leve; 30 y 35 años en la de la moderada; 40 y 50 años para el carcinoma *in situ*; el microinvasor entre los 45 y 50 años y el invasor de los 50 años en adelante (Alaniz-Sánchez y col., 2009). Se ha estimado que aproximadamente el 20% de NIC 1 progresará a NIC 2, y aproximadamente el 30% de estas lesiones progresarán a neoplasias más severas si no son tratadas. Aproximadamente el 40% de lesiones NIC 3 progresarán a cáncer.

La mayoría de las mujeres (80%) infectadas con un tipo específico del VPH no enseñarán evidencia de ese tipo hasta 18 meses después, y se cree que una re-infección con el mismo tipo es improbable (Doorbar, 2006). La mayoría de las infecciones VPH cervicales (con anomalías citológicas o no) son eliminadas o suprimidas por la inmunidad celular dentro de 1-2 años de exposición. Los tipos del VPH más persistentes tienden a ser los más comunes. Aún no se sabe en que depende para que la infección se elimine por completo o se mantenga en estado latente en el epitelio basal celular, en el cual el virus se replica a niveles extremadamente bajos sin tener expresión viral completa (Schiffman y col., 2007). El desarrollo de neoplasia cervical de alto grado se da en mujeres que no pueden eliminar la infección y en las que mantienen la infección activa persistente por años o décadas después de una exposición inicial (Doorbar, 2006).

Usualmente el periodo de latencia es de 2 a 10 años o más entre la infección inicial del VPH de alto riesgo y el desarrollo de cáncer. Esta prolongada historia natural permite que las lesiones cervicales pre-invasivas sean detectadas con la prueba del Papanicolaou (Psyrry y DiMaio, 2008). Aunque la implementación del Papanicolaou en programas de detección rutinario ha reducido ampliamente la incidencia de cáncer y mortalidad, la prueba tiene una precisión limitada y es poco probable que

pueda mejorar (Steinau y col., 2007). La prueba de Papanicolaou tiene un rango de falsos-negativos. Estos han sido atribuidos a errores de muestras, mal interpretación de células anormales cervicales, aún en laboratorios con rigurosos procedimientos de control de calidad. Nuevos métodos de recolección y procesamiento de muestras para pruebas de Papanicolaou han sido desarrollados para ayudar a reducir el número de resultados falso-negativos. En estos métodos, las muestras son recolectadas en una solución preservativa en vez de esparcirlas directamente en el portaobjetos de forma manual. La estructura celular está mejor preservada porque las células son fijadas inmediatamente. Las laminillas se preparan bajo el control del laboratorio citológico, evitando la heterogeneidad en el muestreo manual. La uniformidad de la monocapa creada por estos métodos hacen que sea más fácil la lectura para un técnico, el proceso previene el uso de artefactos que secan la muestra y remueve la mayoría de los contaminantes como moco, proteínas, células rojas, bacterias y levaduras (Burd, 2003). La variación del epitelio normal o en condiciones inflamatorias benignas como una reserva de hiperplasia celular o atipia inflamatoria, da surgimiento a un número significativo de falsos positivos. Esto lleva a repetir la prueba citológica innecesariamente, a investigaciones clínicas más invasivas, y posible tratamiento excesivo, representando un problema innecesario para la participación de las mujeres en programas de monitoreo cervical y un costo adicional tremendo (Klaes y col., 2001; Salmerón y col., 2003). Sin embargo, muestreos más sensibles también clasificarán como anormales más lesiones y más infecciones que serán eliminadas sin tratamiento (Schiffman y col., 2007). Por lo que los biomarcadores moleculares son muy prometedores como indicadores objetivos y precisos del proceso de la patogenética (Steinau y col., 2007).

## II.2 Virus de Papiloma Humano.

Aunque la infección por el virus del papiloma humano (VPH) es extremadamente frecuente y está implicada como un factor etiológico en el cáncer cervicouterino (CaCu), poco se sabe sobre muchos hechos básicos relacionados a la historia natural, condiciones de la infección y riesgo de progresión a premaligno y lesiones

malignas. La célula infectada por el VPH tiene varios cambios en función o en la expresión de genes del huésped, y la detección de estos cambios pueden jugar un papel muy importante en la detección y seguimiento de pacientes infectados (Godoy y col., 2008).

El VPH pertenece a la familia *Papovaviridae*, formada por virus sin envoltura y hay alrededor de 100 tipos diferentes de VPH que han sido identificados basados en el análisis de las secuencias del ADN, el cual han sido asociados con las infecciones en sitios epiteliales específicos. En un nivel evolucionario, los VPH caen en un número de distintos grupos o géneros, y las lesiones que causan tienen diferentes características. El grupo más grande de los VPH es el Alfa y es el grupo que contiene los tipos de mucosa/genital. Más de 30 tipos diferentes de VPH son conocidos por infectar epitelio cervical, por ser transmitidos sexualmente y algunos de estos están asociados con lesiones que pueden progresar a cáncer. Estos VPH asociados a cáncer son clasificados como tipos de VPH de alto riesgo. Los tipos de VPH restantes se clasifican en intermediarios o de bajo riesgo dependiendo en la frecuencia con la que se encuentran en los cánceres (Doorbar, 2006; García-Tamayo y col., 2010). Los tipos VPH de bajo riesgo como el tipo 6 y 11, están asociados a verrugas genitales que no progresan a cáncer (Beaudenon y Huigregtse, 2008). Los tipos VPH de alto riesgo vienen predominantemente con mayor frecuencia de los grupos Alfa 9 y Alfa 7, siendo los tipos de VPH16 y VPH18 de mayor prevalencia (Doorbar, 2006).

Todos los VPH comparten ciertas características, no tienen envoltura y contienen un ADN circular de doble cadena en una cápside icosaedral (García-Tamayo y col., 2010). Aunque el genoma viral puede variar ligeramente en tamaño entre diferentes tipos de VPH, típicamente contienen alrededor de 8000pb (7904pb para el VPH16) y codifica para ocho o nueve ORFs (Marcos de lectura abierta, por sus siglas en inglés). El genoma está dividido en tres regiones: la región larga de control (LCR por sus siglas en inglés) que no tiene potencial para codificar, la región de las proteínas tempranas (E1-E8) y la región de las proteínas tardías (L1 y L2). La envoltura del virus (los capsómeros) está compuesta por dos proteínas

estructurales: L1 que forma el 80% de la partícula viral, con 72 pentámeros, constituye la proteína mayor de la cápside, y L2, la proteína menor de la cápside, con cerca de 72 copias. La L2 es capaz de formar partículas virales incompletas que no son infecciosas y se han denominado “partículas parecidas a virus” (VLPs por sus siglas en inglés). Ambas proteínas juegan un papel importante modulando la eficiencia de la infección viral (Figura 3) (Doorbar, 2006). La replicación del genoma del VPH es vitalmente dependiente de la maquinaria de replicación del ADN de la célula huésped, como se ha visto en otros virus de ADN pequeño (P syrri y DiMaio, 2008).

La infección por virus del papiloma necesita que las partículas virales ganen acceso a las capas basales epiteliales y entrar a las células basales en división.

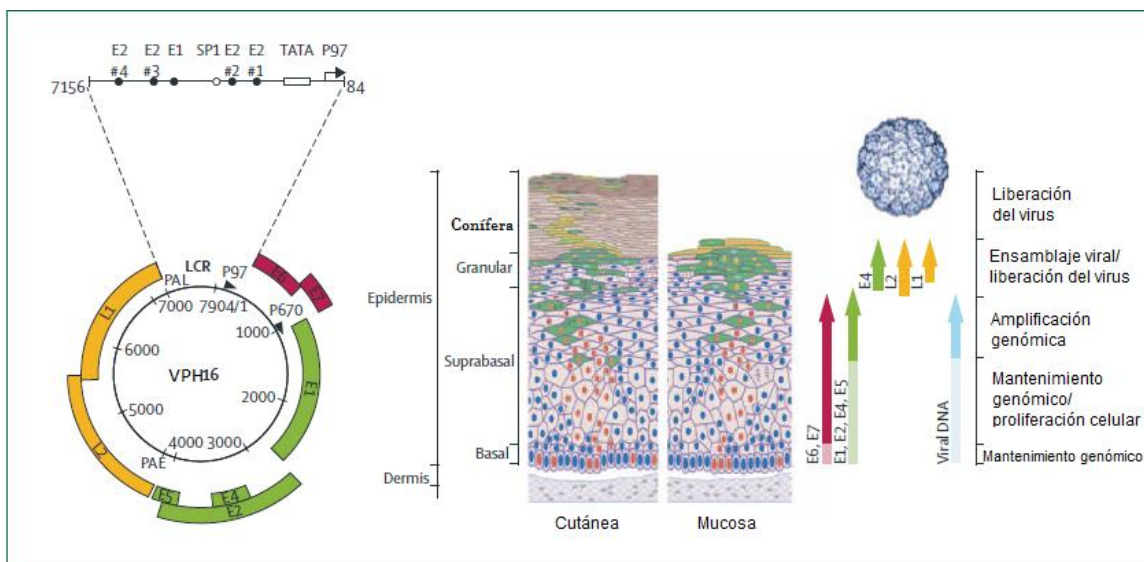


Figura 3. Organización del genoma del VPH y el ciclo de vida del virus. Los genes del VPH son designados como E o L dependiendo de su expresión temprana (E) o tardía (L) en las diferentes fases del epitelio. El genoma viral se mantiene en la capa basal del epitelio, donde la infección por VPH es establecida. Las proteínas tempranas son expresadas en bajos niveles para el mantenimiento genómico (aumentando la posibilidad de un estado de latencia) y proliferación celular. Mientras las células del epitelio basal se diferencian, el ciclo de vida viral va a través de fases exitosas de amplificación genómica, ensamblaje viral, y liberación del virus, con cambios relacionados en el patrón de la expresión de genes tempranos a genes tardíos (Doorbar, 2006).



Las partículas de los VPH son introducidas en la célula lentamente después de la unión y se desensamblan en endosomas tardíos y/o lisosomas, con la transferencia del ADN viral al núcleo siendo facilitada por la proteína de la cápside menor L2. El tiempo entre la infección inicial y la aparición de papilomas productivos puede variar dependiendo de la carga viral y la naturaleza del tipo del virus de papiloma, se ha sugerido que la latencia resulta cuando la carga viral es muy baja. La infección lleva al establecimiento del genoma viral como un episoma estable (sin la integración en el genoma celular del hospedero) en células de la capa basal y se cree que requiere la expresión de proteínas virales de replicación, E1 y E2 (Doorbar, 2006). La integración viral en el genoma celular del hospedero ocurre río abajo de los genes tempranos E6 y E7, normalmente en la región de E1 y E2; este rompimiento resulta en la pérdida de un control de retroalimentación negativa de la expresión oncogénica por las proteínas virales reguladoras E2. Los transcritos derivados de la integración son más estables que los derivados del ADN viral episomal (Woodman y col., 2007).

Las proteínas E1 y E2 son necesarias para la replicación extracromosómica del virus y existen para poder completar el ciclo vital del virus. Las proteínas E1 y E2 se van a unir a secuencias específicas del ADN, de tal modo que E1 es la proteína iniciadora de la replicación, para lo cual las secuencias únicas de E1 en adenina-timina van a estar flanqueadas por dos o tres sitios de unión con la proteína E2; E2 regula la transcripción y es capaz de reprimir algunos promotores que controlan la expresión de los genes E6 y E7 y de esta manera es un regulador de la proliferación celular y de la capacidad de transformación de las células infectadas. En células basales, parece que el genoma viral es replicado con el ADN celular durante la fase S, con los genomas replicados siendo divididos equitativamente durante la división celular. La proteína E4 se expresa en estadios tardíos de la infección cuando se están ensamblando los viriones, en tanto que la proteína E5 en un marco de lectura abierta, está demorada en las células neoplásicas y no es necesaria para mantener la transformación maligna de las células huésped. Es bien conocido que las proteínas E6 y E7 del VPH, son, sin duda alguna, las más

importantes en sus propiedades oncogénicas. Ellas tienen la capacidad de immortalizar y transformar las células del cuello uterino y por otra parte mantienen el ambiente celular para que el genoma viral pueda subsistir mientras no se encuentre incorporado en los cromosomas (García-Tamayo y col., 2010).

En lesiones cervicales causadas por VPH, el aumento de la proliferación de células epiteliales suprabasales es atribuida a la expresión de oncogenes virales E6 y E7. Las células suprabasales normalmente salen del ciclo celular y comienzan con el proceso de diferenciación terminal en orden de producir la barrera protectora que normalmente provee la piel. En células infectadas con el VPH, el control de la progresión del ciclo celular se pierde y la diferenciación terminal normal no ocurre. El mecanismo básico por el cual el virus de papiloma estimula la progresión del ciclo celular es bien conocido y es similar a la manera en la que otros virus tumorales desregulan el crecimiento celular (Figura 4).

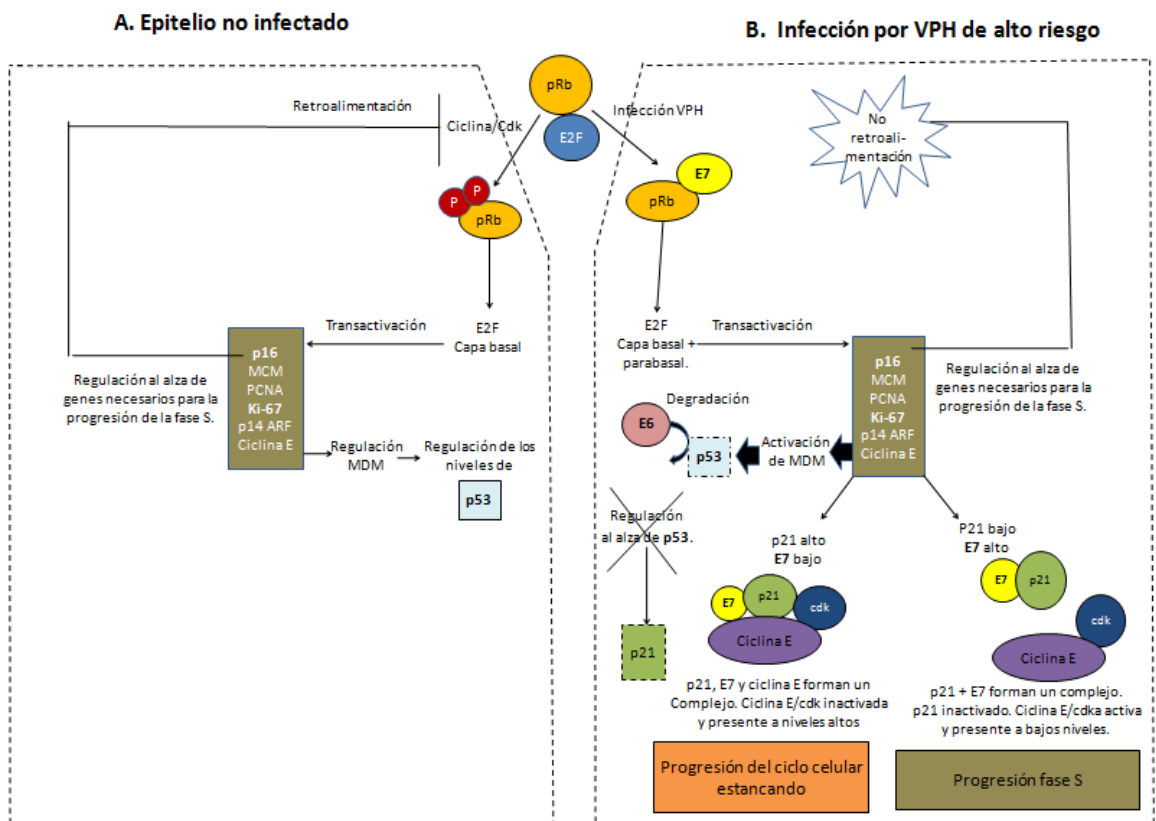


Figura 4. Estimulación de la progresión del ciclo celular por VPH de alto riesgo. La

infección por VPH lleva a la desregulación del ciclo celular. La regulación de proteínas expresadas en epitelio no afectado se muestra en (A). En la presencia de VPH de alto riesgo (B), la regulación de proteínas necesarias para la proliferación celular está alterada, permitiendo que el VPH estimule la entrada a la fase S en las capas epiteliales superiores (Doorbar, 2006).

E7 se asocia con pRb [proteína Rb (retinoblastoma)] y otros miembros de esa familia de proteínas e interrumpe la asociación entre pRb y la familia E2F de los factores de transcripción, independientemente de la presencia externa de los factores de crecimiento. E2F subsecuentemente transactiva proteínas celulares requeridas para la replicación del ADN viral como ciclina A y E. E7 también se asocia con otras proteínas involucradas en la proliferación celular, incluyendo deacetilasas de histonas, componentes del complejo de la transcripción AP1, e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, p21 y p27. Durante la infección natural, sin embargo, la habilidad de E7 para manejar la proliferación celular se ve inhibida en algunas células, dependiendo de los niveles de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina p21 y p27. La función de la proteína viral E6 complementa la de E7, y en los tipos de VPH de alto riesgo, las dos proteínas son expresadas juntas de una simple especie de ARNm policistrónico. Un papel primario de E6 es su asociación con p53 el cual, en el caso de los tipos de VPH de alto riesgo, modula la ubiquitinación y degradación de p53. Esto es para prevenir el arresto celular o apoptosis en respuesta a la entrada al ciclo celular modulado por E7 en las capas superiores epiteliales. El papel de E6 es clave en el desarrollo del cáncer cervical, ya que compromete la efectividad de la respuesta celular al daño al ADN y permite que la acumulación de mutaciones secundarias pase desapercibida.

Las bases moleculares de los cambios entre una lesión NIC 1 y cáncer cervical no están completamente comprendidas, pero muchas reflejan cambios en los niveles de expresión de E6 y E7 que ocurren después de la integración del genoma viral en el cromosoma celular del hospedero (Figura 5). El ADN del VPH integrado es encontrado en la mayoría de los cánceres invasivos y en algunas lesiones de alto grado, pero también puede ser encontrado en algunas lesiones NIC 1, y se ha sugerido que la integración sea un evento temprano en la progresión a cáncer.

Aunque la base molecular por la inestabilidad genómica modulada por E7 no está completamente entendida, parece en parte que es independiente a la tan bien caracterizada asociación de E7 con las proteínas Rb, p107 y p130. La asociación de E7 con estas proteínas, sin embargo, contribuye a la habilidad de E7 para estimular la proliferación celular, siendo la unión de E7 de alto riesgo y Rb más eficiente que las proteínas E7 de bajo riesgo. Las proteínas E7 de alto riesgo también son capaces de modular la degradación de Rb a través del mecanismo dependiente de proteosoma, el cual es importante para que E7 module la transformación celular. Como E7, la proteína E6 también difiere en su función entre los tipos de VPH de alto y bajo riesgo. Una de las más importantes en relación a la progresión a cáncer es la habilidad de las proteínas E6 de alto riesgo de formar un complejo tripartita con p53 y la ligasa celular de ubiquitinación E6AP (proteína asociada a E6, por sus siglas en inglés, *E6-associated protein*), que lleva a la degradación de p53 modulada por proteosoma. Las proteínas E6 de bajo riesgo se unen a p53 con una afinidad más baja que las de alto riesgo, y no tienen la habilidad de unirse a E6AP y estimular la degradación de p53. La pérdida de la respuesta al ADN dañado modulado por p53 en células expresando VPH E6 de alto riesgo predispone a la acumulación de cambios secundarios en el cromosoma de la célula hospedera que eventualmente llevará a cáncer (Doorbar, 2006).

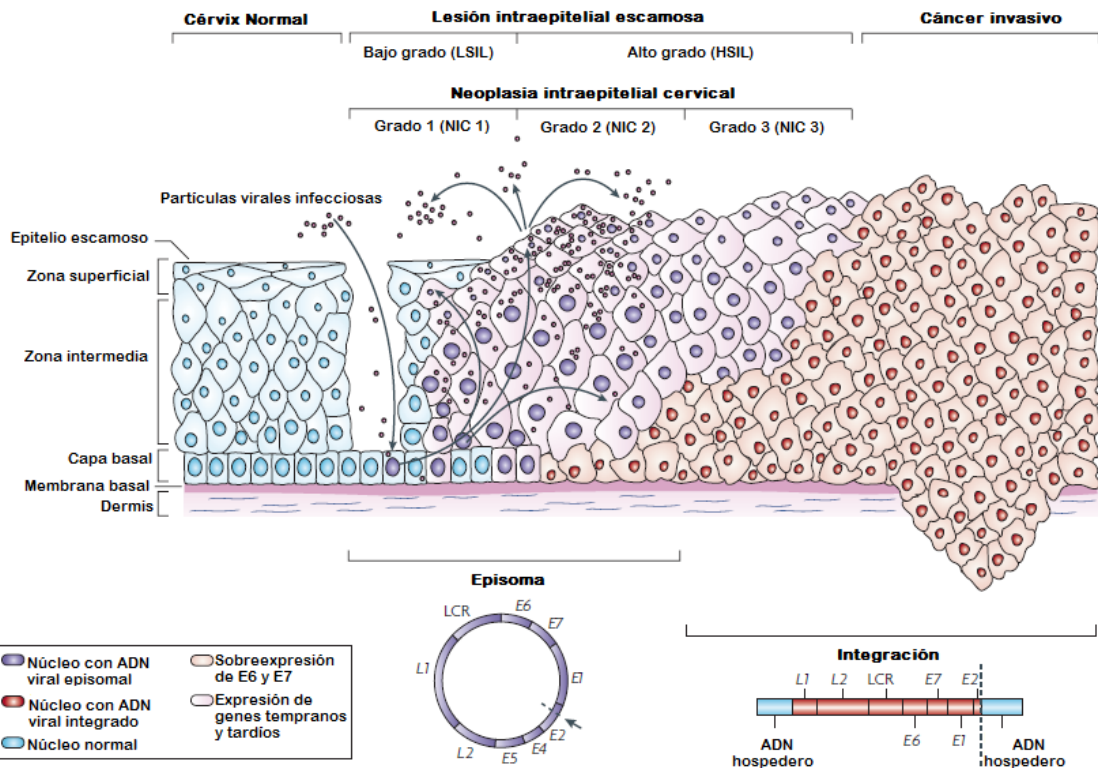


Figura 5. Progresión a cáncer cervicouterino modulado por VPH. Las células basales del epitelio cervical descansan en la membrana basal, la cual es soportada por la dermis. Se cree que el virus del papiloma humano VPH ingresa a las células basales a través de micro-abrasiones en el epitelio cervical. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado soportan una replicación viral productiva. Un número desconocido de infecciones por VPH de alto riesgo progresarán a neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (NIC 3). La progresión de lesiones sin tratamiento de cáncer microinvasivo a invasivo está asociada con la integración del genoma del VPH en el cromosoma del hospedero (núcleo rojo), con la pérdida asociada o disrupción de E2, y la subsecuente regulación al alza de la expresión de los oncogenes E6 y E7. LCR, región larga de control (Woodman y col., 2007).

### II.3 Proteína bcl-2

El proceso de carcinogénesis está asociado con el aumento de la estimulación del crecimiento celular, pérdida de la supresión de crecimiento, alteraciones en la observación inmune y cambios en apoptosis. Varias proteínas de la familia de genes bcl-2 han sido implicadas en la regulación de la apoptosis y proliferación celular. El gen bcl-2, localizado en el cromosoma 18, codifica para una proteína de

26 kDa que se localiza en la mitocondria, el retículo endoplásmico liso y la membrana perinuclear.

bcl-2 ha sido encontrado para prevenir apoptosis en vez de promover la proliferación celular (Crawford y col., 1998). La proteína de supervivencia, bcl-2, bloquea la apoptosis y usa su influencia para potenciar la supervivencia celular en lugar de estimular la división celular. Se ha postulado que bcl-2, por inhibir la apoptosis, retarda la tasa de proliferación en tumores y por lo tanto resulta en un crecimiento tumoral lento con un efecto favorable (Looi y col., 2008).

La habilidad de bcl-2 para inhibir la apoptosis es dependiente a la expresión de bcl-2 y en la formación de hétero- u homodímeros entre los miembros de la familia de bcl-2. El homodímero bax-bax favorece la muerte celular, mientras el heterodímero bax-bcl-2 favorece la viabilidad celular. La expresión de bcl-2 está asociada con una mejor supervivencia en pacientes con tumores sólidos. Parece haber una relación inversa entre p53 y bcl-2 en cáncer de mama, de ovario y linfoma. Esto sugiere una interacción entre estos dos factores en la regulación de la apoptosis. Varios estudios en cáncer cervicouterino (CaCu) han demostrado que hay una ventaja de supervivencia en pacientes bcl-2 positivos (Saegusa y col., 1995; Crawford y col., 1998).

#### II.4 Proteína p53

El supresor de tumores p53, localizado en el cromosoma 17, que codifica una proteína de 53 kDa, es un jugador clave en respuesta al estrés para preservar la estabilidad genómica, responde a una variedad de estímulos incluyendo el daño al ADN, hipoxia, estrés metabólico y activación metabólica. Es un factor de transcripción que modula genes contra el crecimiento celular, en los que se incluye el arresto del ciclo celular, apoptosis, mantenimiento de la integridad genética, inhibición de la angiogénesis y senescencia celular. Bajo circunstancias normales, condiciones no estresantes, un regulador negativo clave de p53 es MDM2, el cual se une al dominio de transactivación de p53 y ubiquitina la proteína, marcándola para su degradación. Ya que la transcripción de p53 activa a MDM2, los niveles de

expresión de p53 y MDM2 son balanceados a través de retroalimentación negativa, el cual se altera por un incremento en los niveles de p53 debido a un estrés como daño al ADN.

p53 controla múltiples funciones celulares que inducen o reprimen genes diana con los elementos responsivos de p53. Estas incluyen genes involucrados en el arresto del ciclo celular como CDKN1A, que codifica para p21; genes involucrados en la apoptosis como BBC3 (Componente de unión 3 al bcl-2, por sus siglas en inglés, *bcl-2 binding component 3*, también conocido como PUMA), BAX (bcl-2 asociado a X) y PERP (efector de apoptosis por p53 relacionado a PMP22). La respuesta de los elementos unidos a p53 es regulada por la estructura y conformación de p53, las modificaciones post-traduccionales de p53 y la estructura y secuencia de los elementos responsivos. Los efectos de p53 en funciones celulares también son mediados por interacciones proteína-proteína. La proteína p53 se une a miembros de la familia Bcl-2, aumentando la permeabilidad mitocondrial para liberar las moléculas intermembranales mitocondriales que participan en eventos apoptóticos río abajo (Whibley y col., 2009). El mal funcionamiento o la ausencia de p53 permite la división celular acelerada y promueve la inestabilidad genética, facilitando la transformación maligna (Koivusalo y col., 2005).

La oncoproteína E6 de virus del papiloma humano (VPH) ha sido demostrada en reclutar la proteína ligasa-ubiquitinasa celular E6AP para marcar a la proteína supresora de tumores p53 para su degradación modulada por ubiquitina-proteosoma. Bajo condiciones normales de crecimiento, la degradación de p53 está modulada principalmente por MDM2, donde hay evidencia que E6AP no participa en la degradación de p53. Esto indica que E6 puede marcar a p53 para su degradación bajo condiciones en las que la vía normal para la degradación de p53 está inactiva (ejemplo por el daño al ADN), usando la proteína ubiquitina-ligasa (E6-AP), que normalmente no se involucra en la degradación de p53 (Hengstermann y col., 2001). En cáncer cervical, aún el recurrente, es raro ver el gen p53 mutado, pero la proteína p53 es constantemente marcada para su degradación por la proteína VPH E6 (Koivusalo y col., 2005; Looi y col., 2008).

La proteína p53 no se expresa en el epitelio cervical normal. No siempre se observa inmunomarcaje para la proteína p53 en cáncer cervicouterino (CaCu); sin embargo algunos consideran que la presencia de p53 se incrementa con los grados de NIC y con la malignidad, por lo que han planteado que esta proteína debería detectarse en el CaCu ya que la infección con VPH de alto riesgo es la responsable de la sobreexpresión de p53 (García-Tamayo y col., 2009).

## II.5 Proteína p16.

p16, producto del gen CDKN2A(MST1, INK4a), ubicado en el cromosoma 9p21, es un supresor de tumores perteneciente a la familia de inhibidores de ciclinas dependientes de cinasas INK4, de 16 kDa, que interviene en la regulación de la fase G1 del ciclo celular; por lo que es una proteína reguladora negativa del ciclo celular, ya que inhibe el ciclo celular previniendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) y el cual el aumento en su expresión ha sido asociada con la displasia y neoplasia epitelial del cérvix por infección del virus del papiloma humano (VPH) (Laconis y col., 2007; Conesa-Zamora y col., 2009; García-Tamayo y col., 2010).

p16 inhibe la fosforilación de pRb por el complejo ciclinaD-Cdk4/Cdk6. pRb hipofosforilado se une a los factores de transcripción E2F y los inhibe en la fase G0 y G1 temprana del ciclo celular. En células proliferando, los CDKs fosforilan a pRb; la fosforilación de pRb libera a E2F e induce genes que modulan la entrada a la fase S. Existe una retroalimentación regulada en la vía de pRb/p16: la transcripción de p16 es reprimida por Rb. En células tumorales que han perdido la función de pRb, la transcripción de p16 está activada (Sano y col., 1998; Ivanova y col., 2007).

Se ha demostrado que las células infectadas con VPH, tienen una sobreexpresión de p16 mediada por el factor de transcripción E2F. A pesar de los altos niveles de p16, las células infectadas con VPH siguen proliferando, porque Rb, el blanco de la actividad inhibitoria de p16, es inactivado por la oncoproteína VPH E7. p16 ha sido comprobado como un marcador sensible de células con activa expresión de la oncoproteína E7 (Laconis y col., 2007; Reimers y col., 2007); ya que la



sobreexpresión de p16 ha sido demostrado en la mayoría de los tejidos cervicales precancerosos y cancerosos, mientras que en tejido normal, la expresión de p16 es encontrada raramente, debido a que p16 no está asociado con la proliferación, pero sí con senescencia y arresto del ciclo celular, (Cuschieri y Wentzensen, 2008). Numerosos estudios inmunohistoquímicos han demostrado que una pequeña proporción de lesiones NIC 1 se tiñen positivamente para p16, una alta proporción de NIC 2 se tiñen positivo y la gran mayoría de lesiones NIC 3 y cáncer cervical tiñen positivo. Además varios estudios sugieren que las lesiones p16 positivas se comportan como verdaderos precursores de lesiones. Por lo que, hay considerables datos que sugieren que la inmunotinción de p16 pueden ayudar a identificar lesiones NIC 2, 3 que se comportarán como verdaderos precursores de la lesión (Zhang y col., 2006; García-Tamayo y col., 2009).

### **III. HIPÓTESIS**

La sobreexpresión de las proteínas moleculares bcl-2, p53 y p16 indican la transición en las neoplasias intraepiteliales cervicales a cáncer cervicouterino.

## **IV. OBJETIVOS**

### IV.1 General

Determinar si los marcadores moleculares bcl-2, p53 y p16 son indicativos de la transición de neoplasia intraepitelial cervical a cáncer cervicouterino.

### IV.2 Específicos

- Detectar la expresión de marcadores moleculares del ciclo celular: bcl-2, p53 y p16, en un grupo de pacientes con citología normales del estado de Querétaro.
- Detectar de manera semi-cuantitativa la expresión de los marcadores moleculares en las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC 1, NIC 2, NIC 3) y CaCu epidermoide *in situ*.
- Relacionar la expresión de los marcadores moleculares con NIC 1, NIC 2, NIC 3 y CaCu epidermoide *in situ*.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales y reactivos

#### V.1.1 Material biológico

Se procesaron células cervicales obtenidas por raspados endocervicales de ochenta pacientes que acudieron entre mayo y noviembre del 2011 al Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer de la SESEQ y al Hospital General San Juan del Río que presentaron neoplasia intraepitelial cervical o con cáncer cervicouterino. Se tomaron también muestras de pacientes con citologías normales. Las muestras se tomaron con un cepillo cervical citobrush. Inicialmente se removió el exceso de moco sin rozar la superficie cervical. Posteriormente se utilizó un cepillo cervical (citobrush) para barrer la zona exocervical, la zona de transformación y el endocérvix. Las muestras colectadas fueron colocadas en un tubo con buffer de fosfatos salino (PBS) y fueron almacenadas en refrigeración a 2-8°C hasta su procesamiento. Se tomó una segunda muestra utilizando un nuevo citobrush y se colocaron en un tubo con PreservCyt/ThinPrep para realizar la prueba de monocapa líquida.

Se excluyeron las muestras que no contuvieran la cantidad suficiente de células para poder llevar a cabo el estudio.

#### V.1.2 Materiales y equipo de laboratorio

- Guantes
- Lentes de seguridad
- Hielera
- Tubos de 15 ml y 50 ml (Falcon)
- Tubos de 1.5 ml y 2.0 ml (Eppendorf)
- Gradillas
- Vórtex (Scientific Industries)
- Espectrofotómetro (Bio-rad Smartspe Plus)
- Microcentrífuga (Eppendorf)

- Refrigerador (4°C)
- Congelador (-20°C)
- Ultracongelador (REVCO)
- Micropipetas (Transferpette)
- Puntas para micropipetas con filtro
- Membranas PVDF Hybond-P (Amersham)
- Aparato para electroforesis (Bio-rad)
- Fuente de poder (Bio-rad)
- Aparato de transferencia semiseca (Bio-rad)
- Revelador de quimio-lumiscencia (Amersham)
- Autoradiografías (Amersham)
- Programa GeneSys (Syngene)
- Tubos PreservCyt/ThinPrep (Cytoc Corp)

#### V.1.3 Reactivos

- Hielo seco
- Tampón de lisis NP40 al 10%
- Inhibidores de proteasas (Sigma)
- PBS (Sigma)
- Tween 20 (Bio-rad)
- Leche desnatada en polvo
- Anticuerpos monoclonales de ratón para  $\beta$ -actina, p16, p53, y bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo de cabra anti-ratón IgG conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology)
- Tris base (Bio-rad)
- Bradford (Bio-rad)
- Albúmina de suero bovino (BSA), [2mg/mL] (Bio-rad)

## V.2 Métodos

### V.2.1. Procesamiento de las muestras

Una vez que se llegaban las muestras, se procesaban inmediatamente retirándoles el moco y se centrifugaban a 1450rpm por 5min se retiraba el sobrenadante, se resuspendía en 1mL de PBS y se dividía en dos. Una parte se usaba para la extracción de ARN y otra para la extracción de proteínas. A la parte que era para extracción de proteínas se le realizaba un lavado más a 3000rpm por 5min con 1mL de PBS, se retiraba todo el sobrenadante y se procedía a la extracción de proteínas.

### V.2.2 Extracción de proteínas

Al botón de células que se obtenía para la extracción de proteínas se le añadían 48µL de buffer de lisis (150mM NaCl; 50mM Tris), 6µL de NP40 al 10% y 6µL de inhibidores de proteasa; se resuspendía, se vortexeaba y se dejaba en hielo por 30min; al terminar se volvía a vortexear y se centrifugaba a 13000rpm, 10min y se recuperaba el sobrenadante.

### V.2.3. Electroforesis

Las proteínas totales fueron cuantificadas usando el método de Bradford, se usó albúmina de suero bovino como estándar. Concentraciones equivalentes de 30µg de proteínas totales se mezclaban con el buffer de carga, se hervían a 95°C por 6min e inmediatamente se ponían en hielo; se centrifugaban por 1min y se cargaban en geles de electroforesis al 12% de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) para ser separadas a 70v por el tiempo en el que pasaban el gel concentrador y de ahí se aumentaba el voltaje a 140v por 1.5hr.

### V.2.4. Western blot

Las proteínas una vez separadas eran transferidas a membranas PVDF Hybond-P, con el aparato de transferencia semiseca a 0.1A por 1hr. Las membranas fueron

bloqueadas con 5% de leche desnatada en polvo en buffer de fosfatos salinos con 0.1% de Tween 20 (PBS-T) por 1hr; seguido de 4 lavados de 6min., con PBS-T; luego una incubación con anticuerpos primarios en 5% de leche desnatada en PBS-T toda la noche a 4°C. La detección del Western se realizó incubando cada membrana simultáneamente con la proteína de interés y  $\beta$ -actina como control de carga en una concentración 1:100. Las proteínas fueron detectadas con los siguientes anticuerpos: bcl-2, p16 y p53. Subsecuentemente, la membrana fue lavada 4 veces con PBS-T por 6min., e inmediatamente incubada con el anticuerpo secundario cabra anti-ratónIgG HRP a una concentración 1:5000. Para finalizar se realizaron 4lavados por 6min., con PBS-T y se procedió al revelado, agregándole a cada membrana 1mL de la solución reveladora, incubando 5min a temperatura ambiente y colocándolo en la cámara oscura para tomar la foto.  $\beta$ -actina fue usada como control de carga y todas las cuantificaciones fueron normalizadas contra  $\beta$ -actina en cada fila. Las imágenes fueron tomadas usando el sistema de imagen Genesys y analizadas usando el software obtenido por el proveedor.

#### V.2.5 Análisis estadístico

El diseño fue completamente al azar donde para cada tipo de lesión se tomó una muestra aleatoria de 5 pacientes o más. Las mediciones para cada marcador se hicieron en cada una de las muestras. La medición se hizo comparando el porcentaje de densidad de la banda de cada proteína de interés respecto al porcentaje de densidad de la banda de  $\beta$ -actina de cada paciente. Debido al número de observaciones, la distribución no fue normal y por lo tanto se utilizaron métodos no paramétricos. Para determinar diferencias entre los grupos de lesión para los niveles de presencia de los marcadores correspondientes se utilizó la prueba de las medianas y de Kruskal-Wallis.

## VI. RESULTADOS

Se estudiaron 40 muestras de pacientes, 5 con citología sana (12.5%), 16 con neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (NIC 1) displasia leve (40%), 7 con NIC 2 displasia moderada (17.5%), 6 con NIC 3 displasia grave (15%) y 6 con cáncer *in situ* (15%).

Primero se probó la especificidad de los anticuerpos monoclonales en células SiHa de cáncer cervicouterino, virus de papiloma humano VPH 16 positivo; como se muestra en la Figura 6.

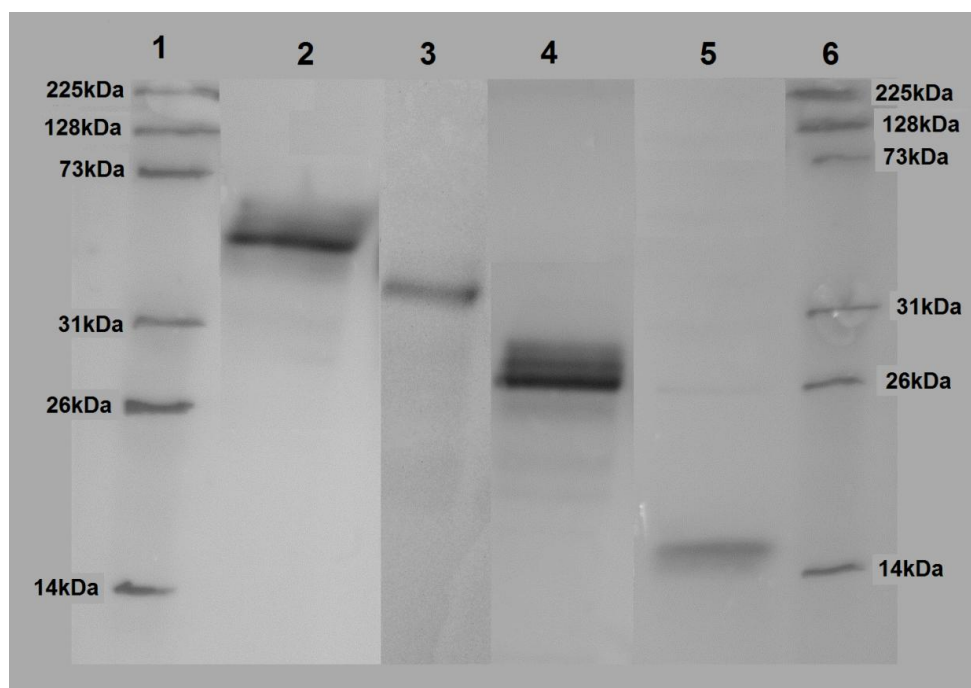


Figura 6. Prueba de especificidad de los anticuerpos monoclonales. Western blot de p53,  $\beta$ -actina, bcl-2 y p16 en células SiHa VPH 16 positivo. Carriles 1 y 6 marcador de peso molecular. Carril 2 p53 (53kDa); carril 3  $\beta$ -actina (43kDa), carril 4 bcl-2 (26kDa) y carril 5 p16 (16kDa).

Después se logró la detección de los marcadores moleculares bcl-2, p53 y p16 en los diferentes estadios de las lesiones preinvasoras (NIC), sanas y cáncer cervicouterino *in situ* (Figura 7).



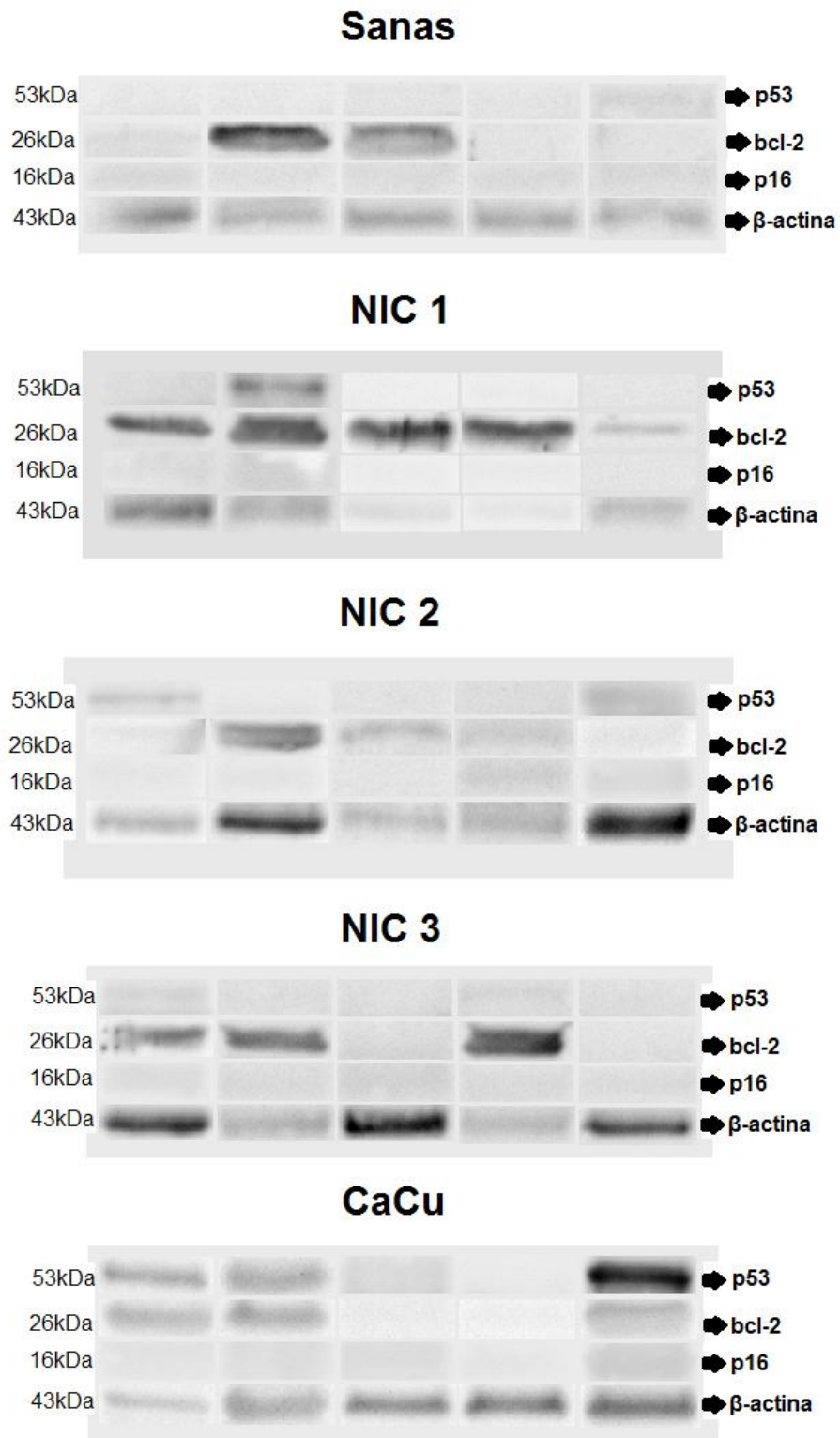


Figura 7. Expresión de las proteínas bcl-2, p53 y p16 extraídas de raspados cervicales de pacientes sanas, displasia leve (NIC 1), displasia moderada (NIC 2),

displasia severa (NIC 3), y cáncer cervicouterino (CaCu), por medio del Western blot.  $\beta$ -actina fue usada como control de carga.

### VI.1 Detección de bcl-2

bcl-2 es una proteína de supervivencia celular. Esto significa que cuando hay altos niveles de dicha proteína, la célula hará todo lo posible por mantenerse viva, inducirá todo tipo de sistemas de defensa y detendrá la apoptosis, aun y cuando la célula se encuentre dañada genéticamente (Luna-López y col., 2008). En el Cuadro 1 se representan las semicuantificaciones de la detección de la proteína bcl-2 y en la Figura 8 se representan los promedios de la expresión de bcl-2 en los diferentes estadios de las lesiones preinvasoras (NIC), cáncer cervicouterino *in situ* y sanas. Se observa que bcl-2 fue detectado en todos los estadios, cáncer y sanas; pareciendo haber un ligero incremento en las células con displasia leve y una ligera disminución en células cancerosas a comparación de los demás.

Cuadro 1. Estadísticas descriptivas de los valores de bcl-2 en pacientes sanas, displasia leve (NIC 1), displasia moderada (NIC 2), displasia severa (NIC 3) y cáncer cervicouterino *in situ* (CaCu).

	Sanas	NIC 1	NIC 2	NIC 3	CaCu
N	5	16	7	6	6
Mínimo	0.12	0.1	0.06	0.07	0.07
Máximo	3.16	19.85	1.15	7.33	1.22
Media	1.079	5.85	0.843	2.287	0.495
Desviación estándar	1.33	8.61	1.06	3.1	0.5
Mediana	0.26	1.323	0.45	0.59	0.35
Jerarquía mediana	12	24	16	19.5	13

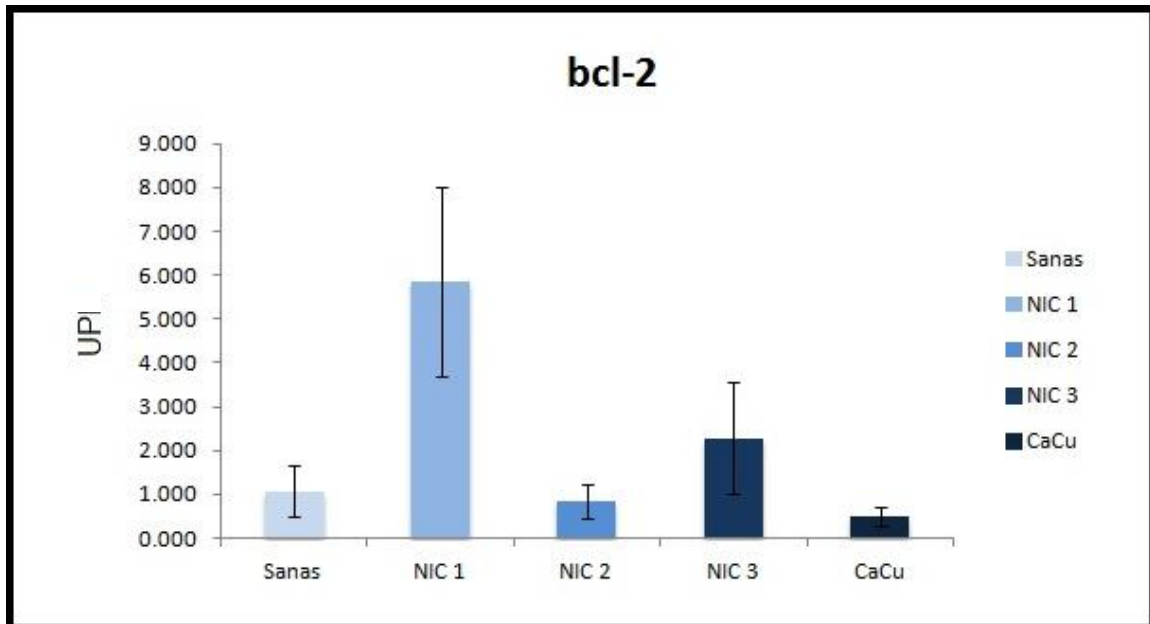


Figura 8. Expresión de la proteína bcl-2 en los diferentes estadios de las lesiones preinvasoras (NIC), cáncer cervicouterino *in situ* y sanas. Las barras representan la media de la concentración  $\pm$  la desviación estándar de las muestras analizadas. UP, unidad porcentual.

En la prueba de las medianas se encontró que no existe diferencia significativa entre las poblaciones debido a que  $1.92 < 9.49$ , el valor crítico de ji-cuadrada con  $\alpha=.05$ . Se realizó también la prueba de Kruskal-Wallis, concluyendo que no hay diferencias significativas debido a que la probabilidad de obtener un valor de  $H \geq 4.58$  es menor que 0.05.

## VI.2 Detección de p53

p53 es activada por una amplia variedad de señales de estrés que la célula puede encontrar durante su progresión a malignidad (daño genotóxico, activación oncogénica, pérdida de contacto con células normales, e hipoxia por nombrar algunos), bloqueando la progresión del ciclo celular y promoviendo la apoptosis (Vousden y Prives, 2009). En el Cuadro 2 se representan los valores obtenidos de la expresión de p53. En la Figura 9 se representan los promedios de la expresión de p53 en los diferentes estadios de las lesiones preinvasoras (NIC), cáncer cervicouterino *in situ* y sanas, detectando su expresión en los cinco estadios y

observando un notable aumento de la expresión en muestras con cáncer a comparación de las muestras sanas que obtuvieron la expresión más baja.

Cuadro 2. Estadísticas descriptivas de los valores de p53 en pacientes sanas, displasia leve (NIC 1), displasia moderada (NIC 2), displasia severa (NIC 3) y cáncer cervicouterino *in situ* (CaCu).

	Sanas	NIC 1	NIC 2	NIC 3	CaCu
N	5	16	7	6	6
Mínimo	0.089	0.079	0.087	0.043	0
Máximo	0.269	1.618	0.919	0.774	0.927
Media	0.166	0.423	0.331	0.256	0.583
Desviación estándar	0.07	0.46	0.32	0.28	0.38
Mediana	0.157	0.274	0.183	0.141	0.725
Jerarquía mediana	16	24.5	18	13	34

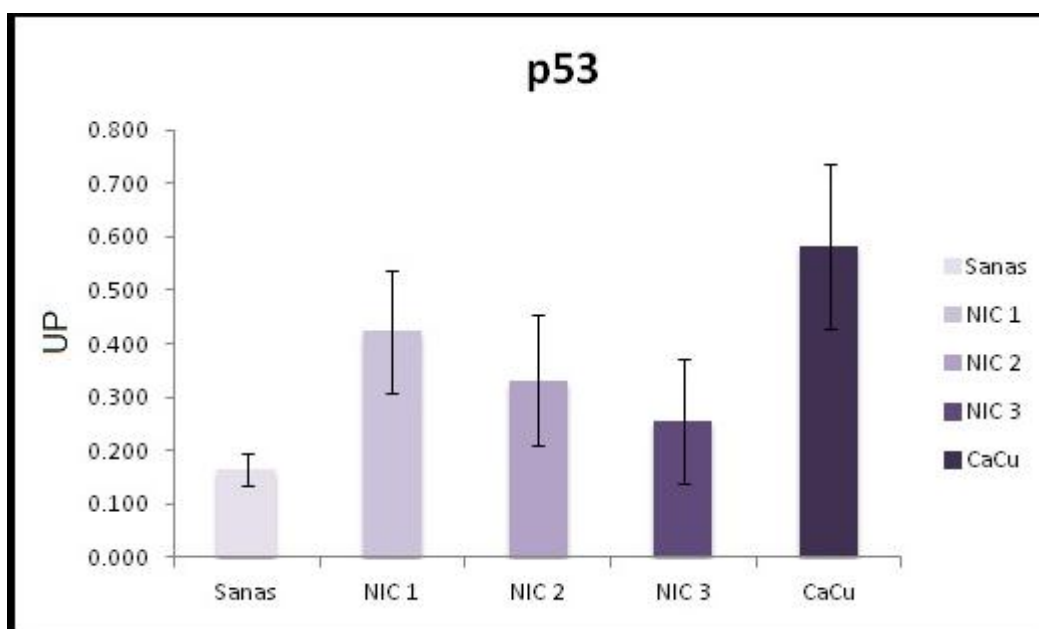


Figura 9. Expresión de la proteína p53 en los diferentes estadios de las lesiones preinvasoras (NIC), cáncer cervicouterino *in situ* y sanas. Las barras representan la media de la concentración  $\pm$  la desviación estándar de las muestras analizadas. UP, unidad porcentual.

La prueba de las medianas concluye que las poblaciones tiene medianas iguales ya que  $5.53 < 9.49$ , el valor crítico de ji-cuadrada con  $\alpha=0.05$ . La prueba de Kruskal-

Wallis también concluyó que las distribuciones de las poblaciones son idénticas debido a que la probabilidad de obtener un valor de  $H \geq 4.52$  es menor que 0.05.

### VI.3 Detección de p16

p16 es una proteína que interviene en la regulación de la fase G1 del ciclo celular; inhibe el ciclo celular previniendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) y el cual la sobreexpresión de p16 ha sido asociada con la displasia y neoplasia epitelial del cérvix por infección del virus del papiloma humano (VPH) (Lacónis y col., 2007; Conesa-Zamora y col., 2009; García-Tamayo y col., 2010). En el Cuadro 3 se representan los valores obtenidos de la expresión de p16. En la Figura 10 se representan los promedios de la expresión de p16 en los diferentes estadios de las lesiones preinvasoras (NIC), cáncer cervicouterino *in situ* y sanas, en la que se observa que p16 fue detectado en todos los estadios, incrementando su expresión ligeramente conforme avanzaba la lesión de sana, a displasia leve (NIC 1), a displasia moderada (NIC 2); pero en la displasia severa (NIC 3) y cáncer hay una disminución en la expresión, siendo estas menor a las sanas.

Cuadro 3. Estadísticas descriptivas de los valores de p16 en pacientes sanas, displasia leve (NIC 1), displasia moderada (NIC 2), displasia severa (NIC 3) y cáncer cervicouterino *in situ* (CaCu).

	Sanas	NIC 1	NIC 2	NIC 3	CaCu
N	5	16	7	6	6
Mínimo	0.138	0	0.125	0.073	0.032
Máximo	0.426	0.998	1.822	0.405	0.465
Media	0.29	0.36	0.48	0.19	0.27
Desviación estándar	0.13	0.29	0.6	0.12	0.16
Mediana	0.283	0.273	0.247	0.167	0.266
Jerarquía mediana	24	22	22	12.5	20.5

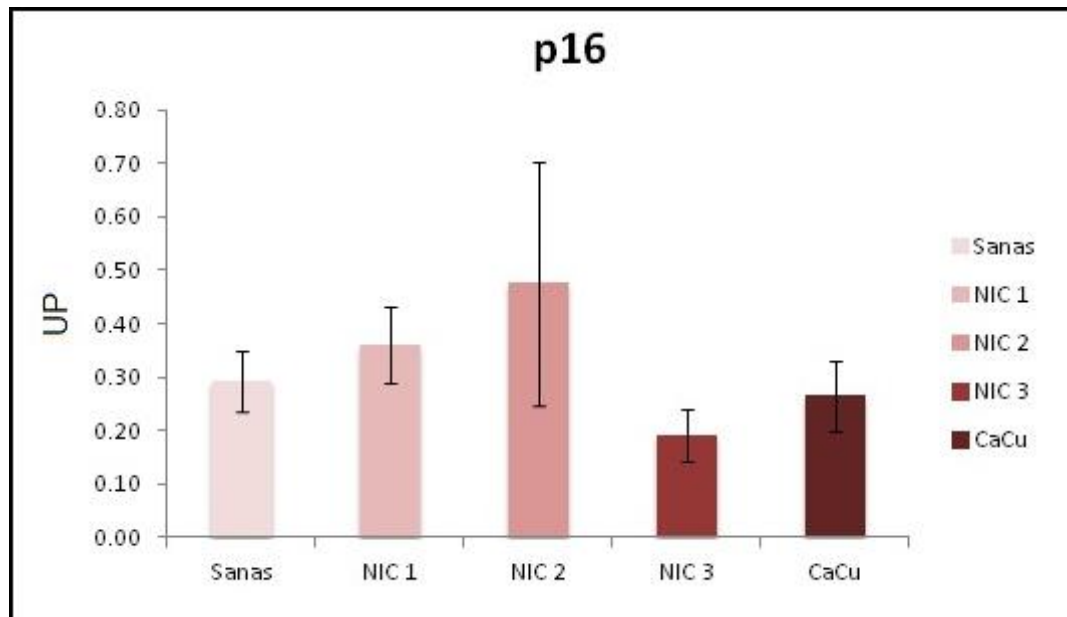


Figura 10. Expresión de la proteína p16 en los diferentes estadios de las lesiones preinvasoras (NIC), cáncer cervicouterino *in situ* y sanas. Las barras representan la media de la concentración  $\pm$  la desviación estándar de las muestras analizadas. UP, unidad porcentual.

Con la prueba de las medianas se encontró que las poblaciones tienen medianas iguales ya que  $2.06 < 9.49$ , el valor crítico de ji-cuadrada con  $\alpha=0.05$ . La prueba de Kruskal-Wallis también concluyó que no hay diferencias significativas debido a que la probabilidad de obtener un valor de  $H \geq 2.63$  es menor que 0.05.

## VII. DISCUSIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es el agente etiológico vinculado con el desarrollo del cáncer cervicouterino (CaCu); se han descrito más de 100 tipos, 40 de ellos pueden infectar la vía genital y 15 de ellos se han catalogado como de alto riesgo para el desarrollo del cáncer del cuello uterino. El tipo 16 es el responsable del 50% de las lesiones acetoblancas diagnosticadas en pacientes de riesgo que acuden a evaluación en clínicas de displasias. En el 25% de las mujeres mexicanas con cáncer uterino se ha identificado al VPH 16 de alto riesgo. La infección por este tipo viral se ha relacionado en mujeres más jóvenes y con neoplasias más agresivas. La edad de la primera relación sexual, el número de parejas sexuales, el tiempo de vida sexual con ellas y la paridad, son factores que influyen en forma directa para el inicio de la enfermedad y su persistencia. El estado hormonal y la anatomía juegan un papel importante, pero no todas las mujeres infectadas con VPH llegan a padecer la enfermedad, lo que indica que se requieren otros factores para que se inicie la carcinogénesis y la manifestación del padecimiento, por lo que la causa se considera multifactorial (Alaniz-Sánchez y col., 2009).

El monitoreo del CaCu sigue siendo una importante preocupación económica y de salud en todo el mundo. Muchos estudios a lo largo de varias décadas han ayudado a elucidar la historia natural y patogénesis de la neoplasia cervical. La incidencia del CaCu y su asociada mortalidad han disminuido en años recientes gracias a la difusión de la implementación de programas de monitoreo como la prueba de Papanicolaou para detectar células anormales cervicales. Métodos como la citología líquida han sido desarrollados para mejorar la habilidad de detectar las lesiones precursoras en los Papanicolaous y han permitido detectarlas en etapas tempranas. Estas estrategias son para minimizar las visitas de seguimiento innecesarias y los procedimientos invasivos sin comprometer la detección de la enfermedad (Burd, 2003). El éxito de las vacunas para VPH abre una nueva era en la prevención del CaCu. La vacunación sin embargo, no elimina el monitoreo. No todas las mujeres serán vacunadas y las mujeres que ya han estado expuestas a los VPH 16 o 18 pueden no ser muy beneficiadas. Además las vacunas sólo cubren

dos o cuatro tipos de VPH causantes de cáncer haciendo que el monitoreo siga siendo obligatorio. (Mayrand y col., 2007).

Las pruebas de ADN, como la captura de híbridos o los kits de monitoreo de VPH para la detección de ADN viral, son pruebas de rutina y herramientas útiles de monitoreo, pero no pueden diferenciar entre infecciones latentes, subclínicas y relevantemente clínicas. Sin embargo, la discriminación del estado infeccioso es importante para el diagnóstico de lesiones precancerosas (Yoshida y col., 2008). Por lo tanto, consideramos que la combinación en la detección de la expresión de las proteínas bcl-2, p16 y p53 por Western blot en raspados cervicales sería una prueba muy útil y poderosa como marcadores predictivos. Por lo que en este estudio, para evaluar la hipótesis, primero vimos si era posible detectar la expresión de las proteínas bcl-2, p16 y p53 en los diferentes estadios de la lesión, en sanas y en cáncer cervicouterino *in situ*. Al confirmar la detección de la expresión de las proteínas en las muestras, relacionamos de manera semicuantitativa la expresión de las proteínas con el grado de lesión.

Crawford y col., en 1998 hicieron un estudio inmunohistoquímico con biopsias de pacientes para detectar bcl-2, y encontraron que las pacientes que en sus biopsias tenían positivo para bcl-2 tenían un 84% de sobrevivir 4 años más con cáncer cervicouterino a comparación del 53% de sobrevivencia en las que tenían negativo. Sin embargo en ese estudio, no quedó claro si las pacientes con casos preinvasivos y bcl-2 positivo hubieran progresado a cáncer o no sin tratamiento. Concluyendo que la identificación de bcl-2 por inmunohistoquímica es un útil factor pronóstico en cáncer cervicouterino (Crawford y col., 1998). En este estudio no se encontraron diferencias significativas en la expresión de bcl-2 entre los diferentes grados de lesión. La mayor expresión de bcl-2 se dio en las displasias leves NIC 1 y la más baja en el cáncer cervicouterino. Estos resultados pueden ser debido a que bcl-2 es una proteína de sobrevivencia, en el que no hay proliferación ni muerte celular. Las lesiones con displasia leve tienen un alto porcentaje de regresión, por lo que una alta expresión de bcl-2 es positiva ya que la lesión tardará o no llegará a aumentar de grado y las células no están tan dañadas como para llevar a cabo la



apoptosis. Que la expresión más baja de bcl-2 haya sido en pacientes con cáncer cervicouterino es razonable debido a que las células están en proliferación y no en estado de senescencia o supervivencia. Aunque la expresión más alta fue en NIC 1 y la más baja en cáncer ninguna de estas alcanzó significancia estadística.

Conesa-Zamora y col., en el 2009 no encontraron diferencia significativa entre la expresión de p53 y los diferentes estadios. Sobre este tema han sido publicados resultados contradictorios: algunos estudios demuestran una correlación significativa entre la expresión de p53 con NIC 3 o cáncer *in situ* a comparación con el cérvix normal o NIC 1 y 2, mientras otros no encuentran asociación significativa. Nuestros resultados concuerdan con los primero estudios y con Conesa-Zamora y col.; la expresión más alta se encontró en pacientes con cáncer y la más baja en pacientes sanas, sin tener diferencia significativa; estos resultados son justificables, debido a que en células que están sanas, los niveles de p53 deben de ser poco detectables y en varios cánceres humanos, p53 normalmente es sobreexpresado como una consecuencia de mutaciones puntuales que interrumpen su actividad transcripcional y causa una regulación baja de proteínas cuya expresión es inducida por p53; una de esas proteínas es MDM2, quien es el principal efector en la regulación negativa de p53; por lo tanto las mutaciones puntuales en el gen de p53 causan una sobreexpresión de la forma inactiva de la proteína. Sin embargo, el mecanismo de inactivación de p53 en carcinogénesis cervicouterina es diferente: la oncoproteína VPH E6 causa la ubiquitinación de p53, y subsecuentemente, la degradación de p53 ocurre en el proteosoma. Este mecanismo de degradación de p53 no excluye que algunos carcinomas cervicales sobreexpresando p53 sean por mutaciones puntuales pero en una frecuencia menor que la observada en otros tumores. Basados en nuestros descubrimientos, la sobreexpresión de p53 no se ve relacionada con la acción de la oncoproteína de VPH y su asociación con el grado histológico no sea tan consistente como en otros tipos de tumores. Otra razón para la falta de una asociación entre p53 y el grado de displasia son los diferentes papeles de los genotipos de VPH para alterar p53 (Conesa-Zamora y col., 2009). Algunos autores han relacionado el aumento en la

expresión de p53 con infecciones de genotipos de VPH de bajo riesgo. Hiller y col., en el 2006 reportaron que en estudios *in vitro* VPH 16 E6 y VPH 18 E6 induce una alta degradación de p53 a comparación de otros VPH menos oncogénicos. Pillai y col., en 1996 encontraron una correlación inversa entre p53 y bcl-2, lo que explica en parte el proceso de progresión del tumor en el cérvix. Porque ha sido documentado que p53 inhibe la expresión de bcl-2, el aumento de la expresión en bcl-2 en la ausencia de (o expresión inactivada de) p53 puede proveer a las células transformadas una ventaja selectiva de sobrevivencia, llevando a la oncogénesis y progresión tumoral. Sobreproducción de la proteína bcl-2 también ha demostrado anular la apoptosis inducida por p53, sugiriendo que si altos niveles de la proteína bcl-2 son producidos, aun cuando p53 tipo silvestre esté presente, puede no ser posible inducir apoptosis. Por lo que el nivel de expresión de bcl-2 puede ser un papel importante en la regulación del crecimiento celular del epitelio cervical. Pillai y col., encontraron una asociación estadísticamente significativa inversa entre la presencia de p53 y el avance de la enfermedad cervical. Todos estos descubrimientos sugieren que las diferentes formas de p53 disfuncional en carcinogénesis cervical puede disfrazar el estado real de la funcionalidad de p53 en estas lesiones (Conesa-Zamora y col., 2009).

La expresión de p16 inmunohistoquímicamente es considerada un marcador útil para la identificación de lesiones premalignas y malignas del cérvix, modulado por VPH. En el presente trabajo, la expresión de p16 no fue significativamente asociada con el grado de displasia, ya que los diferentes estadios expresaron p16 de forma muy parecida, siendo esto muy extraño ya que en los estudios inmunohistoquímicos de Godoy y col., en el 2008 y Conesa-Zamora y col., en el 2009, encontraron que la localización citoplasmática de p16 se vio relacionada con el aumento de grado histológico de lesiones cervicales, no obstante su asociación en ninguno de los dos estudios alcanzó significancia estadística. Pero Zhang y col., en el 2006 y Yu y col., en el 2010 concluyeron que la intensidad de tinción de p16 es un indicador importante para la determinación de NIC de alto grado y que p16 es un excelente biomarcador para el cáncer cervicouterino.

Hasta ahora la mayoría de las investigaciones realizadas para encontrar biomarcadores para el cáncer cervicouterino son realizados en pruebas *in vitro*, en el que todas las muestras son controladas. En este trabajo las pruebas fueron realizadas *in vivo*, por lo que hay muchos factores en los que no se tiene control y la homogenización de las muestras de todas las pacientes es más difícil. Una de las razones por las que pudo no alcanzarse la significancia estadística fue que el estudio se realizó con raspados cervicales y no con biopsias; la recolección de células exfoliadas con citobrush no permite la comparación directa de células normales contra displásicas y tumorales entre el mismo individuo o la estimación de contribución relativa de células normales contra enfermas en cada muestra (Pillai y col., 1996); aparte de que no se supo con exactitud el número de células que se recolectaban en cada raspado. No se sabe con certeza si el diagnóstico de la muestras fue el correcto, pues aunque se determinó el estadio de las muestras por histopatología, la determinación se realizó con la segunda toma de células exfoliadas, haciendo que el diagnóstico no sea el más adecuado pues es probable que la mayoría de las células del mismo paciente con lesiones avanzadas se hayan ido en el primer raspado; asimismo la forma de calificar las lesiones es muy subjetiva, ya que cada patólogo, colposcópico y ginecólogo tienen su propia forma de evaluar la lesión; poniendo en duda si realmente el grado de lesión de la muestra era el más adecuado. No hubo discriminación entre muestras de pacientes que habían recibido tratamiento previo y muestras sin tratamiento. El procesamiento de las muestras no siempre fue al mismo tiempo después de la toma, unas muestras eran procesadas a los 15min., de haber sido tomadas y otras hasta 3hr., después y aunque todas las muestras estuvieron siempre a una temperatura de 2-8°C, las células al ya no estar en su hábitat natural, comienzan a estresarse y empiezan a modificar sus niveles proteicos de expresión, incluso pueden llegar a morir. No se procesaron muestras que tuvieran más de 3hr., de haber sido tomadas. Las muestras fueron tomadas por diferentes ginecólogos donde se desconoce la integridad de su técnica.

Estudios de seguimiento y más pacientes son necesarios para aclarar todas las dudas, sin embargo el objetivo de este estudio era observar si con la detección de la expresión de las proteínas bcl-2, p53 y p16 era posible diagnosticar a la paciente y poder detectar el paso a cáncer cervicouterino; más muestras podrían llevarnos a obtener una diferencia significativa pero no tendría utilidad clínica. El utilizar biopsia en lugar de raspados cervicales podrían hacer que las muestras fueran más significativas aunque aumentaría el costo-efectividad de la prueba. Y lo ideal sería que a lado del consultorio donde se toman las muestras se encontrara el laboratorio para poder procesar las muestras inmediatamente.

## VIII. CONCLUSIÓN

Se logró la detección y la semicuantificación de la expresión de las proteínas del ciclo celular bcl-2, p53 y p16 en raspados cervicales de pacientes de la ciudad de Querétaro y San Juan del Río con citología normal, con diferentes grados de neoplasia intraepitelial cervical (NIC 1, NIC 2 y NIC 3) y con cáncer cervicouterino *in situ*; consiguiendo relacionar su expresión con el grado de displasia, aunque estas no alcanzaron significancia estadística. Más y mejores estudios serán necesarios para poder detectar la transición de neoplasia intraepitelial cervical de alto grado a cáncer cervicouterino.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

**Aguilar-Pérez, JA.** Leyva-López, AG. Angulo-Nájera, D. Salinas, A. Lazcano-Ponce, EC. **2003.** Tamizaje en cáncer cervical: conocimientos de la utilidad y uso de citología cervical en México. *Revista saúde pública.* Vol. 37: 100-106.

**Alaniz-Sánchez, A.** Flores-Grimaldo, J. Salazar-Alarcón, CE. **2009.** Factores de riesgo para el desarrollo de la displasia leve cervical. *Revista facultad de medicina UNAM.* Vol. 52: 69-72.

**Beaudenon, S.** Huigregtse, JM. **2008.** HPV E6, E6AP and cervical cancer. *BMC Biochemistry.* Vol. 9: 147-154.

**Burd, E. M.** Human papillomavirus and cervical cancer. **2003.** *Clinical microbiology reviews.* Vol. 16: 1-17

**Conesa-Zamora, P.** Doménech-Peris, A. Orantes-Casado, FJ. Ortiz-Reina, S. Sahuquillo-Frías, L. Acosta-Ortega, J. García-Solano, J. Pérez-Guillermo, M. **2009.** Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, cyclin D1, p53 and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma. A tissue microarray study. *Am. J. Clin. Pathol.* Vol 132: 378-390.

**Crawford, RAF.** Caldwell, C. Lies, RK. Lowe, D. Shepherd, JH. Chard, T. **1998.** Prognostic significance of the bcl2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *British journal of cancer.* Vol. 78: 210-214.

**Cuschieri, K.** Wentzensen, N. **2008.** Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cáncer Epidemiol Biomarkers Prev.* Vol.17: 2536-2545.

**Doorbar, J.** **2006.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science.* Vol. 110: 525-241.

**García-Tamayo, J.** Molina, J. Blasco-Olaetxea, E. **2009.** Importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. *Revisión. Investigación clínica.* Vol. 50: 241-250.

**García-Tamayo, J.** Molina, J. Blasco-Olaetxea, E. **2010.** El virus del papiloma humano y el cáncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la

investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. Investigación clínica. Vol. 51: 193-208.

**Godoy**, AEG. Mandelli, J. Oliveira, FH. Calegari, S. Moura, LB. Serafini, EP. **2008**. p16<sup>ink4a</sup> expression in precursor lesions of squamous cell cervical cancer related to the presence of HPV-DNA. Brazilian journal of medical and biological research. Vol. 41: 583-588.

**Hengstermann**, A. Linares, LK. Ciechanover, A. Whitaker, NJ. Scheffner, M. **2001**. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. PNAS. Vol. 98: 1218-1223.

**Hiller**, T. Poppelreuther, S. Stubenrauch, F. Iftne, T. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. **2006**. Cancer epidemiol biomarkers. Vol. 15: 1262-1267.

**Ivanova**, TA. Golovina, DA. Zavalishina, LE. Volgareva, GM. Katargin, AN. Andreeva, YY. Frank, GA. Kissel'jov, FL. Kissel'jova, NP. **2007**. Up-regulation of expression and lack of 5' CpG island hypermethylation of p16<sup>ink4a</sup> in HPV-positive cervical carcinomas. BMC Cancer. Vol. 7:14-24.

**Klaes**, R. Friedrich, T. Spitkovsky, D. Ridder, R. Rudy, W. Petry, U. Dallenbach-Hellweg, G. Schmidt, D. Von Knebel Doeberitz, M. **2001**. Overexpression of p16<sup>ink4a</sup> as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. International journal cancer. Vol. 92: 276-284.

**Koivusalo**, R. Krausz, E. Helenius, H. Hietanen, S. **2005**. Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA mediated Degradation of Human Papillomavirus 18 E6 mRNA: opposite effect of siRNA in combination with different drugs. Molecular pharmacology. Vol. 68: 372-382.

**Laconis**, L. Hyjek, E. Ellenson, LH. Pirog, EC. **2007**. p16 and ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix correlation with human papillomavirus detection. Arch Pathol Lab Med. Vol. 131: 1343-1349.

**Looi**, MN. Mohd Dali, AZH. Ali, SAM. Wang Ngah, WZ. Mohd Yusof, YA. **2008**. Expression of p53, bcl-3 and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia and invasive

squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Analytical and quantitative cytology and histology. Vol. 30.

**Luna-López, A. López-Diazguerrero, N. E. González-Puertos, V. Y. Triana-Martínez, F. Köningsberg-Fainstein, M.** El fantástico mundo de la proteína bcl-2. **2008**. Revista de educación bioquímica. Vol. 27: 93-102.

**Mayrand, M. H. Duarte-Franco, E. Rodriguez, I. Walter, S. D. Hanley, J. Ferenczy, A. Ratnam, S. Coutlee, F. Franco, E. L.** Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. **2007**. The new England journal of medicine. Vo. 357: 1579-1588.

**Palacio-Mejía, LS. Lazcano-Ponce, E. Allen-Leigh, B. Hernández-Avila, M.** **2009**. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. Salud pública Mex. Vol. 51: S208-S219.

**Pillai, M. R. Halabi, S. McKalip, A. Jayaprakash, P. G.** The presence of human papillomavirus- 16/-18 E6, p53, and bcl-2 protein in cervicovaginal smears from patients with invasive cervical cancer. **1996**. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. Vol. 5: 329-335.

**Psyrrri, A. DiMaio, D.** **2008**. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. Nature clinical practice oncology. Vol. 5: 24-31.

**Reimers, N. Kasper, HU. Weissenborn, SJ. Stützer, H. Preuss, SF. Hoffmann, TK. Speel, EJM. Dienes, HP. Pfister, HJ. Guntinas-Lichius, O. Klusmann, JP.** **2007**. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. International journal cancer. Vol: 120: 1731-1738.

**Saegusa, M. Takano, Y. Hashimura, M. Shoji, Y. Okayasu, I.** **1995**. The posible role of bcl-2 expression in the progression of tumors of the uterine cérvix. Cancer. Vol. 76: 2297-2303.

**Sano, T. Oyama, T. Kashiwabara, K. Fukuda, T. Nakajima, T.** **1998**. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. American journal of pathology. Vol. 153: 1741-1748.

**Salmerón, J. Lazcano-Ponce, E. Lorincz, A. Hernández, M. Hernández, P. Leyva, A. Uribe, M. Manzanares, H. Antunez, A. Carmona, E. Ronnett, BM. Sherman, ME. Bishai, D. Ferris, D. Flores, Y. Yunes, E. Shah, KV.** **2003**. Comparison of HPV-



based assays with screening in Morelos State, Mexico. *Cancer causes and control*. Vol. 14: 505-512.

**Schiffman**, M. Castle, PE. Jeronimo, J. Rodriguez, AC. Wacholder, S. **2007**. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. Vol. 370: 890-907.

**Steinau**, M. Rajeevan, MS. Lee, DR. Ruffin, MT. Horowitz, IR. Flowers, LC. Tadros, T. Birdsong, G. Husain, M. Kmak, DC. Longton, GM. Vernon, SD. Unger, ER. **2007**. Evaluation of RNA markers for early detection of cervical neoplasia in exfoliated cervical cells. *Cancer epidemiol biomarkers*. Vol. 16: 295-301.

**Vousden**, K. H. Prives, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **2009**. *Cell*. Vol. 137: 413-431.

**Whibley**, C. Pharoah, PDP. Hollstein, M. **2009**. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature*. Vol. 9: 95-107.

**Woodman**, CBJ. Collins, SI. Young, LS. **2007**. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Cancer*. Vol. 7: 11-22.

**Yoshida**, T. Sano, T. Kanuma, T. Owada, N. Sakurai, S. Fukuda, T. Nakajima, T. Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions. **2008**. *Cancer cytopathology*. Vol. 114: 83-88.

**Yu**, L. Wang, L. Zhong, J. Chen, S. **2010**. Diagnostic value of p16ink4A, Ki-67 and human papillomavirus L1 capsid protein immunochemical staining on cell blocks from residual liquid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer cytopathology*. Vol.10: 47-55.

**Zhang**, Q. Kuhn, L. Denny, LA. De Souza, M. Taylor, S. Wright, TC. **2006**. Impact of utilizing p16<sup>ink4a</sup> immunohistochemistry on estimated performance of three cervical cancer screening tests. *International journal cancer*. Vol. 120: 351-356.