

**ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO COMPARATIVO DE
LA GLICOSILACION DEL EPITELIO NORMAL DEL
CUELLO UTERINO Y SUS LESIONES ASOCIADAS, Y SU
RELACION CON LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS
PCNA, P53 Y EL GEN E6 DEL HPV-16**

JOSE ERNESTO MORO RODRIGUEZ

*ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO COMPARATIVO DE LA
GLICOSILACION DEL EPITELIO NORMAL DEL CUELLO UTERINO Y
SUS LESIONES ASOCIADAS Y SU RELACION CON LA EXPRESION DE
LAS PROTEINAS PCNA, P53 Y EL GEN E6 DEL HPV-16.*

Tesis presentada para optar al grado de
DOCTOR EN MEDICINA
por

José Ernesto Moro Rodríguez

Realizada en el Departamento de Anatomía Patológica
Hospital "General Gregorio Marañón" de Madrid,
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, FACULTAD DE MEDICINA.

Enero de 1994

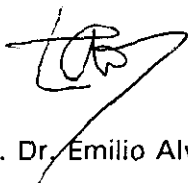
Dirigida por el Profesor Dr. Emilio Alvarez Fernández.

EL DR. D. EMILIO ALVAREZ FERNANDEZ, PROFESOR TITULAR DE ANATOMIA
PATOLOGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID,

CERTIFICA: Que la Memoria titulada "*ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO COMPARATIVO
DE LA GLICOSILACION DEL EPITELIO NORMAL DEL CUELLO UTERINO Y SUS LESIONES
ASOCIADAS Y SU RELACION CON LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS PCNA, P53 Y EL
GEN E6 DEL HPV-16.*", presentada por D. José Ernesto Moro Rodríguez, ha sido realizada
bajo mi dirección.

Examinado y revisado dicho trabajo de investigación, doy mi conformidad para su
presentación y defensa para ser juzgado como Tesis Doctoral.

Y para que conste y obre a los efectos oportunos, firmo el presente Certificado en
Madrid a 20 de Diciembre de 1993.



Fdo: Prof. Dr. Emilio Alvarez Fernández.

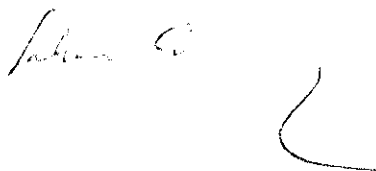
PROF. TITULAR DE ANATOMIA PATOLOGICA.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

EI PROF. DR. D. JULIAN SANZ ESPONERA, CATEDRATICO DE LA FACULTAD DE MEDICINA, Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación titulado "*ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO COMPARATIVO DE LA GLICOSILACION DEL EPITELIO NORMAL DEL CUELLO UTERINO Y SUS LESIONES ASOCIADAS Y SU RELACION CON LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS PCNA, P53 Y EL GEN E6 DEL HPV-16.*" realizado por D. José Ernesto Moro Rodríguez, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Emilio Alvarez Fernández, es apto para ser presentado como Tesis Doctoral ante el Tribunal Calificador.

Y para que conste y obre a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid, a 27 de Diciembre de 1993.



Fdo. Prof. Dr. Julian Sanz Esponera.
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA
PATOLOGICA. FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

A mis padres, **Ernesto y Paquita**

y a mis hermanos **Luis Enrique, Juan Carlos y Ana Luz.**

Atraviesa la espesa tiniebla del no saber
con el afilado dardo del amor que ansía,
y bajo ninguna circunstancia pienses en
abandonar.

Anónimo inglés s. XIII.

Agradecimientos

Al Prof. Dr. Emilio Alvarez que me inició en el campo del estudio de la glicosilación de los procesos neoplásicos y me dirigió esta Tesis dándome estímulo y confianza.

A Dña. Marisa Herranz, Dña. Carmen Blas, y Dña. Charo Casado, por su inestimable asistencia técnica en la realización de los trabajos de histología convencional e inmunohistoquímica.

A la Dra. Carmen López Varela con la que compartí numerosas horas de paciente trabajo y a la que le debo la mayor parte de la casuística recogida para este estudio.

Al Dr. Javier Menárguez, al Dr. Miguel Sánchez, y a Dña. Eva Cristobal por su generosa ayuda y amables consejos.

A la Dra. Nora Clerici y Dña. Mabel Saiz de la Sección Histocompatibilidad del Hospital Ramón y Cajal quienes pusieron con entusiasmo conocimientos y medios para poder realizar las técnicas de PCR del trabajo que se presenta.

Al Dr. Fernando Barahona, del Centro de Biología Molecular de la U. A. M. por su colaboración en la síntesis de los oligonucleótidos necesarios para poder realizar una de las partes experimentales de esta tesis.

Al Dr. José Antonio de Pedro y a mi hermano Juan Carlos, por su ayuda en la interpretación de los resultados de las autorradiografías de este trabajo mediante el programa AnaRay-X desarrollado en el Servicio de Traumatología del Hospital Clínico Universitario de Madrid.

Al Dr. Cesar Lacruz por haberme proporcionado amablemente los controles positivos para la realización de la PCR.

Al Dr. Julio Rodríguez y al Dr. Matías Jiménez con los que colaboré en la realización del Estudio cito-epidemiológico cervico-vaginal en la Comunidad de Madrid que se presenta en el Apéndice de este trabajo.

A Dn. Luis López por su eficaz colaboración en la realización del material gráfico.

A José Miguel, Carmen, Concha, Benjamín, Julio y Demetrio, por su amistad e incondicional apoyo en los momentos de adversidad.

A Dn. Manuel de Andrés, mi profesor de Biología en el Curso de Orientación Universitaria en el Colegio Chamberí de los HHMM por su dedicación y enseñanzas.

Al Dr. Julio Escalona y a todo el personal, amigos y compañeros de Anatomía Patológica del Hospital General Gregorio Marañón con los que he compartido mis años de formación.

Y a la Fundación Científica de la A.E.C.C. que me concedió una de sus becas de investigación cancerológica durante el año 1993 lo que me permitió terminar con mayor dedicación el trabajo que se presenta.

Gracias de **J.E.M.R.**

INDICE

Página:

1.- INTRODUCCIÓN.

| | |
|------------------------------------|----|
| 1.1. MOTIVACIÓN DEL TRABAJO | 1 |
| 1.2. ENUNCIADO DEL PROBLEMA | 25 |
| 1.3. ANTECEDENTES HISTÓRICOS | 50 |
| 1.4. OBJETIVOS DEL TRABAJO | 57 |

2.- MATERIAL Y METODOS.

| | |
|--|----|
| 2.1. SELECCIÓN DEL MATERIAL, FIJACIÓN Y PROCESADO BÁSICO | 61 |
| 2.2. DEMOSTRACIÓN DE LOS DETERMINANTES ISOANTIGENICOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS (ABH Y LEWIS), Y DE LAS PROTEINAS P53 Y PCNA MEDIANTE TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA | 63 |
| 2.2.1 Características de los anticuerpos utilizados. BG 1 con especificidad para Precursor (Cadena tipo 1) BG 2 con especificidad para Grupo A (Cadenas tipo 1 y 2) BG 3 con especificidad para Grupo B (Cadena tipo 2) BG 4 con especificidad para Grupo H-1 BG 5 con especificidad para Grupo Le ^a (Cadena tipo 1) BG 6 con especificidad para Grupo Le ^b (Cadena tipo 1) BG 7 con especificidad para Grupo Le ^x (Cadena tipo 1) BG 8 con especificidad para Grupo Le ^y (Cadena tipo 2) NCL-D07 anti proteína p53 NCL-PC10 anti PCNA | |
| 2.2.2 Técnica de la Avidina-Biotina, utilizando complejo ABC con revelado mediante DAB-HCl | 63 |
| 2.2.3 Técnica de la Fosfatasa alcalina con revelado mediante 2Cl-1 Naftol | 64 |
| 2.3. DEMOSTRACIÓN DE LAS LAS SUSTANCIAS RECEPTORAS PARA LECTINAS UTILIZANDO COMPLEJO ABC Y CON REVELADO MEDIANTE DAB-HCL | 67 |

| | |
|--|----|
| 2.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS LECTINAS UTILIZADAS | 68 |
| 2.4.1 <i>Ulex Europaeus I</i> (UEA-I) | 69 |
| 2.4.3 <i>Dolichos Biflorus</i> (DBA)..... | 72 |
| 2.4.2 <i>Sophora Japonica</i> (SJA) | 71 |
| 2.4.4 <i>Lotus Tetragonolobus purpureas</i> (LTA) | 73 |
| 2.5. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS..... | 75 |
| 2.6. PROTOCOLO DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE HPV | 77 |
| 2.7. CARACTERÍSTICAS DE LOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS | 80 |
| 2.8. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA MUESTRA DEL ESTUDIO | 82 |

3.- RESULTADOS.

| | |
|--|----|
| 3.1. EXPRESIÓN DE LOS DETERMINANTES ISOANTIGENICOS. | |
| 3.1.1 Antígenos ABH en la mucosa normal exocervical | 87 |
| 3.1.2 Antígenos ABH en la mucosa normal endocervical | 89 |
| 3.1.3 Antígenos ABH en las áreas de metaplasia | 90 |
| 3.1.4 Antígenos ABH en las lesiones relacionadas con la infección por HPV (condilomas), y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE-BG) | 92 |
| 3.1.5 Antígenos ABH en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG) | 93 |
| 3.1.6 Antígenos ABH en los carcinomas epidermoides invasores del cuello uterino | 94 |

| | |
|---|-----|
| 3.2. EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO LEWIS. | |
| 3.2.1 Antígenos Lewis en la mucosa normal exocervical | 98 |
| 3.2.2 Antígenos Lewis en la mucosa normal endocervical | 99 |
| 3.2.3 Antígenos Lewis en las áreas de metaplasia | 101 |
| 3.2.4 Antígenos Lewis en las lesiones relacionadas con la infección por HPV (condilomas), y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE-BG) | 102 |
| 3.2.5 Antígenos Lewis en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG) | 104 |
| 3.2.6 Antígenos Lewis en los carcinomas epidermoides invasores del cuello uterino | 106 |
| 3.3. RECEPTORES DE LECTINAS EN LAS ESTRUCTURAS TISULARES. | |
| 3.3.1 Receptores de lectinas en la mucosa normal exocervical | 109 |
| 3.3.2 Receptores de lectinas en la mucosa normal endocervical | 110 |
| 3.3.3 Receptores de lectinas en las áreas de metaplasia | 111 |
| 3.3.4 Receptores de lectinas en las lesiones relacionadas con la infección por HPV (condilomas), y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE-BG) | 112 |
| 3.3.5 Receptores de lectinas en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG) | 112 |
| 3.3.6 Receptores de lectinas en los carcinomas epidermoides invasores del cuello uterino | 113 |

3.4. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS P53 Y PCNA.

| | |
|---|-----|
| 3.4.1 p53 y PCNA en la mucosa normal exocervical | 116 |
| 3.4.2 p53 y PCNA en la mucosa normal endocervical | 116 |
| 3.4.3 p53 y PCNA en las áreas de metaplasia | 117 |
| 3.4.4 p53 y PCNA en las lesiones relacionadas con la infección por HPV (condilomas), y lesiones intraepi- teliales escamosas de bajo grado (LIE-BG) | 117 |
| 3.4.5 p53 y PCNA en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG) | 118 |
| 3.4.6 p53 y PCNA en los carcinomas epidermoides invasores del cuello uterino | 118 |
| 3.5. RESULTADOS DE LA AMPLIFICACIÓN DE UNA REGIÓN DEL INTRÓN E6 DEL VIRUS HPV 16 EN LOS CASOS SELECCIONADOS | 120 |

4.- DISCUSIÓN.

| | |
|--|-----|
| 4.1. ANÁLISIS DE LA IMPORTANCIA DE LAS MODIFICACIONES DE LOS GLICOCONJUGADOS CELULARES EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA. | 129 |
| 4.2. ANÁLISIS DE LA RELEVANCIA DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS P53 Y PCNA EN DIVERSOS PROCESOS MALIGNOS Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE LOS VIRUS HPV | 139 |

| | |
|--|------------|
| 4.3. ANÁLISIS DE LOS PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS UTILIZADOS (MATERIAL Y MÉTODOS). | |
| 4.3.1 Fijación | 143 |
| 4.3.2 Métodos de tinción | 147 |
| 4.3.3 Técnicas de la PCR | 149 |
| 4.3.4 Valoración de resultados | 156 |
| 4.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE LOS DETERMINANTES DE ISOANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO ABH Y LEWIS EN LAS ESTRUCTURAS NORMALES, PRENEOPLÁSICAS Y NEOPLÁSICAS DEL CUELLO UTERINO | 160 |
| 4.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PRO- TEINAS P53 Y PCNA Y DE LA AMPLIFICACION DE UNA PARTE DEL INTRON E6 DEL HPV-16 EN LAS LESIONES INTRAEPITELIALES E INVASORAS DEL CUELLO UTERINO | 167 |
| 5.- <u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u> | 172 |
| 6.- <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 177 |

| | |
|-------------------------------|---|
| 7.- APENDICE | 217 |
| - Tabla I _(A) . | Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado. Expresión de los antígenos T1-CH, A, B, H-1. |
| - Tabla II _(A) . | Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado. Expresión de los antígenos T1-CH, A, B, H-1. |
| - Tabla III _(A) . | Carcinomas invasores. Expresión de los antígenos T1-CH, A, B, H-1. |
| - Tabla IV _(A) . | Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado. Expresión de los antígenos Le ^a , Le ^b , Le ^x , Le ^y . |
| - Tabla V _(A) . | Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado. Expresión de los antígenos Le ^a , Le ^b , Le ^x , Le ^y . |
| - Tabla VI _(A) . | Carcinomas invasores. Expresión de los antígenos Le ^a , Le ^b , Le ^x , Le ^y . |
| - Tabla VII _(A) . | Resumen gráfico de resultados. Expresión de los Ags ABH y Lewis. |
| - Tabla VIII _(A) . | Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado. Expresión de los receptores de lectinas UEA-I, DBA, SJA, LTA. |
| - Tabla IX _(A) . | Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado. Expresión de los receptores de lectinas UEA-I, DBA, SJA, LTA. |
| - Tabla X _(A) . | Carcinomas invasores. Expresión de los receptores para las lectinas UEA-I, DBA, SJA, LTA. |
| - Tabla XI _(A) . | Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, y epitelio regenerativo. Expresión de los determinantes antigénicos de p53, PCNA, y amplificación de parte del intrón E6 del virus HPV 16. |
| - Tabla XII _(A) . | Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado. Expresión de los determinantes antigénicos de p53, PCNA, y amplificación de parte del intrón E6 del virus del papiloma humano-16. |
| - Tabla XIII _(A) . | Carcinomas invasores. Expresión de los determinantes antigénicos de p53, PCNA y amplificación de parte del intrón E6 del virus del papiloma humano-16. |
| - Tabla XIV _(A) . | Concentraciones del DNA extraído de los distintos casos del estudio y resultados de la amplificación del intrón E6 del virus HPV 16. |

-
- Tabla XV_(A). Autorradiografía y representación grafica de la amplificación e hibridación de parte del intrón del gen E6 del HPV-16.
 - Tabla XVI_(A). Resumen de resultados PCR, PCNA. Expresión de PCNA en relación con la amplificación del gen E6 del HPV-16. Relación de la pureza de la extracción de DNA y la amplificación mediante la PCR.

 - Ilustr. 1 Hendiduras endocervicales pseudoglandulares. Expresión positiva del anticuerpo BG1 localizada en los cilios de algunas células de la hendidura.
 - Ilustr. 2 Detalle de la expresión ciliar del MoAb BG1.
 - Ilustr. 3 Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. Cambios morfológicos relacionados con infección por HPV (Condiloma plano). H.E.
 - Ilustr. 4 Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (Condiloma plano). Expresión uniforme del MoAb BG2 en el tercio medio del epitelio pavimentoso por encima de la capa basal que se muestra negativa.
 - Ilustr. 5 Lesión Intraepitelial escamosa de bajo grado. Cambios morfológicos relacionados con infección por HPV. Ligera hiperplasia basal negativa para la expresión del MoAb BG2, y su expresión en el tercio medio del epitelio.
 - Ilustr. 6 CIN I con cambios morfológicos relacionados con infección por HPV. Ausencia de expresión del MoAb BG2 en las capas basales y parabasales, y expresión de este Ab, en el tercio medio del epitelio.
 - Ilustr. 7 Lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Extensión de CIN III en las hendiduras pseudoglandulares que muestran una celularidad con expresión heterogénea y disminución de la expresión del MoAb BG2.
 - Ilustr. 8 CIN III. Detalle de la misma lesión donde se observa un corte brusco de expresión del MoAb BG2. Además se puede apreciar la expresión de este Ab. en el endotelio de pequeñas luces vasculares.
 - Ilustr. 9 Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (condiloma). Expresión del MoAb BG6 por encima de la basal.
 - Ilustr. 10 Lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Area de expresión heterogénea del MoAb BG6 en un CIN III.

-
- Ilustr. 11 Detalle de la expresión de membrana en "panal" del MoAb BG6 en las células intermedias.
 - Ilustr. 12 Lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Area de expresión heterogénea del MoAb BG6 en un CIN III con un patrón en "panal" menor definido en comparación con la ilustración superior.
 - Ilustr. 13 Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (CIN II). Expresión del MoAb BG7 por encima de una basal hiperplasiada y despolarizada.
 - Ilustr. 14 Lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Areas con pérdida de expresión del MoAb BG7 en un CIN III, y expresión positiva tanto en el epitelio simple pseudoglandular como en el moco de las luces.
 - Ilustr. 15 Hendiduras endocervicales pseudoglandulares con expresión positiva para BG5 y CINIII con pérdida de expresión periférica del mismo.
 - Ilustr. 16 Hendiduras endocervicales pseudoglandulares y CIN III con expresión de la proteína PCNA en un 85% de la celularidad, preferentemente en la periferia donde no se expresaba el BG5.
 - Ilustr. 17 Lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Expresión suprabasal de PCNA en un 75% del epitelio.
 - Ilustr. 18 Expresión de PCNA en un 100% de la celularidad de un carcinoma epidermoide invasor.

INDICE GENERAL DE TABLAS Y FIGURAS.

| | | |
|------------|-----------|--|
| TABLA I | (pg. 33) | - CADENAS PRECURSORAS. |
| TABLA II | (pg. 33) | - ESTRUCTURA DE LOS ANTÍGENOS H TIPO 1 Y TIPO 2. |
| TABLA III | (pg. 34) | - ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS DETERMINANTES ANTIGÉNICOS Le ^b , Le ^a , Le ^y , Le ^x). |
| TABLA IV | (pg. 34) | - ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS DETERMINANTES ISOANTIGÉNICOS DE GRUPO SANGUÍNEO A Y B TIPO 1 Y 2. |
| TABLA V | (pg. 36) | - ESTRUCTURAS QUÍMICAS, GENÉTICAS Y ENZIMÁTICAS RELACIONADAS CON LA RUTA PRINCIPAL DE LAS ESTRUCTURAS OLIGOSACÁRIDAS MONO Y DIFUCOSILADAS TIPO 1 (ORIOI, 1992). |
| TABLA VI | (pg. 37) | - ESTRUCTURAS QUÍMICAS, GENÉTICAS Y ENZIMÁTICAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE BIOSÍNTESIS PRINCIPAL DE LAS ESTRUCTURAS OLIGOSACÁRIDAS MONO Y DIFUCOSILADAS TIPO 2 (ORIOI, 1992). |
| TABLA VII | (pg. 39) | - DISTRIBUCION DE LAS CADENAS PRECURSORAS EN VARIOS TEJIDOS HUMANOS |
| TABLA VIII | (pg. 62) | - DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS DE LOS PACIENTES DE LAS LESIONES SELECCIONADAS. |
| TABLA IX | (pg. 66) | - CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUEPOS MONOCLONALES UTILIZADOS |
| TABLA X | (pg. 68) | - RELACIÓN DE LAS LECTINAS UTILIZADAS. |
| TABLA XI | (pg. 76) | - CARACTERES GRAFICOS UTILIZADOS EN LA TABULACION. |
| TABLA XII | (pg. 80) | - SECUENCIAS DE LOS <i>PRIMERS</i> Y SONDA DEL GEN E6 DEL VIRUS HPV 16 PARA LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE LA PCR Y DETECCIÓN MEDIANTE HIBRIDACION NO RADIATIVA. |
| TABLA XIII | (pg. 81) | - SECUENCIA DEL GEN E6 DE LOS VIRUS HPV 16 Y 18 |
| TABLA XIV | (pg. 96) | - RESUMEN DE RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LOS ANTIGENOS T1-CH, A, B, H-1. |
| TABLA XV | (pg. 108) | - RESUMEN DE RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LOS ANTIGENOS LEWIS (Le ^a , Le ^b , Le ^x , Le ^y). |
| TABLA XVI | (pg. 115) | - RESUMEN DE RESULTADOS DE LA EXPRESION DE RECEPTORES DE LECTINAS UEA-I, DBA, SJA, LTA. |
| TABLA XVII | (pg. 119) | - RESULTADOS DE RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS DE LAS PROTEINAS PCNA Y P53. |

| | | |
|-------------|-----------|---|
| TABLA XVIII | (pg. 125) | - CONCENTRACIONES DEL DNA EXTRAIDO DE LOS DISTINTOS CASOS DEL ESTUDIO Y RESULTADOS DE LA AMPLIFICACION DEL INTRON E6 DEL VIRUS HPV-16. |
| FIGURA 1. | (pg. 31) | - Estructuras de las series "ganglio", "globo" y "lacto". |
| FIGURA 2. | (pg. 126) | - Gráficas de los resultados de la amplificación de parte del intrón E6 del virus del papiloma humano-16 y su hibridación específica. |
| FIGURA 3. | (pg. 165) | - Gráfica de las relaciones de dependencia e independencia entre los distintos caracteres cualitativos de la expresión de los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos ABH y Lewis. |
| FIGURA 4. | (pg. 166) | - Gráfica de las relaciones de dependencia e independencia entre los distintos caracteres cualitativos de la expresión de los receptores de lectinas. |
| FIGURA 5. | (pg. 171) | - Gráfica de las relaciones de dependencia entre el índice de proliferación (Expresión PCNA) y presencia de E6 HPV-16. |

Abreviaturas

| | |
|--------|---|
| ABC | complejo avidina-biotina |
| ABO | grupo sanguíneo ABH |
| Ag | antígeno |
| BG(nº) | grupo sanguíneo (<i>MoAb Blood group nº</i>) |
| CIN | neoplasia intraepitelial cervical |
| DAB | diamino-bencidina |
| DBA | <i>dolichos biflorus</i> (lectina) |
| DIG | digoxigenina |
| DO | densidad óptica |
| Fuc | fructosa |
| Gal | dextro-Galactosa |
| Glu | dextro-Glucosa |
| HPV | virus del papiloma humano |
| Ig | inmunoglobulina |
| LIE-AG | lesión intraepitelial escamosa de alto grado |
| LIE-BG | lesión intraepitelial escamosa de bajo grado |
| LTA | <i>tetragonolobus purpurea</i> (lectina) |
| MoAb | anticuerpo monoclonal |
| Le | grupo sanguíneo Lewis |
| PBS | solución tampón (<i>Phosphate buffered saline.</i>) |
| PCNA | antígeno nuclear de proliferación celular |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| RB | gen del retinoblastoma, codifica la p120 |
| SJA | <i>sophora japonica agglutinin</i> (lectina) |
| TE | solución tampón (Tris 1 mM, EDTA 0.1 mM) |
| UEA-I | <i>ulex europeus agglutinin I</i> (lectina) |
| w-p53 | forma no mutada ("natural" <i>wild</i>) de p53 |

INTRODUCCION

1.1.- MOTIVACION DEL TRABAJO

Podemos considerar que el carcinoma de cuello uterino es uno de los procesos oncológicos humanos sobre el que se ha instaurado un mejor control preventivo en cuanto a su diagnóstico precoz.

El índice de mortalidad debido al carcinoma cervical invasor ha descendido un 70% desde la época de Babés y Viana^[7], y la publicación de los clásicos trabajos de Papanicolaou y Traut^[208] en 1928 sobre el uso de la evaluación citológica para la detección del carcinoma de cervix uterino en sus estadios preinvasores^[216] (Piver, 1990). Desde entonces, se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de estas lesiones precursoras, habiéndose impuesto en éstas una concepción unitaria y progresiva^[223] (Richart, 1967)

En nuestro medio, en un estudio realizado en la Comunidad de Madrid sobre el screening masivo que se viene realizando, estimamos que en los años 1991 y 1992 la incidencia de las lesiones preneoplásicas escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado era de 52.94/100.000 y de 8.85/100.000 mujeres/año respectivamente. La incidencia del carcinoma invasor fue entre estos años del 7.04/100.000 mujeres/año^[230] (Rodríguez-Costa, 1993). Valor este último equiparable con estudios parciales realizados en otros países que estiman que, instaurada una asistencia de screening que cubra un 85% de la población, la incidencia y mortalidad debida al carcinoma invasor del cervix sería del 7.5 y 2/100.000 mujeres/año respectivamente^[256] (Sigurdsson, 1991).

Comparando los índices de mortalidad con los de otras épocas algunos autores constatan que ha ocurrido un descenso de los índices de mortalidad por esta causa desde un 9.6/100.000 en los años sesenta (1960-1964) a un 4/100.000 en los años ochenta (1982-1986)¹⁸⁵¹(Free, 1991).

Se puede decir que, con evidencias indirectas, el screening del carcinoma cervical podría incluso reducir la incidencia y la mortalidad del carcinoma del cervix invasor (CAI) hasta en un 90%. En ausencia de screening, el riesgo medio de desarrollar CAI de una mujer de 20 años está en torno a 250/10.000 y el riesgo de que muera por esta causa es de 118/10.000. El screening realizado, al menos cada tres años desde los 20 a los 75 años de edad, reduciría estas probabilidades entorno al 215/10.000 y 107/10.000 respectivamente. La realización de screening cada uno o dos años, en comparación de cada tres, mejora la eficacia de al menos un 5%¹⁷⁵¹(Eddy, 1990).

Los resultados conocidos hasta la fecha permiten afirmar que los screening masivos de larga duración y con chequeos anuales podrían estar teniendo un gran valor en la detección de carcinomas tempranos de cervix, así como en la reducción de los índices de mortalidad¹²⁵⁵¹(Shiromizu, 1990).

Nos hallamos por tanto ante un problema oncológico al que se le está dando una solución inicial eficaz y sencilla en cuanto a su diagnóstico precoz se refiere, y con altas posibilidades terapéuticas en cuanto a sus lesiones precursoras confiere.

Otro tanto es el considerar las tasas de supervivencia, estadio por estadio para el carcinoma invasor de cervix, las cuales han permanecido estables incluso desde que se empezaran a instaurar los screening citológicos, aunque se tiene la esperanza que para la década en la que hemos entrado, estas cifras comiencen también a corregirse gracias a las nuevas medidas radioterapéuticas y al uso de "potenciadores de radiación" como la hidroxiurea^[216](Piver, 1990).

Al relativo éxito logrado en el diagnóstico precoz se le ha añadido la evidencia, adelantada por zur Hausen 1976^[296] y Meisels^[181,182] 1981, 1983, de que existe una fuerte asociación entre las formas preneoplásicas e invasoras con la infección de ciertos subtipos de virus de la familia de los papovavirus humanos (HPV)^[41](Crawford, 1984). En concreto con los subtipos 16 y 18. Además, a estos dos subtipos se les ha demostrado experimentalmente que poseen la propiedad de transformar e inmortalizar distintas líneas celulares, lo que podría considerarse como un paso inicial, aunque aún lejano, en favor de la argumentación de la causalidad con el carcinoma de cervix. (Yasumoto, 1986; Pirisi, 1987; Durst, 1987; Bedell, 1987; Kaur, 1988; Woodworth, 1988 y 1990; Pecoraro, 1989; Jewers, 1992; Halbert, 1992; Sedman, 1992) [293, 215, 71, 17, 141, 288, 289, 211, 134, 104, 249].

Si bien, se sospecha que han de considerarse otros factores (virus del herpes tipo 2, factores individuales del paciente etc.) además de los mencionados HPVs, calificados como necesarios pero no suficientes para la progresión hacia la malignidad de las lesiones que provocan^[297] (zur Hausen, 1982).

Con lo dicho, y pasando por alto la incertidumbre comentada en los párrafos previos, puede afirmarse pues que nos hallamos ante un proceso neoplásico relativamente frecuente el cual, mediante un sencillo procedimiento de screening citológico puede ser detectado en sus formas más iniciales. Subsecuentemente un estudio colposcópico con confirmación histológica puede llevar a un diagnóstico de confirmación sobre el que se puede adoptar una decisión terapéutica de alta eficacia.

Tenemos en definitiva, un modelo casi perfecto y sin parangón en todo el campo oncológico. Y si bien, los casos avanzados de carcinoma invasor mantienen un rendimiento muy escaso en cuanto a la supervivencia de los pacientes tratados se refiere, nos enfrentamos casi a diario con lesiones preneoplásicas de indudable interés para la investigación morfofuncional, que pueden permitirnos en concreto una mejor comprensión de la historia natural de este tipo de neoplasia y además esclarecer en alguna medida lo que supone el proceso neoplásico en su biología general.

En este panorama podemos determinar, en la biología del carcinoma del cuello uterino, y desde un enfoque fundamentalmente anatomopatológico, una serie de puntos en los que la investigación morfofuncional puede proporcionar información valiosa para comprender la historia natural del carcinoma de cervix; entre ellos podemos destacar los siguientes:

* (1) Histogénesis del carcinoma de cuello uterino, con la existencia de subvariedades como el adenocarcinoma o el carcinoma de células pequeñas.

* (2) Conocimiento de los hechos morfológicos y bioquímicos genéricos que acompañan la transformación neoplásica

- Glicosilación anómala, con fenómenos de modificación de la síntesis de mucosustancias y de la expresión de antígenos de grupo sanguíneo¹³⁰¹. (Carretero-Albiñana, 1990)

- Expresión de oncogenes.

* (3) Implicación viral como agente causal de los procesos neoplásicos cervicales, cuyas secuencias genómicas pueden ser puestas en evidencia mediante técnicas sobre muestras en parafina.

* (4) Conocimiento de las alteraciones morfológicas, inmuno e histoquímicas - fenotípicas - que se dan en las lesiones preneoplásicas del cervix, singularmente las lesiones escamosas intraepiteliales de alto y bajo grado.

Con respecto a la histogénesis del carcinoma de cervix, está clara la convicción de que los acontecimientos determinantes de este proceso tienen lugar a nivel del epitelio pavimentoso en la proximidad con el epitelio endocervical, en lo que es conocido como la unión escamo-columnar¹⁰⁸¹ (Hendrickson

1992). La traducción morfológica de este proceso se expresa como una imagen que progresivamente reemplaza la arquitectura normal del epitelio pavimentoso madurativo por una población de células pequeñas "basaloides" que no maduran en los estratos medio y superior sucesivos y que manifiestan en su evolución una tendencia a la despolarización.

Para Richart, la historia natural del carcinoma de cervix tiene un origen unifocal y puntual. Sucede tanto en la unión escamo-columnar como en las áreas de "transformación" sobre la portio, y además esta lesión inicial se extiende gradualmente reemplazando el epitelio escamoso y glandular contiguo. Esta lesión, estando aún limitada en el espesor del epitelio, crece a medida que pasa el tiempo, e incrementando su tamaño llega un momento en que puede ser reconocida en una exploración colposcópica como imágenes de epitelio blanco, puntiforme, de mosaico, de hiperqueratosis o de vasos atípicos^[223].

En este foco que describimos del cervix, el crecimiento epitelial está claramente incrementado si lo comparamos con el epitelio de su vecindad. Este activo crecimiento se refleja en el aumento del número de mitosis. Entre esta población celular en expansión, se supone que se selecciona o seleccionan un clon o clones celulares que manifiestan características invasivas, con la propiedad de rebasar la membrana basal, frontera hasta entonces entre el epitelio y el estroma subyacente.

Se trata en consecuencia de un proceso neoplásico progresivo, unifocal y de origen puntual, que tiene lugar en un epitelio pavimentoso que presentaba hasta aquél momento sucesiones celulares madurativas ordenadas.

Estas lesiones precursoras han sido reconocidas desde hace más de un siglo y han sido identificadas con distintas denominaciones: Lesiones iniciales borderline, displasia leve, o neoplasias intraepiteliales grado I.

Recientemente, y por razones de reproductibilidad entre observadores^[128] (Ismail, 1989), se ha adoptado el consenso de limitar en dos escalones la designación de estas lesiones precursoras, llamando a las lesiones más iniciales: "Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado"; y a las más avanzadas "de alto grado" - Sistema de Bethesda 1988 ^[259](Solomon, 1989).

Algunos autores han dado ya validez de reproductibilidad a este sistema ^[252](Sherman, 1992).

En cuanto a la célula de origen de estos acontecimientos, se asume que, siguiendo el hecho de que la neoplasia que surge tiende a mantener ciertos rasgos básicos que la identifican con su origen, tenemos que si la neoplasia tiene una tendencia a manifestar un crecimiento estratificado y a la formación de queratina, el origen sería el de una célula basal. En otro orden de cosas, las neoplasias endocervicales remedan metaplasias escamosas cervicales con elementos celulares escasamente queratinizantes y su origen estaría en el epitelio

simple de revestimiento. Finalmente, las neoplasias que se caracterizan por presentar unos elementos celulares más pequeños, sin rasgos queratinizantes y con signos de neurosecreción, su origen sería el de las células de reserva.

Como vemos, en la histogénesis de los tumores del cuello uterino se delimitan dos grupos genéricos bien circunscritos: Los carcinomas epidermoides y los adenocarcinomas.

Al carcinoma epidermoide de cervix se le reconocen tres formas distintas de diferenciación: El bien diferenciado o el tipo de células grandes queratinizantes, el moderadamente diferenciado o tipo de células grandes focalmente queratinizante, y el pobremente diferenciado o tipo no queratinizante de células grandes o pequeñas^[221] (Reagan, 1974). Aunque entre estos tres subtipos no se advierten diferencias significativas en cuanto a comportamiento y pronóstico.

Al adenocarcinoma, con una incidencia mucho menor y con una proporción de 1:15 con los carcinomas epidermoides, se le reconocen un número mayor de subvariedades. Además del adenocarcinoma endocervical convencional, podemos mencionar al Adenocarcinoma mucinoso intestinal (coloide), en el que se identifican la presencia de células caliciformes^[86] (Fu Y.S., 1982). Menos frecuentes en su incidencia son los tipos metaplásicos mülerianos^[156] (Lauchlan, 1984) en los que se incluyen los adenocarcinomas papilares mucinoso y seroso, o el adenocarcinoma endometrioides^[270] (Teshima, 1985). A estas variedades se les ha sumado el adenocarcinoma de células

claras^{1109l}(Herbst, 1979) relacionado con la exposición prenatal al Dietilestilbesterol^{1229l}(Robboy, 1974). Otras variantes específicas reconocidas del adenocarcinoma son el adenoma maligno^{1138l}(Kaminski, 1983), el adenocarcinoma adenoquístico^{1178l}(McKelvey, 1963), y el adenocarcinoma mesonefroide^{1105l}(Hart, 1972).

Nos encontramos con un grupo de neoplasias cuyas formas invasoras tienden a disminuir en incidencia gracias al establecimiento de unas medidas de screening sencillas y al parecer eficaces. Este estado de cosas permite aproximarnos a un número creciente de lesiones reconocidas y tipificadas como precursoras y que se distribuyen en un continuum progresivo al que se le ha delimitado, por razones de reproductibilidad y abordaje terapéutico, en un doble tramo de gradación. A esto se suma el hecho de que también se reconocen una serie de cambios celulares que se han asociado de forma muy característica como signos de infección viral. Estos cambios adscritos a la infección por HPV son la koilocitosis, disqueratosis, paraqueratosis y la multinucleación^{1179l}(Meisels y Fortin, 1977). A finales de los setenta también se demostró a nivel ultraestructural la presencia de partículas de HPV dentro de los koilocitos^{1113l}(Hills y Laverty, 1979).

Los estudios epidemiológicos del carcinoma cervical habían relacionado de forma clara el carcinoma cervical con los hábitos sexuales promiscuos tanto en mujeres como en hombres^{1257,26l}(Singer, 1976; Buckley, 1981). De forma paralela también se relacionó con ella un incremento de la incidencia de las

verrugas genitales, las cuales se conocían que estaban causadas por los virus del papiloma humano. Lesiones que hoy se sabe se transmiten sexualmente en ambas direcciones^{128,141}(Campion, 1985; Barrasso, 1987). En la mitad de las pacientes con verrugas en vulva también se vió que presentaban alteraciones a nivel del cervix. Fue entonces cuando se incriminó a este tipo de virus como agentes causales de los tumores cervicales²⁹⁶¹(zur Hausen, 1976).

A la mencionada transmisión sexual comentada, se le puede sumar una forma de transmisión vertical de madre a hijo en el momento del parto, hecho cada vez mejor estudiado, con resultados de infección por HPV-16 en recién nacidos del orden al 25%²⁰⁷¹(Pakarian, 1993). Aunque es temprano todavía para establecer el verdadero alcance de estos hallazgos.

Tenemos un número de evidencias, cada vez más creciente, que hacen responsable como agente causal de este proceso a varios de los subtipos virales de los papilomas humanos (HPV) pertenecientes a la familia de los Papovavirus¹⁵⁰¹(Koutsky, 1992)

Los HPVs son virus ADN de doble cadena circular que tienen entorno a 8 kilobases en su longitud. Este DNA está incluido dentro de una cápside viral que tiene unos 55 nm de diámetro compuesta por dos proteínas diferentes, L₁ y L₂. La proteína L₁, que tiene un peso molecular de 57.000 daltons, es el componente principal de la cápside y su capacidad de formar puentes disulfuro es la responsable de la formación de partículas virales icosaédricas. A esta

proteína se le reconoce un determinante antigénico común a todos los papilomavirus. La proteína L₂ es un componente menor de la cápside y su peso molecular es de 78000 daltons^[67](Doorbar y Gallimore, 1987).

Hasta la fecha se conocen entorno a 60 subtipos de HPV, uno de los últimos descrito por Matsukura en 1990^[176].

Como los HPVs no pueden ser cultivados en el laboratorio, esto ha determinado que los distintos tipos virales se reconozcan en base a la homología en las secuencias de sus DNA. Los distintos tipos reconocidos comparten menos de un 50% de DNA homólogo, y los distintos subtipos comparten más del 50% de DNA homólogo pero menos del 100% del mismo^[212](Pfister, 1986).

Se ha secuenciado la totalidad del genoma de varios de estos virus (HPV 1: Danos, 1982; HPV 6b: Schwarz, 1983; HPV 16: Seedorf, 1985; HPV 31: Lörincz, 1986; HPV 11: Dartmann, 1986; Cole, 1987), observándose la presencia de al menos ocho genes tempranos que codifican proteínas que se sintetizan antes de que ocurra la replicación del DNA, y dos genes tardíos los cuales codifican las proteínas ya comentadas de la cápside [57,245,250,164,58, 33].

Dentro de la gran heterogeneidad de los distintos tipos de HPV se conoce que algunos de ellos tienen, por razones hasta el momento no bien conocidas,

un tropismo especial por el tracto genital femenino. Dentro de estos tenemos los HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42 a 45, 51, 52, 56, 58. Los tipos más estrechamente relacionados con la transformación celular se reconocen que son los HPV-16 y HPV-18, hecho comprobado cuando infectan fibroblastos murinos o líneas de células epiteliales humanas^[141,142](Kaur P, 1988,1989).

Es más, se han identificado a los genes más implicados en esta transformación, y estos son las estructuras de lectura abierta (ORFs) E7 del HPV-16, y la región E6-E7 del HPV-18^[17,139](Bedell, 1987; Kanda 1988). Matlaszewski y cols. en 1987 relacionaron que las regiones E6-E7 del HPV 16 podía cooperar junto con la activación del oncogen *ras* en la transformación celular^[174].

Se puede decir que, desde mediados de los años setenta cuando zur Haursern vincula las verrugas genitales con el carcinoma cervical, hasta la fecha en la que contamos con técnicas de hibridación in situ no isotópicas para la detección rutinaria de DNA y RNAm viral del HPV sobre secciones de parafina^[25,206,98,132,225,196](Burns, 1987; Ostrow, 1987; Gupta, 1989; Jacquemier, 1990; Richart, 1990 Nuovo, 1990, entre otras), y la reciente posibilidad de aplicar las técnicas de PCR para la amplificación de regiones seleccionadas del genoma viral presentes en tejidos conservados en parafina (Shibata, 1988; Cornelissen, 1989; Riou, 1990; Thompson, 1991; Nuovo, 1992), la sensibilidad y especificidad de los estudios ha progresado considerablemente década a década [253,39,226,271,197].

Estudios previos en análisis de hibridación molecular habían servido de base a esta nueva metodología^[66,165,87](DiLuca 1986, y Lorincz 1987, Fuchs 1988).

Las conclusiones a las que se está llegando nos dicen que dependen del tipo de virus HPV para que una lesión cervical pueda tener una mayor capacidad agresiva y acabe por convertirse en una neoplasia invasora. En este sentido a estos virus se les ha clasificado en cuatro categorías según su riesgo de ocasionar carcinomas invasores: (1) De bajo riesgo (HPVs 6/11, 42, 43, y 44), (2) De riesgo intermedio, (HPVs 31, 33, 35, 51 y 52), (3) Alto riesgo/HPV 16, y (4) Alto riesgo/HPV18 (HPVs 18, 45, y 56). De este modo, la presencia según el tipo de HPV oncogénico presente conferiría un riesgo relativo que oscila entre 65.1 y 235.7 para el desarrollo de lesiones de alto grado, y un riesgo entre el 31.1 y el 296.1 para el desarrollo de un carcinoma invasor^[166] (Lörincz, 1992).

Infecciones por HPV-6, 11, 31, 34, 35 y 42 se pueden encontrar en lesiones que con mayor frecuencia regresan frente a infecciones por HPV-16, 18, que tienen mayor capacidad progresiva^[150](Koutsky, 1992).

Al subtipo 16 se le ha descrito una variante designada como HPV-16b, que a diferencia del HPV-16a, se encuentra con menos frecuencia en las neoplasias cervicales, si bien parece más común en la población normal.

Además, se ha comprobado una incidencia mayor de infecciones por HPV-18 en carcinomas cervicales indiferenciados de células pequeñas con diferenciación neuroendocrina, tumor particularmente agresivo si se compara con los mejor diferenciados que suelen manifestar infección por HPV-16^[262] (Stoler, 1991).

También se ha confirmado que en los carcinomas invasores de cervix el HPV-16 puede encontrarse tanto en forma episoma como integrada al genoma celular^[170,175,279,68] (Durst, 1987; Matsukura, 1989; Wagatsuma, 1990; Fukushima, 1990), apreciándose una mayor proporción de formas integradas en éstos que en las lesiones precursoras -un 3% en caso de las lesiones preneoplásicas frente a un 81% en los carcinomas invasores $p < 0.001$; si bien, no se ha determinado que exista una región específica de ningún cromosoma para que se produzca dicha integración, si se conoce que el tipo de HPV-18 se integra con una mayor frecuencia que los demás^[48] (Cullen, 1991).

En cuanto a la integración de parte del genoma viral en el de la célula huésped, se acepta de forma concluyente como una de las características de las lesiones malignas. Esta integración podría alterar la función de las ORF de los genes E1 o E2 ocasionando una disminución de la regulación de la expresión génica, y como consecuencia una hipotética sobreexpresión de las reconocidas como oncoproteínas E6 y E7, las cuales contribuirían como promotores al desarrollo de la neoplasia^[6,246,50,51,30] (Awady, 1987; Schwarz, 1986; Choo, 1987, 1988; Cone, 1992). También se ha sugerido que este fe-

nómeno de integración podría servir como un valioso indicador pronóstico en la clínica de aquellas lesiones preneoplásicas que lo presentaran, distinguiéndose como más afines a desarrollar carcinomas invasores en un más corto plazo de tiempo.

A la proteína codificada por el gen E2 de los virus HPV-16 y HPV-18 se le ha observado una intensa actividad transcripcional de la expresión del genoma viral tanto en los queratinocitos normales como en los inmortalizados. En los análisis moleculares realizados hasta ahora se observan dos actividades distintas, todavía incompletamente entendidas, en la proteína E2 del virus HPV-16^[23](Bouvard, 1993).

Shirasawa (1988), en un análisis de la transcripción específica del virus HPV-16 en lesiones precancerosas y carcinomas invasores del cervix, ha comprobado patrones diferentes de transcripción entre ambas lesiones, sugiriendo que podrían jugar algún papel en el desarrollo del proceso maligno^[25].

En este orden de cosas, han cobrado redoblado interés los mencionados productos proteicos de los genes E6 y E7 de varios de los tipos de HPVs. Esto es así desde que se relacionara una posible, y al parecer probada, interacción entre las denominadas oncoproteínas virales E7 y E6 con las conocidas proteínas supresoras de tumores p105 (pRB) y wild-p53^[72,168,284,243] (Dyson, 1989; Münger, 1989; Werness, 1990; Scheffner, 1992). Interacción que

parece tener una mayor afinidad en el caso de los HPVs de alto riesgo que con los de bajo riesgo^[89,13,104,190](Gage, 1990; Barbosa, 1991; Halbert, 1992; Münger, 1992)

A ello se suma el hecho de que, el alegado potencial oncogénico de ciertos HPVs, manifestado *in vitro* por su capacidad de immortalizar queratinocitos, cambiar el comportamiento de su diferenciación, o transformar diversas líneas celulares, parece quedar restringido a la acción de los mencionados genes E6 y E7 (Bedell, 1987; Kanda, 1988; Hawley-Nelson, 1989; Münger, 1989; Kaur, 1989; Band, 1991; Halbert, 1991; Jewers, 1992) [17,139,106,189,142,10,134].

El estudio de diferentes líneas celulares de carcinomas del cervix puso en evidencia el hecho de que aquellas líneas en las que se identificaba la presencia del algún tipo de virus HPV, carecían de las formas mutadas de las proteínas p53 o p105, mientras que las líneas celulares sin expresión de virus tenían una mayor proporción de formas mutadas de las proteínas p53 o p105^[242,291,44,45,140,260] (Scheffner, 1991; Yamada, 1991; Crook, 1991 y 1992; Kaelbling, 1992; Srivastava, 1992; Wrede, 1992). Abundando en este hecho, Riou (1990) y con posterioridad Higgins (1991) encuentran un grupo de carcinomas cervical invasores HPV negativos que tienen mayor riesgo de reincidencia y de metástasis a distancia, y menor de supervivencia, en comparación con los HPV 16, 18, 33, 35 positivos^[226,111].

La *w-p53*, es una proteína a la que se le está prestando desde hace algunos años una atención renovada. Se trata de una fosfoproteína nuclear de 53kd que inicialmente se encontró en asociación con el antígeno T del virus SV40 en células de roedores transformadas^[195,163](Lane, 1979; Linzer 1979). Posteriormente se observó que distintas líneas celulares transformadas por distintos agentes, entre los que se incluían virus tumorales tanto DNA como RNA , irradiaciones, o carcinógenos químicos, presentaban niveles elevados de *p53*. Este hecho, y la observación de que podía cooperar con el oncogen *ras* (cuyo producto es la *p21*) en las transformación de células primarias, llevó a consignar a la *p53* como perteneciente a la familia de las oncoproteínas nucleares *myc* (*p62*) y *myb*^[265](Subler, 1992). Con el tiempo se advirtió que dicha proteína se trataba de una forma mutada de la proteína originaria, conocida ahora como *wild-p53*^[115](Hinds, 1989).

De igual modo que ocurre con el gen del Retinoblastoma (RB), al gen de la *p53* se le considera hoy un antioncogen o gen supresor de tumores (Levine, 1991). Por el momento, las mutaciones de la *p53* representan los defectos genéticos más frecuentemente informados en los carcinomas humanos, conociéndose también que la mayoría de estas mutaciones se localizan en cuatro regiones principales de la proteína (residuos 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286) (Nigro, 1989; Takahashi, 1989; Vogelstein, 1990; Iggo, 1990; Baker, 1990; Hollstein 1990 y 1991)[193,268,277,125,8,119,120].

Hoy día se sabe que la expresión de la proteína *wild-p53* es capaz de

inhibir la proliferación de células transformadas, suprimir la transformación celular mediada por los oncogenes y eliminar el potencial tumorigénico de algunas líneas celulares derivadas de tumores^{18,159,265} (Baker, 1990; Levine, 1991; Subler, 1992). Sin embargo, en un intento inicial de aprovechar la expresión de este gen mediante su inclusión en el genoma de retrovirus recombinantes sí consigue promover la diferenciación de queratinocitos normales pero falla en revertir la diferenciación aberrante en líneas tumorales e inmortalizadas con HPV¹²⁹⁰ (Woodworth, 1993).

A la proteína w-p53 se le asigna en estos momentos, la función de controlar el ciclo celular normal mediante la regulación de la transcripción o la replicación del DNA. La w-p53, interactuaría con un homólogo celular al antígeno T inhibiendo su función y con ello el comienzo de la replicación del DNA y su entrada en la fase de síntesis.

Alternativamente, la w-p53 podría actuar como un transactivador de la transcripción génica, ya fuera promoviendo o reprimiendo la síntesis de RNAm y en concreto reprimiendo la transcripción de algunos promotores celulares y virales e inhibiendo la transcripción de *c-fos*, *c-jun*, *Il6*, *β-actin*, *MDR1* etc.^{194,239,49,265} (Ginsberg, 1991; Santhanam, 1991; Chin, 1992; Subler, 1992). En todos los casos estudiados, las proteínas mutadas de p53 encontradas en los tumores tenían propiedades menos inhibitorias que la w-p53, e incluso en algunos casos una función activadora. Diferentes proteínas mutadas de p53 tienen además diferentes efectos cuantitativos en la inhibición de promotores.

Queda por determinar si alguna región específica de unión de la p53 reconoce alguna secuencia específica de DNA. Por tanto, la w-p53 podría tener cierto papel en la regulación de los genes de transcripción, quizás sobre un grupo de genes involucrados en el paso de la fase G1 tardía a la fase S del ciclo celular^[159](Levine, 1991). Sin embargo, todavía se desconocen las funciones bioquímicas precisas de esta proteína.

Considerando el efecto de w-p53 sobre la actividad de ciertos promotores, algún autor ha observado un descenso en la regulación del RNAm de PCNA^[182](Mercer, 1991). Si bien esta posibilidad no está todavía suficientemente explorada.

El gen del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) regulado por algunos factores del crecimiento^[4,133](Almendral, 1987; Jaskalski, 1988), codifica una proteína que es un componente de la maquinaria celular de replicación del DNA, identificándose como un cofactor de la polimerasa δ del DNA^[24,219] (Bravo, 1987; Prelich, 1987).

Centrándonos sobre el producto del gen E6 de los HPVs, conocemos que se trata de una proteína de unos 150 aminoácidos aproximadamente, que es capaz de immortalizar por sí sola o junto con E7, células mamarias humanas, así como células epiteliales escamosas y fibroblastos^[110,106,188,281](Band, 1991; Harwley-Nelson, 1989; Münger, 1989 y Watanabe 1989).

A la mencionada interacción entre el producto del gen E6 de los HPV de "alto riesgo" y la proteína w-p53 de la célula huésped, se le han propuesto dos mecanismos en virtud a los cuales se produce la abrogación de las funciones de esta última. (1) Mediante la prevención de la función normal de la w-p53 al bloquear o alterar la interacción de la w-p53 con su blanco celular normal; y (2) Mediante la eliminación de la w-p53 causada por degradación proteolítica.

Para esta segunda hipótesis se ha demostrado *in vitro* que las proteínas E6 son capaces de promover la degradación de la w-p53 por vía del sistema proteolítico dependiente de la ubiquitina^[242,284] (Scheffner, 1990; Werness 1990).

Para algunos autores, el gen de los HPV 16 y 18 con mayor capacidad de transformación celular parece ser el E7^[134] (Jewers, 1992). Este gen codifica una proteína fosforilada de unos 11kDa con ciertas homologías con las proteínas E1A del Adenovirus 5, y con el antígeno T ("large antigen T") del virus simio SV40 que muestran la capacidad de ligarse a la proteína sin fosforilar del gen RB^[73] (Dyson, 1990). Del mismo modo se ha visto que ciertos cambios introducidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína E7 anulan esta capacidad de ligarse con la p105 y también inhiben la capacidad de transformar, en colaboración con el oncogen activado *ras*, las células NIH 3T3 y fibroblastos embrionarios de rata^[72,12,47,128] (Dyson, 1989; Barbosa, 1990; Chesters, 1990; Imai, 1991).

Se conoce que la forma no fosforilada de la pRB predomina en la células en fase G0 y parece actuar como supresora del crecimiento. Sin embargo, en estado fosforilado parece permitir dicho crecimiento. La p105 actúa secuestrando e inactivando ciertas proteínas nucleares (por ejemplo, los factores de la transcripción E2F, *N-myc* y el *c-myc*) involucradas en la proliferación celular^(27,283)(Buchovich, 1989; Weinberg, 1991).

Se sabe, en consecuencia, que se requiere de la unión entre p105 y el producto del E7 para poder transformar células de roedores, sin embargo esto no es esencial para immortalizar la células epiteliales humanas⁽¹³⁴⁾(Jewers, 1992). Para poder lograr una immortalización eficiente en las mismas, es preciso, bien que intervengan conjuntamente E7 y E6, o bien que E7 esté vinculada con otros procesos celulares hasta el momento desconocidos.

Como resumen, podemos añadir a lo dicho que, la immortalización de los queratinocitos del cervix, y como resultado la inhibición de su diferenciación, son el primer paso en un proceso que puede llevar a la malignización de las células. Por tanto, ciertos tipos de virus HPV pueden estar involucrados en los estadios iniciales de la enfermedad, aunque otros factores también puedan dictar esta progresión a la malignidad⁽¹³⁴⁾(Jewers, 1992).

También se han estudiado la expresión de cierto número de oncogenes en las lesiones preneoplásicas e invasoras del cuello uterino, observándose por ejemplo que existe correlación entre la p21 (producto del oncogen *ras*) y el

grado de progresión de las lesiones preneoplásicas^[233,234] (Sagae, 1989 y 1990). En cuanto al *c-myc*, la valoración de su sobreexpresión junto con el status de ganglios linfáticos y el tamaño tumoral, pueden servir como buenos indicadores determinantes de mayor índice de recidivas^[22] (Bourhis, 1990). Si bien, resulta controvertido este hallazgo dado que otros autores aprecian una mayor concentración de antígeno *c-myc*, en células epiteliales procedentes de epitelios normales frente a las procedentes de CIN o carcinomas invasores^[107,123] (Hendy-Ibbs, 1987; Hughes 1989).

En otro orden de cosas, y con respecto a los adenocarcinomas endocervicales, hay también resultados contradictorios entre distintos autores, no vinculando unos la presencia de HPV con el desarrollo de los adenocarcinomas endocervicales^[96] (Griffin, 1991), y otros que sí encuentran DNA de HPV 16/18 presente en una proporción significativa de estas neoplasias^[135,112] (Johnson, 1992; Higgins 1992).

Como vemos, el avance en el campo de las neoplasias cervicales ha sido considerable en las últimas décadas. Nos resta decir que, si bien se detecta infección por HPV en una significativa proporción de lesiones escamosas de alto y bajo grado, no todas las lesiones progresan hacia una forma invasiva^[266] (Syrjänen, 1985), estimándose que en las lesiones diagnosticadas como CIN 1 se produce una regresión espontánea en el plazo de 18 meses de un 65.2% de los casos^[40] (Courtial, 1991). A esto podemos añadir que hay un indudable factor inmunológico a tener en cuenta a la hora de considerar la progresión y

el comportamiento de estas lesiones¹²²⁰⁾ (Radhakirishna Pillai, 1990).

Podemos mencionar en este sentido por ejemplo, la reciente aportación realizada en la que se observa una alta correlación entre la pérdida de expresión de la proteína transportadora asociada a la presentación de antígenos con la pérdida de expresión de los locus HLA-B en los carcinomas cervicales positivos para HPV-16¹⁴²⁾ (Cromme, 1993)

Las investigación en el campo de la inmunología relacionada con las infecciones por HPV resulta muy activa desde hace algunas décadas, habiéndose convocado hasta la fecha dos reuniones internacionales monográficas al respecto, de cuyos trabajos se está desarrollando un importante cuerpo de conocimientos que nos permite vislumbrar resultados esperanzadores a medio y largo plazo. (International Workshop Immunology on HPV, Amsterdam PB 1992 y Cambridge UK 1993).

También resulta necesario mencionar que, a pesar del tratamiento local dado a las lesiones condilomatosas ano-genitales, ya sea mediante crioterapia o laserterapia, se estima que se producen recurrencias en un 67% de los casos, habiéndose detectado la presencia del virus en los márgenes de las lesiones y aún en epitelios morfológicamente normales¹⁷⁹⁾ (Ferenczy, 1985).

Se ha relacionado un incremento de la incidencia de lesiones precursoras cervicales y carcinomas invasores en pacientes en tratamiento con agentes

inmunosupresores^{1143,1471}(Kay, 1970; Koss, 1992), así como en pacientes con el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida en los que parece que se muestran más rápidamente progresivas¹²⁴⁷¹(Schwartz 1991).

En el siguiente apartado exponemos las razones teóricas que nos servirán de base para el ulterior enunciado de nuestra hipótesis de trabajo. Abordamos lo que representa la glicosilación a nivel celular y las observaciones realizadas en cuanto a su alteración en los distintos procesos neoplásicos del organismo.

1.2.- ENUNCIADO DEL PROBLEMA

Dejando al margen las consideraciones hechas con respecto a la infección por los distintos tipos de HPV, podemos recordar la afirmación de Senitiroh Hakomori que dice: "el cáncer es una enfermedad del fenotipo independientemente de su mecanismo genético, y por tanto el diagnóstico y tratamiento del cáncer debe ser enfocado en relación con el fenotipo"^[99](Hakomori, 1988).

Siguiendo en esta línea nos parece que tiene interés que, sea cual sea la causa desencadenante de la transformación maligna, lo que parece de mayor importancia es que esta transformación neoplásica celular se acompaña de una serie de modificaciones cualitativas y cuantitativas en la forma de ser de la célula. Diversos autores, entre los que se encuentra Hakomori, han enfocado el estudio de estas alteraciones en el trastorno que acontece en la síntesis de los compuestos glicoconjugados presentes en las membranas celulares. Estas moléculas son compuestos orgánicos de estructura extremadamente variable y compleja y de muy difícil identificación, que se caracterizan básicamente por incluir una porción carbohidratada en su composición.

Los glicoconjugados pueden dividirse en tres grandes grupos según su composición: Los proteoglicanos, glicoproteínas y glicolípidos^[123](Hughes, 1983).

Los proteoglicanos son compuestos inicialmente glicoproteicos en su síntesis primaria que van perdiendo a lo largo de su proceso de formación y secreción, buena parte de su componente proteico para quedar como una molécula con un predominio del componente carbohidratado completado por un componente proteico.

Se trata de compuestos localizados en su mayor parte en el tejido conectivo y podemos mencionar como tipos representativos de los mismos a un grupo de sustancias como el ácido hialurónico, condroitín sulfato, heparán sulfato, queratán sulfato, y heparina, la mayor parte de los cuales intervienen en la conformación de los geles conectivos intersticiales.

Las glicoproteínas y los glicolípidos son las sustancias más importantes en relación con el trastorno del fenómeno de la glicosilación observada en los procesos neoplásicos. Se encuentran de manera constante en las membranas citoplásmicas y confinadas casi exclusivamente en su superficie no citoplásmica, contribuyendo de manera destacada a la estructuración de su simetría. También hay evidencias que las vinculan con un papel fundamental en todos los fenómenos de interacción celular.

No se conocen en toda su extensión las funciones que realizan los azúcares (glicoproteínas y glicolípidos) a nivel de la membrana celular, describiéndose un papel estructural muy claro relacionado con la conformación, organización y estabilidad de numerosas proteínas, y por tanto de la misma

membrana. Estos radicales carbohidratados participarían en fenómenos biológicos tan diversos como la adhesión, el reconocimiento celular, la regulación del crecimiento celular, la fecundación y en fenómenos inmunitarios^[30] (Carretero-Albiñana, 1990).

Estos compuestos están asimismo relacionados con la determinación de la renovación y distribución de proteínas en el citoplasma, membranas celulares y matriz extracelular, no pudiéndose tampoco olvidar su papel fundamental en la constitución de determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos.

Ambos grupos de sustancias se caracterizan por poseer cadenas carbohidratadas cortas de estructura muy variable; únicas y unidas a compuestos lipídicos en los glicolípidos, y frecuentemente múltiples en las glicoproteínas.

Como indica Hakomori (1992), un número cada vez mayor de evidencias nos apuntan que los carbohidratos situados en la superficie celular y en la matriz extracelular juegan un papel principal en el reconocimiento celular y en la organización de los tejidos y los órganos, y que la expresión aberrante de los carbohidratos se relaciona estrechamente con ciertas enfermedades. Estos cambios en la composición carbohidratada y su expresión, pueden ser la causa y también efecto de la progresión de la enfermedad. Históricamente, el papel funcional de los carbohidratos en el reconocimiento celular ha sido la evidencia más claramente demostrable en el proceso de desarrollo y diferenciación celular^[103].

En este sentido, se han reconocido, tanto en animales como en el hombre, una serie de moléculas glicosiladas conocidas como moléculas de adhesión celular (CAMs), que se han agrupado en las siguientes familias: Superfamilia de las inmunoglobulinas (Familia Ig), familia de la cadherina, superfamilia de la integrina, familia de la selectina (LEC-CAM), familia H-CAM, y familia del factor de crecimiento epitelial EGF¹⁵²(Krog, 1992).

Si bien el análisis bioquímico de la parte glicocarbonada de las glicoproteínas y los glicolípidos ha demostrado un alto grado de heterogeneidad estructural, resultando el estudio de la estructura química de estos compuestos altamente difícil y complejo; existen medios biológicos más sencillos, basados principalmente en el uso de anticuerpos monoclonales y el empleo de lectinas, con los que podemos aproximarnos a los aspectos estructurales de los polisacáridos de la superficie celular.

La mayoría de los patrones de glicosilación periférica/terminal es polimorfo en el hombre y constituyen lo que se conoce como *grupos histo-sanguíneos*¹⁶³(Metoki, 1989), entre los que se encuentran los sistemas ABO, secretor, Lewis, TTn, y P. Estos determinantes antigénicos se han identificado en la mayor parte de los tejidos epiteliales humanos^{131,117}(Clausen y Hakomori, 1989; Holgersson 1992).

La base de biosíntesis de la polimorfía de estos determinantes se conoce desde hace tiempo que depende de la expresión, o falta de expresión, de la

actividad de una determinada transferasa. Dado que tan solo una enzima particular es la encargada de agregar un monosacárido específico del sustrato donante activo al sustrato aceptor, se estima que se requieren más de un centenar de glicosiltransferasas para sintetizar la mayor parte de las estructuras glicoproteicas conocidas.

Hasta la fecha sólo una pocas de estas transferasas han sido purificadas y homogeneizadas habiéndose podido establecer su estructura primaria y clonado su cDNA^[32] (Clausen, 1992). De las glicosiltransferasas conocidas hasta la fecha, se deduce que puede existir un modelo de estructura global para estas proteínas^[210] (Paulson, 1989). Los genes de las glicotransferasas podrían dar lugar a más de una transcripción determinando de este modo proteínas de diferentes tamaños y especificidades.

La glicosilación tiene lugar en el retículo endoplásmico o en el aparato de Golgi, conociéndose bien la topografía y las reacciones bioquímicas que acontecen a nivel de los distintos residuos protéicos de asparaginasa, serina y treonina.

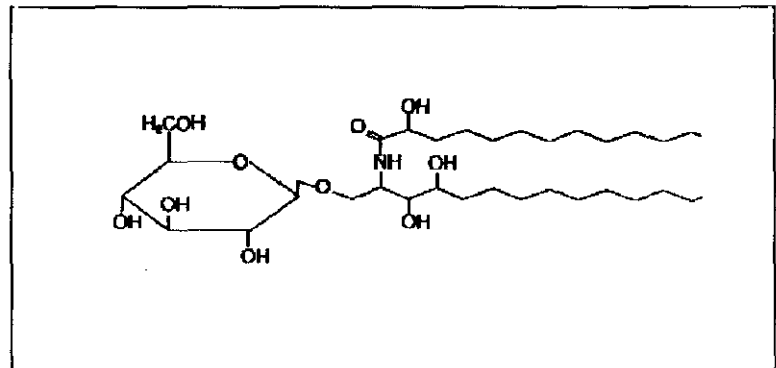
En cuanto a los determinante antigénicos histo-sanguíneos, y más en concreto con respecto al grupo ABO, se conoce que los locus que codifican la polimorfía genética ABO en el hombre, se encuentran localizados sobre el brazo largo del cromosoma 9. Los alelos codominantes de estos locus, A y B, codifican las transferasas α -3-GalNAc y α -3-Gal respectivamente. Estas dos enzimas

resultan ser muy parecidas, y de hecho difieren tan solo en cuatro aminoácidos. Además, los individuos del grupo O homocigóticos para los alelos silentes o recesivos de los locus ABO, tienen una única delección en una de sus bases al principio de la secuencia del gen (que corresponde al aminoácido 87), lo cual determina una variación en la lectura de la estructura genética que ocasiona un codon de stop en la posición correspondiente al aminoácido 117, lo que tiene como consecuencia un producto protéico inactivo^(282,200) (Yamamoto, 1990; Oriol, 1992).

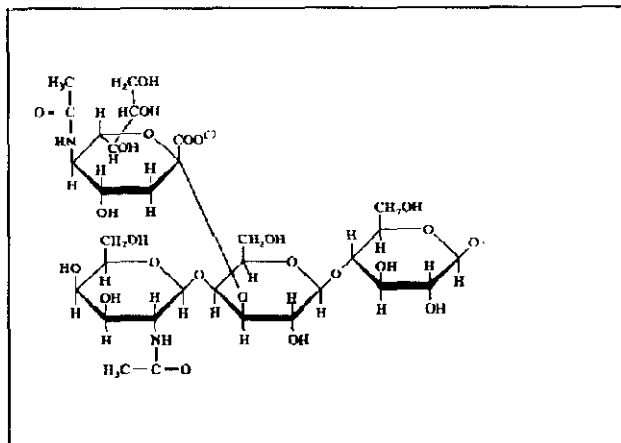
Los determinantes ABH son parte de glicosfingolípidos, componentes ubicuos en la capa lipídica externa de la membrana celular. Estos compuestos constan de una cadena hidrocarbonada hidrófoba unida en ángulo recto al lípido ceramida (un aminoalcohol, la esfingosina unido a un ácido graso). En su mayoría se ajustan a estructuras básicas definidas por la identidad y el tipo de enlace químico de los azúcares más próximos a la ceramida (series, "ganglio", "globo" y "lacto") Figura 1.

En los glicosfingolípidos de la serie "ganglio" la cadena se continúa en el azúcar N-acetilgalactosamina, al cual se le enlaza otra molécula de galactosa. Las dos azúcares pueden llevar unida un azúcar, el ácido siálico, que le confiere una carga negativa (sialogangliósidos). Estos glicosfingolípidos son abundantes en las neuronas, donde llegan a formar el 6% de la masa lipídica total, habiéndose identificado más de 40 gangliósidos diferentes.

FIGURA 1.- Estructuras de las series "ganglio", "globo" y "lacto".



Ilustr. 1 Fórmula simplificada de un glicosfingolípido compuesto de una parte carbohidratada y de una ceramida.



Ilustr. 2 Parte carbohidratada de un gangliosido GM₂

GANGLIO.-

Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer

GLOBO.-

GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1 Cer

LACTO.-

Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer

Los glicolípidos neutros (lactósidos y globósidos), son aún más abundantes, y están formados por una cadena carbohidratada de 1 a 15 residuos entre los que no se encuentra ácido siálico. En la serie "globo", la cadena inicial glucosa-galactosa se continúa en otra galactosa y una N-acetilgalactosamina. En la serie "lacto", por el contrario, la cadena inicial se prolonga en el azúcar N-acetilglucosamina y una galactosa. Según la posición que adopte el último enlace, las moléculas de la serie "lacto" se subclasifican en moléculas de tipo 1 y de tipo 2. Estas sustancias pueden ser muy específicas, apareciendo solamente en ciertos tejidos de determinadas especies, como ocurre con el gangliocerebrósido, componente glicolípídico mayor de la mielina, que llega a constituir el 40% de la monocapa externa de la membrana.

Con lo expuesto, vemos que se conocen bien las estructuras químicas y el control genético de la síntesis de los determinantes antigénicos ABO. Los genes H se encuentran en el brazo largo del cromosoma 19.

Se pueden construir seis tipos principales de antígenos ABH sobre diferentes cadenas precursoras de disacáridos. Los determinantes antigénicos específicos de cada una de estas sustancias se diferencian tan solo por la localización y el tipo de algunos de los azúcares terminales. Tabla I.

TABLA I

| <i>Cadenas Precursoras:</i> | |
|---|--|
| <u>Tipo 1:</u> $\beta\text{Gal}1 \rightarrow 3\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | <u>Tipo 4:</u> $\beta\text{Gal}1 \rightarrow 3\beta\text{GalNAc} \rightarrow \text{R}$ |
| <u>Tipo 2:</u> $\beta\text{Gal}1 \rightarrow 4\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | <u>Tipo 5:</u> $\beta\text{Gal}1 \rightarrow 3\beta\text{Glc} \rightarrow \text{R}$ |
| <u>Tipo 3:</u> $\beta\text{Gal}1 \rightarrow 3\alpha\text{GalNAc} \rightarrow \text{R}$ | <u>Tipo 6:</u> $\beta\text{Gal}1 \rightarrow 4\beta\text{Glc} \rightarrow \text{R}$ |

Cada una de estas cadenas precursoras se pueden transformar en un antígeno H al añadir una fucosa con enlace $\alpha 1 \rightarrow 2$ al azúcar terminal de Galactosa. Tabla II

TABLA II.

| <i>Antígenos H tipo 1 y 2:</i> | |
|--|--|
| <u>H Tipo 1:</u> $\beta\text{Gal}1 \rightarrow 3\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | <u>H Tipo 2:</u> $\beta\text{Gal}1 \rightarrow 4\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ |
| 1,2 αFuc | 1,2 αFuc |

Por medición de la α -3 o α -4-fucosiltransferasa se pueden añadir radicales de fucosa en las posiciones subterminales tercera o cuarta de GlcNAc dándonos los determinantes antigenicos Lewis^b y Lewis^y respectivamente. Tabla III

Para la conformación de los determinantes antigénicos A o B se requiere la estructura H como substrato a la que la enzima añade los correspondientes residuos αGalNAc o αGal . Tabla IV

Tabla III.

| <i>Antígenos Lewis b, Lewis a, Lewis x, y Lewis y:</i> | | | |
|--|--------------------|--|--|
| $\underline{Le^b} : \beta\text{Gal1} \rightarrow 3\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | | $\underline{Le^e} : \beta\text{Gal1} \rightarrow 3\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | |
| 1,2 | 1,4 | 1,4 | |
| αFuc | αFuc | αFuc | |
| $\underline{Le^y} : \beta\text{Gal1} \rightarrow 4\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | | $\underline{Le^x} : \beta\text{Gal1} \rightarrow 4\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | |
| 1,2 | 1,3 | 1,3 | |
| αFuc | αFuc | αFuc | |

Tabla IV.

| <i>Grupos sanguíneos A y B tipos 1 y 2:</i> | |
|--|--------------------|
| $\underline{A Tipo 1} : \alpha\text{GalNAc1} \rightarrow 3\beta\text{Gal1} \rightarrow 3\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | |
| | 1,2 |
| | αFuc |
| $\underline{B Tipo 1} : \alpha\text{Gal1} \rightarrow 3\beta\text{Gal1} \rightarrow 3\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | |
| | 1,2 |
| | αFuc |
| $\underline{A Tipo 2} : \alpha\text{GalNAc1} \rightarrow 3\beta\text{Gal1} \rightarrow 4\beta\text{GlnNAc} \rightarrow \text{R}$ | |
| | 1,2 |
| | αFuc |
| $\underline{B Tipo 2} : \alpha\text{Gal1} \rightarrow 3\beta\text{Gal1} \rightarrow 4\beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ | |
| | 1,2 |
| | αFuc |

En las Tabla V y VI reproducimos el esquema propuesto por Oriol de las estructuras químicas, el papel desempeñado por las distintas enzimas y la información genética de las vías principales de biosíntesis de las estructuras oligosacáridas mono y difucosiladas tipo 1 y 2⁽²⁰⁰⁾ (Oriol 1992).

Sin embargo hay que señalar, como este autor indica, que no todas las enzimas referidas son del todo específicas, existiendo rutas de biosíntesis alternativas.

Todas las fucosilasas descritas son genéticamente polimorfas y se heredan como rasgos mendelianos simples. Los individuos con una o dos copias de los alelos positivos H, Se, Le y Le^x, tienen la correspondiente transferasa y por tanto determinan el correspondiente antígeno oligosacárido⁽²⁰⁰¹⁾ (Oriol 1992).

Alrededor de 10⁶ epítomos A,B o H se encuentran anclados sobre la membrana de cada glóbulo rojo en un individuo H normal -El fenotipo Bombay, en el que no se produce el antígeno H es extremadamente raro-. En un 80% de la población general se pueden encontrar grandes cantidades de determinantes antigénicos ABH considerándose a estos como *secretores*. El 20% restante, *no secretores*, tan solo tienen en saliva trazas de estos antígenos. En la saliva de un 90% de la población también se encuentra gran cantidad de antígenos Le^a y Le^b, los cuales coinciden en que tienen el mismo antígeno Lewis sobre la superficie eritrocitaria, cosa que no ocurre con el 10% de la población restante. En esta población no se encuentran estos antígenos en saliva.

La combinación de los fenotipos secretor ABH y Lewis, expresados en saliva, nos clasifica cuatro grupos distintos:

- (I) Los individuos secretores ABH con Le^a o Le^b en saliva. Estos representan un 70% de la población.
- (II) Los que expresan antígenos Lewis en saliva (principalmente Le^a), y no son secretores. Representan un 20% de la población.
- (III) Los secretores ABH y Lewis negativos. 9% de la población.
- (IV) Y los no-secretores, Lewis negativos. 1% de la población.

TABLA V.- Estructuras químicas, genéticas y enzimáticas relacionadas con la ruta de biosíntesis principal de las estructuras oligosacáridas mono y difucosiladas tipo 1. (Oriol 1992)⁽²⁰⁰⁾

| Nombre | Le ^a | Le ^b | Le ^c (Precursor) | Le ^d (H tipo 1) |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Genes *ABO | | A o B 1 ↓ 3 | | A o B 1 ↓ 3 |
| Se-se | Gal 1 ↓ 3 | Gal2←1αFuc 1 ↓ 3 | Gal 1 ↓ 3 | Gal2←1αFuc 1 ↓ 3 |
| Le-le | GlcNAc4←1αFuc 1 ↓ R | GlcNAc4←1αFuc 1 ↓ R | GlcNAc 1 ↓ R | GlcNAc 1 ↓ R |
| Enzimas Secretor Lewis | - + | + + | - - | + - |

Los productos de los genes ABO transfieren αGalNAc1→3 para el grupo A, αGal1→3 para el grupo B y nada en el caso del O, pero sólo pueden actuar cuando está presente fructosa en α1→2.

TABLA VI.- Estructuras químicas, genéticas y enzimáticas relacionadas con la ruta de biosíntesis principal de las estructuras oligosacáridas mono y difucosiladas tipo 2. (Oriol 1992)¹²⁰⁰¹

| Nombre | Le ^x | Le ^y | I o i (Precursor) | H (H tipo 2) |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Genes A B O | | A o B 1 ↓ 3 | | A o B 1 ↓ 3 |
| H-h | Gal 1 ↓ 4 | Gal2←1αFuc 1 ↓ 4 | Gal 1 ↓ 4 | Gal2←1αFuc 1 ↓ 4 |
| Le ^x -le ^x | GlcNAc3←1αFuc 1 ↓ R | GlcNAc3←1αFuc 1 ↓ R | GlcNAc 1 ↓ R | GlcNAc 1 ↓ R |
| Enzimas | | | | |
| H | - | + | - | + |
| α-3-FT | + | + | - | - |

Los estudios estructurales de los glicoesfingolípidos plasmáticos han demostrado que los secretores ABH, Lewis-negativos (Grupo III) tienen un antígeno H tipo 1 (también llamado Le^d) en lugar de Le^a o Le^b; y que los no-secretores, Lewis negativos en saliva (grupo IV) tienen una cadena oligosacárida precursora tipo 1 (también llamada Le^c) además de un epitopo Le^x tipo 2.

Una larga serie de trabajos han ido estableciendo la expresión específica de los glicoesfingolípidos determinantes de grupo sanguíneo en los diferentes tejidos humanos. La consideración de este apartado sería extensa y nos apartaría en cierta medida del tema principal de nuestro interés; para una mayor información al respecto podemos encontrar un buen resumen de referencias en el trabajo de Holgersson y col. de 1992⁽¹¹⁷⁾. En la Tabla VII se reproduce un esquema de Holgersson donde se muestra la distribución en varios tejidos humanos de las distintas cadenas precursoras para los antígenos determinantes ABH, Lewis, y antígenos X/Y.

Se conoce desde hace tiempo que la expresión de los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo se hace extensible también a los diferentes epitelios del organismo. Con respecto al epitelio pavimentoso exocervical y al epitelio simple endocervical, Torrado y col. (1990) observan que la expresión de isoantígenos ABH se relaciona claramente con el status secretor de cada individuo. Advierten una expresión positiva en los epitelios endo- y exocervicales de los individuos secretores y negativa en los no secretores. Además, estos autores observan que el antígeno Le^y se expresa focalmente en la

generalidad de sus casos, a nivel de la mucosa endocervical e independientemente del status secretor o del fenotipo del Lewis. Este mismo patrón se repite en el caso del antígeno H-tipo 2, aunque sólo en los individuos secretores¹²⁷⁴⁾.

TABLA VII. DISTRIBUCION DE LAS CADENAS PRECURSORAS EN VARIOS TEJIDOS HUMANOS.

| | Tipo de cadena precursora | | | |
|--|---------------------------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Glóbulos rojos | + | +++ | ++ | + |
| Plasma | +++ | + | (+) | - |
| Tejido vascular | ++ | + | ++ | - |
| Hígado | ++ | - | - | - |
| Páncreas | +++ | + | (+) | +++ |
| Riñón | + | + | (+) | +++ |
| Cels. epiteliales del uréter | + | | - | ++ |
| Estómago | +++ | | - | - |
| Cels epiteliales del intestino delgado | +++ | (+) | (+) | - |
| Cels epiteliales del intestino grueso | +++ | (+) | - | - |

Okamura (1990) ha realizado un estudio de localización citoquímica de los antígenos de grupo sanguíneo ABH en las células secretoras de las glándulas cervicales humanas normales, aplicando tanto lectinas como anticuerpos monoclonales marcados con oro. Las lectinas específicas de los determinantes de grupo sanguíneo (DBA, HPA, GSAI-B4, UEA-I) reaccionaron positivamente y de forma heterogénea tan sólo a nivel de los gránulos secretores. Ningún caso expresó positividad alguna en los organelos intracitoplásmicos, ni en el

núcleo, ni en la membrana celular. Además, esta expresión coincidía con el grupo sanguíneo y el status secretor del paciente. Con los anticuerpos monoclonales se vió el mismo patrón, aunque además se observó que ocasionalmente había expresión a nivel nuclear^{1199j}.

En el estado actual de nuestros conocimientos, se considera hoy día a la expresión de estos antígenos histo-sanguíneos una manifestación de la maduración celular en cada tejido. Esto se ha visto a nivel de la mucosa de la cavidad oral donde se ha descrito un desarrollo secuencial de la expresión de los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo iniciada con positivities para cadenas precursoras a nivel de la capa más profunda, o germinativa; siguiéndose con determinantes H monofucosilados a nivel de las capas intermedias, y determinantes A o B en las capas más superficiales¹¹⁷⁰ⁱ(Mandel, 1988). Este patrón sugiere una actividad progresiva de las diferentes glicosiltransferasas durante la migración celular desde las capas profundas a las más superficiales^{1200j}(Oriol, 1992).

Una vez llegado a este punto, y habiendo expuesto sucintamente la síntesis y participación de los distintos compuestos glicoconjugados a nivel de la membrana citoplasmática, cabe decir que el motivo principal de estas consideraciones recae en lo más arriba adelantado. Esto es, que desde hace tiempo se conoce que existe una alteración evidente de la glicosilación en los procesos proliferativos y neoplásicos. Efectivamente, los procesos neoplásicos presentan constantemente alteraciones de los glicoconjugados de la superficie

celular; de manera general y siguiendo a Damjanov (1987), estos cambios se pueden clasificar en los siguientes apartados^[56]:

- 1.- Pérdida de ciertos compuestos normales.
- 2.- Aumento de ciertos compuestos normales.
- 3.- Distribución anómala de los compuestos normales.
- 4.- Aparición de compuestos distintos de los habituales en las células maduras normales de las que el tumor supuestamente se origina.

Se ocasionan en definitiva, una serie de alteraciones en estos glicolípidos asociadas a la transformación oncogénica, que Hakomori (1989) resume en los siguientes términos^[101]:

- A) Síntesis incompleta con o sin acumulación de precursores.
- B) Síntesis de neoglicolípidos .
- C) Cambios organizativos de los glicolípidos en las membranas celulares.

Los cambios de la glicosilación observados que se asocian con la transformación oncogénica parecen estar directamente relacionados con la expresión de las glicosiltransferasas responsables de esta biosíntesis^[100,210,168] (Hakomori, 1989; Paulson, 1989; Macher, 1991).

Son numerosos los trabajos que relacionan las alteraciones de los gliconjugados en los distintos procesos neoplásicos humanos. Desde los traba-

jos iniciales de Davidsohn (1966, 1969) y Kovarik (1968) en tejidos embebidos en parafina que incluían diferentes epitelios normales, carcinomas de células transicionales y escamocelulares, donde se confirmaba esta tesis, se han sucedido diferentes líneas de investigación con el propósito de extraer implicaciones pronósticas y de entender mejor la alteración que a nivel molecular representa la alteración de la glicosilación de los constituyentes de las células neoplásicas^{160,62,151}.

La introducción de los anticuerpos monoclonales capaces de identificar y distinguir específicamente la mayoría de las estructuras glicosiladas, ha permitido poder realizar estudios detallados de la glicosilación de las células y de los tejidos¹⁷¹(Mandel, 1992).

Los trabajos considerados como clásicos en cuanto al estudio inmunohistoquímico de los determinantes antigénicos de grupos sanguíneos ABH y Lewis se han realizado a nivel del tracto urinario humano, en condiciones normales y patológicas^{204,205,162}(Orntoft, 1989,1992 y Limas, 1991); en el tracto digestivo, incluyendo la cavidad oral^{171,59,131}(Mandel, 1992; David, 1992; Itzkowitz, 1992) o en el páncreas (Philipsen, 1988; Kim, 1988; Pour, 1988; Itai, 1988; Schwenk, 1989) [213,145,217,129,248].

Actualmente, aplicando la misma metodología desarrollada, se está ampliando el campo de estudio enfocándose sobre otras neoplasias de interés. En este sentido, se ha estudiado la expresión de los antígenos de grupos

sanguíneos ABH y Lewis en tejidos broncopulmonares normales y en sus neoplasias más comunes^[194,30,2,3](Nilsson, 1992; Carretero-Albiñana, 1990; Alvarez-Fernández, 1990), en tumores de células germinales humanas y embrionarias^[187,76](Motzer, 1988; Fenderson, 1992), y en las neoplasias del tracto genital^[62,261,160,114,238,127](Davidshon, 1969; Stafil, 1972; Lill, 1976; Himes, 1986; Sanders, 1990; Inoue, 1990).

Pasamos a comentar algunos de los hallazgos más significativos alcanzados en estos procesos neoplásicos. En cuanto al *aparato gastrointestinal*, y en concreto con respecto al *colon*, se conoce que la mucosa de esta localización tan solo expresa cierto tipo de antígenos carbohidratados. Los más frecuentemente encontrados son los de la serie lacto cadenas tipo 1 (Gal β 1-3GlcNAc) y tipo 2 (Gal β 1-4GlcNAc) relacionados con los determinantes de grupo sanguíneo que se expresan tanto a nivel de glicolípidos como glicoproteínas; y las estructuras tipo mucina de enlace O-glicanos tales como los antígenos Tn (N-AcGal α 1-O-Ser/Tre-polipéptido), sialil-Tn, y antígeno T (Thomson-Friederich. Gal β 1-3NAcGal), los cuales sólo se encuentran a nivel de las glicoproteínas.

En el feto, los determinantes ABH, Le^a y Le^b se expresan en la mucosa de todo el colon. Sin embargo, en el momento del nacimiento y en la vida adulta, tan solo el antígeno Le^a mantiene esta distribución pancolónica, quedando limitado al tercio proximal del colon la expresión del resto de los determinantes antigénicos (y sólo como cadenas tipo 1)^[236,52](Sakamoto 1986,

Dabelsteen 1988).

En el carcinoma de colon se pueden encontrar alteraciones de estos determinantes, siendo el hallazgo más frecuente la re-expresión en el tercio distal de los antígenos A,B,H y Le^b. Esta re-expresión puede deberse a un incremento de la actividad de la α -2-fucosiltransferasa. Además también se pueden expresar otro tipo de cadenas precursoras (tipo 2,3,4) ausentes en condiciones normales^[258,52,236](Smith, 1975; Debelsteen, 1988; Sakamoto, 1989).

En cambio, en los adenocarcinomas del tercio proximal del colon se observa pérdida de los determinantes antigénicos normalmente presentes. En ambas localizaciones, ocasionalmente se encuentran fenotipos tumorales que expresan antígenos de grupo incompatibles con el tipo de grupo sanguíneo de la paciente.

En estas neoplasias se ha asociado una modificación característica del antígeno Le^a, que consiste en la adición de ácido siálico a su residuo de galactosa terminal. Este antígeno puede ser reconocido por un MoAb el CA 19.9. En la mucosa normal la expresión de este antígeno es generalmente débil y se expresa en más del 70-75% en los casos de adenocarcinomas de colon, en la mitad de los adenomas, en algunas hiperplasias de la mucosa colónica, en las áreas displásicas de la enfermedad de Crohn y de la colitis ulcerosa^[1,74,1,19](Abe, 1986; Enblad, 1988; Blasco, 1989). Aunque a este expresión en tan

diversos procesos le confiere un carácter de inespecificidad, este mismo antígeno resulta ser mucho más útil a nivel del páncreas, revelándose como un buen marcador de los carcinomas de esta localización^[217,129,248] (Pour, 1988; Itai, 1988; Schwenk, 1989).

Los antígenos Le^x y Le^y que se expresan en el segundo mes de la gestación a nivel de toda la mucosa colónica, están ausentes salvo discretas expresiones débiles y focales. En cambio, los adenocarcinomas colónicos expresan de forma intensa este tipo de antígenos, lo que indicaría un incremento de la actividad de la enzima β 1,3 N-acetilglucosaminotransferasa responsable de la síntesis de la cadena tipo 2 precursora. Es más, el antígeno Le^x es tributario de alteraciones de elongación, fucosilación y sialitación asociadas al desarrollo neoplásico^[144,232,290,131] (Kim, 1986; Ruggiero, 1988; Waldock, 1989; Itzkowitz, 1992).

En cuanto a las *neoplasias originadas en el urotelio*, desde los primeros estudios realizados se observó una pérdida de expresión de los antígenos A y B, pérdida de expresión más intensa en aquellas neoplasias anaplásicas e infiltrantes, relacionándose este hecho con su capacidad invasora. En seguida, estos determinantes se revelaron como posibles marcadores predictores del comportamiento biológico de los papilomas de la vejiga. (Flanigan, 1983; Limas, 1986, 1991; Juhl, 1986; Cordon-Cardo, 1986; Orntoft 1988, 1989) [82,161,162,137,37,202,203].

En las neoplasias de alto grado de la vejiga se ha demostrado una pérdida de actividad de las transferasas A y B mientras que las transferasas Lewis Y (α 1-4 fucosiltransferasa) y X (α 1-3 fucosiltransferasa) permanecían activas^[37,202,205] (Cordon-Cardo, 1988; Orntoft, 1988; Orntoft, 1992).

Con respecto a las *neoplasias broncopulmonares*, se han encontrado, mediante el empleo de lectinas, cambios en el patrón habitual de su expresión, confirmando una glicosilación anómala, si bien, no se advierte un patrón específico de reactividad para cada uno de los tipos histológicos mayores de los carcinomas pulmonares^[61,116,295,2] (Davidsohn, 1969; Hirohashi, 1984; Zenita, 1988; Alvarez-Fernández y Carretero-Albiñana 1990). Tan sólo dos hechos parecen válidos: 1) Se ha relacionado la expresión de grupo A tumoral como un factor pronóstico favorable en los carcinomas de pulmón no-células pequeñas^[158] (Lee 1991); y 2) parece haber una estrecha relación entre las moléculas de adhesión celular, y en concreto con la presencia de NCAM (molécula de adhesión celular neural) reconocida por los anticuerpos para los antígenos del cluster 1, y los carcinomas pulmonares no-células pequeñas^[194] (Nilsson, 1992).

En cuanto a los *epitelios estratificados*, como ya comentamos más arriba, se han comprobado cambios acusados en las expresión de los antígenos histo-sanguíneos durante su diferenciación celular, movimiento y transformación maligna. Resulta ser un hallazgo generalizado la ausencia de expresión de cadenas azucaradas ramificadas a nivel del estrato basal, y expresión de las

mismas en estratos suprabasales, siguiendo una progresión secuencial de aparición según su síntesis. Además, se advierten patrones diferentes en la expresión de estos determinantes entre epitelios queratinizantes y no queratinizantes.

A nivel de la mayoría de los *carcinomas epidermoides de la cavidad oral*, y en parte de *sus lesiones precursoras*, se observa una disminución de expresión de los antígenos A y B, e incremento de sus cadenas precursoras, lo que parece relacionarse con el grado histológico madurativo. Es más, se ha relacionado tanto en el carcinoma de la cavidad oral como en del cuello uterino, la ausencia de cadenas precursoras de A y B (ausencia de antígeno H) en los márgenes de invasión tumoral, con una mayor incidencia de metástasis y un peor pronóstico. Hecho que se vincularía con un incremento en la "locomoción celular" prerequisite del fenómeno metastásico^[219,53](Prime, 1985; Dabelsteen, 1988).

Se conoce que en las personas no secretoras, los antígenos A y B se encuentran ausentes de las mucosas normales; lo que no implica la falta de las enzimas precisas para su síntesis, sino la ausencia de síntesis de la cadena precursora H, sobre la cuál se formarían dichos antígenos. La síntesis del antígeno H está controlada por el gen secretor.

Los estudios realizados a nivel del *cuello uterino* no son tan numerosos como los llevados a cabo en otras localizaciones. Cabe decir sin embargo, que

existe cierta similitud de resultados entre los hallazgos obtenidos a nivel del cervix con los obtenidos a nivel de la mucosa oral^[54](Dabelsteen, 1992), con la salvedad de que en el cervix existe una zona de transformación que está influida por los ciclos hormonales estrogénicos/progesterogénicos lo que podría jugar algún papel en cuanto a la expresión de estos determinantes histo-sanguíneos.

Con lo comentado hasta ahora se puede decir que, si bien se conoce que los procesos proliferativos y neoplásicos malignos de distintas localizaciones se acompañan de diversas alteraciones en la glicosilación de las moléculas lipídicas y proteicas de la membrana citoplasmática, y que dichas alteraciones parecen tener como causa lógica una falta o sobreexpresión de una o varias de las glicosiltransferasas específicas, estos hechos no tienen hasta el momento una relación demostrada con alguna otra alteración de las conocidas que acontecen en los mismos procesos neoplásicos. En la bibliografía revisada, no se hace mención alguna a una posible relación entre estas alteraciones de la glicosilación y los fenómenos cada vez más estudiados de la activación de protooncogenes o abrogación de las funciones de las proteínas reguladas por los genes supresores conocidos. Pensamos que merecería la pena intentar relacionar, de ser ello posible, los hallazgos de ambas consideraciones, y de quedar confirmada dicha suposición intentar esclarecer en futuras tentativas los mecanismos más íntimos de la biología de estas neoplasias.

En el siguiente apartado hacemos una revisión histórica de la bibliografía específica en relación con la expresión de los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABO y Lewis a nivel del cuello uterino normal, en sus lesiones preneoplásicas e invasores.

1.3.- ANTECEDENTES HISTORICOS

Dabelsteen y col. en su revisión de 1992 sobre los cambios en la glicosilación de los carcinomas epidermoides, relatan que los trabajos originarios en los que se empiezan a asociar estas alteraciones con los procesos tumorales se deben a Hirschfeld 1929 y Thomsen 1930.

Sin embargo, no es hasta finales de los años sesenta cuando se publicaron los ya clásicos trabajos de Kovarich y Davidsohn y col. (1968, 1969) en los que, mediante las técnicas de inmunofluorescencia y de reacción de aglutinación celular mixta (MCRA), observaron una pérdida de expresión de antígenos específicos de grupo sanguíneos A,B,O(H) en las lesiones neoplásicas malignas del cuello uterino. Esto fue interpretado como "manifestación de la función de desdiferenciación análoga a la desdiferenciación morfológica". Fenómeno que se relacionó desde los primeros trabajos con una mayor incidencia de metástasis. Hecho que se hacía extensivo a adenocarcinomas procedentes del tracto gastrointestinal y ovario, a tumores de células transicionales procedentes del urotelio, y a carcinomas epidermoides de piel, lengua, y laringe.

NOTA: *

* Dabelsteen E., Clausen H. *Carbohydrate pathology*. APMIS Suppl n° 27, vol. 100, 1992.

* Davidsohn I., Kovarik S., Ni L.Y. *Isoantigens A,B and H in benign and malignant lesions of the cervix*. Arch Pathol 1969, **87**:306-314.

* Kovarik S., Davidsohn I., Stejskal R. *ABO antigens in cancer. Detection with the mixed cell agglutination reaction*. Arch Pathol 1968, **86**:12-21.

También desde entonces se reconoce que, en la secuencia: metaplasia (?), displasia y carcinomas in situ del cervix, se reproduce un buen modelo en el que se pueden seguir los cambios de expresión de los isoantígenos ABH.

Estos hallazgos iniciales fueron confirmados con posterioridad por otros autores (Lill y col. 1976, Bonfiglio y col. 1976). Bonfiglio y col. fueron los primeros autores en publicar un trabajo en el que se empleaba, además de la técnica de inmunofluorescencia, una técnica de inmunoperoxidasa para la determinación de los isoantígenos A y B.

Mambo en 1983, llevó a cabo un estudio con inmunoperoxidasa para investigar el status de los isoantígenos de grupo sanguíneo ABO, en condilomas acuminados del cervix uterino, observando pérdidas completas de estos isoantígenos en el 33% de los casos, pérdidas parciales en el 47%, y retención de isoantígenos en el 20% de los casos que estudió, suponiendo que estas últimas lesiones podrían representar un grupo particular en el que se diera con más frecuencia la regresión espontánea.

Stubbe Teglbjaerg y col. en 1985, mediante inmunofluorescencia, observaron un patrón progresivo en la expresión de estos isoantígenos a nivel

* Lill P.H., Norris H.J., Rubenstone A.I., Chang-Lo M., Davidsohn I. *Isoantigens ABH in cervical intraepithelial neoplasia*. Am J Clin Pathol 1976, **66**:767-774.

* Bonfiglio T., Feinberg M.R. *Isoantigenes loss in cervical neoplasia. Demonstration by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques*. Arch Pathol Lab Med 1976, **100**:307-310.

* Mambo N.C. *Isoantigens status in condyloma acuminata of the uterine cervix: An immunoperoxidase study*. Am J Clin Pathol 1983, **79**:178-181.

* Stubbe Teglbjaerg C., Norrild B., Debelsteen E. *Changes of blood antigens in premalignant and malignant lesions of the human exocervix*. Acta Pathol Microbiol Scand 1985, **93**:149-151.

del epitelio pavimentoso normal del cervix, advirtiendo que las células basales y algunas parabasales expresaban N-Acetilactosamina; las parabasales y las células del estrato espinoso bajo, el antígeno H; y las células del estrato espinoso alto expresaban antígenos de grupo sanguíneo A. En todas las lesiones premalignas y malignas confirman también, como los autores que le preceden, una disminución irregular en el contenido de los antígenos A y H, con pérdida casi completa o acumulación de cadenas precursoras.

Schulte y col. en 1985 realizaron un estudio bastante completo de la glicosilación a nivel del epitelio cervical normal utilizando nueve lectinas encontrando que, en el epitelio escamoso estratificado exocervical, y en el epitelio columnar endocervical normales de algunos, aunque no en todos los especímenes estudiados, mostraban tinciones para los azúcares terminales α -N-Acetil-D-Galactosamina, α -D-Galactosa, β -D-Galactosa, y α -D-Fucosa. Las dos primeras expresiones, para azúcares terminales en los isoantígenos de grupo sanguíneo A y B respectivamente, correspondían con el grupo sanguíneo de la paciente (salvo en tres de nueve casos de grupo A que resultaron negativos). La mitad de pacientes del grupo sanguíneo O y del A mostraron expresiones positivas para α -D-Galactosa a nivel de la secreción endocervical.

Sakamoto y col. en 1986 siguen confirmando los hallazgos previos y

* Schulte BA., Poon K.C., Rao KP., Spicer S.S. *Lectin histochemistry of complex carbohydrates in human cervix*. Histochem J 1985, **17**:627-654.

* Sakamoto Y., Kamada M., Irahara M., Hasebe H., Daitoh T., Furumoto H., Kishi Y., Mori T. *Differences in clinical significance of blood antigens A, B, and H in carcinoma tissue in the uterine cervix*. Gynecol Oncol 1986, **25**:195-203.

observan una mayor frecuencia de pérdida completa del antígeno H en los carcinomas invasores de células pequeñas no queratinizantes, con respecto a los carcinomas queratinizantes. En este grupo de neoplasias con pérdida de antígeno H encuentra una peor supervivencia a los dos años lo que le induce a considerar esta hallazgo como útil indicador de peor pronóstico.

To A.C. y col. en 1986 comparan la expresión de los isoantígenos de grupo sanguíneo A,B,H y la expresión del antígeno Oxford, en cuanto marcadores de predicción de supervivencia. Observan que ambos marcadores son independientes, y que no se correlacionan con el grado tumoral. Advierten que los isoantígenos de grupo sanguíneo estudiados pueden servir como predictores de la supervivencia si también se tiene en consideración la profundidad de invasión tumoral.

Himes y col. en 1986 realizan un estudio sobre extendidos citológicos de tomas vagino-cervicales, mediante anticuerpos monoclonales siguiendo una técnica de la inmunoperoxidasa modificada para estas muestras. Sobre estas células exfoliadas confirman los mismos hallazgos que los obtenidos sobre tejidos, advirtiendo una pérdida progresiva de la expresión de los determinantes

* To AC., Soong SJ., Shingleton H.M., Wilkerson J.A., Hatch K.D., Phillips D. *Immunohistochemistry of the blood group A,B,H isoantigens and Oxford Ca as prognostic markers for stage IB squamous cell carcinoma of the cervix.* Cancer 1986, 58:2435-2439.

* Himes T.R., Erst C.S., Koprowska I. *Loss of blood isoantigens in exfoliated cells during the progression of CIN demonstrated by monoclonal antibody staining.* Acta Cytologica 1986, 30:461-468.

de grupo sanguíneo ABH paralela con el progresivo grado de severidad de las lesiones intraepiteliales cervicales. Y además, la pérdida de expresión de estos isoantígenos en células con morfología aparentemente normal, puede predecir la aparición de ulteriores anormalidades morfológicas relacionadas con el diagnóstico de displasia a nivel citológico.

Sanders y col. en 1990 describen que a nivel de la mucosa pavimentosa cervical se presenta una extensa zona de células suprabasales que expresan Le^a y Le^b y con frecuencia lo hacen de forma independiente con el status secretor. Una proporción de este antígeno Le^a está en forma sialitada. En las lesiones neoplásicas intraepiteliales, observa una pérdida progresiva de ambos antígenos de forma paralela con su desdiferenciación. En los carcinomas epidermoides invasores, estos antígenos tan sólo se expresan en las áreas de diferenciación.

Scharl y col. en 1991 han estudiado la expresión del antígeno sialil-Le^a en varios adenocarcinomas del tracto genital femenino, empleando el MoAb CA19-9 que mencionamos más arriba donde apuntamos su utilidad en la identificación de las neoplasias pancreáticas. Estos autores han observado que el epitelio normal del endocervix expresa de forma aislada este antígeno y que es

* Sanders D.S.A., Milne D.M., Kerr M.A. *The expression of Lewis(a) and Lewis(b) antigens reflects changes in fucosylation between normal and neoplastic cervical squamous epithelium.* J Pathol 1990, **162**:23-28.

* Scharl A., Crombach G., Vierbuchen M., Gohring U., Gottert T., Holt JA. *Antigen CA 19-9: Presence in mucosa of nondiseased Müllerian duct derivatives and marker for differentiation in their carcinomas.* Obstet Gynecol 1991, **77**:580-585.

mayor en las neoplasias de estirpe glandular endocervicales. Además esta expresión se relaciona inversamente con el grado de diferenciación.

Stubbe Teglbjaerg y col. en 1991 hacen una revisión de los hallazgos más destacados en relación con la distribución de los antígenos de grupo sanguíneo en cervix y endometrio uterino. Advierten que los resultados conocidos demuestran que se produce una glicosilación en las áreas metaplásicas en las zonas de transformación diferente a la del epitelio normal pavimentoso. Así, por ejemplo, las células escamosas en la metaplasia inmadura expresan los antígenos histo-sanguíneos a nivel del citoplasma pero no en la membrana a diferencia de la metaplasia madura donde la expresión sí se manifiesta en membrana.

Estos autores citando a Fuchs (1988) apuntan la posible implicación que este fenómeno puede tener haciendo notar que la superficie carbohidratada de la célula es importante para la adhesión de microorganismos, los cambios manifestados a nivel de esta superficie podrían influir en la adhesión y/o penetración viral, siendo esta una de las razones por las que las células metaplásicas podrían ser más susceptibles a la infección viral.

* Stubbe Teglbjaerg C., Ravn V., Mandel U., Dabelsteen E. *Distribution of histo-blood group antigens in cervical and uterine endometrium*. AMPIS Suppl 1991, 23:100-106.

* Fuchs P.G., Girardi F., Pfister H. *Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri*. Int J Cancer 1988, 41:41-51

Ogawa y col. en 1992 confirman que se produce una expresión más intensa de los antígenos sialil-Tn y CEA en los carcinomas cervicales que en su contrapartida en el epitelio normal. Además, observan un patrón de expresión diferente para los antígenos sialil-Tn y Le^x entre las lesiones primarias, donde se expresa a nivel de los nidos tumorales en una localización central, y las lesiones metastásicas, donde su expresión es periférica.

* Ogawas H., Inoue M., Tanizawa O., Miyamoto M., Sakurai M. *Altered expression of sialyl-Ty. Lewis antigens and carcinoembryonic antigen between primary and metastatic lesions of uterine cervical cancers.* Histochemistry 1992, **97**:311-317.

1.4.- OBJETIVOS

En el caso de las neoplasias del tracto genital femenino consideramos, como así también lo apuntan las referencias señaladas, que representan un modelo óptimo y hasta el momento no suficientemente explorado, para el estudio de las alteraciones fenotípicas en la progresión desde el epitelio normal al neoplásico. Para ello estudiamos un total de 36 lesiones que cubrían un espectro desde las metaplasias cervicales uterinas con y sin displasia y/o condiloma, hasta carcinomas invasores.

Después de su fijación y procesado hemos empleado en el estudio inmunohistoquímico, anticuerpos primarios procedentes de Ortho Diagnostic (Cambridge. Mass.), Mabs BG1, BG2, BG3, BG5, BG6, BG7 y BG8, reactivos a precursores de los determinantes de las cadenas tipo 1, grupo A (cadenas tipo 1 y 2), grupo B (cadenas tipo 2), Le^a (cadena tipo 1), Le^b (cadena tipo 1), Le^x (cadena tipo 2) y Le^y (cadena tipo 2) respectivamente.

Los hallazgos los hemos comparado con las tinciones con lectinas biotinadas (Sigma Chem. St. Louis, MO) *Ulex europeaus I* (UEA I), *Lotus Tetragonolobus* (LTA), *Dolichus biflorus* (DBA), y *Sophora Japonica* (SJA). Las especificidades de grupo sanguíneo de dichas lectinas son como siguen:UEA I ► O(H), LTA ► O(H), DBA ► A1>A2, y SJA ► B>A>O(H).

La expresión de estos determinantes antigénicos de grupo histosanguíneo ABO, y Lewis nos indicarán un índice de maduración-diferenciación de cada una de las lesiones estudiadas. Este índice de maduración se correlacionará con la expresión, determinada mediante inmunohistoquímica, de la proteína supresora p53 (MoAb Novocastra) y del antígeno PCNA (Novocastra). Además, los hallazgos obtenidos con respecto a la presencia o ausencia de dichos marcadores los relacionaremos finalmente con los resultados del estudio de la amplificación de parte del intrón del gen E6 del virus HPV 16 mediante la técnica de PCR sobre DNA extraído de los mismos tejidos sobre los que previamente se había realizado el estudio inmunohistoquímico.

Como sumario podemos enunciar la siguiente hipótesis y objetivos de nuestro trabajo:

* **Hipótesis de trabajo:**

Es conocido que se produce un complejo entre la proteína codificada por el gen E6 del virus HPV 16 y la proteína w-p53 supresora de tumores, que determina la abrogación de las funciones de esta última⁽¹⁵⁷⁾ lo cual condicionaría, como uno de sus efectos secundarios, el incremento de la proliferación celular evidenciable por un aumento en la expresión de PCNA⁽¹⁸³⁾.

También hay una gran número de evidencias preliminares, aunque en otras localizaciones ya resultan concluyentes, de que a nivel de las neoplasias del cuello uterino se produce una disminución de la expresión de los determinantes de isoantígenos

histo-sanguíneos (ABH y Lewis); alteraciones de la glicosilación que reflejan una menor maduración-diferenciación con respecto al tejido normal.

De ambos fenómenos se puede extraer la hipótesis de que en cierto tipo de lesiones preneoplásicas y en las lesiones neoplásicas invasoras del cuello uterino en las que se puede poner en evidencia la presencia del virus HPV 16, considerado como de "alto riesgo", son más afines a presentar alteraciones de glicosilación a nivel de su membrana celular.

* Objetivos:

- (1) Estudiar los patrones de expresión de los determinantes isoantigénicos histo-sanguíneos (ABH y Lewis) a nivel de los epitelios normales del cuello uterino, metaplasias y en sus lesiones preneoplásicas y neoplásicas epidermoides, estableciendo si se puede deducir algún tipo de alteración en la glicosilación a nivel de la membrana celular que condicione una expresión diferencial a la conocida como normal para cada caso.
- (2) Estudiar la expresión de p53 y PCNA tanto en condiciones normales como en las lesiones proliferativas seleccionadas.
- (3) Estudiar la presencia del virus HPV 16 en los casos seleccionados. (Amplificación de una región de intrón E6 del virus HPV 16).
- 4) Correlacionar los hallazgos de los epígrafes anteriores y confirmar o desestimar la hipótesis establecida con anterioridad.

MATERIAL Y METODOS

En este apartado exponemos la casuística en base a la cual hemos realizado el estudio, la forma de fijación de los tejidos, el procesado básico, las técnicas inmunohistoquímicas con los anticuerpos monoclonales correspondientes, las técnicas de demostración de las sustancias receptoras para las lectinas, las características de las lectinas utilizadas, las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos para el Virus del Papiloma Humano tipo 16, y los criterios de valoración de los resultados.

2.1.- SELECCION DEL MATERIAL, FIJACION Y PROCESAMIENTO BASICO.-

Se han estudiado un total de 36 lesiones de 32 pacientes, de las que se contaba con 30 piezas quirúrgicas (22 histerectomías totales con o sin anejos, y 8 conizaciones), y 3 biopsias cervicales. Entre estos casos se muestreó la siguiente relación de lesiones: 19 Metaplasias maduras, 1 metaplasias inmaduras, 1 epitelio regenerativo; 9 lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado: 8 Lesiones relacionadas con infección por HPV (6 Condilomas planos y 2 Condilomas acuminados), y 1 CIN I. 16 Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado: 3 CIN II y 13 CIN III. Y 10 Neoplasias invasoras (8 Carcinomas epidermoides y una neoplasia mixta: Carcinoma epidermoide invasor y adenocarcinoma invasor).

Los tejidos del estudio fueron remitidas al laboratorio de Anatomía Patológica de forma inmediata después del acto quirúrgico y fueron fijados durante 18 horas en una solución de formaldehído al 4% en solución salina de

Ringer (formol salino). Posteriormente los fragmentos fijados se incluyeron manualmente en parafina y fueron cortados de manera seriada en secciones de un grosor entre 4 a 6 micras, cortes que fueron recogidos sobre portas con poli-L-lisina.

De todas las piezas quirúrgicas se muestrearon, junto con las lesiones, las mucosas normales tanto de exocervix como de endocervix.

El grupo sanguíneo de los pacientes, determinado por métodos convencionales, fué consultado en las historias clínicas y en su defecto consultado directamente a la paciente. La distribución de grupos sanguíneos de las pacientes y el tipo histológico tumoral se resume en la Tabla VIII.

TABLA VIII.

| GRUPO SANGUINEO | Nº | LIE' DE BAJO GRADO | LIE DE ALTO GRADO | CAI** |
|-----------------|----|--------------------|-------------------|-------|
| A | 18 | 5 | 8 | 5 |
| AB | 2 | 1 | 1 | 0 |
| O | 16 | 4 | 7 | 5 |
| TOTALES | 36 | 10 | 16 | 10 |

* LIE.- Lesión intraepitelial escamosa.

** CAI.- Carcinoma invasor.

2.2.- DEMOSTRACION DE LOS DETERMINANTES DE GRUPO SANGUINEO ABO Y LEWIS, Y DE LAS PROTEINAS p53 Y PCNA, MEDIANTE TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA.

2.2.1 Características de los anticuerpos monoclonales utilizados.

Después de la fijación y procesado de los tejidos, se emplearon en el estudio inmunohistoquímico, para caracterizar la expresión de los determinantes de grupo sanguíneo ABO y Lewis, anticuerpos primarios monoclonales procedentes de Ortho Diagnostic (Cambridge, Mass. USA), MoAbs BG1 a BG8. En la Tabla IX quedan desglosadas las características principales de dichos anticuerpos utilizados. Se añaden también las características de los MoAb NC-p53-DO7 y NCL-PCNA (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle sobre el Tyne, Reino Unido), que hemos utilizado para caracterizar la expresión de los antígenos de p53 y PCNA.

2.2.2 Técnica de la avidina-biotina, utilizando complejo ABC con revelado mediante DAB-HCl.

Después de ser titulado cada anticuerpo se realizaron unas diluciones 1/40 para los MoAbs BG1, BG3, BG5, BG6; y 1/200 para los MoAbs BG2, BG4, BG7 y BG8; y se practicó una técnica inmunohistoquímica mediante el método del complejo Avidina-Biotina (complejo ABC), que consta de los siguientes pasos:

- (1) Desparafinado por inmersión sucesiva de los cortes en dos pasos de 10 minutos cada uno, en los siguientes alcoholes: Xilol, alcohol absoluto, y alcohol de 96%.
- (2) Hidratación.
- (3) Bloqueo de la peroxidasa endógena mediante inmersión de los cortes en una solución al 1% de H₂O₂ en metílico 100% durante 20 minutos.
- (4) Lavado en tampón PBS (Sigma, pH 7.4), durante 4 minutos.
- (5) Bloqueo mediante suero humano en una dilución 1/20 con PBS, durante 20 minutos.
- (6) Incubación con el anticuerpo primario específico a 4° en nevera durante al menos 18 horas.
- (7) Lavado en tampón PBS, durante 4 minutos.
- (8) Incubación con el anticuerpo secundario-biotinado, anti-IgG o anti-IgM según la especie animal en que fue producido el anticuerpo primario específico según el Kit ABC VECTAS STAIN (Vecta Stain, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA. USA), durante 30 minutos.
- (9) Lavado en tampón PBS, durante 4 minutos.
- (10) Marcado con el complejo Avidina-Biotinada durante 50 minutos según el Kit mencionado más arriba.
- (11) Lavado en tampón PBS, durante 4 minutos.
- (12) Inmersión en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.01% y de tetrahidrocloreuro de diamonobencidina al 0.05% en tampón PBS a temperatura ambiente con control del revelado del color bajo microscopía óptica (DAB, diaminobencidina, solución cromógena-reveladora).
- (13) Lavado en agua destilada.
- (14) Ligera tinción nuclear de contraste con hematoxilina de Carazzi.
- (15) Lavado, deshidratado (alcoholes y xilol), y montaje de las preparaciones en Permount (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, NJ., USA).

2.2.3 Técnica de la Fosfatasa alcalina con revelado mediante 2Cl-1-Naftol.

Después de titular los anticuerpos NCL-p53-DO7 y NCL-PCNA se realizaron unas diluciones 1/100 para ambos MoAbs, y se practicó una técnica

inmunohistoquímica mediante el método de la fosfatasa alcalina con revelado mediante 2Cl-1-Naftol que consta de los siguientes pasos:

- Los pasos (1) a (5) son similares a los descritos en el apartado 2.2.2.
- (6) Incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario específico.
 - (7) Lavado con tampón PBS, durante 4 minutos.
 - (8) Aplicación de la solución *Link* (Vial prediluido de anti-inmunoglobulinas biotinadas) según el Kit STRAVIGEN™ SUPER SENSITIVE IMMUNODETECTION SYSTEM (ALKALINE PHOSPHATASE) (Biogenex Laboratories, San Ramon, CA. USA) durante 30 minutos.
 - (9) Lavado con tampón PBS, durante 4 minutos.
 - (10) Aplicación de la solución *Label* (Vial de fosfatasa alcalina marcada con estreptavidina) según el mismo Kit más arriba mencionado.
 - (11) Lavado con tampón PBS, durante 4 minutos.
 - (12) Revelado de la fosfatasa alcalina empleando el Cromógeno FAST RED TR (Biogenex Laboratories, San Ramon, CA. USA)
 - (13) Lavado en agua destilada.
 - (14) Ligera contratinción con Hematoxilina de Carazzi.
 - (15) Procedimiento de montaje en medio acuoso con glicerina-gelatina.

TABLA IX. Características de los anticuerpos monoclonales utilizados.

| Anticuepo Mo | BG1 | BG2 | BG3 | BG4 | BG5 | BG6 | BG7 | BG8 |
|------------------|---|------------------------------|---|---|---|---|-------------------------------------|---|
| Clono | K21 | T36 | CLCP-19B | 17-206 | T174 | T218 | P12 | F3 |
| Nº Catálogo | 8310 | 8320 | 8330 | 8340 | 8350 | 8360 | 8370 | 8380 |
| Lote del vial | DC2707 | JC21067 | BC2636 | GC2868 | AC2554 | BC2637 | HC2945 | GC2838 |
| Lote del kit | DK2728 | JK21075 | CK2639 | GK2870 | AK2556 | CK2640 | IK2965 | GK2847 |
| Fuente | Ascitis de ratón | Ascitis de ratón | Ascitis de ratón | Sobrenadante cultivo tisular | Ascitis de ratón | Ascitis de ratón | Ascitis de ratón | Ascitis de ratón |
| Subclase | IgM | IgG ₃ | IgM | IgG ₃ | IgG ₁ | IgM | IgM | IgM |
| Especf. de Grupo | Precursor (Cadena tipo 1) | A Cadenas tipo 1 y 2 | B Cadena tipo 2 | H-1 | Lewis ^a Cadena tipo 1 | Lewis ^b Cadena tipo 1 | Lewis ^a Cadena tipo 2 | Lewis ^a Cadena tipo 2 |
| InmunoAg | Línea celular de teratocarcinoma Tera1. | Línea celular ca. colon HT29 | Línea celular de ca. de páncreas ASPC-1 | Línea celular de carcinoma colon SW-403 | Línea celular de carcinoma colon SK-CO-10 | Línea celular de carcinoma colon SK-CO-10 | Células frescas de placenta humana. | Línea celular de carcinoma pulmón SK-LU-3 |
| Control | Intestino fetal | Riñón normal | Riñón normal | Riñón normal | Adenoca. colon | Adenoca. colon | Riñón normal | Adenoca. colon |

| Anticuerpo Mo | Especificidad | Clono | Inmuno-Ag. | Controles | Subclase Ig | Patrón tinción | Referencia |
|---------------|---------------|-------|------------------|----------------------------|-------------|----------------|---------------------------------|
| NCL-p53-DO-7 | p53 humana | DO-7 | p53 recombinante | Adenoca mama, colon | IgG2b | Nuclear | Vojtesek, 1992 ⁽²⁷⁸⁾ |
| NCL-PCNA | PCNA | PC10 | prot A -pR1T2T | Ganglio linfático reactivo | IgG2a | Nuclear | Wassem, 1990 ⁽²⁸²⁾ |

2.3.- DEMOSTRACION DE LAS SUSTANCIAS RECEPTORAS PARA LECTINAS BIOTINADAS. UTILIZACION DEL COMPLEJO ABC Y CON REVELADO MEDIANTE DAB-HCl.

De forma complementaria con los anticuerpos monoclonales utilizados para la determinación de los isoantígenos de grupo sanguíneo ABO, se utilizaron cuatro lectinas biotinadas de origen vegetal procedentes de los laboratorios Sigma Chemical Company (St. Louis, MO., USA) y Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA., USA). La lista de las lectinas con su nombre abreviado, fuente, laboratorio procedente, y número de lote empleado, queda reflejada en la TABLA X.

El procedimiento histoquímico de tinción por medio de las lectinas, corresponde al descrito por McMillan y colaboradores (1984) - salvo algunas modificaciones-, y consta de los siguientes pasos⁽¹⁷⁷⁾:

- (1) Desparafinado por inmersión sucesiva de los cortes en dos pasos de 10 minutos cada uno en los siguientes alcoholes: Xilol, alcohol absoluto, y alcohol de 96%.
- (2) Hidratación.
- (3) Lavado con tampón PBS (Sigma, pH 7.4), durante 4 minutos.
- (4) Bloqueo de la peroxidasa endógena mediante inmersión de los cortes en una solución al 1% de H₂O₂ en metílico 100% durante 20 minutos.
- (5) Lavado en tampón PBS (Sigma, pH 7.4), durante 4 minutos.
- (6) Incubación con las lectinas biotinadas correspondientes, durante 18 horas a una temperatura de 4° C en nevera, siendo la concentración de las lectinas 1/50 para UEA-I 1/100 DBA y SJA, y 1/200 LTA.
- (7) Lavado en tampón PBS, durante 4 minutos.

- (8) Incubación con el complejo preformado avidina-biotina-peroxidasa (Vecta Stain, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA., USA), durante una hora a temperatura ambiente.
- (9) Lavado en tampón PBS, durante 4 minutos.
- (10) Inmersión en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.01% y de tetrahidrocloruro de diamonobencidina al 0.05% en tampón PBS a temperatura ambiente con control del revelado del color bajo microscopía óptica (DAB, diaminobencidina, solución cromógena-reveladora).
- (11) Lavado en agua destilada.
- (12) Ligera tinción nuclear de contraste con hematoxilina de Carazzi.
- (13) Lavado, deshidratado (alcoholes y xilol), y montaje de las preparaciones en Permount (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, NJ., USA).

TABLA X Relación de lectinas utilizadas en el estudio.

| Lectina | Abreviatura | Laboratorio | Lote | Clasificación Damjanov, |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|
| <i>Ulex Europaeus Agglutinin I</i> | UEA-I | Vector | 90104 | Fructosa |
| <i>Sophora Japonica Agglutinin</i> | SJA | Vector | 70823 | N-Ac.Gal/Gal |
| <i>Dolichos Biflorus</i> | DBA | Sigma | 103F-9615-1 | N-Ac.Gal/Gal |
| <i>Tetragonolobus purpureas</i> | LTA | Sigma | 26F-4022 | Fructosa |

2.4.- CARACTERISTICAS DE LAS LECTINAS UTILIZADAS.

Las lectinas utilizadas en este trabajo están seleccionadas según su especificidad nominal, distribuyéndose de manera irregular dentro de los cinco grupos de la clasificación más difundida^[56] (Damjanov, 1987). Esta clasificación se divide en los siguientes apartados:

- (a) Grupo D-Glucosa/D-Manosa.
- (b) Grupo N-Acetil.
- (c) Grupo N-Acetil D-Galactosamina/D-Galactosa.
- (d) Grupo L-Fructosa.

Las lectinas UEA-I y LTA pertenecen al *grupo L-Fructosa* y se caracterizan por que dicha azúcar bloquea su actividad. La especificidad nominal para la UEA-I es: $\text{Fuc}\alpha 1-2 \text{ Gal}\beta 1-4 \text{ N-Ac.Glu} >> \text{Fuc}(\alpha)$; y para LTA: $\text{Fuc}(\alpha) > \text{Fuc}\alpha 1-2 \text{ Gal}\beta 1-4 \text{ N-Ac.Glu}$.

Las lectinas DBA y SJA pertenecen al *grupo N-Acetil Galactosamina/-Galactosa*. El azúcar N-Ac Galactosamina bloquea dichas lectinas. La especificidad nominal para la DBA es: $\text{N-Ac-Gal}\alpha 1-3 \text{ N-Ac.Gal} >> \text{N-Ac.Gal}(\alpha)$; y para la SJA es: $\text{N-Ac.Gal} > \text{Gal}(\alpha \text{ y } \beta)$.

Algunas de las características específicas de cada una de las lectinas empleados son^[30] (Carretero-Albiñana, 1990):

Ulex Europeus Agglutinin (U.E.A.-I).-

Procede del *Ulex Europaeus* -aliaga, gorse seed-, y está incluida en el grupo de especificidad para la L-Fructosa, junto con el LTA (*Lotus Tetragonolobus A.*)^[95,64] (Goldstein y Poretz, 1986 Debray y cols. 1981).

Se trata de una lectina usada de forma común y desde antiguo. Se utilizó inicialmente para la determinación del estado secretor de los individuos (personas que excretan sustancias glicoproteicas en la saliva y otros fluidos corporales que presentan una actividad antigénica similar a la de los grupos sanguíneos del sistema ABO-H), y en la actualidad en la práctica hematológica habitual como determinante del grupo sanguíneo O

(anti H), o para la discriminación entre los subgrupos a1, y a2, y el estado secretor/no secretor del individuo; también se usa como técnica histoquímica al tratarse de un buen marcador para las células endoteliales y los tumores de origen vascular.

Se caracteriza por ser una glicoproteína con un peso molecular variable entre 80.000 y 65.000, formada por dos cadenas distintas unidas por enlaces no covalentes, y que necesita de tres átomos cálcicos y uno o dos átomos de zinc y de manganeso por molécula. El sitio de unión con los carbohidratos parece ser complementario de la sustancia H del grupo sanguíneo O con un enlace β 1-4 (cadena tipo 2), que está constituida por un residuo de L-fructosa unido por un enlace α 1-2 al precursor inactivo (fenotipo Bombay. Gal β 1-4 N-Ac.Glu β 1-6->R).

El determinante mayor de su unión es el residuo de L-Fructosa, mostrando asimismo la lectina un cierto efecto de avidez (aumento del grado de afinidad por un mayor número de radicales de fructosa), que está mediatizado por una limitada accesibilidad a su sitio de unión, y que origina frecuentemente una falta de inhibición por compuestos difucosilados; algunos autores postulan un área hidrofóbica vecina al sitio de unión con los carbohidratos.

Esta lectina aglutina los hematíes del grupo sanguíneo O y en menor medida los del subgrupo A2.

Lotus Tetragonolobus Agglutinin (L.T.A.)-

Aislada del *Lotus Tetragonolobus* o *Tetragonolobus Purpurea* - asparagus pea-, pertenece junto con el UEA-I al grupo de especificidad por la L-Fructosa.

Se caracteriza por estar formada por una mezcla de tres glicoproteínas-isolectinas (A, B y C) de diferente composición química, peso molecular y número de subunidades-sitios de unión, pero de similar especificidad, que está dirigida fundamentalmente a residuos de L-fructosa terminales y no reductores, con un claro efecto de avidéz.

Las isolectinas A y C corresponden a un 53 y 14% de los preparados naturales, y están formados por cuatro subunidades similares de un peso molecular aproximado de 27.800 (pesos totales aproximados de 120.000 y 117.000); la isolectina C es la de mayor afinidad por los residuos de fructosa. La isolectina B es un dímero de un peso molecular aproximado de 58.000, y de menor afinidad por la fructosa. Todos ellos necesitan de iones metálicos para su actividad (calcio y manganeso).

Los estudios de inhibición han sido hechos con la mezcla de las tres isolectinas, mostrando una banda estrecha de especificidad y datos sugestivos de un sitio de unión para los carbohidratos de pequeño tamaño y con un área hidrofóbica vecina. La inhibición más potente a su acción se logra con el pentafrucosilado glicopéptido III¹⁶⁴⁾ (Debray y cols., 1981), o por

un oligosacárido con dos residuos de fructosa unidos a una cadena de tipo 2 (determinante antigénico del grupo sanguíneo Lewis^y): L-Fuc α 1-2Gal β 1-4(L-Fuc α 1-3)N-Ac.Glu β 1-6->R^[95] (Goldstein y Poretz, 1986), presentando también una gran afinidad por la sustancia H del grupo sanguíneo O con cadenas de tipo 2; esta afinidad es menor que la encontrada en el UEA-I, y al igual que él, desaparece con las cadenas de tipo 1 (enlaces β 1-3, con diferente configuración espacial de la molécula), indicando asimismo una accesibilidad limitada de los sitios de unión de la lectina (o un sitio de unión de pequeño tamaño).

Dolichus Biflorus Agglutinin. (D.B.A.).-

Procedente de la *Dolichus Biflorus* (horse gram), pertenece al grupo de especificidad por la N-Acetil D-Galactosamina/D-Galactosa, al igual que numerosas lectinas entre las que se encuentran: SBA (*Soybean A.*, soja, *Glycine Maximum*), SJA (*Sophora Japonica A.*), PVA (*Phaseolus Vulgaris A.*, kidney bean), BSA-I (*Bandeiraea Simplicifolia A-I*, o *Griffonia Simplicifolia A-I*), PNA (*Peanut A.*, cacahuete, *Arachis Hypogaea*), y RCA-I (*Ricinus Communis A-I*, ricino)^[95]. (Goldstein y Poretz, 1986).

Se trata de una glicoproteína tetramérica de un peso molecular aproximado de 110.000, y que está formada por dos tipos de subunidades de la misma estructura y de composición aminoácida muy parecida, con unos pesos moleculares de 27.300 (II o α) y 27.700 (I o β). Algunos métodos de purificación parecen identificar dos isolectinas distintas, A y B (B 12%).

La molécula está estabilizada por uniones hidrofóbicas, y su actividad depende exclusivamente de la mayor de las subunidades (I o β), en cada una de las cuales se localiza un sitio de unión para los carbohidratos, que también precisa de iones cálcicos y metálicos (manganeso, magnesio, zinc, y cobre) para su funcionamiento; característicamente presenta un área hidrofóbica en su molécula, que la hace reaccionar con ligandos no carbohidratados, entre los que destacan la adenina y compuestos relacionados, y que le permite una unión muy peculiar con los núcleos celulares de las preparaciones histológicas. Es capaz de inducir actividad mitogénica celular.

El monosacárido bloqueador de sus interacciones es la N-acetil galactosamina, pareciendo ser su sitio de unión complementario a dos residuos de N-acetil galactosamina, de enlace α 1-3 (20 veces de actividad mayor que por el disacárido del grupo sanguíneo A con cadena precursora de tipo 1, N-Ac.Gal α 1-3 Gal).

Esta lectina se usa habitualmente en hematología como determinante del subgrupo A1 (afinidad 10 veces mayor que con el subgrupo A2).

Sophora Japonica Agglutinin (S.J.A.).-

Procede de la *Sophora Japonica* -Japanese pagode tree-, y está incluida en el grupo de especificidad para la N-Acetil Galactosamina/Galactose¹⁹⁵¹ (Goldstein y Poetz, 1986).

Es una lectina de características parecidas a la SBA (*Soy-Bean Agglutinin*, procedente de la *Glycine Maximus*, o soja), ya que corresponde a una glicoproteína tetramérica formada por dos subunidades ligeramente distintas, unidas por fuerzas covalentes, y de peso molecular total aproximado de 132.800; cada subunidad está a su vez constituida por dos cadenas idénticas unidas por puentes disulfuro. Necesita de iones metálicos para su activación (calcio y magnesio o manganeso), y presenta una región hidrofóbica vecina al sitio de unión con los carbohidratos.

La SJA presenta una gran inhibición por la N-acetil galactosamina, y una incapacidad de discriminar las formas anoméricas α de las β , aunque prefiere los oligosacáridos con residuos terminales β galactosilados; estudios más complejos han mostrado una afinidad discordante, con preferencia por el disacárido Gal β 1-3 N-Ac. Gal en unos casos, o por N-Ac.Gal β 1-6 Gal en otros, lo que ha sido interpretado por algunos autores como sugestivo de ser producido por un sitio de unión extenso con los carbohidratos y con diferentes subsitios.

Esta lectina aglutina los hematíes de los grupos sanguíneos I, A y B.

2.5.-VALORACION DE LOS RESULTADOS INMUNOHISTOQUIMICOS.

Los resultados fueron evaluados en cada caso y en secciones realizadas en material fijado en formol salino, mediante una tabulación porcentual de las células positivas, especificando la intensidad de la reacción y su localización (membranosa o citoplásmica; aparato de Golgi). El número de células positivas varió desde 0 (ausencia de células positivas), a 100% (todas las células positivas), mientras que la intensidad de la reacción se fijó en una escala arbitraria variable entre 0 -negativa, 1 -débilmente positiva, 2 -moderadamente positiva, y 3 -intensidad positiva^[30](Carretero-Albiñana, 1990).

La tabulación realizada se desglosó sobre el epitelio exocervical pavimentoso en sus capas basal, media y superficial; epitelio endocervical simple; glándulas endocervicales y su moco; lesiones de metaplasias; lesiones preneoplásicas intraepiteliales de alto grado (CIN II y CIN III) y bajo grado (CIN I y lesiones asociadas a infección por HPV (koilocitosis, disqueratosis, mitosis atípicas, imágenes de condiloma acuminado); carcinoma invasor y expresión de los vasos capilares - este último hallazgo utilizado como control interno.

Cuando procedimos a tabular los hallazgos de cada caso se adoptó un sistema de caracteres gráficos mediante el cual se reflejaba tanto la positividad como negatividad de la tinción inmunohistoquímica, como la homogeneidad o heterogeneidad de la misma, la presencia células positivas

aisladas, la tinción ciliar de las células secretoras, la tinción del moco, y la localización de la tinción en el epitelio pavimentoso. TABLA XI.

TABLA XI. Caracteres gráficos utilizados en la tabulación.

| CARACTER GRAFICO | |
|-----------------------------|---|
| - | Tinción negativa |
| ≈ | Tinción ciliar |
| ◆ | Tinción moco |
| ■ | Tinción homogénea |
| ⊕ | Tinción heterogénea |
| ┌ | Tinción capa más externa del epitelio |
| ≡ | Tinción tercio superior del epitelio |
| ≡ | Tinción tercio medio del epitelio |
| ⊥ | Tinción suprabasal del epitelio |
| ⊥ | Tinción basal del epitelio |
| ■ | Tinción en los tercios superior y medio |
| ■ | Tinción del tercio basal y medio del epitelio |
| ● | Tinción de células ocasionales |
| N | Tinción no testada |

2.6.- PROTOCOLO DE LA TECNICA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA AMPLIFICACION DE SECUENCIAS DE HPV.

Para la realización de la técnica de PCR se extrajo de cada uno de los bloques de parafina de los casos estudiados, una sección entre 10 y 15 μm de grosor, según el caso, y a continuación se procedió según el protocolo de extracción de DNA de tejidos embebidos en parafina descrito por Shibata (1988) (Rolfs, 1992 y Herrington, 1992) y que consta de los siguientes pasos^{1231,1101}:

- (1) Se colocan las secciones realizadas en un tubo de Eppendorf de 1.5 ml.
- (2) Se realiza un tratamiento con Xilol, de 500 a 1000 μl según el tamaño del tejido, para extraer la parafina que tiene que disolverse por completo.
- (3) Se centrifuga a 12000 g durante 5 min. para sedimentar el tejido.
- (4) Se decanta el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta y se repiten de nuevo los pasos 2 y 3.
- (5) Se decanta el sobrenadante y se añade al sedimento tisular un volumen similar de alcohol absoluto.
- (6) Se centrifuga a 12000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- (7) Se decanta el alcohol cuidadosamente con una pipeta.
- (8) Se repiten los pasos 5 a 7.
- (9) Se decanta y deja evaporar el etanol incubando los tubos en una estufa a 37°C durante 10 a 15 minutos.
- (10) Se resuspende el sedimento tisular en una solución 1/50 de proteinasa K tamponada (50mM Tris ph 8.5, 1mM Edta, Tween 20 al 0.5%. Proteinasa K, Boehringer Mannheim) se centrifugan las muestras durante 30 segundos a 3500g y posteriormente se incuban a 50° C durante 16 horas.
- (11) Se añade v/v de fenol saturado tamponado a cada muestra y se mezcla hasta que queda una emulsión homogeneizada, y se permite la extracción durante 5 minutos.

- (12) Se centrifuga durante 1 minuto a 3500 g (o 3 min. 12000g en caso de usar una microcentrifuga).
- (13) Se separa la fase acuosa superior y se lleva a un tubo limpio. Se añade v/v de una mezcla cloroformo: isoamilalcohol (24:1, v/v) y se agita vigorosamente, permitiendo la extracción del fenol durante 5 minutos.
- (14) Se separa la fase acuosa de la orgánica mediante una centrifugación de 3500g de 6 minutos a temperatura ambiente.
- (15) Se transfiere la fase acuosa superior a un tubo limpio de Eppendorf 1.5 ml y se repite la extracción con cloroformo:isoamilalcohol una o dos veces (hasta que quede limpia la interfase).
- (16) Se añaden 80 μ l de CIH a 5 M por cada mililitro de volumen de fase acuosa y etanol absoluto 2vol/1, y se mezcla bien. El DNA debe precipitar pronto.
- (17) Se incuba durante 16 horas a -20° C.
- (18) Se centrifuga el DNA a 3500 g durante 20 min.
- (19) Se retira con cuidado el sobrenadante y se deseca el precipitado de DNA en una estufa a 37° C o temperatura ambiente.
- (23) Se resuspende el DNA en TE buffer con un volumen de 100 μ l. (Tris 1mM, Edta 0,1 mM)

Una vez extraído el DNA se procede según el método descrito más adelante de la reacción en cadena de la polimerasa empleando un termociclador (Perkin-Elmer Cetus Instruments, Techne). Previamente se realiza una mezcla de reactivos (*Mastermix PCR*) para 22 reacciones que llegue a un volumen final de 50 μ l/tubo, en el siguiente orden:

- 1.- dNTPs 110 μ l (5 μ l/r) (Perkin-Elmer Hispania, # 808-0007).
- 2.- Buffer de reacción 110 μ l (Perkin-Elmer Hispania, # 808-0010; 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl) y 110 μ l de 25 mM MgCl₂, a temperatura ambiente. (5 μ l/r de ambos).
- 3.- H₂O bidestilada 561 μ l (25.5 μ l/r).
- 4.- Primer H1 44 μ l (2 μ l/r).
Primer H2 44 μ l (2 μ l/r).
- 5.- Taq DNA polimerasa 11 μ l (Perkin-Elmer Hispania, # 801-0060) (0.5 μ l/l reacción).

La solución obtenida se mezcla bien y se realizan alicuotas de 43 μ l/tubo en tubos de reacción preenfriados a las que se añaden a cada uno 5 μ l de cada muestra respectiva (homogeneizada a 0.1 μ g/ μ l de concentración de DNA) y se cubren con 40 μ l de aceite mineral (Sigma #M-5904). Seguidamente se coloca en el termociclador.

El programa del termociclador se estableció como sigue: (a) Desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C; (b) 35 ciclos de: (i) paso de desnaturalización a 95°C durante 45 segundos, (ii) paso de *annealing* de 45 segundos a 55°C, y (iii) paso de extensión a 72°C durante 50 segundos; y (c) paso final detenido a 4°C.

Una parte del producto del DNA amplificado (20 μ l) se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y otra parte (30 μ l) se analizó mediante *dot blotting* siguiendo un ensayo enzimático de digoxigenina-11-dUPT (*DIG DNA Labeling and Detection Kit nonradiactive. Boehringer Mannheim, # 1363 514*) utilizando como sonda la que se reseña en el apartado 2.7.

2.7.- CARACTERISTICAS DE LOS *PRIMERS* UTILIZADOS.

De las secuencias de las regiones E6 del virus HPV 16^[250,33] (Seedorf, 1985; Cole, 1987), y siguiendo los trabajos de Shibata^[253] (1988), se eligieron los *primers* de 20 nucleótidos de longitud que figuran en la TABLA XII. Sus secuencias específicas se sintetizaron en un sintetizador de DNA (modelo 380; Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA; llevada a cabo en el Centro de Biología Molecular dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de la UAM).

TABLA XII Relación de primers y sondas utilizados en el ensayo molecular.

| Subtipo de HPV | Secuencia del primer (5'-3') | P. PCR |
|--------------------------------------|--|--------|
| Human papillomavirus 16 Intrón E6 | H1: ATT AGT GAG TAT AGA CAT TA H2: GGC TTT TGA CAG TTA ATA CA | 109 bp |
| HPV-16 E6 | p1.- ATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTG | |

En la TABLA XIII de la siguiente página figuran las secuencias completas del gen E6 de los virus HPV 16 y 18, indicando en **negrita** la región donde se localizan los *primers* positivos, y subrayadas las regiones de la secuencia complementaria e invertida de los *primers* negativos. Estas dos regiones delimitan parte del producto amplificado por la PCR específico para la sonda que utilizamos en el ensayo de hibridación (doble subrayado).

La temperatura de *annealing* para las secuencias de *primers* empleadas se calculó según la fórmula: $4^{\circ}\text{C} \times (\text{G} + \text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) - 3$, resultando una temperatura de *annealing* $51^{\circ}\text{C} + 4^{\circ}\text{C}$ cuando empleamos los oligonucleótidos H1-H2.

La región amplificada incluía parte de un intrón del gen E6 específica de los virus HPV 16 y 18, ausente en los virus HPV 6 y 11.

TABLA XIII. SECUENCIAS DEL GEN E6 DE LOS VIRUS HPV 16 Y 18.

| | |
|---|--|
| HPV-18(E6) START 87; 1 ^o ATG 105 | HPV-16(E6) START 65; 1 ^o ATG 83 |
| 579 STOP SIZE 474bp; aa 19191dT | 556 STOP |
| aa (5'-3') | aa (5'-3') |
| MARFE AATACTATGGCC | DPQE CATTTTATGCAC |
| DPTR CGCTTTGAGGAT | RPRK CAAAAGAGAACT |
| RPYK CCAACACGGCGA | LPQL GCAATGTTTCAG |
| LPDL CCCTACAAGCTA | CTEL GACCCACAGGAG |
| CTEL CCTGATCTGTGC | QTTI CGACCCAGAAAAG |
| NTSL ACGGAACCTGAAC | HDII TTACCACAGTTA |
| QDIE ACTTCACTGCAA | LECV TGCACAGAGCTG |
| ITCV GACATAGAAATA | YCKQ CAAACAACATA |
| YCKT ACCTGTGTATAT | QLLR CATGATATAATA |
| VLEL TGCAAGACAGTA | REVV TTAGAATGTGTG |
| TEVF TTGGAACCTTACA | DFAF TACTGCAAGCAA |
| EFAF GAGGTATTTGAA | RDLC CAGTTACTGCGA |
| KDLF TTTGCATTTAAA | IVYR CGTGAGGTATAT |
| VVYR GATTTATTTGTG | DGNP GACTTTGCTTTT |
| DSIP GTGTATAGAGAC | YAVC CGGGATTTATGC |
| HAAC AGTATACCCCAT | DKCL ATAGTATATAGA |
| HKCI GCTGCATGCCAT | KFYS GATGGGAATCCA |
| DFYS AAATGTATAGTA | KISE TATGCTGTATGT |
| YSRI TTTTATTCTAGA | YRHY GATAAATGTTTA |
| RELR <u>ATTAGAGAATTA</u> (328) | CYSL AAGTTTATTCT |
| RHYS <u>AGACATTATTCA</u> (347) | YGTT <u>AAAATTAGTGAG</u> (320) |
| DSVY GACTCTGTGTAT | LEQQ <u>TATAGACATTAT</u> (339) |
| GDTL GGAGACACATTG | YNKP TGTTATAGTTGT |
| EKLT GAAAAACTAACT | LCDL <u>TATGGAAACAACA</u> |
| NTGL AACACTGGGTTA | LIRC <u>TTAGAACAGCAA</u> |
| YNLL TACAATTTATTA | INCQ <u>TACAACAAACGT</u> |
| IRCL <u>ATAAGGTGCCTG</u> (418) | KPLC <u>TTGTGTGATTTG</u> |
| RCQK <u>CGGTGCCAGAAA</u> | PEEK <u>TTAATTAGGTGT</u> (410) |
| PLNP <u>CCGTTGAATCCA</u> (437) | QRHL <u>ATTAACCTGTCAA</u> |
| AEKL GCAGAAAAACTT | DKKQ <u>AAGCCACTGTGT</u> (429) |
| RHLN AGACACCTTAAT | RFHN CCTGAAGAAAAG |
| EKRR GAAAAACGACGA | IRGR CAAAGACATCTG |
| FHNI TTTCAACAATA | WTGR GACAAAAAGCAA |
| AGHY GCTGGGCACTAT | CMSC AGATTCCATAAT |
| RGQC AGAGGCCAGTGC | CRSS ATAAGGGGTCGG |
| HSCC CATTCTGTCTGC | RTRR TGGACCGTCTGA |
| NRAR AACCGAGCACGA | ETQL TGTATGTCTTGT |
| QERL CAGGAACGACTC | |
| QRRR CAACGACGCAGA | |
| ETQV GAAACACAAGTA | |

2.7.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA MUESTRA DEL ESTUDIO.

La muestra del estudio incluyó 36 lesiones de 32 pacientes que podemos dividir en tres grupos:

* **Grupo (a).**- 17 Neoplasias intraepiteliales cervicales (13 CIN III, 3 CIN II y 1 CIN I). Edad media: $\Sigma x/n = 38.88$, desviación estándar de la población de datos: $\sigma_n = 8.06$, desviación estándar de la muestra de datos: $\sigma_n^{-1} = 8.31$.¹¹⁷²¹

* **Grupo (b).**- 8 Lesiones con cambios morfológicos relacionados con infección por HPV. Dentro de estas lesiones se incluyó la recidiva de un condiloma de una paciente de 23 años seropositiva para HIV a los cinco meses de la primera biopsia. Edad media: $\Sigma x/n = 29.75$, desviación estándar de la población de datos: $\sigma_n = 8.27$, desviación estándar de la muestra de datos: $\sigma_n^{-1} = 8.8$.

* **Grupo (i).**- 10 Carcinomas invasores (4 Carcinomas epidermoides de células grandes queratinizante, y 5 de células grandes no queratinizantes. Además en uno de los casos concurría un adenocarcinoma invasor). Edad media: $\Sigma x/n = 38.4$, desviación estándar de la población de datos: $\sigma_n = 6.78$, desviación estándar de la muestra de datos: $\sigma_n^{-1} = 7.19$.

Entre estas pacientes se produjeron tres *exitus*, dos en los grupos (a) y (b) (que coincidían con pacientes seropositivas para HIV de 23 y 45 años), y

otra de 43 años en el grupo (i) al año de ser intervenida quirúrgicamente.

En relación con las observaciones hechas en otros países en los que se refieren un incremento de la prevalencia de lesiones cervico-vaginales en pacientes adolescentes^[18,48,65,77], en nuestra muestra hay 4 de 32 (12.5%) pacientes que tienen menos de 26 años. Dos de los carcinomas invasores correspondieron a pacientes de 28 y 29 años.

Se realizó una búsqueda de los estudios de citología practicados en esta población de casos, previos y posteriores a su diagnóstico definitivo. 7 de 9 pacientes del Grupo (i) tenían antecedentes citológicos: 4 positivos (57%) y 3 negativos (42.85%). Después del tratamiento quirúrgico constaron 5 de 9 pacientes con seguimientos citológicos todos ellos con resultados negativos.

En el grupo (a), en 11 de 17 pacientes encontramos antecedentes citológicos previos al diagnóstico definitivo: 4 positivos (36.36) y 7 negativos (63.63%). Después del tratamiento quirúrgico también 11 de las 17 pacientes tenían en archivo seguimientos citológicos, y en ninguno de estos seguimientos se encontró citología positiva alguna.

En 2 de las 32 pacientes se encontraron positividad serológicas que evidenciaban infecciones por el virus de la hepatitis C, una de ellas con hepatitis crónica grado I que coincidía con un carcinoma epidermoide invasor estadio T2N0M0. A la otra paciente se le había practicado una conización por Displasia Leve y cambios morfológicos compatibles con infección por HPV.

RESULTADOS

En este capítulo exponemos detalladamente los resultados de los estudios inmunohistoquímicos realizados con los anticuerpos monoclonales y lectinas según las técnicas previamente descritas sobre el material quirúrgico recogido. Además, sobre los mismos casos, se aportan los resultados obtenidos de la amplificación del gen E6 del virus HPV 16 siguiendo la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con objeto de facilitar la exposición y el posterior análisis de los hallazgos, hemos dividido este capítulo en varios apartados, según los resultados de la expresión de cada uno de los estudios realizados: Expresión de los isoantígenos determinantes de grupos sanguíneos ABH y Lewis, expresión de las proteínas p53 y PCNA, expresión de los receptores de lectinas, y amplificación de parte del intrón E6 del virus HPV 16.

En cada apartado seguiremos el mismo orden de exposición de hallazgos en las siguientes localizaciones histológicas y tipos de lesiones: Mucosas normales exo y endocervicales, áreas de metaplasias, lesiones relacionadas con la infección por HPV (condilomas planos y acuminados), lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado y de alto grado, y neoplasias invasoras del cuello uterino.

Como también mencionamos con anterioridad, la valoración de los resultados se ha hecho evaluando para cada MoAb su expresión o falta de expresión considerando la localización de la tinción simbolizada según los

caracteres gráficos de la página 76. En el caso de la expresión de las proteínas p53 y PCNA, además, se ha seguido un método de valoración porcentual.

Nos hemos encontrado con cierta dificultad a la hora de estudiar la expresión de la totalidad de los determinantes antigénicos propuestos sobre las mismas estructuras tisulares de cada paciente, dado que tal número de cortes nos ocasionó en algunos casos que se agotara el tejido en las localizaciones precisas que hubieramos deseado que se conservaran. No obstante, obviando este inconveniente, podemos considerar suficientemente aceptable el muestreo realizado para cada tipo de lesión.

3.1.- EXPRESION DE LOS DETERMINANTES ISOANTIGENICOS DE GRUPO SANGUINEO ABH.-

Con los anticuerpos BG1, BG2, BG3 y BG4 y siguiendo un ensayo inmunohistoquímico según la técnica de la avidina-biotina, hemos establecido la expresión de los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABH en la muestra de los casos seleccionados (BG1.- precursor cadena tipo 1; BG2.- Grupo sanguíneo A cadenas tipo 1 y 2; BG3.- Grupo sanguíneo B cadena tipo 2; y BG4.- H1).

La calidad de los las tinciones obtenidas fue, en general, buena. Los cuatro antígenos se expresaron, con una tinción de fondo baja, en la membrana citoplasmática en el caso del epitelio pavimentoso, y en el citoplasma/moco de las luces pseudoglandulares, en el caso del epitelio simple.

Como control interno hemos considerado la expresión antigénica a nivel del endotelio de los capilares, habiendo observado una completa concordancia entre dicha expresión y el grupo sanguíneo que ya conocíamos con anterioridad.

Como era de esperar, y dadas las variaciones de expresión de grupo sanguíneo según el fenotipo de cada individuo, obtuvimos unos resultados polimorfos. Por este motivo reordenamos los casos según fueran de grupo A, AB, o O. Aún dentro de este reordenamiento comprobamos variaciones individuales en cuanto a la expresión a nivel del epitelio y moco, en correspondencia con su estado secretor o no.

En las distintas TABLAS I_(A), II_(A) y III_(A) del Apéndice se exponen pormenorizadamente para cada caso la totalidad los hallazgos de la expresión de los antígenos T1-CH, A, B, y H-1 según los casos de la muestra del estudio: Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, y carcinomas invasores.

3.1.1 Antígenos ABH en la mucosa normal exocervical.

El estudio de la expresión de los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABH en el epitelio pavimentoso de la mucosa exocervical nos puso en evidencia una falta de expresión de cadenas precursoras T1-CH, habiéndose observado únicamente focos de expresiones ocasionales en 2 de 35 casos (5.7%). También resultó característico que la capa de células localizadas a nivel basal, constituida generalmente por una única hilera de células, se

mostrara ausente en su expresión para los cuatro anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica.

20 de 35 casos (57%) presentaron expresiones positivas de **grupo sanguíneo A** coincidiendo con la mayoría de los grupos sanguíneos conocidos, con la salvedad de dos casos, uno de una paciente con carcinoma epidermoide invasor de grupo O (endotelio negativo para BG2 y BG3) y otra paciente con LE-BG de grupo sanguíneo AB que además de expresar su grupo a nivel de endotelio y mucosas también expresaba grupo A.

De forma general, la expresión de grupo sanguíneo A era del tipo de membrana citoplásmica, y se localizaba en el tercio medio del epitelio -suprabasal- (16/20 -80%-) adoptando un patrón en "panal". En los mejores casos se apreciaba, a mayor aumento, que esta expresión se correspondía con las uniones desmosómicas intercelulares. En un caso de una paciente de grupo A la expresión de este antígeno resultó ocasional y en tres se extendía al tercio superior.

10 de 36 (27.7%) casos estudiados expresaron **grupo sanguíneo B**, 2 de ellos en coincidencia con su expresión a nivel de endotelio y con los grupos sanguíneos conocidos con anterioridad. Estos casos tenían un patrón de expresión similar al observado en el grupo A.

En dos pacientes de grupo A y en tres paciente de grupo O observamos

expresiones de grupo B entre intensas y débiles (2 siguiendo el mismo patrón, 1 con tinción suprabasal, 1 con tinción heterogénea, 1 con tinción en los tercios medio y superior). Otros dos casos de LE-BG (condilomas acuminados de un mismo paciente GS 0) mostraron expresión de grupo B dudosa, al quedar limitada a la capa más superficial del epitelio.

En cuanto al **antígeno H1** a nivel del epitelio pavimentoso, observamos pocos casos que lo expresaran (6/35 -11.1%), con patrones de tinción diferentes (2 ocasionales, 3 en el tercio superior, y uno suprabasal).

3.1.2 Antígenos ABH en la mucosa normal endocervical.

En el caso del epitelio simple de la mucosa endocervical observamos la misma ausencia de expresión de **cadena precursora** que la observada a nivel del epitelio pavimentoso, con 2 positivities de 27 (7.4%) (en un caso una expresión heterogénea, y en el otro con expresión ocasional a nivel ciliar).

Resultó característica la expresión de cadenas precursoras en los cilios de algunas células de las estructuras pseudoglandulares endocervicales (16 de 30 casos -53.3%-), predominando en los pacientes de grupo A (12/16 -75%-) frente a 5 de 11 pacientes de grupo O (45.4%) que presentaban positivities más ocasionales.

15 de 29 casos (53.5%) mostraron una expresión citoplásmica de **grupo sanguíneo A** a nivel del epitelio simple pseudoglandular y en su mayoría también en la secreción de moco intraluminal (10 de estos casos). Esta

expresión coincidió en 12 casos (12/28 -42.8%-) con expresión positiva a nivel del epitelio simple de la mucosa endocervical. De forma mayoritaria todas las expresiones positivas del epitelio pseudoglandular correspondían a pacientes con fenotipo A, incluida la paciente del grupo AB entre los casos de las lesiones de bajo grado (su epitelio pavimentoso exocervical también expresaba este antígeno).

La expresión de **grupo B** a nivel de esta mucosa tan sólo se observó en las dos lesiones que correspondían a la pacientes de AB, habiendo resultando negativo en el resto de los casos (2/29 -6.8%-).

En cuanto a **H-1**, observamos expresiones positivas a nivel pseudo-glandular en 12 de 31 casos -38.7%- (6 del grupo A y 6 del grupo O). 10 de estas expresiones positivas se localizaron a nivel ciliar coincidiendo todas con las expresiones positivas de cadenas precursoras a nivel ciliar.

Tan sólo dos casos de 30 (6.6%) resultaron positivos para H-1 a nivel del epitelio simple endocervical, uno con una tinción heterogénea, y otro a nivel ciliar.

3.1.3 Antígenos ABH en las áreas de metaplasias.

Entre los casos estudiados identificamos 20 campos de metaplasia (entre estos 18 metaplasia maduras -pseudoerosiones o eversiones reepitelizadas- una metaplasia atípica/epitelio regenerativo, y una metaplasia inmadura).

El estudio de la expresión de los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABH en estas zonas de metaplasia nos puso en evidencia una falta de expresión de **cadena precursoras T1-CH**, habiéndose observado únicamente focos de expresiones heterogéneas en 3 de 20 casos (15%).

12 de 20 casos (60%) presentaron expresiones positivas de **grupo sanguíneo A** coincidiendo la mayoría con los grupos sanguíneos conocidos.

De forma general, la expresión de grupo sanguíneo A a nivel de las metaplasias maduras seguían el mismo patrón que el epitelio pavimentoso (ocho expresión en el tercio medio, dos expresiones heterogéneas, una expresiones en los tercios medio y superior, y una expresión ocasional en coincidencia con falta de expresión a nivel glandular y moco).

6 de 19 casos estudiados (31.5%) expresaron **grupo sanguíneo B**. Tres de estos casos eran del grupo O, uno de grupo AB y dos de grupo A. Tres casos seguían un patrón de expresión a nivel del tercio medio del epitelio. Dos casos (uno de grupo A y otro de grupo O) mostraron expresiones heterogéneas de grupo B únicamente a nivel de la zona de metaplasia, con ausencia de expresión de este mismo determinante antigénico a nivel del resto de epitelios.

En cuanto al **antígeno H1** en los epitelios metaplásicos, observamos pocos casos que lo expresaran (4/20 -20%-). Dos de estos casos mostraron expresiones heterogéneas que coincidieron con expresiones de cadena

precursora T1-CH siguiendo el mismo tipo de patrón. Otros dos casos mostraron expresiones ocasionales de este determinante antigénico.

3.1.4 Antígenos ABH en las lesiones relacionadas con la infección HPV (condilomas), y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE-BG).

A grandes rasgos podemos decir que no hemos observado diferencias destacadas entre los patrones de expresión de la mucosa exocervical en comparación con las lesiones escamosas de bajo grado.

Tanto las cadenas precursoras T1-CH, como H1 se mostraron de forma general ausentes en su expresión en coincidencia con la ausencia de expresión a nivel del epitelio pavimentoso. Tan sólo en un caso del grupo A se vieron campos de expresión ocasionales del determinante antigénico H-1, que no se había visto en el epitelio pavimentoso.

Los determinantes antigénicos de grupo A y B, cuando se expresaron a nivel de las lesiones epiteliales escamosas de bajo grado, coincidieron con el grupo sanguíneo y el tipo de expresión de este determinante en cada paciente a nivel del resto del epitelio.

4 y 6 de 9 casos (44.4%) entre las LIE-BG mostraron expresiones antigénicas de grupo A y B respectivamente. Seis de estos coincidían con el tipo de expresión visto en el epitelio pavimentoso originario.

3.1.5 Antígenos ABH en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG).

Resultaron en menor número los casos que expresaron el determinante antigénico de **cadena precursora T1-CH** (2/16 casos -12.5%-) que los que expresan el **determinante H-1** (5/16 casos -31%-) entre las lesiones escamosas de alto grado.

La expresión del **determinante antigénico H-1** en las LIE-AG resultó preferente en los casos de los paciente de grupo O (4/7 grupo O; 1/8 grupo A) presentándose en campos aislados focales (expresiones ocasionales).

En uno de los paciente de grupo A (nº5) observamos claros campos de expresión de cadenas precursoras T1-CH a nivel de los nidos de LE-AG con un patrón heterogéneo y expresiones focales que comprometían el 2% de la lesión.

Para el **determinante antigénico de grupo A** apreciamos cambios significativos entre la expresión a nivel del epitelio normal y de las lesiones de alto grado. Todos los casos con fenotipo A expresaron este determinante en sus lesiones de alto grado pero con una tendencia destacada a presentar patrones heterogéneos, perdiéndose el patrón característico de membrana con forma en "panal". En 5 de 9 casos positivos (55.5%) con BG2 se observaron pérdidas focales de expresión antigénica a nivel de las lesiones escamosas de alto grado, algunas mostrando claros cortes bruscos de pérdida de expresión sin tránsito gradual con los campos de expresión positiva. En otros campos, se entremezclaban células positivas con negativas. Generalmente apreciamos que a medida que aumenta la masa de tejido neoplásico es más fácil observar alteraciones en la expresión del determinante antigénico de grupo A.

Para el **determinante antigénico de grupo B (Ac BG3)** observamos 4 casos que expresan este tipo de Ag (4/16 -25%-). Tres de estos mostraron un patrón heterogéneo (dos en pacientes de grupo O, uno en un paciente de grupo AB). El cuarto expresaba el antígeno de grupo B en los tercios medio y superior de la lesión. Estos cuatro casos expresaban también el mismo determinante antigénico a nivel del epitelio pavimentoso, por lo que no pueden considerarse como expresiones aberrantes exclusivas a nivel de la lesión.

Dos de los casos con expresión heterogénea de grupo B a nivel de la lesión de alto grado presentaban también pérdidas focales de expresión enfrentadas con campos de expresión clara.

3.1.6 Antígenos ABH en los carcinomas epidermoides invasores del cuello uterino.

2 de las 10 (20%) neoplasias invasoras estudiadas expresaron **cadena precursoras T1-CH y estructura sin ramificar H-1** respectivamente. (Expresión focal ocasional de BG1 en un Carcinoma Epidermoide de un paciente de grupo O; y expresión ocasional superficial en un adenocarcinoma de un paciente de grupo A).

Comparando los hallazgos de las neoplasias invasoras con los de las lesiones escamosas de alto grado, tenemos que los pacientes de **grupo A** con carcinomas invasores muestran con más frecuencia ausencia de expresión de este determinante antigénico (4/5 -80%-). Tan sólo la paciente en la que concurrían un adenocarcinoma y un carcinoma epidermoide, este último presentaba un patrón de expresión de grupo A heterogénea. Del mismo modo, 3 de 5 (60%) pacientes de grupo A y 2 de 5 pacientes del grupo O (40%),

presentaron expresiones aberrantes de **grupo B** a nivel tumoral (si bien tres de carácter débil, y uno -el adenocarcinoma- con tinción dudosa).

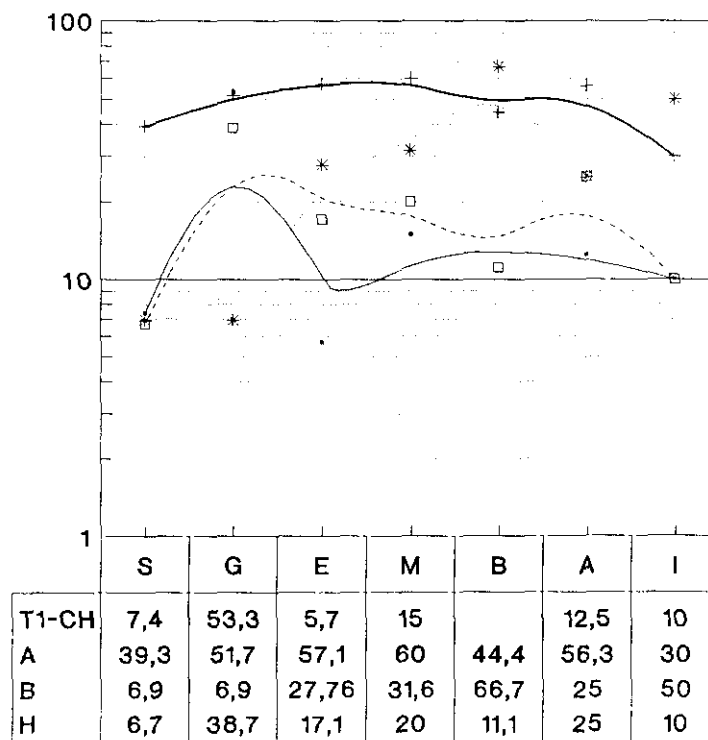
En cuanto a las cinco pacientes de grupo O, una expresaba el determinante antigénico de grupo A a nivel del epitelio pavimentoso (en su tercio medio), y dos en sus neoplasia invasoras (una superficialmente y otra de forma heterogénea débil con focos negativos). La expresión de grupo A en estas dos pacientes a nivel endotelial fue negativa.

En la TABLA XIV se resumen los resultados expuestos hasta el momento en cuanto a la expresión de los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABH en las mucosas endo y exocervical y en las distintas lesiones seleccionadas. En la página siguiente se muestran también estos resultados de forma gráfica y porcentual sobre el eje de ordenadas. En el eje de abscisas se distribuyen las distintas observaciones sobre E.- Epitelio pavimentoso exocervical, S.- Epitelio simple endocervical, G.- Epitelio de las estructuras pseudoglandulares endocervicales, M.- Areas de metaplasia, B.- Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, A.- Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, I.- Carcinomas invasores. Según vemos en dichas curvas, podemos apreciar cómo a medida que se progresa en las lesiones se produce una disminución paralela en la expresión tanto de los antígenos de grupo A como de grupo H, e incremento ligero de las cadenas precursoras T1-CH.

TABLA XIV. RESUMEN DE RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LOS ANTIGENOS T1-CH, A, B, Y H-1

| | T1-CH | | A | | B | | H | |
|--------------------------|-------|---|-------|----|-------|----|-------|---|
| Epitelio Simple | 2/27 | | 11/28 | ■ | 2/29 | ■ | 2/30 | |
| Epitelio Pseudoglandular | 16/30 | ≈ | 15/29 | ◆■ | 2/29 | ■ | 12/31 | ≈ |
| Epitelio Pavimentoso | 2/35 | ● | 20/35 | ≠ | 10/36 | ≠ | 6/35 | ● |
| Area de Metaplasia | 3/20 | ≠ | 12/20 | ≠ | 6/19 | ≠ | 4/20 | ● |
| LIE-BG | 0/10 | | 4/9 | | 6/9 | ≠ | 1/9 | ● |
| LIE-AG | 2/16 | ● | 9/16 | ≠< | 4/16 | ≠< | 4/16 | ● |
| Carcinomas Invasores | 1/10 | ● | 3/10 | ≠ | 5/10 | ≠d | 1/10 | ● |

■.- Tinción homogénea, ≠.- Tinción Heterogénea, ≠.- T. tercio medio del epitelio, ●.- T. ocasional, ≈.- T. ciliar, ◆.- T. del moco, <.- Disminución de la expresión y campos negativos, d.- Tinción débil.



— T1-CH + A * B -□- H

3.2.- EXPRESION DE LOS ANTIGENOS DE GRUPO SANGUINEO LEWIS.

Mediante el empleo de los anticuerpos monoclonales BG5, BG6, BG7, BG8, establecimos la expresión de los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo Lewis (BG5.- Le^a cadena tipo 1; BG6.- Le^b cadena tipo 1; BG7.- Le^x cadena tipo 2; BG8.- Le^y cadena tipo 2) en los casos seleccionados para el estudio.

La calidad de las tinciones obtenidas con estos anticuerpos fue, en su mayor parte, buena. La expresión de cada uno de los cuatro antígenos, al igual que lo ocurrido con la expresión de grupo sanguíneo ABH, fue de membrana en el caso del epitelio pavimentoso, y citoplásmica/moco de las luces pseudo-glandulares en el caso del epitelio simple. La tinción de fondo fue baja o ausente.

Conjuntamente con la determinación de las distintas expresiones antigénicas a nivel de los epitelios y lesiones, se evaluó la expresión de cada uno de los antígenos en el endotelio de los capilares del estroma.

En comparación con los resultados obtenidos con los anticuerpos determinantes de grupo ABH, los resultados para la expresión de los antígenos de grupo Lewis mostraron un menor polimorfismo. Re-evaluando los casos de la muestra según su carácter secretor y la expresión de los determinantes antigénicos Le^a, y Le^b, observamos que en esta población había 15 pacientes

pertenecientes al Grupo I (41.6%) (Secretores ABH +, Lewis a,b +); 13 pacientes del Grupo II (36.1%) (No secretores ABH -, Lewis a,b +); 2 pacientes del Grupo III (5.5%) (Secretores ABH +, Le a,b -); y 6 pacientes del Grupo IV (16.6%) (No secretores ABH -, Lewis a,b -).

En las TABLAS IV_(A), V_(A), VI_(A) del Apéndice, exponemos de forma pormenorizada la totalidad de los hallazgos de la expresión de los antígenos Le^a, Le^b, Le^x, y Le^y, según los casos de la muestra del estudio: Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado, y carcinomas invasores.

3.2.1 Antígenos Lewis en la mucosa normal exocervical.

De forma general, podemos decir que hemos observado en el epitelio pavimentoso de la mucosa exocervical, una expresión que comprometía mayor extensión del grosor de dicho epitelio en el caso de los determinantes antigénicos de grupo Lewis en comparación con la expresión de grupo ABH. Tendiendo a expresarse desde la capa suprabasal hasta las capas externas más superficiales (tinción suprabasal, tercio medio y superior del epitelio).

El antígeno Le^a, se expresó en 20 de 33 casos testados (60.6%). 12 con expresiones extensas que comprometían la capa suprabasal hasta la capa más superficial del epitelio pavimentoso. En el resto de los casos dominaba una expresión del tercio medio-suprabasal (5 casos).

El antígeno Le^b, se expresaba en 27 de 35 casos (77%).

Apreciamos que la forma de expresión más frecuente resultaba comprometer casi la totalidad del epitelio con la salvedad de la capa basal (Tinción tercio medio y superior 15/27). El resto de los casos mostraban una tendencia de expresión por encima del tercio medio del epitelio, advirtiéndose expresiones más extensas en concordancia con la expresión a nivel del epitelio simple y moco.

26 de 35 (74%) casos expresaron Le^x , expresión que también tendía a localizarse en los tercios superiores del epitelio, pero que en general no coincidían con la expresión de los antígenos Le^a y Le^b . Dos casos del grupo de las LE-AG mostraron expresiones focales de este antígeno.

El antígeno Le^y fue el que más se expresó en la muestra de nuestro estudio con 29 casos de 35 (82.8%). 20 de estos casos positivos con expresiones positivas desde la capa suprabasal hasta la más superficial.

3.2.2 Antígenos Lewis en la mucosa normal endocervical.

Donde se pudieron identificar las estructuras pseudoglandulares, el antígeno Le^a en la mucosa endocervical se expresó en 19 de 27 casos (70%) y en 17 de 23 casos (73.9%) donde se encontró epitelio simple. El tipo de expresión en estos casos fue citoplásmica, y en la mayoría de los casos coincidían las expresiones de los dos tipos de células cúbicas, además de expresarse en moco de la luz de las pseudoglandulas. En un caso observamos expresiones claras a nivel ciliar. 15 de 19 casos positivos para Le^a eran fenotipo $Le (a+ b+)$ -78.9%-.

22 de 29 casos (75.8%) mostraron expresión del **antígeno Le^b** en el epitelio pseudoglandular -generalmente también en el moco de las luces-, y 18 de 27 casos -66.6%- fueron positivos en el epitelio simple endocervical. La totalidad de estos últimos mostraron expresiones coincidentes con las expresiones a nivel del epitelio pseudoglandular. En 3 casos se observó expresión en las estructuras ciliares, dos de estos coincidiendo con expresiones heterogéneas del epitelio glandular. Ninguno de estos tres casos presentaban expresión de Le^b en el moco de las luces ni en el epitelio simple.

La expresión del **antígeno Le^x** en el epitelio endocervical tenía más tendencia a mostrarse de forma heterogénea que los antígenos precedentes (13/22 -59%-), con campos irregulares de expresiones positivas y negativas. Se apreciaron epitelios pseudoglandulares positivos en 22 de 29 casos (75.8%), y epitelios simples endocervicales positivos en 18 de 27 casos (66.6%). Sin embargo, también observamos para este antígeno que se mantenía la concordancia de expresión en los dos epitelios simples y además, 14 de estos casos se expresaron también en el moco.

El **antígeno Le^y**, volvió a mostrarse como el antígeno que más se localizaba en la mucosa endocervical con 27 positividadades de 29 casos (93%) en el epitelio pseudoglandular, y con 23 positividadades de 26 casos (88%) en el epitelio simple endocervical. Las expresiones de los dos epitelios coincidieron con un patrón intracitoplásmico homogéneo, además de expresarse también en el moco de las luces pseudoglandulares.

3.2.3 Antígenos Lewis en las áreas de metaplasia.

En 16 metaplasias identificadas para el estudio de la expresión de los antígenos Lewis, 11 (68.7%) fueron positivas para **Le^a** con tinciones supra-basales, predominando los casos en los que se expresaban los dos tercios superiores del epitelio (6 casos). Generalmente se trataba de metaplasias maduras (pseudoerosiones con epidermización pavimentosa completa) que habían adquirido el mismo tipo de expresión que el epitelio exocervical pavimentoso.

12 de 16 casos (75%) expresaron el **antígeno Le^b** con un predominio de casos que expresaban ampliamente este antígeno en casi la totalidad del grosor del epitelio, por encima del estrato basal.

El **antígeno Le^x** se observó positivo en 11 de 14 casos (78.5%) donde se pudieron identificar áreas de metaplasia. La totalidad de estos casos mostraba patrones equivalentes a los vistos en el epitelio pavimentoso exocervical, con la salvedad de un caso de metaplasia atípica/epitelio regenerativo donde apreciamos una expresión heterogénea, con distribución irregular de la expresión del antígeno Le^x. Este tipo de antígeno mostró, en líneas generales una tendencia a expresarse en los estratos más superficiales del epitelio.

El **antígeno Le^y** se expresó positivamente en 10 de 13 casos (76.9%), 7 de los cuales se distribuía desde la capa suprabasal hasta la capa más superficial, uno mostraba expresiones focales ocasionales a lo largo del epitelio, y

otros dos mostraron una expresión heterogénea y superficial cada uno. Sus patrones de expresión eran similares a los vistos en el epitelio pavimentoso correspondiente, incluido el epitelio de regeneración.

3.2.4 Antígenos Lewis en las lesiones relacionadas con la infección HPV (condilomas), y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE-BG).

En la misma línea de lo observado con la expresión de los antígenos de grupo ABH, no hemos encontrado diferencias manifiestas entre los patrones de expresión de la mucosa exocervical en comparación con las lesiones escamosas de bajo grado, con la salvedad de aquellos casos en los que se acompañaban de discretas a moderadas hiperplasias del estrato basal, en los que constatamos una tendencia a mostrarse este estrato con ausencia de expresión para los cuatro antígenos de grupo Lewis, desplazando la expresión de estos antígenos a las capas superiores.

El antígeno Le^a se expresó en 4 de los 10 casos de LIE-BG (40%), conservándose en 3 el patrón de expresión del epitelio pavimentoso originario. Estos 3 casos coincidían en su expresión de Le^a a nivel de la mucosa simple y la secreción mucinosa de la luz pseudoglandular. El cuarto caso expresaba heterogéneamente este antígeno con una ligera tendencia a desplazarse por encima del patrón de expresión del epitelio originario.

El antígeno Le^b se observó en 7 de los 10 casos de LIE-BG (70%), conservándose el tipo de patrón con respecto al epitelio original en 5 casos, y con expresiones heterogéneas en 2. Dos lesiones de las 7 (condiloma

acuminado y su recidiva de la misma paciente) expresaron el antígeno Le^b en la capa más superficial del epitelio, quedándonos la duda si era una falsa positividad de arrastre en el paso de la tinción con el cromógeno.

En 5 de 10 casos (50%) se constataron expresiones positivas para Le^x, sin advertirse diferencias de patrón con respecto al epitelio pavimentoso, hecho similar con las 7 de 10 expresiones (70%) observadas para el antígeno Le^y.

La totalidad de los casos incluidos en el grupo de las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado mostraron expresión positiva a nivel del endotelio capilar para el antígeno Le^y.

3.2.5 Antígenos Lewis en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado LIE-AG.

Sí nos encontramos con cambios evidentes en la expresión de los distintos antígenos de grupo sanguíneo Lewis entre los epitelios originarios y las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado. Estos cambios resultaron más destacados en la evaluación del antígeno Le^x .

11 de 16 casos (68.7%) estudiados de LE-AG se mostraron positivos para el antígeno Le^a , observándose en la mayoría de ellos (7/11 -63%-) cambios en el patrón de expresión antigénica, dominando un patrón heterogéneo con campos irregulares positivos y negativos. En general, la mayoría también expresaba en menor cuantía dicho antígeno habiéndose visto claros focos negativos. Los 5 casos negativos para Le^a , tampoco expresaban dicho antígeno a nivel de los epitelios pavimentoso o simple -3 tenían un fenotipo $Le(a-,b-)$, y dos $Le(a-,b+)$ -.

En cuanto a la expresión del antígeno Le^b , 13 de 16 casos (81%) lo expresaron, 10 de forma heterogénea y 3 con focos ocasionales positivos. En la mayoría de ellos se apreció disminución de la expresión antigénica y bloqueos focales de su síntesis. En los 3 casos que mostraron expresiones focales ocasionales, este bloqueo resultaba más manifiesto.

Entre los 16 pacientes observamos, mediante la técnica inmunohistoquímica realizada, expresiones epiteliales de los antígenos Le^a y Le^b , constatando 7 casos con fenotipo $Le(a+,b+)$; 4 con fenotipo $Le(a+,b-)$; 3 $Le(a-,b-)$; y 2

casos de fenotipo Le(a-b+).

9 de 15 (60%) casos de las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado resultaron positivos para el **antígeno Le^x**, 4 con expresiones positivas ocasionales y 4 con disminución de su expresión que se desplazaba a las capas más superficiales de la lesión. En un caso se mantuvo la expresión en los tercios medio y superior del epitelio. 4 casos manifestaron un fenotipo Le(x -). En un caso (nº15) perdimos la lesión en la seriación y no pudimos determinar su expresión para este antígeno.

Finalmente, la expresión del **antígeno Le^y** resultó positiva en 11 casos (68.7%), advirtiendo para este tipo de antígeno menores cambios en el patrón de expresión. El patrón del epitelio pavimentoso originario se mantuvo en 5 casos, mientras que otros 5 tenían patrones heterogéneos. 3 pacientes presentaron un fenotipo Le(y -).

Es de destacar que en 12 casos observamos expresión positiva de Le^y a nivel del endotelio de los capilares del estroma. Este hecho nos resultó particularmente útil para observar la red capilar que se extendía debajo del epitelio pavimentoso normal y del epitelio con cambios displásicos. En este sentido, hemos constatado una mayor densidad de la red capilar bajo los cambios epiteliales displásicos, fenómeno, por ejemplo, particularmente manifiesto en el caso nº14 de las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado.

3.2.6 Antígenos Lewis en los carcinomas epidermoides invasores del cuello uterino.

La expresión del **antígeno Le^a** en los carcinomas invasores resultó positiva en 3 de los 10 casos. En cuatro casos con expresión fenotípica positiva a nivel del epitelio pavimentoso normal, se apreció ausencia de expresión para Le^a en las neoplasias invasoras, y en dos se encontraron campos irregulares donde alternaban zonas positivas y negativas.

5 de 10 neoplasias invasoras resultaron positivas para el **antígeno Le^b**, 3 de ellas con expresiones heterogéneas y campos negativos, una con campos positivos ocasionales, y una con desplazamiento de la expresión de este antígeno a las capas superficiales (tercio superior del epitelio). Dos casos (n^os 4 y 5) perdieron la expresión del antígeno Le^b a nivel de los nidos neoplásicos en comparación con la expresión del epitelio pavimentoso.

En cuanto a la expresión del **antígeno Le^x** en las lesiones neoplásicas invasoras volvimos a observar un mayor número de casos que presentaban bloqueo de su síntesis como comentamos también en las LE-AG. 6 casos con fenotipo positivo para Le^x en el epitelio pavimentoso, perdieron la expresión en su lesión neoplásica invasora y dos casos se mostraron positivos, uno con expresiones heterogéneas y pérdida de expresión focal, y otro con expresión en el tercio medio del epitelio. Un último caso se trataba de un fenotipo negativo para Le^x, que se mantenía en su lesión.

El estudio de la expresión del **antígeno Le^y** en los casos de los carcinomas invasores reveló hallazgos particulares diferentes a los observados con el resto

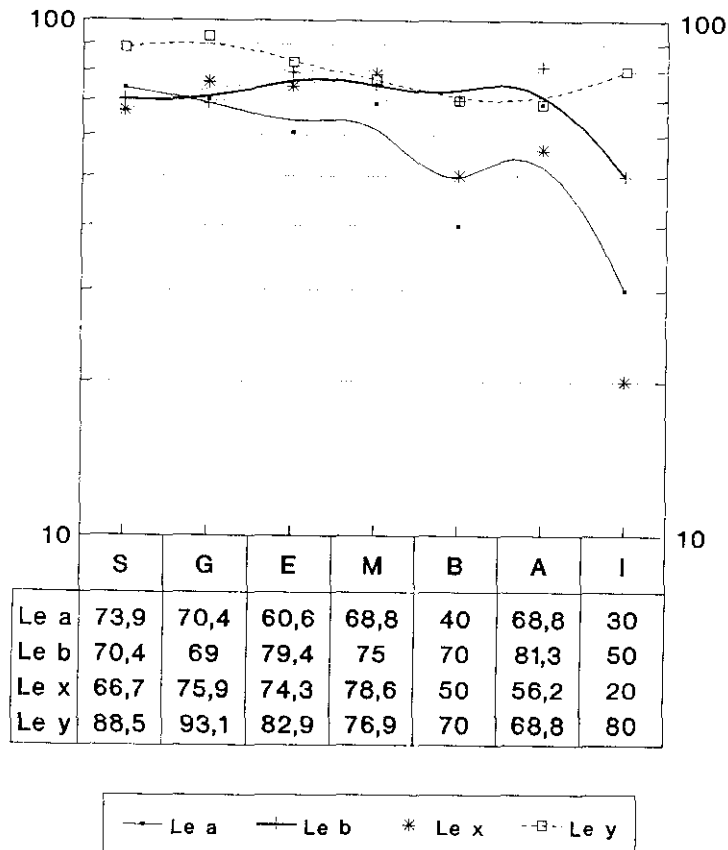
de los anticuerpos. La particularidad que comentamos consistió en que apreciamos un aumento de expresión de Le^y en comparación con el epitelio pavimentoso originario. 8 de los 10 casos resultaron positivos, con expresiones homogéneas en la totalidad del espesor de los nidos tumorales en 6 de ellos. En un caso se advirtió un patrón heterogéneo con disminución focal de expresión, y otro presentaba expresión en 2/3 del grosor de los nidos tumorales con negatividad en la perifería de los mismos.

En la TABLA XV se resumen los resultados expuestos hasta el momento en cuanto a la expresión de los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo Lewis en las mucosas endo y exocervical y en las distintas lesiones seleccionadas. En la página siguiente se muestran también estos resultados de forma gráfica y porcentual sobre el eje de ordenadas. En el eje de abscisas se distribuyen las distintas observaciones sobre E.- Epitelio pavimentoso exocervical, S.- Epitelio simple endocervical, G.- Epitelio de las estructuras pseudoglandulares endocervicales, M.- Areas de metaplasia, B.- Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, A.- Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, I.- Carcinomas invasores. Según vemos en dichas curvas, podemos apreciar cómo a medida que se progresa en las lesiones se produce una disminución marcada en la expresión del antígeno de grupo Le^x; disminución en paralelo de los antígenos Le^a y Le^b; y "sobreexpresión paradójica" del determinante antigénico Le^y.

TABLA XV. RESUMEN DE RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LOS ANTIGENOS LEWIS (Le^a, Le^b, Le^x, Le^y).

| | Le ^a | | Le ^b | | Le ^x | | Le ^y | |
|--------------------------|-----------------|----|-----------------|----|-----------------|----|-----------------|----|
| Epitelio Simple | 17/23 | ■ | 19/27 | ■ | 18/27 | ■ | 23/26 | ■ |
| Epitelio Pseudoglandular | 19/27 | ◆■ | 20/29 | ◆■ | 22/29 | ◆■ | 27/29 | ◆■ |
| Epitelio Pavimentoso | 20/33 | ■ | 27/34 | ■ | 26/35 | ■ | 29/35 | ■ |
| Area de Metaplasia | 11/16 | ■ | 12/16 | ■ | 11/14 | ■ | 10/13 | ■ |
| LIE-BG | 4/10 | ≠ | 7/10 | ≠ | 5/10 | ≠ | 7/10 | ■ |
| LIE-AG | 11/16 | ≠< | 13/16 | ≠< | 9/16 | ● | 11/16 | ■≠ |
| Carcinomas Invasores | 3/10 | < | 5/10 | < | 2/10 | < | 8/10 | ■ |

■.- Tinción homogénea, ≠.- Tinción Heterogénea, ≠.- T. tercio medio del epitelio, ●.- T. ocasional, ≈.- T. ciliar, ◆.- T. del moco, <.- Disminución de la expresión y campos negativos, d.- Tinción débil.



3.3.- RECEPTORES DE LECTINAS EN LAS ESTRUCTURAS TISULARES ESTUDIADAS.

Comparando los hallazgos descritos hasta el momento mediante el empleo de los anticuerpos monoclonales con los resultados obtenidos mediante el uso de las lectinas, observamos para estas últimas una peor definición en la calidad de las tinciones. Su utilización nos ha exigido una mayor puesta a punto de la técnica, y aún después de diversas modificaciones en cuanto a bloqueos iniciales, tiempos o concentraciones de las lectinas, no hemos podido eliminar en su totalidad una cierta tinción de fondo inespecífica que dificultó el tabulado. Sin embargo, los perfiles de tinción mediante su utilización han resultado, en líneas generales, equiparables a los obtenidos con los MoAbs, pese al menor número y mayor debilidad de las células teñidas.

En las TABLAS VIII_(A), IX_(A) y X_(A) del Apéndice se exponen la totalidad de los resultados tabulados para cada tipo de caso y lectina.

3.3.1 Receptores de lectinas en la mucosa normal exocervical.

La lectina **UEA-I** con especificidad para $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlucNAc} > > \alpha\text{-L-Fuc}$ (grupo sanguíneo H(0)), se expresó en 26 de 34 casos (76.4%), todos por encima de la hilera de células basales, y con predominio de expresión en el tercio medio del epitelio (14/26). También observamos la expresión de esta lectina en el endotelio vascular de la mayoría de los casos (28/36 -77.8%-).

21 de 35 casos (60%) expresaron **DBA** con especificidad para GalNAc-(α 1-3)-GalNAc > α GalNAc -grupos sanguíneos A1 > A2-, la mayoría (14/21) pertenecientes al grupo A o AB. El tipo de patrón se expresó por encima de la basal, con predominio de casos en el tercio medio y algunos más con expresiones hasta la superficie del epitelio. 6 casos se expresaron en pacientes del grupo O (3 en el tercio medio del epitelio, 1 con expresiones heterogéneas, y dos con una localización superficial).

23 de 32 casos (71.9%) expresaron la lectina **SJA** con especificidad para α -D-Gal > GalNAc-(α 1-3)-GalNAc > α -L-Fuc - grupos sanguíneos B > A > O-. El tipo de tinción fue suprabasal con un ligero predominio de casos con tinciones en tercio medio algunos de los cuales también continuaban su expresión en las capas más superficiales del epitelio. Comparando los resultados obtenidos con este tipo de lectina y los distintos grupos sanguíneos a los que pertenecían las pacientes, las expresiones tabuladas se dispersaron de forma desordenada.

En cuanto a la lectina **LTA** con especificidad para α -L-Fucosa > Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GluNAc, observamos 17 de 33 casos positivos (51.5%) con patrones de tinción equivalentes a los comentados hasta el momento. En dos casos apreciamos que la expresión de este tipo de lectina se localizaba a nivel nuclear, remarcando sus contornos.

3.3.2 Receptores de lectinas en la mucosa normal endocervical.

UEA-I se expresó en 24 de 27 casos (88.9%) coincidiendo tanto en el epitelio simple pseudoglandular, como en el de revestimiento superficial y en el moco intraluminal.

13 de 27 casos (48.1%) expresaron la **lectina DBA** con el mismo patrón que la lectina anterior, y con expresiones vistas sólo en los pacientes de grupo sanguíneo A.

13 de 26 casos (50%) resultaron positivos para **SJA**. Para esta lectina apreciamos tinciones más irregulares en los epitelios simples, lo que se acompañaba de menor expresión en las secreciones mucinosas.

Para la **lectina LTA** 7 de 25 casos fueron positivos (28%). En tres se expresaron en los núcleos de las células pseudoglandulares, en tres de forma irregular heterogénea y en uno de forma homogénea. Las expresiones en el epitelio simple de la mucosa endocervical fue similar.

3.3.3 Receptores de lectinas en las áreas de metaplasia.

La expresión de las lectinas en las metaplasias maduras resultó en gran parte similar a las expresiones observadas de los epitelios pavimentosos más próximos. **UEA-I** se expresó en 7 de 11 casos observados (63.6%), **DBA** en 8 de 12 (66.6%), **SJA** en 7 de 14 (50%), y **LTA** en 3 de 14 (22%). De la totalidad de estos casos (25) encontramos 8 casos (32%) con cambios de patrón con respecto al epitelio pavimentoso, todos ellos con patrones heterogéneos.

3.3.4 Receptores de lectinas en las lesiones relacionadas con la infección HPV (condilomas), y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE-BG).

La totalidad de los casos de LIE-BG se expresaron positivos para **UEA-I** (9/9). En dos de estos casos observamos un desplazamiento de esta expresión a las capas superiores, manteniendo el resto el mismo patrón de expresión que el epitelio originario.

5 de 9 casos (55.5%) expresaron receptores para la lectina **DBA** en coincidencia con la expresión y patrón en el mismo epitelio pavimentoso originario. Los cuatro casos negativos para **DBA** en las LIE-BG también lo eran en el epitelio pavimentoso de origen.

Para la lectina **SJA** observamos la misma expresión y patrón que para la lectina anterior (5/9) coincidiendo además en los mismos casos donde se expresaban también la lectina **DBA**.

La lectina **LTA** se expresó en menos casos, 4/10, tres con expresiones a nivel del tercio medio del epitelio y uno con expresión débil en la lesión. En uno de los casos localizamos la expresión de tipo nuclear.

3.3.5 Receptores de lectinas en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG).

UEA-I se expresó en 9 de 15 LIE-AG (60%). En 4 de estas lesiones observamos un patrón heterogéneo, y una de estas cuatro tenía campos bien definidos de ausencia de expresión para los receptores de esta lectina con cortes bruscos entre las zonas de expresión y las zonas donde se perdía

ésta.

9 de 15 casos (60%) expresaron receptores para la lectina **DBA**, si bien en 4 de estos tan sólo en focos dispersos ocasionales. El resto tenía patrones diversos (2 se expresaron en el tercio medio del epitelio, 2 de forma heterogénea, y una en el tercio superior). 5 casos mostraron cambios evidentes de expresión con respecto al epitelio pavimentoso originario.

SJA se expresó también en 9 de 15 casos (60%), 5 de ellos con expresiones heterogéneas distintas de los patrones vistos a nivel del epitelio pavimentoso originario. En dos de estos casos la expresión fue débil.

8 de 15 casos (53.3%) expresaron la lectina **LTA**, cuatro de estos a nivel de la capa más superficial del epitelio y dos con sobreexpresión con respecto al epitelio originario. Dos casos más mantuvieron la expresión del epitelio pavimentoso.

3.3.6 Receptores de lectinas en los carcinomas epidermoides invasores del cuello uterino.

8 de 10 carcinomas invasores expresaron positividad para la lectina **UEA-I**, 5 con sobreexpresiones con respecto al epitelio pavimentoso originario, 3 con patrones heterogéneos (dos de ellos, entre los que se incluye el adenocarcinoma, con campos donde se aprecian pérdidas de expresión bruscas en diversos nidos tumorales). En un caso hay pérdida completa de la expresión de estos receptores con respecto al epitelio originario.

Se encontraron receptores para la lectina **DBA** en sólo 2 de 10 casos,

con pérdidas de expresión evidentes en la neoplasia para 3 casos donde se observaron positivities en el epitelio originario.

La lectina **SJA** se encontró positiva en 8 de 10 casos, sin bien, se apreció una tendencia mayor en el número de casos con expresiones heterogéneas (5 de ellos). Dos casos mantuvieron la positividad para esta lectina con un patrón igual al observado en el epitelio originario: Expresiones en las zonas centrales de los nidos tumorales y en el tercio medio del epitelio pavimentoso. En un caso encontramos receptores para esta lectina con expresiones débiles o ausentes.

6 de 10 neoplasias invasoras expresaron receptores para la lectina **LTA**, dos de forma heterogénea con patrón distinto al epitelio originario y dos con focos ocasionales y con una intensidad de tinción débil. Un caso mostró sobreexpresión con respecto al epitelio originario, y en otro caso observamos que se expresaba en las regiones centrales de los nidos tumorales sin haber podido encontrar expresión en el epitelio pavimentoso originario.

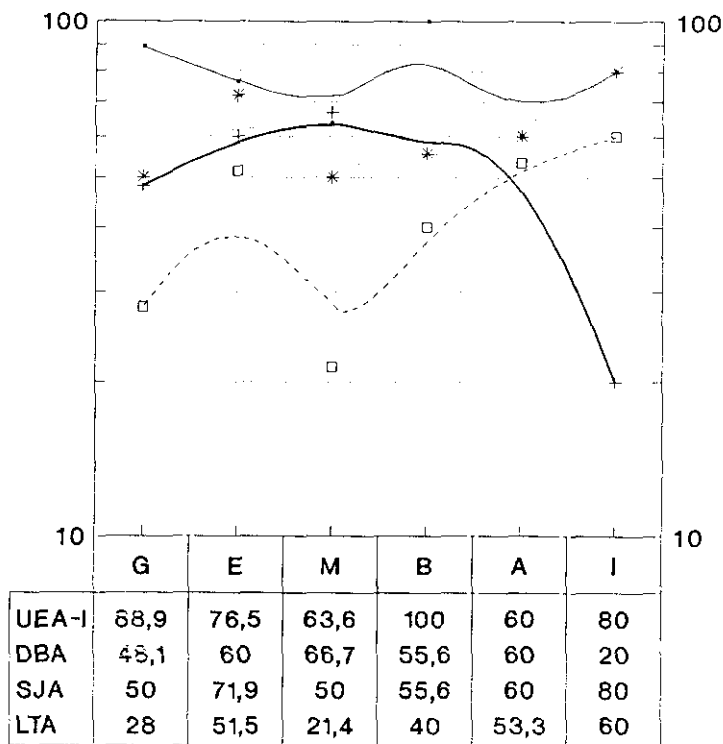
En la TABLA XVI se presenta un resumen de los hallazgos mencionados hasta el momento en relación con la utilización de las cuatro lectinas. Además se incluye, de la misma forma que lo hiciéramos en los distintos apartados sobre la expresión de los grupos sanguíneos ABH y Lewis, una gráfica donde se reflejan de forma porcentual dichos resultados. En dicha gráfica, que considera todos los casos positivos de forma globalizada, no incluye los

cambios en el patrón de la tinción y sin embargo se observa un descenso en la expresión para los receptores de la lectina DBA con especificidad de grupo sanguíneo A.

TABLA XVI. RESUMEN DE RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LOS RECEPTORES DE LECTINAS UEA-I, DBA, SJA, LTA.

| | UEA-I | | DBA | | SJA | | LTA | |
|--------------------------|-------|----|-------|----|-------|---|-------|----|
| Epitelio Pseudoglandular | 24/27 | ◆■ | 13/27 | ◆■ | 13/26 | ≠ | 7/25 | nl |
| Epitelio Pavimentoso | 26/34 | ≠ | 21/35 | ≠ | 23/32 | ≠ | 17/33 | ≠ |
| Areas de Metaplasia | 7/11 | ≠ | 8/12 | ≠ | 7/14 | ≠ | 3/14 | |
| LIE-BG | 9/9 | ≠ | 5/9 | ≠ | 5/9 | ≠ | 4/10 | ≠ |
| LIE-AG | 9/15 | ≠ | 9/15 | • | 9/15 | ≠ | 8/15 | ≠ |
| Carcinomas Invasores | 8/10 | ■≠ | 2/10 | < | 8/10 | ≠ | 6/10 | ≠ |

■.- Tinción homogénea, ≠.- Tinción Heterogénea, ≠.- T. tercio medio del epitelio, ≠.- T. del tercio superior del epitelio; ≠.- T. de la capa más externa del epitelio; ≠.- T. suprabasal; •.- T. ocasional, ≈.- T. ciliar, ◆.- T. del moco, <.- Disminución de la expresión y campos negativos, d.- Tinción débil.



—○— UEA-I —□— DBA * SJA -□- LTA

3.4.- EXPRESION DE LAS PROTEINAS p53 y PCNA.

3.4.1 *p53 y PCNA en la mucosa normal exocervical.*

Ambos antígenos, cuando se expresaron y según esperábamos, adoptaron un patrón nuclear. Globalmente, hemos observado expresiones positivas para el antígeno PCNA en las capas más profundas del epitelio, circunscritas a la basal y primera hilera parabasal. Su tinción tendía a ser intensa (++) y con un porcentaje estimado entorno al 6%.

En 15 de 34 (44.1%) casos estudiados y donde identificamos un epitelio pavimentoso normal, presentaron expresiones positivas para PCNA en la basal y parabasal, con intensidades variables entre ligera(+) a intensa(++) y porcentajes entre el 3% y el 30%.

En ningún caso se encontró expresión de p53 en la mucosa exocervical normal con el MoAb utilizado y aún habiendo incrementado la concentración del primario y habiendo aumentado el periodo de incubación a 18 horas (4°C).

3.4.2 *p53 y PCNA en la mucosa normal endocervical.*

No se apreció expresión de PCNA ni de p53 en el epitelio simple endocervical, y tan sólo se encontraron expresiones focales de PCNA en las pseudoglándulas endocervicales con intensidades entre débil y moderada entorno al 3% de expresión porcentual celular.

5 de 27 (18.5%) muestras estudiadas para la expresión de p53 y

PCNA en la mucosa endocervical pseudoglandular resultaron positivas para PCNA de forma irregular heterogénea.

3.4.3 p53 y PCNA en las áreas de metaplasia.

Las áreas de metaplasia madura presentaron una expresión para PCNA similar a la observada en la mucosa pavimentosa exocervical, a diferencia de las áreas de metaplasia inmadura que tendieron a expresar en menor proporción este antígeno. En el único caso que contábamos con un epitelio regenerativo no encontramos expresión positiva evidenciable para PCNA mediante la técnica inmunohistoquímica practicada.

En ninguno de los casos encontramos expresiones positivas de p53 en las áreas de metaplasia madura con el MoAb empleado.

3.4.4 p53 y PCNA en las lesiones con cambios morfológicos relacionados con infección por HPV (condilomas), y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE-BG).

En ninguna de las lesiones con cambios morfológicos relacionados con infección por HPV se pudieron observar expresiones positivas para p53 ni para PCNA en las mismas zonas de lesión (koilocitosis, disqueratosis, mitosis atípicas). Por el contrario, en 7 de estos casos se apreciaron ligeras hiperplasias suprabasal con expresiones positivas para PCNA que arrojaban porcentajes celulares entre el 10% y el 60%.

El único caso de CIN I demostró un incremento mayor de células

positivas para PCNA, con elementos celulares positivos que se extendían al estrato medio del epitelio. La tinción para este antígeno resultó ser entre ligera y moderada y con un porcentaje celular positivo máximo del 60%.

3.4.5 p53 y PCNA en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG).

En la mayoría de las lesiones intraepiteliales de alto grado estudiadas se apreció un incremento en el porcentaje de células positivas para PCNA, en comparación con lo observado en las mucosas normales. En 12 de 14 casos (85.7%) observamos expresiones positivas entre moderadas a intensas, con positivities porcentuales celulares entorno al 70%.

En ninguno de los quince casos se encontraron expresiones positivas para p53 con el MoAb utilizado.

3.4.6 p53 y PCNA en los carcinomas epidermoides invasores del cuello uterino.

8 de 9 casos (89%) de carcinomas invasores del cuello uterino expresaron el antígeno PCNA con una intensidad de tinción fuerte (+ + +) y con porcentajes de células positivas entre el 40 y el 100%. Predominaron los casos que mostraban porcentajes altos de células positivas entorno al 95-100%.

En el caso donde se contaba tanto con un carcinoma epidermoide invasor como un adenocarcinoma invasor, ambos resultaron positivos para PCNA.

En una de las 10 neoplasias invasoras se observó una expresión positiva de p53 que comprometía aproximadamente un 40% de células de los nidos tumorales. Para este caso, la expresión de PCNA resultó menor que la observada en los otros casos (40%).

En la TABLA XVII se resumen los resultados para la expresión de PCNA y p53 sobre las lesiones estudiadas.

En las tablas XI_(A), XII_(A), y XIII_(A) se reflejan la totalidad de los resultados para la expresión de las proteínas p53 y PCNA en las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado, así como en los carcinomas invasores.

TABLA XVII. RESUMEN DE RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS DE LAS PROTEINAS PCNA Y P53.

| Histopatología | | PCNA | p53 |
|-------------------------|-------|-------------------|------|
| M. Exocervical (basal) | 15/34 | [6%/3-30%/2]* | 0/33 |
| M. Endocervical (basal) | 5/27 | [3%/3-20%/2] | 0/26 |
| LIE-BG (suprabasal) | 7/10 | [25%/10-60%/2] | 0/10 |
| LIE-AG (suprabasal) | 12/14 | [70%/30-100%/2-3] | 0/15 |
| CAI | 8/9 | [90%/40-100%/3] | 1/9 |

- * Primera cifra: porcentaje de células positivas.
- Segunda cifra: Porcentajes mínimos y máximos de células positivas.
- Tercera cifra: Intensidad de tinción; escala entre 1 (ligera) a 3 (intensa).

3.5.- RESULTADOS DE LA AMPLIFICACION DE UNA REGION DEL INTRON E6 DEL VIRUS HPV 16 EN LOS CASOS SELECCIONADOS.

Para poder realizar la amplificación de parte del intrón E6 del virus HPV 16 mediante la técnica de PCR, se sintetizaron los correspondientes *primers* ya comentados en el precedente apartado de Material y Métodos (pg. 80). Estos *primers* fueron establecidos y experimentados con anterioridad por Shibata^[253] en 1988, conociéndose su especificidad y su expresión en las líneas celulares de carcinomas cervicales CaSki y HeLa.

Mediante este ensayo se puede determinar de forma específica el Virus del papiloma humano (HPV) tipo 16 sin reacciones cruzadas para los HPV 6 o 11, y con un mínimo de 20 copias por muestra.

En un primer intento de reproducir el experimento de Shibata, se realizó una síntesis de los *primers* reseñados sin purificar. La optimización de la técnica de PCR con distintos controles positivos, negativos y blanco nos proporcionó resultados insatisfactorios, con amplificaciones inespecíficas en todas las muestras, incluida la muestra blanco de H₂OBD. Este hecho lo interpretamos como resultado de la formación de "*primer-dimers*" consecuencia de la impureza inespecífica de los oligonucleótidos sintetizados.

La resíntesis de los *primers* H1 y H2 con posterior purificación mediante extracción aniónica en columnas (OligoPark™), nos proporcionó productos que

diluimos en dos soluciones a un volumen de 500 μ l que nos dieron las siguientes concentraciones: H1.- 0.457 y 0.474 μ g/ μ l, H2.- 0.339 y 0.321 μ g/ μ l.

Los índices de pureza de cada oligonucleótido fueron, para H1 = 2.1 y para H2 = 1.8, y que consideramos como dentro de los márgenes óptimos 1.6-1.8.

Además se sintetizó una sonda -P1- específica para la región amplificada por la pareja de *primers* H1-H2. Dispusimos de dos volúmenes de 500 μ l de dicha sonda con unas concentraciones de 0.396 y 0.367 μ g/ μ l y un índice de pureza de 2. Dicha sonda fue marcada con DIG-dUPT para realizar un ulterior análisis mediante *dot blotting* (*DIG DNA Labeling and Detection Kit non-radioactive. Boehringer Mannheim, # 1363514*).

En la extracción del DNA procedente del tejido embebido en parafina, tomamos las máximas precauciones con el objeto de evitar contaminaciones. Cambiamos para cada caso la cuchilla del microtomo en el momento de realizar los cortes de los tejidos en parafina. Dichos bloques se manipularon con guantes y fueron debastados en 10 μ m hasta empezar a recoger las muestras. Entre cada corte se realizó una limpieza cuidadosa del microtomo con Xileno. En todo momento se manipularon las muestras y los tubos con guantes y todo el material utilizado con posterioridad estaba esterilado y era desechable, cambiando para cada caso las puntas de la pipetas y los correspondientes tubos.

Concluida la extracción y medidas las concentraciones de cada caso, estimamos como satisfactorio este primer paso.

En la TABLA XVI y TABLA XIV_(A) del Apéndice se exponen las concentraciones del DNA obtenido de cada caso y su índice de pureza, así como los resultados de la amplificación de parte del intrón E6 del virus HPV 16 mediante la técnica de PCR. Todas las muestras se homogeneizaron a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ previamente a la realización de la mezcla de los reactivos del ensayo.

Con anterioridad a la realización de la PCR a la totalidad de los casos, efectuamos también varios ensayos de optimización para determinar la mejor temperatura de *annealing* y número de ciclos. El resultado de dicha optimización nos llevó a practicar el programa del termociclador expuesto en el apartado de Material y Métodos (pg. 80). También en el momento de la optimización y con varias de las muestra tomadas al azar, realizamos un ensayo de amplificación, ya establecido en el Laboratorio de Histocompatibilidad donde realizamos este trabajo, de parte del gen de la región HLA-DR que codifica la molécula de la cadena β . Este ensayo resultó positivo en la totalidad de las muestras seleccionadas lo que nos aseguró que el producto extraído era válido para los posteriores ensayos de amplificación.

El procedimiento de hibridación mediante *dot blotting* con la sonda marcada con dUTP-Digoxigenina (1 pmol/ μl) se realizó a una temperatura inicial de 42° durante 18 horas. Una vez revelado y autorradiografiado a los 10 segundos, 1 minuto y tres minutos, los resultados de la placa radiográfica

fueron digitalizados y procesados informáticamente traduciéndolos en curvas según una escala de grises (FIGURA 2 y en la TABLA XV_(A) del Apéndice).

En el *blotting* del ensayo se incluyeron las pruebas de optimización entre las que se incluía uno de los casos que había amplificado y habíamos identificado como positivo mediante un gel del electroforesis. Dicho caso nos sirvió para establecer el límite de positividad según se muestra en la FIGURA 2. En la misma también se representan las curvas de grises de la totalidad de los casos del ensayo realizado. Además, contábamos con un caso, cortesía del Dr. Lacruz, que previamente había sido identificado como positivo para HPV-16 mediante *hibridación in situ* y PCR mediante primers consensuados. Dicho caso fue incluido en el ensayo de extracción de DNA y reemplazó uno de los huecos de nuestro *dot blotting* (nº3 LIE-AG) correspondiente a un caso del que no pudimos realizar su extracción de DNA convenientemente. Este caso control se confirmó como positivo en nuestro ensayo.

Mediante la prueba realizada de amplificación siguiendo la técnica de PCR con posterior hibridación específica y revelado en "frio", identificamos 7 casos positivos para el gen del intrón E6 del HPV-16 de 10 LIE-BG, 7 de 15 LIE-AG, y 7 de 10 carcinomas invasores. En total 21 positivos de 35 lesiones con una incidencia del 60% en esta muestra de casos.

Con posterioridad a la primera hibridación inicial a 42° C, procedimos a deshibridar las membranas y a rehibridarlas siguiendo los mismos pasos que la vez anterior pero con una temperatura de hibridación más alta (7° superior) con

la intención de reducir en lo posible las hibridaciones inespecíficas. Sin embargo, los resultados obtenidos con este segundo procedimiento fueron similares al previamente obtenido salvo muy ligeras atenuaciones en los casos donde contábamos con hibridaciones inespecíficas.

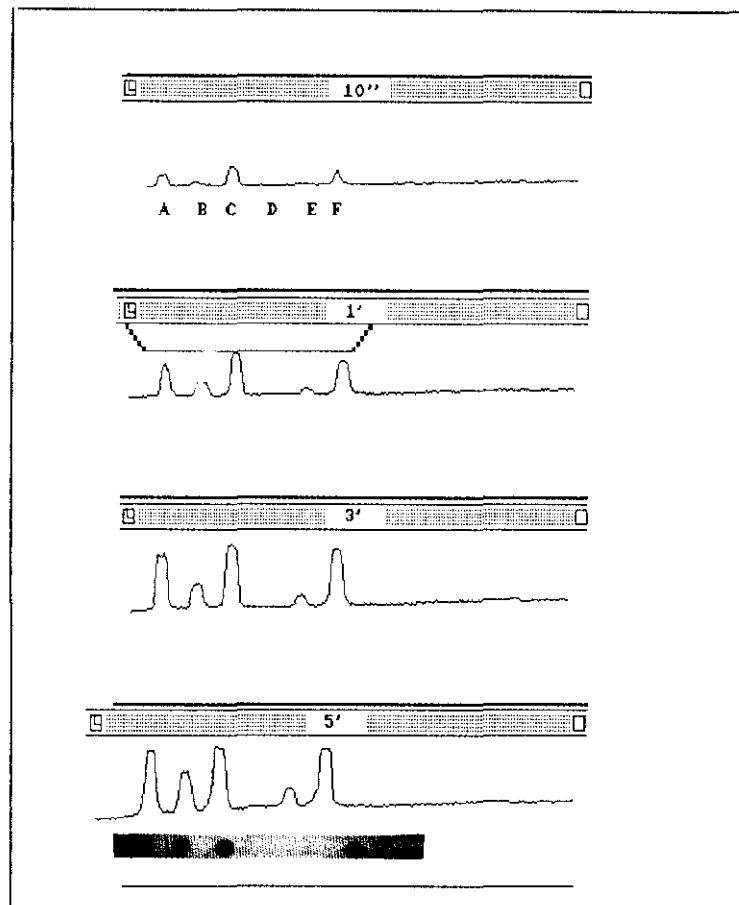
Con todo ello, y aún con las cautelas que comentaremos en el correspondiente apartado de la Discusión, hemos considerado aceptables los resultados que se exponen en la TABLA XVIII.

TABLA XVIII CONCENTRACIONES DEL DNA EXTRAIDO DE LOS DISTINTOS CASOS DEL ESTUDIO Y RESULTADOS DE LA AMPLIFICACION DEL INTRON E6 DEL VIRUS HPV 16.

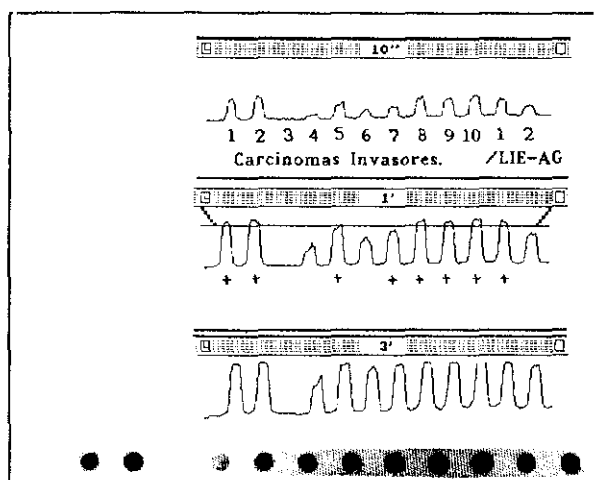
| LIE-BG | [DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | Pureza | Amplificación E6:HPV 16 | LIE-AG | [DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | Pureza | Amplificación E6:HPV 16 |
|--------|------------------------------------|--------|----------------------------|--------|------------------------------------|--------|----------------------------|
| 1 | 0.362 | 1.652 | + | 1 | 0.250 | 1.74 | + |
| 2 | 0.153 | 1.545 | + | 2 | 0.176 | 1.39 | - |
| 3 | 0.210 | 1.438 | - | 3 | - | - | NO |
| 4 | 0.180 | 1.44 | + | 4 | 0.161 | 1.91 | + |
| 5 | 0.081 | 1.42 | - | 5 | 0.377 | 1.690 | + |
| 6* | 0.030 | 1.15 | + | 6 | 0.195 | 1.652 | - |
| 7 | 0.066 | 1.609 | + | 7 | 0.228 | 1.701 | - |
| 8'' | 0.139 | 1.494 | - | 8 | 0.469 | 1.724 | - |
| 9''' | 0.097 | 1.492 | + | 9' | 0.177 | 1.462 | - |
| 10''' | 0.180 | 1.538 | + | 10 | 0.300 | 1.587 | - |
| | | | | 11 | 0.258 | 1.433 | - |
| | | | | 12 | 0.256 | 1.570 | + |
| | | | | 13 | 0.366 | 1.663 | - |
| | | | | 14 | 0.367 | 1.714 | + |
| | | | | 15'' | 0.103 | 1.450 | + |
| | | | | 16 | 0.402 | 1.178 | + |

| CARCINOMAS INVASORES | [DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | Pureza | Amplificación E6:HPV16 |
|-------------------------|------------------------------------|--------|---------------------------|
| 1 | 0.541 | 1.54 | + |
| 2'''' | 0.808 | 1.6 | + |
| 3'''' | 0.277 | 1.63 | - |
| 4 | 0.321 | 1.65 | - |
| 5 | 0.765 | 1.75 | + |
| 6 | 0.125 | 1.62 | - |
| 7 | 0.168 | 1.78 | + |
| 8 | 0.202 | 1.81 | + |
| 9 | 0.367 | 1.79 | + |
| 10 | 0.807 | 1.60 | + |

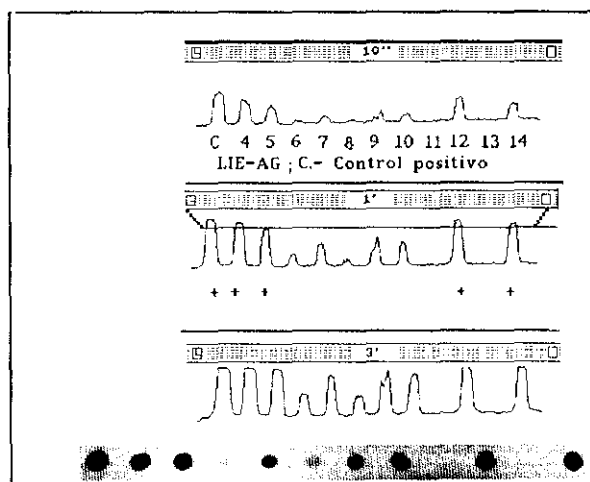
FIGURA 2. GRAFICAS DE LOS RESULTADOS DE LA AMPLIFICACION DE PARTE DEL INTRON E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO-16 Y SU HIBRIDACION ESPECIFICA.



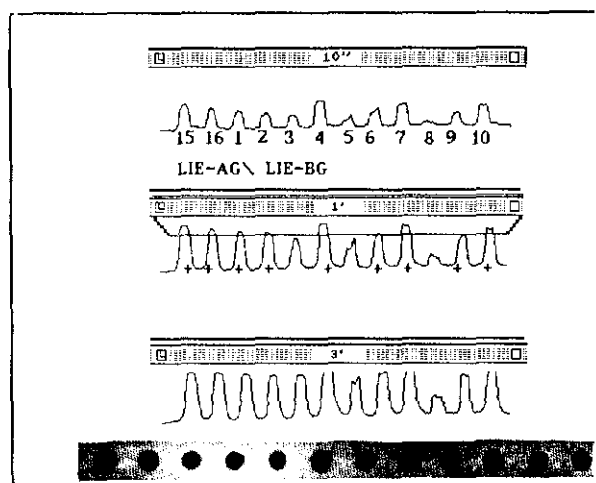
Optimización de la técnica de la PCR. Amplificación de parte del intrón E6 del HPV-16 e hibridación específica en *dot blotting*. Después de digitalizar los resultados obtenidos de la autorradiografía a 10'', 1', 3' y 5' de exposición, se realizaron varias curvas de grises para cada caso. En esta hilera se incluyen algunos de los casos de la optimización: A.- Caso nº 5 LIE-AG amplificado a una T° de *annealing* de 60°C y 30 ciclos con una concentración del DNA de la muestra de 0.1µg/µl; B.- El mismo caso y programa del termociclador pero a una concentración de DNA de 0.05µg/µl; C.- El mismo caso con una [DNA] de 0.1µg/µl pero con una T° de *annealing* a 55°C y 35 ciclos de amplificación. Los casos D.- Blanco E.- Caso nº 10 LIE-AG, y G.- Caso nº 16 LIE-AG se amplificaron en un programa de 30 ciclos con una T° de *annealing* de 60°C y una [DNA] de 0.1µg/µl. Establecimos el nivel de positividad de las curvas de grises según el caso C de la optimización.



Curvas de grises de la autorradiografía de la cuarta hilera del *dot blotting* donde se incluyen los 10 casos de los carcinomas invasores y los casos 1^o y 2^o de las LIE-AG.



Tercera hilera del *dot blotting* donde se incluyen los casos 4^o a 14^o de las LIE-AG



Segunda hilera del *dot blotting* donde se incluyen los casos 15^o y 16^o de las LIE-AG y los 10 casos de las LIE-BG.

DISCUSSION

4.1.- ANALISIS DE LA IMPORTANCIA DE LAS MODIFICACIONES DE LOS GLICOCONJUGADOS CELULARES EN LA TRANSFORMACION MALIGNA.

En el presente trabajo hemos comparado la expresión de los distintos determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos ABH y Lewis en tejidos del cuello uterino donde se contaba con epitelios normales y un espectro de lesiones escamosas intraepiteliales que iban desde las lesiones consideradas como de bajo grado (cambios morfológicos relacionados con la infección por HPV, condilomas y CIN grado I) hasta el carcinoma invasor. Además, hemos intentado establecer relación, si la hubiera, con la presencia de parte del intrón E6 del virus HPV16 reconocido como importante factor etiopatogénico en dichas lesiones.

Los mencionados determinantes antigénicos de ambos grupos sanguíneos resistieron bien la fijación mediante formol salino. Además, para contrastar los resultados con los anticuerpos monoclonales utilizados, hemos empleado cuatro tipos diferentes de lectinas: *Ulex Europaeus*, *Lotus Tetragonolobus*, *Dolichus Biflorus*, y *Sophora Japonica Agglutininas*.

Los resultados de ambos métodos nos han llevado a observar una mejor definición de las tinciones con el empleo de los MoAbs, si bien, los patrones de tinción tendieron a parecerse en ambos.

Este trabajo se fundamenta en el hecho de que el estudio de los glicoconjugados celulares pueden proporcionar una información valiosa en cuanto a los acontecimientos relacionados con la transformación celular neoplásica.

En este contexto, el propósito final de la mayoría de los trabajos realizados en nuestros días ha sido el de identificar un marcador celular ideal que se expresara en las superficies de los epitelios neoplásicos y se encontrara ausente en los tejidos no neoplásicos. En esta búsqueda, han sido numerosos los marcadores experimentados. Así, cabría mencionar entre otros y como ejemplos más notorios, al antígeno de membrana epitelial (EMA), al antígeno carcinoembrionario (CEA), las citoqueratinas ^[9,186,285], al receptor de los factores de crecimiento epitelial (EGF)^[15,16], o el antígeno CA 19-9^[240].

También se han identificado algunos marcadores séricos como el antígeno SCC (antígeno de los carcinomas de células escamosas) o el CA-125 relacionados con los carcinomas epidermoides y que podrían ser útiles en la monitorización del tratamiento y curso de estos procesos^[118,251].

Lejos de ese marcador ideal, y con un esperanzado sentido de aproximación no exento de algo de "credulidad", existen numerosas evidencias de que en distintos procesos neoplásicos de distintas localizaciones, los fenómenos de glicosilación de ciertas moléculas de la membrana celular sufren modificaciones que podría jugar un papel no desdeñable en relación con su comportamiento

de malignidad^[102].

Es así que, se han identificado y caracterizado gran número de anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos con un gran potencial antigénico cuyas estructuras moleculares se encuentran en los dominios de sitios de *O-glicosilación o N-glicosilación ligadas a diversas moléculas proteicas mayores*. En otro contexto, y como vimos en la Introducción, también estos epítomos estarían ligados a estructuras lipídicas.

Le^x y PoliLe^x, Le^x con extensiones de acetyl neuramínico o SialilLe^x, PolisialilLe^x, Le^y, SialilLe^{x-i}, Antígeno-i, sustancia-H, Le^a, Le^b, SialilLe^a, híbridos-Le^a-Le^b, los antígenos T, Tn y SialisTn, los Gal-Gb_{4,5 y 7}, Fuc-GM1, 6'-gangliosidos, NCAM, sGP90-135, gp160^[84,91,194], y los antígenos histo-sanguíneos ABH(O), constituirían ese extenso y cada vez mejor explorado conjunto de epítomos.

Con anterioridad al desarrollo de los anticuerpos monoclonales, no había pasado desapercibido el estudio de la glicosilación de la membrana citoplásmica celular.

Diversas observaciones con distintos extractos vegetales habían dado origen a un particular campo de conocimiento entorno a un grupo de sustancias proteicas ampliamente distribuidas en la naturaleza y que conocemos hoy como Lectinas.

Todas estas partículas tienen en común que se unen selectivamente a ciertos monosacáridos u oligosacáridos. Para cada lectina en particular se identifica una secuencia específica de residuos azucarados, que actuarían como receptores y se fijarían a ellos de forma reversible.

Pues bien, con las mencionadas lectinas se han podido llevar a cabo numerosos trabajos de investigación desde muy diversas perspectivas. Entre ellas, las lectinas han dado un particular servicio a la investigación oncológica habiendo sido las primeras moléculas que han podido identificar heterogeneidades en las poblaciones de las células tumorales, hecho particularmente útil en el estudio de los procesos de diferenciación de las células neoplásicas.

Recientemente, a las mencionadas lectinas se han ido sumando un número creciente de anticuerpos monoclonales con especificidades para los epítomos ya mencionados, lo que ha venido a completar y a mejorar las observaciones hechas con anterioridad y que quedaron reflejadas de forma más detallada en la Introducción de este trabajo.

También recientemente, han empezado a caracterizarse de una forma más completa los tipos de moléculas sobre los que los restos azucarados se asientan, perteneciendo gran parte de ellas a diferentes familias de receptores de adhesión: *Familia de la selectina* (LAM-1, ELAM-1, CD62), diversos *receptores celulares* (CD44), y en menor medida a la *familia de las integrinas* (β 1 integrinas VLA, β 2 integrinas Leu-CAMs, β 3 integrinas Citoadhesinas,

superfamilia $\beta 7$, y otras integrinas), y *superfamilia de las inmunoglobulinas* (ICAM, VCAM, CD2, CD4, CD8, CD22, etc).

Con estas moléculas y sus correspondientes ligandos, entre los que podemos mencionar la *fibrinectina*^[172], la *laminina*, *vitronectina*, las *moléculas de histocompatibilidad de clase I y II*, el *colágeno* o las estructuras de *Le^x*; se están estableciendo hoy en día distintos modelos de interacciones moleculares que darían explicación a fenómenos tan diversos como la fecundación, la adhesión de granulocitos al endotelio vascular, la emigración de los linfocitos T en los procesos de la inflamación, o la interacción de diversos microorganismos con las superficies celulares^[54].

A la presencia de estas estructuras azucaradas en las moléculas mencionadas no se les sabe dar hoy en día un papel determinado, si bien se advierte que sus funciones no pueden limitarse a un mero cometido arquitectural. En este sentido se apunta que estos restos hidrocarbonados podrían jugar un importante papel en la conformación de las moléculas donde se ligan, a modo de modeladores de su estructura espacial.

Así por ejemplo, los residuos de ácido siálico, al parecer, son los responsables del polimorfismo visto en muchas proteínas plasmáticas, como por ejemplo la $\alpha 1$ glicoproteína ácida, proponiéndose que las múltiples formas se deben a las diferentes posiciones isoméricas entre el ácido siálico y la galactosa, los cuales podrían modificarse a diferentes valores de pK para el

grupo carboxílico de este azúcar.

En cuanto a las secreciones mucinosas, las glicoproteínas son el principal componente macromolecular. Estas glicoproteínas mantienen un patrón estructural constituido principalmente por ácido siálico, fucosa, galactosa y N-acetilhexosamina. La unión de estas estructuras carbohidratadas a las cadenas peptídicas primarias se realiza mediante enlaces O-glicosilados a los residuos de Serina y Treonina, siendo relevante que ambos aminoácidos representan casi el 30% del total de los aminoácidos, y en un 60% contienen unidades carbohidratadas, lo que implica que en estas secreciones mucinosas los carbohidratos estén muy próximos unos de otros con una distancia entre 6 y 8 aminoácidos.

Siguiendo estos razonamientos y sumando otras evidencias, ya Spiro R.^[259b] en 1969 apuntaba que si bien, no encontraba una teoría unitaria que explicara la razón de la diversidad de estructuras carbohidratadas ligadas a proteínas aparentemente distribuidas en una forma no discriminada. Sin embargo, se podría establecer ese posible cometido de "modelador" de las moléculas, lo que les conferiría su particular función. No serían esenciales para la realización de las funciones de las moléculas en cuestión pero si jugarían una función de "apoyo" indispensable.

Con respecto a las moléculas glicolípídicas, Sen-itiroh Hakomori^[99-103] ha sido un autor que ha dedicado gran parte de su investigación encaminada a

entender las bases enzimáticas y la significación biológica e inmunológica de los cambios de glicosilación asociados con la transformación oncogénica que él mismo observó, como uno de los más destacados pioneros.

En este sentido, y desde hace casi una década, este autor advierte que se producen tres categorías de alteraciones: Síntesis incompleta, neosíntesis y redistribución en la organización de los glicolípidos de la membrana.

Reconoce además, que el proceso de acumulación de precursores por síntesis incompleta y el resultante de neosíntesis de glicolípidos pueden constituir verdaderos antígenos glicolipídicos "asociados a tumores", ausentes en la superficie de las células originarias.

El gangliósido GD3 en el melanoma humano, la globotriosilceramida en el linfoma de Burkitt, y las estructuras de sialosilLe^a, di o triaméricoLe^x, y sialosylLe^x en los carcinomas humanos gastrointestinales, pancreático, pulmonar, hepático y de mama, son para este autor, ejemplos típicos de glicolípidos "asociados a tumores".

A esto se puede sumar la observación de expresiones de determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABH incompatibles con la especificidad fenotípica propia de algunos pacientes. Por ejemplos, antígenos glicolipídicos tipo-A en tumores de pacientes de individuos del grupo O, o el antígeno Forssman en tumores de tejidos originarios Forssman-negativos, entre otros.

A todos estas alteraciones, Hakomori les asigna una significación de retroexpresión de glicolípidos propios de la organogénesis fetal¹¹⁰²⁾.

En cuanto a otros procesos neoplásicos, se ha hecho la observación de que el carcinoma de cervix y sus lesiones preneoplásicas representan un modelo óptimo para investigar la progresión de estas alteraciones de la glicosilación celular. En consonancia con esta afirmación, nosotros advertimos también que, además, se puede añadir a lo mencionado el hecho de que gran número de trabajos incriminan a un factor viral, el Virus del Papiloma Humano, como responsable etiológico de este proceso. No obstante, están justificadas las numerosas cautelas que se guardan con respecto a esta afirmación, dado que aún siguen latentes los excesos de triunfalismo de hace algunas décadas cuando se pretendió relacionar al Virus del Herpes Simple tipo 2 con el carcinoma del cuello uterino¹¹⁸⁵⁾.

En otro orden de cosas y siguiendo a diversos autores¹¹¹⁾, se advierte que en el momento actual se comienza a dar la paradójica situación, casi con carácter de inflación, de tener a nuestro alcance mucha y dispersa información en cuanto a lo que significan las transformaciones celulares malignas, numerosos los marcadores comerciales y además un número creciente de oncogenes y genes supresores de tumores, pero escasa ligazón entre los conocimientos.

Podríamos decir que, en términos relativos, el conocimiento actual es

importante si bien parcelado. Como así lo señala M. Barbacid en el trabajo mencionado más arriba "el cáncer es un proceso que conlleva muchos escalones y probablemente es el resultado de la acumulación de una serie de errores genéticos y/o epigenéticos". Es por ello por lo que comienzan a hacerse necesario los trabajos que pongan en relación unos sucesos con otros.

Por esto motivo, no nos hemos de conformar hoy en día con conocer que en determinados procesos neoplásicos se producen cambios estructurales de determinados glicolípidos de las series ganglio, globo o lacto, o incluso de las glicoproteínas, con acumulación o no de sus sustancias precursoras y antígenos Lewis, o incluso neosíntesis de antígenos como el Forssman o los antígenos T o Tn (Ags de Thomas-Friedenreich) sino que debemos discernir si estas evidencias, cada vez mejor constatadas en numerosas neoplasias, pueden arrojar soluciones nuevas a problemas de siempre, e incluso se pudieran relacionar con otras alteraciones en un intento de conciliar diversas parcelas de nuestro saber.

En este sentido|podemos decir que en divesos países ya se han autorizado algunas investigaciones clínico-terapéuticas que tienen como fundamento básico la expresión de estos antígenos de neosíntesis, intentando encontrar una utilidad práctica a este conocimiento (Longenecker M. y Mitchell M. 1993)

Si bien distante de esa utilidad más inmediata, pero a nuestro entender no de menor interés, estimamos como relevantes los trabajos anteriormente

mencionados en cuanto a los modelos de adhesión celular que se están desarrollando o trabajos, por ejemplo, como los descritos también en la Introducción en los que se relaciona la presencia de determinados tipos de HPV con la pérdida de la *Tap*, proteína transportadora asociada con la presentación de antígenos¹⁴²⁾.

Dentro de nuestras posibilidades y limitaciones, y según iremos desarrollando en esta discusión, éste ha sido el espíritu que hemos querido marcar a nuestro trabajo, en un intento de investigar qué relaciones se podrían encontrar entre las ya supuestas alteraciones de la glicosilación de la membrana citoplásmica celular y la cada vez más convincente presencia de parte del genoma del virus HPV-16 en las neoplasias del cuello uterino.

4.2.- ANALISIS DE LA RELEVANCIA DE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS P53 Y PCNA EN DIVERSOS PROCESOS MALIGNOS Y SU RELACION CON LA PRESENCIA DE CIERTOS TIPOS DE VIRUS HPV.

Ya esbozamos en la Introducción de este trabajo gran parte del conocimiento que en nuestros días se tiene con respecto a una de las proteínas de la que se reconocen más alteraciones como consecuencia de las numerosas mutaciones evidenciadas en su gen, y a la que se le asigna un papel crucial en el control de la proliferación celular: La p53.

El gen de la p53 se incluye entre los genes denominados como "genes supresores de tumores". Se conoce que la pérdida de funciones de éstos genes se pueden deber como resultado de diversas mutaciones, y también, entre otras, por reordenamiento de cromosomas, nodisyunciones, o transformaciones genéticas.

A estas alteraciones se les ha sumado el hecho reconocido de que estos genes pueden ser neutralizados por ciertas proteínas celulares u oncoproteínas virales, lo que según se señala, representaría un importante paso en el estudio de la patogénesis, diagnóstico, pronóstico y terapéutica del cáncer humano (Harris C, 1993).

Siguiendo la revisión de Harris y Hollstein^{104b1}, recientemente se ha reconocido que la proteína p53 induce la transcripción de diferentes genes que

contienen una secuencia específica de DNA en ciertas regiones reguladoras (por ejemplo el gen *mdm-2*, el gen de la creatinquinasa muscular, y el GADD45) (Volgelstein, 1992), y tiene además un efecto opuesto sobre genes con la secuencia promotora TATA, común a gran número de genes de la transcripción¹²⁰⁹¹. Esta represión de la transcripción, se atribuiría a la capacidad de la proteína p53 de ligarse a un miembro esencial del complejo transcripción-iniciación. Una abundancia de proteína p53 inhibiría, mediante este u otros mecanismos desconocidos, la expresión de muchos genes que se consideran fundamentales para el control del crecimiento celular.

Se conoce también que tanto la expresión amplificada del oncogen *mdm-2* como la expresión de ciertas proteínas virales (antígeno T del virus SV40 o las proteínas codificadas por los genes E6 y E1b de ciertos tipos de virus HPV y adenovirus) pueden inactivar y reducir la actividad de p53, liberándose su efecto inhibitor sobre los genes comentados, lo que tendría como resultado un incremento de la proliferación celular.

Sobre estas bases teóricas, algunos autores han investigado desde unos supuestos fundamentalmente morfológicos, y gracias a las aplicaciones que brindan la inmunología y la biología molecular, el alcance práctico de estas evidencias, empleándolas como herramientas útiles al servicio del diagnóstico en un intento de extraer implicaciones pronósticas.

En este sentido han sido numerosos los trabajos realizados sobre dife-

rentes procesos neoplásicos, concluyéndose que el gen de la proteína p53 es el más frecuentemente mutado entre los carcinomas humanos^[159].

A estas neoplasias, se les pueden añadir también ciertas formas de carcinomas de cuello uterino negativas para el virus del papiloma humano^[45], lo que daría una mayor argumentación en favor de estos supuestos teóricos.

Algunos autores han explorado la posibilidad de estudiar diversos factores relacionados con la proliferación celular, como pudieran ser el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) cuya transcripción estaría en alguna medida regulada en sentido negativo, por la actividad de la proteína no mutada p53 (w-p53)^[35,90].

Así por ejemplo, estos autores han observado en las displasias de la mucosa esofágica que la expresión de PCNA en la capa suprabasal resulta ser un excelente marcador tanto en su sensibilidad como su especificidad, observándose tan sólo en las lesiones de displasia y pudiendo reconocer mediante su aplicación aquellas lesiones con un mayor potencial premaligno.

Considerados estos precedentes, nos ha parecido de gran interés complementar nuestro estudio de la presencia de parte del gen E6 del virus HPV-16, con los resultados derivados de la expresión de dos de los anticuerpos monoclonales que mejores resultados están dando en la actualidad para identificar mutaciones de la p53 y la proteína PCNA: NCL-p53-DO-7 y NCL-

PCNA-PC10. Con estos dos MoAbs, hemos identificado entre nuestros casos, al menos, una lesión que pudiera no estar relacionada con la presencia del virus HPV, en la que no amplificamos el intrón E6 del HPV-16 y que era positiva para p53 en un 40% de su celularidad. En el resto de los casos observamos un incremento de la proliferación celular, establecido mediante un índice de expresión de PCNA, que tendió a ser mayor con la presión de las lesiones, y máximo en los carcinomas invasores.

4.3.- ANALISIS DE LOS PROCEDIMIENTOS TECNICOS UTILIZADOS (MATERIAL Y METODOS).

En este apartado discutimos los procedimientos técnicos que hemos realizado, considerando tanto el tipo de fijador usado como los métodos de tinción, la valoración de los resultados, los anticuerpos monoclonales, lectinas y primers utilizados, y la técnica de PCR.

4.3.1. Fijación.

La utilización o no de un determinado fijador, así como el tiempo de acción del mismo resulta ser, en cierto sentido, una de las claves a tener en cuenta si se quiere llegar a conseguir unos resultados satisfactorios tanto desde el punto de vista inmunohistoquímico como de los derivados de ciertas técnicas de biología molecular.

Por razones de simplificación, en nuestro caso hemos decidido elegir un tipo de fijador que resultara aceptable tanto para la preservación de los componentes glicoconjugados de los tejidos, como eficaz en la preservación del DNA.

Hemos considerado como impracticable el posible empleo de cortes de congelación en criostato dadas las limitaciones que este método impone. Pese a que el empleo de cualquiera de los fijadores más utilizados condiciona, en mayor o menor medida, un empobrecimiento en la conservación de los distin-

tos determinantes antigénicos a observar, juega en su favor que se gana una mayor precisión de los detalles morfológicos en contra de una moderada pérdida de tinción.

Tampoco hemos de olvidar que el empleo obligado de los distintos agentes deshidratantes y aclarantes utilizados en el proceso de inclusión en parafina (alcoholes de diferentes gradación, xilol, toluol) también producen, sin lugar a duda, extracción de estos componentes glicolipídicos^[30].

No obstante, la casi totalidad de los trabajos referidos en la Introducción relacionados con el estudio de los determinantes antigénicos de grupos sanguíneos, empleando tanto lectinas como anticuerpos monoclonales, se trata de estudios retrospectivos de archivo con tejidos fijados convencionalmente con formaldehído e incluidos en parafina.^[20,60,151,263,272,273]

En pocos casos se realizó un control preciso de la fijación de los tejidos mediante diferentes fijadores y cuando esto se hizo, invariablemente se incluyó el empleo de líquido de Carnoy^[245], con el cuál los resultados parecen incrementarse.

Garin-Chesa utiliza en su estudio, además de tejidos procedentes de archivo, algunos casos de material congelado no fijado inicialmente y si después del corte, empleando acetona fría (4°C 10 minutos), formaldehído salido (3.7% en PBS, 10 minutos a temperatura ambiente) o 96% de etanol

(10 minutos a temperatura ambiente)^[91].

En nuestro caso, donde se sumó la particularidad de que a los mismos casos a los que practicamos las técnicas inmunohistoquímicas con MoAb y lectinas, realizamos también una técnica de biología molecular que precisaba *de una correcta preservación de DNA*.

Esta preservación del DNA procedente de tejidos fijados, no está exenta tampoco de sus limitaciones, y son numerosos los estudios realizados con el propósito de determinar la influencia de productos tan comúnmente utilizados como la acetona, formaldehído, líquidos de Carnoy, Zenker, Bouin, Zamboni, Clarke, B5, metacarn, etanol etc.

El principal inconveniente observado es el de que cualquiera de estos fijadores producen también, en mayor o menor medida, modificaciones del DNA o *cross-linking*, ya bien sea por el tipo de fijador usado o por la duración de la fijación. Estas modificaciones pueden condicionar invariablemente la *eficacia de la amplificación, reduciendo sus posibilidades*^[231b].

Las conclusiones a las que se ha llegado en los trabajos comentados han sido la de considerar que tanto el empleo de acetona como de formaldehído al 10% para la fijación de los tejidos, es aceptable para amplificar productos de hasta 1327bp. Este hecho se ve considerablemente reducido al prolongar el tiempo de fijación, y así por ejemplo, una fijación mantenida hasta 30 días con

formaldehído al 10% reduce las posibilidades de amplificación a productos de 268bp.

Los fijadores como el líquido de Carnoy, el Zenker, el Bouin y el B5, empleados durante 24 horas, se ha visto que comprometen considerablemente los resultados de las técnicas de la PCR, no siendo recomendable si se van a realizar estos estudios.

Otro de los inconvenientes que se añaden a los ya vistos, está el hecho de que también el DNA se degrada con el tiempo en aquellos tejidos conservados en parafina, lo que contribuye a limitar aún más la longitud de los productos que se vayan a amplificar. A este respecto se aceptan como válidas muestras archivadas con un tiempo máximo de 4 a 6 años, estimándose que en éstas se pueden realizar amplificaciones entre 100 y 200bp.

Dadas las consideraciones hechas hasta ahora, hemos tomado como criterio válido el de utilizar como fijador común, tanto para las técnicas de inmunohistoquímica como para las de PCR, el formaldehído al 10%. Además, el estudio retrospectivo que hemos realizado incluye casos de los años 1990 a 1992, no excediendo en 3 años el tiempo de conservación en parafina, y como nuestro ensayo de amplificación se limita a fragmentos pequeños de 109bp, entendemos que hemos trabajado dentro de unos márgenes de seguridad que nos llevar a considerar como satisfactorios los resultados obtenidos.

4.3.2. *Métodos de tinción.*

Los métodos inmunohistoquímicos que hemos seguido para la demostración de los determinantes antigénicos de los grupos histosanguíneos ABH y Lewis, así como para la demostración de las sustancias receptoras de las lectinas han sido los procedimientos indirectos basados en el sistema de la Avidina-Biotina.

En este método, una vez incubados los tejidos con el MoAb primario, se realiza un segundo paso de detección del primario mediante un anticuerpo biotinado específico para la inmunoglobulina de la misma especie animal que el primario, y un tercer paso donde se aplica el complejo AVI-BIO-PR. El revelado final lo hemos realizado con el cromógeno DAB (3,3'-diaminobencidina t.), dado que tiene como ventaja que la tinción que produce es permanente y resiste los baños en alcohol y xileno.

En el caso de la técnica para la demostración de los receptores de lectinas, éstas se utilizaron directamente biotinadas y no fue necesario el paso intermedio del anticuerpo secundario.

Mediante estos procedimientos, y dada la extensa red tridimensional que se forma, donde múltiples moléculas de PR biotinadas se entrelazan con las de Avidina, se produce un proceso de amplificación de señal en el que para cada unión antigénica del MoAb primario se establecen múltiples moléculas de

peroxidasa activas en el seno del complejo ABC, lo que contribuye a aumentar la sensibilidad de la técnica. Tiene como ventajas añadidas que, dado que es necesaria una menor concentración de MoAb primario y es menor la afinidad del complejo ABC por las estructuras tisulares, se reduce de forma considerable la tinción de fondo, que de producirse desvirtúa en cierta medida la tabulación.

En nuestro protocolo dejamos señalado en el apartado correspondiente del Material y Métodos, que hemos prolongado considerablemente el tiempo de incubación con el primario hasta 16-18 en nevera (4°C). Mediante este procedimiento hemos podido comprobar de forma personal un incremento considerable en la calidad de los resultados. Dicha incubación prolongada nos ha permitido también reducir a su vez la concentración del primario, lo cual tiene como ventaja añadida la de aumentar la sensibilidad de las técnicas practicadas.

En el caso de la determinación de las proteínas p53 y PCNA mediante los MoAb NCL-p53-DO-7 y NCL-PCNA-PC10 y dado que su tinción se localiza a nivel nuclear, hemos seguido una técnica basada en la Fosfatasa alcalina marcada con streptoavidina y revelando mediante 2Cl-1 Naftol Fast Red ITR.

Este procedimiento que proporciona unos resultados muy favorables, tiene el inconveniente de hacer obligado el montaje en medio acuoso y proporciona unas tinciones menos duraderas que el método anterior.

Ambos procedimientos constituyen métodos generales de inmunohistoquímica bien establecidos y comercializados por lo que, en nuestros días, los resultados son perfectamente reproducibles en cualquier laboratorio.

4.3.3. Técnicas de la PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa es un método desarrollado por Millus y colaboradores en 1985 que ha despertado en nuestros días un interés considerable tras la inclusión de enzimas termoestables y la automatización mediante el empleo de los termocicladores, ideándose día a día un número creciente de aplicaciones.

Esta técnica tiene un fundamento básico sencillo. Reproduce *in vitro* la replicación enzimática de los ácidos nucleicos dirigida por unos oligonucleótidos sintéticos o *primers*. Dichos *primers*, en número de dos y generalmente con una longitud entre 20 y 40 bases, localizan sus dos regiones complementarias del genoma, que pueden distar una de otra entre 80 a un millar de pares de bases. En una secuencia de tres pasos (calentamiento inicial de desnaturalización, *annealing* de los oligonucleótidos, y extensión de los *primers* o síntesis de DNA) que completan un ciclo de amplificación, se consiguen dos cadenas de nueva síntesis que servirán de plantilla para la síntesis de ciclos sucesivos. Estos tres pasos se suceden en el tiempo de forma precisa y programada e implican cambios distintos de temperatura en virtud de la cual se produce (1) la separación de la doble cadena del DNA, (2) hibridación de los *primers* que incluimos en el ensayo y que localizan las zonas de interés, (3) temperatura

óptima para que la Taq polimerasa active la síntesis. La sucesión automática de un número entre 30 y 40 ciclos dá como resultado, de estar presente la secuencia objetivo, una amplificación exponencial de la secuencia genómica buscada y que podremos con posterioridad identificar fácilmente mediante diversos procedimientos: Electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, o de forma más específica mediante hibridación utilizando sondas marcadas de forma radiactiva o mediante un procedimiento en "frio".

En el campo de la patología han venido aplicándose diversas técnicas de la biología molecular. En este sentido, se han desarrollado protocolos de hibridación *in situ* y de southern blot que han servido como poderosas herramientas experimentales¹⁰⁹. Si bien se puede decir, que estas dos técnicas son de una exquisita especificidad, sin embargo en ambas, la sensibilidad queda muy lejos de las posibilidades alcanzadas por la técnica de la PCR. En términos relativos se puede decir que la sensibilidad de la hibridación *in situ* sería de 10 blancos por célula, la del Southern blot de 1/100, y la de la PCR de 1 copia por cada 100.000 células¹¹⁰.

Esta técnica se está utilizando con carácter experimental en numerosas aplicaciones en los campos de la microbiología, inmunología, patología, o medicina forense y legal. Entre ellas podemos mencionar la detección de numerosos agentes infecciosos, de distintas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, translocaciones, genes relacionados con distintas enfermedades congénitas, tipaje de las moléculas de histocompatibilidad etc¹⁰⁴.

En cuanto a la identificación de la diversidad de tipos de HPV existentes, ya las técnicas de hibridación *in situ*, e hibridación en slot-blot habían contribuido a salvar el difícil obstáculo de no poder cultivar dichos virus y el desafortunado hecho de la imprecisa identificación inmunohistoquímica de los distintos antígenos virales^(92,154).

Junto a las técnicas comentadas la PCR ha venido a añadir un considerable incremento en cuanto a la sensibilidad arriba comentada, permitiendo en teoría, identificar entre un millón de células y después de 30 ciclos de amplificación del DNA una copia única de la secuencia objetivo.^(5b)

En la Introducción de este trabajo ya expusimos de forma detallada gran parte del conocimiento que se baraja en nuestro días con respecto a las implicaciones etiopatogénicas de los HPVs en relación con las lesiones preneoplásicas e invasoras del cuello uterino. Las aportaciones de la PCR en estos estudios han resultado considerables.

A los trabajos ya mencionados de Lörincz⁽¹⁶⁶⁾ donde se clasifican los distintos tipos de HPV en varios niveles de riesgo según razones estadísticas, y de distintos autores como Shibata⁽²⁵³⁾, o Cornelissen⁽³³⁾, se pueden sumar los de Bergeron y col.^(18b) 1992 en los que se establecen unos índices de detección mediante PCR de HPV 16 desde un 21 % en las lesiones intrapeteliales de bajo

grado hasta un 57% en las de alto grado. Para estos autores el HPV 18 se detectó globalmente en tan sólo un 3% de los CIN y los HPV 31,33 y 35 en un 8%. Los HPV 30,39,45, 52, 52,56,58 y 61 se encontraron en un 44% de las lesiones de bajo grado y en un 8% de los CIN de alto grado.

También Hording^[120b] en 1992 ha establecido, entre un total de 63 lesiones que iban desde los cambios morfológicos relacionados con infección por HPV hasta los carcinomas invasores, un índice de detección de HPV 16 mediante Southern blotting del 44% y mediante PCR del 73%.

Dada la "efervescente" actualidad de estos trabajos, a las citas mencionadas se podrían añadir un buen número de publicaciones más, y sin duda, en años próximos seguirán apareciendo otras que completarán en forma más precisa los índices que manejamos hoy en día.

En definitiva, se estima que los tipos de HPV 6b y 11 se asocian a lesiones benignas de verrugas anogenitales y LIE-BG (condilomas y CIN 1), mientras que los HPV 16 y 18 se encuentran entre el 60 al 80% de las LIE-AG (CIN 2 y 3). En cuanto a los carcinomas anogenitales invasores, los HPV 16 y 18 se detectan en más del 90%^[56,124,149,222]. Además hay autores que señalan *que esta práctica aportaría una considerable precisión a los convencionales estudios histopatológicos.*^[195,197]

En otro orden de cosas y según se hacen eco todas las obras que hemos

consultado^[110,231,128], incluidas ciertas publicaciones^[154b] relacionadas con esta técnica, está el riesgo no desdeñable de que se pueden interpretar resultados como positivos o negativos que en realidad no son tales (falsos positivos y falsos negativos). Este desagradable hecho, consecuencia de la extremada sensibilidad de la técnica, puede deberse a múltiples causas perfectamente reconocidas, por lo que se exige un cuidado minucioso en la preparación de todos los ensayos que se piensen realizar.

Tanto la contaminación de la muestra con cualquier fragmento de DNA extraño a la misma, como las numerosas sustancias que pueden inhibir la polimerasa, o hasta la omisión de algunos de los componentes de la reacción pueden dar como resultado hallazgos equívocos.

Para evitar estos hechos hemos tomado ciertas precauciones reconocidas como esenciales si se quiere evitar la contaminación (además de las ya apuntadas en apartados anteriores con respecto al corte de las muestras en parafina): Preparar las muestras en un sitio diferente al de la amplificación. Pasar por el autoclave todas las pipetas y tubos de microcentrífugas. Realizar alicuotas para los reactivos y almacenarlos en un lugar libre de productos amplificados. Emplear en todo momento guantes desechables. Evitar salpicaduras de las muestras cuando se abren y cierran los tubos. Hacer una premezcla de los reactivos y dividirla en alicuotas. Incluir un control negativo sin muestra de DNA. Añadir el DNA al final y después de la mezcla de los reactivos, y elegir controles positivos^[154b]. Además podemos añadir que tanto el termociclador,

como el aparato de dot-blotting y la cámara de hibridación que hemos empleado nunca habían sido utilizados con anterioridad para amplificar e hibridar ningún tipo de HPV.

Una práctica particularmente extendida cuando se trabaja amplificando secuencias de ciertos microorganismos, es la de amplificar las mismas muestras de forma paralela para secuencias conocidas del genoma humano, generalmente con *primers* específicos para β -globina. Con esta ensayo es posible descartar los falsos negativos al confirmarse que la muestra es perfectamente amplificable supuestos otros condicionantes perfectamente preestablecidos.

En nuestras circunstancias no nos ha sido posible practicar dicho test a la totalidad de las muestras, aunque como alternativa sí hemos llevado a cabo un ensayo tomando varias muestras de forma aleatoria para amplificar parte del gen HLA-DR que codifica la molécula de la cadena β . Test que nos dió unos resultados similares a los acostumbradamente observados en el laboratorio donde practicamos el ensayo, por lo que estimamos que la extracción del DNA y todas nuestras muestras, que tenían una misma procedencia y habían seguido un tratamiento similar, eran perfectamente válidas para nuestro objetivo de amplificación.

Otra de las desventajas que la técnica de la PCR condiciona, sobre todo en nuestro campo de la patología esencialmente morfológica, es el de que me-

diante este procedimiento se pierde sustancialmente la interpretación de toda aquella información derivada de la arquitectura de los tejidos. Las técnicas de hibridación *in situ*, bien desarrolladas en el campo del diagnóstico de distintos procesos ginecológicos, obvian esta desventaja resultándonos una difícil disyuntiva elegir uno u otro procedimiento cuando nos planteamos este trabajo.

La aplicación de las técnicas de PCR sobre tejidos *in situ*, pese al enorme interés que implica su consecución y las numerosas tentativas que están realizando algunos autores al respecto, adolece por el momento de dificultades insalvables. El hecho de tener que trabajar con temperaturas cíclicas muy altas y la imposibilidad de fijar los productos amplificados a las estructuras fuente, parecen estar constituyendo las dos limitaciones más decisivas.

No obstante, y dado el hecho de que es posible vislumbrar que en un futuro no muy lejano estos inconvenientes puedan ser superados, y ya que la sensibilidad que otorga es inmejorable, nos han parecido éstas suficientes razones para practicar la técnica de la PCR en nuestro estudio en detrimento de los ensayos de hibridaciones *in situ*. Pese a que éstos se complementarían perfectamente con los estudios inmunohistoquímicos que hemos realizado.

Aún así, a la vista de los estudios estadísticos que hemos realizado, hemos podido perder una importante información morfológica en razón de un considerable incremento de sensibilidad. Hecho que podría ser superado en el futuro de ser practicable la PCR *in situ*.

4.3.4. *Valoración de los resultados.*

Como ya hemos comentado en apartados previos, hemos advertido algunas diferencias en cuanto a la intensidad, regularidad de las tinciones y tinción de fondo, entre los resultados obtenidos con los distintos anticuerpos monoclonales específicos para los determinantes antigénicos histo-sanguíneos ABH y Lewis, y los resultados con las cuatro lectinas UEA-I, DBA, SJA y LTA.

Sin embargo, los patrones de tinción resultaron complementarios y con reactividades uniformes. En el caso de los MoAb apenas hemos apreciado diferencias de intensidades entre las células negativas y positivas, por lo que hemos considerado suficiente distinguir en nuestra tabulación este hecho. No obstante nos ha resultado obligado, dada la particularidad de los epitelios pavimentosos observados, establecer la localización de la tinción. A este respecto hemos considerado las distintas particularidades de la histología normal del exocervix y sus lesiones asociadas, identificando en dichos epitelios varios estratos: El basal, intermedio y superficial^[108].

La tabulación que hemos realizado se ha basado, en consecuencia, tanto en la presencia o ausencia de reactividad, como en la localización de la tinción. Dicha localización la hemos identificado en la forma de caracteres gráficos según quedó expuesto ya en el Material y Métodos.

Somos concientes, no obstante, de que este sistema adolece en cierto

modo de excesiva simplicidad dado que no considera la intensidad de la tinción, ni establece de forma porcentual la celularidad teñida. Pese a ello, este sistema de valoración de resultados lo hemos considerado suficiente y justificado en razón de un mayor incremento de objetividad y de una necesaria simplificación que pudiera adecuarse a un posterior estudio estadístico. El incremento de determinadas subcategorías dentro de una misma variable iría en perjuicio de una conveniente representatividad de la muestra del estudio, de por sí ya limitada.

Sí consideramos justificados los criterios de tabulación establecidos por autores como Alvarez y Carretero^{13,301} cuando se emplean en forma exclusiva las lectinas. En su método sí se considera tanto la presencia o no de reactividad, como la intensidad de la misma y establece además una estimación porcentual del número de células positivas dentro de un determinado grupo observado.

En nuestro casos, y dada la mayor precisión que establece el empleo de los MoAb junto a las razones expuestas más arriba, no hemos considerado necesario este sistema, si bien, nos ha resultado de bastante utilidad en la tabulación de los anticuerpos específicos de la proliferación celular. En este caso, sí precisábamos incluir una valoración, aunque subjetiva, del número de elementos reactivos, índice obligado para establecer las diferencias existentes entre las distintas lesiones incluidas en el estudio. Pese a que autores como Coltrera 1992, en sus trabajos con los mismos marcadores sobre displasias esofágicas sigue un sistema mucho más simplificado valorando tan sólo la

reactividad suprabasal o ausencia de la misma^[95].

Merece mención aparte la discusión de los procedimientos metodológicos de la PCR. Añadiendo a lo ya comentado en el apartado precedente, nosotros hemos practicado un ensayo de *dot blotting*, utilizando una sonda específica marcada con digoxigenina, para reconocer una secuencia de 40bp localizada entre los oligonucleótidos empleados para la amplificación.

Con la totalidad de los casos, una parte de la muestra amplificada la utilizamos para realizar un reconocimiento del producto mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% y visualización con bromuro de etidio y luz UV. El resto de la muestra se hibridó con una sonda específica marcada, fue revelada por quimoluminiscencia incubando con AMPPD y autorradiografiada.

El procedimiento de *dot blotting* tiene la ventaja sobre la detección del producto mediante electroforesis de que la muestra queda concentrada sobre un área limitada de las membranas de nylon, lo que permite trabajar con posterioridad sobre ella y realizar los ensayos de hibridación específica. Esto le confiere no sólo más fiabilidad sino también más sensibilidad a la hora de determinar los productos amplificados.

Nosotros hemos añadido, en el momento de interpretar los resultados procedentes de las distintas autorradiografías, un procedimiento objetivo de valoración. Dichas autorradiografías fueron digitalizadas mediante *scanner* y

procesadas informáticamente.

Mediante un programa de análisis de imágenes radiográficas (*AnaRay-X*), establecimos las diferentes curvas de las señales de hibridación-revelado en base a sus distintas intensidades de grises.

Entre los casos autografiados se incluyó una fila de casos de optimización y control, con dos variedades de amplificación (60° de annealing y 30 ciclos, 55° grados de annealing y 35 ciclos) y distintas concentraciones del DNA de las muestras (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Con esta fila establecimos el nivel mínimo de positividad. La totalidad de las muestras las homogeneizamos a una concentración de DNA de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Este procedimiento nos ha facilitado considerablemente la interpretación de los resultados dado que hemos tenido hibridaciones, en las que sin haber tinción de fondo, se podía detectar señal. Eso puede interpretarse como resultado de que en éstas muestras, si bien se había producido amplificación de cierto producto, la hibridación con la sonda específica utilizada no era completa, y por lo tanto el objetivo determinado no era el buscado. Contamos también con varios casos que resultaron "blancos" -no hibridación- y en otros, la señal apenas era imperceptible.

4.4.- ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LOS DETERMINANTES DE ISOANTIGENOS DE GRUPO SANGUINEO ABH Y LEWIS EN LAS ESTRUCTURAS NORMALES, PRENEOPLASICAS Y NEOPLASICAS DEL CUELLO UTERINO.

En base a los resultados globales ya expuestos en los apartados 3.1 y 3.2, resumizados en las TABLAS XIV y XV, hemos establecido las correspondientes tablas de contingencia con la intención de aplicar los test de la Chi-cuadrada de Pearson, y prueba exacta de Fisher cuando la muestra era representativa, comparando los disitintos caracteres cualitativos observados: (tablas 2x2) Epitelios pavimentosos, epitelios simples de las hendiduras endocervicales, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado, y carcinomas invasores.

Para la realización de los mencionados cálculos estadísticos nos hemos auxiliado del programa informático RSigma (Horus Hardware 1990).

De la totalidad de los cálculos realizados se desprenden, como hallazgos más relevantes, concernientes con los estudios comparativos de la glicosilación realizados, que existen diferencias significativas en cuanto a la **expresión del antígeno de grupo sanguíneo Le^x** cuando comparamos los *epitelios pavimentosos* y los *carcinomas invasores* ($p < 0.01$).

Diferencias que se repitieron significativas cuando se comparó la expresión de **Le^x** entre los *epitelios simples pseudoglandulares* y las *neoplasias invasoras* ($p < 0.01$).

Al comparar estos dos mismos epitelios para la **expresión del antígeno Le^a**, también se observaron diferencias, aunque en este caso con un nivel de significación menor ($p < 0.1$).

Hubo además, diferencias casi significativas en la **expresión del determinante isoantigénico de grupo B** cuando comparamos los *epitelios pavimentosos* con las *LIE-BG* ($p < 0.1$), en razón de la observación hecha de expresiones aberrantes, las cuales se hicieron más evidentes al comparar los *epitelios simples de las hendiduras endocervicales* y los *carcinomas invasores* ($p < 0.01$).

Tenemos que destacar esta hallazgo como particularmente singular y que, según refieren algunos autores se ha observado tan sólo en tejidos de cánceres pancreáticos (Pour y col. 1988)⁽²¹⁷⁾.

Si bien, alguno de nuestros casos donde encontramos una expresión positiva para BG3 podría tratarse de una paciente erróneamente tipada como A que fuera AB (nº 2-3 carcinomas invasores con expresión B endotelial débil), el resto de las expresiones tumorales incompatibles de BG3 se tratarían de verdaderas expresiones aberrantes de difícil explicación a nivel molecular⁽¹³⁰⁾.

El mencionado hecho de las expresiones antigénicas incompatibles se ha observado tanto en los sistemas de grupo sanguíneo ABO, como P y Forssman. Con mayor frecuencia, se han descrito expresiones incompatibles del antígeno A-like en individuos O o B tanto en lesiones no malignas (como la úlcera péptica, por ejemplo) como en neoplasias invasoras (entre el 10 y el 15% de los tumores)⁽¹³¹⁾, habiéndose identificado la mayoría de éstas como reacciones cruzadas con el antígeno Tn⁽¹³⁰⁾.

Aplicando la prueba exacta de Fisher observamos diferencias casi significativas ($p < 0.1$) al comparar los *epitelios pavimentosos* y los *carcinomas invasores* en cuanto a la expresión de Le^a ($p=0.071604$) Le^b ($p=0.064278$), **grupo A** ($p=0.0946$) y entre el *epitelio simple* y *carcinomas invasores* en la expresión del Le^a ($p=0.02845$).

El conjunto de estos hallazgos parece estar en consonancia con las observaciones hechas en cuanto a la pérdida de expresión de los antígenos de grupo sanguíneo ABH o las cadenas monofucosiladas Le^a y Le^x , que se asociaría con un comportamiento de los tumores más agresivo en cánceres tanto de la vejiga, como del cuello uterino, colon, o de la cabeza y cuello^(158,201).

En cuanto a las **cadena precursoras T1-CH y la cadena H** observamos diferencias de expresión entre los *epitelios pavimentosos* y los *simples*, muy significativas cuando se trata del primer antígeno ($p < 0.001$) y casi significativas para el segundo ($p < 0.1$). Ya indicamos que esta expresión estaba localizada de forma principal en los cilios de algunas de las células de las hendiduras pseudo-glandulares.

Se hace obligado destacar que el análisis que hemos realizado, y que queda expuesto hasta este punto, se deriva exclusivamente de los valores establecidos de forma global, habiendo considerado tan sólo la expresión o falta de expresión de los distintos antígenos. Dicho análisis no ha tenido en cuenta los cambios de patrón que se pueden observar en la mayoría de los

casos, con lo que quremos hacer ver que aún, sin entrar en estas implicaciones de carácter más detallado, y estableciendo un criterio, aunque simplista, riguroso, se encuentran diferencias con significación estadística para antígenos como el Le^x, Le^a y del grupo B. En la FIGURA 3 se representan de forma gráfica estos resultados.

Al analizar los cambios ocasionados en los patrones de expresión de los distintos antígenos, evaluación aún más subjetiva que la anterior, nos encontramos con que hemos observado cambios relevantes en dichos patrones. Aunque sin razones estadísticas, podemos decir que no es difícil apreciar cambios en estos patrones de expresión. Cambios que hemos catalogado con el apelativo de heterogéneos, en cuanto que no era inextricable comprobar pérdidas de tinción entre un grupo de células en determinados campos de las distintas lesiones. En algunas ocasiones estos cambios resultaban extremadamente evidentes, observándose cortes bruscos en la expresión, que delimitaban zonas con tinciones regulares y zonas con pérdida completa en la expresión de dichos antígenos.

Además, uno de los antígenos, el Le^y, mostró invariablemente un incremento en su expresión, más evidente en las lesiones de alto grado y en los carcinomas invasores, y sobre todo si nos atenemos a los patrones de dicha expresión. Este mismo hallazgo fue observado en tumores de otras localizaciones⁽²⁾, y Orntoft y col. asocia las pérdidas de expresión de los determinantes antigénicos A y B con los procesos de fucosilación y acumulación de cadenas

precursoras fucosiladas⁽²²⁰⁾. La falta de actividad de la tranferasa A condicionaría una acumulación de su cadena precursora, el antígeno H, que en los tejidos tumorales podría ser fucosilado formando las cadenas difucosiladas tipo 1 (Le^b) y tipo 2 (Le^y).

En cuanto a los receptores de las lectinas, hemos encontrado para la **UEA-I** diferencias casi significativas ($p < 0.1$) entre la expresión del *epitelio simple* y las *LIE-AG*, y entre las *LIE-BG* y *LIE-AG*.

Con respecto a la expresión de la lectina **DBA** hemos visto también cambios casi significativos entre el *epitelio pavimentoso* y los *carcinomas invasores*, y entre las *LIE-AG* y los *Carcinomas invasores* ($p < 0.1$).

Estas dos lectinas tienen una especificidad de grupo sanguíneo para O(H) y A1 > A2 respectivamente. Al considerar los hallazgos obtenidos mediante la utilización del MoAb BG2 específico para un epítipo de grupo A (cadenas tipo 1 y 2) y la lectina DBA observamos, en razón del análisis estadístico efectuado, que hay una perfecta concordancia de resultados entre ambos procedimientos.

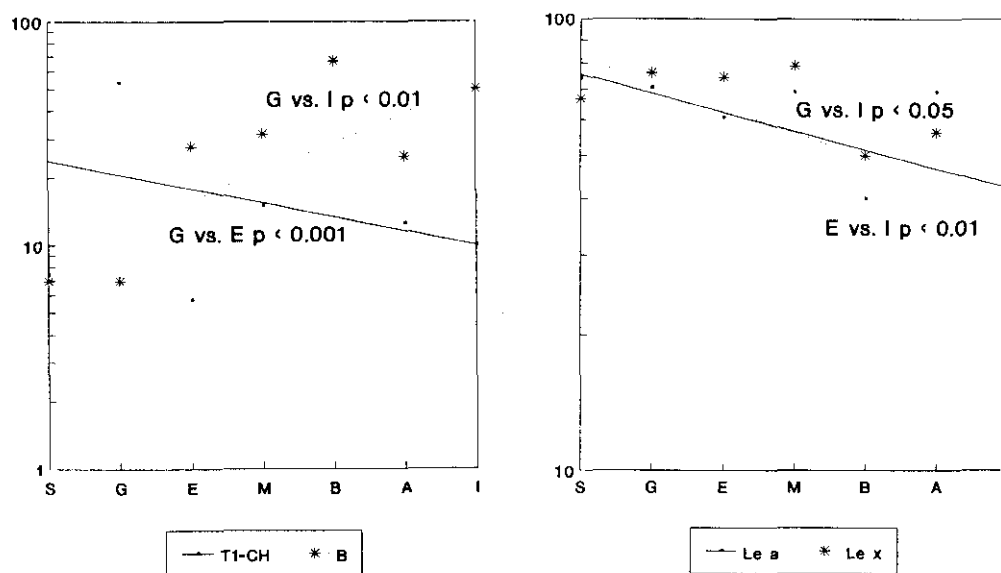
También la lectina SJA (ver figura de la TABLA XVI pg. 115) refleja un aumento de expresión para sus receptores que se incrementa en las neoplasias invasoras. Dicha lectina tiene una especificidad para B > A > O(H) y se correspondería con los hallazgos para el MoAb BG 3 específico para el grupo sanguíneo B (cadenas tipo 2).

En la FIGURA 4 se representan los hallazgos principales de los distintos caracteres cualitativos de la expresión de los receptores de lectinas.

De lo expuesto hasta el momento se desprende el hecho de que las mayores diferencias que podemos ver, en cuanto a la expresión de los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos ABG o Lewis, se establecen entre los dos extremos supuestos, esto es: entre los epitelios normales y las lesiones invasoras.

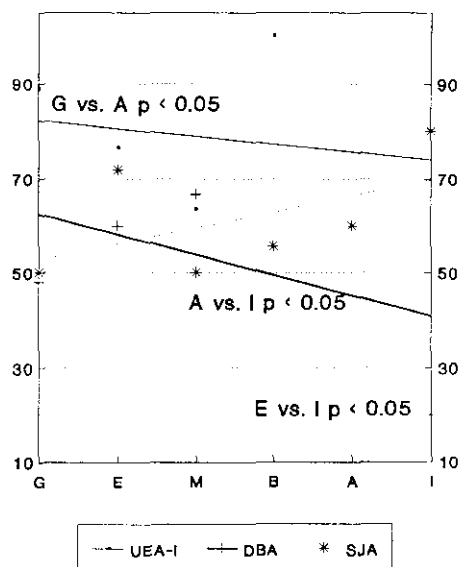
De forma particular resulta característico que el mayor nivel de significación lo hallamos observado en la expresión del antígeno Le^x ($p < 0.01$). Según expusimos en el Apartado 4.1, la estructura antigénica SialilLe^x, representa un importante ligando para ciertas moléculas de adhesión células, entre las que se han señalado a las selectinas. La pérdida de expresión de Le^x, que interpretamos como relevante, podría jugar algún papel en el comportamiento invasivo de estas neoplasias.

FIGURA 3. RELACIONES DE DEPENDENCIA E INDEPENDENCIA ENTRE LOS DISTINTOS CARACTERES CUALITATIVOS DE LA EXPRESION DE LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS DE LOS GRUPOS SANGUINEOS ABH Y LEWIS



S.- Epitelio simple, G.- Epitelio de las hendiduras endocervicales, E.- Epitelio pavimentoso, M.- Areas de metaplasia madura, B.- LIE-BG, A.- LIE-AG, I.- Carcinomas invasores.

FIGURA 4. RELACIONES DE DEPENDENCIA E INDEPENDENCIA ENTRE LOS DISTINTOS CARACTERES CUALITATIVOS DE LA EXPRESION DE LOS RECEPTORES DE LECTINAS.



S.- Epitelio simple, G.- Epitelio de las hendiduras endocervicales, E.- Epitelio pavimentoso, M.- Areas de metaplasia madura, B.- LIE-BG, A.- LIE-AG, I.- Carcinomas invasores.

Expresión del antígeno de grupo sanguíneo Le^x.

Epitelios pavimentosos vs. carcinomas invasores:

Chi² = 7.5782 sin corregir 9.7509
 $p < 0.01$ $p = 0.0059$,
 Coeficiente de asociación $v = 0.4655$,
 Razón de predominio = 11.5556,
 Error estándar = 10.17,
 Prueba exacta de Fisher pr. de la tabla = 0.0028805.
 Y rechazo en la realización de la Prueba de la diferencia de la tasa $3.123 > 1.96$.

Epitelios simples pseudoglandulares vs. carcinomas invasores:

$p < 0.01$ $p = 0.005884$,
 Coeficiente de asociación $v = 0.50138$.

Expresión del antígeno Le^a.

Epitelios simples pseudoglandulares vs. carcinomas invasores:

$p < 0.1$ $p = 0.065152$,
 Coeficiente de asociación $v = 0.36516$,
 Razón de predominio = 5.5417,
 Error estándar = 4.481.

Expresión del antígeno B.*Epitelios pavimentosos vs. LIE-BG:*

$p < 0.1$ $p = 0.073347$,
 Coeficiente de asociación $v = 0.32497$,
 Razón de predominio = 0.19231,
 Error estándar = 0.15366

Epitelios simples de las hendiduras endocervicales vs. Carcinomas invasores.

$p < 0.01$
 Prueba exacta de Fisher pr. de la tabla = 0.0066519.

Expresión de las cadenas precursoras T1-CH.*Epitelios pavimentosos vs. Epitelios simples de las hendiduras endocervicales:*

$p < 0.001$ $p = 0.00006359$,
 Prueba exacta de Fisher pr. de la tabla = 0.00001737.

Expresión de la cadena H.*Epitelios pavimentosos vs. Epitelios simples de las hendiduras endocervicales:*

$p < 0.1$ $p = 0.091692$,
 Prueba exacta de Fisher pr. de la tabla = 0.033445.

Expresión de los receptores de lectinas UEA-I*Epitelios simples de las hendiduras endocervicales vs. LIE-AG*

$p < 0.1$ $p = 0.072835$.
 Prueba exacta de Fisher pr. de la tabla = 0.0328

LIE-BG vs. LIE-AG

Prueba exacta de Fisher pr. de la tabla = 0.03718

Expresión de los receptores de lectinas DBA*Epitelios pavimentosos vs. carcinomas invasores*

$p < 0.1$ $p = 0.06107$,
 Prueba exacta de Fisher p. de la tabla = 0.02536

LIE-AG vs. carcinomas invasores

Prueba exacta de Fisher pr. de la tabla = 0.050528.

4.5.- ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS P53 Y PCNA Y DE LA AMPLIFICACION DE UNA PARTE DEL INTRON E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO-16 EN LAS LESIONES INTRAEPITELIALES E INVASORAS DEL CUELLO UTERINO.

Finalmente nos queda por discutir los resultados obtenidos de los estudios tanto inmunohistoquímicos, en los que determinamos la expresión de las proteínas P53 y PCNA, como de las pruebas moleculares con las que detectamos parte del intron E6 del HPV-16.

La PCNA, como ya quedó expuesto en la introducción, se trata de un antígeno nuclear relacionado con la proliferación celular. El empleo de determinados MoAb específicos para este antígeno, entre los que se incluye el clon PC-10 que nosotros hemos utilizado, ha permitido su utilización como marcador de proliferación habiéndose experimentado en distintos carcinomas epidermoides y lesiones premalignas⁽³⁵⁾.

De los resultados expuestos en las TABLA XVII y TABLAS XI_(A) a XIII_(A) hemos observado un aumento progresivo en las medias de los índices de proliferación: LIE-BG 14.7%, LIE-AG 60.35%, CARCINOMAS INVASORES 85%, con diferencias muy significativas cuando comparamos las distintas medias de dichas lesiones ($p < 0.001$).

En relación con la PCNA, se ha postulado que resulta necesaria una eventual alteración del gen supresor de tumores p53. La proteína nativa w-p53

se encuentra en todas las células, si bien a unos niveles muy bajos, indetectables mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, cuando se producen mutaciones de p53, sí se puede entonces detectar esta proteína mediante inmunohistoquímica dado que se produce sobreexpresión del producto mutado.

Como ya dijimos antes, se han detectado mutaciones de p53 en un 45% de los carcinomas de mama, 68% de los adenocarcinomas de colon, y 80% de los carcinomas epidermoides.

Entre nuestros casos no hemos encontrado sobreexpresión de p53 (DO-7) más que en una única lesión incluida entre las neoplasias invasoras. Hemos repetido dos veces esta técnica inmunohistoquímica para determinar la p53 confirmando los hallazgos obtenidos.

Nuestros resultados están en consonancia con lo esperado. Según expusimos en la introducción, tanto las lesiones preneoplásicas como invasoras del cuello uterino estarían influidas por la acción de determinadas proteínas oncovirales que degradarían la p53, liberando su efecto inhibitor. Por lo que no hay mutaciones de, p53 ni sobreexpresión.

Mediante las técnicas de PCR hemos establecido un índice de detección de parte del intro E6 del HPV-16 del 60% (7/10 LIE-BG, 7/15 LIE-AG, y 7/10 Carcinomas invasores). Este índice, establecido en nuestro caso de forma objetiva y mediante un método muy restrictivo, estaría próximo a los hallazgos

de otros autores^[120b,18b](Hording 1992, Bergeron 1992).

De los 14 casos negativos para el gen E6 del HPV-16 (TABLA XV_(A)), 3 no dieron ninguna señal en la hibridación (Un adenocarcinoma, y 2 LIE-AG). El resto, 11 casos, dieron señales de hibridación variables sin llegar al nivel positivo establecido. Estas 11 lesiones, con señales de hibridación cruzadas e inespecíficas, podrían estar también relacionadas con la presencia de ciertos tipos de HPVs, si bien distintos del tipo 16.

No obstante, hemos observado más casos positivos entre las LIE-BG y menos casos positivos de los esperados entre las LIE-AG. El primer supuesto puede explicarse dado que se trata de lesiones extensas y que además algunas de ellas fueron seleccionadas entre distintas pacientes que presentaban lesiones aún más avanzadas. En cuanto a las LIE-AG, si bien se ha establecido que es incluso posible detectar la presencia de los virus HPV en los epitelios normales adyacentes a las zonas de displasia y de los carcinomas invasores^[34], pensamos que el menor número de casos detectados con respecto a los esperados se puede deber a que dicha técnica la practicamos después de los estudios inmunohistoquímicos habiéndose quedado agotadas las lesiones para la extracción del DNA.

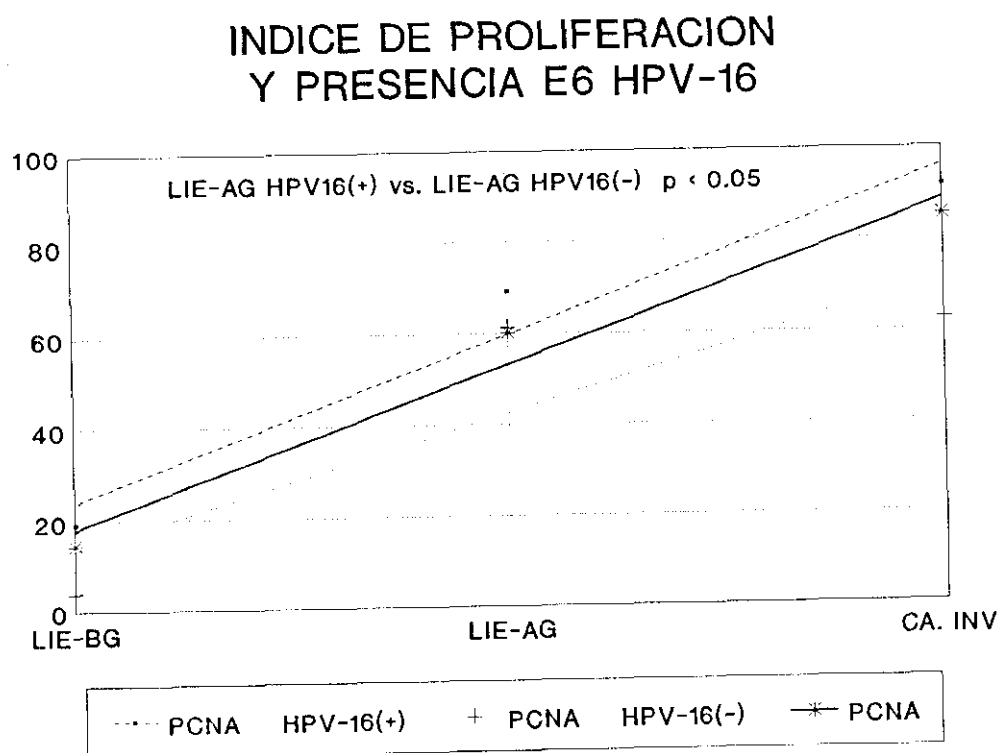
En virtud de nuestros resultados para la expresión de PCNA y la detección de parte del intron E6 del HPV-16 hemos podido determinar diferencias significativas al comparar las medias de los índices de proliferación

entre los casos de las LIE-AG positivas para el HPV-16 (PCNA 69.16%) y las LIE-AG negativas para el HPV-16 (PCNA 61.428) ($p < 0.05$ $p = 0.0116931$).

En la FIGURA 5 presentamos una gráfica en la que se refleja el incremento del índice de proliferación, en base a la expresión de PCNA, en las distintas lesiones, y las diferencias en cuanto a la detección o no del HPV-16.

Por último, no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la expresión de los antígenos Le^x, Le^a, Le^b, grupo A y B en relación con la detección del virus HPV-16, por lo que desestimamos la hipótesis de trabajo inicialmente expuesta en la Introducción, estableciendo que ambas variables resultan ser independientes.

FIGURA 5.



RESUMEN Y CONCLUSIONES

5.1.- RESUMEN.

Para comparar los patrones de expresión de los determinantes isoantigénicos de los grupos histosanguíneos ABH y Lewis entre los epitelios pavimentosos y simples, y las lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino hemos seleccionado un total de 36 lesiones (10 Lesiones intraepiteliales de bajo grado, 16 de alto grado y 10 carcinomas invasores) y practicado diversas técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos monoclonales (BG1 a BG8 Ortho Diagnostic, Cambridge, Mass. USA) y cuatro tipo de lectinas (*Ulex Europaeus Agglutinin I*, *Sophora Japonica Agglutinin*, - Lab. Vector - *Dolichos Biflorus* y *Tetragonolobus purpureas* - Lab. Sigma -. Además sobre estos mismos casos hemos estudiado, también mediante inmunohistoquímica, la expresión de las proteínas p53 y PCNA (Clones DO-7 y PC-10, Lab. Novocastra, UK) estableciendo el índice de proliferación de cada lesión, y determinamos mediante la técnica de la PCR la detección de parte del intrón del gen E6 del HPV-16 (Shibata 1988).

En cuanto a los hallazgos, hemos observado en los epitelios tanto pavimentosos como simples del cuello uterino una expresión polimorfa, generalmente en coincidencia con el fenotipo sanguíneo, de los determinantes isoantigénicos de grupo histo-sanguíneo ABH.

En los mismos casos, los antígenos de grupos Lewis se expresaron de forma menos polimorfa, comprometiendo los dos tercios superiores de los epitelios pavimentosos, por encima de la hilera basal.

En las distintas lesiones estudiadas, y en relación con la progresión de las mismas, observamos cambios en los patrones de expresión de los antígenos de los grupos sanguíneos ABH y Lewis, con tendencia a encontrarnos pérdidas de expresión focales y patrones heterogéneos en las lesiones más avanzadas, así como sobreexpresión del antígeno Le^y.

En los carcinomas invasores del cuello uterino hemos observado una pérdida de expresión del antígeno de grupo sanguíneo Le^x con respecto a los epitelios pavimentosos normales, con un nivel de significación $p < 0.01$.

Entre los carcinomas invasores del cuello uterino y los epitelios simples hay diferencias significativas en la expresión del antígeno de grupo sanguíneo B, ($p < 0.01$). Expresión de grupo B que resultó incompatible con el fenotipo de las pacientes en 4 de 10 carcinomas invasores (2 de grupo A y 2 grupo B).

Al comparar la expresión de los los antígenos Le^a, Le^b, y grupo sanguíneo A, en los epitelios pavimentosos y los carcinomas invasores, encontramos diferencias casi significativas, ($p < 0.1$ (Prueba exacta de Fisher)).

Los antígenos Lewis en las LIE-BG y LIE-AG tendieron a desplazar su expresión a las capas superiores de los epitelios pavimentosos.

En las células ciliadas del epitelio simple de las hendiduras endocervicales se observó una expresión focal de las cadenas precursoras T1-CH con un nivel alto de significación ($p < 0.001$), en comparación con la expresión de este

mismo antígeno en el epitelio pavimentoso.

Mediante la determinación de la expresión de la proteína PCNA establecimos un índice de proliferación que tendió a ser mayor en relación con la progresión de las lesiones ($p < 0.001$)

El índice proliferación para las LIE-AG en las que se detectó parte del gen E6 HPV-16 fue mayor que en las mismas lesiones donde no se detectó éste ($p < 0.05$).

Con el MoAb DO-7 para p53 encontramos entre los carcinomas invasores un único caso positivo para esta proteína. De forma característica, esta neoplasia tenía un menor índice de proliferación que el resto de los carcinomas y resultó ser negativa para el virus HPV-16.

Mediante la técnica de la PCR identificamos 7 casos positivos para el gen del intrón E6 del HPV-16 de 10 LIE-BG, 7 de 15 LIE-AG, y 7 de 10 carcinomas invasores (60% como índice de detección del HPV-16).

La presencia de parte del gen E6 del HPV-16 resultó ser una variable independiente de los cambios producidos en la glicosilación de la membrana celular de las lesiones intraepiteliales e invasoras del cuello uterino.

5.2.- CONCLUSIONES.

1ª.- No hemos observado diferencias en cuanto a la expresión de los determinantes isoantigénicos de grupo sanguíneo ABH y Lewis entre los epitelios pavimentosos y las áreas de metaplasia madura.

2ª.- En las lesiones intraepiteliales escamosas de diferentes grados, se producen modificaciones de la glicosilación normal consistentes en: Pérdidas focales y patrones heterogéneos de los determinantes antigénicos A, Le^a, Le^b y Le^x. Por tratarse de observaciones localizadas y subjetivas no hemos establecido su significación estadística, pero sugieren prolongar la investigación en este sentido.

3ª.- Los carcinomas epidermoides del cuello uterino presentan alteraciones de la glicosilación consistentes en: Pérdida de expresión del antígeno Le^x ($p < 0.01$), y de los antígenos A, Le^a y Le^b ($p < 0.1$ Prueba exacta de Fisher), y sobreexpresión del antígeno Le^y.

Esta observación inmunohistoquímica se traduciría como una falta de actividad de las correspondientes glicosiltransferasas específicas. La falta de actividad de la transferasa A confirmaría el hecho, ya adelantado por algunos autores, de que se ocasionaría una acumulación de cadenas H que en los tejidos tumorales podrían ser fucosiladas formando estructuras con especificidad para Le^y.

4ª.- En los carcinomas epidermoides del cuello uterino nos hemos encontrado con expresiones de grupo sanguíneo B incompatibles en pacientes de grupo A y O (40%) a las que es difícil dar una explicación a nivel molecular.

Pese a que deberían descartarse eventuales reacciones cruzadas con otros antígenos, los resultados derivados de la utilización de la lectina *Shophora Japonica Agglutinin* con especificidad para el grupo B > A > O(H) corroborarían este hallazgo como verdadero.

5ª.- En ciertas lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, la detección de parte del intro E6 del HPV-16 determina un mayor índice de proliferación celular ($p < 0.05$) con respecto a las que no se detecta éste.

El gen E6 presente en las LIE-AG podría originar una proteína específica que influyera sobre la maquinaria de la transcripción celular que condicionara un incremento en su proliferación celular.

6ª.- De los estudios realizados en cuanto a la glicosilación y a la detección de parte del intrón del gen E6 del HPV-16 en las distintas lesiones intraepiteliales escamosas y carcinomas epidermoides del cuello uterino, no hemos podido establecer relación de dependencia alguna entre ambos fenómenos.

ME REUNÍ EN EL DIA DE HOY LA COMISIÓN DE LA...

... de estudios demográficos...

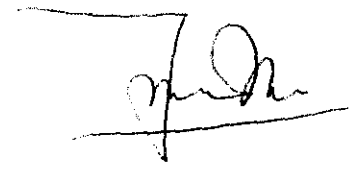
... para el estudio del espíritu; ... del mundo
... y ...
... José Escobedo

M.º Sr. Fernández

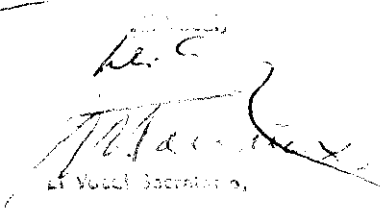
...

... 1994

...



El Vocal,



El Vocal Secretario,

El Vocal,



BIBLIOGRAFIA

6.- BIBLIOGRAFIA.

1. **ABE K., HAKOMORI S., OHSIBA S.** *Differential expression of difucosyl type 2 chain (Ie^y) defined by monoclonal antibody ah6 in different locations of colonic epithelia, various histological types of colonic polyps, and adenocarcinomas.* Cancer Res 1986, **46**:2639-2644.
2. **ALVAREZ-FERNÁNDEZ E., CARRETERO-ALBIÑANA L.** *Expression of blood group antigens by normal bronchopulmonary tissues and common forms of pulmonary carcinomas.* Arch Pathol Lab Med 1991, **115**: 42-49.
3. **ALVAREZ-FERNÁNDEZ E., CARRETERO-ALBIÑANA L.** *Lectin histochemistry of normal bronchopulmonary tissues and pulmonary carcinoma.* Arch Pathol Lab Med 1990, **114**:475-481.
4. **ALMENDRAL J.M., HUEBSCH A.P., BLUNDELL H., MACDONALD-BRAVO, BRAVO R.** *Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins.* Proc Natl Acad Sci USA 1987, **84**:1575-1579.
5. **ANDERSON M.C., BROWN C.L., BUCKLEY C.H., FOX H. JENKINS D., LOWE D.G., MANNERS T.P., MELCHER D.H., ROBERTSON A.J., WELLS M.** *Current views on cervical intraepithelial neoplasia.* J Clin Pathol 1991, **44**:969-978.
- 5b. **ARENDS M.J.** *Identification of HPV: In situ hybridization or polymerasa chain reaction?. Editorial.* J Pathol 1991, **164**:191-193.
6. **AWADY M., KAPLAN S., O'BRIEN S., BRUK R.** *Molecular analysis of integrated papillomavirus 16 sequence in the cervical cell line SiHa.* Virology 1987, **159**:389-398.
7. **BABES A.** *Le diagnostique du cancer du col utérin para les frottis.* Presse Méd. 1928, **36**:451-454.

8. **BAKER S.J., MARKOWITZ K., FEARON E.R., WILLSON J.K.V., VOGELSTEIN B.** *Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53.* Science 1990, **249**:912-915.
9. **BAMFORD P.N., ORMEROD M.G., SLOANE J.P., WARBURTON M.J.** *An immunohistochemical study of the distribution of epithelial antigens in the uterine cervix.* Obstet Gynecol 1983, **61**:603-608.
10. **BAND V., DE CAPRIO J.A., DELMOLINO L., KULESA V., SAGER R.** *Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells.* J Virol 1991, **65**:6671-6676.
11. **BARBACID M.** *Mutagens, oncogenes and cancer.* En Oncogenes and Growth Factors. Editado por Ralph A. Bradshaw y Steve Prentis. Ed. Elsevier Science Publishers 1987 (4ª reimpression 1989), Amsterdam, New York, Oxford. pg. 90-99.
12. **BARBOSA M.S., EDMONDS C., FISHER C., SCHILLER J.T., LOWY D.R., VOUSDEN K.H.** *The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a y SV₄₀ large T antigen contains separate domains for the RB binding and casein kinase II phosphorylation.* EMBO J 1990, **9**:153-160.
13. **BARBOSA M.S., VASS W.C., LOWY D.R., SCHILLER J.T.** *In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential.* J Virol 1991, **65**:292-298.
14. **BARRASSO R., DE BRUX J., CROISSANT O., ORTH G.** *High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia.* N Eng J Med 1987, **317**:916-23.

-
15. **BASU A., MURTHY U., RODECK U., HERLYN M., MATTES L., DAS M.** *Presence of tumor associated antigens in epidermal growth factor receptors from different human carcinomas.* Cancer Res 1987, **47**:2531-2536.
 16. **BATTAGLIA F., SCAMBIA G., BENEDETTI PANICI P. et al.** *Epidermal growth factor receptor expression in gynecological malignancies.* Gynecol Obstet Invest 1989 **27**:42-44.
 17. **BEDELL M.A., JONES K.H., LAIMINS L.A.** *The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and Rat-1 cells.* J Virol 1987, **61**:3635-3640.
 18. **BEHMARD S., HSIEH E.W., GUNN S.W.** *Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia in sexually active teenagers and young adults.* Am J Obstet Gynecol 1984, **148**:726-729.
 - 18b. **BERGERON C., BARRASO R., BEAUDENON S., FLAMANT P., CROISSANT O., ORTH G.** *Human papillomavirus associated with cervical intraepithelial neoplasia, Great diversity and distinct distribution in low and high-grade lesions.* Am J Surg Pathol 1992, **16(7)**:641-649.
 19. **BLASCO E., TORRADO J., COSME A., GUTIERREZ-HOYOS, ALVAREZ E., ZUGASTI A., ARENAS JL.** *Expression of Lewis Antigens in Colorectal Adenocarcinomas.* Exp Cell Bio 1989, **57**:153-158.
 20. **BONFIGLIO T.A., FEINBERG M.R.** *Isoantigens loss in cervical neoplasia. Demonstration by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques.* Arch Pathol Lab Med 1976, **100**:307-310.

-
21. BOONSTRA H., AALDERS J.G., KOUDSTAAL J., OOSTERHUIS J.W., JANSSENS J. *Minimum extension and appropriate topographic position of tissue destruction for treatment of cervical intraepithelial neoplasia.* Obstet Gynecol 1990, 75:227-231.
 22. BOURHIS J., LE M.G., BARROIS M., GERBAULET A., JEANNEL D., DUVILLARD P., LE DOUSSAL V., CHASSAGNE D., RIOU G. *Prognostic value of c-myc Proto-oncogene overexpression in early invasive carcinoma of the cervix.* J Clin Oncol 1990, 8:1789-1796.
 23. BOUVARD V., STOREY A., PIM D., BANKS L. *Characterisation of the human papillomavirus E2 protein: Evidence of trans-repression in cervical keratinocytes.* 2nd International Workshop on HPV Immunology, University of Cambridge 1993, UK.
 24. BRAVO R, FRANK R., BLUNDELL A.P., MACDONALD-BRAVO. *Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ .* Nature 1987, 326:515-517.
 25. BURNS J., GRAHAM A.K., FRANK C., FLEMING K.A., EVANS M.F., MCGREE J. O'D. *Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic in situ hybridisation.* J Clin Pathol 1987, 40:858-864.
 26. BUCKLEY J.D., HARRIS R.W., DOLL R., VESSEY M.P., WILLIAMS P.T. *Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri.* Lancet 1981, 2:1010-1015.
 27. BUCHOVICH K., DUFFY L.A., HARLOW E. *The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle.* Cell 1989, 58:1097-1105.

-
28. **CAMPION M.J., SINGER A., CLARKSON P.K., McCANCE D.J.** *Increased risk of cervical neoplasia in consorts of men with penile condylomata acuminata.* Lancet 1985, 1:943-946.
29. **CAMPION M.J., McCANCE D.J., CUZICK J., SINGER A.** *Progressive potential of mild cervical atypia: Prospective cytological, colposcopic, and virological study.* Lancet 1986, 2:237-240.
30. **CARRETERO-ALBIÑANA L.** *Estudio histoquímico de la distribución de receptores de lectinas en el carcinoma pulmonar.* Tesis Doctoral 1990, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina.
31. **CLAUSEN H., HAKOMORI S.** *ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution.* Vox Sang 1989, 56:1-20.
32. **CLAUSEN H., BENNET E.P., DABELSTEEN E.** *Carbohydrates of the cell surface: Molecular aspects of glycosyltransferases and their genes.* Acta Pathol Microbiol Immunol Scand, Supplementum 1992, 100:9-17.
33. **COLE S.T., DANOS O.** *Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products.* J Mol Biol 1987, 193:599-608.
34. **COLGAN T.J., PERCY M.E., SURI M. et al.** *Human papillomavirus infection of morphologically normal cervical epithelium adjacent to squamous dysplasia and invasive carcinoma.* Hum Pathol 1989, 20:316-319.

-
35. COLTRERA M.D., ZARBO R.J., SAKR W.A., GOWN A.M. *Markers for dysplasia of the upper aerodigestive tract. Suprabasal expression of PCNA, and CK19 in alcohol-fixed, embedded tissue.* Am J Pathol 1992, **141**:817-825.
36. CONE R.W., MINSON A.C., SMITH M.R., McDOUGALL J.K. *Conservation of the HPV-16 E6/E7 ORF sequences in a cervical carcinoma.* J Med Virol 1992, **37**:99-107.
37. CORDON-CARDO C., LLOYD KO., FINSTAD C.L., McGROARTY M.E., REUTER V.E., BANDER N.H., OLD L.J., MELAMED M.R. *Immunoanatomic distribution of blood group antigens in the human urinary tract. Influence of secretor status.* Lab Invest 1986, **55**:444-454.
38. CORDON-CARDO C., REUTER VE., LLOYD K.O., SHEINFELD J., FAIR W.R., OLD L.J., MELAMED M.R. *Blood group-related antigens in human urothelium: enhanced expression of precursor, Le^x, Le^y determinants in urothelial carcinoma.* Cancer Research 1988, **48**:4113-4120.
39. CORNELISSEN M., VAN DEN TWEEL J., STRUYK A., JEBBINK M., BRIËT M., NOORDAA J.V., SCHEGGET J.T. *Localization of human papillomavirus type 16 DNA using the polymerase chain reaction in the cervix uteri of women with cervical intraepithelial neoplasia.* J gen Virol 1989, **70**:2555-2562.
40. COURTIAL I., BREMOND A., AKNIN D. *Regression spontanee des condylo-mata plan du col uterin.* J Gynecol Obstet Biol Reprod 1991, **20**:527-531.
41. CRAWFORD L. *Papilloma viruses and cervical tumours.* Nature 1984, **310**:16.

-
42. CROMME F.V., PLOEGH H.L., AIREY J., KENEMANS P., GALLEE M., MEIJER C.J.L.M., WALBOOMERS J.M.M. *Loss of transporter protein, encoded by the Tap genes, is highly correlated with loss of HLA-B locus expression in HPV 16 positive cervical carcinomas.* 2nd International Workshop on HPV Immunology. University of Cambridge 1993, UK.
43. CRUM C.P., EGAWA K., SHI FU Y., LANCASTER W.D., BARRON B., LEVINE R.U., FENOGLIO C.M., RICHART R.M. *Atypical immature metaplasia (AIM). A subset of human papilloma virus infection of the cervix.* Cancer 1983, 51:2214-2219.
44. CROOK T., WREDE D., VOUSDEN K.H. *p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines.* Oncogene 1991, 6:873-875.
45. CROOK T., WREDE D., TIDY J.A., MASON W.P., EVANS D.J., VOUSDEN K.H. *Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours.* Lancet 1992, 339:1070-1073.
46. CULLEN A.P., REID R., CAMPION M., LÖRINCZ A.T. *Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm.* J Virol 1991, 65:606-612.
47. CHESTERS P.M., EDMONDS C., VOUSDEN K.H., McCANCE D.J. *Analysis of human papillomavirus type 16 open reading frame E7 immortalizing function in rat embryo fibroblast cells.* J Gen Virol 1990, 71:449-453.
48. CHRISTOPHERSON W.M., LUNDIN F.E., MENDEZ W.M., PARKER J.E. *Cervical cancer control. A study of morbidity and mortality trends over a twenty-one-year period.* Cancer 1976, 38:1357-1366.

-
49. CHIN K.V., UEDA K., PASTAN I., GOTTESMAN M.M. *Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by ras and p53*. Science 1992, **255**:459-462.
50. CHOO K., PAN C., HAN S. *Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames*. Virology 1987, **161**:259-261.
51. CHOO K., LEE H., PAN C., WU L., LIEW W., CHEUNG W. HAN S. *Sequence duplication and internal deletion in the integrated human papillomavirus type 16 genome cloned from a cervical carcinoma*. J Virol 1988, **62**: 1659-1666.
52. DABELSTEEN E., GRAEM N., ET AL. *Structural variations of blood group A antigens in human normal colon and carcinomas*. Cancer Res 1988, **48**:181-187.
53. DABELSTEEN E., CLAUSEN H., HOLMSTRUP P., REIBEL J. *Premalignant and malignant oral lesion are associated with changes in the glycosylation pattern of carbohydrates related to ABH blood group antigens*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 1988, **96**:813-819.
54. DABELSTEEN E., CLAUSEN H. *Carbohydrate pathology*. Acta Path Microbiol Immunol Scand. Suppl n° 27, vol. 100, 1992.
55. DALE I., BRANDTZAEG P. *Expression of the epithelial L1 antigen as an immunohistochemical marker of squamous cell carcinoma of the lung*. Histopathology 1989, **14**:493-503.
56. DAMJANOV I. *Lectin cytochemistry and histochemistry*. Lab Invest 1987, **57**:5-20.

-
57. DANOS O., KATINKA M., YANIV M. *Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among Papovaviridae*. EMBO J 1982, 1:231-236.
58. DARTMANN K., SCHWARZ E., GISSMANN L., et al. *The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11*. Virology 1986, 151:124-130.
59. DAVID L., NESLAND J.M., CLAUSEN H., CARNEIRO F., SOBRINHO-SIMÕES M. *Simple mucine-type carbohydrate antigens (Tn, Sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastases*. Acta Path Microbiol Immunol Scand Suppl 1992, 100:162-172.
60. DAVIDSOHN I., KOVARIK S., LEE C.L. *A,B, and O substances in gastrointestinal carcinoma*. Arch Path 1966, 81:381-390.
61. DAVIDSOHN J., NI IY. *Loss of isoantigens A,B and H in carcinoma of the lung*. Am J Path 1969, 57:307-334.
62. DAVIDSOHN I., KOVARIK S., NI L.Y. *Isoantigens A,B and H in benign and malignant lesions of the cervix*. Arch Pathol 1969, 87:306-314.
63. DAVIS J.R., ARISTIZABAL S., WAY D.L. et al. *DNA ploidy grade, and stage in prognosis of uterine cervical cancer*. Gynecol Oncol 1989, 32:4-7.
64. DEBRAY H., DECOUT D., STRECHER G., SPIK G., MONTREUIL J. *Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins*. Eur J Biochem 1981, 117:41-55.
65. DEVESA S.S., YOUNG J.L., BRINTON L.A., FRAUMENI J.F. *Recent trends in cervix uteri cancer*. Cancer 1989, 64:2184-2190.

-
66. DILUCA D., PILOTTI S., STEFANON B., ROTOLA A., MONINI P., TOGNON M., et al. *Human papillomavirus Type 16 DNA in genital tumours: A pathological and molecular analysis.* J gen Virol 1986, **67**:583-589.
67. DOORBAR J., GALLIMORE P.H. *Identification of the proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a.* J Virol 1987, **61**:2793-2799.
68. DONEHOWER L.A., HARVEY M., SLAGLE B.L., McARTHUR M.J., MONTGOMERY C.A., BUTEL J.S., BRADLEY A. *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours.* Nature 1992, **356**:215-221.
69. DUBEAU L., CHANDLER L.A., GRALOW J.R., NICHOLS P.W., JONES P.A. *Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens.* Cancer Res 1986, **46**:2964-2969.
70. DURST M., CROCE C.M., GISSMAN L., SCHWARZ E., HUEBNER K. *Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas.* Proc Natl Acadm Sci USA 1987, **84**:1070-1075.
71. DURST M., DZARLIEVA-PETRUSEVSKA R.T., BOUKAMP P., FUSENIG N., GISSMANN L. *Molecular and cytogenetic analysis of immortalized primary human keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA.* Oncogene 1987, **1**:251-256.
72. DYSON N., HOWLEY P.M., MÜNGER K., HARLOW ED. *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.* Science 1989, **243**:934-937.

-
73. DYSON N., BERNARDS R., FRIEND S., GOODING L., HASSELL J., MAJOR E., PIPAS L M. VANDYKE T., HARLOW E. *Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein.* J Virol 1990, **64**:1353-1356.
74. ENBLAD P., BUSCH C., CARLSSON U., EKELUND G., GLIMELIUS B., LINDSTRÖN C., PONTEN J., PAHLMAN L. *The adenoma-carcinoma sequence in rectal adenomas. Support by the expression of blood group substances and carcinoma antigens.* Am J Clin Pathol 1988, **89**:121-130.
75. EDDY D.M. *Screening for cervical cancer.* Ann Intern Med 1990, **113**:214-226.
76. EGAN M., FREETH M., CROCKER J. *Intraepithelial neoplasia, human papilloma virus infection and argyrophilic nucleoprotein in cervical epithelium.* Histopathology 1988, **13**:561-567.
77. FELDMAN M.J., LINZEY E.M., SREBNIK E., KENT D.R., NELSON M., GOLDSTEIN A.I. *Abnormal cervical cytology in the teenagers, A continuing problem.* Am J Obstet Gynecol 1976, **126**:418-421.
78. FENDERSON B.A., ANDREWS P. *Carbohydrate antigens of embryonal carcinoma cells: Changes upon differentiation.* Acta Path Microbiol Immunol Scand Suppl. 27 1992, **100**:109-118.
79. FERENCZY A., MITAO M., NAGAI N., SILVERSTEIN S., CRUM C.P. *Latent papillomavirus and recurring genital warts.* N Engl J Med 1985, **313**:784-788.
80. FERENCZY A., BERGERON C., RICHART R.M. *Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital human papillomavirus infections.* Obstet Gyneocol 1989, **74**:950-954.

-
81. FERENCZY A., BERGERON C., RICHART R.M. *Human papillomavirus DNA in CO2 laser-generated plume of smoke and its consequences to the surgeon.* Obstet Gynecol 1990, **75**:114-118.
82. FLANIGAN RC., KING CT., CLARK TD., CASH J.B., GREENFIELD B.J., SNIĘCINSKI I.J., PRIMUS J.F. *Immunohistochemical demonstration of blood group antigens in neoplastic and normal human urothelium: a comparison with standard red cell adherence.* J Urol 1983, **130**:499-503.
83. FOSCHINE M.P., EUSEBI V., TISON V. *Alveolar soft part sarcoma of the cervix uteri. A case report.* Virchows Arch Abt A Pathol Anat Histopat 1989, **414**:439-449.
84. FRADET Y., LaRUE H., PARENT-VAUGEOIS C., BERGERON A., DUFOUR C., BOUCHER L., BERNIER L. *Monoclonal antibody against a tumor-associated sialoglycoprotein of superficial papillary bladder tumors and cervical condylomas.* Int J Cancer 1990, **46**:990-997.
85. FREE K., ROBERT S., BOURNE R., DICKIE G., WARD B., WRIGHT G., HILL B. *Cancer of the cervix--old and young, now and then.* Gynecol-Oncol 1991, **43**:129-136.
86. FU Y.S., REAGAN J.W., HSIU J.G., STORAASLI J.P., WENTZ W.B. *Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix. I. A clinopathologic study.* Cancer 1982, **49**:2560.
87. FUCHS P.G., GIRARDI F., PFISTER H. *Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri.* Int J Cancer 1988, **41**:41-51.

-
88. FUKUSHIMA M., YAMAKAWA Y., SHIMANO S., HASHIMOTO M., SAWA SA Y., FUJINAGA K. *The physical state of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia.* Cancer 1990, **66**:2155-2161.
89. GAGE J.R., MEYERS C., WETTSTEIN F.O. *The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties.* J Virol 1990, **64**:723-730.
90. GARCÍA R.L., COLTRERA M.D., GOWN A.M. *Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparasion with flow cytometric analysis.* Am J Pathol 1989, **134**:733-739.
91. GARIN-CHESA P., RETTIG WJ. *Immunohistochemical analysis of LNT, NeuAc2 -> 3LNT, and Le(x) carbohydrate antigens in human tumors and normal tissues.* Am J Pathol 1989, **134**:1315-1327.
92. GERBER-HUBER S.N., GORGIEVSKI-HRISOHO M., MEANDZIJA M. *Sensitive detection and typing of human papillomavirus DNA in gynecological cell scrapings by slot-blot-hybridization.* Virchows Arch Abt B Cell Pathol 1988, **56**:119-125.
93. GERSELL D.J., MAZOUJIAN G., MUTCH D.G., RUDOLFF M.A. *Small-cell undifferentiated carcinoma of the cervix. A clinicopathologic, ultrastructural, and immunocytochemical study of 15 cases.* Am J Surg Pathol 1988, **12**:684-698.
94. GINSBERG D.F., MECHTA F., YANIV M., OREN M. *Wild-type p53 can down-regulate the activaty of various promoters.* Proc Nat Acad Sci USA 1991, **88**:9979-9983.

-
95. **GOLDSTEIN I.J., PORETZ R.D.** *Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins.* En: *The lectins. Properties, functions, and applications in Biology and Medicine.* G.Ed.: I.E. Liener, N. Sharon y I.J. Goldstein. Academic Press Inc. Orlando, Florida. 1986. Chap. 2, pp 33-247.
96. **GRIFFIN N.R., DOCKEY D., LEWIS F.A., WELLS M.** *Demonstration of low frequency of humna papillomavirus DNA in cervical adenocarcinoma and adenocarcinoma in situ by the polymerase chain reaction and in situ hybridization.* Int J Gynecol Pathol 1991, **10**:36-43.
97. **GUPTA S., GUPTA Y.N., SINGH I.J., SANYAL B., KHANNA S., SANI A.** *Tissue isoantogens A, B, and H in carcinoma of the cervix uteri: Their clinical significance.* J Surg Oncol 1981, **16**:71-77.
98. **GUPTA J.W., SAITO K., SAITO A., FU Y.S., SHAH K.V.** *Human papillomaviruses and the pathogenesis of cervical neoplasia. A study by in situ hybridization.* Cancer 1989, **64**:2104-2110.
99. **HAKOMORI S-I.** *Introductory remarks on aberrant glycosylation in tumors.* En: *Altered glycosylation in tumor cells.* G.Ed.: C.L. Reading, S.I. Hakomori y D.M. Marcus. Alan R. Liss Inc. 1988. pp. 207-212.
100. **HAKOMORI S-I.** *Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens.* Adv Cancer Res 1989, **52**:257-331.
101. **HAKOMORI S-I.** *General concept of tumor-associated carbohydrate antigens: Their chemical, physical, and enzymatic basis.* En: *Gangliosides and Cancer.* G Ed.:H.F.Oettgen. V.C.H. 1989. Cap. 6, pp.58-68.

-
102. HAKOMORI S-I. *Glycosphingolipids as differentiation-dependent, tumor-associated markers and as regulators of cell proliferation*. En *Oncogenes and Growth Factors*. Editado por Ralph A. Bradshaw y Steve Prentis. Ed. Elsevier Science Publishers 1987 (4ª reimpresión 1989), Amsterdam, New York, Oxford. pg. 218-226.
103. HAKOMORI S-I. *Preface to Carbohydrate Pathology*. En *APMIS Supplementum* nº 27 100:5-181, Ed: Erik Dabelsteen & Herik Clausen, Munksgaard Copenhagen, 1992.
104. HALBERT C.L., DEMERS G.W., GALLOWAY D.A. *The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells*. *J Virol* 1992, **66**:2125-2134.
- 104b. HARRIS C., Y HOLSTEIN M. *Clinical implications of the p53 tumor-suppressor genes*. *N Engl J Med* 1993, **28**:1318-1327.
105. HART W.R., NORRIS H.J. *Cervix adenocarcinoma of mesonephric type*. *Cancer* 1972, **29**:106.
106. HARWLEY-NELSON P., VOUSDEN K.H., HUBBERT N.L., LOWY D.R., SCHILLER J.T. *HPV 16 E6 and E7 cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes*. *EMBO J* 1989, **8**:3905-3910.
107. HENDY-IBBS P., COX H., EVAN G.I. WATSON J.V. *Flow cytometric quantification of DNA and c-myc oncoprotein in archival biopsies of uterine cervix neoplasia*. *Br J Cancer* 1987, **83**:179-192.
108. HENDRICKSON M.R., KEMPSON R.L. *Uterus and fallopian tubes*. En E. Sternberg S.S., *Histology for pathologists*. 1st ed., New York, Ed. Raven Press, 1992.

-
109. HERBST A.L., COLE P., NORUSIS M.J., WELCH W.R., SCULLY R.E. *Epidemiologic aspects and factors related to survival in 384 registry cases of clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix.* Am J Obstet Gynecol 1979, **135**:876-ss
110. HERRINGTON C.S., MCGEE J. O´D., SHIBATA D.K. *The polymerasa chain reaction and the molecular genetic analysis of tissue biopsies.* Diagnostic molecular pathology. A practical approach. Vol II. Oxford University Press, 1992. Cap. 4, pp.86-111.
111. HIGGINS G.D., DAVY M., RODER D., UZELIN D.M., PHILLIPS G.E., BURRELL C.J. *Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA.* Lancet 1991, **338**:910-913.
112. HIGGINS G.D., PHILLIPS G.E., SMITH L.A., UZELIN D.M., BURRELL C.J. *High prevalence of human papillomavirus transcripts in all grades of cervical intraepithelial glandular neoplasia.* Cancer 1992, **70**:136-146.
113. HILLS E., LAVERTY C.R. *Electron microscopic detection of papilloma virus particles in selected koilocytic cells in a routine cervical smear.* Acta Cytol 1979, **23**:53-56.
114. HIMES T.R., ERNST C.S., KOPROWSKA I. *Loss of blood isoantigens in exfoliated cells during the progression of CIN demonstrated by monoclonal antibody staining.* Acta Cytologica 1986, **30**:461-468.
115. HINDS P., FINLAY C., LEVINE A.J. *Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation.* J Virol 1989, **63**: 739-746.

-
116. HIROHASHI S., INO Y., KODAMA T., ET AL. *Distribution of blood group antigens A,B,H and I (Ma) in mucus producing adenocarcinoma of the lung.* J Nat Can Inst 1984, **72**:1299-130.
117. HOLGERSSON J., BREIMER M.E., SAMUELSSON B.E. *Basic biochemistry of cell surface carbohydrates and aspects of the tissue distribution of histo-blood group ABH and related glycosphigolipids.* Acta Path Microbiol Immunol Scand, Supplementum 1992, **100**:18-27.
118. HOLLOWAY R.W., TO A., MORADI M., BOOTS L., WATSON N., SHINGLETON H.M. *Monitoring the course of cervical carcinoma with the squamous cell carcinoma serum radioimmunoassay.* Obstet Gynecol 1989, **74**:944-949.
119. HOLLSTEIN M.C., METCALF L.A., WELSH J.A., MONTESANO R., HARRIS C.C. *Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer.* Proc Natl Acad Sci USA 1990, **87**:9958-9961.
120. HOLLSTEIN M., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B., HARRIS C.C. *p53 mutations in human cancer.* Science 1991, **153**:49-53.
- 120b. HORDING U., DAUGAARD S., IVERSEN A., JOHANNES E., PHILIP J. *Detection of human papillomavirus Type 16 DNA ssequences in archival cervical tissues by polymerasa chain reaction.* Arch Pathol Lab Med 1992, **116**:632-634.
121. HOWLEY P.M. *Role of the human papillomaviruses in human cancer.* Cancer-Res 1991, **51**:5019-5022.
122. HUGHES R.G., NEIL W.A., NORVAL M. *Papillomavirus and c-myc antigen expression in normal and neoplastic cervical epithelium.* J Clin Pathol 1989, **42**:46-51.
123. HUGHES R.C. *Glycoproteins (Outline studies in Biology).* G.Ed.: W.J. Brammar y M. Edidin. Chapman and Hall Ltd. London, 1983.

124. IFTNER T., OFT M., BÖHM S., WILCZYNSKI S.P., PFISTER H. *Transcription of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 in anogenital condylomata is restricted to undifferentiated cell layers of the epithelium.* J Virol 1992, **66**:4639-4646.
125. IGGO R., GATTER K., BARTEK J., LANE D., HARRIS A.L. *Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer.* Lancet 1990, **335**:675-679.
126. IMAI Y., MATSUSHIMA T., SUGIMURA, TERADA M. *Purification and characterization of human papillomavirus type 16 E7 protein with preferential binding capacity to the under phosphorylated form of retinoblastoma gene product.* J Virol 1991, **65**:4966-4972.
- 126b. INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J. *PCR protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. San Diego IL.
127. INOUE M., OGAWA H., NAKANISHI K., TANIZAWA O., KARINO K., ENDO J. *Clinical value of sialyl Tn antigen in patients with gynecologic tumors.* Obstet Gynecol 1990, **75**:1032-1036.
128. ISMAIL S., COLCLOUGH A.B., DINNER J.S., EAKINS D., EVANS D.M.D., GRADWELL E., O'SULLIVAN J.P., SUMMERELL J.M., NEWCOMBE R.G. *Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia.* Br Med J 1989, **298**: 707-710.
129. ITAI S., ARII S., TOBE R., KITAHARA A., KIM Y-C., YAMABE H., OHTSUKI H., KIRIHARA Y., SHIGERA K., KANNAGI R. *Significance of 2-3 and 2-6 sialylation of Lewis A antigen in pancreas cancer.* Cancer 1988, **61**:775-787.

-
130. ITO N., HIROTA T., *Histochemical and Cytochemical localization of blood group antigens*. Prog Histochem Cytochem Vol. 25, No. 2, 1992, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pg 62.
131. ITZKOWITZ S. *Carbohydrate changes in colon carcinoma*. Acta Path Microbiol Immunol Scand. Suppl 1992, **100**:173-180.
132. JACQUEMIER J., PENAULT F., DURST M., PARC P., SERADOUR B., MEYNARD P., HALFON P. HASSOUN P. *Detection of five different human papillomavirus types in cervical lesions by in situ hybridization*. Hum Pathol 1990, **21**:911-917.
133. JASKALSKI D., GATTI S., TRAVALI B., CALABRETTA et al. *Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors*. J Biol Chem 1988, **263**:10875-10879.
134. JEWERS R.J., HILDEBRANDT P., LUDLOW J.W., KELL B., MCCANCE D.J. *Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes*. J Virol 1992, **66**:1329-1335.
135. JOHNSON T.L., KIM W., PLIETH D.A., SARKAR F.H. *Detection of HPV 16/18 DNA in cervical adenocarcinoma using polymerase chain reaction (PCR) methodology*. Mod Pathol 1992, **5**:35-40.
136. JOVANOVIC R, JARIRDAR J, THUNG S.N. *Blood-group-related antigen Lewis(x) and Lewis(y) in the differential diagnosis of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma*. Arch Pathol Lab Med 1989, **113**:139-142.
137. JUHL BR., HARTZEN SH., HAINAU B. *A,B,H antigen expression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder*. Cancer 1986, **57**:1768-1775.
138. KAMINSKI P.F., NORRIS H.J. *Minimal deviation carcinoma (adenoma malignum) of the cervix*. Int J Gynecol Pathol 1983, **2**:141.

-
139. KANDA T., FURUNO A., YOSHIIKE K. *Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells.* J Virol 1988, **62**:610-613.
140. KAEHLING M., BURK R.D., ATKIN N.B., JOHNSON A.B., KLINGER H.P. *Loss of heterozygosity on chromosome 17p and mutant p53 in HPV-negative cervical carcinomas.* Lancet 1992, **340**:140-142.
141. KAUR P., McDOUGALL J.K. *Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18.* J Virol 1988, **62**:1920-1924.
142. KAUR P., McDOUGALL J.K., CONE R. *Immortalization of primary human epithelial cells by cloned cervical carcinoma DNA containing human papillomavirus type 16 E6/E7 open reading frames.* J Gen Virol 1989, **70**:1261-1266.
143. KAY S., FRABLE W.J., HUME D.M. *Cervical dysplasia and cancer developing in woman on immunosuppression and carcinogenesis.* Cancer 1970, **26**:1048-1052.
144. KIM Y.S., YUAN M., ITZKOWITZ S.H., SUN Q., KAIZU T., PALEKAR A., TRUMP B.S., HAKOMORI S. *Expression of Le^Y and extended Le^Y blood group-related antigens in human malignant, premalignant, and nonmalignant colonic tissues.* Cancer Res 1986, **46**:5985-5992.
145. KIM Y.S., ITZKOWITZ S.H., YUAN M., CHUNG Y., SATAKE K., UMEYAMA K., HAKOMORI S-I. *Le^a and Le^b antigens expression in human pancreatic cancer.* Cancer Research 1988, **48**:475-482.
146. KOSS L.G., DURFEE G.R. *Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: Cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia.* Ann NJ Acad Scin 1956, **61**:1245-1261.

-
147. KOSS L.G. *Epidermoid carcinoma of the uterine cervix and related precancerous lesions. En Diagnostic Cytology and its histopathologic bases. The effects of therapeutic procedures and drugs on the epithelial of the female genital tract.* 4th ed., Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1992, pg. 663-686.
148. KOSS L.G. *The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and tragedy.* J Med Assoc 1989 **261**:737-743.
149. KOUTSKY L.A., GALLOWAY D.A., HOLMES K.K. *Epidemiology of genital human papillomavirus infection.* Epidemiol Rev 1988, **10**:122-163.
150. KOUTSKY L.A., HOLMES K.K., CRITCHLOW M.S., STEVENS C.E., et al. *A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection.* N Engl J Med 1992, **327**:1272-1278.
151. KOVARIK S., DAVIDSOHN I., STEJSKAL R. *ABO antigens in cancer. Detection with the mixed cell agglutination reaction.* Arch Pathol 1968, **86**:12-21.
152. KROG L., BOCK E. *Glycosylation of neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily.* Acta Path Microbiol Immunol Scand Suppl 1992, **100**:53-70.
153. KURMAN R.J., FERENCZY A., WINKLER B. *Cervical intraepithelial neoplasia and condyloma. Carcinoma and metastatic tumors of the cervix.* En E. Springer-Verlag, Blaustein's pathology of the female genital tract. 3th ed., New York, Ed. Spinger-Verlag, 1987. Caps. 7 y 8, pgs 177-256.
154. KURMAN R.J., NORRIS H.J., WILKINSONS E. *Tumors of the cervix, vagina and vulva. Atlas of the tumor pathology.* Editor Juan Rosai, AFIP Washington D.C., 1992.
- 154b. KOWK S., HIGUCHI R. *Avoiding false positive with PCR.* Nature 1989, **339**:237-328.

-
155. LANE D.P., CRAWFORD L.W. *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cell.* Nature 1979, **278**:261-263.
156. LAUCLAN S.C. *Metaplasias and neoplasias of the müllerian epithelium.* Histopathology 1984, **8**: 543.
157. LECHNER MS., MACK D.H., FINICLE A.B., CROOK T., VOUSDEN K.H., LAIMINS L.A. *Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription.* EMBO J 1992, **11**:3045-3052.
158. LEE J.S., RO J.Y., SAHIN A.A., HONG W.K., BROWN B.W., MOUNTAIN C.F., HITTELMAN W.N. *Expresión of blood-group antigen A- a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med 1991, **324**:1084-1090.
159. LEVINE A.J., MOMAND J., FINLAY C.A. *The p53 tumor suppresor gene.* Nature 1991, **351**:453-456.
160. LILL P.H., NORRIS H.J., RUBENSTONE A.I., CHANG-LO M., DAVIDSOHN I. *Isoantigens ABH in cervical intraepithelial neoplasia.* Am J Clin Pathol 1976, **66**:767-774.
161. LIMAS C. *Detection of urothelial Lewis antigens with monoclonal antibodies.* Am J Pathol 1986, **125**:515-523.
162. LIMAS C. *Relationship of epidermal growth factor receptor detectability with the ABH blood group antigens. Emphasis on normal and neoplastic urothelium.* Am J Pathol 1991, **139**:131-137.
163. LINZER D.I.H., LEVINE A.J. *Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.* Cell 1979, **17**:43-52.

-
164. LÖRINCZ A.T., LANCASTER W.D., TEMPLE G.F. *Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix.* J Virol 1986, **58**:225-229.
165. LÖRINCZ A.T., TEMPLE G.F., KURMAN R.J., JENSON A.B., LANCASTER W.D. *Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia.* JNCI 1987, **79**:671-677.
166. LÖRINCZ A.T., REID R., JENSON B., GREENBERG M.D., LANCASTER W., KURMAN R.J. *Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types.* Obstet Gynecol 1992, **79**:328-337.
167. LUDLOW J.W., FIGGE J., SHEW J., HUANG C.M., et al. *SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of retinoblastoma susceptibility gene.* Cell 1988, **54**:275-283.
168. MACHER B.A., HOLMER E.H., SWIEDLER S.J., STULS C.L.M., SRNKA C.A. *Human α 1-3 fucosyltransferases.* Glycobiol 1991, **1**:577-584.
169. MAMBO N.C. *Isoantigen status in condyloma acuminata of the uterine cervix: An immunoperoxidase study.* Am J Clin Pathol 1983, **79**:178-181.
170. MANDEL U., CLAUSEN H., VEDTOFTE P., SORENSEN H., DABELSTEEN E. *Sequential expression of carbohydrate antigens with precursor-product relation characterizes cellular maturation in stratified squamous epithelium.* J Oral Pathol 1988, **17**:506-511.
171. MANDEL U. *Carbohydrates in oral epithelia and secretion: Variation with cellular differentiation.* Acta Path Microbiol Immunol Scand Suppl 1992, **100**:119-129.

-
172. MANDEL U., THERKILDSEN M.H., REIBEL J., SWEENEY B., MATSUURA H., HAKOMORI S-I., DEBELSTEEN E., CLAUSEN H. *Cancer-associated changes in glycosylation fibronectin*. Acta Path Microbiol Immunol Scand 1992, **100**:817-826.
173. MARTIN ANDRES A., D. LUNA DEL CASTILLO J. *Bioestadística para las ciencias de la salud*. Ediciones Norma S.A. 3ª Edición. 1990, Madrid.
174. MATLASHEWSKI G., SCHEIDER J., BANKS L., JONES N., MURRAY A., CRAWFORD L. *Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells*. EMBO J 1987, **6**:1741-1747.
175. MATSUKURA T., KOI S., SUGASE M. *Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers*. Virology 1989, **172**:63-72.
176. MATSUKURA T., SUGASE M. *Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma*. Virology 1990, **177**:833-836.
177. McMILLAN P., FERAYORNI L., GERHARDT C., JAUREGUI H. *Light and electron microscope analysis of lectin binding to adult rat liver in situ*. Lab Invest 1984, **50**:408-420.
178. McKELVEY J.L., GOODLIN R.R. *Adenoma malignum of the cervix: A cancer of deceptively innocent histologic pattern*. Cancer 1963, **16**:549.
179. MEISELS A., FORTIEN R., ROY M. *Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study*. Acta Cytol 1977, **21**:379
180. MEISELS A., ROY M., FORTIER M., MORIN C., CASAS-CORDERO M SHAB K.D., TURGENON H. *Human papillomavirus infection of the cervix. The atypical condyloma*. Acta Cytologica 1981, **25**:7-16.

-
181. MEISELS A., MORIN C. *Human papillomavirus and cancer of the uterin cervix*. Gynecol Oncol 1983, 12:S 111-123.
182. MERCER W.E. SHIELDS M.T., LIND., APPELLA E., UWRICH S.J. *Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating cell nuclear antigen expression*. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88:1958-1962.
183. METOKI R., KAKUDO K., TSUJI Y., TENG N., CLAUSEN H., HAKOMORI S-I. *Deletion of histo-blood group A and B antigens and expression of incompatible A antigen in ovarion carcinoma*. J Natl Cancer Inst 1989, 81:1151-1157.
184. MIES C. *Molecular pathology of paraffin-embedded tissue. Current clinical applications*. Diagn Mol Pathol 1992, 1:206-211.
185. MILDER J.W., WILBANKS G.D. et al. *Herpesvirus and cervical cancer. Symposium sponsored by the American Cancer Society*. Cancer Res 1973, 33:1345-1563.
186. MITTAL K.R., DEMOPOULOS R.I., GOSWAM S. *Patterns of keratin 19 expression in normal, metaplastic, condylomatous, atrophic, dysplastic, and malignant cervical squamous epithelium*. Am J Clin Pathol 1992, 98:419-423.
187. MOTZER R.J., RUTER V.E., CORDON-CARDO C., BOSL G.J. *Blood group-related antigens in human germ cell tumors*. Cancer Res 1988 48:5342-5347.
188. MÜNGER K., PHELPS W.C., BUDD V., HOWLEY P.M., SCHLEGEL R. *The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes*. J Virol 1989, 63:4417-4421

-
189. MÜNGER K., WERNESSE B.A., DYSON N., PHELPS W.C., HARLOW E., HOWLEY P.M. *Complex formation of human papillomavirus E7 protein with the retinoblastoma tumor suppressor gene product.* EMBO J 1989, **8**:4099-4105.
190. MÜNGER K, SCHEFFNER M., HUIBREGTSE J.M., HOWLEY P.M. *Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products.* Cancer Surv 1992, **12**:197-217.
191. NASIELL K., NASIELL M., VACLAVINKOVA V. *Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow-up.* Obstet Gynecol 1983, **61**:609-614.
192. NASIELL K., ROGER V., NASIELL M. *Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up.* Obstet Gynecol 1986, **67**:665-669.
193. NIGRO J.M., BAKER A.C., PREISINGER J.M., JESSUP R et al. *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types.* Nature 1989, **342**: 705-708.
194. NILSSON O. *Carbohydrate antigens in human lung carcinomas.* Acta Path Microbiol Immunol Scand Suppl 1992, **100**:149-161.
195. NUOVO G.J. *Correlation of histology with Human Papillomavirus DNA detection in the female genital tract.* Gynecol Oncol 1988, **31**:176-183.
196. NUOVO G.J., FRIEDMAN D., RICHART R.M. *In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA segregation patterns in lesions of the female genital tract.* Gynecol Oncol 1990, **36**:256-262.
197. NUOVO G.J., MORITZ J., LEI WALSH L., MACCONNELL P., KOULOS J. *Predictive value of human papillomavirus DNA detection by filter hybridization and polymerase chain reaction in women with negative results of colposcopic examination.* Am J Clin Pathol 1992, **98**:489-492.

-
198. OGAWA H., INOUE M., TANIZAWA O., MIYAMOTO M., SAKURAI M. *Altered expression of sialyl-Ty. Lewis antigens and carcinoembryonic antigen between primary and metastatic lesions of uterine cervical cancers.* Histochemistry 1992, **97**:311-317.
199. OKAMURA Y. *Heterogeneity of the blood group ABH antigens and variation in the expression of these antigens of secretory granules in human cervical glands. An electron microscopic observation using lectins and monoclonal antibodies .* Histochemistry 1990, **94**:489-96.
200. ORIOL R., MOLLICONE R., COULLIN P., DALIX A.M., CANDELIER J.J. *Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues.* Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl 1992, **100**:28-38.
201. ORNTOFT T.F., WOLF H. *Blood group ABO and Lewis antigens in bladder tumors: Correlation between glycosyltransferasa activity and antigen expression.* Acta Path Microbiol Immunol Scand 1988 96/SUPL. **4**:126-133.
202. ORNTOFT T.F., WOLF H., WATKINS W.M. *Activity of the human blood group ABO, Se, H, Le, and X gene-encoded glycosyltransferases in normal and malignant bladder urothelium.* Cancer Res 1988, **48**:4427-4433.
203. ORNTOFT TF., WOLF H., CLAUSEN H., HAKOMORI S-I., DEBELSTEEN E. *Blood group ABH-related antigens in normal and malignant bladder urothelium: possible structural basis for the deletion of type-2 chain ABH antigens in invasive carcinomas.* Int J Cancer 1989, **43**:774-780.
204. ORNTOFT T.F., HVID H., CLAUZER H. et al. *Loss of blood group ABO-related antigen expression in urothelium from patients with chronic cystitis.* Lab Invest 1989 **60**:305-310.

-
205. ORNTOFT T.F. *Carbohydrate changes in bladder carcinomas*. Acta Path Microbiol Immunol Scand Suppl 1992, **100**:181-187.
206. OSTROW R.S., MANIAS D.A., CLARK B.A., OKAGAKI T., TWIGGS L.B. FARAS A.J. *Detection of human papillomavirus DNA in invasive carcinomas of the cervix by in situ hybridization*. Cancer Res 1987, **47**:649-653.
207. PAKARIAN F., KAYE J., CASON J., JEWERS R.J., KELL B., RAJU K.S., BEST J.M. *Vertical transmission of genital papillomaviruses demonstrated by the polymerase chain reaction (PCR)*. 2nd International Workshop on HPV Immunology. University of Cambridge 1993, UK.
208. PAPANICOLAOU D.N., TRAUT H.F. *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear*. New York, Commonwealth Fund 1943.
209. PARKER P.J., KATAR M. *Molecular biology of oncogenes and cell control mechanisms*. Ed. Ellis Horwood Limited, 1990. Marker Cross House, Cooper Street, Chichester, West Sussex, PO19 1EB, England, pgs. 125,128,132.
210. PAULSON J.C., COLLEY K.J. *Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosilation*. J Biol Chem 1989, **264**:17615-17618.
211. PECORARO G., MORGAN D., DEFENDI V. *Differential effects of human papillomavirus types 6, 16, and 18 DNAs on immortalization and transformation of human epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1989, **86**:563-567.
212. PFISTER H., KRUBKE J., DIETRICH W., IFNER T., FUCHS P.G. *Classification of the papillomaviruses-mapping the genome*. En: Evered D., Clark S. (eds) Ciba Foundation Symposium. Wiley, Chichester, pp. 3-22.

213. PHILIPSEN E.K., CLAUSEN H., DABELSTEEN E., GRAEM N. *Blood group related carbohydrate antigens in human fetal pancreas*. *Apmis* 1988, **96**:1109-1117.
214. PICKER H., HAAS J., LAHOUSEN M. *Prognostic factors in cervical cancer on basis of morphometric evaluation*. *Bailliere's Clin Obstet Gynecol* 1988, **2**:805-815.
215. PIRISI L., YASUMOTO S., FELLER M., DONIGER J., DIPAOLO J.A. *Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA*. *J Virol* 1987, **61**:1061-1066.
216. PIVER M.S. *Invasive cervical cancer in the 1990s*. *Semin Surg Oncol* 1990, **6**:359-363.
217. POUR P.M., TEMPERO M.M., TAKASAKI H., UCHIDA E., TAKIYAMA Y., BURNETT D.A., STEPLEWSKI Z. *Expression of blood group-related antigens ABH, Lewis A, Lewis B, Lewis X, Lewis Y, and CA 19-9 in pancreatic cancer cells in comparison with the patient's blood group type*. *Cancer Research* 1988, **48**:5422-5426.
218. PRELICH G. TAN C.K., KUSTARA M., MATHEWS M.B., SO A.G., DOWNEY K.M., STILLMAN B. *Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase δ auxiliary protein*. *Nature* 1987, **326**:517-520.
219. PRIME S.S., ROSSER T.J., MALAMOS D., SHEPHERD J.P., SCULLY C. *The use of the lectin Ulex Europeus to study epithelial cell differentiation in neoplastic and non-neoplastic oral white lesions*. *J Pathol* 1985, **147**:173-179.

-
220. RADHAKIRISHNA PILLAI M., BALARAM P., CHIDAMBARAM S., PADMA-NABHAN T.K., NAIR M.K. *Development of an immunological staging system to prognosticate disease course in malignant cervical neoplasia*. *Gyneocol Oncol* 1990, **37**:200-205.
221. REAGAN J.W. *Cellular pathology and uterine cancer*. *Am J Clin Pathol* 1974, **62**:150.
222. REEVES W.C., BRINTON L.A., GARCIA M. et al. *Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America*. *New Engl J Med* 1989, **320**:1437-1441.
223. RICHART R.M. *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia*. *Clin Obstet Gynecol* 1967, **10**:748-784.
224. RICHART R.M. *A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia*. *Obstet Gynecol* 1990, **75**:131-133.
225. RICHART R.M., NUOVO G.J. *Human papillomavirus DNA in situ hybridization may be used for the quality control of genital tract biopsies*. *Obstet Gynecol* 1990, **75**:223-226.
226. RIOU G., FAVRE M., JAENNEL D., BOURHIS J., LE DOUSSAL V., ORTH G. *Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA*. *Lancet* 1990, **335**:1171-1174.
227. ROBERTSON A.J., ANDERSON J.M., SWANSON BECK., BURNETTR A., HOWATSON S.R., LEE F.D., LESSELLS A.M. *Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens*. *J Clin Pathol* 1989, **42**:231-238.
228. ROBERTSON A.J. *Histopathological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN)-Is there a need for change?*. *J Pathol* 1989, **159**:273-275.

229. **ROBBOY S.J., HERBST A.L., SCALLY R.E.** *Clear-cell adenocarcinoma of the vagina an cervix in young females. Analysis of 37 tumors that persisted or recurred after primary therapy.* Cancer 1974, **34**:606.
230. **RODRÍGUEZ-COSTA J., MORO E., RUIZ-AYUCAR J.M., LACRUZ C., JIMENEZ-AYALA M., VALDES A.** *Estudio cito-epidemiológico cervicovaginal en la Comunidad de Madrid.* Reunión anual de la Sociedad Española de Anatomía Patológica 1993, Madrid.
231. **ROLFS A., SCHULLER I., FINCKH U., WEBER-ROLFS I.** *Isolation of DNA from cells and tissue for PCR.* PCR: Clinical diagnostics and research. Ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992. Cap. 7, pp 85-87.
- 231b. **ROLFS A., SCHULLER I., FINCKH U., WEBER-ROLFS I.** *Substances affecting PCR: Inhibition or enhancement.* PCR: Clinical diagnostics and research. Ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992. Cap. 7, pp 51-60.
232. **RUGGIERIO F., COOPER HS. STEPLEWSKI Z..** *Immunohistochemical study of colorectal adenomas with monoclonal antibodies against blood group antigens (Sialosyl-Le^a, Le^a, Le^b, Le^x, Le^y, A, B, and H.* Lab Invest 1988, **59**:96-103.
233. **SAGAE S., KUZUMAKI N., HISADA T., MUGIKURA Y., KUDO R., HASHIMOTO M.** *Ras-oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix.* Cancer 1989, **63**:1577-1582.
234. **SAGAE S., KUDO R., KUZUMAKI N., HISADA T., MUGIKURA Y., NIHEI T., TAKEDA T., HASHIMOTO M.** *Ras oncogene expression and progression in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix.* Cancer 1990, **66**:295-301.

-
235. SAKAMOTO Y., KAMADA M., IRAHARA M., HASEBE H., DAITOH T., FURUMOTO H., KISHI Y., MORI T. *Differences in clinical significance of blood antigens A, B, and H in carcinoma tissue in the uterine cervix.* Gynecol Oncol 1986, **25**:195-203.
236. SAKAMOTO H. *The reactive cellular population and expression of blood group substance in human colorectal cancer.* Acta Pathol Jpn 1989, **39**:313-320.
237. SAKAMOTO J., FURUKAWA K., CORDON-CARDO C., YIN B.W.T., RETTIG W., OETTGEN J., OLD H.F., LLOYD K.O. *Expression of Lewis^a, Lewis^b, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines.* Cancer Res 1986, **46**:1553-1561.
238. SANDERS D.S.A., MILNE D.M., KERR M.A. *The expression of Lewis(a) and Lewis(b) antigens reflects changes in fucosylation between normal and neoplastic cervical squamous epithelium.* J Pathol 1990, **162**:23-28.
239. SANTHANAM V., RAY A., SEHGAL. *Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product.* Proc Natl Acad Sci USA 1991, **88**:7605-7609.
240. SCHARL A., CROMBACH G., VIERBUCHEN M., GÖHRING U., GÖTTERT T., HOLT JA. *Antigen CA 19-9: Presence in mucosa of nondiseased Müllerian duct derivatives and marker for differentiation in their carcinomas.* Obstet Gynecol 1991, **77**:580-585.
241. SCHWARZ E., DÜRST M., DEMANKOWSKI C., et al. *DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b.* EMBO J 1983, **2**:2341-2348.

-
242. SCHEFFNER M., WERNES A., HUIBREGTSE J.M., LEVINE A.J., HOWLEY P.M. *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell 1990, **63**:1129-1139.
243. SCHEFFNER M., MÜNGER K., BYRNE J.C., HOWLEY P.M. *The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines*. Proc Natl Acad Sci USA 1991, **88**:5523-5527.
244. SCHEFFNER M., TAKAHASHI T., HUIBREGTSE J.M., MINNA J.D., HOWLEY P.M. *Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins*. J Virol 1992, **66**:5100-5105 .
245. SCHULTE BA., POON K.C., RAO KP., SPICER S.S. *Lectin histochemistry of complex carbohydrates in human cervix*. Histochem J 1985, **17**:627-654.
246. SCHWARZ E., SCHNEIDER-GADICKE A., ROGGENBURCH B., MAYER W., GISSMANN L., ZUR HAUSEN H. *Expression of human papillomavirus DNA in cervical carcinoma cell lines*. Banbury Rep 1986, **21**:281-290
247. SCHWARTZ L.B., CARCANGIU M.L., BRADHAM L., SCWARTZ P.E. *Rapidly progressive squamous cell carcinoma of the cervix coexisting with human immunodeficiency virus infection: clinical opinion*. Gynecol Oncol 1991, **41**:255-258.
248. SCHWENK J., MAKOVITZKY. *Comparative study on the expression of the blood group antigens Le a, Le b, Le x, Le y and the carbohydrate antigens CA 19-9 and CA-50 in chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1989, **414**:465-476.

-
249. SEDMAN S.A., HUBBERT N.L., VASS W.C., LOWY D.R., SCHILLER J.T. *Mutant p53 can substitute for human papillomavirus type 16 E6 in immortalization of human keratinocytes but does not have E6-associated trans-activation or transforming activity.* J Virol 1992, 66:4201-4208.
250. SEEDORF K., KRÄMMER G., DÜRST M., SUHAI S., RÖWEKAMP W.G. *Human papillomavirus type 16 DNA sequence.* Virology 1985, 145:181-185.
251. SFAMENI S.F., JOBLING T.W., TRICKEY N.R.A., HAVELOCK C. *Evaluation of serial cervical cytology in the assessment of preinvasive cervical neoplasia.* J. Obstet Gynecol 1989 29:40-43.
252. SHERMAN M.E., SCHIFFMAN M.H., EROZAN Y.S., WACHOLDER S. KURMAN J. *The Bethesda system. A proposal for reporting abnormal cervical smears based on the reproducibility of cytopathologic diagnoses.* Arch Pathol Lab Med 1992, 116:1155-1158.
253. SHIBATA D.K., ARNHEIM N., MARTIN W.J. *Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerasa chain reaction.* J Exp Med 1988, 167:225-230.
254. SHIRASAWA H., TOMITA Y., KUBOTA K., KASAI T., SEKIYA S., TAKAMIZANA H., SIMIZV B. *Transcriptional differences of the human papillomavirus type 16 genome between precancerous lesions and invasive carcinoma.* J Virol 1988, 62:1022-1027.
255. SHIROMIZU K., OGAWA M., KAMATA H., TOMINAGA K., KOYAMA Y. *Long-term mass screening in uterine cervical carcinoma eradication strategy.* Jpn J Clin Oncol 1990, 20: 134-138.

-
256. **SIGURDSSON K., ADALSTEINSSON S., RAGNARSSON J.**, *Trends in cervical and breast cancer in Iceland. A statistical evaluation of trends in incidence and mortality for the period 1955-1989, their relation to screening and prediction to the year 2000.* Int J Cancer 1991, **48**: 523-528.
257. **SINGER A., REID B.L., COPPLESON M.** *A hypothesis: The role of a high-risk male in the etiology of cervical carcinoma. A correlation of epidemiology and molecular biology.* Am J Obstet Gynecol 1976, **126**:110-115.
258. **SMITH EL., MCKIBBIN MJ.** *Characterization of a human intestinal fucolipid with blood group Le^a activity.* J Biol Chem 1975, **250**:6059-6064.
259. **SOLOMON D.** *The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses.* Acta Cytol 1989, **33**:567-574.
- 259b. **SPIRO R.G.** *Glycoproteins: Their biochemistry, biology and role in human disease.* N Engl J Med 1969, **281**:991-1000, y 1043-1053.
260. **SRIVASTAVA S., TONG Y.A., DEVADAS K., ZOU Z.Q., CHEN Y., PIROLLO K.F., CHANG E.H.** *The status of the p53 gene in human papilloma virus positive and negative cervical carcinoma cell lines.* Carcinogenesis 1992, **13**:1273-1275.
261. **STALF A., MATTINGLY R.F.** *Isoantigens ABO in cervical neoplasia.* Gynecol Oncol 1972; **1**:26-35.
262. **STOLER M.H., MILLS S.E., GERSELL D.J., WALKER A.N.** *Small-cell neuroendocrine carcinoma of the cervix. A human papillomavirus type 18 associated cancer.* Am J Surg Pathol 1991, **15**:28-32.
263. **STUBBE TEGLBJAERG C., NORRILD B., DEBELSTEEN E.** *Changes of blood group antigens in premalignant and malignant lesions of the human exocervix.* Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 1985, **93**:149-151.

-
264. STUBBE TEGLBJAERG C., RAVN V., MANDEL U., DABELSTEEN E. *Distribution of histo-blood group antigens in cervical and uterine endometrium*. Acta Path Microbiol Immunol Scand Suppl 1991, **23**:100-106.
265. SUBLER M.A., MARTIN D.W., DEB S. *Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53*. J Virol 1992, **66**:4757-4762.
266. SYRJÄNEN K., VÄYRYNEN M., SAARIKOSKI S., MÄNTYJÄRVI R., PARKKINEN S., HIPPELÄINEN M., CASTREN O. *Natural history of cervical human papillomavirus (HPV) infections based on prospective follow-up*. Br J Obstet Gynecol 1985, **92**:1086-1092.
267. TAGUCHI H., DAIBATA M., KITAGAWA T. et al. *Generalized lymph node metastasis of early uterine cancer in an HTLV-I carrier*. Cancer 1988, **62**:2614-2617.
268. TAKAHASHI T., NAU M.M., CHIBA I., BIRNER M.J., et al. *p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer*. Science 1989, **246**:491-494.
269. TAY S.K., JENKINS D. *Langerhans cell population in early invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix*. J Obstet Gynecol 1989, **29**:38-43
270. TESHIMA S., SHIMOSATO Y., KISHI K., KASAMATSU T., OHMI K., UEI Y. *Early stage adenocarcinoma of the uterine cervix*. Cancer 1985, **56**: 167.
271. THOMPSON C.H., ROSE B.R. *Deleterious effects of formalin/acetic acid/alcohol (FAA) fixation on the detection of HPV DNA by in situ hybridization and the polymerase chain reaction*. Pathology 1991, **23**:327-330.
272. TO AC., SOONG SJ., SHINGLETON H.M., GORE H., WILKERSON J.A., HATCH K.D., PHILLIPS D., DOLLAR J.R.. *Immunohistochemistry of the blood group A,B,H isoantigens and Oxford Ca as prognostic markers for stage IB squamous cell carcinoma of the cervix*. Cancer 1986, **58**:2435-2439.

-
273. TORRADO J, BLASCO E, COSME A et al. *Expression of type 1 and type 2 blood group-related antigens in normal and neoplastic gastric mucosa*. Am J Clin Pathol 1989, **91**:249-254.
274. TORRADO J., GUTIERREZ HOYOS A., BLASCO E., LARRAZ J., FERNANDEZ RIVAS J.L. *Immunohistological patterns of blood group ABO and type 1 chain (Lewis a, Lewis b) and type 2 chain (H-2, Y) antigens in normal uterine cervix*. Tissue-Antigens 1990, **36**:8-11.
275. TWIGGS L.B., CLARK B.A., OKAGAKI T. *Basal cell pseudopodia in cervical intraepithelial neoplasia: progressive reduction of number with severity: A morphometric quantification*. Am J Obstet Gynecol 1981, **139**:640-644.
276. VAN NAGELL J.R.JR., POWELL D.E., GALLION H.H. et al. *Small cell carcinoma of the uterin cervix*. Cancer 1988, **62**:1586-1593.
277. VOGELSTEIN B. *Cancer: a deadly inheritance*. Nature 1990, **348**:681-682.
278. VOJTESEK B., BONTEK J., MIDGLEY C.A et al. *An immunochemical analysis of human p53: New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53*. J Immunol Methods 1992, **151**: 237-144.
279. WAGATSUMA M., HASIMOTO K., MATSUKURA T. *Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in the cervical cancer: amplification of viral sequences together with cellular franking sequences*. J Virol 1990, **64**:813-821.
280. WALDOCK A., SCI MB., ET AL. *Differential expression of the Lewis Y antigen defined by monoclonal antibody c14/1/46/10 in colonic polyps*. Cancer 1989, **64**:414-421.
281. WATANABE S., KANDA T., YOSHIIKE K. *Human papilomavirus type 16 transformation of primary human embrionic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7*. J Virol 1989, **63**:965-969.

-
282. **WASSEM M.H., LANE D.P.** *Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form.* J Cell Science 1990, **96**: 121-129.
283. **WEINBERG R.A.** *Tumor suppressor genes.* Science 1991, **254**:1138-1146.
284. **WERNES B.A., LEVINE A.J., HOWLEY P.M.** *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53.* Science 1990, **248**:76-79.
285. **WHITTAKER J.R., SAMY A.M.J., SUNTER J.P. et al.** *Cytokeratin expression in cervical epithelium: An immunological study of normal, wart virus-infected and neoplastic tissue.* Histopathology 1989, **14**:151-160.
286. **WILLIAMS A.E., JORDAN J.A., ALLEN J.M., MURPHY J.F.** *The surface ultrastructural of normal and metaplastic cervical epithelia and of cancer in situ.* Cancer Res 1973, **33**:504-513.
287. **WOLF D., HARRIS N., ROTTER V.** *Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene.* Cell 1984, **38**:119-126.
288. **WOODWORTH S.D., BOWDEN P.E., DONIGER J., PIRISI L., BARNER W.** *Characterization of normal exocervical epithelial cells immortalized in vitro by papillomavirus type 16 and 18 DNA.* Cancer Res 1988, **48**:4620-4628.
289. **WOODWORTH C.D., WAGGONER S., BARNES W., STOLER H., DIPAOLO J.A.** *Human cervical and foreskin epithelial cells immortalized by human papillomavirus DNAs exhibit dysplastic differentiation in vivo.* Cancer Res 1990, **50**:3709-3715.
290. **WOODWORTH C., WANG H., DIPAOLO J.** *Growth and differentiation of genital keratinocytes infected with retrovirus vectors encoding wild type p53.* 2nd International Workshop on HPV Immunology. Cambridge 1993, UK.

291. YAMADA Y., YOSHIDA T., HAYASHI K., SEKIYA T., YOKOTA J., HIROHASHI S., NAKATANI K., NAKANO H., SUGIMURA T., TERADA M. *p53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases*. Cancer-Res 1991, 51:5800-5805.
292. YAMAMOTO F.I., CLAUSEN H., WHITE T., MARKER J., HAKOMORI S.I. *Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system*. Nature 1990, 354:229-233.
293. YASUMOTO S.A., BURKHARDT L., DONIGER J., DIPAOLO J.A. *Human papillomavirus type 16 DNA induced malignant transformation of NIH 3T3 cell*. J Virol 1986, 57:572-577
294. YOKOTA J., TSUKADA Y., NAKAJIMA T., GOTOH M., SHIMOSATO Y., MORI N., TSUNOKAWA Y., SUGIMURA T., TERADA M. *Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in carcinoma of the uterine cervix*. Cancer Res 1989, 49:3598-3601.
295. ZENITA K., KIRIHATA Y., KITAHARA A., ET AL. *Fucosylated Type-2 chain polylectosamine antigens in human lung cancer*. Int J Can 1988, 41:344-349.
296. ZUR HAUSERN H. *Condylomata acuminata and human genital cancer*. Cancer Res 1976, 36: 794.
297. ZUR HAUSERN H. *Human genital cancer: Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events?*. Lancet 1982, 2: 1370-1372.

APENDICE

TABLA I_(A) LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE BAJO GRADO.
EXPRESION DE LOS ANTIGENOS T1-CH, A, B, H-1.

| N° | GS | L | E | BG1 | | | | | BG2 | | | | | BG3 | | | | | BG4 | | | | | Bloques |
|----|-----|-------|-----|-----|----|---|---|----|-----|---|---|----|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---------|
| | | | | S | G | E | B | M | S | G | E | B | M | S | G | E | B | M | S | G | E | B | M | |
| 1 | A | I | +A | N | ≈ | - | - | - | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | - | - | - | - | - | - | ■ | ● | - | - | X2 |
| 2 | A | HPV | + | ≠ | ≈ | - | - | - | - | - | ● | ● | ● | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ● | X1 |
| 3 | A | HPV | + | - | ** | - | - | - | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | - | - | - | - | - | - | ~ | - | ● | ● | X4 |
| 4 | A | HPV | + | - | - | - | - | N | ■ | ◆ | ■ | hb | N | - | - | d | d | N | - | - | - | - | N | X1 |
| 5 | A | MA/ER | + | - | ≈ | - | N | ≠ | ■ | ◆ | ≠ | N | ≠ | - | - | - | N | ≠ | - | ≈ | ⊥ | N | ≠ | X2 |
| 6 | AB | HPV | +AB | - | - | - | - | N | - | ◆ | ≠ | - | N | ■ | ■ | ≠ | ≠ | N | - | - | - | - | N | X1 |
| 7 | O | HPV | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ⊥ | ■ | ≠ | - | - | - | - | - | X2 |
| 8 | O | HPV | - | - | ** | - | - | Mh | - | - | - | - | ≠ | - | - | - | d | ≠ | - | ◆ | - | - | - | X1 |
| 9 | O | HPV | - | N | N | - | - | N | N | N | - | - | N | N | N | ⊥ | ≠ | N | N | N | - | - | N | X1 |
| 10 | idm | HPV | - | N | N | - | - | N | N | N | - | - | N | N | N | ⊥ | ⊥ | N | N | N | - | - | N | X1 |

GS.- Grupo sanguíneo; L.- Lesión; E.- Endotelio; S.- Epitelio simple endocervical; G.- Epitelio glandular; E.- Epitelio pavimentoso exocervical; M.- Area de metaplasia B.- LEI-BG; BL.- Bloques; I.- CIN-I. ■ = Tinción homogénea; ≠ = Tinción heterogénea; ≠ = T. en tercio medio; ⊥ = T. en tercio superior; ⊥ = T. basal; ⊥ = T. suprabasal; ● = T. ocasional; ≈ = T. cilíar; ◆ = T. moco; ■ = T. tercio medio y superior; <.- pérdida focal de la expresión; MA/ER.- Metaplasia atípica/Epitelio regeneración; hb.- hiperplasia basal; d.- T. débil. MI.- Metaplasia inmadura.

TABLA II (1A) LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE ALTO GRADO.
EXPRESION DE LOS ANTIGENOS T1-CH, A, B, H-1

| Nº | GS | L | En | BG1 | | | | | BG2 | | | | | BG3 | | | | | BG4 | | | | | BL |
|----|----|-----|-----|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|----|-----|---|---|---|----|-----|---|---|---|---|----|
| | | | | S | G | E | M | A | S | G | E | M | A | S | G | E | M | A | S | G | E | M | A | |
| 1 | A | II | +A | N | ◆ | - | - | - | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠< | N | ⊥ | ≠ | ≠ | ■ | N | - | - | - | ● | X2 |
| 2 | A | II | + | - | ≈ | ● | - | - | - | - | ≠ | ≠ | ■ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X1 |
| 3 | A | III | + | - | ≈ | - | N | - | ■ | ◆ | ≠ | N | ≠< | - | - | - | N | - | - | ≈ | - | N | - | X2 |
| 4 | A | III | + | - | ≈ | - | - | - | - | ◆ | ≠ | ≠ | ≠< | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X1 |
| 5 | A | III | + | - | ● | - | - | ≠ | ■ | ◆ | ■ | N | ≠< | - | - | - | N | - | - | - | - | N | - | X2 |
| 6 | A | III | + | - | ≈ | - | - | - | N | ■ | ■ | ■ | ≠ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X2 |
| 7 | A | III | + | - | - | - | - | ● | - | - | ≠ | ≠ | ≠ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X3 |
| 8 | A | III | + | - | ≈ | - | - | - | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | - | - | - | - | - | - | - | ● | - | - | X2 |
| 9 | AB | III | +AB | - | - | - | - | - | ≠ | ≠ | ≠ | ≠ | ≠< | ■ | ■ | ≠ | ≠ | ≠< | - | - | - | - | - | X1 |
| 10 | O | II | - | - | ● | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ⊥ | ● | - | ● | X2 |
| 11 | O | II | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ≈ | - | ● | X3 |
| 12 | O | III | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ● | - | X2 |
| 13 | O | III | - | - | ≈ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ≈ | ≈ | ⊥ | - | X1 |
| 14 | O | III | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ≠ | ≠ | ≠ | - | - | - | - | - | X2 |
| 15 | O | III | - | - | - | - | ≠ | - | - | - | - | - | - | - | - | ⊥ | N | ≠< | ≠ | ◆ | N | ≠ | ⊥ | X2 |
| 16 | O | III | - | ● | ● | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ⊥ | - | - | X1 |

GS- Grupo sanguíneo; L.- Lesión; En.- Endotelio; S.- Epitelio simple endocervical; G.- Epitelio glandular; E.- Epitelio pavimentoso exocervical; M.- Area de metaplasia A.- LEI-AG; BL.- Bloques; II, III.- CIN-II, III. ■ = Tinción homogénea; ≠ = Tinción heterogénea; ≠ = T. en tercio medio; ⊥ = T. en tercio superior; ⊥ = T. basal; ≡ = T. suprabasal; ● = T. ocasional; ≈ = T. cililar; ◆ = T. moco; ■ = T. tercio medio y superior; <- pérdida focal de la expresión.

TABLA III_(A) CARCINOMAS INVASORES
EXPRESION DE LOS ANTIGENOS T1-CH, A, B, H-1

| Nº | G.S. | L | End | BG1 | | | | BG2 | | | | BG3 | | | | BG4 | | | | Bloques | |
|----|------|-----|-----|-----|---|---|---|-----|---|---|----------------|-----|---|----------------|----------------|-----|---|---|---|---------|----|
| | | | | S | G | E | I | S | G | E | I | S | G | E | I | S | G | E | I | | |
| 1 | A | CE | +A | - | ≈ | ● | - | ■ | ◆ | N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | x2 |
| 2 | A | CE | + | - | ≈ | N | - | ■ | ■ | ≠ | ≠ | - | - | - | - | - | ≈ | - | - | - | x1 |
| 3 | idem | ADC | + | N | - | - | - | ■ | ■ | ≠ | - | - | - | - | ≠? | - | - | - | - | •+ | x1 |
| 4 | A | CE | + | - | - | - | - | N | N | ≠ | - | N | N | - | ≠ | - | - | - | - | - | x1 |
| 5 | A | CE | + | N | N | - | - | N | N | ≠ | - | N | N | - | - | - | - | - | - | - | x1 |
| 6 | O | CE | - | N | N | - | ● | N | N | - | - | N | N | - | - | - | N | N | ± | - | x1 |
| 7 | O | CE | - | N | N | - | - | N | N | - | ⊥ | N | N | - | - | - | N | N | - | - | x1 |
| 8 | O | CE | - | N | N | - | - | N | N | ≠ | ≠ ^d | N | N | - | ≠ ^d | - | N | N | - | - | x1 |
| 9 | O | CE | - | - | ≈ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ≠ ^d | - | ≈ | - | - | - | x3 |
| 10 | O | CE | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ≠ ^d | - | - | - | - | - | - | x1 |

GS- Grupo sanguíneo; L.- Lesión; End.- Endotelio; S.- Epitelio simple endocervical; G.- Epitelio glandular; E.- Epitelio pavimentoso exocervical; I.- Tumor Invasor; BL.- Bloques; CE.- Carcinoma epidermoide; ADC.- Adenocarcinoma; ■ = Tinción homogénea; ≠ = Tinción heterogénea; ≠ = T. en tercio medio; ⊥ = T. en tercio superior; ± = T. basal; ± = T. suprabasal; ● = T. ocasional; ≈ = T. ciliar; ◆ = T. moco; ■ = T. tercio medio y superior; <.- pérdida focal de la expresión; d.- T. débil; -.- T. negativa; N.- T. no testada.

TABLA IV_(A) LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE BAJO GRADO.
EXPRESION DE LOS ANTIGENOS Le^a, Le^b, Le^x, Le^y.

| Nº | G.S | L | En | BG5 | | | | | BG6 | | | | | BG7 | | | | | BG8 | | | | |
|----|------|-------|------------------|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|
| | | | | S | G | E | B | M | S | G | E | B | M | S | G | E | B | M | S | G | E | B | M |
| 1 | A | I | +Le ^y | N | - | - | - | - | - | ± | ± | ± | ± | - | ± | ± | ± | ± | - | - | - | - | - |
| 2 | A | HPV | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| 3 | A | HPV | + | ■ | ◆ | ± | ± | ± | ■ | ◆ | ■ | ■ | ■ | - | - | - | - | - | ■ | ◆ | ■ | ■ | ■ |
| 4 | A | HPV | + | - | - | - | - | N | ■ | ◆ | ± | ± | N | - | ± | ± | ± | N | ■ | ◆ | ■ | ■ | N |
| 5 | A | MA/ER | + | - | - | ± | ± | ± | - | - | - | - | - | ± | ± | ± | ± | ± | ■ | ◆ | ■ | ■ | ■ |
| 6 | AB | HPV | + | ■ | ■ | ± | ± | N | ■ | ■ | ± | ± | N | ■ | ◆ | - | - | N | ■ | ◆ | N | N | N |
| 7 | O | HPV | + | ■ | ◆ | ± | ± | ± | ■ | ◆ | - | - | - | N | ± | ± | ± | ± | N | ◆ | ± | ± | ± |
| 8 | O | HPV | + | - | - | - | - | - | N | ± | ± | ± | ± | - | - | - | - | - | ■ | ◆ | ■ | ■ | ■ |
| 9 | O | HPV | + | N | N | - | - | N | N | N | ± | ± | N | N | N | - | - | N | N | N | ± | ± | N |
| 10 | idem | HPV | + | N | N | - | - | N | N | N | ± | ± | N | N | N | - | - | N | N | N | - | - | N |

GS.- Grupo sanguíneo; L.- Lesión; En.- Endotelio; S.- Epitelio simple endocervical; G.- Epitelio glandular; E.- Epitelio pavimentoso exocervical; M.- Area de metaplasia B.- LEI-BG; I.- CIN-I. ■ = Tinción homogénea; ± = Tinción heterogénea; ± = T. en tercio medio; ± = T. en la capa más externa del epitelio; ± = T. en tercio superior; ± = T. basal; ± = T. suprabasal; ◆ = T. ocasional; ± = T. cilial; ◆ = T. moco; ■ = T. tercio medio y superior; MA/ER.- Metaplasia atípica/Epitelio regeneración.

TABLA V_(A) LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE ALTO GRADO.
EXPRESION DE LOS ANTIGENOS Le^a, Le^b, Le^x, Le^y.

| Nº | GS | L | EN | BG5 | | | | | BG6 | | | | | BG7 | | | | | BG8 | | | | | | | | |
|----|----|-----|------------------|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | S | G | E | M | A | S | G | E | M | A | S | G | E | M | A | S | G | E | M | A | | | | |
| 1 | A | II | - | N | - | - | N | - | N | - | - | N | - | N | - | - | N | - | N | ≠ | ≠ | N | ≠ | | | | |
| 2 | A | III | - | ■ | ◆ | ■ | ■ | ■ | - | - | ■ | ■ | ≠ | ≠ | ■ | ◆ | ■ | ● | ⊥ | • | ≠ | N | ◆ | ≠ | - | - | - |
| 3 | A | III | - | ■ | ◆ | ■ | N | ≠ | ■ | ◆ | ■ | N | ≠ | - | ◆ | ≠ | - | N | - | - | ◆ | ≠ | - | N | - | - | |
| 4 | A | III | - | ■ | ◆ | ■ | ■ | ≠ | - | - | ≠ | - | - | ■ | ◆ | ■ | ■ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 5 | A | III | +Le ^y | ■ | ◆ | ■ | N | ≠ | ■ | ◆ | ■ | N | ≠ | ■ | ◆ | ■ | N | ● | - | - | ■ | ◆ | ■ | N | ≠ | ≠ | |
| 6 | A | III | + | ■ | ◆ | ■ | ■ | ⊥ | ■ | ◆ | ■ | ■ | ≠ | ■ | ◆ | ■ | ■ | ⊥ | - | - | ≠ | ≠ | ■ | ■ | ⊥ | ⊥ | |
| 7 | A | III | + | ■ | ◆ | ■ | ■ | ≠ | - | - | ≠ | ≠ | - | ≠ | ◆ | ≠ | ■ | ■ | - | - | ■ | ◆ | ■ | ● | ● | - | |
| 8 | A | III | + | ■ | ◆ | ■ | ■ | ≠ | ■ | ◆ | ■ | ■ | ≠ | ≠ | ≠ | ■ | ■ | ■ | • | ≠ | ■ | ◆ | ■ | ⊥ | ≠ | ≠ | |
| 9 | AB | III | + | - | - | - | - | - | ■ | ■ | ■ | ■ | ≠ | ■ | ◆ | ■ | ● | N | - | - | ■ | ◆ | ■ | ■ | N | ■ | |
| 10 | O | II | + | N | N | - | N | - | ■ | ◆ | ■ | N | ● | - | - | - | N | - | - | - | ■ | ◆ | ■ | N | ■ | ■ | |
| 11 | O | II | + | ■ | ◆ | - | ⊥ | ⊥ | ■ | ◆ | ⊥ | ⊥ | ≠ | - | - | ⊥ | ⊥ | ⊥ | - | - | ■ | ◆ | ■ | ■ | ■ | ≠ | |
| 12 | O | III | + | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | ■ | ◆ | ■ | ■ | ≠ | ≠ | ≠ | ⊥ | ⊥ | ● | - | - | ■ | ◆ | ■ | ■ | ■ | ≠ | |
| 13 | O | III | + | ■ | ◆ | ■ | N | ≠ | ■ | ◆ | ■ | N | ≠ | ≠ | ◆ | ≠ | ■ | N | ■ | - | ■ | ◆ | d | N | N | | |
| 14 | O | III | + | ■ | ◆ | ■ | ■ | ⊥ | - | ● | ≠ | ≠ | ● | ■ | ◆ | ■ | ■ | ⊥ | - | - | ■ | ◆ | ■ | N | ■ | | |
| 15 | O | III | + | - | - | - | - | - | - | ≠ | ≠ | ≠ | - | - | - | N | N | N | - | - | ■ | ◆ | ■ | N | ■ | | |
| 16 | O | III | + | N | N | - | N | - | - | - | ⊥ | N | ● | ■ | ◆ | ■ | N | ≠ | - | - | ■ | ◆ | ■ | N | ■ | | |

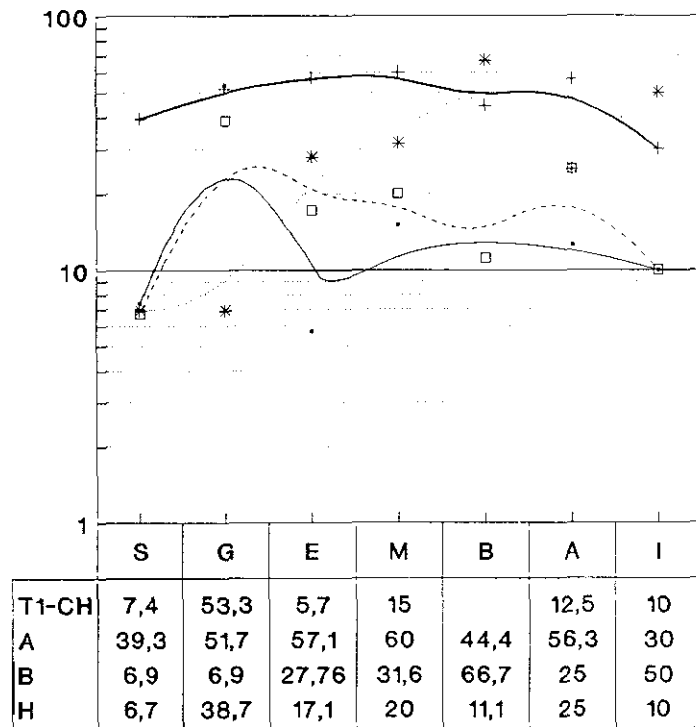
GS.- Grupo sanguíneo; L.- Lesión; En.- Endotelio; S.- Epitelio simple endocervical; G.- Epitelio glandular; E.- Epitelio pavimentoso exocervical; M.- Area de metaplasia; A.- LIE-AG; ■ = Tinción homogénea; ≠ = Tinción heterogénea; ⊥ = T. en tercio medio; ⊥ = T. en la capa más externa del epitelio; ≡ = T. en tercio superior; ⊥ = T. basal; ≡ = T. suprabasal; ● = T. ocasional; ≡ = T. ciliar; ◆ = T. moco; ■ = T. tercio medio y superior; II-III.- CIN II-III.

TABLA VI_(A) CARCINOMAS INVASORES.
EXPRESION DE LOS ANTIGENOS Le^a, Le^b, Le^x, Le^y.

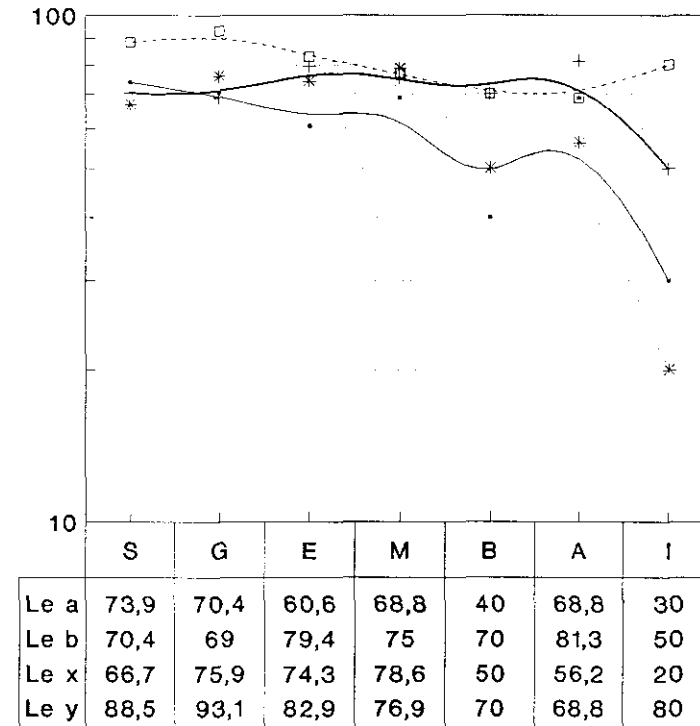
| Nº | GS | L | End | BG5 | | | | BG6 | | | | BG7 | | | | BG8 | | | | | |
|----|------|----|-------------------|-----|----|---|----|-----|----|---|----|-----|----|---|----|-----|----|---|----|---|---|
| | | | | S | G | E | I | S | G | E | I | S | G | E | I | S | G | E | I | | |
| 1 | A | CE | | ■ | ◆■ | N | - | ■ | ◆■ | - | - | - | - | - | - | - | - | ■ | ◆■ | ≠ | ■ |
| 2 | A | CE | | ■ | ◆■ | N | ≠ | ■ | ◆■ | N | ≠< | ■ | ◆≠ | ■ | - | ■ | ◆■ | ≠ | ■ | | |
| 3 | idem | AC | | N | ◆■ | N | ≠< | ■ | ◆■ | ■ | ≠ | ■ | ◆■ | ■ | - | ■ | ◆■ | ≠ | ■ | | |
| 4 | A | CE | | N | N | ■ | - | N | N | ■ | - | N | N | ≠ | ≠ | N | N | ■ | ■ | | |
| 5 | A | CE | + Le ^y | N | N | ■ | - | N | N | ■ | - | N | N | ■ | - | N | N | ■ | ■ | | |
| 6 | O | CE | + | N | N | ■ | - | N | N | ■ | - | N | N | ≠ | - | N | N | ■ | N | | |
| 7 | O | CE | | N | N | ≠ | ≠< | N | N | - | - | N | N | ≠ | N | N | N | - | - | | |
| 8 | O | CE | - | N | N | - | - | N | N | - | ≠ | N | N | ≠ | ≠< | N | N | ■ | ■ | | |
| 9 | O | CE | + | N | ■ | ≠ | - | ■ | ◆■ | ≠ | ● | ≠ | ≠ | ≠ | - | ■ | ◆■ | ■ | ≠< | | |
| 10 | O | CE | | ■ | ◆■ | ≠ | - | ■ | ◆■ | ■ | ≠< | ≠ | ◆≠ | ≠ | - | ■ | ◆■ | ■ | ■ | | |

GS.- Grupo sanguíneo; L.- Lesión; En.- Endotelio; S.- Epitelio simple endocervical; G.- Epitelio glandular; E.- Epitelio pavimentoso exocervical; I.- Carcinoma Invasor;
 ■ = Tinción homogénea; ≠ = Tinción heterogénea; ≠ = T. en tercio medio; ≡ = T. en la capa más externa del epitelio; ≡ = T. en tercio superior;
 ⊥ = T. basal; ≡ = T. suprabasal; ● = T. ocasional; ≈ = T. ciliar; ◆ = T. moco; ■ = T. tercio medio y superior.

TABLA VII(A) RESUMEN GRAFICO DE RESULTADOS
EXPRESION DE LOS AGS ABH Y LEWIS.



— T1-CH —+ A * B -□- H



— Le a —+ Le b * Le x -□- Le y

TABLA VIII_(A) LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE BAJO GRADO.
EXPRESION DE LAS LECTINAS UEA-I, DBA, SJA, LTA.

| Nº | GS | L | En | UEA-I | | | | | DBA | | | | | SJA | | | | | LTA | | | | | |
|----|------|-------|------|-------|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|----|-----|-----|---|---|
| | | | | S | G | E | B | M | S | G | E | B | M | S | G | E | B | M | S | G | E | B | M | |
| 1 | A | I | +uea | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | nl | nl | - | - | - | |
| 2 | A | HPV | + | - | - | ≠ | ≠ | N | - | - | - | - | N | - | - | - | - | N | - | - | - | - | N | |
| 3 | A | HPV | + | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | ≠ | ≠ | ≠ | ≠ | ≠ | N | - | ◆ | ≠ | ≠ | d | - | - | ≠ | ≠ | ≠ |
| 4 | A | HPV | + | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | N | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | N | - | - | ? | ? | N | - | - | ≠nl | ≠nl | N | |
| 5 | A | MA/ER | + | ■ | ◆ | ≠ | ⊥ | ≠ | ■ | ■ | ≠ | ≠ | ≠ | ■ | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | - | - | - | - | - | |
| 6 | AB | HPV | + | N | N | ≠ | ≠ | N | N | N | ≠ | ≠ | N | N | N | ≠ | ≠ | N | N | N | ≠ | ≠ | N | |
| 7 | O | HPV | + | N | ◆ | ≠ | ≠ | ≠ | N | - | - | - | - | N | - | - | - | - | N | - | - | - | - | |
| 8 | O | HPV | + | ■ | ◆ | ≠ | N | ≠ | - | - | ≠ | N | ≠ | - | - | ≠ | ≠ | ≠ | - | - | - | d | - | |
| 9 | O | HPV | + | N | N | ≠ | ⊥ | N | N | N | - | - | N | N | N | - | - | N | N | N | (⊥) | (⊥) | N | |
| 10 | idem | HPV | + | N | N | ≠ | ≠ | N | N | N | - | - | N | N | N | - | - | N | N | N | - | - | N | |

TABLA IX_(A) LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE ALTO GRADO.
EXPRESION DE LAS LECTINAS UEA-I, DBA, SJA, LTA

| Nº | GS | L | | UEA-I | | | | | DBA | | | | | SJA | | | | | LTA | | | | | | |
|----|----|-----|-------|-------|---|---|---|---|-----|---|-----------------|---|---|-----------------|---|---|----------------|----------------|----------------|---|-----------------|----|-----------------|---|---|
| | | | | S | G | E | M | A | S | G | E | M | A | S | G | E | M | A | S | G | E | M | A | | |
| 1 | A | II | +uea | N | ■ | - | N | - | N | ◆ | ■ | ■ | N | ≠ | N | ■ | - | N | - | N | - | - | - | N | - |
| 2 | A | III | + | ■ | ◆ | ■ | N | N | N | - | - | ■ | ■ | - | - | - | ⊥ | ⊥ | - | - | - | ■ | ■ | ⊥ | |
| 3 | A | III | - | ■ | ◆ | ■ | ≠ | N | • | ■ | ◆ | ≠ | N | • | ≠ | ≠ | N | N | ⊥ ^d | - | - | N | N | ⊥ | |
| 4 | A | III | +u/ba | ■ | ◆ | ■ | - | - | - | - | - | ≠ | ≠ | • | ≠ | ≠ | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 5 | A | III | - | ■ | ◆ | ■ | ≠ | N | • | ■ | ■ | ■ | N | • | ≠ | ≠ | ■ | N | ≠ | - | - | - | N | - | |
| 6 | A | III | - | ■ | ◆ | ■ | ⊥ | N | - | ≠ | ≠ | - | N | - | ≠ | ◆ | ■ | N | ≠ | - | - | - | N | - | |
| 7 | A | III | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 8 | A | III | - | ■ | ◆ | ■ | - | - | - | ≠ | ◆ | ■ | ■ | • | ≠ | ≠ | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 9 | AB | III | + | N | N | ≠ | N | ≠ | ≠ | N | N | ≠ | N | ≠ | N | N | ≠ | N | ≠ ^d | N | N | ≠ | N | ≠ | |
| 10 | O | II | + | ■ | ◆ | ■ | ≠ | N | ≠ | - | - | - | N | - | - | - | ■ | N | ••• | - | - | ■ | N | ■ | |
| 11 | O | II | + | ■ | ◆ | ■ | ≠ | ≠ | ⊥ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 12 | O | III | + | ■ | ◆ | ■ | ≠ | ≠ | • | - | - | ≠ | ■ | ≠ | ≠ | - | ≠ | - | ≠ | - | - | nl | ■ ^{nl} | - | ⊥ |
| 13 | O | III | + | ■ | ◆ | ■ | ≠ | N | ≠ | - | - | - | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | |
| 14 | O | III | + | ■ | ◆ | ■ | ≠ | - | ≠ | - | ≠ ^{nl} | ≠ | ≠ | ≠ ^{nl} | - | ≠ | ■ ^d | ≠ | ≠ | - | ≠ ^{nl} | ■ | ≠ | ■ | |
| 15 | O | III | + | ■ | ◆ | ■ | ≠ | N | ≠ | - | - | ≠ | N | ≠ | - | - | ≠ | ≠ ^d | ≠ | - | - | - | - | d | |
| 16 | O | III | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ⊥ | - | ⊥ | - | - | ⊥ | - | ⊥ | |





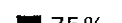







TABLA X_(A) CARCINOMAS INVASORES.
 EXPRESION DE RECEPTORES PARA LAS LECTINAS UEA-I, DBA, SJA, LTA.

| Nº | GS | L | End | UEA-I | | | | DBA | | | | SJA | | | | LTA | | | |
|----|------|----|--------|-------|---|---|----|-----|---|---|---|-----|---|---|----|-----|---|---|----|
| | | | | S | G | E | I | S | G | E | I | S | G | E | I | S | G | E | I |
| 1 | A | CE | +uea | ■ | ◆ | ■ | ■ | ■ | ◆ | · | · | ■ | ◆ | N | - | - | - | N | d |
| 2 | A | CE | + | ■ | ◆ | · | ◆* | ■ | ◆ | ≠ | - | ■ | ≠ | ■ | - | ≠ | ≠ | - | ·d |
| 3 | idem | AC | +u/dba | ■ | ◆ | ■ | ■ | ■ | ◆ | - | - | - | ≠ | ■ | ≠ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 4 | A | CE | - | N | N | - | ■ | N | N | - | ≠ | N | N | ≠ | ≠ | N | N | - | ≠ |
| 5 | A | CE | + | N | N | ■ | ■ | N | N | ≠ | - | N | N | ≠ | ·< | N | N | ⊥ | - |
| 6 | O | CE | + | N | N | ■ | - | N | N | - | - | N | N | ■ | ≠ | N | N | ⊥ | ≠ |
| 7 | O | CE | - | N | N | - | - | N | N | ⊥ | - | N | N | ≠ | ≠ | N | N | ⊥ | - |
| 8 | O | CE | + | ■ | N | N | *< | - | N | N | - | - | N | ⊥ | *< | - | N | - | - |
| 9 | O | CE | + | ■ | ◆ | ■ | ≠ | - | - | ⊥ | ≠ | - | - | ⊥ | ≠ | ≠ | ≠ | ■ | ≠ |
| 10 | O | CE | + | ■ | ◆ | ≠ | ■ | - | - | - | - | - | - | ■ | ≠ | ≠ | ≠ | ⊥ | - |

TABLA XI_{1A)} LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE BAJO GRADO, Y EPITELIO REGENERATIVO. EXPRESION DE LOS DETERMINANTES ANTIGENOS DE P53, PCNA Y AMPLIFICACION DE PARTE DEL INTRO E6 DEL VIRUS HPV 16.

| Nº | GS | L | Edad | P53 | | | | PCNA | | | | HPV 16 |
|----|------|-------|------|-----|---|---|---|------|---|---|-------|------------------|
| | | | | S | G | E | B | S | G | E | B | |
| 1 | A | I | 45 | - | - | - | - | - | ± | ± | ■ 10% | + |
| 2 | A | HPV | 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 3 | A | HPV | 34 | - | - | - | - | - | ± | ± | ■ 7% | - (+/-) |
| 4 | A | HPV | 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 5 | A | MA/ER | 28 | - | - | - | - | - | ± | - | - | - (+/-) |
| 6 | AB | HPV | 51 | - | - | - | - | - | - | ± | ■ 30% | + |
| 7 | O | HPV | 39 | - | - | - | - | - | - | ± | ■ 10% | + |
| 8 | O | HPV | 35 | - | - | - | - | - | - | ± | ■ 5% | - |
| 9 | O | HPV | 23 | N | N | N | - | N | N | N | ■ 45% | + ^{***} |
| 10 | idem | HPV | " | N | N | N | - | N | N | N | ■ 40% | + ^{***} |

TABLA XII(A) LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE ALTO GRADO.
 EXPRESION DE LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS DE P53, PCNA Y AMPLIFICACION
 DE PARTE DEL INTRON E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO-16.

| Nº | GS | L | Edad | P53 | | | | PCNA | | | | HPV |
|----|----|-----|------|-----|---|---|---|------|-------|-------|--|---------|
| | | | | S | G | E | A | S | G | E | A | 16 |
| 1 | A | II | 45 | N | N | - | - | N | N | - |  70% | + |
| 2 | A | III | 35 | N | N | - | N | N | N | - | - | - (+/3) |
| 3 | A | III | 40 | - | - | - | - | - | - | - | - | N |
| 4 | A | III | 30 | - | - | - | - | - | - | \pm |  60% | + |
| 5 | A | III | 42 | - | - | - | - | - | - | - |  90% | + |
| 6 | A | III | 25 | - | - | - | - | - | - | - |  75% | - |
| 7 | A | III | 44 | - | - | - | - | - | N | - | - | - |
| 8 | A | III | 43 | - | - | - | - | - | - | - |  75% | - |
| 9 | AB | III | 51 | N | N | - | - | - | - | \pm |  60% | * |
| 10 | O | II | 46 | N | N | - | - | - | - | \pm |  50% | - |
| 11 | O | II | 44 | N | N | - | - | N | N | \pm |  75% | - |
| 12 | O | III | 30 | - | - | - | - | N | N | \pm |  40% | + |
| 13 | O | III | 36 | - | - | - | - | - | \pm | \pm |  95% | - |
| 14 | O | III | 32 | - | - | - | - | - | - | \pm |  75% | + |
| 15 | O | III | 35 | - | - | - | - | - | \pm | \pm |  80% | +** |
| 16 | O | III | 50 | - | - | - | - | - | - | - | N | + |

*, **, ***.- Lesiones que coinciden en las pacientes referidas.

TABLA XIII_(A) CARCINOMAS INVASORES.
 EXPRESION DE LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS DE P53 Y PCNA Y AMPLIFICACION DE PARTE
 DEL INTRON E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO-16.

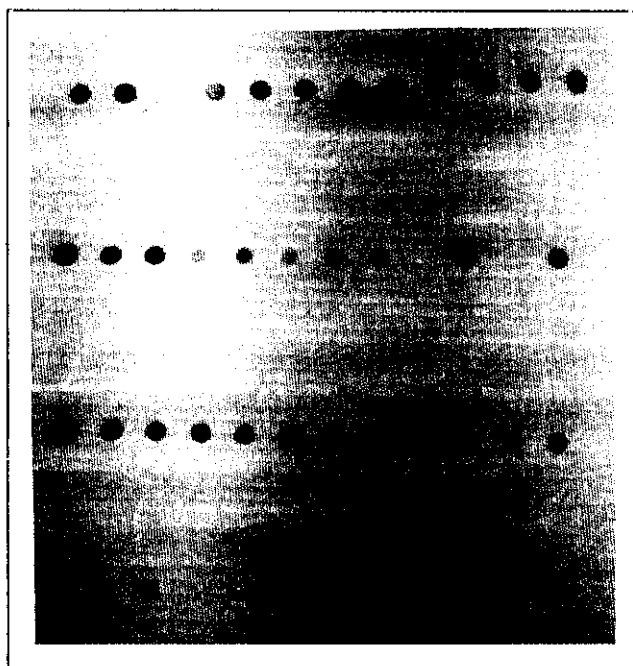
| Nº | GS | L | Edad | P53 | | | | PCNA | | | | HPV 16 |
|----|------|----|------|-----|---|---|-------|------|---|---|--------|-----------|
| | | | | S | G | E | I | S | G | E | I | |
| 1 | A | CE | 36 | N | N | N | - | N | N | N | ■ 100% | + |
| 2 | A | CE | 41 | - | - | - | - | - | - | - | ■ 95% | +**** |
| 3 | Idem | AC | " | - | - | - | - | - | - | - | ■ 85% | -.... |
| 4 | A | CE | 50 | - | - | - | ■ 40% | - | - | - | ■ 40% | - |
| 5 | A | CE | 29 | N | N | - | - | N | N | - | ■ 100% | + |
| 6 | O | CE | 45 | - | - | - | N | - | - | - | N | - |
| 7 | O | CE | 36 | - | - | - | - | - | - | ± | ■ 100% | + |
| 8 | O | CE | 43 | N | N | - | - | N | N | ± | ■ 100% | + |
| 9 | O | CE | 28 | - | - | - | - | - | - | - | ± | + |
| 10 | O | CE | 38 | - | - | - | - | - | - | - | ■ 80% | + |

CE.- Carcinoma Epidermoide; AC.- Adenocarcinoma del cuello uterino. ****.- Neoplasias que coinciden en la misma paciente.

TABLA XIV^(A) CONCENTRACIONES DEL DNA EXTRAIDO DE LOS DISTINTOS CASOS DEL ESTUDIO Y RESULTADOS DE LA AMPLIFICACION DEL INTRON E6 DEL VIRUS HPV 16.

| LIE-BG | [DNA] µg/µl | Pureza | Amplificación E6:HPV 16 | LIE-AG | [DNA] µg/µl | Pureza | Amplificación E6:HPV 16 |
|--------|----------------|--------|----------------------------|--------|----------------|--------|----------------------------|
| 1 | 0.362 | 1.652 | + | 1 | 0.250 | 1.74 | + |
| 2 | 0.153 | 1.545 | + | 2 | 0.176 | 1.39 | - |
| 3 | 0.210 | 1.438 | - | 3 | - | - | NO |
| 4 | 0.180 | 1.44 | + | 4 | 0.161 | 1.91 | + |
| 5 | 0.081 | 1.42 | - | 5 | 0.377 | 1.690 | + |
| 6* | 0.030 | 1.15 | + | 6 | 0.195 | 1.652 | - |
| 7 | 0.066 | 1.609 | + | 7 | 0.228 | 1.701 | - |
| 8** | 0.139 | 1.494 | - | 8 | 0.469 | 1.724 | - |
| 9*** | 0.097 | 1.492 | + | 9* | 0.177 | 1.462 | - |
| 10**** | 0.180 | 1.538 | + | 10 | 0.300 | 1.587 | - |
| | | | | 11 | 0.258 | 1.433 | - |
| | | | | 12 | 0.256 | 1.570 | + |
| | | | | 13 | 0.366 | 1.663 | - |
| | | | | 14 | 0.367 | 1.714 | + |
| | | | | 15** | 0.103 | 1.450 | + |
| | | | | 16 | 0.402 | 1.178 | + |

| CARCINOMAS INVASORES | [DNA] µg/µl | Pureza | Amplificación E6:HPV16 |
|-------------------------|----------------|--------|---------------------------|
| 1 | 0.541 | 1.54 | + |
| 2**** | 0.808 | 1.6 | + |
| 3**** | 0.277 | 1.63 | - |
| 4 | 0.321 | 1.65 | - |
| 5 | 0.765 | 1.75 | + |
| 6 | 0.125 | 1.62 | - |
| 7 | 0.168 | 1.78 | + |
| 8 | 0.202 | 1.81 | + |
| 9 | 0.367 | 1.79 | + |
| 10 | 0.807 | 1.60 | + |



----> CARCINOMAS INVASORES 1 A 10 Y LIE-AG 1 Y 2.

----> CONTROL + Y LIE-AG 4 A 14.

----> LIE-AG 15 Y 16, LIE-BG 1 A 10.

----> CONTROLES, OPTIMIZACION.

TABLA XV_(A) Dot blotting. Autorradiografía (superior) y sus curvas gráficas en base a las señales de grises emitidas (inferior).

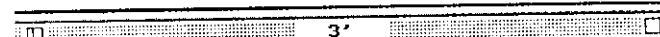
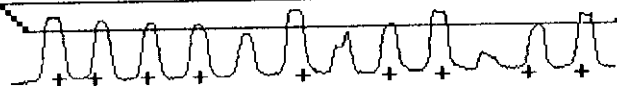
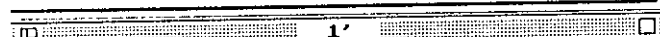
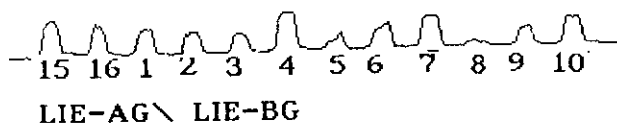
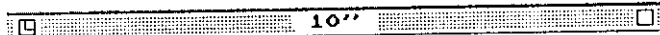
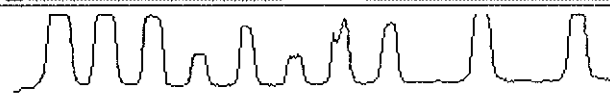
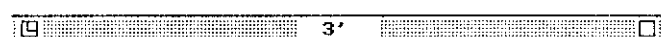
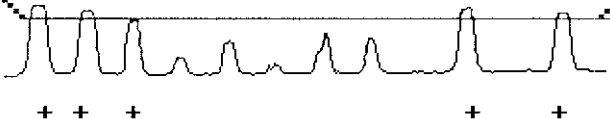
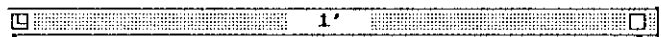
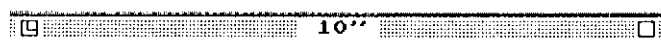
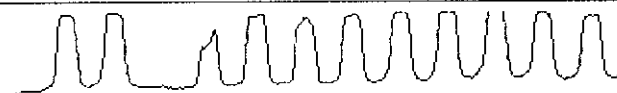
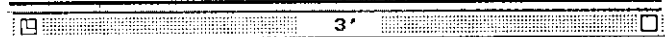
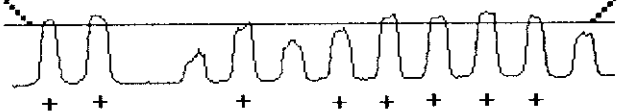
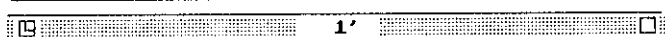
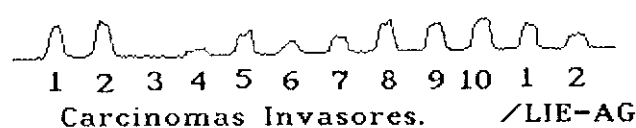
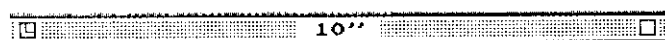
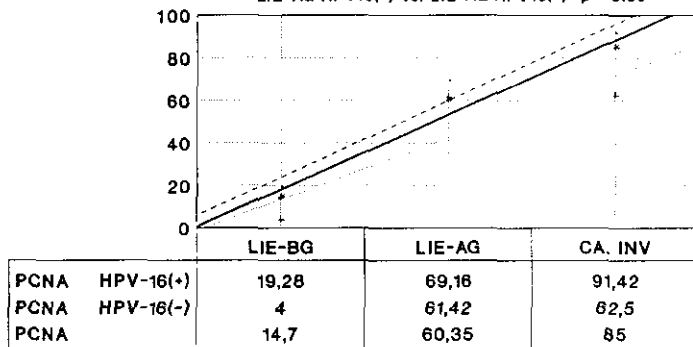


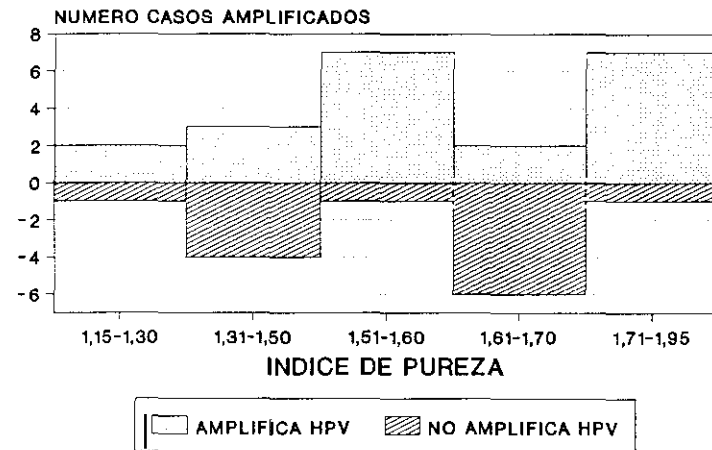
TABLA XVI(A) RESUMEN DE RESULTADOS PCR, PCNA INDICE DE PROLIFERACION Y PRESENCIA E6 HPV-16

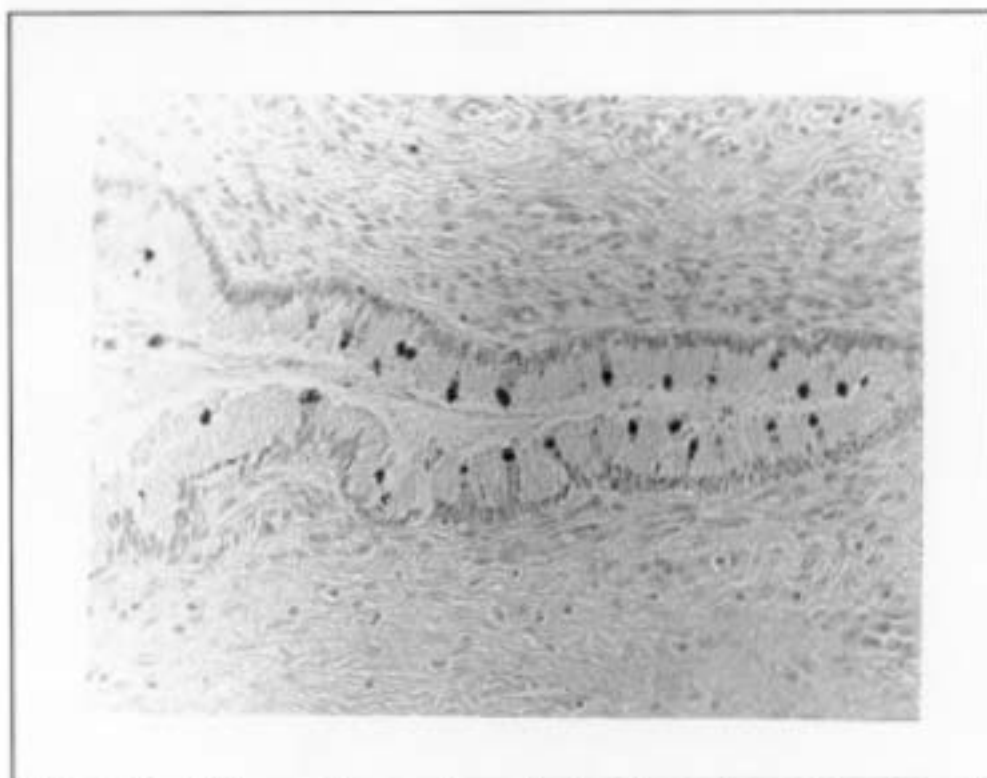
LIE-AG HPV16(+) vs. LIE-AG HPV16(-) p < 0,06



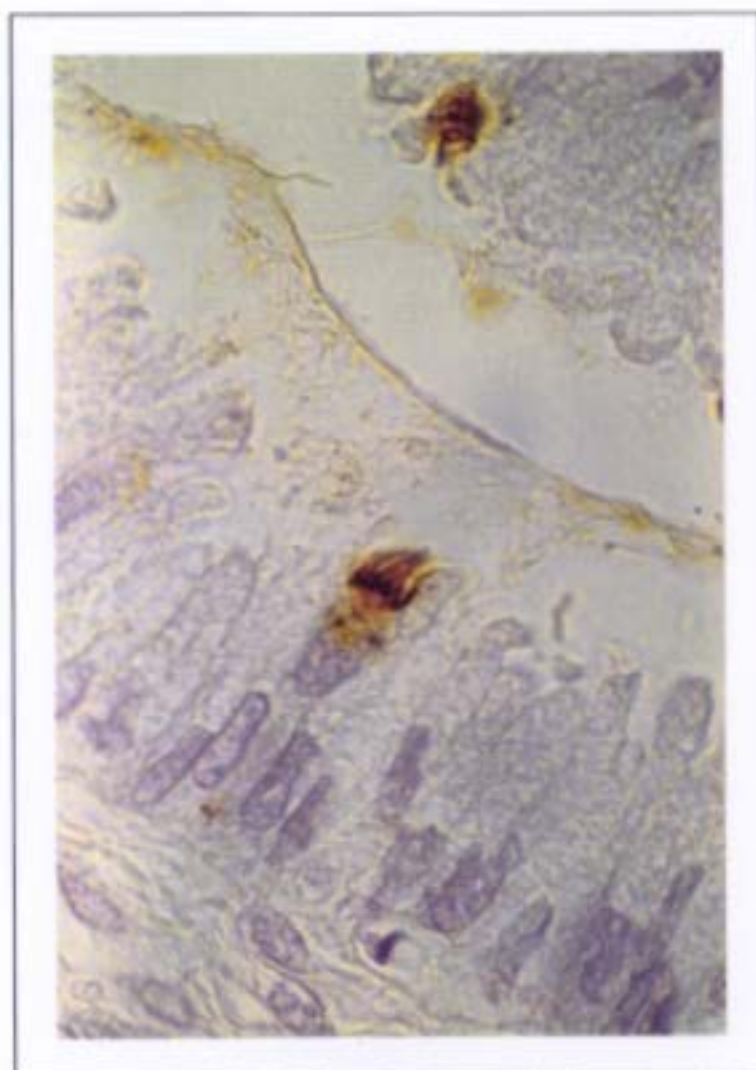
--- PCNA HPV-16(+) + PCNA HPV-16(-)
— PCNA

PUREZA EXTRACCION DNA/ AMPLIFICACION PCR

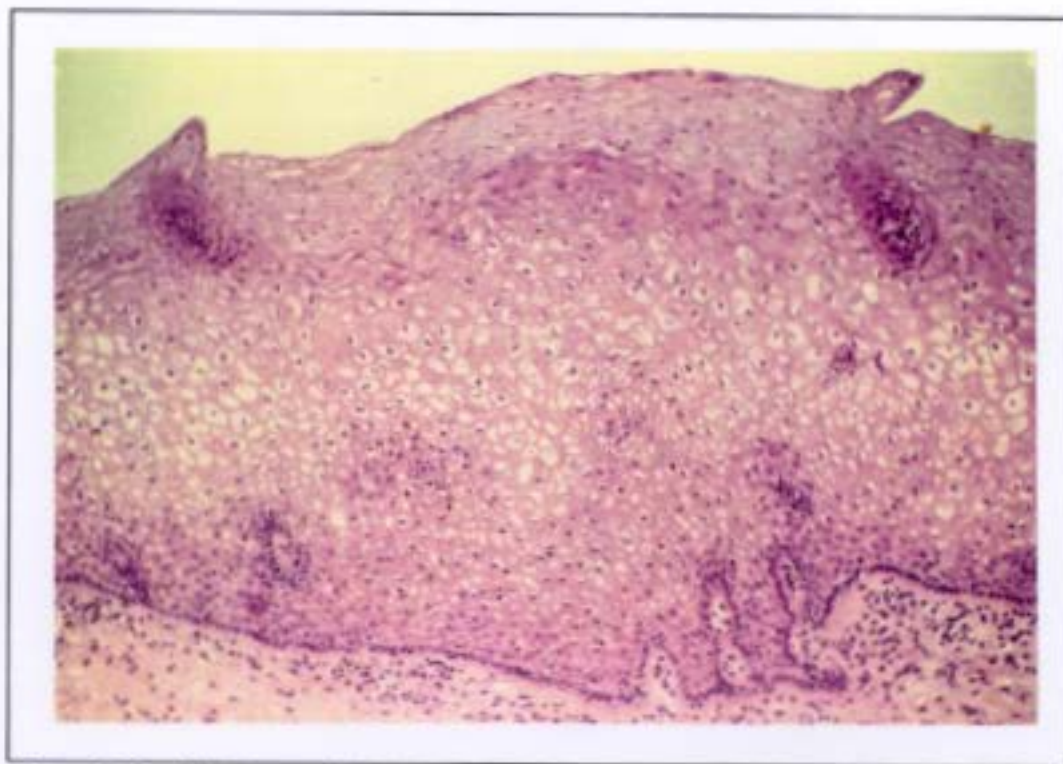




Ilustr. 1 Hendiduras endocervical pseudoglandulares. Expresión positiva del anticuerpo BG1 localizada en los cilios de algunas células de la hendidura.



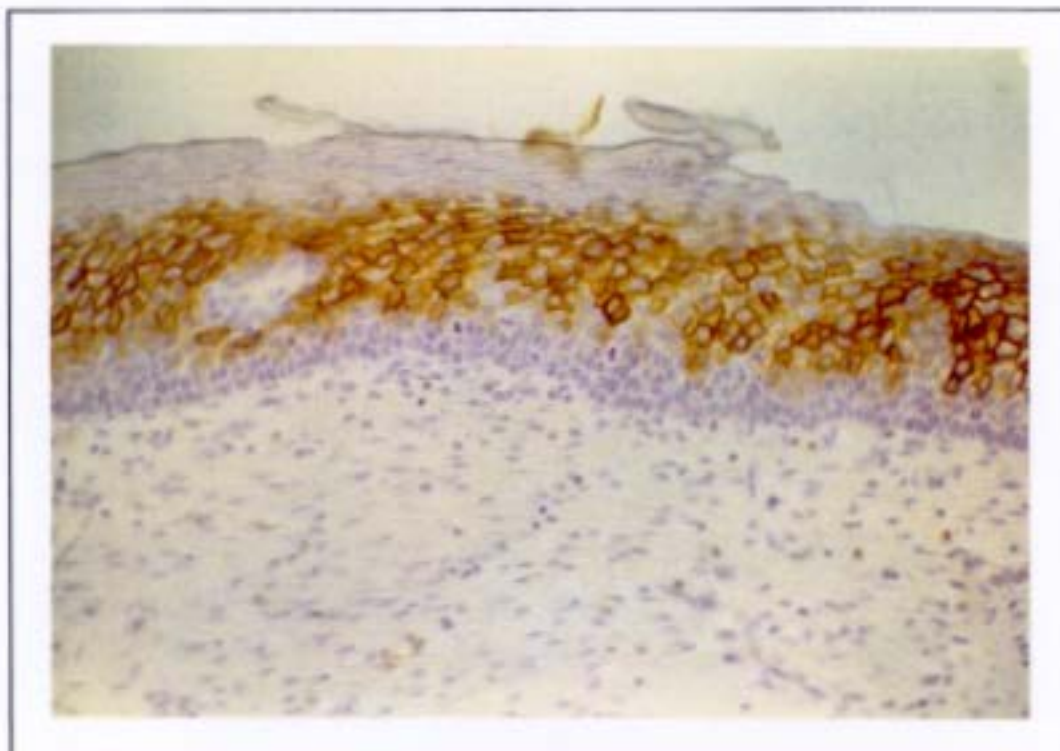
Ilustr. 2 Detalle de la expresión ciliar del MoAb BG1.



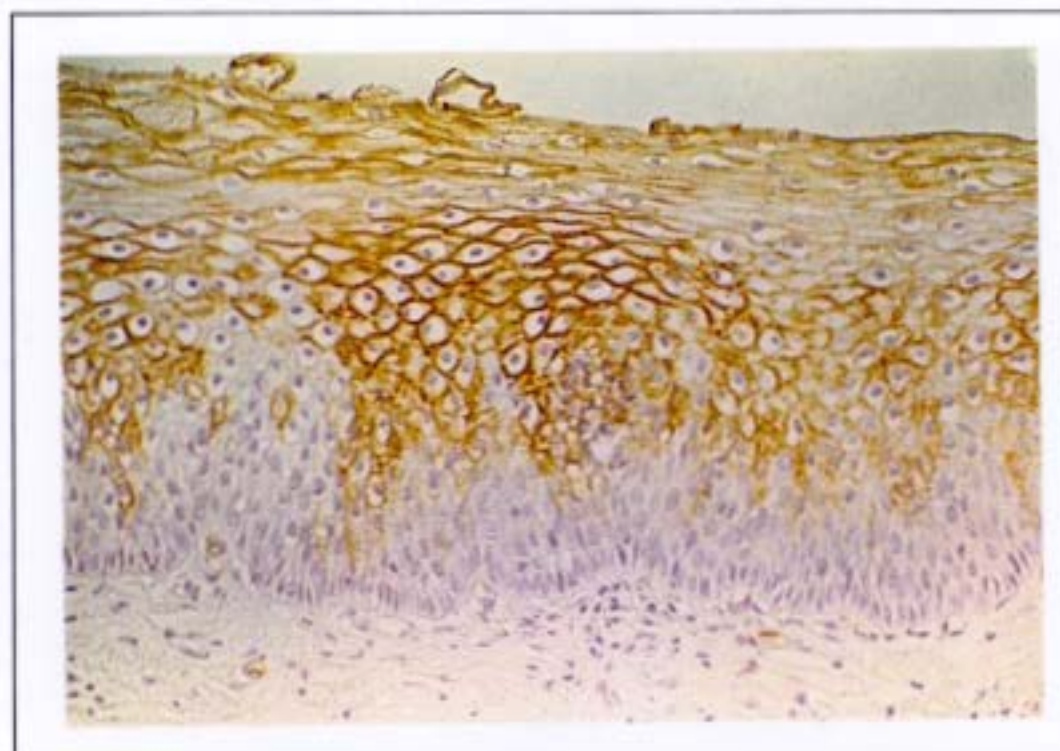
Ilustr. 3 Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado. Cambios morfológicos relacionados con infección por HPV (Condiloma Plano). H.E.



Ilustr. 4 Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado (Condiloma Plano). Expresión uniforme del MoAb BG2 en el tercio medio del epitelio pavimentoso por encima de la capa basal que se muestra negativa.



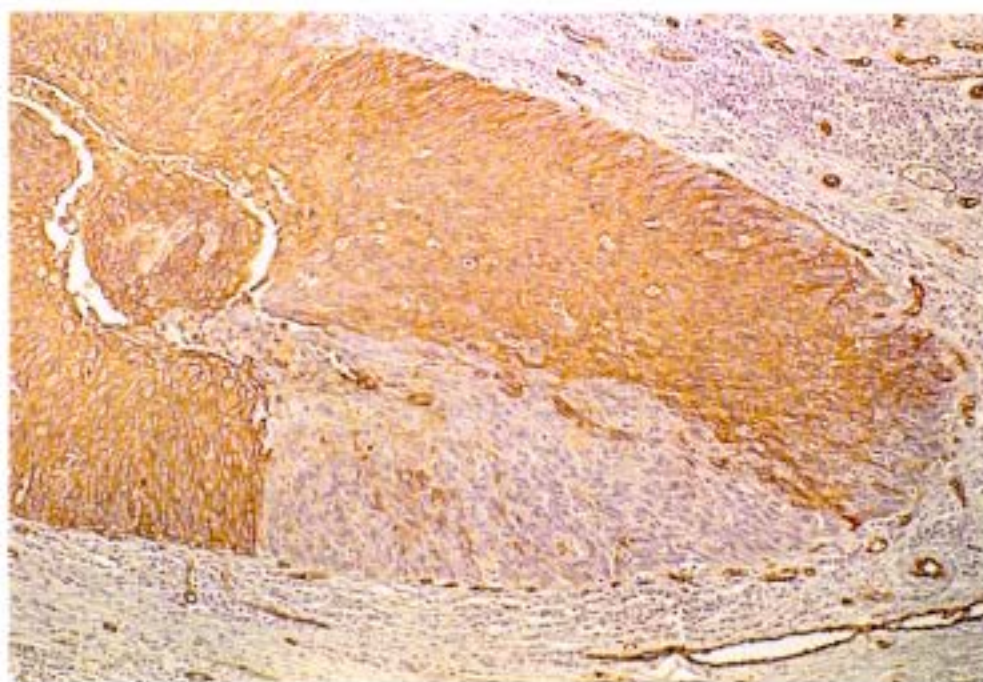
Ilustr. 5 Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado. Cambios morfológicos relacionados con infección por HPV. Ligera hiperplasia basal negativa para la expresión del MoAb BG2, y su expresión en el tercio medio del epitelio.



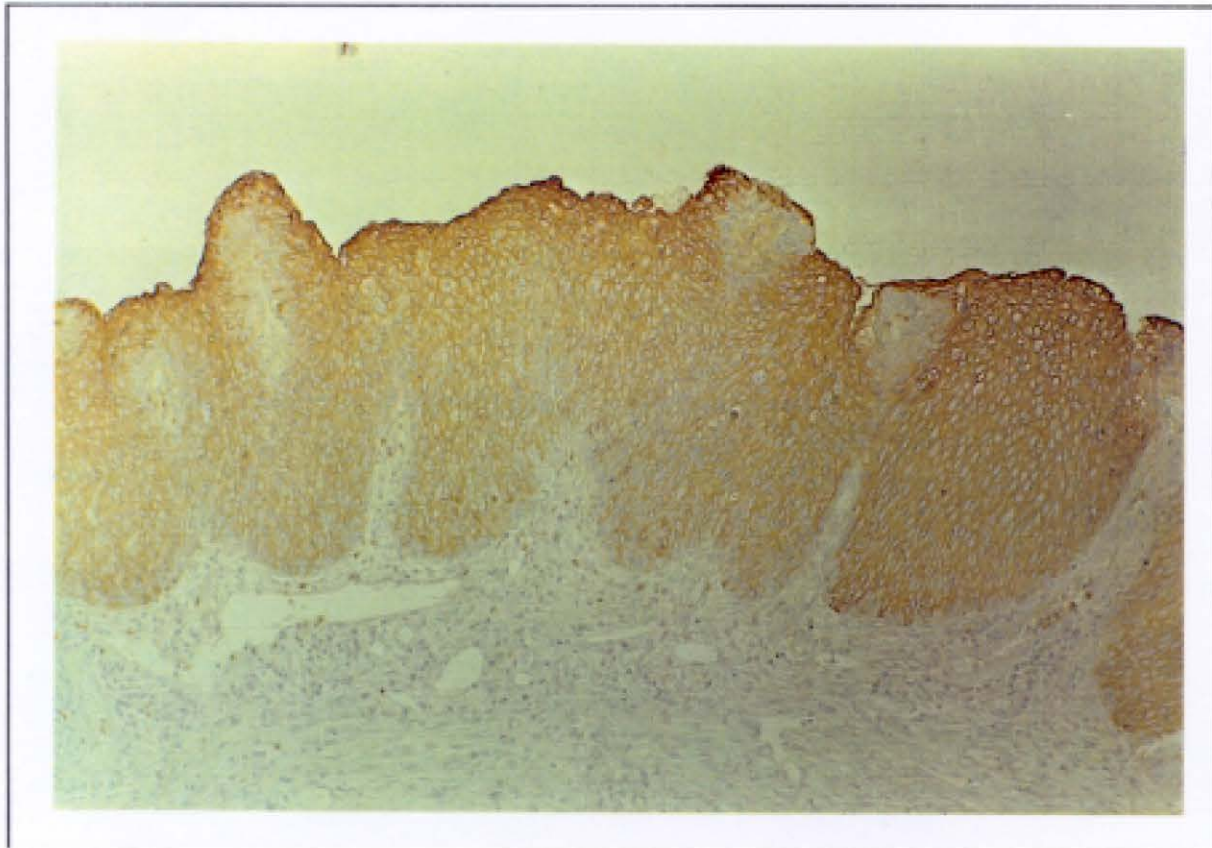
Ilustr. 6 CIN I con cambios morfológicos relacionados con infección por HPV. Ausencia de expresión del MoAb BG2 en las capas basales y parabasales, y expresión de este Ab. en el tercio medio del epitelio.



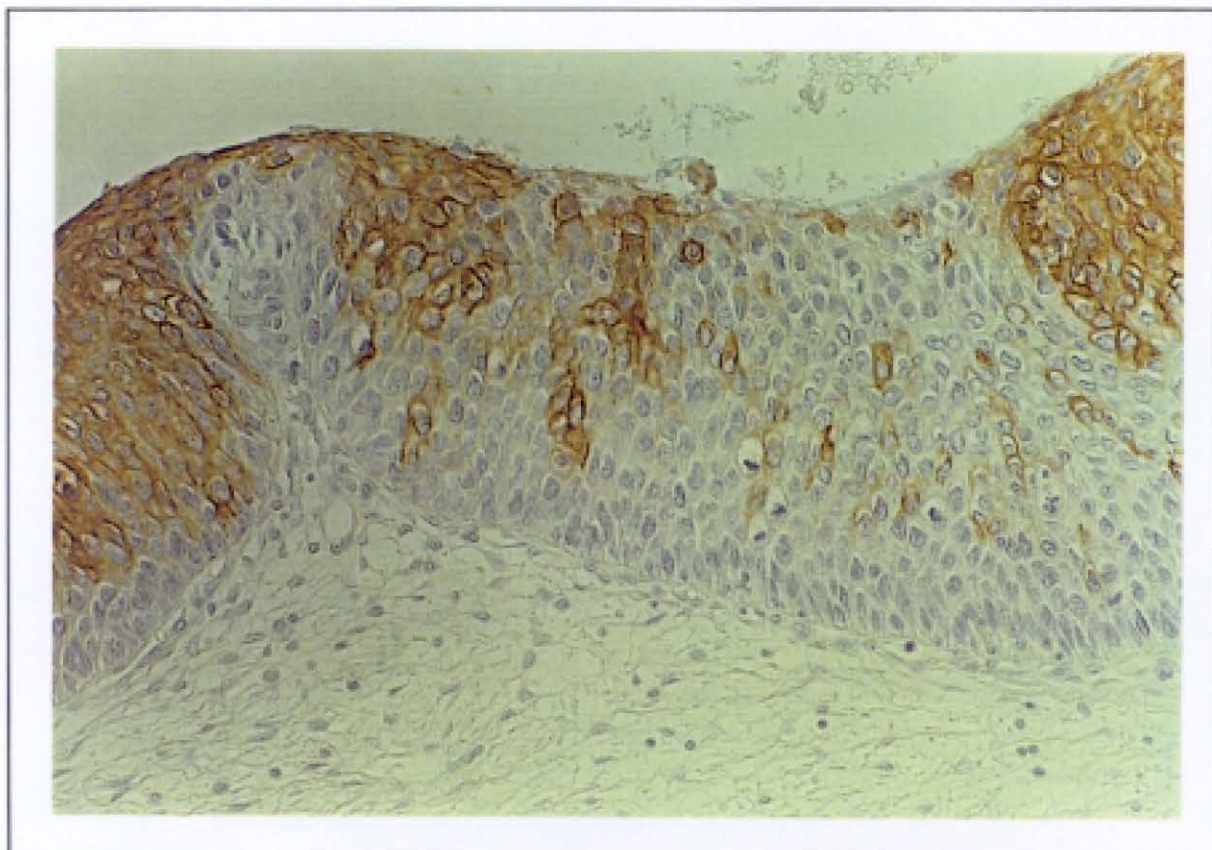
Ilustr. 7 Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado. Extensión de CIN III en las hendiduras pseudoglandulares que muestran una celularidad con expresión heterogénea y disminución de la expresión del MoAb BG2.



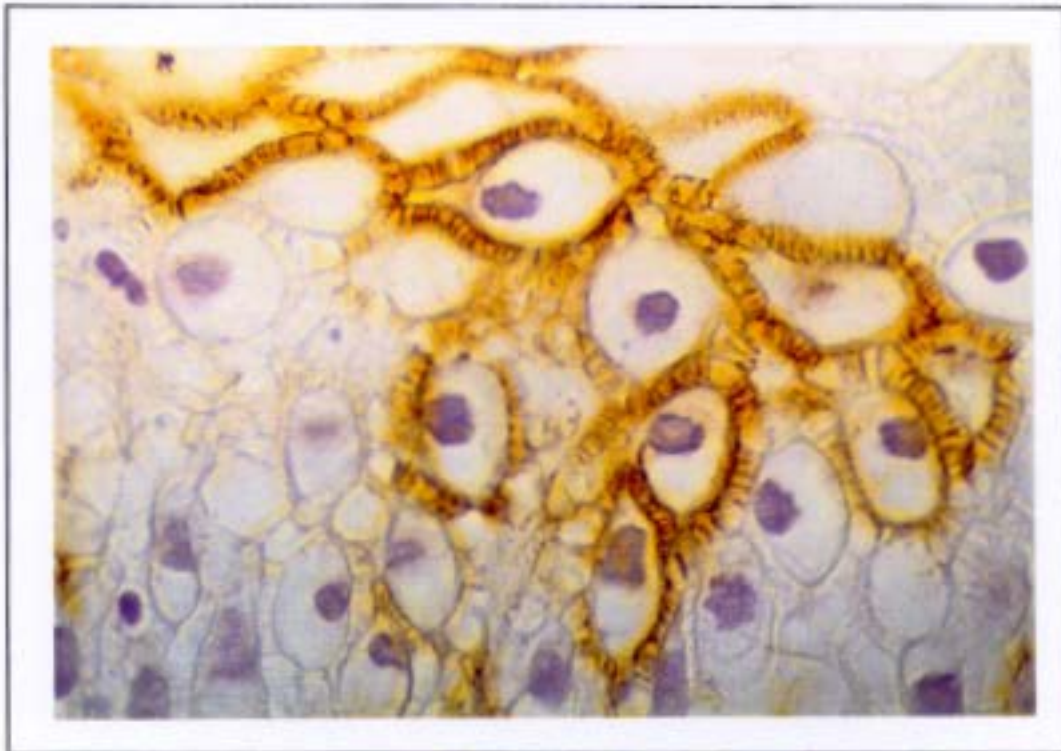
Ilustr. 8 CIN III. Detalle de la misma lesión donde se observa un corte brusco de expresión del MoAb BG2. Además se puede apreciar la expresión de este Ab. en el endotelio de pequeñas luces vasculares.



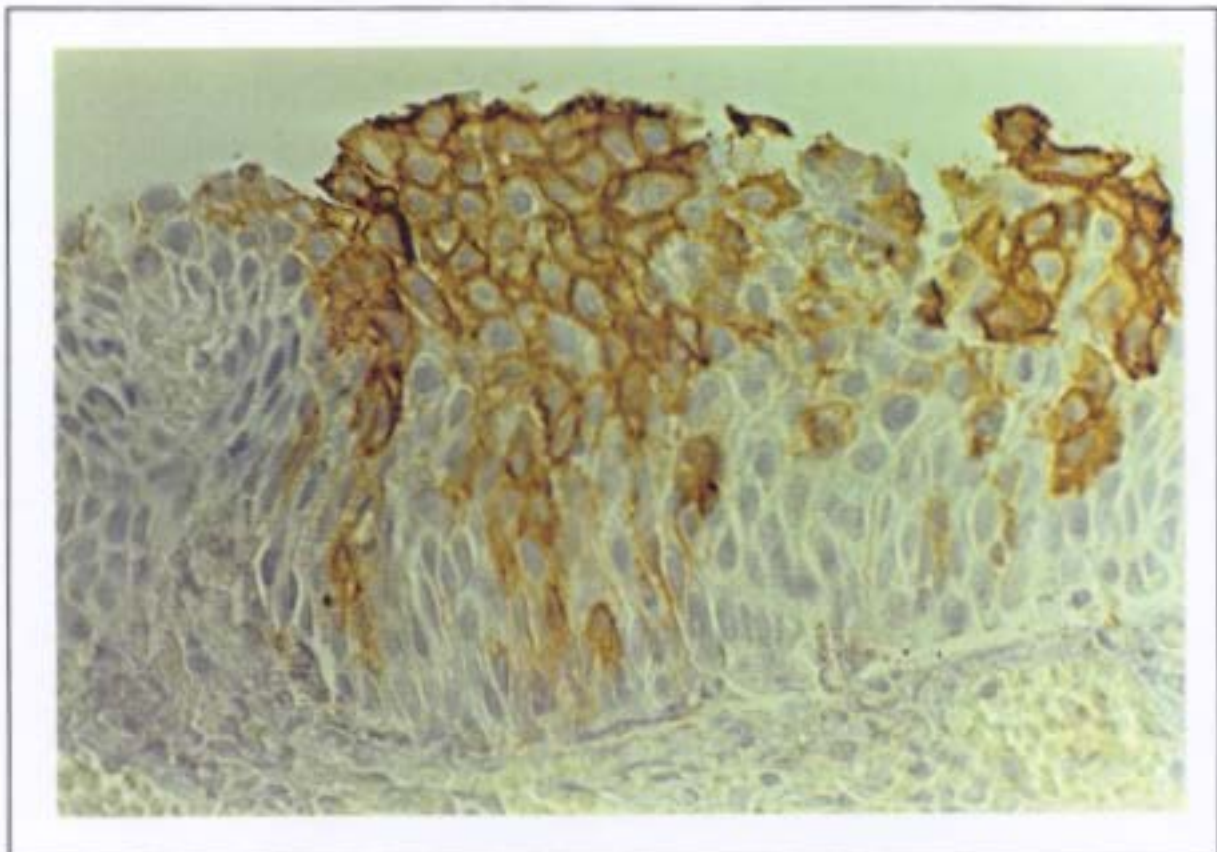
Ilustr. 9 Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado (Condiloma). Expresión del MoAb BG6 por encima de la basal.



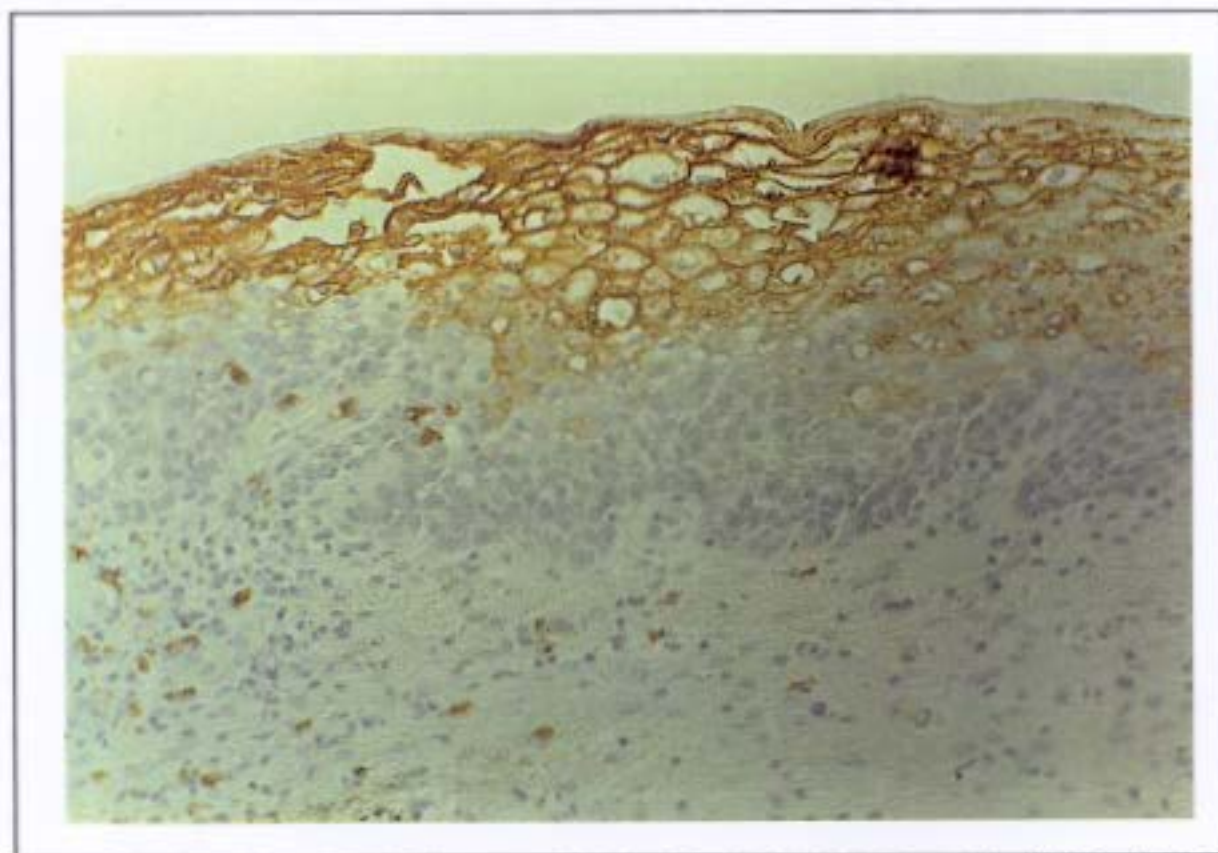
Ilustr. 10 Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado. Area de expresión heterogénea del MoAb BG6 en un CIN III.



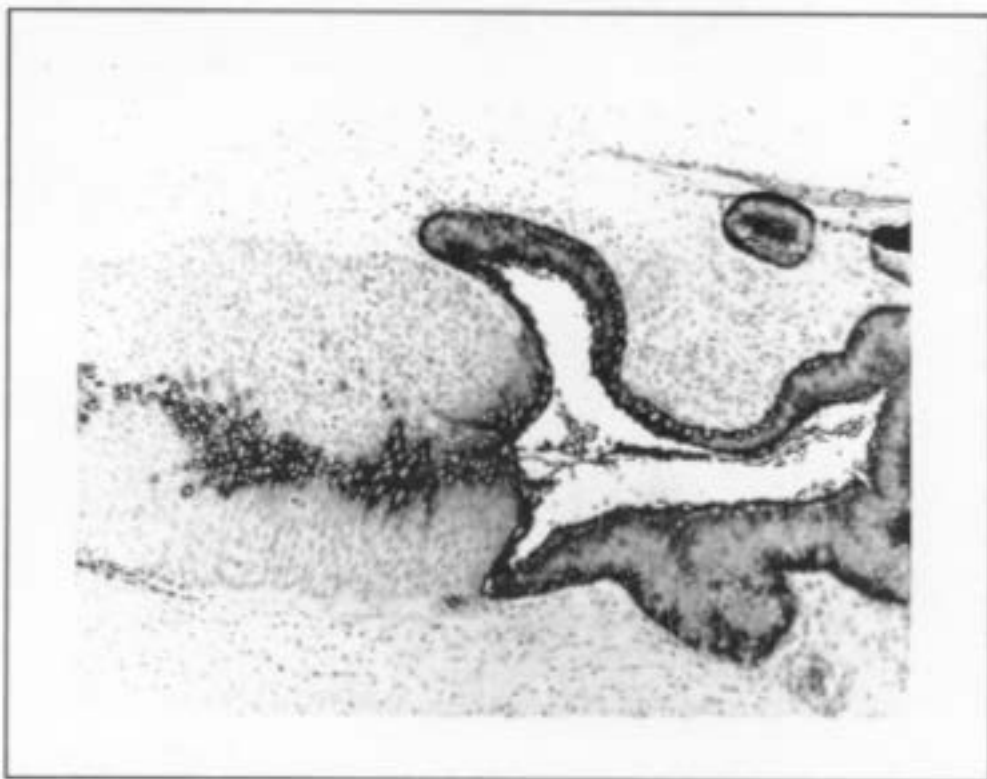
Ilustr. 11 De talle de la expresión de membrana en "panal" del MoAb BG6 en las células intermedias.



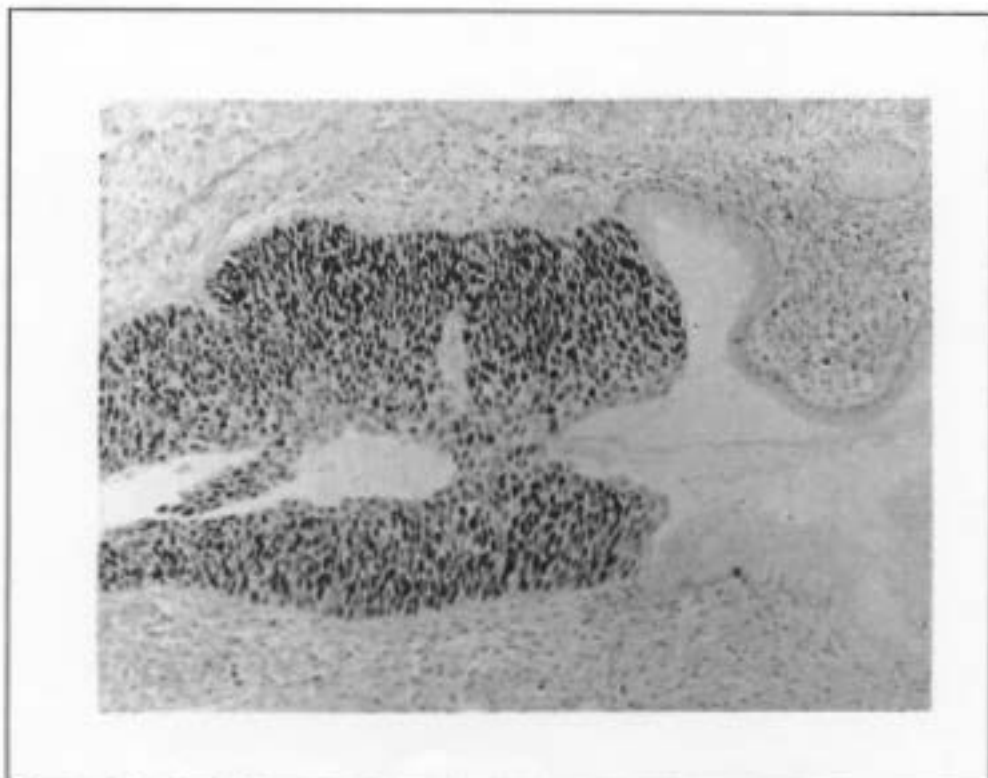
Ilustr. 12 Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado. Area de expresión heterogénea del MoAb BG6 en un CIN III con un patrón en "panal" menos definido en comparación con la ilustración superior.



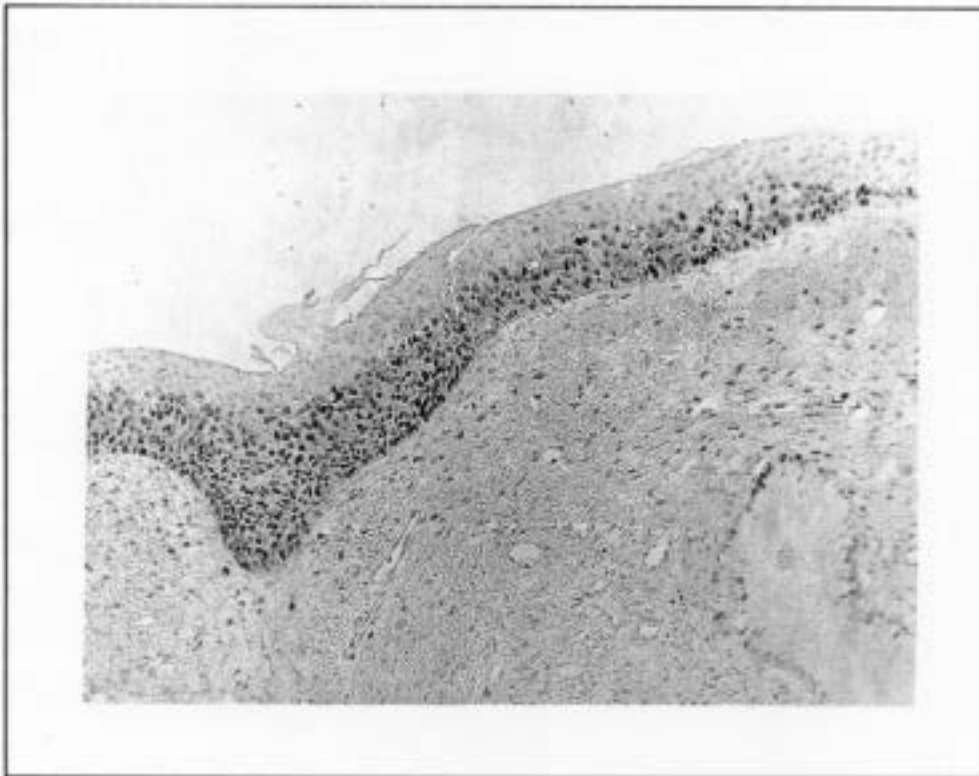
Ilustr. 13 Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado (CIN II). Expresión del MoAb BG7 por encima de una basal hiperplásica y despolarizada.



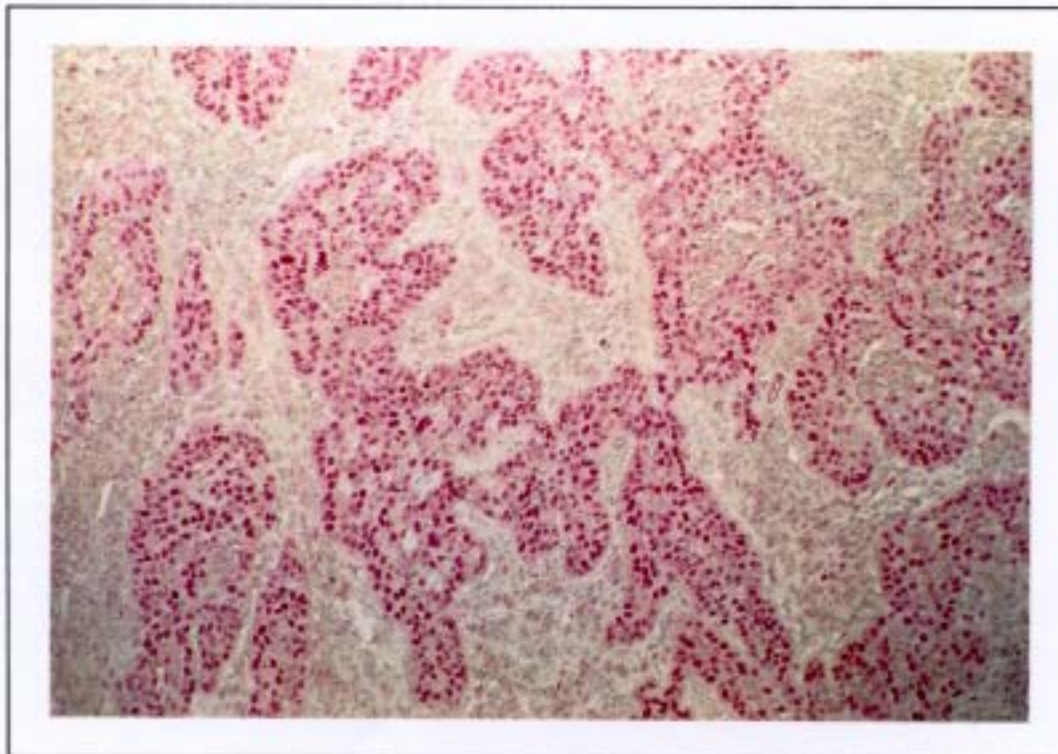
Ilustr. 15 Hendiduras endocervical pseudoglandulares con expresión positiva para BG5 y CINIII con pérdida de expresión periférica del mismo.



Ilustr. 16 Hendiduras endocervical pseudoglandulares y CIN III con expresión de la proteína PCNA en un 85% de la celularidad, preferentemente en la periferia donde no se expresaba el BG5.



Ilustr. 17 Lesion Intraepitelial Escamosa de Alto Grado. Expresión suprabasal de PCNA en un 75% del epitelio.



Ilustr. 18 Expresión de PCNA en un 100% de la celularidad de un carcinoma epidermoide invasor.