

AH 01401

84856

T
354

24956

**ASOCIACION DEL DESEQUILIBRIO HORMONAL Y DE
RECEPTORES DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA EN
INFECCION POR PAPILOMA VIRUS HUMANO Y
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

PRESENTA
M. EN C. EDITH LUCIA SALAZAR ESQUIVEL

**EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
PERTENECE AL PADRÓN DE POSGRADOS DE
EXCELENCIA DEL CONACYT Y ADEMÁS CUENTA CON
EL APOYO DEL MISMO CONSEJO
CON EL CONVENIO PFP-20-93”**

**EL JURADO DESIGNADO POR LAS DIVISIONES DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y DE LA SALUD DE LAS UNIDADES IZTAPALAPA Y XOCHIMILCO APROBÓ
LA TESIS QUE PRESENTÓ:**

EDITH LUCIA SALAZAR ESQUIVEL

EL DIA 1° DE MARZO DEL AÑO 2004.

COMITÉ TUTORIAL:

Tutor: DR. EFRAÍN MERCADO PICHARDO



Asesor: DR. ARTURO SALAME MÉNDEZ

Asesor: DRA. REYNA C. FIERRO PASTRANA



Sinodal: DR. JOSÉ DOMINGO MÉNDEZ FRANCISCO



Sinodal: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN



AGRADECIMIENTOS:

***A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA***

***A LA COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
DEL IMSS, POR EL APOYO RECIBIDO
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE
DOCTORADO***

AGRADECIMIENTOS AL:

DR. EFRAÍN MERCADO PICHARDO

DR. ARTURO SALAME MÉNDEZ

DR. REYNA C. FIERRO PASTRANA

*Por su apoyo durante la realización
de este Doctorado*

DR. JOSÉ DOMINGO MÉNDEZ FRANCISCO

DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

*Por sus valiosas aportaciones para
mejorar y enriquecer el
presente trabajo*

DR. RUBÉN ROMAN RAMOS

*Por su apoyo para la culminación de este
Doctorado*

A la persona que inspira cada día de mi vida, a mi hija “ Brenda “

Bendiciones para hoy y siempre

Ruego a Dios intensamente

Envíe sobre ti eternamente

Navidad inolvidable aquella

Donde llegaste como estrella

Angel que hizo mi vida bella

**A mis hermanas, sobrinos y
sobrinos-nietos y a toda
mi familia y amistades
que estan siempre en mi pensamiento**

y a todos mis compañeros del IMSS

**DEDICO EL PRESENTE ESTUDIO A LA MUJER MEXICANA QUE POR
IGNORANCIA O POR CUMPLIR CON “SU MISIÓN” ESTA EXPUESTA CADA
DÍA A GRANDES RIESGOS QUE ATENTAN CONTRA SU VIDA**

RESUMEN

El tejido cervical es estrógeno – regulado, pero la respuesta clínica a la influencia hormonal, varía entre mujeres. Esto podría indicar que existen algunas diferencias en cuanto a la sensibilidad a las hormonas, a la cantidad de receptores hormonales activos intracelulares o a diferencias en el receptor mismo, en cuanto a capacidad para reconocer, aceptar y transcribir el mensaje que contienen.

El receptor de estradiol (RE), es una proteína activada por factores de transcripción nuclear, siendo un importante regulador del crecimiento y diferenciación de células estrógeno-reguladas. En ausencia del ligando, el RE se encuentra asociado a proteínas de choque térmico como las HSP90 formando un complejo oligomérico. Cuando une a estrógenos, el RE se disocia de este complejo, uniéndose en el núcleo, a secuencias específicas del DNA llamadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE), localizadas en la región promotora de genes regulados por estas hormonas. El procesamiento después de la unión con su ligando, puede alterar sensiblemente su concentración subcelular. Sin embargo, los mecanismos responsables de este control, son actualmente desconocidos.

Por otro lado, las causas de algunas anormalidades histológicas en el tejido escamoso endocervical y exocervical desde el punto de vista de receptores de hormonas esteroidales, se encuentran aún desconocidas, sin embargo, existen evidencias de que un tejido blanco para estradiol (E₂) puede presentar respuestas muy diversas para sus metabolitos, cuando unen al RE, ejerciendo funciones inusuales a nivel nuclear.

En este trabajo de investigación, se analizaron 30 mujeres como grupo control y 70 pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grados 1, 2 o 3 bajo tratamiento o no, de anticonceptivos orales (ACO). Del total de los casos con NIC, 19 (27.1%) de ellos, correspondieron a NIC aislado y 51 (72.9%) a NIC asociado a infección por virus del papiloma humano (VPH). A cada paciente se le determinaron los niveles serológicos de E₂ y estrona (E₁), así como las concentraciones de RE en cada tejido.

Con respecto a los valores de RE, se encontró una correlación altamente significativa entre los niveles de RE y el grado histológico de NIC entre ambos grupos (pacientes con uso y sin uso de ACO). Del mismo modo, se encontraron los niveles mas altos de RE en los tejidos de NIC 1 de pacientes con uso de ACO ($p < 0.005$), determinándose por tal motivo, que este grupo presenta un incremento en el riesgo relativo para la presentación de NIC (RR= 1.31, 95% CI 1.0 - 2.3).

Por otro lado, la media de los valores ($M \pm DE$) de E₂ y E₁ en mujeres sanas sin uso de ACO fueron 0.07 ± 0.03 ng/ml y 0.06 ± 0.02 ng/ml, respectivamente. Los valores correspondientes para pacientes con NIC sola y asociada a VPH sin uso de ACO fueron 0.074 ± 0.03 ng/ml y 0.076 ± 0.03 ng/ml y de 0.080 ± 0.03 y 0.148 ± 0.02 , respectivamente, lo cual revela una acción estrogénica mayor en el último grupo ($p < 0.05$). Así mismo, la media de los valores ($M \pm DE$) de E₂ y E₁ en mujeres sanas con uso de ACO fueron 0.09 ± 0.05 ng/ml y 0.072 ± 0.04 ng/ml, respectivamente. Los valores correspondientes para pacientes con NIC sola y asociada a VPH con uso de ACO fueron de 0.103 ± 0.03 y 0.072 ± 0.02 ng/ml y de 0.143 ± 0.03 y 0.138 ± 0.03 ng/ml, respectivamente para ambas hormonas, lo cual revela una mayor actividad estrogénica en pacientes en donde se encontraba asociado el VPH ($p < 0.05$).

Se propone que el incremento de los niveles de hormonas endógenas y/o sus metabolitos (particularmente E_1 y $16\alpha\text{-OH } E_1$) podrían funcionar como promotores de cáncer cervical, a través de una proliferación celular incontrolada e inducida por la unión al RE.

Los estrógenos estimulan la transcripción de E6/E7 y E2 del genoma viral, genes que están directamente involucrados en la transformación y progresión de displasias genitales hasta un estado maligno. El complejo [R - $16\alpha\text{-OHE}_1$] formado, podría funcionar como un potente agonista promoviendo la desregulación de E2 en el genoma viral y con ello, la expresión de los oncogenes E6/E7 del VPH, eventos directamente involucrados en la iniciación y/o promoción de displasias cervicales.

Para explicar la abundancia de RE dominante negativo (RE^-) con predominio conforme avanza el grado de NIC, se sugiere la formación de un RE modificado, a través de una reacción entre el grupo ceto del esteroide y el grupo amino de las lisinas del dominio de unión hormonal del RE, mediante la formación de una base de Schiff entre ambos grupos.

Por otro lado, a lo largo del genoma de VPH 16 se encuentran siete regiones diferentes con alto grado de similitud, a las secuencias de los ERE (AGGTCA-nnn-TGACCT) localizadas en la región promotora del gen, por lo que se propone que el siguiente mecanismo podría realizarse a través de la unión del dominio de unión al DNA del RE, y una de estas secuencias del genoma viral.

ABSTRACT

Cervical tissue is estrogen -dependent, but the clinical response to hormonal influence varies among women. This might indicate a different sensitivity of cervical tissue to hormones as well as different levels of steroid receptors in the cells or different capacity of the receptor structure to recognise, accept and receive the message transmitted by the inductor.

The (estrogen receptor) ER is a protein activated by the nuclear transcription factor and it is an important regulator of growth and differentiation in estrogen-responsive cells. In the absence of (estradiol) E₂, ER is thought to be associated with heat shock proteins like HSP90. Upon estrogen binding, ER dissociates from this complex and binds in the nucleus to a specific DNA sequence, the estrogen-responsive elements (ERE) located in the promoter region of target genes regulated by these hormones. The processing after ligand binding can substantially alter the cellular concentration of ER. However, the mechanisms responsible for this control are unknown.

Findings on the cause of histological abnormalities in the endocervical and exocervical squamous epithelium from the viewpoint of steroid hormone receptors remain unknown. Evidence that target tissues for E₂ respond variably to its metabolites raises questions whether the ER bound to these metabolites might exert unusual functions at the nuclear level.

This research consisted in the examination of 30 normal women and 70 premenopausal females with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade 1, 2 or 3 under or not oral

contraceptive (OC) treatment. There were 19(27.1%) patients with CIN as an isolated condition and 51 (72.9%) with CIN associated to human papillomavirus (HPV) infection. Serum E₂ and estrone (E₁) concentrations, as well as ER levels were determined in each patient.

In this study of users and non-users of OC treatment with NIC, significant correlation was found between levels of ER and histological grading of their CIN in both groups, likewise higher levels of ER were observed in the CIN 1 group tissue from patients who were OC users ($p < 0.005$). OC users had an increased risk (RR= 1.31, 95% CI 1.0 – 2.3).

The mean \pm SD values for E₂ and E₁ were 0.07 ± 0.03 and 0.06 ± 0.02 ng / ml, respectively in normal subjects. Corresponding data in patients with CIN alone or associated to HPV infection in patients without OC treatment were 0.074 ± 0.03 and 0.076 ± 0.03 ng / ml or 0.080 ± 0.03 and 0.148 ± 0.02 ng / ml respectively, which revealed a significantly greater extent of estrogenic action in the latter population ($p < 0.05$). In the same way, the mean \pm SD values for E₂ and E₁ in normal subjects with OC treatment were 0.09 ± 0.05 and 0.072 ± 0.04 ng / ml, respectively. Corresponding data in patients with CIN alone or associated to HPV infection in patients with OC treatment were 0.103 ± 0.03 and 0.072 ± 0.02 ng / ml or 0.143 ± 0.03 and 0.138 ± 0.03 ng / ml respectively for E₂ and E₁ levels which revealed a significantly greater extent of estrogenic action in patients with CIN associated to HPV infection the latter population ($p < 0.05$)

It has been hypothesized that increased levels of endogenous hormones and/or their metabolites (particularly E₁ and 16 α -OH E₁) augment the risk of cervix cancer, through an uncontrollable cell proliferation mediated by the binding to the ER.

Estrogen stimulates the transcription of E6 / E7 and E2 HPV genes, which are directly involved in the cells transformation and progression of genital dysplasias to a fully developed malignant state. Thus, $16\alpha\text{-OHE}_1$ may function as a potent estrogen agonist mediating the initiation and/or the promotion of E6 / E7 and E2-HPV oncogens expression. These results suggest that protein modification could occur through a Schiff base formation between the ceto group of the steroid and the amino groups of lysine residues of the C-terminal hormone-binding region of the ER.

On the other hand, the HPV-16 genome has seven different regions with a high degree of similarity to the ERE (AGGTCA-nnn-TGACCT) sequences. The following mechanism might be through the HPV sequences and $16\alpha\text{-OHE}_1$ -ER complex.

INDICE

ASOCIACIÓN DEL DESEQUILIBRIO HORMONAL Y DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA EN INFECCIÓN POR PAPILOMAVIRUS HUMANO Y NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
INDICE.....	1

I. INTRODUCCIÓN

Antecedentes generales y marco histórico.....	5
1.1 Antecedentes epidemiológicos a nivel mundial	6
1.2 Antecedentes epidemiológicos en México	7
1.3 Antecedentes epidemiológicos en el IMSS	7
1.4 Morbilidad por CaCU en el IMSS	8
1.5 Antecedentes morfológicos y citológicos del CaCU	9
1.6 Zona de transformación	10
2. Infección por virus del papiloma humano (VPH)	11
2.1 Cuadro clínico.....	11
2.2 Morfología de la infección por VPH	14
2.3 Organización genómica del VPH	14
2.4 Clasificación de los VPH	16
2.5 VPH tipo 16 y aspectos clínicos	18

3. Hormonas esteroides	18
3.1 Hormonas esteroides y sus mecanismos de transporte	18
3.2 Receptores esteroides y superfamilia a la que pertenecen	19
3.3 Organización estructural y funcional de los RE	20
3.4 Receptores de estradiol y su organización estructural.....	23
3.5 Receptores de estradiol nativos y mutados	24
II . PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN	27
1. Antecedentes particulares	27
2. Planteamiento del problema	27
3. Justificación 4. Hipótesis 5. Objetivo general	28
6. Objetivos específicos 7. Metas del proyecto	29
8. Diseño del estudio	30
8.1 Muestreo del material biológico.....	31
8.2 Grupos de casos y grupo control.....	31
9. Análisis estadístico	32
III . MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. Universo de trabajo.....	33
2. Selección de la muestra.....	33
3. Especificación de los parámetros estudiados.....	37

4. Determinaciones hormonales	39
4.1 Muestra biológica	39
4.2 Determinación de LH, FSH, PRL y P ₄	40
4.3 Determinación de E ₂ y E ₁	40
5. Determinación de receptores hormonales	40
5.1 Extracción de citosol para la valoración de receptores.....	40
5.2 Estandarización de las condiciones experimentales.....	41
5.3 Cuantificación de receptores de estradiol (RE)	41
5.4 Cuantificación de receptores de progesterona (RPg)	42
6. Determinación de VPH tipo 16	45
 IV . RESULTADOS	 48
1. Estudio citológico e histopatológico	48
2. Estudio clínico.....	53
3. Estudio de los casos por uso de anticonceptivos orales (ACO).....	55
4. Presencia de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), VPH y ACO.....	61
5. Estudios hormonales de LH, FSH, PRL, P ₄	62
5.1 Niveles serológicos de E ₂ y P ₄	62
5.2 Niveles serológicos de E ₂ y E ₁	65
6. Estudio de receptores hormonales.....	66
6.1 Estandarización de las técnicas.....	66
6.5 Determinación de receptores de estradiol (RE)	68

6.6 Determinación de receptores de progesterona (RPg).....	70
6.7 Concentración de RE y RPg en los tejidos estudiados	71
7. Estudio de secuencias para VPH tipo 16	76
V. DISCUSIÓN	77
1. Estrógenos y su papel durante la carcinogénesis.....	81
2. Metabolismo del estradiol y receptores estrogénicos.....	81
3. Isoformas del receptor de estradiol y efectos agonistas.....	83
4. VPH y su papel durante la carcinogénesis	85
5. Metabolismo del estradiol, VPH y carcinogénesis cervical	86
6. Significado fisiológico de los resultados.....	86
7. RE (región E), 16 α -hidroxilación y carcinogénesis cervical	88
8. Elementos de respuesta a estrógenos (ERE), VPH y RE (región C)	92
VI. CONCLUSIONES	95
VII. BIBLIOGRAFÍA	97
VIII. PRODUCTOS DEL PROYECTO	106

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES Y MARCO HISTÓRICO

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento anormal y diseminado de células que al desarrollarse en forma incontrolada, avanzan entre los tejidos normales alterando así el funcionamiento del organismo. Este se inicia casi siempre como una enfermedad localizada.

Con respecto al cáncer cervicouterino (CaCU) se reconocen dos tipos histológicos principalmente: el epidermoide o de células escamosas y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano que recubre el ectocervix y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical (1).

El origen histológico del CaCU es de tipo epidermoide en el 85 a 90% de los casos y generalmente aparecen la unión del canal cervical y el ectocervix. En esta área el epitelio columnar es reemplazado por epitelio escamoso. La historia natural del CaCU se inicia por cambios intraepiteliales clasificados como displasias, las cuales son lesiones precursoras que pueden conducir hasta un carcinoma invasor (2).

La mayor parte de estas displasias son diagnosticadas en la mujer, después de los veinte años, el cáncer in situ se presenta de manera significativa entre los 30 y 39 años y el carcinoma invasor después de los 40 años (3,4).

La citología surgió como un procedimiento diagnóstico gracias a los estudios de varios autores, entre los que se deben mencionar a Papanicolaou y Traut (5) los cuales

en 1941 publicaron el artículo “ The diagnosis value of vaginal smears in carcinoma of the uterus” en donde se muestra la utilidad del método fundamental en el diagnóstico oportuno de CaCU. Estas aportaciones junto con otras (6,7) se han considerado como las primeras en el mundo en relación con el diagnóstico por medio de la citología (8,9).

En 1976 zur Hausen planteó una hipótesis en donde propuso al virus del papiloma humano (VPH) como el agente etiológico sexualmente transmitido en el humano y responsable de la transformación neoplásica del cuello uterino (10).

Ademas de estos antecedentes, se cuenta con el reporte de infecciones en algunos animales de tipo vacuno y equino, así como en conejos, perros, roedores y pájaros, en los que se han identificado lesiones de tipo papilomatoso como el tumor de Shope en la piel de conejos y el cáncer de esófago en bovinos, en los que se ha encontrado VPH tipo 4 (11,12).

1.1 Antecedentes epidemiológicos a nivel mundial.

El CaCU es una de las neoplasias mas comunes que afectan a la mujer. En el ámbito mundial, el CaCU es la segunda causa de morbilidad y mortalidad, ya que es el causante de 160 000 muertes por año.

En América Latina y el Caribe, se presentan las más altas tasas de incidencia de CaCU (13) ya que cada año mueren más de 25 000 mujeres por CaCU en esta región (14). Esto contrasta con los países industrializados que en gran medida han logrado abatir la mortalidad mediante programas de detección oportuna de cáncer de alta cobertura a nivel poblacional (15).

1.2 Antecedentes epidemiológicos en México.

En la República Mexicana se tiene calculado, que cada dos horas fallece una mujer por CaCU presentándose anualmente más de 4 000 muertes (16). Durante los últimos quince años se estima que han ocurrido mas de 62 000 fallecimientos en el país, a pesar de la existencia de un programa nacional de detección oportuna desde hace mas de veinte años. Estas cifras y una serie de estudios realizados por el Instituto Nacional de Salud Pública, demuestran desafortunadamente que este programa de detección, ha tenido un impacto casi nulo para la disminución en la frecuencia de esta enfermedad, por lo que continúa siendo un problema de salud pública importante.

Analizando la incidencia en mujeres de 25 años o más, se ha ubicado como el segundo tipo de neoplasia, así como la principal causa de muerte por tumores malignos en la mujer. En 1997 se registró una tasa de mortalidad del 5.27 por cada 100 000 habitantes (17) cifra que se incrementa cada vez más, ya que en el año 2000 se reportaron 37 000 casos con una tasa de mortalidad correspondiente a 6.85 (18).

1.3 Antecedentes epidemiológicos en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

El CaCU se ha mantenido en los últimos 20 años como la segunda neoplasia en orden de frecuencia en la población derechohabiente del IMSS sin embargo, entre la población femenina se le ubica en primer lugar.

En relación con la mortalidad general, se encuentra dentro de las diez primeras causas de muerte en el grupo de los 35 a los 44 años de edad, es la cuarta causa de muerte y una de las primeras diez en todos los grupos de edad comprendidos entre los 35 y los 64 años, después de esta edad, se desplaza por otras causas competitivas de defunción.

En los últimos veinte años, la tendencia a la mortalidad por CaCU se ha mantenido entre los límites de 6.4 a 9.3 defunciones por cada 100 000 derechohabientes (Tabla 1) (19).

Tabla 1. Las diez neoplasias principales en la población global y femenina del IMSS. (año 2001)

Causa de defunción	Tasa en mujeres	Tasa en hombres	Pobl. global
Tráquea, bronquios y pulmón	3.4	9.0	6.1
Cuello uterino	9.3	-	4.3
Mama	6.9	0.1	3.7
Estómago	2.6	4.0	3.3
Próstata	-	5.8	2.8
Hígado y conductos biliares	2.6	3.0	2.8
Leucemia linfoide	2.4	2.6	2.5
Páncreas	2.4	2.4	2.4
Colon y recto	2.1	2.3	2.2
Leucemia mieloide	1.7	1.9	1.8

Tasa por 100 000 derechohabientes (18)

1.4 Morbilidad por CaCU en el IMSS.

La distribución de la incidencia es desigual en el IMSS y oscila de 0.27 en Yucatán hasta 27.8 en Chiapas. Los estados con la mayor ocurrencia de este padecimiento son Chiapas, Veracruz, Quintana Roo, Chihuahua y Tabasco. Aquellos con la menor incidencia corresponden a Yucatán, Aguascalientes y el Distrito Federal (20).

El estado de Morelos muestra tasa baja de incidencia pero altas tasas de mortalidad, lo que hablaría de una menor sobrevivencia al padecimiento. Lo contrario se aprecia con Tabasco, Guerrero y Oaxaca, que tienen tasas altas de incidencia y su mortalidad es de las

más bajas. Es indudable que problemas en la certificación y notificación de casos contribuyen a explicar esta aparente paradoja.

Los Estados de Quintana Roo, Colima, Chiapas y Tamaulipas, son estados que notifican las mayores tasas de incidencia y mortalidad, mientras que Aguascalientes, Baja California Sur y Distrito Federal coinciden en informar baja incidencia y mortalidad (21).

1.5 Antecedentes morfológicos y citológicos del CaCU.

El cuello uterino está tapizado por dos tipos de epitelios, el exocervical que es plano y pavimentoso y el endocervical que es cilíndrico y mucosecretor.

La mucosa endocervical está tapizada por una hilera de células cilíndricas productoras de moco. Esta secreción tiene funciones específicas y suele modificarse por influencia de estrógenos y progesterona (22).

El sitio anatómico en donde se localiza la unión de ambos epitelios es muy variable y dependiente de la acción de las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona), lo que a su vez se relaciona con la edad.

A la unión de estos epitelios se denomina “zona de unión escamocolumnar” la cual es dinámica y sujeta a cambios constantes relacionados con la acción de las hormonas como los estrógenos (estradiol y estrona principalmente), que transforman el epitelio cilíndrico mucosecretor en epitelio pavimentoso. Debido a que en esta área hay cambios muy activos, se le denomina “zona de transformación” en donde se realizan numerosos fenómenos de tipo proliferativo y de remodelación, a los que se les da el nombre de metaplasia (23) (Figura 1).

1.6 Zona de transformación.

La metaplasia se presenta como cambios fisiológicos normales y dinámicos, pero en ocasiones como consecuencia de estímulos inflamatorios importantes. Koss (24) señala la frecuencia con que se presenta este fenómeno y Patten (25) señala que la metaplasia y epidermización corresponden a efectos de protección.

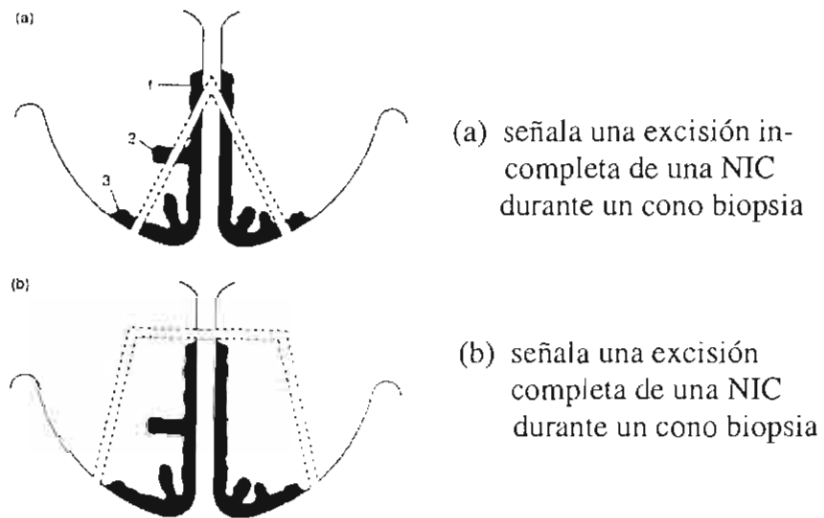


Figura 1. Zona de transformación del cuello uterino (1)

2. INFECCIÓN POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

2.1 Cuadro clínico.

El aspecto clínico de la infección se inicia cuando el virus penetra en el epitelio del cuello uterino o de la vagina, los cuales al estar en continuo crecimiento y maduración, resultan ideales para la infección y desarrollo del virus.

Esta infección se realiza a través de microabrasiones de ahí, el virus alcanza la zona basal y dependiendo del tipo de VPH que se trate, se desencadenarán una serie de cambios displásicos.

La infección puede no manifestarse inmediatamente, habiendo un período de latencia mediado por factores dependientes del virus y del huésped (26), por lo que las lesiones se presentarán bajo tres modalidades: infección clínica, infección subclínica o infección latente (27). La infección clínica produce síntomas y puede verse a simple vista en forma de lesiones verrugosas o condilomatosas, la infección subclínica se hace evidente utilizando algún procedimiento como el colposcopio y la infección latente puede identificarse por medio de investigaciones virológicas, ya que no hay cambios macro ni microscópicos en el epitelio escamoso infectado. Su evolución a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y CaCU, depende de varios factores (Figura 2) entre otros, el tipo de genoma infectante, la edad de la paciente y estado inmunológico (28).

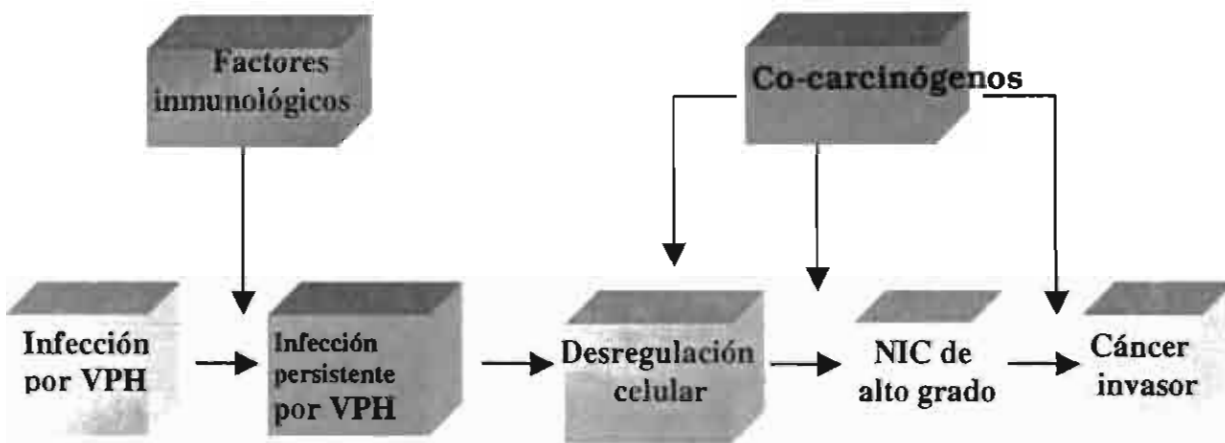


Figura 2. Diagrama de la evolución de la infección por VPH a cáncer invasor del cervix (8)

Las características biológicas del huésped aunadas al potencial oncogénico del virus (Figura 3) divide a los pacientes infectados en dos grupos: el afectado con los tipos 6 y 11 que tienen poca o nula capacidad oncogénica y con aspectos morfológicos de condiloma acuminado, cuyas lesiones pueden evolucionar hasta su desaparición para probablemente reaparecer cuando las condiciones del huésped así lo permitan. Bajo estas circunstancias, el virus se encuentra en forma de episomas circulares produciendo en las células infectadas, cambios citológicos llamados coilocitosis y queratinización. En el otro grupo de pacientes, se encuentran involucrados principalmente los tipos 16 y 18 del VPH, donde el DNA viral se encuentra integrado al DNA de la célula huésped a la que transforman (29).

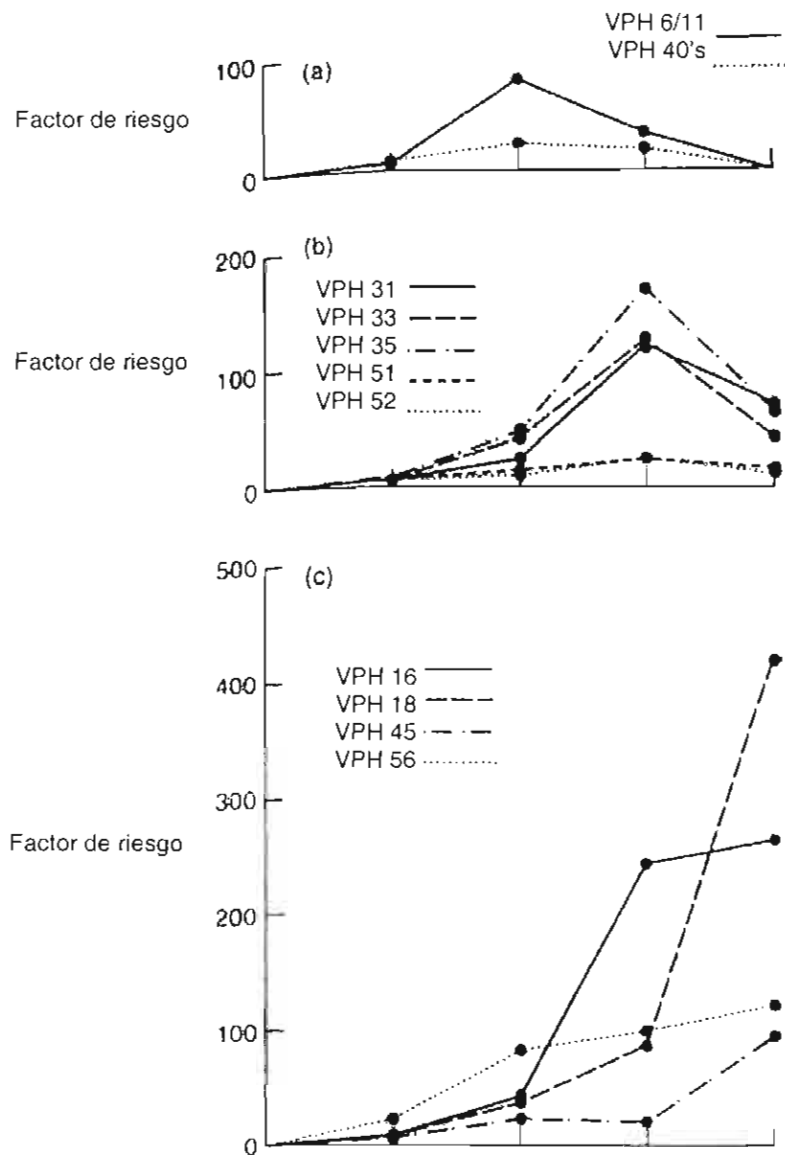


Figura 3. Clasificación de los diferentes tipos de VPH de acuerdo a su potencial oncogénico. Tipos de VPH que proporcionan bajo (a) mediano (b) y alto riesgo oncogénico (c) (1)

2.2 Morfología de la infección por VPH.

Los cambios morfológicos por una infección de VPH corresponde a los coilocitos, descritos por Koss en 1956 (24) , quien utilizó el término coilocitosis cuando este cambio biológico estaba presente en las lesiones displásicas. Finalmente en 1976 Meisels y Fortin (6) establecieron la etiología viral del coilocito. Estas son células escamosas maduras (superficiales o intermedias) que presentan un núcleo hipercromático, un halo perinuclear bien definido, donde el citoplasma residual que queda entre el halo y la membrana celular es denso y en ocasiones presentan binucleación.

2.3 Organización genómica del VPH.

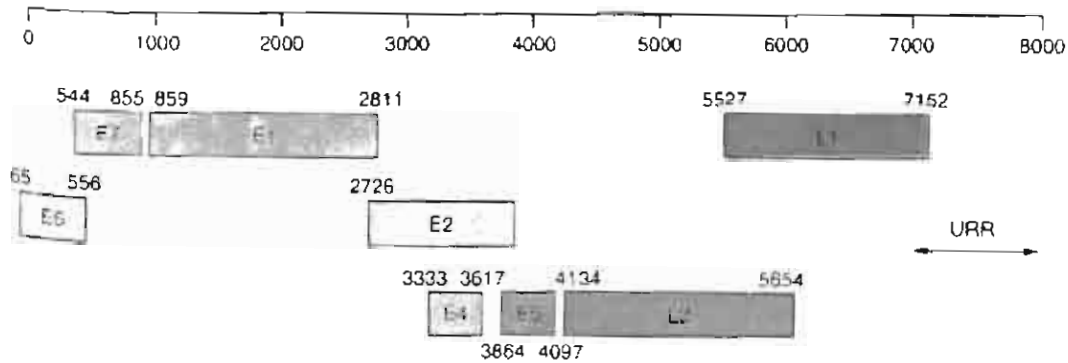
Los papilomavirus (PV) son virus que contienen DNA de doble cadena de 52-55 nm de diámetro, sin envoltura y con una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros que envuelven al genoma (30,31).

El genoma del VPH tiene 7900 pb de largo y como el de todos los PV es circular. La cápside de los viriones esta constituida por dos proteínas: la proteína mayor o principal (L1, 80% del virión) de 559 kilodaltones (kDa) y la proteína menor (L2) de 76 kDa (32,33).

La organización genómica de los VPH se encuentra prácticamente establecida (Figura 4). Se conocen varias regiones funcionales, una de ellas es la región reguladora, denominada unidad reguladora no codificada (URR) o unidad larga de control (LCR) de 0.4 a 1 Kb de longitud, esencial para las funciones reguladoras del genoma durante su replicación (34). El resto del genoma se agrupa en zonas de lectura abierta (ORFs, open

reading frames) las cuales integran dos funciones diferentes, las denominadas E (early) o de expresión temprana (segunda región) y las L (late) o de expresión tardía (tercera región). La region E esta formada por seis secuencias de E1 a E7 (E3 no existe) las cuales codifican proteínas responsables de la transformación celular (E5, E6, E7), de la replicación viral (E1, E2) y para el control del DNA de las células que infecta (E1, E4) (35,36). Especial interés tienen las regiones E6/E7 que poseen un importante papel en los mecanismos de transformación celular, las cuales se encuentran virtualmente expresadas en todos los cánceres asociados al VPH (37).

Entre las evidencias que indican que algunos VPH están involucrados en forma causal al CaCU se mencionan las siguientes: i) el DNA viral se encuentra en el 80 a 90% de los CaCU ii) el DNA viral se integra al genoma celular, inactivando al gen E2 del virus, lo que a su vez favorece la expresión de los oncogenes E6/E7 ya que su expresión es mediada por dicho gen iii) en tumores y líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales, se encuentra el mRNA y las proteínas de los oncogenes E6/E7, los cuales son capaces de inactivar a las proteínas supresoras de tumor p53 y p105 Rb, respectivamente (38,39).



Organización genómica de VPH 16

Figura 4. Regiones que conforman el genoma del VPH. Se presentan las regiones de expresión temprana (E), regiones de expresión tardía (L) y la región reguladora no codificada (URR) (32)

2.4 Clasificación de los VPH.

La actual clasificación de los VPH se basa en la descripción de tipos y subtipos en relación con el grado de homología de su DNA. La clasificación inicial ha sido modificada recientemente tras la secuenciación del genoma (40). El nuevo concepto de clasificación de VPH se basa en la comparación de las secuencias E6/E7 y L1 entre los tipos de VPH ya conocidos. Una homología inferior al 90% supone un nuevo tipo, mientras que una superior al 90% corresponde a un subtipo del tipo ya clasificado (41,42).

El número de tipos de VPH identificados y caracterizados se ha incrementado en forma considerable en los últimos años, hasta el momento se han caracterizado mas de 180 tipos diferentes, aunque su aislamiento y caracterización estan en continuo proceso (43).

Existe asociación de diferentes tipos de VPH con un amplio espectro de tumores en diversos órganos como: tracto genital inferior, tracto digestivo superior e inferior, tracto urinario y respiratorio, piel y conjuntiva (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de VPH y su asociación con diversas enfermedades (13)

Enfermedad	VPH más frecuentes	VPH menos frecuentes
VERRUGAS		
plantar	1,2	4,6,3
común	1,2,7,10	3,4,26-29,41,57,65
plana	3,10	27,38,41,49
CONDILOMAS	6,11	30,42-44,45,51,54,55,70
NIC		
del tracto genital y ano	30,34,39, 40,53,57,59 62,64,66,67-69	
de bajo grado	6,11	16,18,31,33,35,42-44,45,51,52
de alto grado	16,18	51,52,56,58,66
PAPULOSIS BOWENOIDE	16	31,34,39,42,45
CÁNCER		
de cervix	16,18	31,33,35,39,45,51,52,56,58,66
de piel escamoso y vasocelular	2,3,5,8-10	12,14,15,17,19-25,36-38,47,50
de amígdala y orofaringe	16	31,33
periungueal y conjuntival	16	
ENFERMEDAD VERRUCIFORME	2,3,5,8-10	12,14,15,17,19-25,36-38,47,50
PAPILOMATOSIS		
respiratoria recurrente	6,11	32
conjuntival	6,11,16	

2.5 VPH tipo 16 y aspectos clínicos.

La infección por VPH es una enfermedad sexualmente transmitida lo que representa el mayor riesgo para la NIC y el CaCU. El VPH16 es el encontrado más frecuentemente, así como el considerado con el de mayor riesgo oncogénico (44,45).

Iwasawa y col. (46) encontraron una alta frecuencia de VPH16 en el carcinoma de pene, por lo que también se le involucra en la transformación celular de este órgano.

Aunque en la actualidad no se ha precisado el mecanismo exacto de interacción virus-célula huésped, se propone que el virus penetra en la capa de células basales de la superficie epitelial por abrasiones microscópicas que finalmente producen la transformación de una o más células (47).

3. HORMONAS ESTEROIDES

3.1 Hormonas esteroides y sus mecanismos de transporte.

Las hormonas esteroides, dentro de las que se encuentran el estradiol (E_2) y la progesterona (P_4), son transportadas a través del torrente sanguíneo unidas a diversas proteínas, como la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) o la globulina fijadora de corticoides (CBG), las cuales unen E_2 y P_4 , respectivamente (48).

Estas proteínas acarreadoras, constituyen un reservorio circulante, con una capacidad de fijación relativamente grande. Funcionan como amortiguadores durante los cambios repentinos en la concentración hormonal plasmática, existiendo una velocidad de depuración a la hormona inversamente proporcional a la afinidad a su transportador (49).

La velocidad de secreción de las mismas varía de manera considerable en los diferentes estados biológicos y se relaciona directamente con su índice de producción en el ovario.

Para que la hormona esteroide, desempeñe su función durante la diferenciación y desarrollo de un órgano blanco, es necesaria la presencia de receptores específicos en el citoplasma y/o en el núcleo (50).

3.2 Receptores de esteroides y superfamilia a la que pertenecen.

Los receptores de estradiol (RE) y de progesterona (RPg) pertenecen a la superfamilia de receptores hormonales nucleares (51). Dentro de esta superfamilia se encuentran los receptores de glucocorticoides, de mineralocorticoides y de hormonas tiroideas (Figura 5). De la subdivisión, se forman varios subgrupos de receptores los cuales son muy semejantes en cuanto a sus antecedentes evolutivos, secuencias de sus aminoácidos y aspectos funcionales. Entre las ramas más importantes se encuentran el grupo A formado por receptores de hormonas esteroides, el grupo B por receptores de hormonas tiroideas, ácido retinóico (RAR) y vitamina D y el grupo C por receptores huérfanos (NGFI-B/Nur 77, EIP/SF-1 y FTZ-F1) (52) (Figura 5).

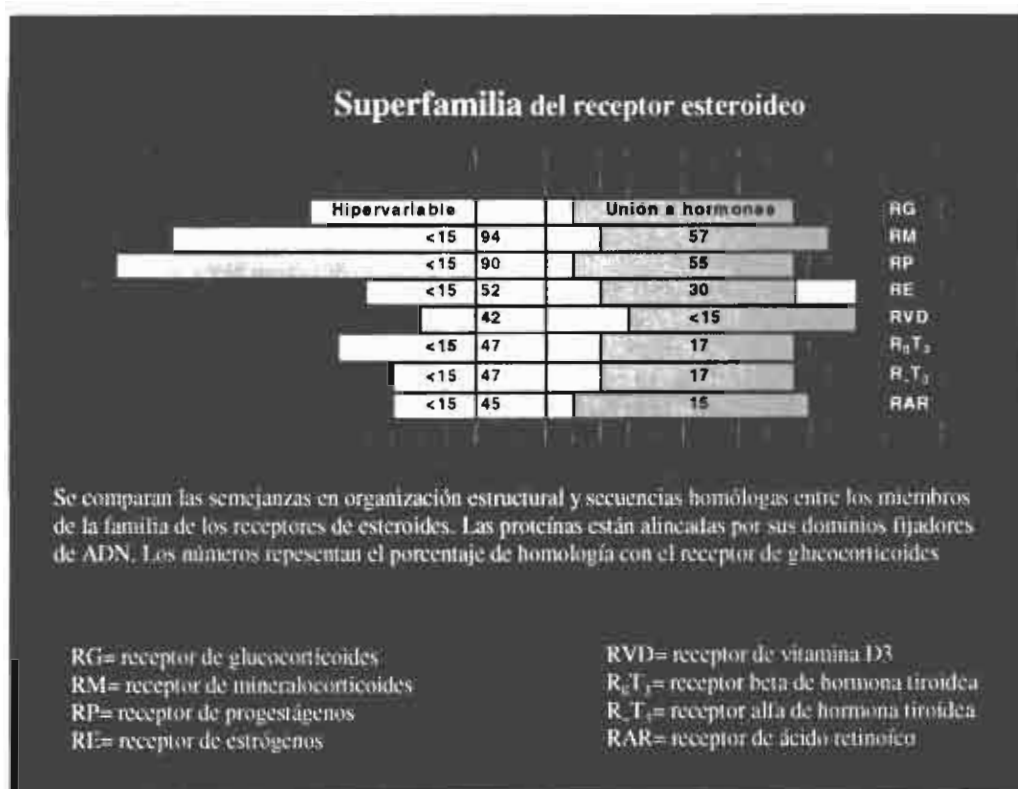


Figura 5. Organización estructural y homología de las secuencias de los receptores de esteroides (52)

3.3 Organización estructural y funcional de los receptores de esteroides.

Por medio del análisis de secuenciación de aminoácidos, se ha podido definir la estructura primaria de los miembros de esta superfamilia, observándose que está constituida por seis regiones que van de la A a la F (53). La clonación del cDNA ha permitido definir los dominios y mecanismos funcionales. Las funciones principales son comunes entre todos ellos como la unión al DNA (54), unión a la hormona (55), asociación con proteínas de choque térmico (HSPs) (56) localización nuclear, activación (57), represión y dimerización

(58). La estructura de la proteína receptora está organizada en diversos dominios funcionales dentro de los que se encuentran:

Región A / B

Es la región N-terminal del receptor y se le conoce como altamente variable en secuencia y longitud. Esta región tiene gran variación en el número de aminoácidos, por lo que es diferente para cada receptor. Su función es la transactivación (59).

Región C / D

En la región C se encuentra el dominio de unión al DNA. Es una región multifuncional ya que tiene secuencias de reconocimiento específico al DNA así como a los elementos de respuesta hormonal (ERH), de unión competitiva a los mismo y de información para la dimerización (60). Es altamente conservada entre todos los miembros de la superfamilia, teniendo una longitud de aproximadamente 66 aminoácidos. La región D llamada "región bisagra", esta poco conservada, ya que es altamente variable en cuanto a longitud y secuencia. Algunos aminoácidos de esta región son requeridos para la unión eficiente al DNA. Por estudios de delección se ha demostrado que esta región también es importante para la unión a la hormona (61).

Región E / F

La parte C-terminal es la más complicada en cuanto a estructura y función. Se subdivide en las regiones E y F las cuales solo existen en algunos receptores como en el RE y RAR . Por alineamiento del cDNA de diferentes receptores de la superfamilia, se han identificado tres regiones altamente conservadas: región I, II y III que se encuentran

presentes en todos los miembros de la superfamilia. En la región I reside la unión al DNA mientras que en las regiones II y III (con longitudes de 43 y 26 aminoácidos, respectivamente) se localiza propiamente la región E. Esta última es independiente ya que puede estar transferida a cualquier parte de la estructura del receptor y seguir conservando su funcionalidad. En esta región se encuentra el dominio de dimerización el cual es rico en leucina y lisina (62).

Con respecto a la región F, solo se encuentra en cierto receptores. En el RE se han provocado algunas deleciones en esta región, no afectando la funcionalidad del mismo, no siendo así con otros receptores de la misma familia (Figura 6).

Durante su unión al DNA celular, los receptores del grupo A inducen una disociación de las HSPs seguida de una dimerización, unión al DNA y activación del receptor; lo que contrasta con los receptores del grupo B que no se encuentran asociados a HSPs, uniéndose como homodímeros o heterodímeros al DNA en ausencia del ligando.

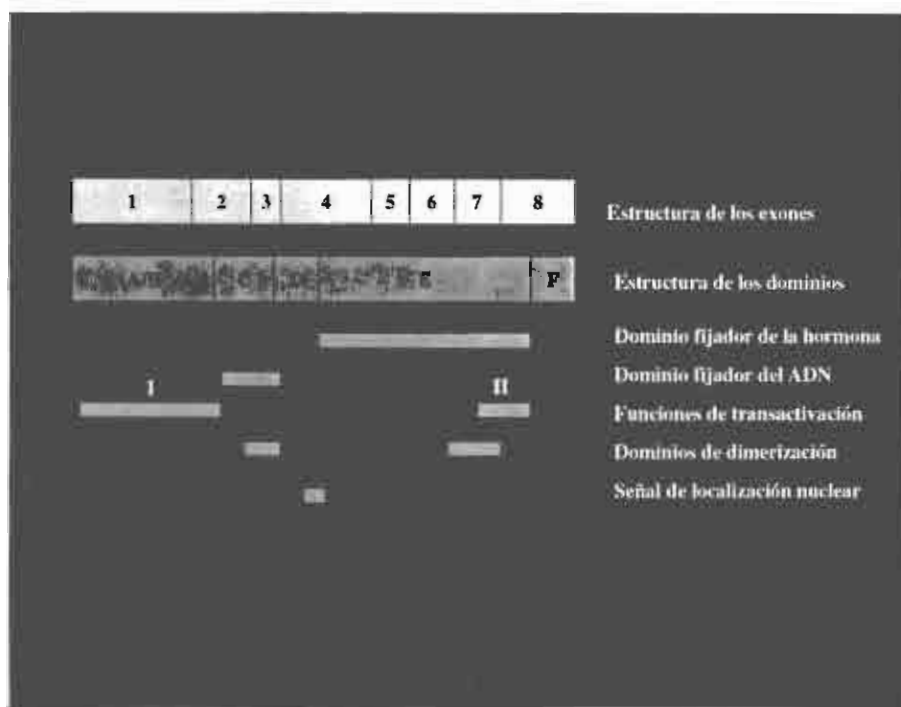


Figura 6. Organización del gen del receptor a estradiol. Se muestra la estructura y función de sus dominios con respecto a la posición de sus exones (55)

3.4 Receptores de estradiol y su organización estructural.

Región A/B. Denominado dominio regulador. Se une a otras proteínas dando lugar a los determinantes antigénicos. Esta región se encuentra en la zona NH₂ terminal del receptor y en el sitio de transcripción llamado AF-1 (Figura 7). Su remoción no impide que el receptor se una al DNA (63).

Región C. Dominio de unión al DNA. Secuencia muy conservada de 66 a 68 aminoácidos donde se controla la activación de la transcripción. En esta región se encuentran dos protuberancias denominadas dedos de Zn⁺⁺ (64). Se localiza en la zona COOH terminal del receptor. En este dominio se realiza la dimerización (65), lo que le permite mayor

estabilidad durante la unión al DNA. Después de unido el complejo hormona- receptor a secuencias específicas del DNA (secuencias palindrómicas de 13-26 pb presentes en los ERH, se activa la transcripción (66).

Región D. Dominio angular o de giro, donde se encuentra la señal de localización nuclear. Es una región que gira alterando la conformación del receptor (67).

Región E. Dominio de unión a la hormona y a las proteínas HSP70 y HSP90. Región muy conservada por lo que mutaciones en esta región, inhiben la unión al ligando. Es en donde se localiza el sitio mas activo para inducir la transcripción y cuenta con abundancia de grupos lisina y leucina. (región AF-2 del RE) (Figura 7) (68).

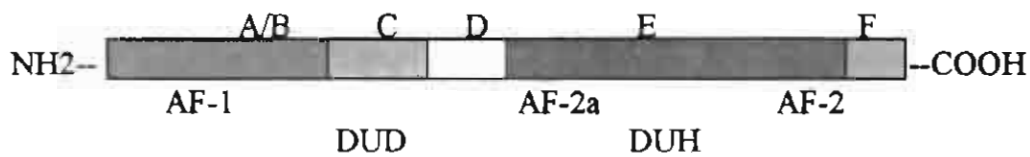


Figura 7. Representación esquemática del RE en donde se muestran las regiones A a la F; sus diferentes dominios, DUD (dominio de unión al DNA) y DUH (dominio de unión a la hormona) y sitios de transcripción (secuencias AF-1, AF-2 y AF-2a) (55)

Receptores de estradiol nativos (REn) y mutados (REm).

Para que un receptor lleve a cabo sus funciones de modo adecuado, es indispensable que todos sus dominios se encuentren intactos y por lo tanto, el dominio de fijación al DNA se encuentre sin ninguna modificación, que le permita llevar a cabo correctamente la modulación de la transcripción. Sin embargo, se han localizado diversas deleciones en el

dominio de unión al ligando, sin que esto impida el reconocimiento a los ERH en el DNA, lo cual sugiere que dicha respuesta no está completamente regulada por la hormona (69).

Existen varios mecanismos por los que la expresión de un RE_m pudiera dar lugar a una neoplasia no hormono-dependiente. El primero de ellos, se presenta cuando el RE actúa como un dímero para estimular la transcripción de los ERE, dando lugar a que un RE_m pudiera interferir con un RE_n formando heterodímeros inestables o disfuncionales. Un segundo mecanismo involucra la unión de un RE_m con los ERE en ausencia de la hormona, evitando así, la unión del RE_n con los ERE. Una tercera posibilidad se presenta cuando, un RE_m disminuye la activación transcripcional de genes inducidos por estrógenos al unirse a ellos, inhibiendo un gran número de procesos de transcripción esenciales dentro de un proceso normal (70) (Figura 8).

A partir de estas posibilidades, se han realizado algunos protocolos en líneas celulares en busca de RE_m. En uno de ellos, se realizó un ensayo de desplazamiento en gel, para determinar si los RE extraídos de biopsias tumorales podían unirse en forma específica a sus receptores. Así mismo midieron la unión al DNA y a la hormona, con los RE aislados de 79 biopsias de neoplasia de mama (71). Se observó una u otra unión en 25 de los 79 tumores estudiados, pero nunca unión al DNA y a la hormona juntos, lo que sugiere que estos tumores pudieran expresar un RE_m en el dominio de unión al DNA o en el dominio de unión a la hormona, pero en diferentes RE (72).

En extractos de biopsias tumorales y después del ensayo de desplazamiento en gel, se han detectado formas truncadas de RE. De acuerdo a estos y a otros estudios al respecto, se observa que existen diversas mutaciones en los RE en tejidos tumorales (73).

En las células de cáncer de mama T47D resistentes a estrógenos, se ha detectado que el mRNA del RE traduce proteínas mutadas, también se han reportado tres mutaciones

diferentes en el RE, en el dominio de unión a la hormona y se han identificado RE_m con deleciones en el dominio de unión al DNA en varias cepas tumorales(74).

Al aislar RE_m proveniente de biopsias de tumores mamarios, incluyendo una mutación puntiforme en la región amino-terminal, se verificó que el mRNA del RE, se encontraba truncado, con deleciones en los exones 3, 5 ó 7.

Se han investigado algunos aspectos sobre la funcionalidad del RE_m, encontrándose que el RE con deleción en el exón 2 ó 3, no parece ser funcional y por el contrario la deleción en el exón 5 causa un receptor dominante positivo que es activo en presencia y en ausencia de la hormona. Así mismo, cuando la deleción es en el exón 7 del RE, se convierte en dominante negativo, inhibiendo las acciones de los RE_n (75).

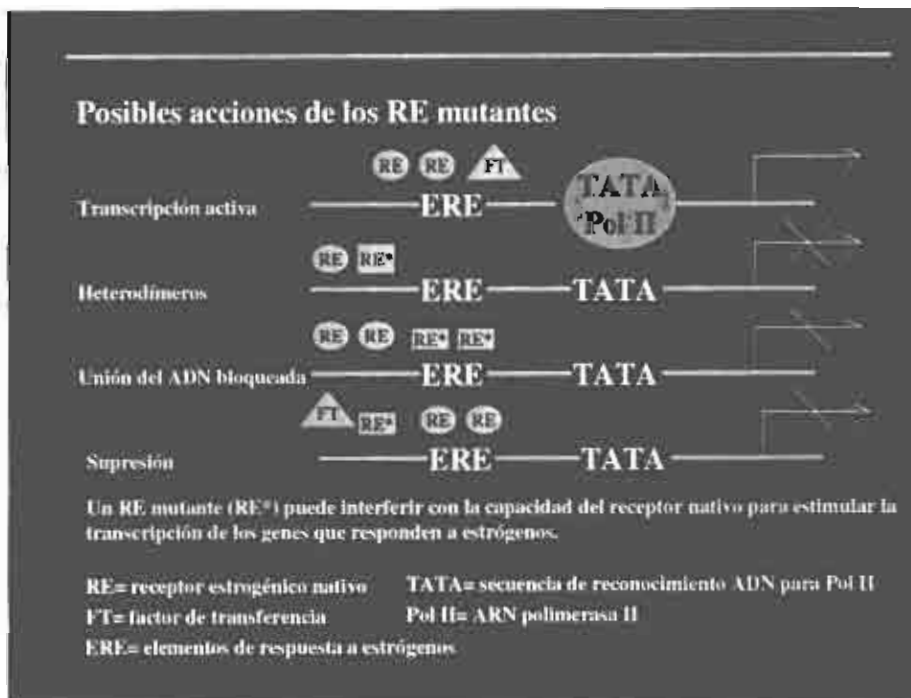


Figura 8. Mecanismos de acción de RE nativos y RE mutados (75)

II. PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

1. ANTECEDENTES PARTICULARES

En el epitelio escamoso cervical, la mayor parte de las lesiones contienen algún tipo de VPH normalmente de alto riesgo (tipos 16 ó 18) (76), sin embargo, muchas de estas lesiones no progresan a cáncer in situ ó invasor de cervix ya que se sugiere, deben estar involucrados otros factores hormonales y genéticos (77,78).

Uno de los riesgos que se han asociado a la presencia de NIC e infección por VPH, es la exposición a estrógenos, por lo que al embarazo se le considera un factor de riesgo de alto grado, debido a la persistencia estrogénica durante este período, así al uso de anticonceptivos orales se le atribuye el mismo riesgo (79,80).

Los mecanismos específicos por los cuales, los estrógenos podrían contribuir al desarrollo de la NIC ó a un estado más avanzado, hasta el momento no se encuentran plenamente establecidos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por VPH y la NIC, representan un problema multidimensional para diversos profesionales de la salud. La incidencia de esta infección ha ido en aumento, de tal forma que actualmente es la infección viral más frecuente del aparato genital femenino, presentándose sintomatología clínica hasta etapas avanzadas.

3. JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta que la incidencia de enfermedades malignas y premalignas del cervix continúa epidemiológicamente en aumento, es de primordial importancia contribuir al desarrollo de nueva tecnología, que apoye la detección temprana de estas lesiones, así como a evitar que factores colaterales exacerben esta enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Los efectos biológicos de los estrógenos, en coordinación con la expresión del VPH, tienen gran relevancia clínica, ya que participan como factores que fomentan la progresión de neoplasias cervicales a un estado más avanzado.

5. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que los estrógenos tienen relación con la transformación neoplásica de lesiones cervicales asociadas a VPH.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Evaluar la importancia de un desequilibrio hormonal por influencia estrogénica, en mujeres premenopáusicas con NIC e infección por VPH.
- ◆ Evaluar los niveles de RE y RPg en tejido premaligno de cervix en diferentes etapas.
- ◆ Investigar y proponer los mecanismos por los cuales los RE y la hidroxilación de estrógenos participan durante la transformación neoplásica del cervix.

- ◆ Investigar y proponer los mecanismos por los cuales los RE y el VPH, participan en forma sinérgica durante la transformación neoplásica y la expresión oncogénica del virus.

7. METAS DEL PROYECTO

- ◆ Contribuir al conocimiento de los factores que participan durante la infección por VPH y desarrollo de NIC en pacientes mexicanas.
- ◆ Contribuir en la obtención de diagnósticos certeros en etapas tempranas de la NIC y posteriormente contar con nuevas estrategias terapéuticas.

8. DISEÑO DEL ESTUDIO

El diseño metodológico se señala en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Diseño del estudio

En pacientes en edad reproductiva con lesiones pre-malignas del cervix (VPH, NIC 1, NIC 2, NIC 3)

Tipo de estudio: prospectivo, transversal, comparativo

n = 70 casos n = 30 controles

Estudio clínico- patológico	Estudio serológico (fase folicular)	Estudio en tejido (fase folicular)
1) Factores de riesgo	1) LH (mUI/ml)	1) RE (fmoles / mg prot)
2) Estudio citológico	2) FSH (mUI/ml)	2) RPg (fmoles / mg prot)
3) Estudio colposcópico	3) E 2 (ng/ml)	
	4) E 1 (ng/ml)	
4) Estudio histopatológico	5) PRL (ng/ml)	
	6) P4 (ng/ml) *	

Tabla 4. Parámetros estudiados

1) Infección por VPH tipo 16	1) Edad (17- 48 años)
2) Receptores hormonales RE (fmoles/mg prot.) RPg (fmoles /mg prot.)	2) Inicio de vida sexual activa
3) Grado de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC 1, NIC 2, NIC 3)	3) No. de gesta
4) Niveles de estradiol (ng/ml)	4) No. de partos
5) Niveles de estrona (ng/ml)	5) Edad a la primera gesta
	6) No. de comp. sexuales
	7) Uso de anticonceptivos orales

8.1 Muestreo del material biológico y realización de la metodología

El presente proyecto se realizó de acuerdo a los principios de investigación clínica establecidos en Helsinki y después de haber sido aprobado por el Comité de Investigación del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” del IMSS y por la Delegación 3 Suroeste a la que pertenece dicha Institución. Todas las pacientes participantes en el estudio, dieron su consentimiento previo para ser incluidas en este protocolo.

Los estudios de citología, colposcopia e histopatología fueron realizados en los departamentos correspondientes, por el personal especializado en cada campo del mismo Hospital.

La metodología aplicada para las determinaciones serológicas de hormonas y determinación de receptores hormonales (RE y RPg), se realizó en el Laboratorio de Investigación en Medicina Reproductiva ubicado en el 6° piso del mismo Hospital.

La metodología aplicada para la identificación de VPH tipo16, se realizó en el Laboratorio de Investigación en Medicina Reproductiva ubicado en el 6° piso del mismo Hospital y en el Lab. de Inv.en Enf. Oncológicas del IMSS.

8.2 Grupos de casos

Grupo 1 (n=10): Pacientes en edad reproductiva entre 17 y 48 años con hallazgos citológicos, colposcópicos e histopatológicos de NIC 1, asociada a VPH.

Grupo 2 (n= 10): Pacientes en edad reproductiva entre 17 y 48 años con hallazgos citológicos, colposcópicos e histopatológicos de NIC I, no asociada a VPH.

Grupo 3 (n=10): Pacientes en edad reproductiva entre 17 y 48 años con hallazgos citológicos, colposcópicos e histopatológicos de NIC 2, asociada a VPH.

Grupo 4 (n=10): Pacientes en edad reproductiva entre 17 y 48 años con hallazgos citológicos, colposcópicos e histopatológicos de NIC 2, no asociada a VPH.

Grupo 5 (n=10): Pacientes en edad reproductiva entre 17 y 48 años con hallazgos citológicos, colposcópicos e histopatológicos de NIC 3, asociada a VPH.

Grupo 6 (n=10): Pacientes en edad reproductiva entre 17 y 48 años con hallazgos citológicos, colposcópicos e histopatológicos de NIC 3, no asociada a VPH.

Grupo 7 (n=10) : Pacientes en edad reproductiva entre 17 y 48 años con hallazgos citológicos, colposcópicos e histopatológicos de infección por VPH aislada.

8.3 Grupo control

Se seleccionaron 30 pacientes en edad reproductiva entre 17 y 48 años con hallazgos citológicos, colposcópicos e histopatológicos normales.

9. ANALISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados de los estudios de gabinete se expresaron como la media \pm la desviación estándar ($M \pm DE$) de los valores obtenidos. La concentración de las hormonas analizadas y los valores de RE y RPg entre casos y controles, se analizaron por la prueba U de Mann-Whitney y la prueba de Wilcoxon a un nivel de significancia de $p < 0.05$ (81). El riesgo relativo (RR) se determinó como medida de asociación entre las pacientes con NIC con uso y no de anticonceptivos orales, en presencia o ausencia de infección por VPH (RR , 95% CI). Su significado estadístico se determinó a partir de 1.0 ($p < 0.05$).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. UNIVERSO DE TRABAJO

Los casos y controles se seleccionaron de las pacientes derecho- habientes del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” del IMSS, registradas en la Clínica de Colposcopía de este Hospital, con diagnóstico de envío de Papanicolaou positivo o dudoso, por presentar cambios citológicos en el tejido cervical.

Para formar los 7 grupos de casos, se seleccionaron a las pacientes con resultados de NIC en cualquiera de sus tres grados: leve (NIC 1), moderado (NIC 2) o severo (NIC 3) asociada y no a VPH, así como pacientes que presentaron infección por VPH aislada.

Se realizó una subselección de las pacientes en cuanto al uso de anticonceptivos orales (ACO) clasificándose éstas en dos grupos: 1) Grupo CAO, formado por pacientes con uso de ACO por tres años ó más, antes de este estudio 2) Grupo SAO, formado por pacientes sin uso de ACO en ningún momento de su vida.

Para formar el grupo control, se seleccionaron a las pacientes que después de realizarles los estudios correspondientes (citológicos, colposcópicos e histopatológicos) se descartó algún problema por cambios citológicos en el tejido cervical.

2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Dada la importancia de la NIC y su evolución a lesiones malignas, en este proyecto se planteó identificar su presencia en un número de pacientes pre-establecido, aplicando estudios de citología exfoliativa, los cuales fueron corroborados por estudios de

colposcopia e histología, cuyos resultados fueron integrados a un cuestionario dirigido con el objeto de establecer los factores de riesgo.

A todas las pacientes se les elaboró una historia clínica completa, examen físico y se les aplicó un cuestionario dirigido (Tablas 5 y 6), así como se les interrogó si deseaban participar en dicho proyecto.

De acuerdo al ciclo menstrual de cada paciente, se les programó para la toma de muestras sanguíneas en dos ocasiones:

1ª.) La primera, se tomó durante la fase folicular de cada paciente para las determinaciones de las siguientes hormonas: hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), prolactina (PRL), estradiol (E_2) y estrona (E_1), tomándose el mismo día el cono- biopsia de la lesión en cervix, durante el estudio de colposcopia que fue realizado por un genecólogo- colposcopista. Al mismo tiempo dos partes de la lesión se lavaron con solución salina y conservaron a -160°C en nitrógeno líquido para:

- a) procesamiento y estudio de marcadores bioquímicos en el tejido: RE y RPg
- b) procesamiento y estudio del DNA en el tejido: VPH tipo 16

2ª.) La segunda de las muestras se tomó durante la fase lútea de cada paciente, tomándose únicamente una muestra de sangre para la determinación de los niveles de progesterona (P_4).

Tabla 5. Cuestionario dirigido en hoja de captación de datos No. 1

HOSPITAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
"LUIS CASTELAZO AYALA"
IMSS
 UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Folio: _____ Fecha: _____
 Nombre: _____ Edad: _____ Cédula IMSS: _____
 Teléfono: _____
 Estado Civil: S/C/D/U/L/V Ocupación Actual: _____ Anteriores: _____
 Escolaridad: Año: _____ Nivel: _____ Sabe leer y escribir: _____ Peso: _____ Talla: _____
 DIAGNÓSTICO DE ENVÍO: _____

PERFIL HORMONAL LH _____ mUI/ml. FSH _____ mUI/ml. PRI _____ ng/ml.
 Estradiol: _____ ng/ml Estrona _____ ng/ml Progesterona: _____ ng/ml
 Día del ciclo: _____
 Fosfatasa alcalina: _____ U/ml RI: _____ fmol/mg prot. RPg _____ fmol/mg prot.

CITOLOGÍA **COLPOSCOPIA** **HISTOPATOLOGÍA**

Tabla 6. Cuestionario dirigido en hoja de captación de datos No. 2

HOSPITAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
"LUIS CASTELAZO AYALA"
IMSS
 UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES:
 Cáncer en: Padre: _____ Madre: _____ Hermanos: _____ Número de familiares con cáncer: _____
 Tipo de cáncer: _____ Parentesco: _____

ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS:
 Menarca: _____ Ritmo y periodicidad del ciclo: _____
 IVSA: _____ G: _____ P: _____ A: _____ C: _____ Edad 1a. gesta: _____
 No. de compañeros sexuales: _____ Circuncisión en (sus) parejas: _____
 Infección por VPH en forma previa: _____
 Otras enfermedades de transmisión sexual: _____ IUR: _____ Etapa del ciclo _____

FACTORES DE RIESGO:
 Anticonceptivos: _____ Orales: _____
 Fecha de inicio de uso: _____ Tiempo de uso: _____
 Edad de inicio de uso: _____ Fecha de interrupción: _____
 Nombre comercial del AC: _____ Dosis: _____
 Tabaquismo: Si _____ No _____

2.1 Criterios de inclusión de los casos.

Se incluyeron a las pacientes que cumplieran con las condiciones previamente establecidas y que se encontraran entre los 17 y 48 años normorréicas, con diagnóstico clínico y paraclínico de NIC grados 1, 2 ó 3 con clasificación de acuerdo a la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia), aislada o asociada a infección por VPH o por presentar cambios citológicos por presencia de VPH.

2.2 Criterios de exclusión de los casos.

Se excluyeron a las pacientes que no cumplieran con las condiciones previamente establecidas en la hoja de captación de datos, que fueran menores de 17 años o mayores de 48 años, que no fueran normorréicas o que presentaran cambios citológicos por cualquier otra infección diferente a VPH o algún problema por adenocarcinoma in situ o invasor del cervix.

2.3 Criterios de inclusión para controles.

Se incluyeron a las pacientes que cumplieran con la hoja de captación de datos, entre los 17 y 48 años, normorréicas, sin utilización de ACO como método de planificación familiar en ningún momento de su vida y con diagnóstico citológico, colposcópico e histopatológico normal.

2.4 Criterios de exclusión para controles.

Se excluyeron a las pacientes que no cumplieran con la hoja de captación de datos, que fueran menores de 17 años o mayores de 48 años, que no fueran normorréicas, que hubieran utilizado ACO como método de planificación familiar, que presentaran infección

por VPH o cambios citológicos por cualquier otra infección, presencia de NIC en cualquiera de sus tres tipos o algún problema por adenocarcinoma in situ o invasor del cervix.

2.5 Criterios de eliminación.

Se eliminaron a todas aquellas pacientes que no cumplieran con los requisitos previamente establecidos o las que se negaron a participar en el estudio.

2.6 Consideraciones éticas.

El proyecto se realizó con material biológico que se obtiene normalmente para estudios de rutina de las pacientes que se presentan en la Clínica de Colposcopía del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” del IMSS, en función de que éstas presentaron una citología cervical anormal, por lo cual la toma de estas biopsias no representó ningún riesgo para la paciente, sin embargo se les aclararon sus dudas y se les solicitó su aceptación para la participación en dicho proyecto.

3. ESPECIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS

3.1 Estudios de gabinete.

Edad, número de gestas, número de partos, número de abortos, número de parejas sexuales, edad de inicio de vida sexual activa (IVSA), edad al primer embarazo, tabaquismo.

3.2 Determinación del perfil hormonal en el suero de cada paciente.

Niveles serológicos de gonadotropinas (LH mUI/ mL, FSH mUI/mL)

Niveles serológicos de PRL ng/mL y P₄ ng/mL

Niveles serológicos de estradiol (E₂ ng/mL) y de estrona (E₁ ng/mL)

3.3 Determinación de los receptores de esteroides.

Niveles de receptores de estradiol (RE fmolas/mg prot.) y de progesterona en tejido de cervix (RPg fmolas/mg prot.).

3.4 Factores de riesgo pre-establecidos.

Presencia de NIC en cualquiera de sus tres grados NIC 1, NIC 2 ó NIC 3

Infección por VPH tipo 16

Anticonceptivos utilizados bajo prescripción médica del Sector Salud:

- 1) levonorgestrel (0.15 mg) y etinilestradiol (0.03 mg), grageas.
- 2) desogestrel (0.15 mg) y etinilestradiol (0.03 mg), tabletas.

3.5 Definición de los parámetros estudiados.

Neoplasia intraepitelial cervical leve (NIC 1): cuando se afecta un tercio inferior del epitelio cervical.

Neoplasia intraepitelial cervical moderada (NIC 2): cuando se afectan los dos tercios inferiores del epitelio cervical.

Neoplasia intraepitelial cervical severa (NIC 3): cuando se afecta todo el grosor del epitelio cervical.

Infección por virus del papiloma humano (infección por VPH): presencia de coilocitos, los cuales son células escamosas maduras (superficiales o intermedias) con un núcleo hipercromático y halo perinuclear bien definido, el citoplasma residual que queda entre el

halo y la membrana celular es denso o hialino, la coloración citoplasmática puede ser basófila o eosinófila.

Gonadotrofinas hipofisarias: hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH) cifras en mUI/mL

Hormonas esteroides: Estradiol (E_2), progesterona (P_4) cifras en ng/ mL y estrona (E_1) cifras en ng/mL

Hormona proteica: Prolactina (PRL) cifras en ng/mL.

Receptores de esteroides: receptor de estradiol (RE) cifras en fmolas/mg de proteínas y receptor de progesterona (RPg) cifras en fmolas/mg de proteínas.

4. DETERMINACIONES HORMONALES

4.1 Muestra biológica.

Sangre venosa. A todas las pacientes se les tomó la muestra de sangre, por punción de la vena cubital en la mañana entre las siete y las nueve horas, con ayuno de diez a doce horas y quince minutos de reposo previo a la toma de la muestra. A todas las pacientes se les tomó la muestra sanguínea durante la fase folicular temprana (3° a 5° día) de su ciclo menstrual para las determinaciones de E_2 , E_1 , estudio de las gonadotrofinas LH y FSH y la determinación de PRL. Se les citó entre los días 18 y 21 de su ciclo menstrual, para la determinación serológica de P_4 .

Una vez obtenida la sangre se colocó en un tubo sin anticoagulante, que permitió la obtención del suero el cual se utilizó para la medición de todas las hormonas. Las muestras fueron divididas en alícuotas de 500 uL y almacenadas a -35° C hasta el momento de

realizar las determinaciones hormonales.

4.2 Determinación de LH, FSH, PRL y P₄

La mayoría de las determinaciones hormonales se realizaron por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), las gonadotropinas hipofisarias (LH,FSH) y PRL por la técnica del segundo anticuerpo. Para LH y FSH se utilizaron estuches comerciales de la compañía Clinical Assay (Stillwater Min, USA), PRL y para P₄ los estuches de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA).

4.3 Determinación de E₂ y E₁

Para la evaluación de los niveles serológicos pre-ovulatorios de E₂ y E₁ se aplicó la técnica de RIA de fase sólida utilizando estuches comerciales de Bio Cis-Sorin International (Cedex, Francia).

5. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES HORMONALES (RE y RPg)

5.1 Extracción de citosol para la valoración de receptores hormonales.

Preparación de citosol total (Ct): El tejido se descongeló rápidamente, se pesó y posteriormente se trituró y homogeneizó en un homogeneizador vidrio-vidrio que contenía 100 uL del amortiguador TETG/TETG-KCL (1:3). El amortiguador TETG contenía: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1.5 mM, monotioglicerol 10 mM y glicerol 10% a pH 7.4 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) y el amortiguador TETG-KCl contenía: 10 ml

de buffer TETG adicionado de KCl 0.8M a pH 8.5 (194), poniéndolos en contacto previamente durante 20 min/ 4°C y posterior homogeneización de 1 min con intervalos de 5min, durante 30 min conservando la temperatura de 4°C. El homogeneizado se sometió a ultracentrifugación a 105,000g durante 60min empleando un rotor T65 de una ultracentrífuga refrigerada Beckman J-38.

5.2 Estandarización de las condiciones experimentales.

Para elegir la concentración de proteínas y obtener la unión específica óptima de E₂ y P₄, se incubaron concentración crecientes de Ct dentro de un margen de proteínas de 0.05 a 3 mg/mL de Ct.

La estandarización de las condiciones de temperatura y pH, se realizaron mediante incubaciones de Ct a la concentración óptima de proteínas obtenida previamente, a la temperatura de 4°C y 37°C respectivamente. El margen de pH del sistema de incubación se estudió entre los límites de 5 a 9. Los estudios de saturación se realizaron bajo las condiciones óptimas de reacción las cuales fueron: pH 7.4 (RE) y pH 7.8 (RPg), 4°C y 18 h de incubación.

5.3 Cuantificación de receptores de estradiol (RE).

Para la determinación de los niveles de receptores de estradiol, se incubaron alícuotas de 100 uL de Ct de cada tejido, en cantidades crecientes de estradiol ³H (0.012 – 0.1 nM) [³H – 2,4,6,7- estradiol (89 Ci/ mmol; Amersham International, Amersham, UK)] durante 18h a 4°C. La unión no-específica se obtuvo agregando a otra serie de tubos un exceso de 200 veces la concentración de dietilestilbestrol (DES; Sigma Chemical Company, St Louis,

MO, USA). Las fracciones libre y unida fueron separadas por el método del carbón cubierto con dextrán (82,83).

Sensibilidad: Los valores de RE igual o mayores a 10 fmolas/mg de proteínas, se consideraron receptor positivo (RE+).

5.4 Cuantificación de receptores de progesterona (RPg).

Para la determinación de los niveles de RPg, se incubaron alícuotas de 100 μ l de Ct de cada tejido, en cantidades crecientes de ^3H - ORG 2058 (0.025 - 0.5 nM) [^3H - ORG (52 Ci/ mmol; Amersham International, Amersham, UK)] durante 18h a 4°C. La unión no-específica se obtuvo agregando a otra serie de tubos un exceso de 200 veces la concentración de ORG 2058 no radiactivo (Amersham International, Amersham, UK). Las fracciones libre y unida fueron separadas por el método del carbón cubierto con dextrán (84) (Figura 9).

Sensibilidad: Los valores de RPg igual ó mayores a 7 fmolas/mg de proteínas, se consideraron receptor positivo (RPg +).

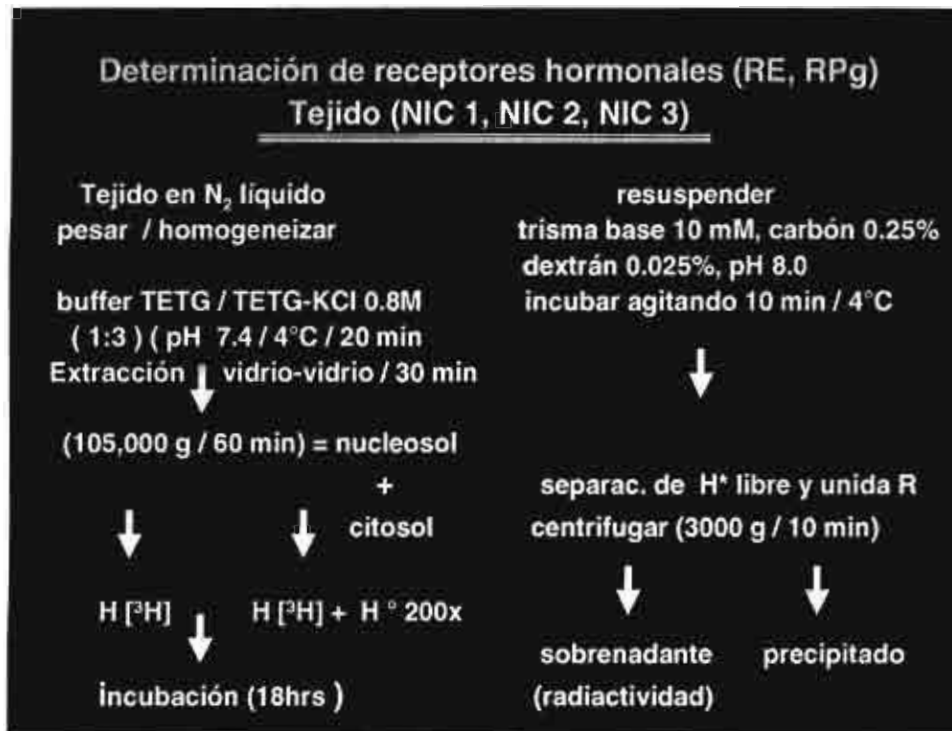


Figura 9. Diagrama de la metodología empleada

5.5 Separación de las fracciones libre y unida.

Las fracciones libre y unida, se separaron por la técnica del carbón cubierto con dextrán a 0.25%, dextrán T 70 (0.25%) y Tris (hidroximetilaminometano) 0.01M (Sigma Chemical Company) con pH 8.0. Después del tiempo de incubación, se adicionaron 200 ul de esta suspensión a cada tubo, agitándose 10 min dos veces a 4°C. El carbón se sedimentó en centrífuga refrigerada Beckman J-68 a 2500 g durante 10 minutos. La radiactividad debida a la formación del complejo [H-R] se cuantificó en el sobrenadante en un contador Packard Tri carb 3380, utilizando Instagel como líquido de centelleo. El número de sitios de unión se determinó por el método de Scatchard (85) (Figura 10).

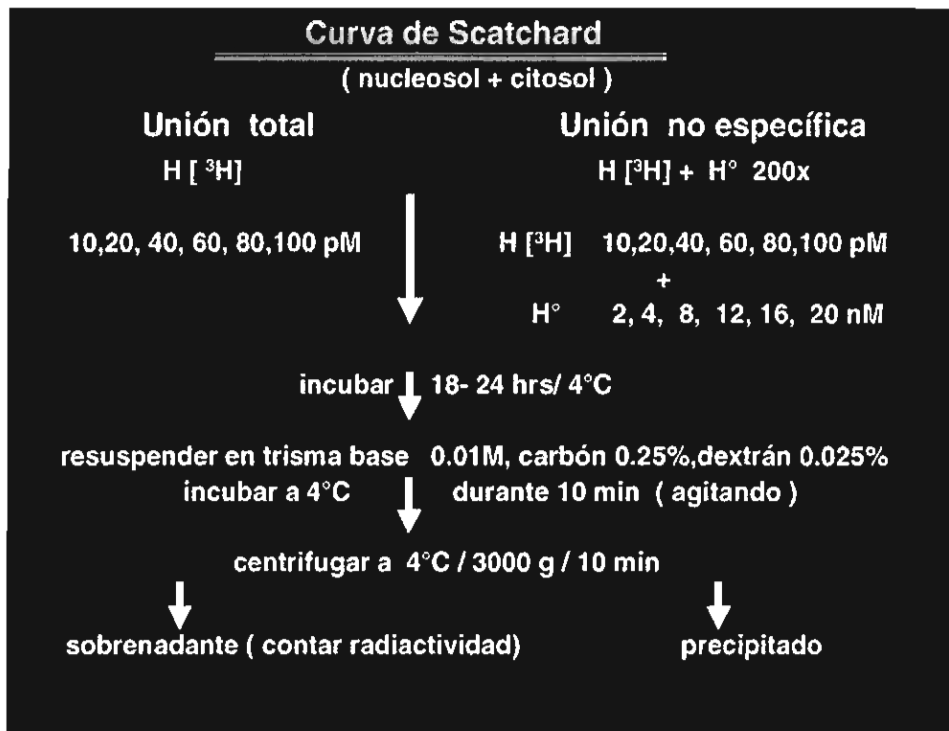


Figura 10. Diagrama de la curva de Scatchard para la determinación de receptores hormonales

5.6 Determinación de proteínas.

Para expresar los sitios de unión en RE y RPg, se cuantificó el contenido de proteínas en el C1 por el método de Lowry (86) utilizando como estándar albúmina bovina.

5.7 Purificación de hormonas tritiadas.

Las hormonas radiactivas se purificaron al eluir las en una columna de vidrio conteniendo sephadex LH-20, con una mezcla de benceno-metanol (85: 15), los esteroides ácidos eluyen en las primeras fracciones después los neutros y finalmente los básicos. El estradiol eluye en los primeros 3-4 ml y el ORG-2058 en los 12-14 ml.

6. DETERMINACIÓN DE VPH tipo 16

6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Extracción de secuencias de ácido desoxirribonucleico (DNA) de los tejidos en estudio.

La biopsia de cervix se depositó en un tubo Eppendorf, se disgregó mecánicamente y se adicionaron 400 ul de buffer de lisis (Tris, 50 mM ; EDTA, 1mM; Tween 20, 0.5% pH 8.3) adicionando 200 ug/ml de proteinasa K. Posteriormente la muestra se incubó a 55 °C durante toda la noche.

Extracción del DNA en plasma (control negativo): se recolectaron 20 ml de sangre en un tubo que contenía EDTA, una vez centrifugados se tomaron 500 ul de plasma en un tubo Eppendorf al cual se adicionaron 100ul de buffer de lisis para glóbulos blancos. Posteriormente la muestra se incubó a 55 °C toda la noche con proteinasa K. La extracción de DNA de las muestras de tejidos y plasma, se realizó por la técnica del fenol-cloroformo y precipitación con etanol de acuerdo a lo descrito por Chomczynsky (87). El DNA así obtenido se cuantificó por espectrofotometría.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): para comprobar que el DNA extraído del plasma ó tejido era adecuado para la aplicación de PCR, todas las muestras se probaron para su amplificación del gen de la β -globina, que es un gen muy conservado. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: 5'- ACA TTT GCT TCT GAC ACA ACC- 3' , 5'- GGC AGA ATC CAG ATG CTA AGC- 3'.

Amplificación de una región del gen L1. El DNA previamente extraído y amplificado, se utilizó para amplificar secuencias del VPH. Con este fin se utilizaron los oligonucleótidos generales L1 C1: 5'-CGT AAA CGT TTT CCC TAT TTT TTT-3' y L1

C2: 5'-TAC CCT AAA TAC TCT GTA TTG-3' que generan un fragmento de 240 pb de la región L1 y detectan un gran número de secuencias de VPH. Para un volumen de 20 ul por reacción, se añadieron 20 pmolas de cada uno de los "primers": 2ul buffer 1X para PCR, 2ul de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a 200mM, cloruro de magnesio a una concentración final de 2mM y 0.15ul (0.75 U) de la enzima Tac Polimerasa (Perkin-Elmer) Las reacciones se sometieron a 40 ciclos de amplificación en un termociclador (Modelo 480, Perkin-Elmer) El programa consistió en : un ciclo de 12 min a 94°C, 38 ciclos de 1 min a 94°C y un ciclo de 10 min a 72°C.

Determinación de VPH tipo 16: con el fin de determinar el tipo viral en las muestras de biopsias positivas a VPH, se utilizó un oligonucleótido específico para VPH tipo 16, para lo cual se amplificó un fragmento de 450 pb de la región E6 / E7:

16 E6: 5'-ATG CAC CAA AAG AGA ACT GCC-3'

16 E7: 5'-GGA TCA GCC ATG GTA GAT TAG-3'

Los productos de la amplificación por PCR de las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

Los fragmentos del genoma VPH tipo 16 se amplificaron por la reacción de PCR utilizando como "primers" para cada reacción 50 pmol/ul de MY 09 como "primer F" y de MY 11 como "primer R".

Los reactivos generales para la realización de cada una de las reacciones de PCR fueron los siguientes: buffer TED (20 mM Tris-HCl, 0.01 mM EDTA a pH 8), dNTP's 10mM (conteniendo 10 mM de cada uno de los dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), MY 09 y MY 11 50 pmol/ul de c/u, MgCl₂ 25 mM, Taq 5U/ul, H₂O para completar la reacción a 50 ul.

Como reactivos control de PCR se utilizaron como control positivo el PCR de un cultivo de células Caski el cual contiene integrado en su constitución el VPH tipo 16, y como control negativo el PCR de leucocitos extraídos de una sangre normal.

Las condiciones de desnaturalización, alineamiento y elongación fueron las siguientes:

94°C --- 5' ----- 1 ciclo
94°C --- 30''-----
55°C --- 90''----- 25 ciclos
72°C ---- 90''-----
72°C ---- 7' ----- 1 ciclo
4°C ----- ∞

IV . RESULTADOS

1. ESTUDIO CITOLÓGICO E HISTOPATOLÓGICO

La clasificación de los tejidos de acuerdo al grado de NIC y a su asociación con VPH, se realizó por medio de técnicas especializadas en citología e histopatología. El material se clasificó de acuerdo al reporte obtenido de los correspondientes departamentos, lo cual se ilustra con los siguientes ejemplos:

1.1 Estudio citológico: (Figuras 11 a la 18).

1.2 Estudio histopatológico.

Se agruparon los casos de acuerdo al grado de NIC que presentaban y a su asociación con VPH, encontrándose que del total de los casos estudiados (70 pacientes), 19 (27.1%) casos presentaron NIC aislado y 51 (72.9%) casos presentaron NIC asociado a VPH. Se encontró que la frecuencia de asociación NIC/VPH fue mayor conforme avanzó el grado de NIC (relación 1: 2.4 a 1:3, respectivamente) (Figura 19).

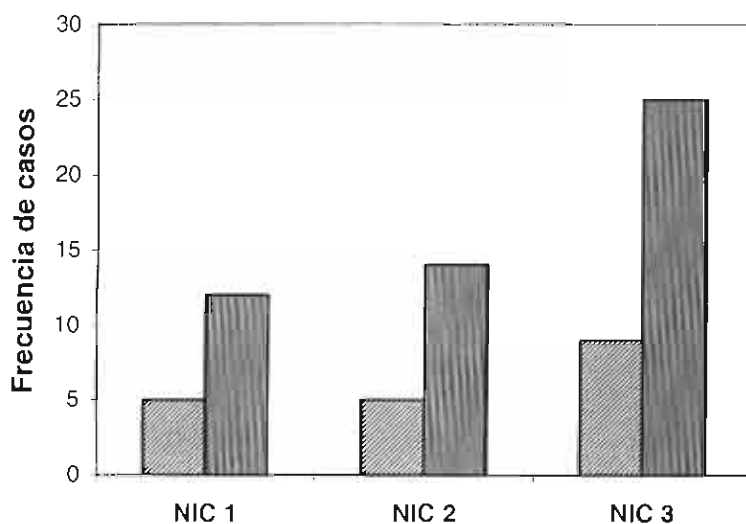
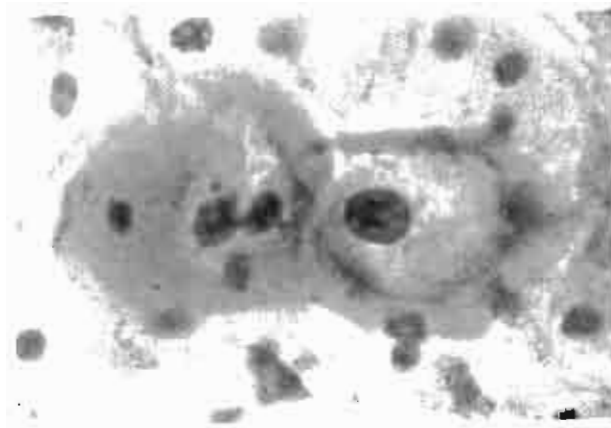


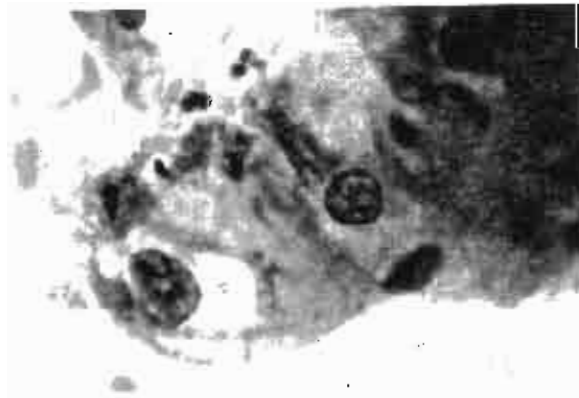
Figura 19. Casos con NIC aislado y asociado a VPH

2. ESTUDIO CITOLÓGICO



← coilocito

Figura 11. Coilocitosis. Se observa un núcleo grande hiper cromático y el espacio perinuclear claro (40x).



← coilocito

Figura 12. Neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (NIC 1).
Se observa formación de coilocitos (40x).

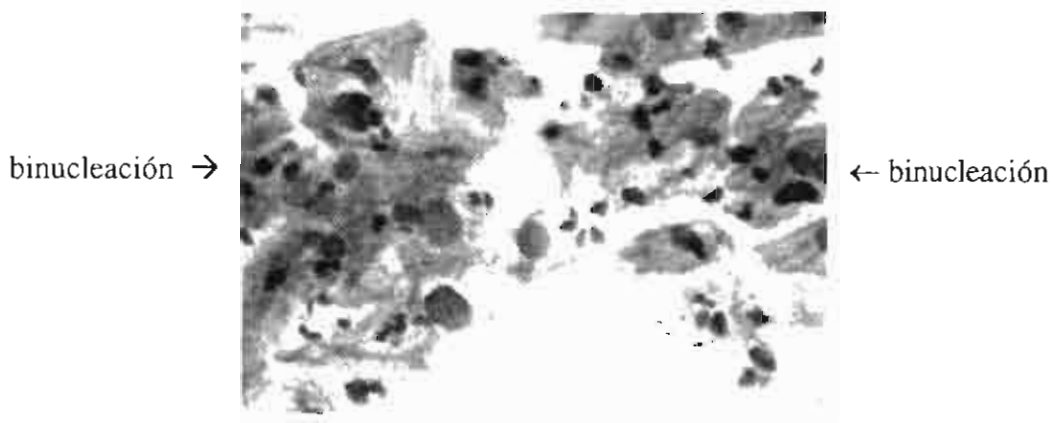


Figura 13. Neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (NIC 1).
Se observa binucleación (40x).

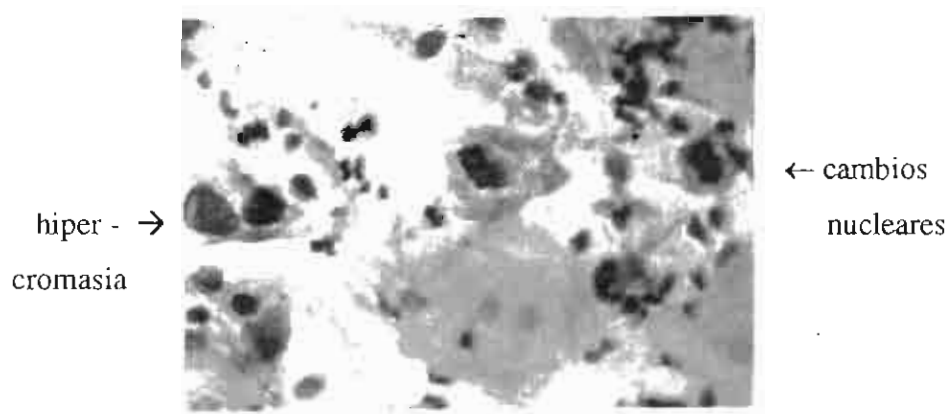
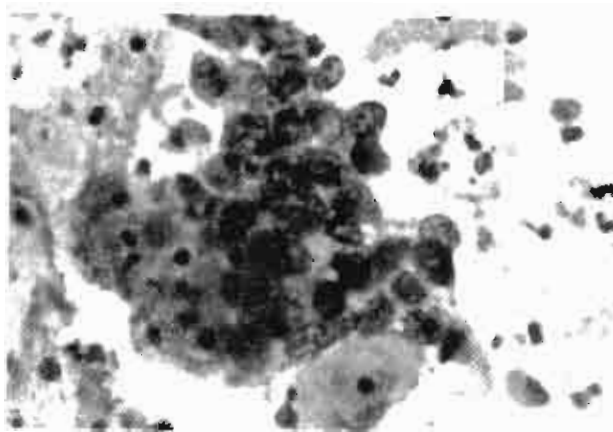
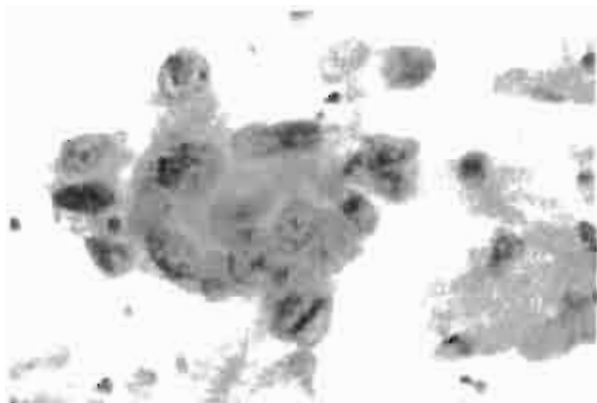


Figura 14. Neoplasia intraepitelial cervical grado 2 (NIC 2).
Se observan cambios nucleares e hiperchromasia (40x).



← escaso
citoplasma

Figura 15. Neoplasia intraepitelial cervical grado 3 (NIC 3).
Se observa abundancia de células transformadas (40x).



escaso
citoplasma →
y
núcleo
grande

Figura 16. Neoplasia intraepitelial cervical grado 3 (NIC 3).
Se observa presencia de coilocitos (40x).

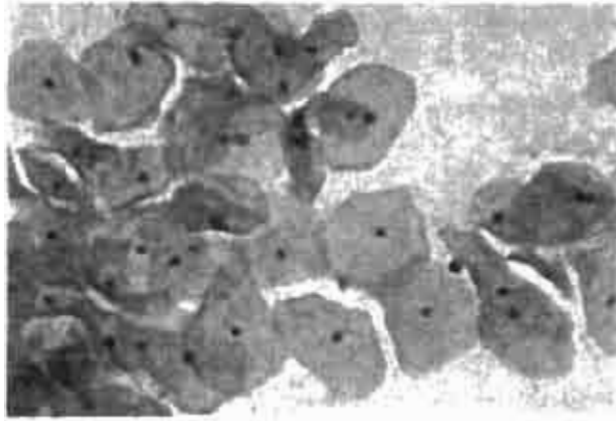


Figura 17. Citología del cervix con estímulo estrogénico alto.
Se observa presencia de numerosas células superficiales (10x).

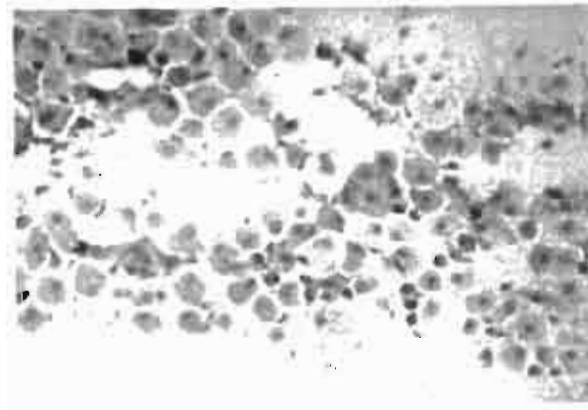


Figura 18. Citología del cervix con ausencia de estímulo estrogénico.
Se observa presencia de numerosas células profundas (10x).

2. ESTUDIO CLÍNICO

2.1 Edad promedio para casos y controles.

De los casos estudiados 16 (22.9%) fueron menores a 30 años (2 casos con 17 años de edad) y 54 (77.1%) se encontraron en la edad entre los 31 y 48 años. La mayor frecuencia de este padecimiento se presentó en el grupo de los 36-40 años. No se encontraron diferencias estadísticas con respecto al grupo control (35.7 ± 4.3 años) ($p > 0.05$) (Figura 20).

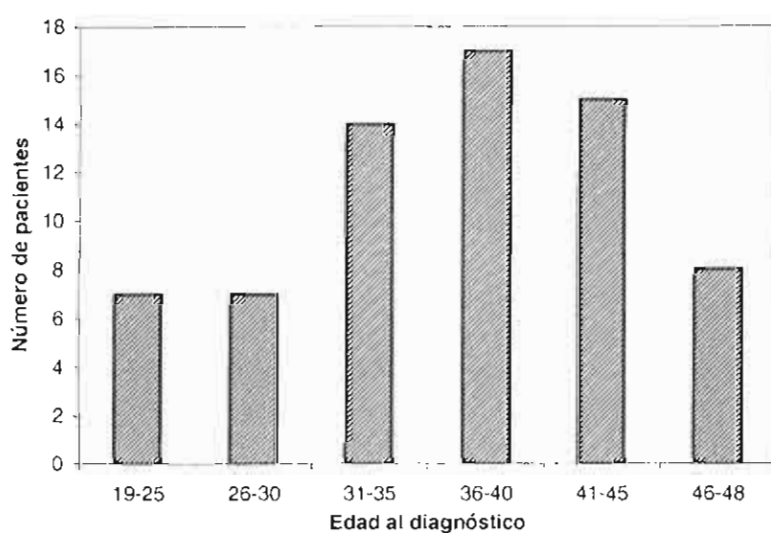


Figura 20. Distribución en grupos de edad de los 70 casos estudiados

2.2 Edad promedio para cada uno de los grupos con NIC aislado y asociado a VPH.

La edad promedio de los casos con NIC aislado y asociado a VPH fue para NIC 1: 24 ± 4.8 y 38.7 ± 3.2 años, NIC 2: 31.6 ± 3.7 y 37.8 ± 4.3 años y NIC 3: 40.0 ± 3.7 y 35.3 ± 5.2

años, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos ($p > 0.05$).

2.3 Edad de inicio de vida sexual activa (IVSA) para cada uno de los grupos con NIC aislado y asociado a VPH.

La edad promedio de IVSA para casos con NIC aislado y asociado a VPH fue de 18.8 ± 3.8 y 19.2 ± 2.3 años, respectivamente. La mayor frecuencia de asociación NIC/VPH se presentó entre los 18 y 25 años. No se encontraron diferencias estadísticas con respecto al grupo control (19.4 ± 3.2 años) ($p > 0.05$).

2.4 Edad promedio de la primera gesta para casos y controles.

La edad promedio de la primera gesta para casos con NIC aislado y asociado a VPH fue de 20.7 ± 4.3 años y de 18.2 ± 3.1 años, respectivamente, entre los límites de 15 a 31 años. El 60% (42 pacientes) de los casos y el 23.3 % de los controles (7 pacientes) presentaron edad menor a los 18 años. No se encontraron diferencias estadísticas con respecto al grupo control (19.6 ± 5.1 años) ($p > 0.05$). Cuando se analizaron los datos tomando como variable dependiente la infección por VPH, si se encontraron diferencias estadísticas ($p = 0.032$).

2.5 Número de gestas para casos y controles.

Con respecto a la multiparidad para casos con NIC aislado y asociado a VPH fue de 3.1 ± 1.6 y 4.7 ± 2.1 gestas, respectivamente, entre los límites de 1 a 9. No se encontraron diferencias estadísticas con respecto al grupo control (3.2 ± 1.2 gestas, entre los límites de 1 a 6) ($p > 0.05$). Cuando se analizaron los datos tomando como variable dependiente la infección por VPH, si se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

2.6 Número de parejas sexuales para casos y controles.

El promedio de parejas sexuales para casos con NIC aislado y asociado a VPH fue de 2 y 3, respectivamente, 9 (47.4%) de los casos con NIC aislado presentaron mas de un compañero sexual, con promedio de dos y 19 (37.2%) de los casos con NIC asociado, presentaron mas de dos compañeros sexuales, con un promedio de tres. Si se encontraron diferencias estadísticas con respecto al grupo control (promedio de dos) ($p < 0.05$). Cuando se analizaron los datos tomando como variable dependiente la infección por VPH, si se encontraron diferencias estadísticas ($p = 0.049$).

3. ESTUDIO DE ACUERDO AL USO DE ANTICONCEPTIVOS ORALES (ACO)

3.1 Distribución de los casos.

De los 70 casos estudiados 36 (51.4%) correspondió a pacientes que utilizaron anticonceptivos orales por más de tres años (pacientes CAO) y 34 (48.6%) correspondió a pacientes que no utilizaron este método de planificación familiar (pacientes SAO).

3.2 Distribución de los casos de acuerdo a la edad, al grado de NIC y uso de ACO.

Con respecto a la edad, grado de NIC y uso de ACO para los casos CAO fue de 36.7 ± 6.9 años y para los casos SAO de 34.9 ± 6.6 años, con un máximo y un mínimo de 23 a 48 años y 17 a 48 años, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) (Figura 21).

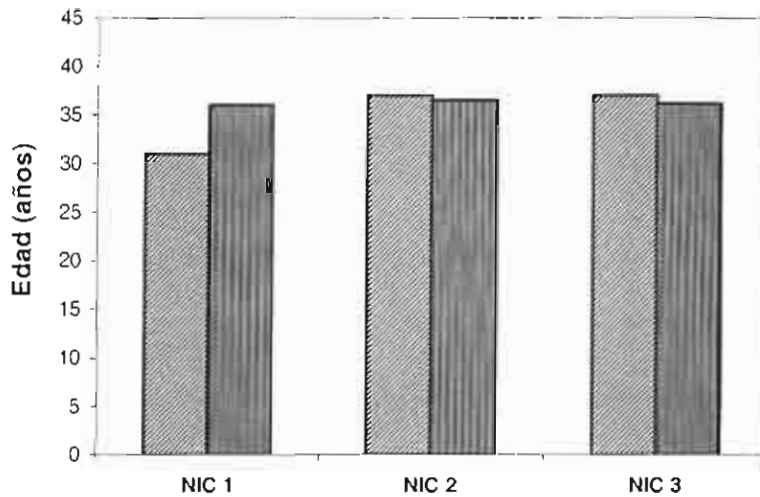




Figura 21. Edad media de las pacientes con NIC sin  y con  administración de ACO

3.3 Distribución de los casos en frecuencia por grupos de edad y uso de ACO.

La mayor frecuencia de pacientes con NIC, se encontró en el grupo de 31-40 años, tanto para casos SAO como para casos CAO. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figura 22).

3.4 Distribución de los casos de acuerdo al grado de NIC y uso de ACO.

De los 36 casos CAO, se observa que la mayoría correspondieron a casos con NIC2, cuando se analizaron los 34 casos SAO, prevalecieron los grados NIC 1 y NIC 3, observándose que la minoría eran casos NIC 2 (Tabla 7).

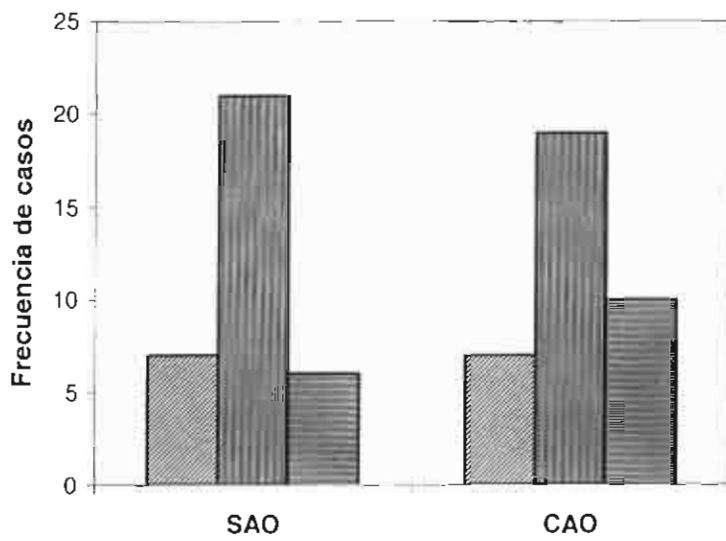


Figura 22. Distribución de pacientes por frecuencia en grupos de edad

17 - 30  31 - 40  41 - 48 años 

Tabla 7. Distribución de los casos de acuerdo al grado de NIC y uso de anticonceptivos orales

Grado de NIC	CAO	SAO
NIC 1	11 (30.5%)	13 (38.2%)
NIC 2	15 (41.7%)	8 (23.5%)
NIC 3	10 (27.8%)	13 (38.2%)
TOTAL	36 (100%)	34 (100%)

3.5 Distribución de los casos de acuerdo al inicio de vida sexual activa (IVSA) y uso de ACO.

Con respecto a la edad de inicio de vida sexual activa y uso de ACO para los casos CAO se encontró una edad de 18.8 ± 3.8 años y para los casos SAO de 19.4 ± 3.2 años, con un mínimo y un máximo de 14 a 30 años y 13 a 31 años, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figura 23).

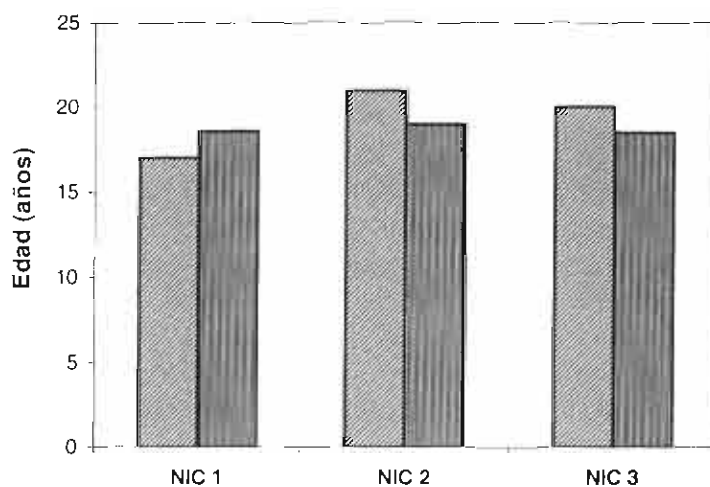


Figura 23. Inicio de vida sexual activa en pacientes con NIC sin  y con  administración de ACO

3.6 Distribución de los casos de acuerdo a la edad de la primera gesta y uso de ACO.

Con respecto a la edad de la primera gesta y uso de ACO, se encontró que para los casos CAO fue de 20.7 ± 4.3 años y para los casos SAO fue de 19.6 ± 5.1 años, con un mínimo y un máximo de 15 a 31 años y 14 a 29 años, respectivamente. Siete (19.4%) de los casos

CAO y 9 (26.5%) de los casos SAO correspondieron a menores de 18 años (Figura 24).

Cuando se analizaron los datos tomando como variable dependiente la infección por VPH, si se encontraron diferencias estadísticas ($p = 0.032$).

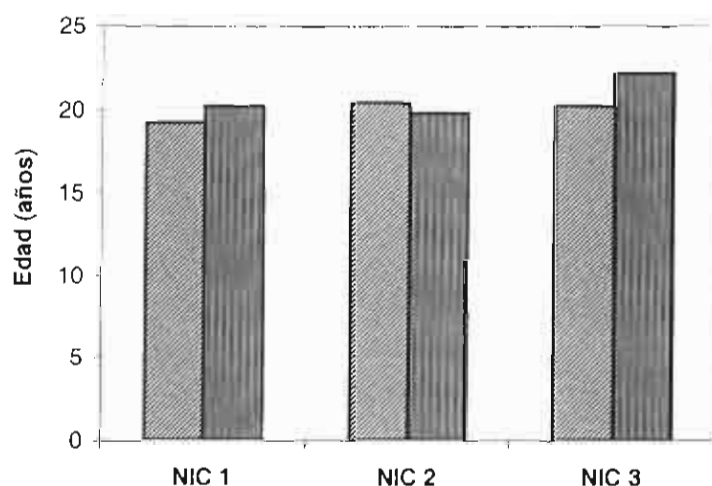




Figura 24. Edad de la primera gesta en pacientes sin  y con  administración de ACO

3.7 Distribución de los casos de acuerdo al número de gestas y uso de ACO.

Con respecto al número de gestas y uso de ACO la distribución fue la siguiente: para los casos CAO fue de 3.1 ± 1.6 y para los casos SAO fue de 3.2 ± 1.8 con un máximo y un mínimo de 1 a 8 y de 1 a 7, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), sin embargo, en 15 (41.6%) de los casos CAO y 9 (26.5%) de los casos SAO, correspondió a mujeres que tuvieron más de tres embarazos, presentando neoplasias de mayor grado (NIC 2 y NIC 3).

3.8 Distribución de los casos de acuerdo al tiempo de uso de ACO.

En la tabla se señala que el uso de ACO menor a tres años en el grupo de edad 17-25 años, presenta un riesgo relativo (RR) de 2.3, aumentando este RR a 3.2 si se encuentra asociado el VPH. En los otros grupos de edad el RR se incrementa si se encuentra asociado el VPH. Cuando se utilizaron ACO por mas de tres años en el grupo de edad 17-25 años, presenta un RR de 5.6. En los otros grupos de edad el RR se incrementa si se encuentra asociado el VPH (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de los casos por grupos de edad y uso de anticonceptivos orales

CARACTERÍSTICAS DE USO	EDAD EN AÑOS					
	17 - 25		26 - 35		36-45	
	RR	95% CI	RR	95% CI	RR	95% CI
Meses de uso						
Ninguno	1.0		1.0		1.0	
≤12	1.6	0.7 - 3.6	1.2	0.7 - 1.9	1.8	1.0 - 3.0
Infección VPH	1.8	0.8 - 4.2	1.9	0.9 - 2.3	1.9	2.2 - 4.7
13 - 36	2.3	1.0 - 5.2	1.5	0.9 - 2.4	1.4	0.8 - 2.6
Infección VPH	3.2	3.7 - 7.2	3.7	0.7 - 4.2	3.2	2.3 - 4.2
>36	5.6	2.3 - 13.9	1.2	0.7 - 2.2	1.5	0.8 - 3.2
Infección VPH	4.5	4.2 - 6.7	4.2	0.9 - 3.1	2.5	0.9 - 3.7

Riesgo relativo e intervalo de confianza (RR 95% CI)

4. PRESENCIA DE NIC grados 1, 2 ó 3, ASOCIACIÓN A VPH Y USO DE ACO

4.1 Frecuencia de casos con NIC aislado y asociado a VPH y uso de ACO.

Cuando se analizaron los datos de acuerdo al uso de ACO, se encontraron estadísticamente significativos para la infección por VPH ($p = 0.0242$), $RR = 3.2714$ $CI (1.1670-9.1702)$.

Al analizar el grado de NIC en presencia de VPH y tomando como variable dependiente el uso de ACO, estos datos se encontraron altamente significativos ($p = 0.0001$), $RR = 2.4158$ $CI (1.7150-3.4028)$ (Figura 25).

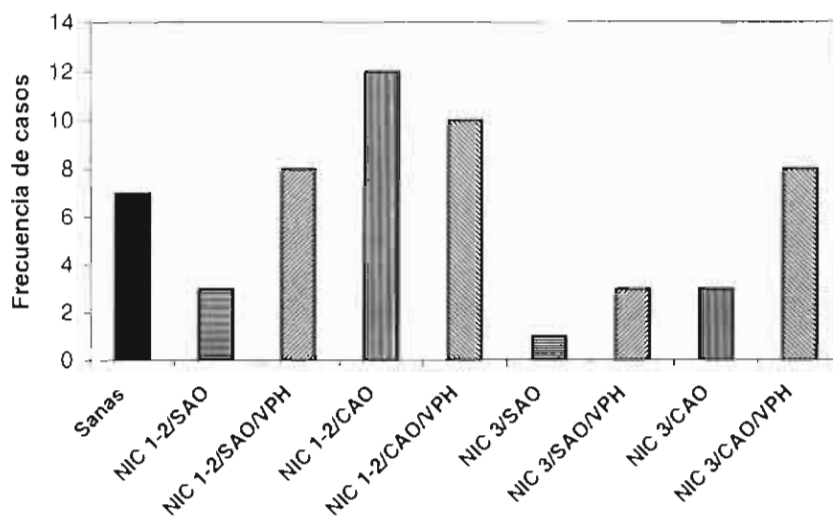


Figura 25. Frecuencia de casos con NIC aislado y asociado a VPH y uso de anticonceptivos orales

5. ESTUDIOS HORMONALES

5.1 Niveles serológicos de LH, FSH, PRL, E₂ y P₄ en pacientes con NIC. Grupos SAO y CAO.

Los valores obtenidos para los casos SAO, no presentaron diferencias estadísticas para LH, FSH, PRL ni P₄, con respecto a los valores obtenidos en los controles (p > 0.05). Los valores de E₂ del mismo grupo, se observó que el 14.7% (5 casos) presentaron valores fuera del límite superior con respecto a los controles, sin embargo estos datos no fueron estadísticamente significativos (p > 0.05).

Los valores obtenidos para los casos CAO, no presentaron diferencias estadísticas para LH, FSH ni PRL. El 11% (4 casos) de ellos, presentaron P₄ fuera del límite superior con respecto a los controles, sin embargo estos datos no fueron estadísticamente significativos (p > 0.05). Con respecto a los resultados de E₂ del mismo grupo, se observó que el 47.2% (17 casos) del total, presentaron valores fuera del límite superior con respecto a los controles (p < 0.05) (Tabla 9).

5.3 Niveles serológicos de E₂ y P₄ en pacientes con NIC (grupos SAO y CAO).

Cuando se realizó el estudio durante la fase lútea de cada paciente, se encontró que no existen diferencias significativas para E₂ ni para P₄ en los grupos SAO ni CAO. Sin embargo, cuando se programó el mismo estudio durante la fase folicular de cada paciente, se encontró que los resultados para E₂ eran estadísticamente significativos (p < 0.05) en el grupo CAO, no siendo así para P₄ (Tabla 10).

Tabla 9. Perfil hormonal del grupo control y de casos con NIC. Grupos SAO y CAO

Perfil hormonal de pacientes con NIC (SAO)					
Fase folicular tardía					Fase lútea
Hormona	LH (mUI/ml)	FSH(mUI/ml)	PRL(ng/ml)	E2(ng/ml)	P4(ng/ml)
control n=30	9.4 (1.3- 19)	7.2(2.7-10.5)	8(6.1-20)	0.090 (0.060- 0.120)	6.5 (3.4-29)
casos n=70	8.2 (1.8-17)	6.7 (3.0-9.2)	9.2 (3-18)	0.074(0.044-0.134)	5.7 (2.5 -22.9)

Perfil hormonal de pacientes con NIC (CAO)					
Fase folicular tardía					Fase lútea
Hormona	LH (mUI/ml)	FSH(mUI/ml)	PRL(ng/ml)	E2(ng/ml)	P4(ng/ml)
control n=30	5.9 (1.3-14)	4.8 (2.7-7.5)	10 (5.2-18.7)	0.08 (0.04-0.19)	0.55 (0.35-1.6)
casos n=70	6.7 (3-9)	5.0 (2.8-6.9)	12.2 (3-17)	0.189 (0.09-0.269)	1.2 (0.7-1.5)

Los valores son la media con el rango entre paréntesis

Tabla 10. Valores serológicos de estradiol y progesterona del grupo control y de casos con NIC. Grupos SAO y CAO (M ± DE)

Fase del ciclo Menstrual	Citología normal			Citología anormal (NIC)		
	SAO	CAO	valor de p	SAO	CAO	valor de p
<i>Estradiol</i>	E2 ng/ml			E2 ng/ml		
Folicular	0.08 ± 0.06	0.110 ± 0.09	> 0.05	0.074 ± 0.05	0.189 ± 0.08	< 0.05*
Lútea	0.075 ± 0.03	0.115 ± 0.09	> 0.05	0.186 ± 0.03	0.109 ± 0.01	> 0.05
<i>Progesterona</i>	P4 ng/ml			P4 ng/ml		
Folicular	0.545 ± 0.72	0.510 ± 0.48	> 0.05	0.658 ± 0.50	0.441 ± 0.28	> 0.05
Lútea	5.945 ± 1.2	0.505 ± 0.32	> 0.05	2.705 ± 1.24	1.183 ± 0.33	> 0.05

Prueba de Wilcoxon (p < 0.05) *

5.4 Niveles serológicos de E₂ y E₁ en pacientes con NIC aislado y asociado a VPH sin uso de ACO.

En este estudio se encontró que no existen diferencias significativas para E₂ en casos con NIC aislado ni asociado a VPH. Sin embargo para E₁ se señalan valores de 0.187 ± 0.02 y 0.177 ± 0.02 ng/ml para casos de NIC 2 y NIC 3 asociados a VPH. Datos estadísticamente significativos ($p < 0.05$) (Tabla 11).

Tabla 11. Niveles serológicos de estradiol (E₂ ng/ml) y estrona (E₁ ng/ml) de grupo control y grupo con NIC (casos SAO) sola y asociada a VPH (M ± DE)

Fase folicular	Citología normal	Citología anormal			
		NIC		NIC + VPH	
			Valor de p		Valor de p
E ₂		NIC1 0.074 ± 0.03	>0.05	NIC1 0.076 ± 0.03	>0.05
	0.07 ± 0.03	NIC2 0.072 ± 0.05	>0.05	NIC2 0.072 ± 0.04	>0.05
		NIC3 0.076 ± 0.03	>0.05	NIC3 0.092 ± 0.02	>0.05
E ₁		NIC1 0.07 ± 0.02	>0.05	NIC1 0.080 ± 0.04	>0.05
	0.06 ± 0.02	NIC2 0.08 ± 0.04	>0.05	NIC2 0.187 ± 0.02	<0.05 *
		NIC3 0.08 ± 0.05	>0.05	NIC3 0.177 ± 0.02	<0.05 *

Prueba de Wilcoxon ($p < 0.05$) *

5.5 Niveles serológicos de E₂ y E₁ en pacientes con NIC aislado y asociado a VPH con uso de ACO.

En este estudio se encontró que no existen diferencias significativas para E₂ en casos con NIC aislado ($p > 0.05$), sin embargo, en los casos con NIC 3 asociado a VPH, si existen diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0.05$). Cuando se analizaron los resultados de E₁, se encontró que el mismo grupo de pacientes presentaba igual comportamiento que para E₂, es decir, los valores de E₂ y E₁ para los casos con NIC 3 asociado a VPH fueron estadísticamente significativos con respecto al grupo control ($p < 0.05$) (Tabla 12).

Tabla 12. Niveles serológicos de estradiol (E₂ ng/ml) y estrona (E₁ ng/ml) en grupo control y con NIC (casos CAO), sola y asociada a VPH (M ± DE).

Fase folicular	Citología normal	Citología anormal					
		NIC		NIC + VPH			
			Valor de p		Valor de p		
E ₂	0.09 ± 0.05	NIC1	0.112 ± 0.04	>0.05	NIC1	0.122 ± 0.03	>0.05
		NIC2	0.090 ± 0.03	>0.05	NIC2	0.117 ± 0.02	>0.05
		NIC3	0.109 ± 0.04	>0.05	NIC3	0.192 ± 0.04	<0.05*
E ₁	0.072 ± 0.04	NIC1	0.071 ± 0.03	>0.05	NIC1	0.110 ± 0.02	>0.05
		NIC2	0.067 ± 0.02	>0.05	NIC2	0.097 ± 0.03	>0.05
		NIC3	0.080 ± 0.02	>0.05	NIC3	0.207 ± 0.04	<0.05*

Prueba de Wilcoxon ($p < 0.05$)*

6. ESTUDIO DE RECEPTORES HORMONALES

6.1 Estandarización de las técnicas.

Antes de aplicar las técnicas previstas para la determinación de RE y RPg en los tejidos de cervix, se estandarizaron las técnicas en cuanto a concentración de proteínas, temperatura, tiempo de incubación y pH.

6.2 Estudio de la concentración de proteínas.

Se incubaron concentraciones crecientes de Ct (conteniendo de 0.5 - 3 mg/ mL de proteínas) con una cantidad de estradiol H³ o de progesterona (ORG H³-2058) en presencia de 200 veces de la hormona no H³. Se observó que la máxima unión específica se obtuvo a una concentración de proteínas entre 1 - 1.5 mg /ml de Ct, para ambos receptores (Figura 26).

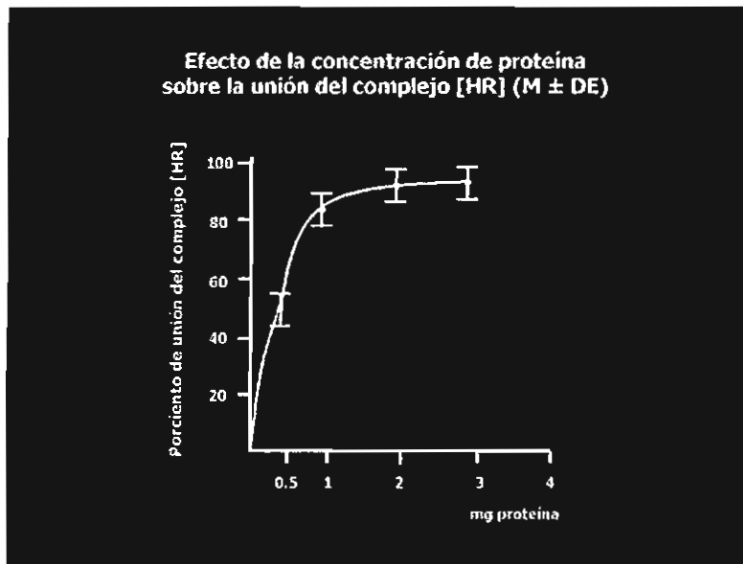


Figura 26. Curva de saturación del complejo [HR] en función de la concentración de proteínas

6.3 Curva de saturación en función del pH.

Cuando se graficó el porcentaje de unión de estradiol- H^3 o de progesterona (ORG H^3 -2058) en 100 μ l de Ct contra diferentes valores de pH, la unión máxima para estradiol fue a pH 7.4 y para progesterona fue a pH 7.8, observándose una disminución drástica en la capacidad de unión a un pH menor a 7.0 y superior a 8.5 (Figura 27).

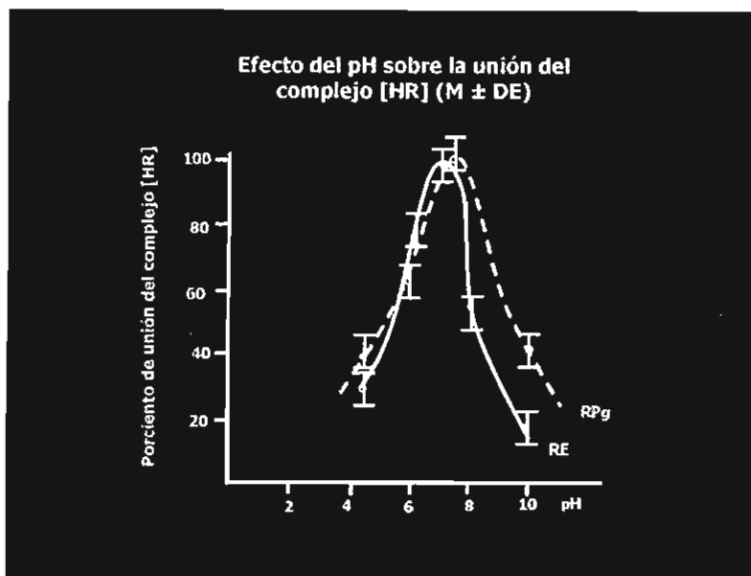


Figura 27. Curva de saturación del complejo [HR] en función del pH

6.4 Curva de saturación en función de la temperatura.

La temperatura a la que se logró la máxima unión del ligando con su receptor fue a 4°C

manteniéndose esta después de 24 h de incubación. La temperatura del estudio se elevó a 37°C obteniéndose la máxima unión a los 30 min y manteniéndose durante 1 h, tiempo a partir del cual disminuye (Figura 28). El mismo efecto presentaron ambos receptores.

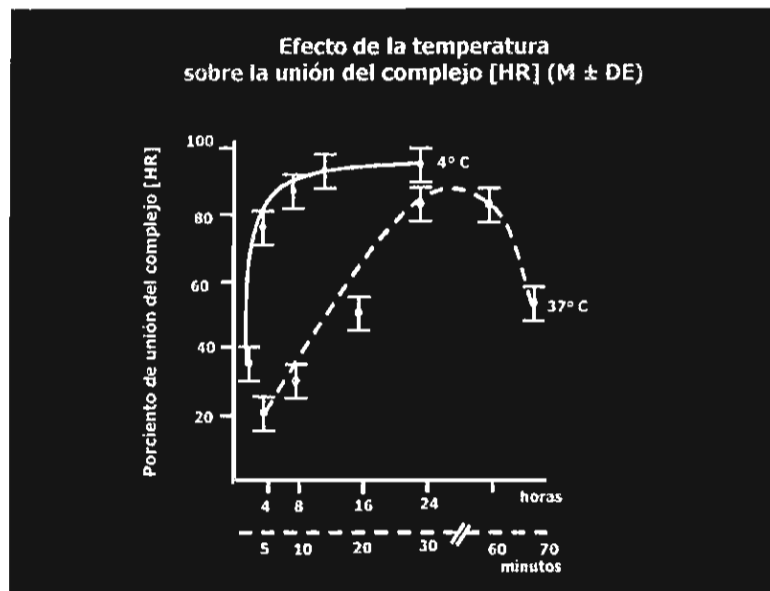


Figura 28. Curva de saturación del complejo [HR] en función de la temperatura

6.5 DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE ESTRADIOL

Curva de saturación y análisis de Scatchard para RE.

La saturación del receptor en el sistema de incubación se alcanzó a una concentración de 100 fmolas/ml de estradiol- H^3 obteniéndose una constante de disociación (K_d) de 3.57×10^{-11} M y número de sitios de unión (n) de 10.8 fmolas/ml correspondientes a 27.0 fmolas/mg proteínas (Figuras 29 y 30).

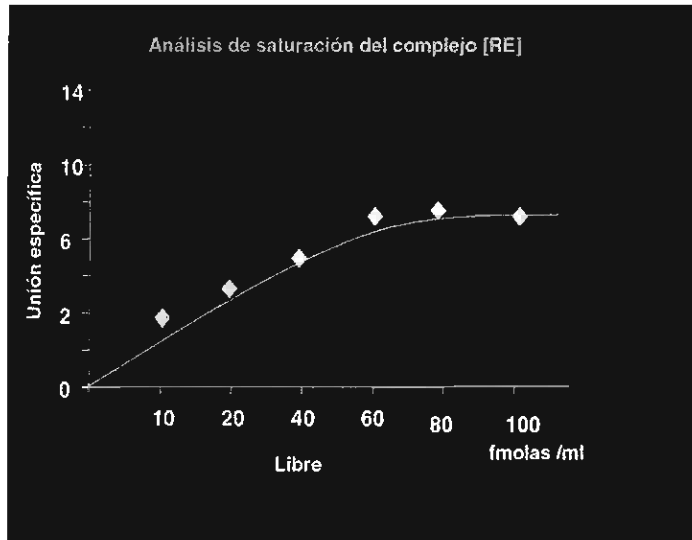


Figura 29. Curva de saturación del complejo [RE]

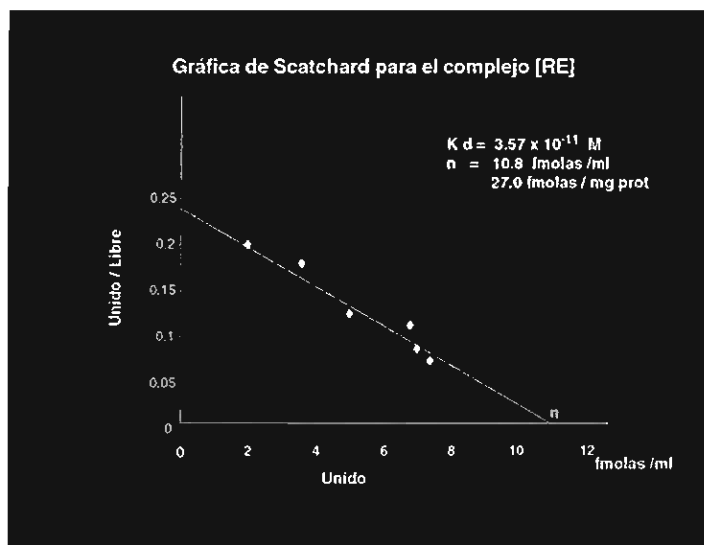


Figura 30. Gráfica de Scatchard para el complejo [RE]

6.6 DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE PROGESTERONA

Curva de saturación y análisis de Scatchard para RPg.

La saturación del receptor en el sistema de incubación se alcanzó a una concentración de 100 fmolas /ml de ORG H³ -2058 obteniéndose una constante de disociación (Kd) de 4.55×10^{-11} M y número de sitios de unión (n) de 9.8 fmolas/ml correspondientes a 19.6 fmolas/mg de proteínas (Figuras 31 y 32).

Para el análisis de la concentración de RPg se utilizó el compuesto sintético ORG-2058 por no tener afinidad por las proteínas de transporte SHBG y CBG.

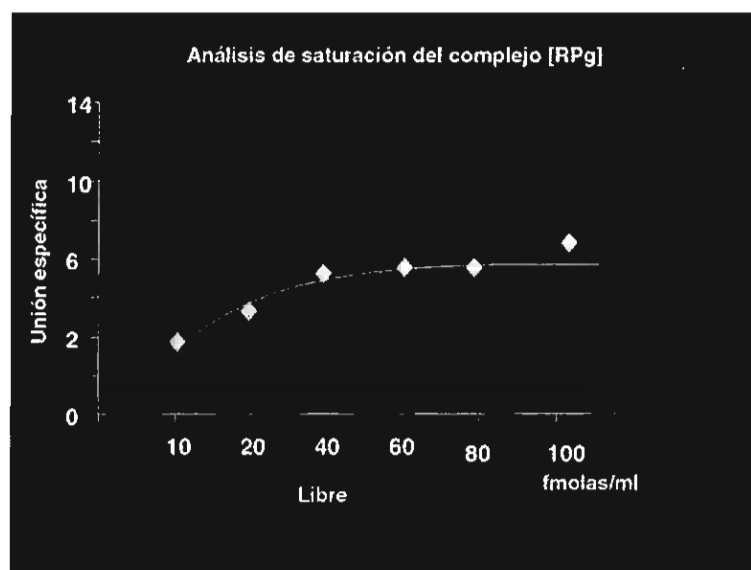


Figura 31. Curva de saturación del complejo [RPg]

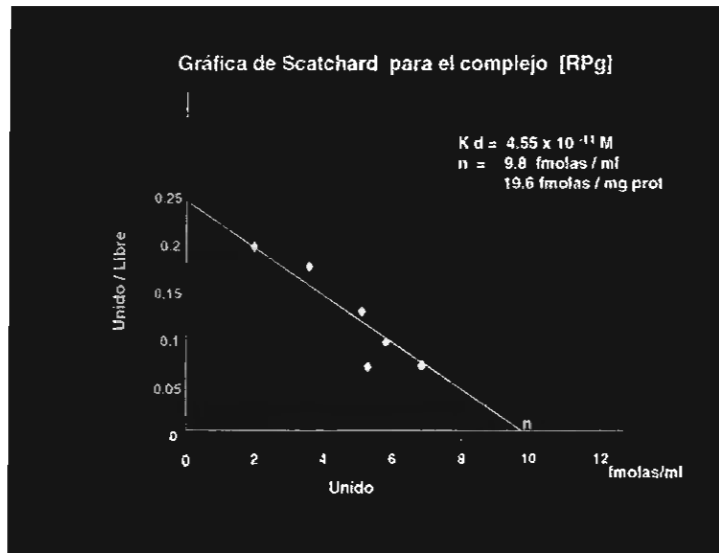


Figura 32. Gráfica de Scatchard para el complejo [RPg]

7. CONCENTRACIÓN DE RE Y RPg EN LOS TEJIDOS ESTUDIADOS

El estudio de los tejidos con respecto a este parámetro, se inició con la cuantificación de ambos receptores, agrupando sus valores de acuerdo al grado de NIC que contenían.

Cifras de RE y RPg en fmolas/ mg proteínas ($M \pm DE$)

Se encontró que los valores más altos y positivos de ambos receptores, correspondieron a los tejidos con NIC 1 y NIC 2 por el contrario, se encontraron las cifras mas bajas y negativas en los tejidos con NIC 3 (Figura 33).

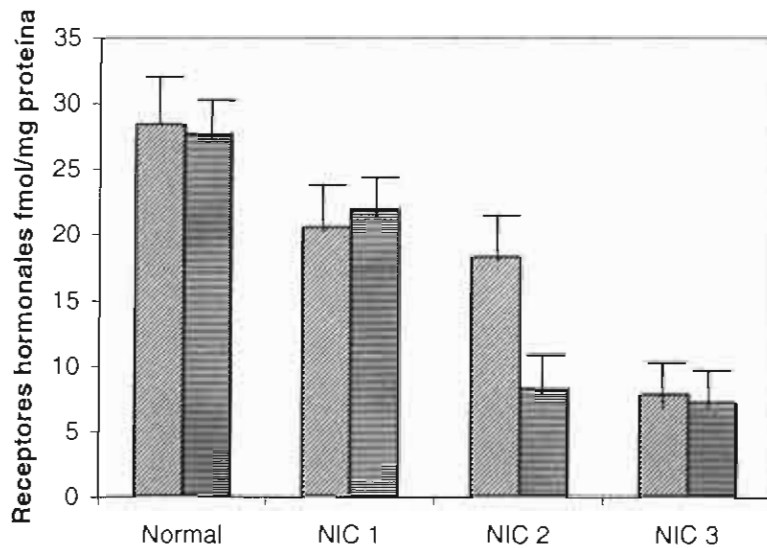




Figura 33. Concentración de receptores hormonales en los tejidos estudiados

RE 

RPg 

7.1 Grupos de receptores (RE^+RPg^-) (RE^-RPg^+) (RE^+RPg^+) (RE^-RPg^-) y grado de NIC.

Para analizar cada tejido para ambos receptores, se agruparon de la siguiente manera: (RE^+RPg^-) (RE^-RPg^+) (RE^+RPg^+) (RE^-RPg^-) encontrándose que para el grupo control correspondió a: 11 (36.7%), 10 (33.3%), 9 (30.0%) 0 (0%), respectivamente. Para los casos con NIC esta agrupación correspondió a: 18 (25.7%), 13 (18.6%), 12 (17.1%) y 27 (38.6%), respectivamente, encontrándose que una gran mayoría tenía ambos receptores negativos (Figura 34).

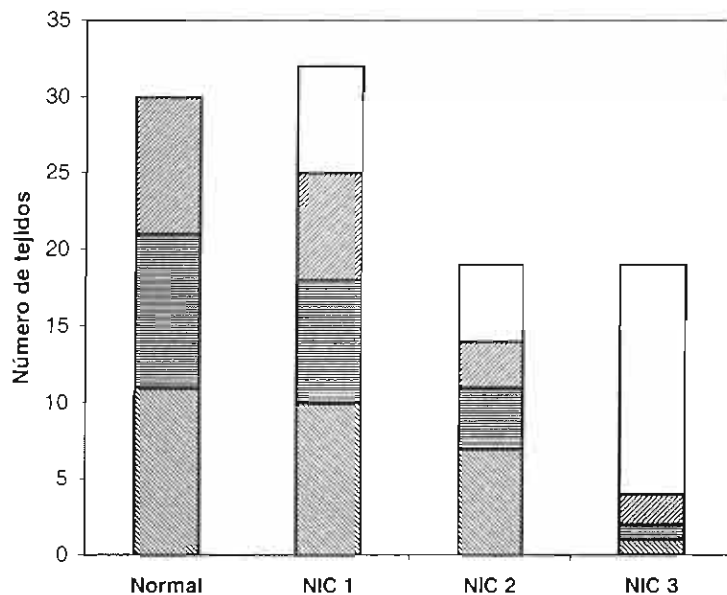
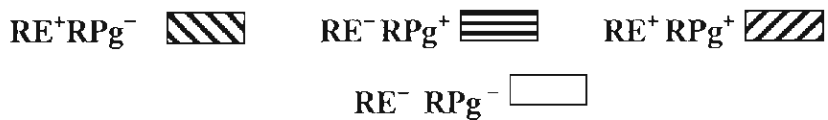


Figura 34. Número de tejidos y estado de receptores hormonales



7.2 Análisis estadístico de RE en fmolas/ mg proteínas en tejidos con diferentes grados de NIC y clasificación de acuerdo al uso de ACO.

Como el objetivo del presente proyecto estaba dirigido hacia el estudio y comportamiento del RE, el análisis de los resultados obtenidos y su correlación con los demás parámetros, se dirigió hacia este receptor únicamente.

Con respecto a los valores de RE, se encontró una correlación altamente significativa entre los niveles de RE y el grado histológico de NIC, entre pacientes con uso y sin uso de ACO, encontrándose que los niveles más altos de RE correspondieron a los tejidos de NIC 1 de pacientes con uso de ACO ($p < 0.005$). Estadísticamente se determinó que este grupo

presenta un incremento en el riesgo relativo para la presencia de NIC (RR= 1.31, 95% CI 1.0 - 2.3).

Con respecto a la tendencia que presenta la concentración del RE conforme avanza el grado de NIC, fue altamente significativa en los grupos con NIC 2 ($p < 0.05$) y NIC 3 ($p < 0.005$) con respecto al grupo control y en ambos grupos (grupos CAO y SAO) (Figura 35).

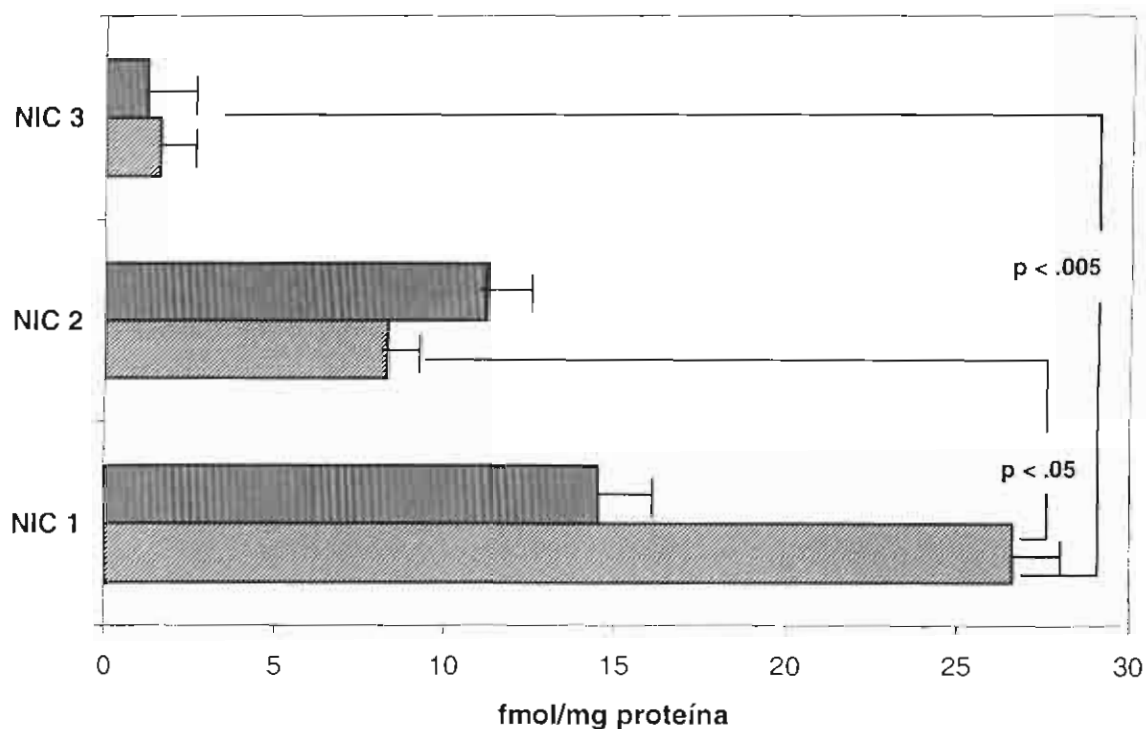




Figura 35. Concentración de RE en pacientes con diferente grado de NIC sin  y con  administración de anticonceptivos orales

7.3 Número de pacientes con RE positivo y diferente grado de NIC . Distribución de acuerdo al uso de ACO.

Cuando se agruparon los casos de acuerdo a presencia de receptor a estradiol positivo (RE +), al grado de NIC y al uso de ACO, se encontró que el mayor número de tejidos RE + correspondieron a tejidos NIC 1 en ambos grupos (grupos CAO y SAO). Para los tejidos NIC 2, el mayor número de RE + se encontró en el grupo SAO y para tejidos NIC 3, unicamente se encontró un tejido RE +, este dentro de los casos CAO (Figura 36).

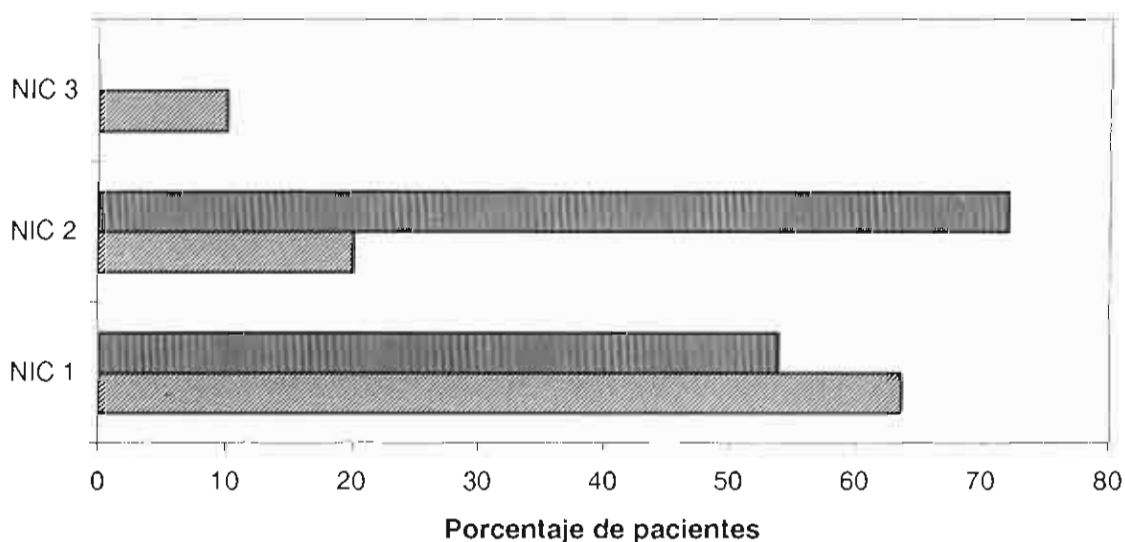




Figura 36. Porcentaje de pacientes con NIC y RE+ sin  y con  administración de anticonceptivos orales

8. ESTUDIO DE SECUENCIAS PARA VPH tipo 16

Se aplicó la prueba de PCR para la detección de secuencias de DNA tipo 16 en 34 tejidos cuyas biopsias de tumor primario estuvieron clasificadas como VPH positivo, encontrándose que el 70.6 % (24 tejidos) contenían VPH tipo16.

Al comparar estos resultados con las pacientes sanas, se encontró una diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$) ya que no se detectó en ninguna (0%) de las 24 pacientes sanas.

Al analizarse los resultados con respecto al grado de NIC se encontró positividad de VPH16 en tejidos con NIC1, NIC 2 y NIC3 sin embargo el 46% (11 tejidos) correspondieron a NIC 3 (Figura 37 , M= No.de muestra).

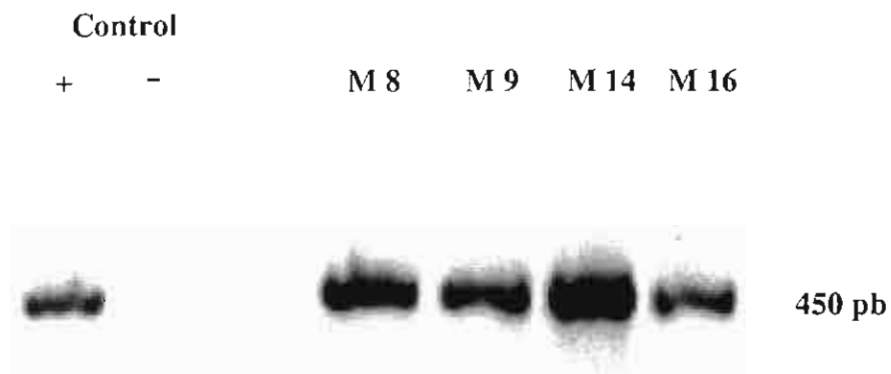


Figura 37. PCR de diversos tejidos e identificación de VPH tipo 16

V. DISCUSIÓN

La comunicación celular es un proceso fundamental para la supervivencia de la célula, habiendo varios tipos o formas de realizarse dentro de las que se encuentran la comunicación autocrina, paracrina y sináptica, las cuales se distinguen entre sí, por la forma en que se realizan así como por los elementos celulares que participan.

Los distintos tipos de comunicación celular tienen en común, el permitir a la célula la percepción de los cambios del exterior, así como generar una respuesta específica, la que finalmente la lleva a su adaptación.

Los mecanismos moleculares que en ella se llevan a cabo durante esta respuesta, se conocen con el término general de comunicación intracelular, por medio de la cual, la célula regula diversas funciones esenciales tales como metabolismo, crecimiento, proliferación y diferenciación (88).

Cada célula tiene en su genoma, la información necesaria para dar lugar a la expresión de una gran variedad de elementos de naturaleza proteica, que en conjunto y de manera coordinada, participan en la comunicación intercelular así como intracelular. Alteraciones en estos procesos de comunicación y regulación génica, podrían llevar a la célula a la muerte o a procesos de carcinogénesis (89), lo que depende esencialmente del nivel en que ocurra la alteración, el factor o factores involucrados, así como los mecanismos de reparación que utilice la misma célula.

Con respecto al proceso de carcinogénesis, es una enfermedad que pasa por varias etapas como: daño a nivel genético, transformación celular, desregulación de la proliferación y metástasis.

El cáncer es un problema multifactorial, en donde se encuentran involucrados diversos eventos como: mutaciones, deleciones, translocaciones, aberraciones cromosómicas, activación de oncogenes, integración de virus (como es el caso del VPH) (90) y/o, la presencia de diversos factores como: factores químicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas), energía radiante (rayos ultravioleta, rayos X, rayos gamma) (91), alimentación (aflatoxina B1, producida por el moho *Aspergillus flavus* que se encuentra en cacahuates y otros alimentos), estilo de vida (consumo de cigarrillos) (92) y otros factores (agentes farmacológicos), lo cual se manifiesta acrecentado, si existen fallas en los mecanismos de reparación genética y/o existencia de una supresión inmunológica.

El cáncer constituye un importante problema de salud pública. En México, ocupa el segundo lugar como causa de muerte y en particular, el CaCU en las mujeres y las leucemias en niños y jóvenes, son los mas frecuentes. Con base en lo anterior, resulta importante estudiar y entender las bases bioquímicas y moleculares, así como diseñar estrategias para su prevención, oportuna detección y tratamiento.

Algunos tipos de cánceres en la actualidad y en ocasiones, pueden ser tratados y curados, tal es el caso del cáncer de mama que al tener una oportuna detección puede ser controlado.

La biología celular y molecular junto con la medicina y la bioquímica han dado grandes aportaciones para poder dilucidar los mecanismos celulares, moleculares y factores

bioquímicos que pudieran provocar que una célula se transforme en cancerosa. En la actualidad, se ha puesto especial atención en los mecanismos durante la comunicación celular así como durante la activación de oncogenes que participan e intervienen en los procesos carcinogénicos (93).

Para su estudio y aplicación de tratamientos, se han diseñado terapias como la quirúrgica, radioterapia y quimioterapia. Desafortunadamente estas en muchos casos, no son eficientes, ya que el cáncer puede localizarse en un sitio inalcanzable, estar muy diseminado en el organismo o hacerse resistente, entrando en juego la calidad de vida del paciente. Un ejemplo del uso de estas terapias, es el fármaco tamoxifen (TAM) (94) muy utilizado en la terapia endocrina, el cual actúa normalmente como un antiestrogeno compitiendo con el estradiol, por unirse al sitio activo del receptor, pero se ha observado que puede desarrollar resistencia en algunos de los tumores tratados ya que muchos de ellos vuelven a crecer estimulados por el mismo, pues su actividad biológica puede estar encaminada a realizarse de dos maneras, como agonista o como un antagonista no esteroideo (95).

Con respecto al CaCU, es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento anormal y diseminado de células que se inicia siempre como una enfermedad localizada, constituyendo la principal causa de mortalidad de todos los cánceres del tracto genital femenino coexistiendo frecuentemente en cuello uterino, vagina y vulva, los que comparten causas y bases epidemiológicas (96).

Es de gran interés el estudio de la carcinogénesis desde varios puntos de vista como estudios epidemiológicos hasta estudios genéticos, participando entre otros, la investigación de diversas proteínas dentro de las que se encuentran los receptores hormonales.

La localización de los RE se ha ubicado en el núcleo celular en ausencia y en presencia de la hormona (97) cuya cantidad y distribución se encuentra influenciada por el ciclo menstrual y embarazo. En el cervix, células positivas a receptores a estradiol (RE+) existen en mayor número en la fase proliferativa que en la fase secretora, lo que sugiere que la proliferación y/o maduración del epitelio escamoso exocervical esta influenciado por esteroides ováricos, principalmente por estrógenos.

La localización subcelular de los RE, esta bajo el control de diversos mecanismos de regulación que los mantienen en el núcleo, en donde al unirse a su ligando, forma un complejo [ER] que posteriormente dimeriza. En ausencia de la hormona, el RE en un monómero inactivo que se encuentra formando un complejo asociado a HSPs (90 kDa, 70 kDa y 56kDa). La unión a su ligando provoca la disociación y dimerización del RE, con la subsecuente unión a los ERE localizados en la región palindrómica del DNA, lo que incrementa su transcripción. Las funciones de activación , formación del complejo [ER] y dimerización son sobrepuestas una con otra, lo que sugiere que estas funciones son activadas con la disociación de las HSPs (48).

El DNA viral, induce a una variedad de lesiones epiteliales proliferativas, conociéndose actualmente que la infección de este tipo se transmite por contacto sexual, aunque se desconoce a la fecha el mecanismo exacto de interacción virus-célula huésped.

El curso natural de las lesiones precursoras del cervix es variable ya que pueden presentarse dos procesos: una regresión espontánea de la lesión proliferativa o una transformación celular encaminada a un estado más avanzado.

1. Estrógenos y su papel durante la carcinogénesis

Los mecanismos por los cuales los niveles estrogénicos pueden causar daño en el DNA durante el proceso de carcinogénesis, son complejos e involucran diversos efectos genómicos, como la proliferación celular y la promoción de una mutación, entre otros (98).

Por otro lado, varios cambios genéticos pueden ocurrir en el RE causando respuestas aberrantes a sus ligandos, así como alterando acciones reguladoras en RE α .

La identificación de los dominios funcionales en el RE, ha aumentado el interés en el conocimiento sobre las vías por las cuales ocurren ciertas acciones estrogénicas, así como en los pasos durante el proceso de regulación hormonal que son altamente vulnerable a sufrir alteraciones por mutación.

Aunque se ha demostrado que los estrógenos estimulan la liberación de diversos factores en células cancerosas cultivadas *in vitro*, no se ha establecido aún una correlación directa entre las acciones de los estrógenos y la expresión de estos factores de transformación (99).

2. Metabolismo del estradiol y receptores estrogénicos

El E₂ es uno de los estrógenos más activos biológicamente, además de tener gran afinidad por sus receptores. La E₁ generada por la oxidación en el carbono C17 puede ser hidroxilada en la posición C-2 para dar lugar a la 2-hidroxiestrone (2OH-E₁) (100) o en la

posición C-16 α para dar lugar a la 16 α -hidroxiestrone (16 α -OH E₁) (101) además de estriol (E₃), ambos con propiedades agonistas (102) (Figura 38).

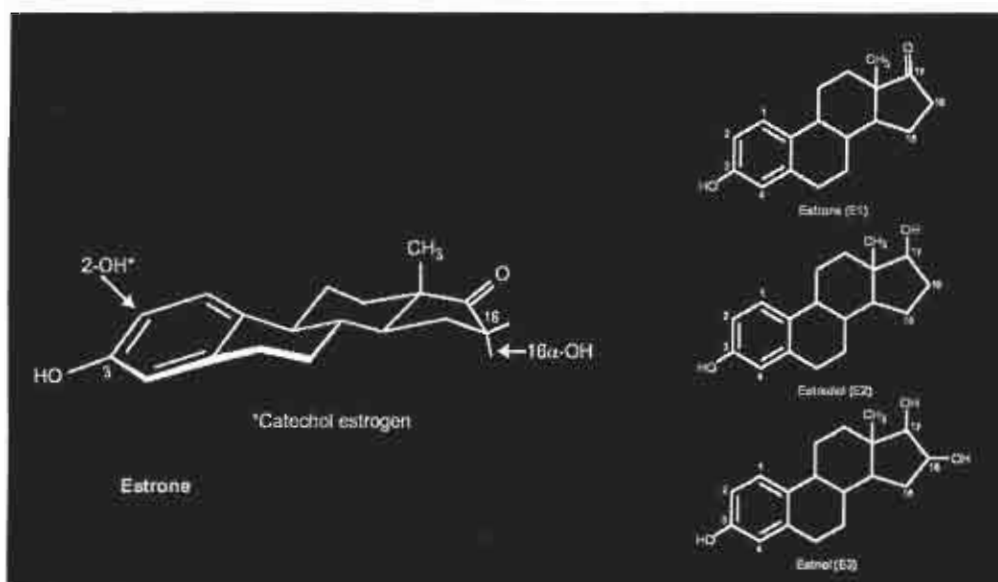


Figura 38. Metabolismo del estradiol

El metabolito 2OH-E₁ es inactivo y altamente antiestrogénico (100) contrariamente a lo que muestra el metabolito 16 α -OHE₁ el cual es altamente estrogénico (101), además de unirse en forma covalente a grupos amino formando aductos con las proteínas, incluyendo a los RE con los que podría presentar una actividad prolongada y una respuesta francamente hormono-dependiente (103).

1. Isoformas del receptor de estradiol y efectos agonistas

Recientemente se ha demostrado por técnicas de autoradiografía y de hibridación de RNAm que existen dos isoformas del RE, el RE α y el RE β (Figura 39). El primero conocido ya desde hace varias décadas, se creía era el mediador único de todas las acciones transcripcionales de los estrógenos. El RE β es codificado por un gen diferente al que expresa el RE α (104,105) y ambos, tienen elevada homología estructural en el dominio de unión al DNA y solo homología parcial en el dominio de unión al esteroide y en otras regiones de la molécula, lo que les permite presentar diferente especificidad por el ligando que unen, así como diferente distribución en los tejidos (106).

Los compuestos o ligandos que pueden interaccionar con ambos receptores son variados y de estructura química diversa sin embargo, requieren como requisito indispensable tener un anillo aromático.

Estos ligandos agonistas o antagonistas de los estrógenos, se unen al dominio de unión del RE en el mismo sitio y de manera similar a los estrógenos, pero dependiendo de su estructura inducen conformaciones distintas en el dominio de activación, además de que el complejo proteico así formado, puede interaccionar con los co-activadores o con los co-represores para activar o inhibir la transcripción (107).

La unión del receptor con su ligando, desencadena cambios conformacionales en el mismo, dimerización y una serie de reacciones en cascada, en las que el complejo [ER] en concierto con los factores de activación, determinan la transcripción, síntesis del mRNA y finalmente la respuesta celular a la acción de los estrógenos (108).

A pesar de su localización nuclear el receptor no se mantiene estático, se moviliza constantemente del núcleo al citoplasma libremente, mientras que el paso del citoplasma al

núcleo es un proceso que requiere energía. En ausencia del ligando, el RE se localiza principalmente en el núcleo celular como un complejo oligomérico formado por la unión a las HSPs, cuya función es mantener al receptor inactivo y facilitar su transporte entre membranas. Considerando que el receptor dimeriza una vez que se une al esteroide, existe la posibilidad de que pueda formar homodímeros (RE α -RE α ó RE β -RE β) ó heterodímeros (RE α -RE β) lo que diversifica su especificidad por el ligando así como la complejidad de la respuesta con efecto agonista o antagonista, dependiente de la isoforma involucrada (104,105).

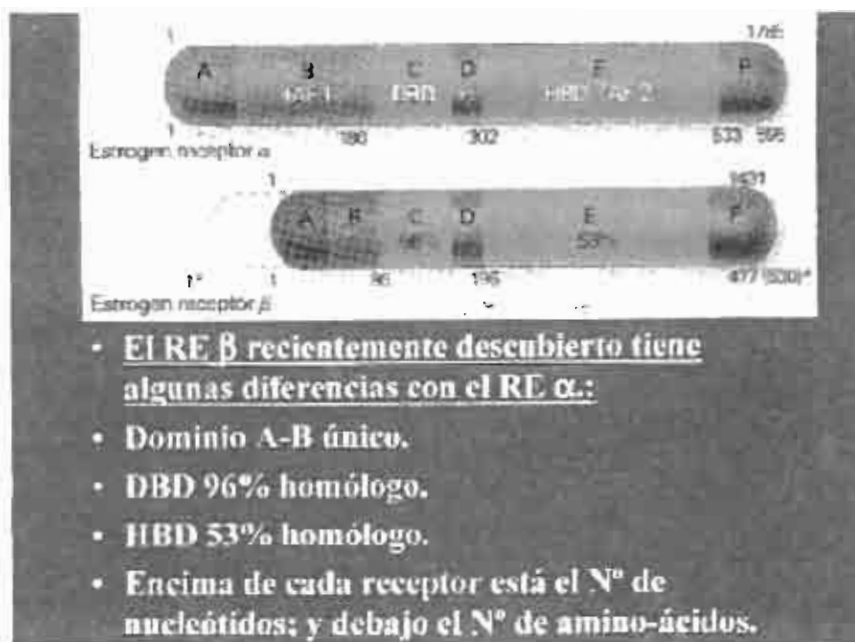


Figura 39. Isoformas del receptor de estradiol (RE α , RE β) y homología entre sus dominios

4. Virus del papiloma humano y su papel durante la carcinogénesis

La integración del DNA viral dentro del genoma celular parece ser muy importante durante el desarrollo del CaCU, aunque este solo evento no es el único responsable para que se presente la carcinogénesis cervical, ya que muchos tumores infectados contienen DNA viral en forma episomal (DNA viral circular, mantenido en forma libre o extracromosomal, también llamado "episoma") por tal motivo, el desarrollo del CaCU es un proceso biológico degenerativo, el cual no puede ser explicado simplemente por la presencia de algún tipo de VPH.

Es evidente en consecuencia, que son diversos los factores los que promueven la aparición de células transformadas y el establecimiento de un fenotipo neoplásico, por lo que se ha puesto gran interés en investigar mas sobre el tema, para tratar de conocer otros posibles factores que pudieran participar durante el desarrollo neoplásico y transformación cancerígena del tejido cervical.

Epidemiológicamente se ha atribuido que alrededor del 95% de los cánceres del cervix están asociados a la presencia de VPH así, el VPH tipo 16 representa la mayor proporción (49.2%) seguida por el VPH tipo 18 (11.7%), el VPH tipo 45 (8%), el VPH tipo 31 (5%) y el restante (16.1%) para todos los demás tipos, proporción que se ha establecido dentro de la población mundial (92).

El VPH 16 de alto riesgo codifica para dos oncoproteínas E6/ E7 las cuales inactivan la función de dos proteínas reguladoras del ciclo celular la p53 y p105 Rb, respectivamente. (38) Sin embargo, algunas lesiones intraepiteliales de tipo escamoso que contienen este DNA virus no progresan a carcinoma in situ o a invasor del cervix, por lo que se sugiere la participación de otros factores (109).

El embarazo en donde los niveles estrogénicos se mantienen altos, es un factor de riesgo importante ya que se puede favorecer la permanencia del VPH. De la misma manera el uso prolongado de ACO deben presentar un doble riesgo, en infección por VPH y en NIC de cualquier grado (110).

5. Metabolismo del estradiol, VPH y carcinogénesis cervical

La NIC asociada a VPH involucra principalmente el epitelio escamoso metaplásico, cuya topografía e histología es compleja y dinámica, siendo principalmente afectada por la edad, el estado hormonal, preñez y paridad.

Los mecanismos por los cuales los estrógenos y/o sus metabolitos pudieran favorecer la aparición de una lesión neoplásica, son probablemente a través de una transactivación oncogénica del genoma viral en donde la activación de la expresión de los oncogenes E6/ E7 presentes en el genoma del VPH y el metabolismo estrogénico (específicamente por la formación de la 16α -OH E₁) (111) pudieran funcionar como un sinergismo biológico, en donde la 16α -hidroxilación aceleraría la expresión oncogénica del VPH así como la expresión oncogénica del VPH aceleraría la 16α - hidroxilación (112).

6. Significado fisiológico de los resultados.

Con respecto a los resultados obtenidos de este estudio, es importante mencionar, que todos los estudios de gabinete como: edad a la primera gesta, número de gestas y número de parejas sexuales, fueron significativos estadísticamente ($p < 0.05$) cuando se tomó como variable dependiente la infección por VPH; de la misma manera, cuando se analizó cada parámetro de acuerdo al uso de ACO, fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$ -

$p < 0.005$) para el desarrollo de NIC, pero cuando se analizaron los mismos, tomando como variable dependiente la infección por VPH, estos resultados fueron altamente significativos ($p < 0.0001$) lo cual hace resaltar, que la presencia de VPH es definitiva para el desarrollo de NIC de cualquier grado.

Con respecto al perfil hormonal, no se obtuvieron resultados significativos para LH, FSH, PRL, E_2 ni P_4 en el grupo SAO, sin embargo, los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) para E_1 en pacientes con NIC 2 y NIC 3 cuando se encontraba asociado el VPH. Cuando se analizaron los resultados de pacientes CAO las hormonas LH, FSH, PRL ni P_4 tuvieron significado estadístico, sin embargo cuando se analizaron los valores de E_2 y E_1 se observó que estos eran significativos cuando se encontraba asociado el VPH a NIC 3 ($p < 0.05$).

En cuanto a la identificación del VPH tipo 16 en 24 de los 34 tejidos estudiados, concuerda con lo descrito en la literatura (99) ya que este tipo de VPH, se encontró en el 70.6 % de los casos analizados.

Con respecto al número de sitios de unión para E_2 y P_4 (RE y RPg) en el Ct de los tejidos analizados, se observa que ambos receptores disminuyen en cuanto avanza el grado de NIC, quedando casi nulos en los tejidos con NIC 3. lo cual revela que estos sitios se encuentran ocupados o modificados. Con respecto a los RE en el grupo SAO, se observa que el número de sitios de unión disminuye conforme avanza el grado de NIC, sin embargo cuando se analizó el grupo CAO, el comportamiento es distinto ya que el número de sitios de unión aumenta drásticamente en casos con NIC 1 (lo que concuerda con el uso prolongado de ACO pues su producción es estimulada por dicha administración) sin embargo, conforme avanza el grado de NIC el número de sitios de unión van disminuyendo hasta quedar casi nulo en casos con NIC 3.

A continuación se sugieren algunos mecanismos por los cuales los factores de riesgo antes mencionados pudieran realizar dicha función biológica:

1 . Receptor de estradiol (región E), 16 α -hidroxilación y carcinogénesis cervical.

El dominio de unión al ligando en el RE, es una región formada por 250 aminoácidos, localizada en la región del COOH terminal y responsable de la unión al E₂ o a cualquier otro compuesto estrogénico como la 16 α -OH E₁ que ocupa el dominio de unión hormonal del receptor, confiriéndole cambios conformacionales al mismo.

Este metabolito del estradiol (16 α -OH E₁) al formar el complejo [R- 16 α OH E₁] y por las propiedades antes mencionadas, se propone que sea el directamente involucrado en la transformación celular.

Para explicar este proceso, se proponen los siguientes mecanismos de reacción: como la reactividad del grupo ceto en posición C17 de la 16 α -OHE₁, se encuentra aumentada por el efecto inductivo del hidroxilo vicinal (en posición C16), es altamente vulnerable de sufrir un ataque nucleofílico por el grupo amino de alguna de las lisinas de la región E del RE, efectuándose una reacción de Schiff entre ambos grupos. Durante el proceso de esta reacción, se realizan deshidrataciones y como intermediario, la formación de una imina protonada, la que finalmente dará lugar a la base de Schiff (Figuras 40 y 41).

La realización de este mecanismo dependerá de varias circunstancias:

- 1) La formación del complejo [R-16 α OHE₁] desencadenaría cambios conformacionales en el receptor, lo que lo llevaría a una mutación. Entre estas posibilidades se encuentra la mutación en el exón 7 de la región E, convirtiéndolo en dominante negativo e inhibiendo la acción del RE_n. Este mecanismo, nos explicaría la persistencia de la no aparición de estos receptores en los tejidos

analizados, así como la relación directa que se guarda entre número de sitios específicos, número de tejidos con ausencia de receptores y agresividad.

- 2) Durante la dimerización del RE, existe la posibilidad de que puedan formarse homodímeros ($RE\alpha-RE\alpha$ ó $RE\beta-RE\beta$) ó heterodímeros ($RE\alpha-RE\beta$) lo que diversifica su especificidad por el ligando así como la complejidad de la respuesta, con efecto agonista o antagonista, dependiendo del ligando y de la isoforma involucrada. Este antecedente nos explicaría la diversidad en la especificidad por el ligando y el efecto agonista, lo que nos daría como respuesta una proteína modificada.

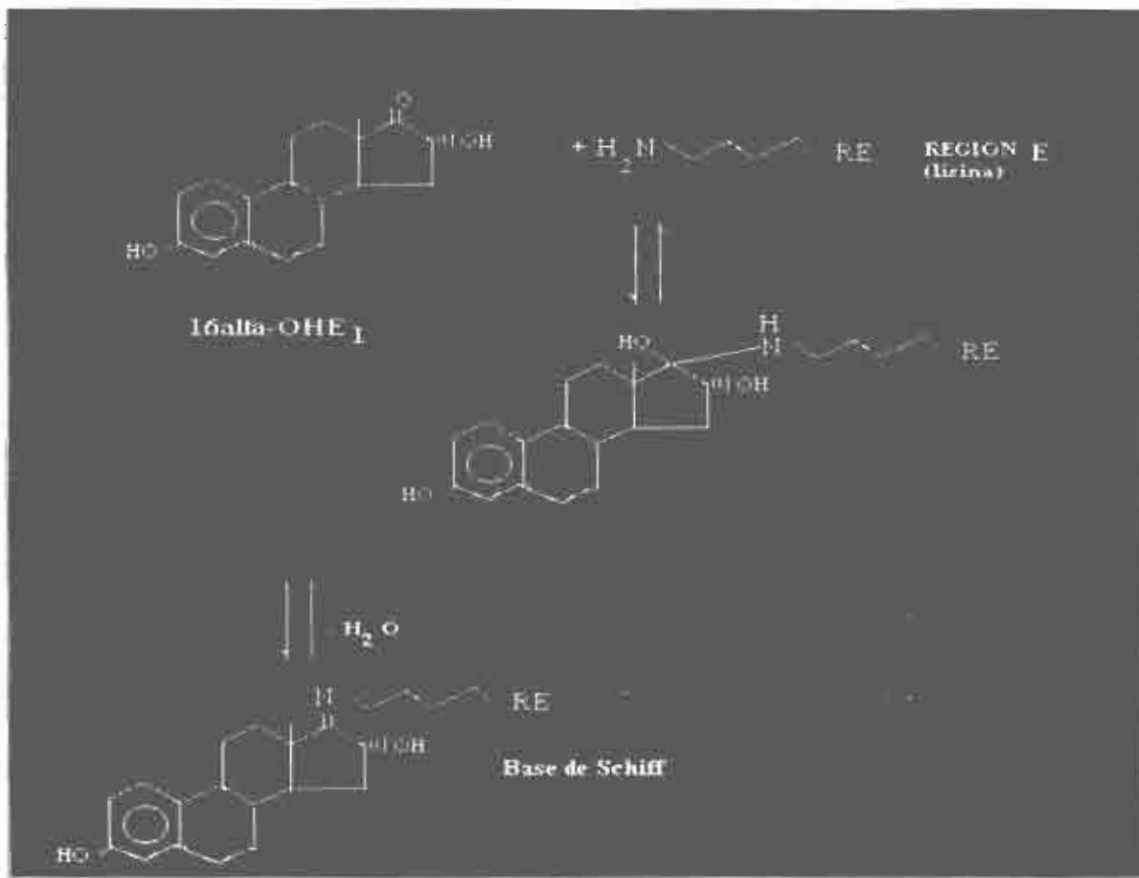


Figura 40. Reacción de Schiff entre el grupo ceto de la 16 α -OHE₁ y el grupo amino de una lisina de la región E del RE

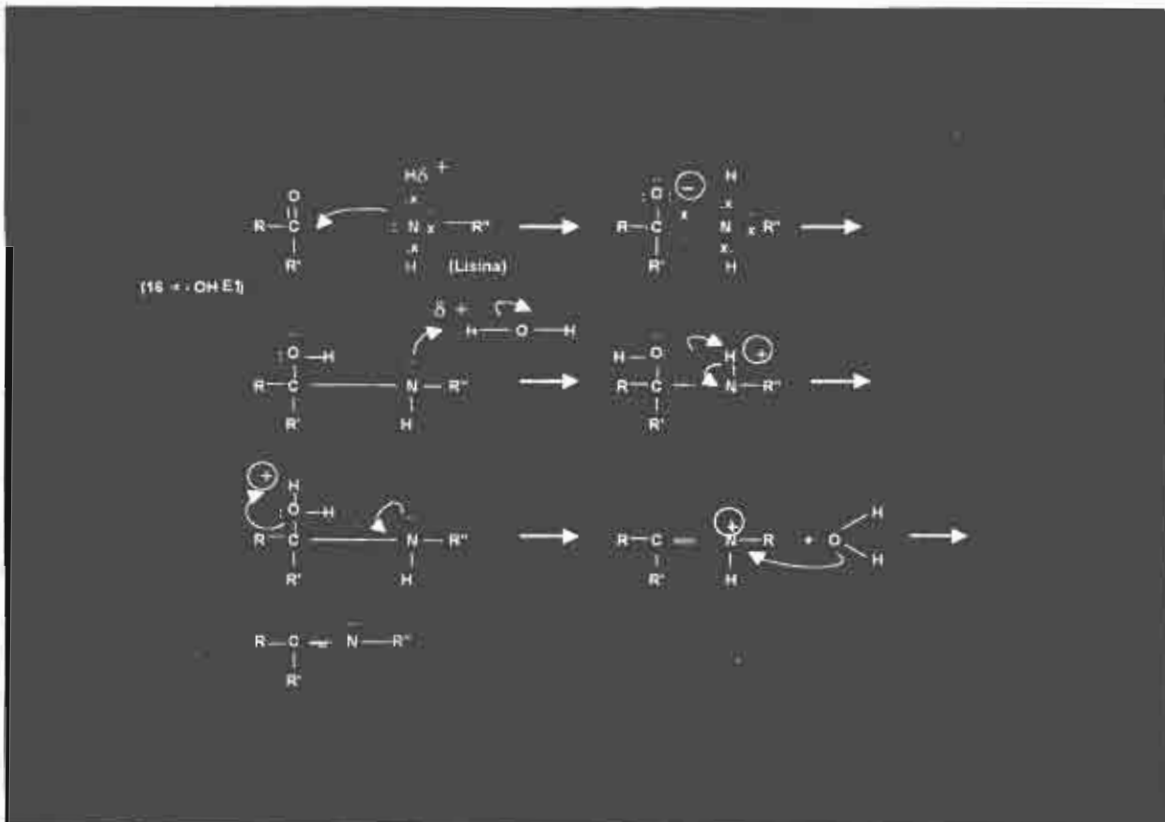


Figura 41. Mecanismo de reacción para la formación de una base de Schiff

La reactividad del grupo ceto en C17, se encuentra aumentada por el efecto inductivo del grupo hidroxilo del carbono vicinal (en posición C16), lo que lo hace altamente susceptible a un ataque nucleofílico del grupo amino de una lisina de la región E del RE. Esta reacción induce a la formación de una base de Schiff.

2. Elementos de respuesta a estrógenos (ERE), VPH y RE (región C)

El dominio de unión al DNA en el RE es una región de cerca de 70 aa, altamente conservada que se une con elevada afinidad a una secuencia específica de nucleóticos del DNA llamados ERE que se encuentran en la región promotora del gen, y que se definen como una secuencia palindrómica conformada de AGGTCA-NNN-TGACCT en donde N representa una región espaciadora de tres pares de bases, los cuales pueden ser variables.

Por otro lado, a lo largo de todo el genoma del VPH, se reconocen siete secuencias con alta homología a los ERE (AGGTCA-NNN-TGACCT) por lo que se propone que el mecanismo de reacción, durante la expresión oncogénica del VPH sería: el complejo previamente formado por [R- 16 α -OHE₁] no se una a los ERE, sino que pudiera reconocer a alguna de las siete secuencias similares del genoma viral, especialmente a la secuencia GGGTCAAGTTGACTA (3201- 3215) correspondiente a E2. Con dicho mecanismo pudiera inactivarse el gen E2 del DNA virus, con lo cual quedarían activados los oncogenes E6/E7 del genoma viral (Figuras 42 y 43).

Este mecanismo se llevaría a cabo por alguna de las siguientes razones:

- 1) Por presencia de un impedimento estérico entre el complejo formado [R- 16-OHE₁] y los ERE .
- 2) Por presencia de secuencias homólogas entre los ERE del genoma celular y el DNA viral, debida a una degeneración del código genético.

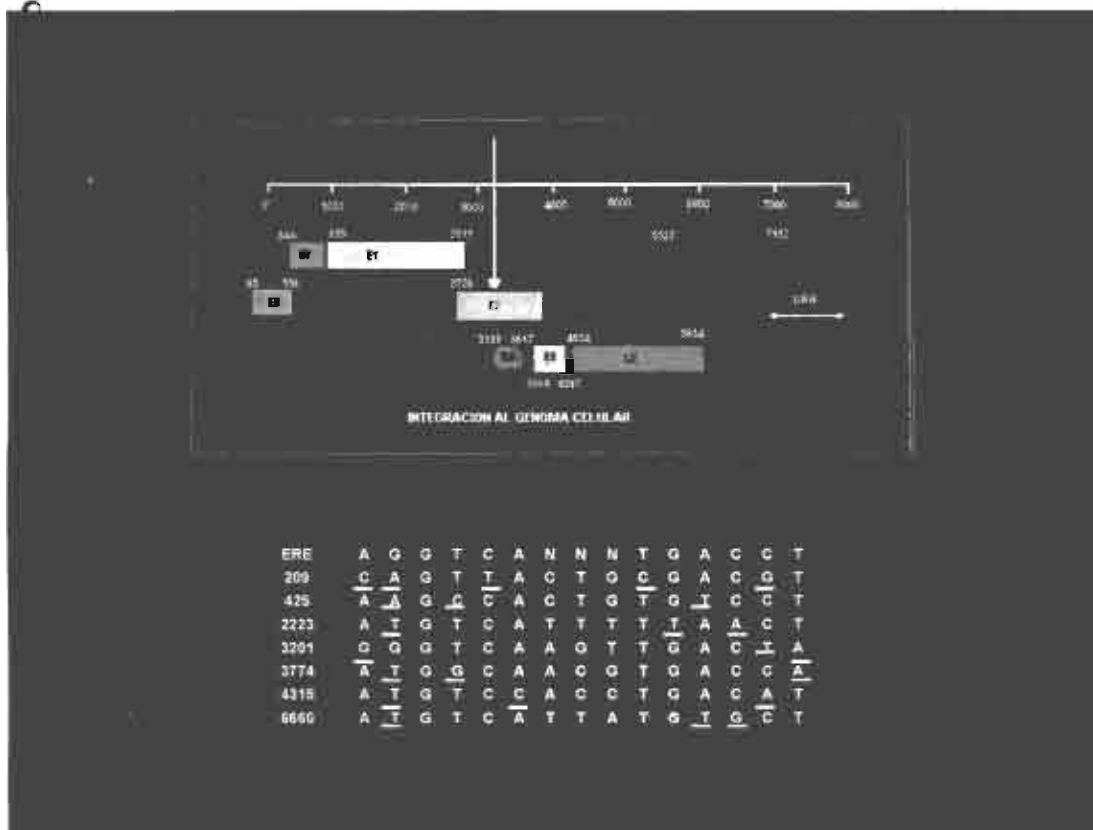


Figura 42. Similitud de siete secuencias del genoma viral, con la secuencia que integra a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE)

En la parte inferior de la figura se señalan, las siete secuencias del DNA viral, señalándose el nucleótido que difiere (N) con respecto a la primera secuencia correspondiente a los ERE.

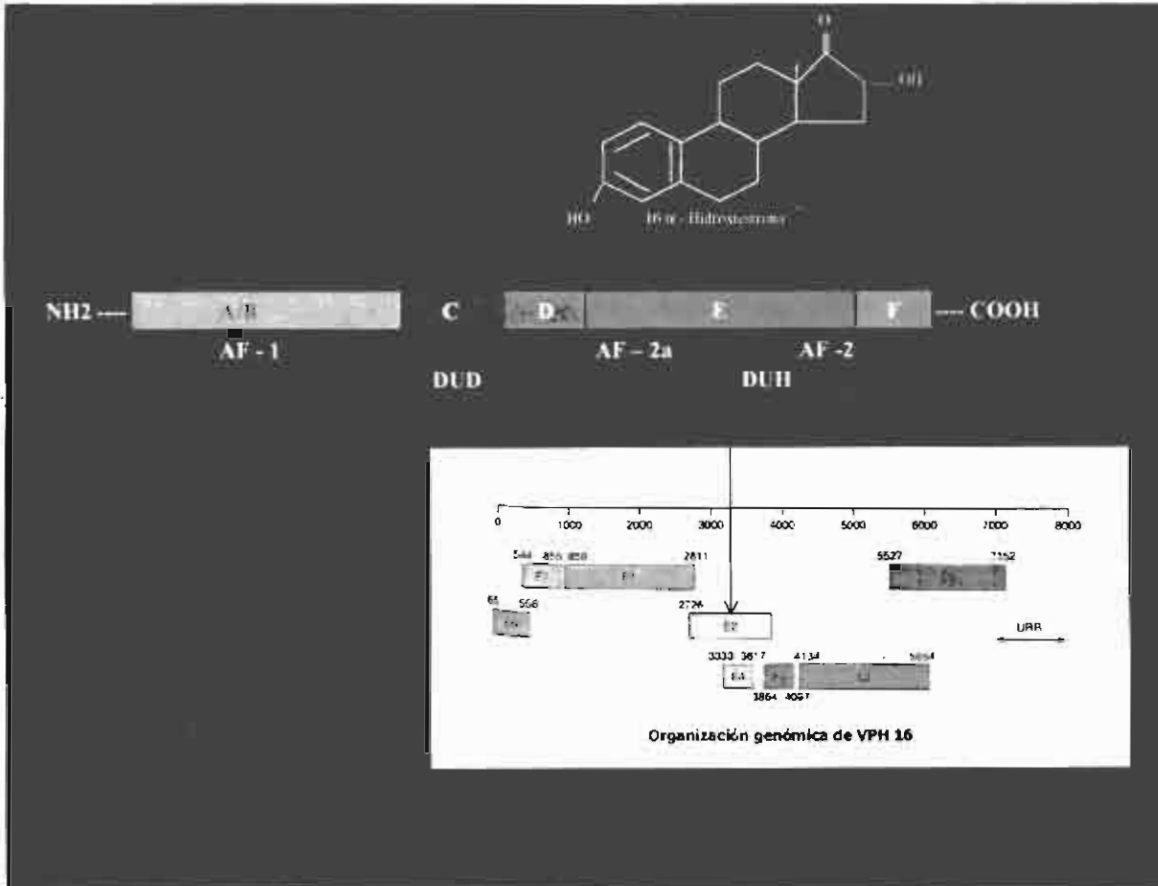


Figura 43. Mecanismo de expresión de los oncogenes E6/E7 del genoma viral

El complejo previamente formado por R- hormona [R- 16 α -OHE₁] **no** une a los elementos de respuesta a estrógenos presentes en el DNA antes de su dimerización, sino que pudiera reconocer a una de las siete secuencias altamente similares del genoma viral (secuencia 3201-3215, correspondiente a E2). Con dicho mecanismo quedaría inactivado el gen E2 del DNA viral y activada la expresión de los oncogenes E6/E7 del mismo genoma.

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se llegó con el presente estudio son las siguientes:

1. La utilización de anticonceptivos hormonales orales, constituye el factor de riesgo más importante para infección por virus del papiloma humano y el desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical; ya que el hiperestrogenismo endógeno provocado por esa carga hormonal extra, parece ser indispensable para la integración de este virus al genoma celular.
2. Antes de la prescripción de cualquier anticonceptivo hormonal, es necesario descartar cualquier infección por virus del papiloma humano o presencia de neoplasia intraepitelial cervical, para lo cual se requiere de la confirmación por dos estudios, el citológico y el colposcópico.
3. Los niveles de receptores hormonales (RE y RPg) en lesiones pre-cancerígenas del cervix, constituyen un marcador bioquímico para determinar el grado de lesión cervical, la correlación que existe entre sus niveles y el grado de malignidad, nos permite pensar en una alternativa terapéutica, en la que se pudiera bloquear la síntesis de estas proteínas receptoras.

4. El VPH tipo 16 es el que se encuentra con mayor frecuencia en pacientes mexicanas en edad reproductiva, el que aunado a niveles fuera del límite superior de E_2 y/o E_1 , constituyen los factores de riesgo más importantes para el establecimiento y evolución de neoplasias cervicales.

5. El mecanismo de reacción que se realiza entre el grupo ceto de la $16\alpha\text{OH-E1}$ y el grupo amino de una lisina de la región E del receptor a estradiol, es por medio de la formación de una base de Schiff; seguida por la unión de este complejo, a una secuencia del genoma viral por similitud a los elementos de respuesta a estrógenos, provocando la expresión oncogénica del DNA viral.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Luesley DM, Barrasso R. Cancer and pre-cancer of the cervix. Chapman and Hall Medical. 1a. Ed Lippincott- Raven Publishers, London, UK 1998
2. Alonso RP, Lazcano PE, Hernández AM. Cáncer cervico uterino: diagnóstico, prevención y control. 1ª. ed Editorial Médica Panamericana, México DF 2000
3. Verduzco RL, Palet GJA, Aguirre GH, González PE. Cáncer cérvico uterino y edad. Ginec Obst Méx 1997; 65: 119-22
4. Hatch KD, Hacker NF. Enfermedad intraepitelial del cuello uterino, vagina y vulva en: Ginecología de Novak 12ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, Mexico D.F 1997
5. Papanicolaou N, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. Am J Obstet Gynecol 1941; 42: 193-205
6. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. Cytologic patterns . Act Cytol 1976; 20: 505-09
7. Richart R. Evaluation of the true false negative rate in cytology. Am J Obstet Gynecol 1964; 89: 723- 6
8. Torres L. Cáncer cervicouterino. Evidencias a favor de una etiología multifactorial. Ginec Obstet Mex 1987; 55: 11-22
9. Christopherson WM. Citología del aparato genital femenino. Clasificación Internacional de tumores número 8. Organización Mundial de la Salud, Ginebra 1973
10. zur Hausen H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. Curr Trop Microbiol 1977; 78: 1-8
11. Vance KW, Campo MS, Morgan IM. A novel silencer element in the bovine papillomavirus type 4 promoter represses the transcriptional response to papillomavirus E2 protein. J Virol 2001; 75: 2829-838
12. Embers ME, Budgeon LR, Pickel M, Christensen ND. Protective immunity to rabbit oral and cutaneous papillomaviruses by immunization with short peptides of L2, the minor capsid protein. J Virol 2002; 76: 9798- 805
13. Muñoz N. HPV and cervical cancer: Epidemiological evidence. Proceedings of EUROGIN /WHO joint experts meeting on cervical cancer screening and new developments. Eurogin Scientific Publications, Paris 1999

14. Brisson J, Morin C, Roy M, Bouchard C, Leclerc J, Christen A. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low and high grade lesions. *Am J Epidemiol* 1994; 140: 700-10
15. Sonnex C. Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. *J. Clin Pathol* 1998; 51: 643-9
16. Hernández AM. Evaluación del programa de detección oportuna de cáncer cérvico uterino en la ciudad de México. *Gac Med Mex* 1994; 130: 201-9
17. Olvera RA, Quiroz PS, Pérez LJ, De la Rosa MV. Displasia cervical y carcinoma cervicouterino: un reto para los servicios de salud. *Ginec Obst Mex* 2000; 66: 232-36
18. Juárez VP, Meza BS. Cáncer cervicouterino y citología exfoliativa. Jefatura del Servicio de Medicina Preventiva IMSS, México 2001
19. Instituto Mexicano del Seguro Social. Normas para la atención del cáncer cérvico uterino. Subdirección General Médica 2001
20. Cisneros MT, Espinoza R, Pineda BE. Mortalidad por cáncer de la mujer mexicana. *Sal Pub Mex* 1997; 29: 299-312
21. García SM. Frecuencia relativa del cáncer en el hospital de oncología. *Rev Med del IMSS* 1991; 92: 355-9
22. Feldman D, Romney SL, Edgcomb J, Valentine T. Ultrastructure of normal metaplastic and abnormal human uterine cervix: use montages to study the topographical relationship of epithelial cells at the tissue level. *AM J Obstet Gynec* 1997; 150: 573-685
23. Elson DA, Rilley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, Arbeit JM. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen- induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res* 2000; 60: 1267- 275
24. Koss LG. Diagnostic cytopathology and its histopathologic bases, 4ª ed Philadelphia . JB Lippincott 1992
25. Patten SF, Jr. Diagnostic cytopathology of the uterine cervix. Munich. 2a. ed Basel Karger 1988
26. Costa S, De Simone P, Venturoli S, Cricca M, Zerbini ML, Musiani M. Factors predicting human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia lesions treated by conization. *Gynecol Oncol* 2003; 90:358-65
27. Weikel W, Wagner R, Moll R. Characterization of subcolumnar reserve cells and other epithelia on the human uterine cervix. *Cell Pathol* 1997; 54: 98-110

28. zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991; 184: 9-13
29. Altekruze L, Sean F, James V, Brinton LA, Gravitt PE, Silverberg SG. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 657-663
30. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 83: 4680-684
31. Veress G, Murvai M, Szarka K, Juhasz A, Konya J, Gergel L. Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1946-952
32. Berumen J, Casas L, Segura E, Amescua JL, García-Carrancá. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* 1997; 56: 640-45
33. Zhao KL, Hengst K, Liu YH, Liu XS, Frazen IH. E2/E7 proteins enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology* 2000; 272: 382-93
34. Altekruze SF, Lacey JV Jr, Brinton LA, Gravitt PE, Silverberg SG, Barnes WA. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. *Obstet Gynecol*. 2003; 188: 657-63
35. Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95: 1336-343
36. Böhmer G, vander Brule AJC, Brummer O, Meijer ChJL, Petry KU. No confirmed case of human papillomavirus DNA negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. *AM J Obstet Gynecol* 2003; 189: 118-20
37. Tran-Thanh D, Provencher D, Kovshik A, Duarte-Franco E, Kessous A, Drovin P. Herpes simplex virus type II is not a cofactor to human papillomavirus in cancer of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 129-34
38. Grace VM, Shalini JV, Lekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003; 91:51-8
39. Smith-McCune K, Kalman D, Robbins C, Bishop JM. Intranuclear localization of human papillomavirus 16 E7 during transformation and preferential binding of E7 to the Rb family member p130. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6999-7004

40. Kobayashi A, Miaskowski C, Wallhagen M, Smith-Mc, Cune K. Recent developments in understanding the immune response to human papilloma virus infection and cervical neoplasia. *Oncol Nurs Forum* 2000; 27: 643-51
41. Stevenson M, Hudson LC, Burns JE, Stewart RL, Wells M, Maitland NJ. Inverse relationship between the expression of the human papillomavirus type 16 transcription factor E2 and virus DNA copy number during the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol* 2000; 81: 1825-32
42. DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, DiMaio D. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol* 2000; 77:1551-63
43. Fracchioli S, Porpiglia M, Arisio R, Voglino G, Katsaros D. Oral squamous carcinoma in a patient with cervix cancer: use of human papillomavirus analysis to differentiate synchronous versus metastatic tumor. *Gynecol Oncol* 2003; 89:522-5
44. Beskow AH, Gyllensten UB. Host genetic control of HPV 16 titer in carcinoma in situ of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2002; 101:526-31
45. Masson M, Hindelang C, Sibler AP, Schwalbach G, Trave G, Weiss E. Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. *J Gen Virol*. 2003; 84:2099-104
46. Iwasawa A, Kumamoto Y, Fujinaga K. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in penile carcinoma by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Urol* 1993; 149: 59-3
47. Woodman CB, Collins S, Rollason TP, Winter H, Bailey A, Yates M. Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 2003; 361: 40-3
48. Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Molec Endocrinol* 1993; 7: 4 -11
49. Ciocca DR, Jorge AD, Jorge O, Milutín C, Hosokawa R, Lestren MD, et al. Estrogen receptors, progesterone receptors and heat-shock 27-kD protein in liver biopsy specimens from patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1991; 13: 838- 44
50. Welshons WV, Lieberman ME, Gorski J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptor. *Nature* 1984; 307: 747-9
51. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-95
52. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 451-86

53. Parker M, Arbuckle N, Daubois S. Structure and function of the estrogen receptor. *Ann NY Acad Sci* 1993; 684: 119-26
54. Lander CC, Kushner PJ, Greene GL. The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins. *Molec Endocrinol* 1994; 8: 1407-419
55. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987; 51: 441-51
56. Knoblauch R, Garabedian MJ. Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 3748-59
57. Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richter JK. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1167-77
58. Tsai SY, Carlstedt-Duke T, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson JA, Tsai MJ. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: Evidence for receptor dimer formation. *Cell* 1988; 55: 361-69
59. Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Atger M, Perrot-Applanat M. Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 1989; 57: 1147-154
60. Fawell SE, Lees JA, White R, Parker MG. Characterization and localization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 1990; 60: 953-62
61. Waterman ML, Adler S, Nelson C, Greene GL, Evans RM, Rosenfeld MG. A single domain of the estrogen receptor confers desoxyribonucleic acid binding and transcriptional activation of the rat prolactin gene. *Mol Endocr* 1988; 2: 14-21
62. Zilliacus J, Wright AP, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA. Structural determinants of DNA binding specificity by steroid receptors. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 389-400
63. Strahle V, Klock G, Schütz G. A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7871-877
64. Evans RM, Hollenberg SM. Zinc fingers: guilt by association. *Cell* 1988; 52: 1-3
65. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA sequence, expression and homology to v-erb A. *Nature* 1986; 320: 134-39
66. Tora L, White J, Brou C. The human estrogen receptor as two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 1989; 59: 477-82

67. Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988; 55: 145-56
68. Chaumbrand B, Berry M, Redeuilh G. Several regions of human estrogen are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 1990; 265: 20686-692
69. Metger D, White JH, Chambon P. The human oestrogen receptor functions in yeast. *Nature* 1988; 334: 31- 7
70. Sluysen M. Mutations in the estrogen receptor gen. *Hum Mutat* 1995; 6: 97-103
71. Tonetti DA, Jordan VC. The role of estrogen receptor mutations in Tamoxifen stimulated breast cancer. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1997; 62: 119-28
72. Kuiper GG, Gustafsson JA. The novel estrogen receptor beta subtype: potential role in the cell and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 1997; 410: 876- 90
73. Fuqua SA, Wolf DM. Molecular aspects of estrogen receptor variants in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35: 233-41
74. Martinez E, Givel F, Wahli W. The estrogen responsive element as an inducible enhancer: DNA sequence requirements and conversion to a glucocorticoid responsive element. *EMBO J.* 1987; 6: 3719- 727
75. Beato M, Sánchez Pacheco A. Interaction of steroid hormone receptor with the transcription initiation complex. *Endocrine Rev* 1996; 17:587-609
76. Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Emerich J, Wojcikowski C. Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 608-12
77. Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression of p16 and p14 ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int.* 2002; 52: 375-83
78. Bohmer G, van den Brule AJ, Brummer O, Meijer CL, Petry KU. No confirmed case of human papillomavirus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189: 118-20
79. de Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 2003;103:705-09

80. Pater A, Bayatpour M, Pater MM. Oncogenic transformation by human papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestins from oral contraceptives. *Amer J Obstet Gynec* 1990; 162: 1099- 103
81. Daniel WW. Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. 3ª Ed. Noriega Editores, México 1996
82. Wittliff JL. Steroid-binding proteins in normal and neoplastic mammary cells. In Busch H. Eds, *Methods in Cancer Research Vol. II* Academic Press, New York 1975
83. Wittliff JL. Steroid hormone receptors. In Pesce A and Kaplan L Eds. *Methods in Clinical Chemistry* St. Louis, 1987
84. Pasic R, Djulbegovic B, Wittliff JL. Comparison of sex steroid receptor determinations in human breast cancer by enzyme immunoassay and radioligand binding. *J Clin Lab Anal* 1990; 4: 430- 36
85. Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949; 51: 660- 72
86. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75
87. Chomczynsky P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate –phenol-cloroform extraction. *Annal Biochem* 1987; 162: 156-59
88. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología Celular y Molecular* . 4ª ed. Editorial Médica Panamericana, España 2002
89. Cavenne WK, White RL: Bases genéticas del cáncer. *Investigación y ciencia* 1995; 2: 44-51.
90. Schiffman MH, Bauer HMM. Hoover RN. Glass AG, Cadell DM. Rush BB. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer* 1993; 85: 958-64
91. Lehninger, L.A., Nelson L.D. and Cox M.M. *Principios de Bioquímica*. 2ª ed. Ediciones Omega, España 1995
92. Schiffman MH, Haley NJ, Felton JS, Andrews AW, Kaslow RA, Lancaster WD. Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: Measuring cigarette smoke constituents in the cervix. *Cancer Res* 1987; 47: 3886-88
93. Gariglio A. Genes, Virus y Neoplasias. *Genética molecular del cáncer*. Información Científica y Tecnológica 1993; 15: 24-32

94. Catherino WH, Wolf DM, Jordan VC. A naturally occurring estrogen receptor mutation results in increased estrogenicity of a Tamoxifen analogs. *Mol Endoc* 1995; 9: 1053-063
95. Madsen MW, Reiter BE, Lykkesfeldt AE. Differential expression of estrogen receptor mRNA splice variants in the tamoxifen resistant human breast cancer cell line, MCF-7/TAM (R-1) compared to the parental MCF-7 cell line *Mol Cell Endoc* 1995; 109: 197-207
96. Kruger KS, Brinton LA. Adenocarcinomas of the uterine cervix: the epidemiology of an increasing problem. *Epidem Rev* 1993; 15: 486- 98
97. Picard D, Yamamoto KR. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 1987; 6: 3333-337
98. Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: a unifying hypothesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92: 3650-657
99. Mitrani- Rosenbaum S, Tsvieli R, Tur- Kaspas R. Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. *J Gen Virol* 1989; 70: 2227- 232
100. Schneider JH, Bradlow HL, Fishman J. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1984; 259: 4840-845
101. Fishman J, Martucci C. Biological properties of 16 α -hydroxyestrone: Implications in estrogen physiology and pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 611-15
102. Bucala R, Fishman J, Cerami A. Formation of covalent adducts between cortisol and 16 α -hydroxyestrone and protein: possible role in the pathogenesis of cortisol toxicity and systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 3320-324
103. Swaneck GE, Fishman J. Covalent binding of the endogenous estrogen 16 α -hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: Characterization and intranuclear localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7831-835
104. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53
105. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; 138: 863- 70
106. Giguere V, Tremblay A, Tremblay G. Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroid* 1998; 63: 335- 39
107. Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richter KJ. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996; 10:1167-177

- 108.** Tasset D, Tota L, Fromental. Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell* 1990; 62: 1177-187
- 109.** Salazar EL, Roman AM, González SJ. Hormone receptors status Hormone receptors status in cervical intraepithelial neoplasia: correlation with the stage of disease. *Med Sci Res* 1999; 27: 681-83
- 110.** Salazar EL, Sojo AI, López R . The evidence for an etiological relationship between oral contraceptive use and dysplastic change in cervical tissue. *Gynecol Endocrinol* 2001; 15: 23- 8
- 111.** Salazar EL, Mercado PE, Sojo AI. Relationship between estradiol 16 α - hydroxylation and human papillomavirus infection in cervical cell transformation. *Gynecol Endocrinol* 2001; 15: 335- 40
- 112.** Pater MM, Mittal R, Pater A. Role of steroid hormones in potentiating transformation of cervical cells by human papillomavirus. *Trends Microbiol* 1994; 2: 229-35

The evidence for an etiological relationship between oral contraceptive use and dysplastic change in cervical tissue

E. L. Salazar, I. Sojo-Aranda, R. López* and M. Salcedo*

Department of Investigational Medicine, University of Investigational and Reproductive Medicine; and *University of Investigational Medicine and Oncology, Mexican Institute of Social Security, Mexico City, Mexico

Key words: ESTROGEN RECEPTOR, 17β -ESTRADIOL, CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA, ORAL CONTRACEPTION

ABSTRACT

A case-control study of 112 patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 131 control subjects was conducted. Estradiol receptor levels were determined in the total (cytosolic-nucleosolic) fraction of the neoplastic cervical specimens taken during the late proliferative phase of their cycle from 58 premenopausal patients who had been oral contraceptive (OC) users for at least 2 years and from 54 premenopausal women who had not been OC users. All specimens contained variable amount of estradiol receptor (from 7.6 to 53.0 fmol estradiol/mg protein and 7.2 to 29.3 fmol estradiol/mg protein in patients who were OC users and non-users, respectively). A significant correlation was found between estradiol receptor concentration and histological grading in both groups, likewise higher levels of estradiol receptor were observed in the low-grade CIN group tissue from patients who were OC users ($p < 0.05$). At the same time 17β -estradiol and progesterone levels were also determined in the serum of all women who had not used an OC for at least 12 months. The mean \pm SD estradiol serum levels in non-users of OC with CIN

189 ± 0.08 ng/ml, follicular phase) were greater than the mean \pm SD (1.163 ± 0.33 ng/ml, luteal phase) progesterone serum concentration. Serum estradiol levels were significantly higher ($p < 0.05$) in OC users, whereas progesterone levels were not ($p > 0.05$). OC users had an increased risk (odds ratio = 1.31, 95% CI 1.0-2.3) of cervical neoplasia.

INTRODUCTION

Cervical carcinoma occurs more frequently in premenopausal women^{1,2} and according to some epidemiological studies there is an increased risk in women exposed to prolonged oral contraceptive (OC) treatment³. Microglandular hyperplasia represents a benign lesion that can be associated with the use of OCs and with pregnancy, but it can also occur in women who are not on OCs and who are not pregnant⁴. Microglandular hyperplasia of the endocervix is a complex glandular proliferation that has

Correspondence: Dr E. L. Salazar, Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 86056, México, D.F., Código Postal 14391

been attributed to progestogen and/or estrogen and has been reported primarily in younger women using OCs, or during pregnancy⁵.

Studies suggest that there is a potential risk of cervical dysplasia and carcinoma from 2 or more years of OC use. The literature indicates that OC users have approximately twice the incidence of cervical cancer as non-users after 2 years, rising to four times as high after 10 years of use. After approximately 2 years OC users had a relative risk of 0.8, but thereafter OC users were found to have a relative risk of 1.5, while among long-term users the risk was approximately twice as high⁶.

The amount, chemical content and physical properties of cervical mucus change markedly with the hormonal fluctuations of the human menstrual cycle. In the proliferative phase, cervical mucus is thin, elastic and high in water content. In the secretory phase, the mucus increases in viscosity and in the concentration of numerous soluble proteins. These effects are even more striking in women taking sequential estrogens and progestogens during OC treatment⁷. Furthermore, the human cervix has been shown to contain macromolecules which specifically bind estrogens with high affinity⁸; however, their cyclical variations in the human cervix is still a matter for debate^{9,10}. This mucus could facilitate the entry of mutagens and promote an alteration of the immune response that might increase susceptibility to viral agents. For example, sex hormones have been found to enhance the transcription of the human papillomavirus (HPV) gene¹¹.

The influence of OCs on the uterine cervix has been the subject of many studies for over two decades. At present there is no evidence of a causal relationship between OC endogenous hormones and steroid receptor hormone values, so additional follow-up studies are needed to define the effect of OC on the natural history of cervical cancer.

The purpose of the present study was to investigate the sex steroid receptors and the sex hormone serum levels from four groups of sexually active women – some of whom were OC users and some of whom were not – with and without cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

PATIENTS AND METHODS

Patients

Between June 1997 and June 1999, 112 patients with CIN and 131 healthy controls were investigated in our department at the Hospital de Gineco-Obstetricia 'Luis Castelazo Ayala' at the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City. The patients and control subjects were aged from 17 to 49 years. All the women who visited the clinic who were found to have any sign of a lesion in the cervix were invited to participate in the study. The women invited to participate in this study filled out a questionnaire at the screening facility. This questionnaire concerned their history of disease and demographics, including marital status, education, age at first marriage or cohabitation, age at first pregnancy, smoking history and alcohol consumption, as well as information on social and psychologic conditions. The questionnaire included questions on the use and duration of OC, and cases and control subjects were classified into users and non-users. The OCs contained both estrogen and progestin hormones.

Histology

The lesions were located endocervically by colposcopy and a representative biopsy was examined histologically to confirm the diagnosis. Histological grading included CIN low grade (CIN 1), CIN moderate grade (CIN 2) and CIN high grade (CIN 3). The specimens were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -90°C until they were processed for biochemical investigation.

Hormonal assays

Blood samples were drawn into tubes containing EDTA at 8 a.m. on the day of colposcopy. The blood was centrifuged and the plasma stored at -20°C until analyzed for 17β -estradiol and progesterone levels. These steroids were measured by direct radioimmunoassay, antisera being used at 1:50 000 dilution. The sensitivity range was linear from 10 to 800 pg and the slope of the standard curve was calculated as follows:

$$\text{slope} = -2.3 \pm 0.2 (\text{logit} - \text{log})^{12}.$$

Estrogen receptor content

The tissue was weighed and homogenized in a Polytron Brinkmann Homogenizer (Westbury, Long Island, NY, USA), four pulses each for 20s, at five revolutions/s at intervals of 15 min using 1:3 volumes of TETG/TETG-KCl buffers. TETG contained tris-HCl 10 mM, EDTA 1.5 mM, monothiolglycerol 10 mM and 10% glycerol at pH 7.4 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). TETG-KCl contained TETG buffer with KCl 0.8 M at pH 8.5¹³. The homogenate was ultracentrifuged at 105 000 g for 30 min to obtain the supernatant fraction. The levels of estrogen receptor were measured by the method of single saturation point assay as described previously⁷. Aliquots (0.1 ml) of the supernatant fraction were incubated in two parallel sets with various concentration (0.125–1 nM) of ³H-2,4,6,7-estradiol (89 Ci/minol; Amersham International, Amersham, UK) for 18–20 h at 4°C. The non-specific binding was assayed using a 200-fold excess of diethylstilbestrol (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Bound and free estradiol were separated by a dextran-coated charcoal separation method¹⁴. All steps were carried out at 4°C. Estradiol receptor levels were quantified using the Scatchard method¹⁵ and protein values were determined in the supernatant fraction using the method of Lowry and colleagues¹⁶.

Statistical analysis

The relative risk (RR) was estimated by the odds ratio (OR), and was the measure of the association between the use or non-use of OCs and presence or absence of CIN lesions. To determine the statistical significance of these RRs, 95% confidence intervals (CI) were calculated, with a lower level of 1.0 representing significance at the $p < 0.05$ level.

RESULTS

Of the 112 patients with CIN, 58 were users of oral contraceptives and 54 were non-users. The mean age \pm SD of the former group was 36.7 ± 9 (range 23–49 years) and the mean age of the latter was 34.0 ± 7.8 (range 19–46 years) (Figure 1). The mean age \pm SD of control subjects who were users or non-users of OC, was 32 ± 7.2 and

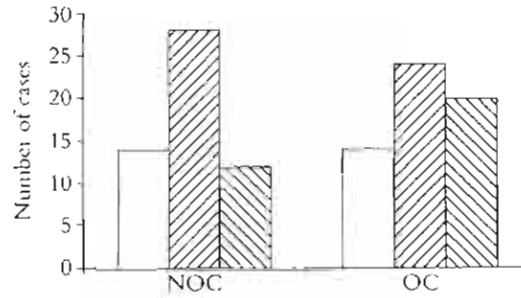


Figure 1 Numbers of patients in different age ranges with cervical intraepithelial neoplasia who had been oral contraceptive users (OC) or non-users (NOC). □, 17–30 year olds; ▨, 31–40 year olds; ▩, 41–50 year olds

35 ± 5.3 , respectively. The mean time interval between OC use and the collection of smears in women with normal and abnormal cytology was 12 and 14 months, respectively.

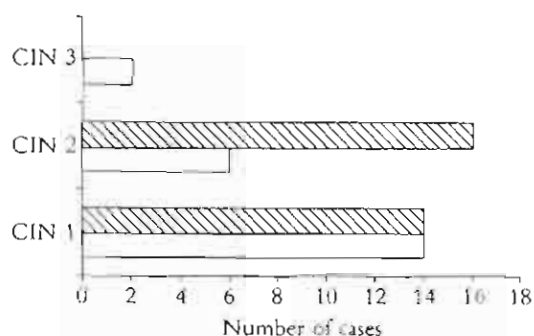
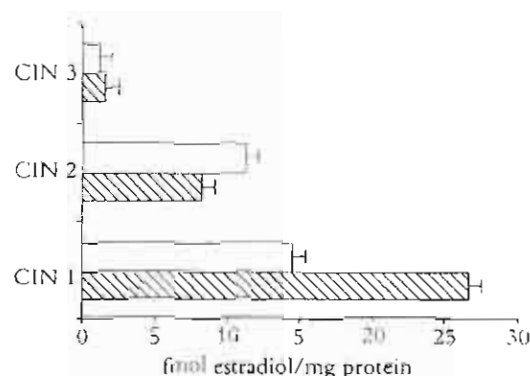
There were 18 (31%) OC users with CIN 1, 26 (44.8%) with CIN 2 and 14 (24.1%) with CIN 3; the corresponding figures for the non-users were 22 (40.7%) with CIN 1, 12 (22.2%) with CIN 2 and 20 (37%) with CIN 3. There was no significant difference in histological grading between users and non-users of OC ($p < 0.05$).

Twenty-eight (48.3%) OC users had elevated serum levels of estradiol and progesterone, 14 (24.1%) had a normal progesterone:estradiol ratio and 44 (75.9%) had an irregular progesterone:estradiol ratio; the corresponding figures for the non-users were 16 (29.6%) with elevated serum levels of estradiol and progesterone, six (11.1%) with a normal progesterone:estradiol ratio and 48 (88.9%) with an irregular progesterone:estradiol ratio (Table 1).

A positive specific affinity for estradiol-receptor binding sites was defined as the presence of more than 7 fmol estradiol per mg protein; on this basis, 30 (51.7%) OC users with CIN and 22 (40.7%) non-users of OC with CIN were positive for estradiol-receptor binding sites (Figure 2). Higher levels of estradiol-receptor binding sites were observed in the CIN 1 group from patients who were OC users ($p < 0.05$) (Figure 3). The chi-squared correlations between estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative tissues from patients who were users and non-users

Table 1 Serum levels of estradiol and progesterone from healthy women and women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) who had been users or non-users of oral contraceptives (OCs); values are mean \pm SD

Parameter/ menstrual cycle phase	Normal cytology			Abnormal cytology (CIN lesion)		
	OC non-user	OC user	p value	OC non-user	OC user	p value
<i>Estradiol</i>						
Follicular	0.08 \pm 0.06	0.110 \pm 0.09	> 0.05	0.074 \pm 0.05	0.189 \pm 0.08	< 0.05
Luteal	0.075 \pm 0.03	0.115 \pm 0.09	> 0.05	0.186 \pm 0.03	0.109 \pm 0.01	> 0.05
<i>Progesterone</i>						
Follicular	0.545 \pm 0.72	0.510 \pm 0.48	> 0.05	0.658 \pm 0.50	0.441 \pm 0.28	> 0.05
Luteal	5.945 \pm 1.2	0.505 \pm 0.32	> 0.05	2.705 \pm 1.24	1.163 \pm 0.33	> 0.05

**Figure 2** Number of cases with positive specific affinity-binding sites for estradiol from patients who had been oral contraceptive users (▨; $n = 30$) or non-users (□; $n = 22$). CIN 1, cervical intraepithelial neoplasia low grade; CIN 2, moderate grade; CIN 3, high grade**Figure 3** Number of specific affinity binding sites for estradiol in cervical intraepithelial neoplasia tissue from patients who had been oral contraceptive users (▨) or non-users (□); mean \pm SD. CIN 1, cervical intraepithelial neoplasia low grade; CIN 2, moderate grade; CIN 3, high grade

of OC were 7.22 ($p < 0.05$) and 10.11 ($p < 0.05$), respectively, and in OC users there was an increased risk of receptor binding (OR=1.31, 95% CI 1.0–2.3).

DISCUSSION

The incidence of precancerous lesions of the cervix has recently been increasing, especially among young women. The reasons for this remain unknown; however, it has been hypothesized that OCs might play a role. Likewise, previous studies have speculated that the rise in the incidence of cervical carcinoma might be attributable to the increasing use of OCs¹⁷. Given the long natural history of neoplasm of the cervix, it is inevitable that a large number of patients subsequently diagnosed with cervical cancer would have been exposed to OC during the genesis and progression of their neoplasms.

The use of OC might alter the risk of cervical cancer by any one of a number of mechanisms. The cervical tissue has hormone receptor sites¹⁸ and a histological change in the cervical epithelium can result from the administration of contraceptive steroids. Variations in concentration and distribution of the hormones used in OC may induce an altered intracellular distribution of estrogen and progesterone receptors similar to that observed in the regulation of expression of the transforming growth factors and epidermal growth factor receptors in endometrial cancer cells in culture¹⁹. The expression or over-expression of such autocrine/paracrine factors and/or their receptors may be important in the growth of cervical dysplasias.

The regulation of protein synthesis in a target tissue is undoubtedly the principal action of steroid hormones, which penetrate the cell by simple diffusion or facilitated diffusion and bind to specific

hormone receptors. The hormone-receptor complex is transferred to the nucleus, where it binds to the target-cell gene. This affects the synthesis of mRNA and finally finds expression in the new cell.

It is possible that exogenous hormones promote carcinogenesis by increasing the growth of cancer cells through an altered physiological environment²⁰ by virtue of an interaction between OCs and human papillomavirus (HPV). Hormones enhance the transcription of the HPV-16 gene^{21,22} therefore the HPV will induce the transformation of cervical epithelial cells. Studies have shown that the transcriptional regulatory region of HPV-DNA contains hormone-recognition elements, and *in vitro* cellular transformation with viral DNA is enhanced by hormones^{23,24}. It is significant that two different studies found an elevated risk of invasive cervical cancer among HPV-positive women who had used an OC^{25,26}, thus OCs may promote the activity of HPV once the infection has occurred.

Metabolism of estradiol

A brief outline of the initial stages of the metabolism of estradiol – the main estrogenic

compound – might be of some relevance. The first stage involves oxidation at C17 to estrone, which is metabolized by specific cytochrome P450 enzymes through two pathways, 2-hydroxylation to catechol estrogens and 16 α -hydroxylation to 16 α -hydroxyestrone, which is converted by reduction at C17 to estriol. 16 α -Hydroxyestrone is poorly bound to sex hormone-binding globulin and therefore it is fully available in the cell²⁷. 16 α -Hydroxyestrone has the unusual property of binding covalently to the estrogen receptor, a mechanism which prolongs its estrogenicity in an autocrine manner and increases cell proliferation.

CONCLUSION

In this study of users and non-users of oral contraceptives with cervical intraepithelial neoplasia, significant correlation was found between levels of estradiol receptors and histological grading of their CIN in both groups, likewise higher levels of ER were observed in the CIN1 group tissue from patients who were OC users ($p < 0.05$). OC users had an increased risk (OR = 1.31, 95% CI 1.0–2.3) of cervical neoplasia

REFERENCES

1. Cannistra SA, Niloff JM. Cancer of the uterine cervix. *N Engl J Med* 1996;334:1030–7
2. Salazar EL, Gonzalez SJ, Galindo VA, et al. Estrogen receptor in dysplastic and malignant cervical tissue: expression, localisation and prognostic significance. *Med Sci Res* 1996;24:523–4
3. Kjaer SK, Brinton LA. Adenocarcinomas of the uterine cervix: the epidemiology of an increasing problem. *Epidemiol Rev* 1993;15:486–98
4. Leslie KO, Silverberg SG. Microglandular hyperplasia of the cervix. Unusual clinical and pathologic presentation and their differential diagnosis. *Progr Surg Pathol* 1984;5:95–114
5. Jones MW, Silverberg SG. Cervical adenocarcinoma in young women: possible relationship to microglandular hyperplasia and use of oral contraceptives. *Obstet Gynecol* 1989;73:984–8
6. Brinton LA. Oral contraceptives and cervical neoplasia. *Contraception* 1991;43:581–95
7. Pater A, Bayatpour M, Pater MM. Oncogenic transformation by human papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestins from oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1990;62:1099–103
8. Fujiwara H, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, et al. Adenocarcinoma of the cervix. Expression and clinical significance of estrogen and progesterone receptors. *Cancer* 1997;79:505–12
9. Atlas I, Grajewski W, Falkenberry S, et al. Absence of estrogen and progesterone receptors in glassy cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1998;91:136–8
10. Scambia G, Panici PB, Biondi G, et al. Steroid hormone receptors in carcinoma of the cervix: lack of response to an antiestrogen. *Gynecol Oncol* 1990;37:323–6
11. zur Hausen H. Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet* 1982;2:1370–2
12. Porras H, Carranco LA, Soyo AI, et al. Hormonal content of plasma and endometrium of women

- taking oral contraception. *Obstet Gynaecol* 1978; 52:703-7
13. Salazar EL, Roman AM, Gonzalez SJ. Hormone receptor status in cervical intraepithelial neoplasia: correlation with the stage of disease. *Med Sci Res* 1999;27:681-3
 14. Salazar EL, Roman AM, Gonzalez SJ. Progesterone receptor values in human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Med Sci Res* 1997;25:511-12
 15. Scatchard G. The attraction of protein for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949;51: 660-72
 16. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75
 17. Gram IT, Macaluso M, Stalsberg H. Oral contraceptive use and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynaecol* 1992;167: 40-4
 18. Bhattacharya D, Redkar A, Mitra J, et al. Oestrogen increases S-phase fraction and oestrogen and progesterone receptors in human cervical cancer *in vivo*. *Br J Cancer* 1997;75:554-8
 19. Murphy EJ. Growth factors and steroid hormone action in endometrial cancer. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1994;48:419-23
 20. Hildesheim A, Reeves WC, Brinton L, et al. Association of oral contraceptive use and human papillomavirus in invasive cervical cancers. *Int J Cancer* 1990;45:860-4
 21. Gloss B, Bernard HU, Seedorf K, et al. The upstream regulatory region of the human-papilloma-virus-16 contains an E2-protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J* 1987;6:3735-43
 22. Mitran-Rosenbaum S, Tsvieli R, Tur-Kaspa R. Estrogen but not glucocorticoids stimulate HPV-16 transcription in SIHA cells. Proceedings of the Seventh International Papillomavirus Workshop, Nice, France 1988;82
 23. Auborn KJ, Woodworth C, DiPaolo JA, Bradlow HL. The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 1991;49:867-9
 24. Monsonego J, Magdalenat H, Catalan F, et al. Estrogen and progesterone receptors in cervical human papillomavirus related lesions. *Int J Cancer* 1991;48:533-9
 25. Bosch FX, Muñoz N, de Sanjose S, et al. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992;52:750-8
 26. Eluf-Neto J, Bosch M, Muñoz N, et al. Human papillomavirus and invasive cancer in Brazil. *Br J Cancer* 1994;69:114-9
 27. Catherino WH, Wolf DM, Jordan VC. A naturally occurring estrogen receptor mutation results in increased estrogenicity of a Tamoxifen analog. *Mol Endocrinol* 1995;9:1053-63

Relationship between estradiol 16 α -hydroxylation and human papillomavirus infection in cervical cell transformation

E. L. Salazar, E. Mercado*, I. Sojo and M. Salcedo†

Medical Research Coordination, Medical Research Unit in Reproductive Medicine, Social Security Mexican Institute; *Metropolitan Autonomy University – IzTapalapa Unit, Reproductive Biology Department; †Medical Research Unit in Oncologic Diseases, Social Security Mexican Institute, Mexico City, Mexico

Key words: ESTROGENIC STATE, ESTRADIOL METABOLISM, HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION, INTRAEPITHELIAL CERVICAL NEOPLASIA

ABSTRACT

The ovarian steroid hormone estradiol and its metabolite estrone were examined in 45 normal women and 127 premenopausal women with precancerous cervical lesions. Interviews, colposcopy and cervical scrapings were performed. The mean \pm SD values for estradiol and estrone were 0.07 ± 0.08 ng/ml and 0.06 ± 0.02 ng/ml, respectively in normal subjects. Corresponding data in patients with cervical intraepithelial neoplasia alone or in association with human papillomavirus (HPV) infection were 0.074 ± 0.03 ng/ml and 0.076 ± 0.03 ng/ml or 0.080 ± 0.03 ng/ml and 0.148 ± 0.02 ng/ml, respectively, which revealed a significantly greater extent of estrogenic action in the latter population ($p < 0.05$). We considered that the presence of HPV infection probably increased 16 α -hydroxylation of estradiol, providing a possible link between the viral and hormonal elements, possibly having a bearing on the etiology of the disease.

INTRODUCTION

Several of the most common cancers occur in hormonally responsive tissues, including the breast^{1,2}, endometrium³ and ovary⁴. These cancers have been causally linked to exposure to synthetic or endogenous steroidal hormones or their metabolites⁵.

Estradiol is the primary active estrogen and has a high affinity with the estrogen receptor (ER). Estradiol is oxidized to estrone, which may be either hydroxylated at C-2 to give 2-hydroxyestrone or at C-16 α to give 16 α -hydroxyestrone. 2-Hydroxyestrone is a catechol estrogen that is inactive and weakly anti-estrogenic⁶. Conversely, 16 α -hydroxyestrone is fully estrogenic⁷ and forms covalent bonds with amino groups⁸, including the ER^{9,10}; it has prolonged activity with an ER-dependent response^{11,12}.

Correspondence: Dr E. L. Salazar, Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 86-056, Mexico City, Mexico

The most widely appreciated and investigated effect of estrogens is increased cell proliferation^{13,14}. It has become clear that several metabolites can have an influence directly or indirectly through redox cycling processes that cause oxidative DNA damage^{15,16}. The mechanism of estrogen that causes DNA damage in carcinogenesis is complex, and involves both non-genotoxic (cell proliferation) and direct or indirect genotoxic effects. DNA damage leads to mutation and proliferation¹⁷.

Estrogen is a potent tumor promoter, influencing post-initiation events via epigenetic mechanisms. However, the action of estrogen metabolites with human papillomavirus (HPV) infection in association with the tumorigenic transformation is poorly understood. Estrogen metabolites such as 16 α -hydroxyestrone may function as initiators, perturbing the intermediate biomarkers for preneoplastic transformation¹⁸.

The ER is a hormone that is activated via a nuclear transcription factor, an important regulator of growth and differentiation in estrogen-responsive cells. In the absence of estradiol, the ER is thought to be associated in the cytoplasm with heat shock proteins such as HSP90. Upon estrogen binding, the ER dissociates from this complex and binds in the nucleus by a hormone-dependent mechanism to a specific DNA sequence, the estrogen-responsive elements, located in the promoter region of target genes¹⁹.

In the same way, it has been hypothesized that increased levels of endogenous hormones and their metabolites, particularly 16 α -hydroxyestrone, increase the risk for cervical cancer through promotion by increased uncontrolled cell proliferation mediated by covalent binding to the ER.

On the other hand, HPVs are a group of DNA viruses that induce benign epithelial proliferation, benign lesions of the human genital tract and premalignant and malignant transformation.

Clinical and experimental data have indicated that HPV infection by itself does not necessarily lead to the development of cervical cancer. It seems that co-factors are needed for the full expression of oncogenicity. Hormones may play an important role in HPV-associated malignancies.

Various cellular genes are regulated by estrogens. The stimulatory effect of estrogen on transcription is most likely to occur via the binding of the ER complex to the estrogen-responsive elements, by a mechanism that is still obscure²⁰.

Estrogen differentially stimulates the transcription of the E₆/E₇ and E₁ genes of HPV, which are directly involved in the transformation of cells and progression of HPV-associated genital dysplasia to a fully developed malignant state.

The aim of the study was to determine the relationship between clinical and biological effects of estradiol and estrone on the expression of HPV, which is relevant during the progression of HPV infection associated with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) into a fully developed malignant state.

PATIENTS AND METHODS

Patients

We investigated 127 premenopausal patients with precancerous cervical lesions in our department between November 1999 and November 2000. The average age at diagnosis was 36.1 years (range 17–50 years). Information on personal characteristics and contraceptive history was obtained from enquiries answered by each woman, who was asked for consent to participate in this study. All interviews were conducted by a single nurse interviewer who had no knowledge of the patient's diagnosis. The interview included questions on age, residence, occupation, marital status, age at first intercourse and first pregnancy, number of pregnancies, frequency of intercourse and method of contraception.

The control subjects were women with normal cervical smears, interviewed and selected at the same time as the cases. A total of 45 control subjects (median age 38.5 years, range 27–49 years) were included in the study.

The individuals studied had no history of liver, kidney or endocrine dysfunction, none had used oral contraceptives during the previous 2 years and they were taking no medications known to alter steroid metabolism.

Methods

In most cases, biopsies were performed on an out-patient basis, searching for gynecological disorders without menstrual disturbances. The ectocervical lesions were visualized by colposcopy. These were histologically confirmed.

Cervical smears and pathological specimens were prepared, stained and diagnosed at the laboratory in the Hospital 'Luis Castelazo Ayala' of the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City. The degree of tumor was reported according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification⁸. All specimens were classified into one of four groups: HPV infection; CIN low grade (CIN 1); CIN moderate grade (CIN 2); and CIN high grade (CIN 3). All were classified as single or associated with HPV.

Hormonal assays

The preovulatory levels of estradiol and estrone were evaluated in patients and normal women. Aliquots of 15–20 ml blood were drawn by venipuncture, and out-patient cervical curettage was performed the same day. Blood was collected without anticoagulant, centrifuged and stored at –20°C until assayed.

Serum samples were extracted with ethyl acetate, defatted and chromatographed on small celite columns (1 g) soaked with formamide (1 : 2, v/w) and prepared in hexane. Estradiol and estrone were recovered in hexane/ethyl acetate (80 : 20) and hexane/ethyl acetate (90 : 10), respectively. Hormone concentrations were determined in duplicate for each extracted sample and appropriate fractions were then processed for radioimmunoassay. All samples were processed in a single assay and the intra-assay coefficient of variation was < 10%. Anti-estradiol antibody cross-reacted slightly with estrone and estriol (approximately 5%). Anti-estrone antibody cross-reacted slightly with 16 α -hydroxyestrone (approximately 4%) and estradiol (approximately 2%)²¹.

Statistical analysis

The means are presented with a standard error of the mean as the index of dispersion. All data were compared by the use of the non-parametric Wilcoxon rank order test that was used to evaluate any significant difference among various parameters at the 95% confidence limit. Difference was statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Of the 127 patients with CIN, 25 (19.7%) were 30 years old or younger, and 68 (53.5%) were between 31 and 45 years. The median age at first intercourse was 19.2 years and the frequency of intercourse was 1–3 times a week at age less than 40 years. Women who were married or cohabited for the first time at an early age and had had a high number of sexual partners had an increased risk for precancerous cervical lesion. The women younger than 35 years were more likely to be positive for HPV infection. Twenty patients (15.7%) were nulligravid (Table 1).

As regards other illnesses, 24 (18.9%) of patients had either hypertension, diabetes, obesity or a combination of these conditions.

There were 29 (22.8%) patients with CIN as an isolated condition and 67 (52.7%) with CIN associated with HPV infection (Figure 1). The mean age of the former group with CIN 1 was 24, with CIN 2 was 31.6 and with CIN 3 was 40 years. The mean age of the latter group with CIN 1 was 38.7, with CIN 2 was 37.8 and with CIN 3 was 35.3 years. There were 31 (24.4%) women with HPV infection as an isolated condition, with an average age of 34.8 years.

Table 1 Distribution of 127 patients with cervical intraepithelial neoplasia

	n	%
<i>Age at first intercourse (years)</i>		
≤ 16	32	25.2
17–19	43	33.8
20–22	28	22.0
≥ 23	24	18.9
<i>Number of pregnancies</i>		
1–3	46	36.2
4–6	36	28.3
7–10	25	19.7
<i>Number of sexual partners</i>		
1	25	19.7
2–3	48	37.8
≥ 4	54	42.5
<i>Frequency of coitus at age < 40 years</i>		
1–3 times a week	73	57.5
≥ 4 times a week	41	32.2

The results of estradiol and estrone evaluation are shown in Table 2. The concentration of estradiol in normal women was 0.07 ± 0.08 ng/ml (absolute range: early follicular phase, 0.010–0.050 ng/ml; late follicular phase, 0.060–0.200 ng/ml). The concentration of estrone in the same women was 0.06 ± 0.02 ng/ml (absolute range: follicular phase, 0.037–0.137 ng/ml; median, 0.062 ng/ml).

Corresponding values for estradiol and estrone in patients with isolated CIN were: 0.074 ± 0.03 ng/ml and 0.076 ± 0.03 ng/ml, respectively, and in patients with CIN associated with HPV were 0.080 ± 0.03 ng/ml and 0.148 ± 0.02 ng/ml, respectively. There was a

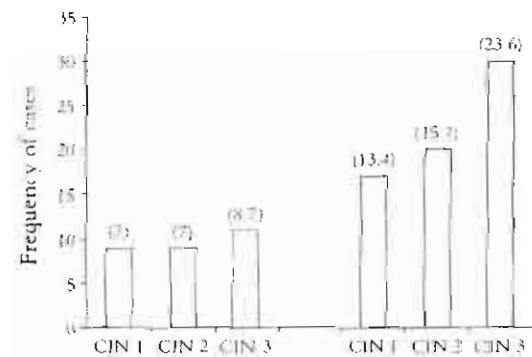


Figure 1 Number of patients in different stages of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in isolation ($n = 29$; white bars) or associated with human papillomavirus infection ($n = 67$; shaded bars). CIN 1, low-grade CIN; CIN 2, moderate grade CIN; CIN 3, high-grade CIN

Table 2 Serum levels of estradiol and estrone from healthy women and from those with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) as an isolated condition or associated with human papillomavirus (HPV) infection. Values are mean \pm SD

	Estradiol (ng/ml)	n	p Value	Estrone (ng/ml)	n	p Value
Normal cytology	0.07 ± 0.08			0.06 ± 0.02		
Isolated CIN						
CIN 1	0.074 ± 0.03	9	> 0.05	0.07 ± 0.02	9	> 0.05
CIN 2	0.072 ± 0.05	9	> 0.05	0.08 ± 0.04	9	> 0.05
CIN 3	0.076 ± 0.03	11	> 0.05	0.08 ± 0.05	11	> 0.05
CIN with HPV						
CIN 1	0.076 ± 0.03	17	> 0.05	0.08 ± 0.04	17	> 0.05
CIN 2	0.072 ± 0.04	20	> 0.05	0.187 ± 0.02	20	< 0.05
CIN 3	0.092 ± 0.02	30	> 0.05	0.177 ± 0.02	30	< 0.05

CIN 1, low-grade CIN; CIN 2, moderate grade CIN; CIN 3, high-grade CIN

statistically significant difference ($p < 0.05$) between the normal women and the latter population, particularly with estrone. Estrone values increased significantly ($p < 0.05$) from isolated CIN to CIN associated with HPV, but estradiol values did not ($p > 0.05$). We conclude that measurements of both estradiol and estrone are necessary for accurate prediction of hormone responsiveness.

DISCUSSION

The appearance of a fully transformed tumorigenic phenotype is the culmination of a cascade of molecular, metabolic and cellular events leading to the preneoplastic transformation of normal target tissue. Regions where one type of epithelium replaces another (metaplasia) have a predilection for cancer formation. Metaplasia occurs during development and sexual maturation. Some examples of metaplastic epithelial carcinogenesis include glandular squamous metaplasia, high-risk HPV infection and uterine cervical cancer²²

Environmental factors are closely linked to metaplastic carcinogenesis. In particular, these include cervical cancers associated with HPV infection that develop primarily at the transformation zone, where they may have a unique estrogen metabolism compared with other reproductive tract epithelial cell types producing hormone metabolites with direct genotoxicity. Thus, chronic estrogen exposure is an essential co-factor that is required for the induction of squamous

epithelial reproductive tract carcinogenesis by the persistent expression of HPV 16 oncogenes.

In the same way, ovarian steroid hormones such as estradiol and progesterone, influencing epithelial cell proliferation, morphogenesis, cytodifferentiated function and neoplastic transformation, cause endocrine effects that are mediated by intracellular receptors. In concert with ligand-inducible enhancer factors, these receptors may influence gene transcription, including that of specific oncogenes.

Epidemiological evidence provides a strong argument that endogenous estrogens participate in the etiology and progress of cervical cancer. Much effort has been directed to the identification of differences in the secretion and/or metabolism of estrogens in women with neoplastic tissue of the cervix, but the results have been contradictory²³.

ERs are key components in the signal transduction pathways controlled by estrogens. These pathways direct a variety of physiological processes, such as establishment and maintenance of female sex differentiation patterns, reproductive cycle and pregnancy. It is also well established that some of these pathways have an influence in the carcinogenesis of several cancers.

On the other hand, the viral protein of HPV is necessary to maintain the transformed state and its expression is essential for the initiation of the transformation. Similarly, the intermediate metabolite 16 α -hydroxyestrone, generated during 16 α -hydroxylation of estradiol, exhibits persistent covalent binding to the nuclear ER.

Metabolism of estradiol and human papillomavirus infection

Although the biological action of estradiol in many target cells depends on its metabolites, the formation of both 16 α -hydroxyestrone and

2-hydroxyestrone may not have negligible biological effects. The existence of a link between increased 16 α -hydroxylation of estradiol and cancer risk has been previously demonstrated²². Moreover, 16 α -hydroxyestrone has shown an increase in proliferative activity and DNA repair synthesis. Thus, 16 α -hydroxyestrone may function as a potent estrogen agonist mediating the initiation and/or promotion of E₆/E₇ or E₁ HPV oncogene expression.

Furthermore, estrogen metabolism and the pathology of HPV infection appear to be interdependent. The level of 16 α -hydroxylation in HPV immortalized keratinocytes is less than in normal cells derived from the transformation zone²⁴. The implication is a spiralling effect, whereby 16 α -hydroxylation exacerbates HPV infection, and HPV increases 16 α -hydroxylation²⁵.

CONCLUSION

Squamous metaplasia appears to be the first stage of carcinogenesis in the transformation zone of clinical disease, and the zone where an HPV lesion is usually formed contains high constitutive levels of 16 α -hydroxyestrone.

Estrogen metabolism and the pathology of HPV infection appear to be interdependent. The effects of and responses to estrogens are complex and together contribute to their promoting and completing the carcinogenic process. However, the degree of each effect and response is likely to be specific for each tissue.

We hypothesized that 16 α -hydroxyestrone is a DNA-damaging agent in cervical cells that promotes the continuing transformation of HPV and the expression of the viral oncoproteins E₆/E₇. The effect of estradiol metabolism on HPV infection and their role in cervical cancer development must be clarified in the future.

REFERENCES

1. Salazar EL, Torres JA, Avila A, et al. Hyperplastic changes and receptor status in the breast tissue of bodybuilders under anabolic-androgenic steroid simulation. *Arch Androl* 2000;45:1-7
2. Salazar EL, Paredes A, Moreno E, et al. Hormone receptors and cellular differentiation: relationship/ expression in breast carcinoma. *Adv Reprod* 1998; 2:71-7
3. Iwai K, Fukuda K, Hachisuga T, et al. Prognostic significance of progesterone receptor immunohistochemistry for lymph node metastases in

- endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1992;72:351-9
4. Shiohara S, Shiozawa T, Shimizu M, et al. Histochemical analysis of estrogen and progesterone receptors and gastric-type mucin in mucinous ovarian tumors with reference to their pathogenesis. *Cancer* 1997;80:903-16
 5. Henderson BE, Ross RK, Pike MC. Toward the primary prevention of cancer. *Science* 1991;254:1131-8
 6. Schneider J, Huh MM, Bradlow HL, Fishman J. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1984;259:4840-5
 7. Fishman J, Martucci C. Biological properties of 16 alpha-hydroxyestrone: implications in estrogen physiology and pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:611-15
 8. Bucala R, Fishman J, Cerami A. Formation of covalent adducts between cortisol and 16 alpha-hydroxyestrone and protein: possible role in the pathogenesis of cortisol toxicity and systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:3320-4
 9. Swaneck GE, Fishman J. Covalent binding of the endogenous estrogen 16 alpha-hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterization and intranuclear localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7831-5
 10. Miyairi S, Ichikawa T, Nanibara T. Structure of the adduct of 16 α -hydroxyestrone with a primary amine: evidence for the Heyns rearrangement of steroidal D-ring 16 α -hydroxyimines. *Steroids* 1991;56:361-6
 11. Lustig RH, Mobbs CV, Pfaff DW, et al. Temporal actions of 16 alpha-hydroxyestrone in the rat: comparisons of lordosis dynamics with other estrogen metabolites and between sexes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1989;33:417-21
 12. Salazar EL, Sojo AI, Lopez R, et al. The evidence of an etiological relationship between oral contraceptive use and dysplastic change in cervical tissue. *Gynecol Endocrinol* 2001;15:23-8
 13. Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3650-7
 14. Ethier SP. Growth factor synthesis and human breast cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:664-73
 15. Liehr JG. Mechanism of metabolic activation and inactivation of catecholestrogens: a basis of genotoxicity. *Polycycl Arom Comp* 1994;6:229-39
 16. Li Y, Trush MA, Yager JD. DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis* 1995;15:1421-7
 17. Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, et al. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect* 1993;101:372-7
 18. Telang NT, Suto A, Wong GY, et al. Introduction by estrogen metabolite 16 α -hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:634-8
 19. van Dijk MA, Hart AA, van't Veer LJ. Differences in estrogen receptor α variant messenger RNAs between normal human breast tissue and primary breast carcinomas. *Cancer Res* 2000;60:530-3
 20. Mitrani-Rosenbaum S, Tsveti R, Tur-Kaspa R. Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. *J Gen Virol* 1980;70:227-32
 21. Pomas H, Carranco LA, Sojo AI, et al. Hormonal content of plasma and endometrium of women taking oral contraception. *Obstet Gynecol* 1978;52:703-2
 22. Elson DA, Riley RR, Lacey A, et al. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res* 2000;60:1267-75
 23. Bradlow HL, Hersheuff RJ, Martucci CP, et al. Estradiol 16 α -hydroxylation in the mouse correlates with mammary tumor incidence and presence of murine mammary tumor virus: a possible model for the hormonal etiology of breast cancer in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6295-9
 24. Auburn KJ, Woodworth C, DiPaolo JA, et al. The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 1991;49:867-9
 25. Newfield L, Bradlow HL, Sepkovic DW, et al. Estrogen metabolism and the malignant potential of human papillomavirus immortalized keratinocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:322-6