

# Carcinoma escamoso invasor de cérvix uterino.

Estudio de la expresión de p53, BCL-2, Ki-67, C-MYC y ciclina D1

**Palabras clave:** Cérvix uterino, carcinoma escamoso, p53, BCL-2, Ki-67, C-MYC, ciclina D1.

**Key words:** Uterine cervix, squamous cell carcinoma, p53, BCL-2, Ki-67, C-MYC, cyclin D1.

Francesc Alameda,\* Teresa Baro,\* María Luisa Mariñoso,\* Josep M<sup>a</sup> Manresa,\*\* Carlota Costa,\* Blanca Espinet,\* Pere Fuste,\*\*\* Gemma Mancebo,\*\*\* Ramón Carreras,\*\*\* Francesc Sole,\* Sergi Serrano\*

\* Servicio de Patología. Hospital del Mar. Universitat Autònoma de Barcelona.

\*\* Asesorament Metodològic d' Investigació Biomèdica. IMIM.

\*\*\* Servicio de Ginecología y Obstetricia. Hospital del Mar. Universitat Autònoma de Barcelona.

Correspondencia:

Francesc Alameda

Servicio de Patología

Hospital del Mar, Passeig Marítim 25-29

08003 Barcelona. Tel: 93.248.30.31, Fax: 93.248.31.31

E-mail: 86780mas.imim.es

150

Recibido: 16/02/2006.

Aceptado: 26/04/2006.

## Resumen

Se realiza un estudio descriptivo de la expresión inmunohistoquímica de p53, BCL-2, Ki-67, C-MYC, y ciclina D1 en 40 casos de carcinoma escamoso infiltrante en relación a parámetros morfológicos como: tamaño, estadio, invasión vascular, invasión de cuerpo uterino, invasión de parametrios y metástasis ganglionares utilizando array de tejidos. Solamente se encuentra relación entre la expresión de ciclina D1 y la invasión de cuerpo uterino, de forma estadísticamente significativa. Se observa además relación entre la expresión de C-MYC y Ki-67LI, C-MYC y ciclina D1, y ciclina D1 y Ki-67LI.

## Abstract

A descriptive study of p53, BCL-2, Ki-67, C-MYC and cyclin D1 immunohistochemical expression in 40 cervical squamous cell carcinoma using tissue arrays, was carried out. The data obtained were related with some clinical and morphological parameters as tumor size, vessel, uterine body and parametrial invasion, and lymph node metastases. The results show only relation between cyclin D1 expression and uterine body invasion. Then, the relationship between C-MYC and Ki-67 expression, between C-MYC and cyclin D1 expression, and between cyclin D1 and Ki-67LI, was observed. These results are discussed.

medigraphic.com

## Introducción

**E**l carcinoma escamoso invasor de cuello uterino es poco frecuente en nuestro medio, a diferencia de los procesos displásicos. Ambos, carcinoma invasor y displasias, tienen relación con la infección por virus del papiloma humano (VPH). En los procesos displásicos acontece una variedad de cambios genéticos que eventualmente conducen al desarrollo de carcinoma escamoso invasor. Estos cambios son debidos a las alteraciones del ciclo celular que producen los VPH llamados de alto riesgo, y en ocasiones a la integración del propio virus en el genoma de la célula infectada.

Por otro lado, existen algunas proteínas que se expresan o bien solamente en procesos displásicos y neoplásicos, o bien con mayor intensidad en estos procesos. Estas proteínas son detectables inmunohistoquímicamente. Entre ellas, están p53, BCL-2, Ki-67, C-MYC, y ciclina D1.

La alteración de la función de la proteína p53, por inactivación mediante la acción de la oncoproteína E6, juega un papel importante en el desarrollo de la neoplasia cervical.<sup>1-6</sup> Pero la alteración de la función de p53 no es debida a mutación del gen TP53,<sup>7</sup> ya que parece ser que la mutación se puede producir en estadios tardíos de la carcinogénesis.<sup>8</sup> En consecuencia, la mutación de p53 no juega un papel importante en la génesis del carcinoma escamoso de cérvix.<sup>9</sup> La expresión inmunohistoquímica de p53 es variable y parece creciente a medida que aumenta el grado de displasia y, en casos de carcinoma invasor, a medida que aumenta el estadio. No se expresa en cérvix normal.<sup>10-15</sup> Se ha intentado dar un valor pronóstico a la expresión de p53, pero no se ha conseguido.<sup>16,17</sup> Algunos autores encuentran diferencias pronósticas en la expresión de p53, en estadios IBI,<sup>18</sup> sin que la expresión de p53 sea un factor pronóstico independiente.<sup>15</sup> Otros han asociado la expresión de p53 a mal pronóstico en casos tratados con radioterapia.<sup>19</sup> No se observa relación entre la inmunopositividad de p53

y la positividad para VPH en tumores primarios ni en metástasis.<sup>15,20-23</sup>

La expresión inmunohistoquímica de BCL-2 es escasa en cérvix normal y se incrementa en displasias y cáncer.<sup>12</sup> La inmunoposición de BCL-2 no es un factor predictivo de metástasis.<sup>14</sup> Algunos autores sugieren que la inmunopositividad de BCL-2 y p53 en carcinomas escamosos de cérvix se asocian a infección por VPH de forma que pueden constituir un marcador diagnóstico independiente para cáncer cervical.<sup>23</sup> Algunos autores han observado un patrón inverso de inmunopositividad entre p53 y BCL-2 de forma estadísticamente significativa.<sup>24</sup>

La expresión de Ki-67 ha sido estudiada en lesiones displásicas y carcinoma, observándose un incremento de la expresión de Ki-67 acorde con el incremento de displasia hasta el carcinoma *in situ*.<sup>25</sup> No tiene relación con la presencia de metástasis ni valor pronóstico.<sup>16</sup>

Se ha demostrado expresión inmunohistoquímica de C-MYC en displasias y cáncer de cérvix uterino,<sup>26,27</sup> incrementándose con grado de displasia hasta el carcinoma.<sup>28-30</sup> Parece que no existe relación estadísticamente significativa entre la expresión de C-MYC y el tipo de VPH o el estadio.<sup>31,32</sup> Sin embargo, sí se ha hallado relación entre la expresión de C-MYC y la producción de E6.<sup>33</sup> En la infección por VPH de tipo 16 y 18 se encuentra un incremento de la expresión de C-MYC asociado a un incremento de la expresión de p53.<sup>31</sup>

La inmunoposición nuclear de ciclina D1 se observa en células parabasales y basales en cérvix normales. Dicha inmunoposición disminuye al aumentar el grado de displasia<sup>34</sup> llegando a la ausencia de expresión, tanto en displasias severas como en carcinomas escamosos infiltrantes.<sup>35</sup> Sin embargo, si evaluamos la inmunoposición citoplasmática de ciclina D1, observamos incremento progresivo desde la displasia hasta el carcinoma escamoso. Ha sido mostrado que la ciclina D1, se traslada del núcleo al citoplasma cuando la célula está en G<sub>1</sub> y entra en fase de síntesis.<sup>36</sup>

Nuestra intención en este trabajo, es estudiar la expresión inmunohistoquímica de algunas de estas alteraciones genéticas, su incidencia en el carcinoma invasor y su relación con diversos parámetros histológicos.

## Material y métodos

Se estudian un total de 40 casos de carcinoma escamoso invasor de cuello uterino procedentes de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Mar. Se valoran los siguientes parámetros: Tamaño tumoral, estadio, invasión vascular, afectación del cuerpo uterino, afectación de parametrios, y metástasis a ganglios linfáticos. Estos datos se relacionan con la inmunexpresión de p53, BCL-2, Ki-67, C-MYC y ciclina D1 estudiada mediante array de tejidos.

### Técnica de construcción de microarray

152

La técnica del microarray consiste en la construcción de un bloque de parafina en el que se pueden incluir cilindros de tejido de entre 0.5 y 1 mm de diámetro, de múltiples áreas de un gran número de casos. Para ello se seleccionan las áreas a estudiar en las preparaciones obtenidas previamente y teñidas con hematoxilina-eosina. Es conveniente que dicha selección sea realizada por dos patólogos a doble ciego.

Una vez escogidas las áreas a estudiar, se marcan con un rotulador vitrográfico y se llevan al bloque de parafina, determinando exactamente las zonas que deben transportarse al array.

Mediante agujas de 1 mm de diámetro, se procede a pinchar las áreas «problema» en los bloques de parafina «donantes», y trasladar el material obtenido al bloque de parafina «receptor», que constituirá el array. Las muestras se colocan adecuadamente y se construye un mapa con el fin de poder identificar cada caso. El array debe contener casos «control» y algún sistema que permita saber cuál es el primer caso que debe leerse y en

consecuencia tener orientada la secuencia de casos que contiene el array. Deben obtenerse al menos dos áreas por cada tumor.

Este nuevo bloque proporciona entre 100 y 200 cortes histológicos sobre los que se podrán realizar técnicas distintas, en nuestro caso de inmunohistoquímica. Periódicamente, cada 10 cortes deberá realizarse una hematoxilina-eosina con el fin de comprobar el buen estado de las muestras a estudiar.

La principal ventaja de los microarrays es que permite realizar estudios retrospectivos. Tiene además una serie de ventajas respecto a técnicas tradicionales de bloques multitisulares como son: Aumento de la capacidad de estudio de las muestras. Disminución del daño de los bloques de parafina; localización y ordenación sistemática y precisa de las muestras y posibilidad de análisis automatizado. Dado que la tecnología de los microarrays es relativamente reciente, existen pocos trabajos realizados con base en esta tecnología, entre ellos el presente.

### Estudio inmunohistoquímico

Los anticuerpos utilizados, sus diluciones y recuperación antigénica se expresan en el *cuadro I*. Las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron según métodos usuales. Brevemente se obtuvieron secciones en parafina de 3-4 micras, utilizando portaobjetos previamente tratados. Las secciones fueron desparafinadas e hidratadas según métodos usuales. Se llevó a cabo la recuperación antigénica. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario y se utilizó como método de visualización el sistema EnVision (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Para el revelado se utilizó el cromógeno DAB y hematoxilina de Mayer como tinción de contraste. El resultado obtenido se observó con un microscopio óptico.

El número de células positivas para Ki-67 o lo que es lo mismo, el índice proliferativo (IP) para Ki-67 se obtuvo mediante el porcentaje de nú-

**Cuadro I.** Anticuerpos estudiados.

AC	Casa/Clona	Dilución	Recup
Ciclina-D1	Dakocyt/DSC-6	1:50	AW
Ki-67	Dakocyt/MIB-1	1:100	AW
p53	Novocastra/DO-7	1:50	AW
BCL2	Biogenex/100	1:120	AW
C-MYC	Dakocyt/9E10	1:50	AW

Dakocytomation (Glostrup, Denmark), Novocastra (Newcastle, UK)  
Biogenex (San Ramon, CA, USA).

AW: Autoclave. Citrato a pH 7.3 a 120 aC, y 1 atmósfera de presión.

cleos inmunorreactivos, en un recuento manual de 200 células en 25xHPF para cada muestra. La expresión de ciclina D1, se consideró positiva al observarse en núcleo y citoplasma, y fue valorada en ambos lugares. Todos los anticuerpos fueron testados en los tejidos problema, a la vez que con tejidos control previamente conocidos como positivos y negativos. En todos ellos se evaluó el porcentaje de células positivas, realizándose una media aritmética entre las dos muestras correspondientes a cada caso.

### Detección de VPH

La hibridación *in situ* se realizó mediante un sistema de detección «INFORM HPV» de VENTANA basado en la hibridación *in situ* con sonda que determina la presencia del virus del papiloma humano en tejido fijado en formol e incluido en parafina. Las secciones de tres micras en portaobjetos tratados previamente se tratan de forma enzimática (ISH proteasa 2), para eliminar las proteínas que bloquean el ADN de la célula. A continuación se realizan las siguientes etapas:

- Desnaturalización (Incubación a 75°C en SSC – Salt Sodium Citrate Buffer) 20x/formamida.
- Incubación con sonda (Conjugada con isotiocianato de fluoresceína), para virus de alto riesgo (HPV HR probe).

- Lavado con SSC (Salt Sodium citrate Buffer) 20x/formamida.
- Amplificación y detección: La sonda conjugada con FITC se incuba con un anticuerpo antiFITC. Se realiza un lavado y después se incuba con un anticuerpo anti-Ig biotilado y con un conjugado de avidina con el enzima fosfatasa alcalina que reacciona con BICP (5bromo-4cloro-3indolyl fosfato), en presencia de NBT (Nitro Blue Tetrazolium: color azul en la localización de virus).
- Lavado con SSC (Salt Sodium citrate Buffer) 20x/formamida.

Contratinción con ISH RED counterstain (Tejido color rosa), de ADN Papilomavirus humano de amplio espectro VENTANA.

Las células positivas muestran el núcleo punteado de azul (*figura 1*).

### Estudio estadístico

Las variables cualitativas se resumen con su frecuencia absoluta y su porcentaje correspondiente. Las variables continuas se resumen con su media y desviación estándar, o con la mediana y los cuartiles 1 y 3 en caso de no seguir una distribución normal.

En los contrastes realizados en las variables cuantitativas, se compararon los grupos utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

El nivel de significación utilizado para todos los contrastes de hipótesis fue de 0.05.

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS para Windows (versión 12.0).

## Resultados

Se expresan en los cuadros II a VI

La edad media de las pacientes era de 55.7 años con un rango entre 32 y 81 años.

El estadio de la enfermedad se expresa en el cuadro II. La mayoría de los casos (25) estaban en estadio IB1.

La presencia de VPH de alto riesgo se demostró en 36 de los 40 casos (90%) con un patrón morfológico punteado, aceptado como de integración del virus en el DNA celular.

El tanto por ciento de casos y la mediana de células positivas se expresa en el *cuadro III*. Se observó inmunorreactividad nuclear para p53 (*figura 1*) en 11 de los 40 casos (27.5%) con una mediana de 12 y un rango entre 4 y 20. BCL-2 mostró inmunorreactividad citoplasmática (*figura 2*) en 7 casos (17.5%) con una media de célu-

las positivas de 15 y un rango entre 2 y 20. La inmunoeexpresión nuclear de Ki-67 (*figura 3*) se observó en 18 casos con una media de células positivas de 34 y un rango entre 10 y 60. Ciclina-D1 se expresaba tanto en el citoplasma como en el núcleo (*figura 4*) en 15 de los 40 casos, con una media de células positivas de 63 y un rango entre 20 y 100. La inmunoeexpresión de C-MYC (*figura 5*) fue observada en 25 casos (62.5%), con una media de células positivas de 18 y un rango entre 5 y 30.

El *cuadro IV* muestra la relación entre los aspectos macro y microscópicos y los distintos parámetros estudiados. En ella se expresa el nivel de significación y el coeficiente de correlación de Spearman.

Siete casos medían menos de 7 mm. Diez casos, entre 8 y 20 mm, 21 casos entre 21 y 40 mm y 9 casos más de 40 mm de diámetro máximo. No se observó relación entre tamaño y expresión de p53, BCL-2, Ki-67, Ciclina D1, ni C-MYC. Tam-

**Cuadro II.** Estadios.

Estadio	N. casos
IA1	1 (2.5%)
IB1	25 (62.5%)
IB2	8 (20%)
IIB	6 (15%)
T	40

154

**Cuadro III.** Casos positivos para p53, BCL-2, Ki-67, CCND1 y C-MYC, expresado en tanto por ciento y mediana de células positivas.

	p53	BCL-2	Ki-67	Ciclina-D1	C-MYC
Positivos	11 (27.5%)	7 (17.5%)	18 (45%)	15 (37.5%)	25 (62.5%)
Negativos	29 (72.5%)	33 (82.5%)	22 (55%)	25 (62.5%)	15 (37.5%)
Mediana de células +	12	15	34	63	18
Cuartiles, de células+ 1-3	4-20	2-20	10-60	20-100	5-30

**Cuadro IV.** Relación entre parámetros y aspectos histológicos.

	p53	BCL-2	Ki-67	C-MYC	Ciclina D1
Tamaño	0.061	-0.253	-0.159	-0.029	0.186
Estadio	0.031	0.73	0.293	0.633	0.373
IVAS	0.555	0.373	0.150	0.788	0.599
AFCU	0.369	0.467	0.507	0.450	0.034 (*)
AFPAR	1.000	0.859	0.430	0.739	0.631

Nivel de significación(\*); Coeficiente de correlación de Spearman ( $p < 0.005$ )

IVAS: Invasión vascular; AFCU: Afectación de cuerpo uterino; AFPAR: Afectación de parámetros

**Cuadro V.** Relación entre parámetros y metástasis ganglionares (rangos promedio y número de casos).

	Mediana		Total (GN/GP)
	Ganglios -	Ganglios +	
Ki-67	13.80	18.79	22/7
Ciclina DI	14.75	15.79	22/7
C-MYC	13.77	18.86	22/7
BCL-2	14.80	15.64	22/7

Ninguna de las diferencias fue estadísticamente significativa.

**Cuadro VI.** Correlaciones no paramétricas (Coeficiente de correlación).

	BCL-2	Ki-67	Ciclina DI	C-MYC
BCL-2	X	0.148	0.245	0.032
Ki-67	0.148	X	0.508 (**)	0.378 (*)
Ciclina DI	0.245	0.508 (**)	X	0.289 (*)
C-MYC	0.032	0.378 (*)	0.289 (*)	X

Coeficiente de correlación de Spearman (\*):  $p < 0.05$ ; (\*\*):  $p < 0.001$

poco se observó relación entre estadio y expresión de p53, BCL-2, Ki-67, Ciclina DI, ni C-MYC.

La invasión vascular estaba presente en 17 de los 40 casos. No se observó relación entre la invasión vascular con respecto a p-53, BCL-2, ciclina DI, Ki-67 o C-MYC.

Siete de los 40 casos mostraban afectación de cuerpo uterino. Solamente se observaron diferencias en relación a la expresión de ciclina DI.

Se constató afectación de parametrios solamente en 6 casos. No se observó relación entre afectación de parametrios y expresión de BCL-2, Ciclina DI, Ki-67 ni C-MYC.

Se estudiaron ganglios linfáticos regionales en 29 de los 40 casos. Los resultados se expresan en el *cuadro V*; se expresa la mediana de células positivas en los casos sin metástasis ganglionares (22 casos) y con metástasis ganglionares histológicamente demostradas (7 casos). La expresión de BCL-2, ciclina DI, Ki-67 y C-MYC no muestra-

ron relación con la presencia o ausencia de metástasis ganglionares. Por lo que respecta a p-53, de los 11 casos positivos, 2 mostraron metástasis ganglionares, 6 no y en los tres restantes no se extirparon ganglios linfáticos regionales. De los 20 casos negativos 5 mostraron metástasis ganglionares, 16 no y en los 13 restantes no se extirparon ganglios linfáticos. Los resultados no son valorables desde el punto de vista estadístico dada la escasez de casos. Por lo que respecta a la determinación de VPH de alto riesgo, de los 4 casos negativos, en dos no se demostraron metástasis ganglionares y en los otros dos no se estudiaron ganglios linfáticos. De los 36 casos positivos, 7 mostraron metástasis ganglionares, 20 no y en los 9 restantes no se extirparon ganglios linfáticos. Los resultados tampoco son valorables desde el punto de vista estadístico dada la escasez de casos.

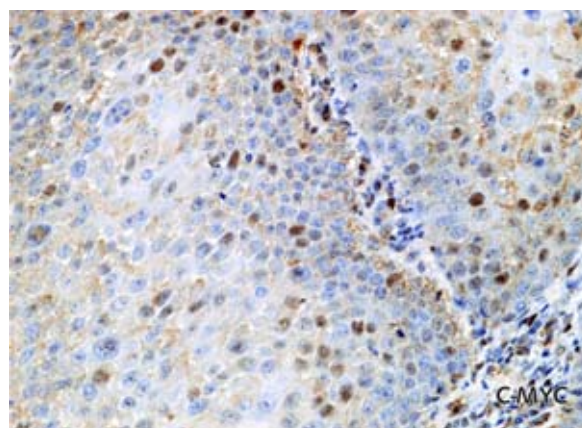
Estudiando la correlación entre la expresión de las distintas moléculas (*cuadro VI*) se observa correlación entre la expresión de Ki-67 y ciclina DI: (Ambos fueron positivos en 11 casos y negativos en 20), Ki-67 y C-MYC (ambos fueron positivos en 13 casos y negativos en 12) y ciclina DI y C-MYC (Ambos fueron positivos en 11 casos y negativos en 11).

## Discusión

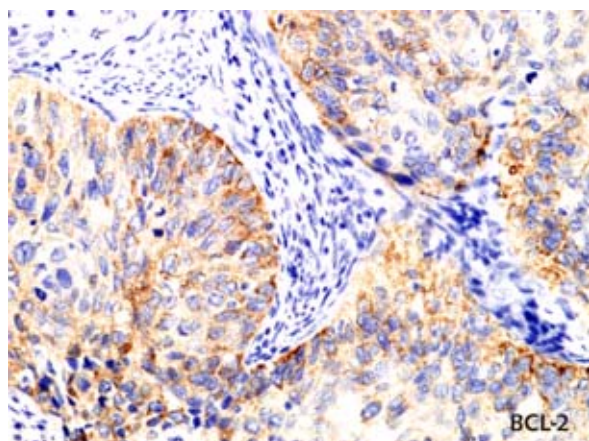
Nuestra casuística es escasa y en cierta forma no permite evaluar adecuadamente las relaciones estudiadas, si bien creemos que algunos de los resultados obtenidos deben tenerse en cuenta. La alteración de p53, no es un acontecimiento inicial en el desarrollo del carcinoma escamoso de cérvix, si bien en casos de infección por virus del papiloma humano de alto riesgo, la función de p53 es anulada por la oncoproteína E6. Desde el punto de vista inmunohistoquímico p53 no debería detectarse en casos de displasia, si bien algunos autores encuentran inmunoreactividad para p53 en estos casos y demuestran que se incrementa

con el grado de la displasia y el cáncer.<sup>10-15</sup> p53 no se detecta en todos los casos de carcinoma escamoso infiltrante, pero en estos casos parece existir relación entre el incremento de la inmunoexpresión de p53 y el estadio,<sup>10-15</sup> dato que no hemos encontrado en nuestra casuística. No se ha hallado ningún valor pronóstico a la expresión de p53.<sup>16,17</sup>

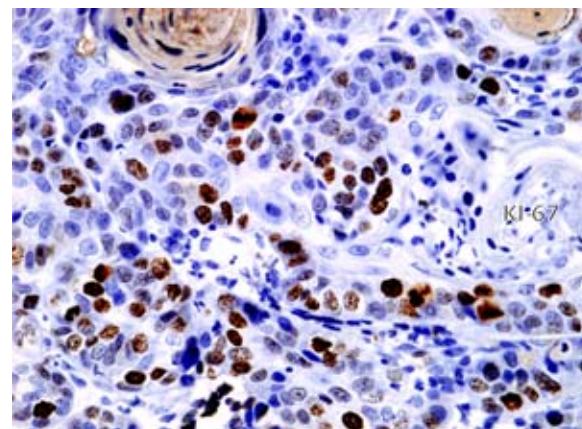
Tampoco hemos hallado relación entre la inmunoexpresión de BCL-2 y los parámetros estudiados. Se ha dicho que la inmunoexpresión de BCL-2 es un factor predictivo de metástasis.<sup>14</sup>



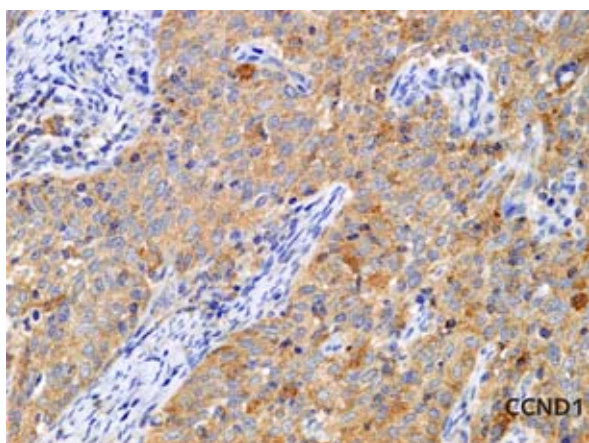
**Figura 3.** Carcinoma escamosos infiltrante, aumento 40x. C-MYC.



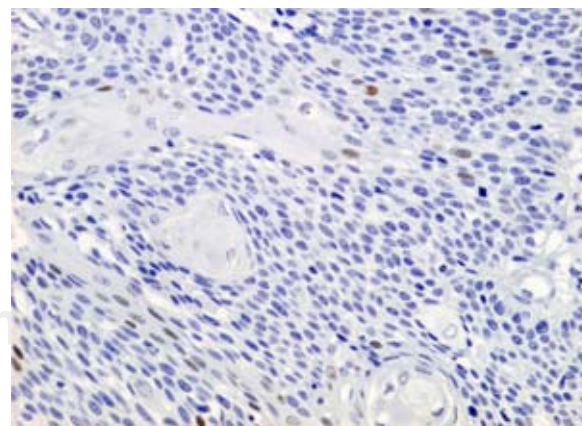
**Figura 1.** Carcinoma escamosos infiltrante, aumento 40x. BCL-2.



**Figura 4.** Carcinoma escamosos infiltrante, aumento 40x. ERB-B2.



**Figura 2.** Carcinoma escamosos infiltrante, aumento 40x. CCND1.



**Figura 5.** Carcinoma escamosos infiltrante, aumento 40x. Ki-67.

Sin embargo, en nuestros casos no existe relación entre la inmunexpresión de BCL-2 y la presencia de metástasis ganglionares.

En cuanto al valor de la inmunexpresión de Ki-67 solamente se ha observado un incremento de su expresión en relación directa con el incremento de la displasia, hasta el cáncer,<sup>25</sup> de forma similar a p53, BCL-2, y C-MYC, pero no se ha observado relación con la presencia de metástasis, ni valor pronóstico.<sup>16</sup> Nuestros resultados abogan en este sentido.

La inmunexpresión de C-MYC ha sido menos estudiada. Aparte del incremento de la inmunexpresión acorde con el grado de displasia,<sup>26,27</sup> no se ha hallado relación con otros determinantes biológicos. Asimismo, nuestros datos abogan en este sentido. Ngan, 2001,<sup>31</sup> encuentra expresión de C-MYC en 37% de sus casos mientras que en los nuestros la expresión llega a 62%. No se ha hallado relación entre la expresión de C-MYC y la inmunexpresión de p53, ni con los tipos 16 y 18 de VPH.

La expresión de ciclina D1 se altera en los casos de displasia y cáncer de cérvix, dado que en condiciones normales ciclina D1 interacciona con pRB, como modulador del ciclo, y en casos de infección por VPH de alto riesgo, es la oncoproteína E7 quien interacciona con pRB, de forma que ciclina D1 no ejerce su función. En consecuencia es posible que ciclina D1 sea rápidamente ubiquitinizada en el núcleo y transportada al proteosoma correspondiente citoplasmático para ser destruida. Asimismo, ciclina D1 pasa al citoplasma para ser destruida en las células en fase de síntesis (Cita ciclina D1). Este dato correlacionaría con los hallazgos inmunohistoquímicos en el sentido de que en casos de carcinoma escamoso, ciclina D1 se expresa principalmente en citoplasma, y escasamente en núcleo mientras que en casos de displasia leve se expresa tanto en el núcleo como en el citoplasma.<sup>25</sup> En este sentido, es interesante el hallazgo de la correlación positiva entre la inmunexpresión de ciclina D1 y Ki-67, por

cuanta mayor proliferación, más número de células en fase de síntesis y en consecuencia mayor expresión de ciclina D1, citoplasmática.

Se ha hallado también correlación entre Ki-67 y C-MYC y entre ciclina D1 y C myc. Este dato merece mayor reflexión. C-MYC es un oncogen que parece activarse en el carcinoma escamoso de cérvix uterino, ya en displasias de alto grado.<sup>37</sup> Es pues posible que C-MYC induzca mayor proliferación y en consecuencia mayor expresión de Ki-67 y ciclina D1. Los mecanismos a través de los cuales se produce este efecto, no son objeto de este trabajo, pero es un hecho conocido que ciclina D1 y C-MYC son dianas de la vía WNT/APC/beta-catenina.<sup>38</sup>

Por fin llama la atención la escasez de relaciones halladas en este trabajo, a diferencia de lo expresado en la literatura. Es posible que dicha escasez responda a que el trabajo ha sido realizado mediante arrays de tejido, Sin embargo, el método ha sido validado en distintos trabajos (39, citas de arrays, 2 muestras de 1 mm para cada caso, tal y como hemos procedido en este trabajo). La otra razón que puede argumentarse es el número relativamente bajo de casos estudiados dado que, por ejemplo, los valores de VPH y los de p53 no son evaluables estadísticamente.

## Referencias

1. Akasofi M, Oda Y. *Immunohistochemical detection of p53 in cervical epithelial lesions with or without infection of HPV 16 and 18.* *Virchows Arch* 1995; 425 (6): 593-602.
2. Mittal KR, Lin O, Chan W, Goswami S, Demopoulos RI. *Cervical squamous cell dysplasias and carcinomas with immunodetectable p53 frequently contain HPV.* *Gynecol Oncol* 1995; 58 (3): 289-294.
3. Chen CA, Chen TM, Wu CC, Chang CF, Hsieh CY. *Human Papillomavirus DNA and p53 in stage IB bulky cervical cancer.* *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (11): 678-682.
4. Hachisuga T, Matsuo N, Iwasaka T, Sugimori H, Tsuneyoshi M. *HPV and p53 overexpression in carcinomas of the uterine cervix, lower uterine segment and endometrium.* *Pathology* 1996; 28 (1): 28-31.
5. Uchiyama M, Iwasaka T, Matsuo N, Hachisuga T, Mori M et al. *Correlation between HPV and p53 gene overexpression in adenocarcinoma of the uterine cervix.* *Gynecol Oncol* 1997; 65 (1): 23-29.
6. Bar JK, Markowska J, Harloziska A, Sedlackzek P, Nowak M et al. *Relation between infection with HPV and expression of p21*



- and p53 oncoproteins in patients with cancer of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996; 17 (4): 283-285.
7. Busby-Earle RM, Steel CM, Williams AR, Cohen B, Bird CC. P53 mutations in cervical carcinogenesis-low frequency and lack of correlation with human papillomavirus status. *Br J Cancer* 1994; 69 (4): 732-737.
  8. Herrington CS, Woraham M, Southern SA, Mackowiak P, Wolman SR. Loss of sequences on the short arm of chromosome 17 is a late event in squamous cell carcinoma of the cervix. *Mol Pathol* 2001; 54 (3): 160-164.
  9. Ngan HY, Tsao SW, Liu SS, Stanley M. Abnormal expression and mutation of p53 in cervical cancer. A study at protein RNA and DNA levels. *Genitourin Med* 1997; 73 (1): 54-58.
  10. Dellas A, Schultheiss E, Almendral AC, Gudat E, Oberholzer M et al. Altered expression of mdm-2 and its association with p53 protein status tumor cell proliferation rate and prognosis in cervical neoplasia. *Int J Cancer* 1997; 74 (4): 421-425.
  11. Suo Z, Holm R, Nesland JM. Squamous cell carcinomas, an immunohistochemical and ultrastructural study. *Anticancer Res* 1992; 12 (68): 2025-2031.
  12. Tang ZH, Cai QF, Ye XA. Expression of bck-2, cerbB2 and p53 protein in cervical epithelial carcinogenesis. *Ai Zheng* 2003; 22 (10): 1057-1061.
  13. Horn LC, Fischer U, Hanel C, Kuhn H, Raptis G et al. P53 in surgically treated and pathologically staged cervical cancer: correlation with local tumor progression, but not with lymphatic spread. *Pathol Res Pract* 2001; 197 (9): 605-609.
  14. Graflund M, Sorbe B, Karlson M. Immunohistochemical expression of p53, BCL-2 and p21 (WAF1/CIP1), in early cervical carcinoma: correlation with clinical outcome. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12 (3): 290-298.
  15. Avall-Lundqvist EH, Silfversward C, Aspenblad U, Nilsson BR, Auer GU. The impact of tumor angiogenesis, p53 overexpression and proliferative activity (MIB-1) on survival squamous cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 1997; 33 (11): 1799-1804.
  16. Ebara T, Mitsuhashi N, Saito Y, Sakurai H, Hasegawa M et al. Prognostic significance of immunohistochemically detected p53 protein expression in stage IIIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation therapy alone. *Gynecol Oncol* 1996; 63 (2): 216-218.
  17. Hunt CR, Hale RJ, Buckley CH, Hunt J. P53 expression in carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 1996; 49 (12): 971-974.
  18. Chen HY, Hsu CT, Lin WC, Tsai HO, Chang WC. Prognostic value of p53 expression in stage IB1 cervical carcinoma. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49 (4): 266-271.
  19. Oka K, Suzuki Y, Nakano T. Expression of p27 and p53 in cervical squamous cell carcinoma patients treated with radiotherapy alone: radiotherapeutic effect and prognosis. *Cancer* 2000; 88 (12): 2766-2773.
  20. Cavuslu S, Goodlad J, Hobbs C, Connor AM, Raju KS et al. Relationship between human papillomavirus infection and overexpression of p53 protein in cervical carcinomas and lymph node metastases. *J Med Virol* 1997; 53 (2): 111-117.
  21. Saito J, Hoshiai H, Noda K. Type of HPV and expression of p53 in elderly women with cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49 (3): 190-193.
  22. Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1997; 76 (11): 1410-1415.
  23. Grace VM, Shalini JV, Lekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and BCL2 proteins in HPV induce squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003; 91 (1): 51-58.
  24. Bitiren M, Cakmak EA, Gocmen A, Inaloz SS, Sari I et al. The relationship between expression of p53/BCL-2 and clinicopathologic criteria in cervix squamous cell carcinomas. *Eur J Gynecol Oncol* 2003; 24 (5): 411-412.
  25. Alameda EFP, Boluda S, Ferrer L, Baro T, Mariño L et al. The Ki67 labeling Index is not a useful predictor for the follow up of cervical Intraepithelial Neoplasia-I. *J Low Gen Tract Dis* 2004; 8 (4): 313-316.
  26. Nagai N. Gene diagnosis of uterine cervical cancer (Article in Japanese). Summary. *Rinsho Byori* 1994; 42 (4): 372-379.
  27. Petrov SV, Mazurednko NN, Sukhova NM, Moroz IP, Katsenel'son VM et al. Cell oncogene expression in normal, metaplastic, dysplastic epithelium and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Arkh Patol* 1994; 56 (4): 22-31. (Article in russian), summary.
  28. Nair SA, Nair MB, Jayaprakash PG, Rajalekshmy TN, Nair MK et al. Ras and c.myc oncoproteins during tumor progression in the uterine cervix. *Tumori* 1998; 84 (5): 583-588.
  29. Golijow CD, Abba MC, Mouron SA, Gomez MA, Dolout FN. C myc gene amplification detected in preinvasive intraepithelial cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11 (6): 462-465.
  30. Aoyama C, Peters J, Senadheera S, Llu P, Shimada H. Uterine cervical dysplasia and cancer: identification of C-MYC status by quantitative polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1998; 7 (6): 324-330.
  31. Ngan HY et al. Abnormal expression of pan-Ras, C-MYC and p53 in squamous cell carcinoma of the cervix. Correlation with HPV and prognosis. *Oncol Rep* 2001; 8 (3): 557-561.
  32. Brenna SM, Zeferino LC, Pinto GA, Souza RA, Andrade LA et al. C-MYC protein expression is not an independent prognostic predictor in cervical squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35 (4): 425-430.
  33. Polischouk AG, Scotnikova OI, Sergeeva NS, Zharinov GM, Lewensohn R et al. Response to radiotherapy of human uterine cervix carcinoma is not correlated with rearrangements of the Ha-ras-1 and/or C-MYC genes. *Eur J Cancer* 1997; 33 (6): 942-949.
  34. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16 (4): 339-347.
  35. Srivatsan ES, Misra BC, Venugopalan M, Wilezynski SP. Loss of heterozygosity for alleles on chromosome 11 in cervical carcinoma. *Am J Hum Genet* 1991; 49 (4): 868-877.
  36. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes and Develop* 1993; 7: 812-821.
  37. Brychtova S, Brychta T, Sedlakova E, Kolar Z. Proto-oncogene C-MYC in uterine cervix carcinogenesis. *Neoplasma* 2004; 51 (2): 84-89.
  38. Uren A, Fallen S, Yuan H, Usabutun A, Kucukali T et al. Activation of the canonical WNT pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression. *Cancer Res* 2005; 65 (14): 6199-6206.
  39. Alkushi A, Irving J, Hsu E, Dupuis B, Liu CL et al. Immunoprofile of cervical and endometrial adenocarcinomas using a tissue microarray. *Virchows Arch* 2003; 442 (3): 271-277.