

El virus del papiloma humano y el cáncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela.

Jorge García-Tamayo¹, Julia Molina¹ y Eduardo Blasco-Olaetxea²

¹Laboratorio de Patología Molecular, Maracaibo, Venezuela e

²Instituto Canario de Investigación sobre el Cáncer. Fuerteventura, Islas Canarias.

Palabras clave: VPH, cáncer cervical, glicolípidos, E6 E7, inmunohistoquímica, p16.

Resumen. Se examinó la historia de la relación entre la infección con el VPH, las lesiones intraepiteliales y el cáncer del cuello uterino. Inicialmente los hallazgos fueron descritos en Maracaibo (1971), luego en México en 1973 y posteriormente los estudios sobre la ultraestructura e inmunohistoquímica de este virus y su importancia en la génesis del cáncer cervical. Se describió la ultraestructura de los viriones y sus diferentes proteínas señalando el rol de ellas en la incorporación del genoma viral a los queratinocitos del cérvix. La cubierta glicoproteica de los queratinocitos ha sido objeto de estudios y se señaló la importancia de la misma durante la infección con el VPH y su relación con p16, los antígenos de grupos sanguíneos y alteraciones tempranas en diferentes genes, las que conllevan cambios en el ciclo celular con pérdida de la heterocigosis, fenómenos que estimulados por la infección con el VPH de alto riesgo, conducen al cáncer del cuello uterino.

Human papilloma virus and cervical cancer. An historical review on the development of research on cancer of the cervix uteri in Venezuela.

Invest Clin 2010: 51(2): 193 - 208

Key words: HPV, cervical cancer, glycolipids, E6 E7, immunohistochemistry, p16.

Abstract. The history on the relationship of VPH infection and cervical cancer was examined. Findings were initially reported in Maracaibo(1971), later in Mexico(1973) and thereafter several studies on the ultrastructure and immunohistochemistry of VPH infection and its role on cervical cancer were described. The ultrastructural findings of viral particles of HPV and their proteins, as well as their role in the incorporation of the viral genome to the human cervical cells were also described. Glycoproteins on the surface of cervical cells were reviewed and their importance on HPV infection was related to p16, blood group antigens and early genetic changes in the cell cycle with loss of heterozigosity, all of which, stimulated by the high risk HPV infection lead to cervical cancer.

LA HISTORIA

En un principio, como si fuese un enunciado bíblico, todo comenzó en el VIII Congreso Latinoamericano de Patología que tuvo lugar en Maracaibo, Venezuela, a orillas del lago de Coquivacoa, en octubre del año 1971. Un ginecólogo, el doctor Jorge Nágel y un patólogo el doctor Elio Casale Ochoa, ambos venezolanos, ejerciendo en Caracas, demostraron con el microscopio electrónico (ME) en un trabajo libre, presentado en aquel Congreso, que existían partículas virales en unas lesiones del cuello uterino que colposcópicamente aparecían como manchas rosadas. Estaba yo sentado en la audiencia, al lado del doctor José Trinidad Núñez Montiel, un ginecólogo experto en colposcopia (para la época, los norteamericanos no creían en este procedimiento diagnóstico, pero “JotaTe”, como le llamábamos nosotros a este genial ginecólogo, era reconocido como experto colposcopista en Suecia y en la Argentina donde iba

a hablar en los Congresos sobre “mosaicos” y “recuadrados”, una terminología que recién comenzaba a crearse y que para los ginecólogos de la época sonaba esotérica. Unos años antes, Núñez Montiel había sido capaz de demostrar con el uso de una pinza que abría todo el canal endocervical y con la ayuda del lugol, la presencia de focos de displasia en los sitios más profundos del cuello uterino. JT quien usaba una pitillera corta y la mantenía en la boca pasándola de un lado al otro, captó la importancia del asunto cuando escuchó lo que decían Nágel y Casale en el VIII Congreso de la SLAP e inmediatamente volteó a mirarme y me dijo... –“¡Chico, si tú tienes el microscopio electrónico (ME) y yo el colposcopio, vamos a resolver el problema del origen del cáncer cervical en menos de lo que canta un gallo!” Habíamos venido examinando con el ME biopsias del cuello uterino y estábamos conociendo mejor la ultraestructura del epitelio exocervical, cuando JT nos hizo aquel premonitorio comentario (1, 2). El doc-

tor Núñez Montiel era un médico muy preocupado y estudioso y venía de haber estado durante años dándole vueltas al tema de las tricomonas y su efecto sobre el epitelio cervical, las veía con su colposcopio, girando y girando, hasta a meterse en el epitelio usando sus flagelos y pensaba cuanto y como deberían irritar la superficie de los queratinocitos. Ya habíamos tomado muestras y examinado casos de tricomoniasis con el ME y estábamos pensando en comunicar nuestros hallazgos en un trabajo por lo que algunas de estas experiencias sobre las tricomonas serían publicadas unos años más tarde (3, 4).

Pero el asunto de los virus parecía ser otra cosa. Estos virus del Polioma-Papiloma, sabíamos producían las verrugas, las observadas en las mucosas genitales conocidas como condilomas y las verrugas vulgaris de la piel denominadas popularmente “cadiellos”. Evidentemente estas lesiones que simulaban ser pequeños coliflores eran verdaderos tumores. Aquellos condilomas, eran tumores ginecológicos y sabíamos bien que ellos se veían más frecuentemente en mujeres de escasos recursos. Si el origen era viral, algo nos decía que el cáncer del cuello uterino, que era y sigue siendo la primera muerte por cáncer en la mujer venezolana, podía tener algo que ver con un virus que producía tumores. Tan pronto terminó el Congreso de la SLAP del año 1971, JT inició la febril tarea de tomar biopsias y nosotros nos dispusimos a buscar y pronto a detectar las partículas del virus del Papiloma Humano (VPH) en el cuello uterino. En unos meses ya estábamos obteniendo resultados esperanzadores. En aquellos días, luchaba yo por convencer a mis colegas patólogos, de que los halos coilocíticos que veíamos en los cortes histológicos no eran producto de la llamada “sobrecarga glucogénica”. Hacíamos coloraciones para demostrar que no eran halos de glucógeno, pero ellos no creían que podían ser algo diferente.

Cuando JT les hablaba de los virus, sencillamente, se reían de él... Había algo de envidia, digo yo, y mucha incredulidad para no modificar conceptos ya establecidos. Algunos de nuestros colegas decían que JT estaba loco, y como siempre sucede, él tenía enemigos por lo preciso de su verbo, por lo llano de su manera de ser, tal vez por esa pasión obsesiva por su trabajo (era capaz de buscar a una paciente pobre en un barrio hasta con la policía, para obligarla a ir al hospital y tratarla para que no se malignizara un proceso que él consideraba pre-neoplásico). Estas cosas hacían de JT un ser diferente, un ginecólogo que examinaba y operaba a las mujeres costeándoles la hospitalización de su bolsillo y sin cobrarles por sus servicios... ¡Cuánto sabía! Quizás por eso mismo, nunca fue llamado a enseñar como profesor de la Universidad (aun cuando suena disparatado, no es sino una de nuestras típicas contradicciones). El cargo de profesor nunca se lo dieron. En realidad le fue varias veces escamoteado, y entretanto, era invitado a dictar charlas en Europa o en otros países de América, era felicitado por unos pocos amigos y a la vez era envidiado por muchos de sus colegas. El siguiente Congreso Latinoamericano de Patología se dio dos años después. El año 1973 presentamos nuestros resultados en México. Yo era un patólogo de 33 años, un pichón de investigador, pero nunca olvidaré aquella memorable tarde, en Mérida, capital de la península de Yucatán. Al final de la presentación de ambos trabajos, donde demostrábamos la presencia del VPH en el epitelio cervical y lo relacionábamos con el cáncer, el doctor Javier Arias Stella quien había estado presente, se me acercó para decirme que seguramente yo no tenía idea de la importancia de lo que acababa de mostrarles, pero que era algo crucial y que los años habrían de demostrarlo. Javier, con Pelayo Correa y con Rui Pérez Tamayo eran para la época, la flor y nata de la Anatomía

Patológica latinoamericana... Yo emocionado recibí sus elogiosos comentarios, sin captar realmente su valor. Con las vueltas que da la vida, sería en San Sebastián, en el País Vasco, muchos años después, a comienzos de la década de los noventa del pasado siglo XX, cuando volveríamos a revivir aquellos días y Don Javier Arias Stella tuvo la deferencia de comentar este hecho en una hermosa charla sobre nuestra especialidad dictada en el País Vasco, en unos lluviosos días de noviembre vividos allá en Donostia, frente al mar Cantábrico... Su conferencia fue reproducida en 1993 en la Revista Patología de la Sociedad Latinoamericana de Patología (5).

Volviendo al IX Congreso de la SLAP en Mérida, Yucatán, México, del año 1973, la presentación de los 2 trabajos libres fue publicada en el Suplemento de la Revista Patología (Mex) en las Memorias del IX Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Patología, Mérida Yucatán, México, 1973 (6, 7). Cualquiera que conozca sobre la historia del VPH y sus publicaciones, notará que para la época, el investigador canadiense Maisels y el germano ZurHausen todavía no comenzaban a hablar del virus del papiloma ni de su probable relación con el cáncer cervical. Los cambios citológicos de la infección con este virus fueron descritos inicialmente por Meisels y Fortín (8) e igualmente por Puroloa y Savia (9) en 1976. Una publicación relacionada con estos hallazgos, aparecida unos años más tarde (1978), ya viviendo en Caracas, en una revista que para la época llevaba un buen record de ininterrumpida presencia (10), resumió nuestras experiencias durante los años de trabajo en Maracaibo y quiso ser un homenaje al increíble personaje que había sido JT Nuñez Montiel, por ello llevaba un epígrafe que decía: "Esta investigación sobre la papilomatosis cérvico-vaginal, es el producto de las inquietudes y el tesón de José Trinidad Nuñez Montiel, brillante gine-

cólogo zuliano, hoy ya desaparecido. Él sintió muy de cerca el abatimiento y la decepción al ver como sus colegas dentro y fuera de la Universidad del Zulia, no valoraron sus esfuerzos para hacer investigación sobre el cáncer del cuello uterino. Este trabajo es el fruto de sus ideas y espero pueda servir como homenaje póstumo a su memoria".

Unos años más tarde, con el doctor Francisco (Pancho) Rincón Morales, un ginecólogo maracaibero ejerciendo en Caracas, quien nos decía con orgullo se sentía sucesor de las ideas y de la obra de JT, nos interesamos en el tema de las lesiones vulvares provocadas por el VPH, les hicimos ME de transmisión y de barrido y de allí surgieron otras publicaciones (11-13). El año 1984, en el Boletín de la Sociedad Venezolana de Anatomía Patológica Vol. 1, No. 1 Enero-febrero, escribí un Editorial que ahora ya ni se que lo hice, pero era como otros tantos artículos sobre temas para pensar en lo que Pancho Rincón denominaba "la cifra ignominiosa" al referirse al número de mujeres que fallecían anualmente por cáncer del cuello uterino. Llegamos a pensar que dichos escritos, solo servían como catarsis, pero llamábamos la atención sobre las fallas en el sistema para lograr un despistaje eficiente de los casos de cáncer utilizando la citología vaginal y destacamos como desafortunadamente, la conducción de estos programas sanitarios permanecían en las manos de funcionarios quienes no eran en principio especialistas en patología. Las controversias con los citotecnólogos surgieron en la medida que comencé a publicar mis reflexiones. Algunas en la prensa de Caracas y de Maracaibo, y quizás especialmente por las verdades que decía en "Reflexiones de un Anatomopatólogo", un libro que se publicó auspiciado por la Directiva de la Sociedad Venezolana de Anatomía Patológica el año 1991. Años después en otro libro de ensayos "Más reflexiones sobre la Patología y el País" publicado en 1998, hay algu-

nos artículos de prensa aparecidos durante varios años en El Nacional, Panorama, El Diario de Caracas, etc, repitiendo la historia de las estadísticas que demostraban y lo siguen haciendo, como en el curso de los años, lejos de haber mejorado luego de más de 50 años de hacer despistaje de cáncer por citología, la curva del carcinoma cervical en Venezuela no se ha modificado substancialmente. Esto puede parecer una muestra del más terrible subdesarrollo o mejor, de la entropía tropical, ese desorden e irresponsabilidad que nos ha caracterizado desde siempre a quienes deberíamos haber adoptado con seriedad y organización, medidas para que el cáncer del cuello uterino, ya estuviese desapareciendo de nuestra tierra. Con el argumento de “la idiosincrasia”, o de nuestra particular manera de ver la cosas, superficialmente, sin ir al meollo del asunto, el tiempo pasa y lejos de mejorar, las condiciones de los pacientes que son la mayoría del pueblo que no tiene recursos, se deteriora cada día más. Los políticos, solo se ocupan de llenarse los bolsillos y por eso es que en el fondo, si queremos buscar un culpable pudiésemos pensar que paradójicamente, es “el excremento negro del diablo”, el petróleo, que ha hecho tan rica esta nación y tan pobres a sus ciudadanos.

La presencia de las secuencias de ADN viral en el cáncer del cérvix, fue demostrada por Harald Zur Hausen (14, 15) en la década de los 90, lo cual le valdría el Premio Nobel de Medicina el año 2008, junto con Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier. En un estudio cito-histológico realizado en Venezuela durante el año 1994, se re-evaluaron 100 citologías determinándose que en el 35% de ellas se podía detectar la asociación de NIC con VPH; de esa re-evaluación histológica se determinó que el 63% mostraban NIC y VPH (16). Los estudios iniciales sobre la presencia de VPH en el país utilizando métodos de biología molecu-

lar fueron publicados en 1997 (17), posteriormente, la población estudiantil venezolana fue analizada por PCR y se demostraron altos porcentajes (80,5%) para los tipos de VPH de alto riesgo; se ha descrito también la presencia frecuente de virus de alto riesgo en las muestras cervicales de pacientes con lesiones de bajo grado, destacándose el hecho de que la infección se observaba en pacientes muy jóvenes (18).

EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus del Papiloma Humano no tiene envoltura, posee una cápside icohédrica y se replica exclusivamente en el epitelio plano estratificado de la piel y de las mucosas. Existen más de 10 tipos de VPH y hay un grupo de ellos denominado de alto riesgo que se encuentra en el cáncer del cuello uterino y en otros carcinomas, del canal anal, de la orofaringe y del pene (15).

La infección genital con el virus del papiloma humano (VPH) es hoy día la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo y aunque estas infecciones generalmente son transitorias, existen dos hechos de carácter relevante; primero, la infección puede ser persistente y segundo, existen de más de 15 tipos de VPH de alto riesgo. Estos virus constituyen la causa directa de los casos de carcinoma epidermoide y adenocarcinoma del cuello uterino y sabemos hoy que el 70% de de los casos de cáncer cervical se deben a VPH de los tipos 16 y 18 (19). Con los nuevos métodos de biología molecular los estudios de Nubia Muñoz y sus colaboradores en la Agencia Internacional para Investigación sobre el Cáncer (IARC) en Francia, han concluido que en un 99,7% de todos los casos de cáncer cervical, el VPH es la causa necesaria para que estos tumores se hayan desarrollado (20).

La mayoría de los carcinomas del cuello uterino se inician como alteraciones in-

traepiteliales, por lo que frecuentemente existen lesiones sincrónicas y metaacrónicas en el epitelio cervical displásico y neoplásico, que son provocadas por la expansión clonal de células epiteliales transformadas. Ahora se sabe que en la transformación de las células del cáncer cervical siempre han mediado eventos genéticos previos y se conoce que ellos están asociados a la presencia del VPH en la génesis de esta neoplasia, lo cual ha sido señalado desde hace muchos años y es en la actualidad parte consustancial del proceso de carcinogénesis. De manera tal que puede decirse que las infecciones con el virus del papiloma humano (VPH) se caracterizan por presentar una expresión genética de tipo restringido y es ésta la que les ha permitido a estos virus oncogénicos evolucionar con la especie humana e intervenir en diferentes enfermedades (21). Es posible afirmar que el proceso de transformación neoplásica en un epitelio infectado por el VPH es puntual y está directamente inducido por los oncogenes E6 y E7 de los tipos de VPH de alto riesgo que van a provocar inestabilidad cromosómica en las células basales y parabasales del epitelio involucrado (23, 24). Afortunadamente, estos cambios que dan inicio a la carcinogénesis, se producen ocasionalmente durante las infecciones con los diversos tipos de VPH de alto riesgo, cuya incidencia está asociada a factores geográficos y sociológicos bien estudiados (19).

La replicación viral múltiple con difusión de gran cantidad de copias de los viriones sin que se produzcan daños celulares aparentes, es un fenómeno muy particular del VPH; sabemos que los genes del VPH se encuentran en diversos epitelios del ser humano y que estos usualmente no se expresan en las células basales y parabasales para solo hacerse evidentes cuando las células epiteliales que van migrando hacia la superficie llegan a alcanzar un cierto grado de maduración (1). Es en ese momento cuan-

do se produce el ensamblaje y la integración de las partículas virales y se podrán detectar los viriones ultraestructuralmente (6, 7, 10). El daño que este fenómeno produce, se evidencia en las células superficiales que estaban ya destinadas a morir y que muestran cambios arquitecturales que han sido descritos desde hace muchos años (1, 2).

El VPH pertenece a la familia Papovaviridae, formada por virus sin envoltura que tienen una cápside con 72 capsómeros que rodean el genoma del virus. Los capsómeros están compuestos por dos proteínas estructurales: L1 que forma el 80% de la partícula viral, con 72 pentámeros, constituye la proteína mayor de la cápside, y L2, la proteína menor de la cápside, con cerca de 72 copias. La L2 es capaz de formar partículas virales incompletas que no son infecciosas y se han denominado "partículas como virus" (PCVs) (22). Es interesante acotar que las PCVs con L1 son utilizadas para preparar las vacunas; ellas son capaces de penetrar en células epiteliales cultivadas de manera tal que es imposible diferenciar su penetración de la efectuada por una partícula viral que contenga proteínas L1 y L2 infecciosas (25). La unión de las partículas virales, infecciosas o no, con la membrana celular se hace a través de moléculas de proteoglicanos del tipo heparán sulfato (26, 27). Este mecanismo puede ser bloqueado a través de una enzima que actúa como activo inhibidor, la proproteína convertasa (decanoil-RVKR-cmk); estas convertasas son miembros de la familia de las proteasas endocelulares cuyo prototipo es la furina (28, 29). La proproteína-convertasa es necesaria para la penetración de las PCVs y este hallazgo es muy interesante pues vincula a estas enzimas con el inicio de la infección con el VPH. No obstante, se sabe que este mecanismo no es efectivo solo durante la infección con el VPH; el Togavirus Semliki Forest, es activado por la furina en el momen-

to de su penetración y lo mismo se ha descrito para otro virus transmitido por artrópodos, el Flavivirus del Dengue (30, 31) La activación de la furina, con la proteína viral L2 puede estudiarse en vivo e *in vitro*. En células cultivadas se produce en la superficie del epitelio y en un modelo murino experimental desarrollado recientemente, la penetración se logra exponiendo la membrana basal tras disrupción del epitelio superficial (32).

El genoma del VPH se encuentra rodeado por la cápside y es una molécula de doble cadena de ADN organizada con 8 a 10 marcos de lectura abierta (ORFs) la cual es semejante para todos los tipos de VPH. El genoma está dividido en tres regiones: la región larga de control (LCR) que no tiene potencial para codificar, la región de las proteínas tempranas (E1-E8) y la región de las proteínas tardías (L1 y L2). Las proteínas E1 y L2 son necesarias para la replicación extra cromosómica del virus y existen para poder completar el ciclo vital del virus (33). En la etapa no productiva episomal, las células basales del epitelio llegan a formar hasta 200 copias con gran amplificación del genoma. Posteriormente, se transcribirá el ARNm y se van a codificar las proteínas L1 y L2 de la cápside, cosa que se produce únicamente en las capas superficiales del epitelio, allí se pueden comenzar a ver con el microscopio electrónico las partículas virales. La infección persiste en las células basales porque ellas no sufren cambios, no hay coilocitosis, no hay lisis celular, no son productivas. Una de las características del cáncer cervical es la pérdida de la expresión de la proteína viral E2. Se cree que, en las células basales del epitelio neoplásico, ésta proteína, E2, pierde su expresión lo que conlleva a que se produzca una pequeña cantidad de E2-ORF, la cual, como producto de fusión, es capaz de represar la replicación del ADN y su expresión y por lo tanto mantendría el virus en fase latente en

las células basales (34,35). Las proteínas E1 y E2 se van a unir a secuencias específicas del ADN, de tal modo que E1 es la proteína iniciadora de la replicación, para lo cual las secuencias únicas de E1 en adenina-timina van a estar flanqueadas por dos o tres sitios de unión con la proteína E2, con alta afinidad para las secuencias de adenina-timina; E2 regula la transcripción y, como se dijo, es capaz de reprimir algunos promotores que controlan la expresión de los genes E6 y E7 y de esta manera es un regulador de la proliferación celular y de la capacidad de transformación de las células infectadas. La proteína E4 se expresa en estadios tardíos de la infección cuando se están ensamblando los viriones, en tanto que la proteína E5 en un marco de lectura abierta está demorada en las células neoplásicas y ella no es necesaria para mantener la transformación maligna de las células huésped (33). Es bien conocido que las proteínas E6 y E7 del VPH, son, sin duda alguna, las más importantes en sus propiedades oncogénicas. Ellas tienen la capacidad de inmortalizar y transformar las células del cuello uterino y por otra parte mantienen el ambiente celular para que el genoma viral pueda subsistir mientras no se encuentre incorporado en los cromosomas (36).

Algunas de las proteínas que pueden ser examinadas por inmunohistoquímica dependen de la acción de los oncogenes E6 y E7 del VPH. Con la técnica de hibridación *in situ* (HinS) y amplificando la señal para los virus de alto riesgo utilizando sondas con tiramida biotinilada, hoy día es posible detectar directamente en el epitelio cervical en casos de NIC o de CC, secuencias de ácidos nucleicos virales tan pequeñas como una sola copia, lo cual hace de esta técnica un valioso instrumento para la investigación sobre la infección y la carcinogénesis viral. La presencia de infección genital con el virus del papiloma humano (VPH) por HinS se ha estudiado utilizando sondas bio-

tiniladas de ADN específicas para VPH, de amplio espectro (WS) que comprende los virus tipo 6,11, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51 y 52; y de alto riesgo (AR) con los virus tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Igualmente y por separado hemos estudiado la presencia de VPH 16 y 18 en casos de NIC y de CC con VPH de AR y los resultados al utilizar esta metodología permiten una correlación entre los casos de NIC y CC que se estudian para detectar el VPH y las diversas proteínas cuya actualización sobre sus estudios con IHQ hemos discutido previamente (33, 37).

Las proteínas E6 y E7, las más importantes por sus propiedades oncogénicas, mantendrán el ambiente celular para que el genoma viral pueda permanecer extracromosómico. Hoy en día se reconoce en los genes E6 y E7 del VPH la capacidad para inmortalizar y transformar las células del cuello uterino. Los modelos de E6-p53 y de E7-Rb, han servido para demostrar como el VPH provoca los cambios preneoplásicos (38). El blanco de E6 es la proteína supresora de tumores conocida como p53, pues E6 promueve su degradación a través de la ubiquitina, de manera que las células que expresan E6 tienen bajos niveles de p53, lo cual favorece la acumulación de mutaciones en los cromosomas (34, 36). La mayoría de las alteraciones cromosómicas en el cáncer cervical, se han encontrado en los brazos de los cromosomas 3p, 4p, 5, 6, 11q y 17p; estos cambios conllevan un fenómeno que es crucial en el proceso de transformación maligna: la pérdida de la heterocigosis (LOH) (39-42).

Es un hecho comprobado que son las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo las que más se relacionan con p53 y con el gen del retinoblastoma (Rb), y éstas conducen al epitelio cervical hacia la hiperproliferación, inmortalización e inestabilidad genética, e igualmente, lo llevan a la malignización, fenómeno directamente aso-

ciado a los tipos de VPH de alto riesgo. E6 puede funcionar como factor de transcripción celular por la homología de su estructura con presencia de “dedos de zinc”, dominios éstos que pueden unirse al ADN para activar la transcripción. El proceso de apoptosis es interferido a través de p53 y de otros mecanismos en los que influye E6 para evitar la muerte celular programada. Esto se logra a través del bloqueo del ciclo celular por el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p21 y Bax, que es una proteína proapoptótica presente en los epitelios indiferenciados y que puede ser degradada por E6 a través de la ubiquitina (43). Ya hemos señalado que el sitio de replicación del VPH es el epitelio bien diferenciado y se considera que también influye E6 para evitar el proceso de diferenciación terminal del epitelio escamoso. Se ha demostrado que E6 del VPH-16 es capaz de interactuar con proteínas relacionadas con el calcio dentro del retículo endoplasmático. Algunas proteínas citoplasmáticas que poseen dominios PDZ se unen al extremo C-terminal de las proteínas de E6 de VPH de alto riesgo e interactúan con proteínas que se relacionan con el control de las uniones intercelulares y con la proliferación celular, por lo que se presume que influyen en los contactos intercelulares y en el control de la polaridad y la división celular. En cuanto a E7, su principal papel consiste en alterar el control del ciclo celular. Esta proteína es, principalmente, nuclear; su expresión está asociada al incremento de la síntesis del ADN celular y de la proliferación celular. De la interacción de E7 con las proteínas de la familia Rb se produce la inhibición del factor de transcripción E2F, por tanto, E7 forma un complejo con Rb y su degradación se promueve a través del sistema de ubiquitinización y por otra parte, además de degradar a Rb, otros inhibidores del ciclo celular como p21 y p27, son controlados por E7 (33, 44).

LOS GLICOLÍPIDOS DE LA CUBIERTA CELULAR EN EL CÁNCER DEL CÉRVIX

Las células de los mamíferos están revestidas por la cubierta celular o glicocalix, constituida por una densa capa de glicolípidos, glicoproteínas, proteoglicanos y glicofosfolípidos anclados en la membrana celular (45). Existen evidencias de que las células neoplásicas presentan alteraciones de la expresión de las glicoproteínas en la cubierta celular y de que estos cambios están relacionados con modificaciones en el ácido siálico de estos glicoconjugados. Se sabe que la transformación oncogénica, la invasión y las metástasis son fenómenos regidos por estos cambios en la membrana celular (46). La importancia de la expresión de α 2-6-sialyltransferasa (ST6Gal-1) como mediador del crecimiento tumoral provocando un cambio hacia la expresión de un fenotipo menos diferenciado por la vía del incremento de las funciones de las β 1-integrinas, se produce por un incremento del ácido siálico en α 2-6- en los N-glycanos resultantes de la sobreexpresión de las enzimas β -galactosidase y α 2-6-sialyltransferasa (ST6Gal-1) en el complejo de Golgi (47). La expresión del antígeno de Thomsen-Friedenreich (T-Ag) y del antígeno Tn (Tn-Ag), precursores de los antígenos de grupos sanguíneos se ha vinculado estrechamente con la invasión parametrial, las metástasis ganglionares y la sobrevida de 5 años en el cáncer del cérvix (38). Recientemente se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, que una pequeña proteína del tipo de las mucinas, la podoplanina, la cual es mediadora de una vía que conduce los fenómenos de invasión celular y que parece estar relacionada con la localización nuclear de β -catenina y la sobreexpresión de β 1-integrinas, así como las moléculas de adhesión celular L1 que se expresan, como la podoplanina (80% en cáncer del cervix) en las áreas limítrofes de la invasión tumoral, luego de la pérdida de expresión

de la E-cadherina, la expresión de podoplanina *in vitro* se sabe corre paralela a un incremento de la migración celular en la interfase epitelio-mesénquima (49, 50).

Diversos carbohidratos que pueden ser reconocidos por las lectinas, están presentes en la superficie de la membrana celular de los queratinocitos e intervienen en los procesos de diferenciación, crecimiento y reconocimiento celular. Existen numerosas evidencias histopatológicas de que las lectinas pueden ser de utilidad para demostrar las variaciones en la expresión de diferentes carbohidratos de la cubierta celular de los epitelios. Estos cambios pueden estar representados por pérdida de la expresión de antígenos de grupos sanguíneos en la superficie de las células epiteliales, y ellos se han relacionado con incremento de la agresividad, o como parte del proceso evolutivo de diferentes grados de cancerización en la vejiga urinaria (51) en el colon (52) y más recientemente en el cuello uterino (53). Los Gangliósidos, una variante de los glicoesfingolípidos ricos en ácido siálico que se encuentran presentes en la cara externa de la membrana plasmática de numerosos vertebrados, son capaces de inducir apoptosis por mecanismos aún no bien conocidos. La investigación con ciertas lectinas para detectar glicoproteínas en la cubierta celular de los queratinocitos neoplásicos en biopsias de lesiones neoplásicas del cuello uterino, ha demostrado modificaciones en el marcaje de las mismas que implican una estrecha relación entre la estructura de estos azúcares de la superficie de las células alteradas por el proceso neoplásico. Llama la atención igualmente, como el inmunomarcaje de la actividad de p16 pareciera ser simultáneo a la expresión de algunas lectinas en el cérvix. Específicamente la lectina *Viscum Album*, ha mostrado un inmunomarcaje inverso a p16, lo cual parece relacionar la expresión de esta proteína génica con las glicoproteínas de superficie de los querati-

nocitos desde las fases iniciales de la neoplasia intraepitelial cervical (Blasco Olaetxea E.; comunicación personal). Por otra parte, se sabe que la lectina *Viscum Album* (Mistletoe) (ML-1) modula la apoptosis a través de fenómenos de fosforilación y de su unión con N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) (54).

Las alteraciones inducidas por los VPH de alto riesgo, se pueden detectar como efectos tempranos en la cubierta celular glicoprotéica de los queratinocitos y se pueden medir por un incremento intracelular y extracelular en la adherencia a la fibronectina (55). Se ha descrito una disminución de la expresión de las integrinas $\alpha 5 \beta 1$ y $\alpha 2 \beta 1$ en la superficie de los queratinocitos y esto se ha relacionado con disminución de la adherencia a la fibronectina y al colágeno (56). Recientemente se ha descrito que el incremento de la expresión de $\alpha 2$ -6-ácido siálico unida a N-glicanos LewisX con Acido Siálico y en glicanos-O (típicos de las mucinas) se puede asociar a malignidad (45, 57, 58). Se sabe que la $\beta 1,4$ -galactosyltransferasa es una de las enzimas controladoras de la biosíntesis de oligosacáridos complejos y hay evidencias de que p16 puede controlar la expresión génica y la actividad de la $\beta 1,4$ GT, reduciendo la actividad de $\beta 1,4$ GT específicamente en la superficie de las células epiteliales (59). Estas enzimas de estructura glicosídica están sobreexpresadas en diversas neoplasias y se han relacionado con la progresión de los procesos de malignización celular (46, 47, 57). La demostración de que el gangliósido GT1b es capaz de promover la apoptosis e interrumpir el ciclo celular evidencia la importancia de la señalización de los glicolípidos de membrana en el cáncer del cérvix (60). Se han detectado niveles elevados de un anticuerpo anti-Gal en el suero de pacientes con tumores sólidos (61). Otro de los efectos de los genes E6 y E7 del VPH sobre la expresión de un gen que inmunomarca la superficie

de la membrana de los queratinocitos, es una reducción en la regulación de la E-cadherina de manera progresiva en la neoplasia intraepitelial cervical; esta alteración se produce por la vía de señalización Wnt con liberación de la beta catenina del complejo E-cadherina/catenina (62). La importancia de estos hallazgos y la aplicación de los mismos al realizar un estudio comparativo con diversas lectinas y con p16, es que relacionan la estructura de los azúcares en la superficie de la membrana celular con señales que son genéticamente controladas y cuya evaluación debe ser de utilidad en el estudio de la carcinogénesis del cuello uterino.

Estudios previos demostraron que los antígenos de grupos sanguíneos ABH se encontraban presentes en las células del epitelio cervical normal (63) y posteriormente en el útero neoplásico (64-66). Sin embargo, se ha señalado que la presencia de isoantígenos ABO en el epitelio exo y endocervical de mujeres "secretoras", no es detectable en las identificadas como no secretoras (67). Blasco-Olaetxea ha examinado el rol de los oligosacáridos en diversas neoplasias y recientemente (53) hemos demostrado como en lesiones premalignas (NIC I y NIC II) hay pérdida parcial de la expresión antigénica de ABH, mientras que en NIC III y en carcinoma epidermoide infiltrante del cuello uterino, la pérdida de la expresión de estos antígenos de grupos sanguíneos en pacientes "secretoras" es total.

Hemos señalado que la infección de la mucosa del cuello uterino por VPH de alto riesgo, de tipo 16 y 18 lleva a una desregulación del ciclo celular con alteración de varios genes: p27^{KIP1}, ciclina E, CDK4, p16^{INK4A} y Rb se alteran tempranamente, en tanto que la Ciclina D1, MDM-2, p53 y p21^{waf} son aberraciones que ocurren tardíamente en la carcinogénesis (21, 33, 37). Todas estas alteraciones de genes conducen a que exista una aceleración del ciclo celular con incremento de la proliferación,

como se indica inmunohistoquímicamente por el incremento Ki67 y de p16. (37, 68). De estos resultados se puede deducir que resulta de utilidad aplicar estudios de inmunohistoquímica con p16 (INK4a) en el diagnóstico temprano de alteraciones asociadas a la carcinogénesis cervical. p16 (INK4a) es una proteína codificada por el gen supresor CDKN2 (*MST1*, *INK4a*) ubicado en el cromosoma 9p21, la cual resulta ser inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas, cdk4 y cdk6, que intervienen en la regulación de la fase G1 del ciclo celular. La expresión de esta proteína en células normales se expresa a niveles muy bajos, no siendo detectable mediante inmunohistoquímica, pero se encuentra sobrepresada en las lesiones intraepiteliales del cérvix uterino relacionadas con la infección con VPH de alto riesgo. La inactivación de la proteína del gen pRb es usualmente recíproca con la expresión de p16 (INK4a) en el carcinoma epidermoide (69, 70). Estudios previos por inmunohistoquímica han demostrado no obstante, que ambas pRb y p16 (INK4a) se co-expresan en las formas pre neoplásicas y neoplásicas del carcinoma cervical, a diferencia de lo observado en otros órganos (71).

Es evidente que la expresión inmunohistoquímica de p16 (INK4a) en la neoplasia intraepitelial cervical se manifiesta de manera difusa o en todo el espesor del epitelio, desde los niveles de NIC1 hasta NIC2 y NIC3 y parece ser un marcador de infección persistente con VPH de alto riesgo (72). En la cascada reguladora del ciclo celular que incluye p16/ciclinaD1/pRb, existe una estrecha relación entre pRb y p16 (INK4a). La actividad supresora de p16 (INK4a) se le atribuye a su capacidad bioquímica para unirse a cdk4-6 e inhibir la actividad catalítica del complejo enzimático cdk4-6/ciclina D, el cual es requerido para la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) y para que progrese el ciclo

celular (73). El incremento en los niveles de p16 conducen a la formación de complejos inhibidores cdk4-6/p16 y la pérdida de los complejos estimuladores cdk4-6/ciclina D y como una consecuencia de esta situación, la ubiquitina degradará la ciclina D libre por una vía proteosómica (74). Secuencialmente, ambas cdk4 y 6, que tienen relativamente una larga vida si se comparan con la ciclina D, concluirán con pérdida de la ciclina D y acumulación de p27KIP1 con inhibición completa de ambas cdk2/ciclinaE y cdk2/ ciclina A dependientes de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb). Las alteraciones de p16 como gen supresor de tumores, también se han relacionado con una posible función promotora de la metilación y se conocen bien los cambios en su expresión temprana en el epitelio cervical neoplásico (75). Se han descrito como biomarcadores confiables para demostrar las etapas iniciales de la neoplasia intraepitelial cervical a Ki67, p16 y la ciclina E. (76). Más recientemente (77) la interpretación de los resultados con la tinción de p16^{INK4a} se ha considerado excelente ($\kappa = 0.899$) y debe ayudar significativamente a la interpretación de los estudios histopatológicos de rutina sobre el cáncer cervical.

Los resultados de investigaciones sobre la etiopatogenia del cáncer del cuello uterino y la infección con el VPH aquí presentados, complementan la información pertinente ya publicada en estudios previos sobre la ultraestructura del cérvix humano, del VPH y del cáncer cervical, originalmente iniciados en Maracaibo, Venezuela, en la década de los años 70 y 80 del pasado siglo XX (1, 2, 6, 7, 10). En estudios posteriores examinamos la detección ultraestructural del VPH y algunos avances en Biología Molecular, trabajos estos realizados en el Instituto Anatomopatológico de la Universidad Central de Venezuela entre 1976 y el año 1997 (11-13). Con el apoyo del Instituto

Canario de Investigación sobre el Cáncer, algunas investigaciones ulteriores se han llevado adelante en el Laboratorio de Patología Molecular de Maracaibo y algunos de sus resultados han sido comentados a través de actualizaciones recientes (21, 33, 37, 53).

El objetivo de este trabajo de revisión es señalar nuevamente que el cáncer del cuello uterino sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres venezolanas. La investigación sobre este flagelo social requiere de una especial atención por parte de las instituciones encargadas de darle apoyo a la investigación científica y en particular a los programas de ayuda social y de organización sanitaria que conduzcan a resolver este grave problema de salud pública.

REFERENCIAS

1. **Luzardo-Batista M, García-Tamayo J, Nuñez-Montiel JT.** Anatomía submicroscópica del exocervix humano normal. *Invest Clin* 1969; 30:25-56.
2. **Luzardo-Batista M, García-Tamayo J, Nuñez-Montiel JT.** Ultraestructura de la membrana basal y células basales del exocervix humano normal. *Rev Ven Obstet Ginecol* 1970; 30:13-25.
3. **García-Tamayo J, Nuñez Montiel JT, de García HP.** Tricomoniasis vaginal humana. Estudio ultraestructural e histoquímica. *Invest Clin* 1972; 13:2-14.
4. **García-Tamayo J, Nuñez-Montiel JT, de García HP.** An electrón microscopio investigation of human vaginal trichomoniasis. *Acta Cytol* 1978; 22:447-455.
5. **Arias-Stella J.** Patología en un país en desarrollo. Experiencia de una vida, *Patología (Mex)* 1993; 31:1-5
6. **García-Tamayo J, Nuñez Montiel JT.** Identificación de partículas virales en el exudado vaginal de pacientes con papilomas y condilomas genitales. (Resumen). *Patología (Mex)* 1973; Supl 1-11:81.
7. **Núñez-Montiel T, García-Tamayo J.** Colposcopia, histopatología y ultraestructura de papilomas y condilomas genitales. (Resumen). *Patología (Mex)* 1973; Supl 1-11:86.
8. **Meisels A, Fortín R.** Condylomatous lesions of the cervix and vagina. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976; 20:505-509.
9. **Puroloa E, Savia E.** Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977; 21:26-31.
10. **García-Tamayo J, Núñez-Montiel JT.** Investigación con el microscopio electrónico sobre la papilomatosis cérvico-vaginal. *Acta Méd Venezol* 1978; 25(3-4):132-138.
11. **Rincón-Morales F, García-Tamayo J.** Infección por virus papiloma humano de la vulva. Aspectos clínicos, histológicos y ultraestructurales. *Rev Ven Obst y Ginecol* 1983; 43:203-215.
12. **García-Tamayo J.** Infección con el virus del papiloma humano y cáncer del cuello uterino. *Rev Fund José María Vargas.* 1984; 30:177-187.
13. **Borges de R, García-Tamayo J, Zaitman M.** Cytologic and ultrastructural findings of a peculiar alteration of cervical cells in patients with HPV infection. *Acta Cytol (USA)* 1989; 33:314-318.
14. **Zur-Hausen H.** Virus in human cancers. *Science* 1991; 254:1167-1172.
15. **Zur-Hausen H.** Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111:581-587.
16. **Esteves J, Croes-Arends L.** Correlación cito-histológica de los cambios producidos por el virus del papiloma humano (VPH) y su asociación con neoplasias intraepiteliales del cuello uterino (NIC). *Rev Venez Oncol* 1994; 6:82-86.
17. **Correnti M, Uribe M, Cavazza ME, Bajarres M, Bello J, Cerruti R, Acosta H, Salma N, Herrera O, Suárez NR.** Detección de virus papiloma humano (VPH) mediante biología molecular y su asociación con neoplasia cervical uterina. *Rev Venez Oncol* 1997; 9:76-83.
18. **Correnti M, Cavazza ME, Beherenis A, Lozada C.** La infección con el virus del papiloma humano. Un problema de salud pública en Venezuela. Octubre-Diciembre 2002 <http://caibco.uev.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeTrece/Articulos/Infectologia/HTML/DISCUS.HTM>.

19. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-527.
20. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-19.
21. Molina J, Guzmán-Biston C, Méndez V, Blasco-Olaetxea E, García Tamayo J. Alteraciones cromosómicas en el cáncer del cuello uterino. En *Vitae-Academia Biomédica Digital* Octubre-diciembre 2005. <http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeVeinticinco/>.
22. Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Dürst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 1993; 67: 6929-6936.
23. Duensing S, Münger K. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene* 2002; 21:6241-6248.
24. Duensing S, Münger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 2002; 62: 7075-7082.
25. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003; 307:1-11.
26. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999; 274:5810-5822.
27. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001; 75: 1565-1570.
28. Seidah NG, Mayer G, Zaid A. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:1111-1125.
29. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med* 2007; 85:685-696.
30. Zhang X, Fugere M, Day R, Kielian M. Furin processing and proteolytic activation of Semliki Forest virus. *J Virol* 2003; 77:2981-2989.
31. Zybert IA, Van Der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J Gen Virol* 2008; 89:3047-3051.
32. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, Lowy DR, Schiller JT. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med* 2007; 13:857-861.
33. García-Tamayo J. Actualización sobre la historia del virus del papiloma humano en Venezuela y su relación con el cáncer cervical. En *Vitae-Academia Biomédica Digital* Mayo-Agosto, 2006. <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=7&n=228>
34. Thierry F, Benotmane MA, Demeret C, Mori M, Teissier S, Desaintes O. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; 64:895-903.
35. Stubenrauch F, Zoble T, Iftner T. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* 2001; 75: 4139-4149.
36. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20:7874-7887.
37. García-Tamayo J, Molina J, Blasco-Olaetxea E. Importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. *Invest Clin* 2009; 50(2):241-250.
38. Howley PM, Scheffner M, Munger K. Oncoproteins encoded by the cancer-associated papillomavirus target the products of retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes. *Quant Biol* 1991; 56:159-155.

39. **Mitra AB, Murthy VS, Li RG, Pratap M, Luthar UK, Chaganti RSK.** Allelotype análisis of cervical carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54:4481-4487.
40. **Mullokkandov MR, Kholodilov NG, Atkin NB, Burk RD, Johnson AB, Klinger HP.** Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosomes heterozygosity and human papillomavirus tumor status. *Cancer Res* 1996; 56:197-205.
41. **Kisseljov F, Semionova L, Samoylova E, Mazurenko N, Komissarova E, Zourbitskaya V, Gritzko T, Kozachenko V, Netchushkin M, Petrov S, Smirnov A, Alonso A.** Instability of chromosome 6 microsatellite repeats in human cervical tumors carrying papillomavirus sequences. *Int J Cancer* 1996; 69:448-487.
42. **Hapmton GM, Larson AA, Baergen RN, Sommers RL, Kern S, Cavenee WK.** Simultaneous assessments of loss of heterozygosity at multiple microsatellite loci using semiautomated fluorescent-based detection; subregional mapping of chromosomes 4 in cervical carcinoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 1966; 93:6704-6709.
43. **Nakagawas S, Huibregtse M.** Human Scribble (vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 2000; 20:8244-8256.
44. **Jones DL, Thompson A, Munger K.** Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16E7-induced apoptosis. *Virology* 1997; 239:97-107.
45. **Varki NM, Varki A.** Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* 2007; 87:851-857.
46. **Chen CL, Lee WL, Tsai YC, Yuan CC, Ng HT, Wang PH.** Sialyltransferase family members and cervix squamous cell carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002; 23: 514-518.
47. **Hedlund M, Ng E, Varki A, Varki NM.** α 2-6-Linked Sialic Acids on N-Glycans Modulate Carcinoma Differentiation In vivo. *Cancer Res* 2008; 68:388-394.
48. **Hirao T, Sakamoto Y, Kamada M, Hamada SI, Aono T.** Tn antigen, a marker of potential for metastasis of uterine cervix cancer cells. *Cancer* 1993; 72:154-159.
49. **Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G.** Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 2006; 9:261-272.
50. **Martin-Villar E, Megias D, Castel S, Yurrita MM, Vilaro S, Quintanilla M.** Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2006; 119: 4541-4553.
51. **Blasco-Olaetxea E, Torrado J, Belloso L, Arozena F, Gutierrez-Hoyos A, Cuadrado E.** T Antigen: A prognostic indicator of high recurrence index in transitional carcinoma of Bladder. *Cancer* 1988; 61:1091-1095.
52. **Blasco-Olaetxea E, Torrado J, Cosme A, Gutierrez-Hoyos A, Alvarez E, Zugasti A, Arenas JI.** Lewis determinants expression in colorectal adenocarcinomas. *Exp Cell Biol* 1989; 57:153-158.
53. **Guzman C, Pinillos B, Blanco-Arias MC, Arenas A, Molina J, Garcia-Tamayo J, Blasco-Olaetxea E.** Expression of blood group-related antigens in neoplastic uterine cervix. *Clin Transl Oncol* 2008; 10:227-230.
54. **Khawaja TA, Wajahat T, Ahmad I, Hoessli DC, Walker-Nasir E, Kaleem A, Wajahat M, Qazi WM, Shakoorn AR, Din NU.** In silico modulation of apoptotic Bel-2 proteins by mistletoe lectin-1: Functional consequences of protein modifications. *J Cell Biochem* 2008; 103:479-491.
55. **Hodivala KJ, Pei XF, Liu QY, Jones PH, Rytina ER, Gilbert C, Singer A, Watt FM.** Integrin expression and function in HPV 16-immortalised human keratinocytes in the presence or absence of v-Ha-ras. Comparison with cervical intraepithelial neoplasia. *Oncogene* 1994; 9:943-948.
56. **McCormack SJ, Brazinski SE, Moore JL Jr, Werness BA, Goldstein DJ.** Activation of the focal adhesion kinase signal transduction pathway in cervical carci-

- noma cell lines and human genital epithelial cells immortalized with human papillomavirus type 18. *Oncogene* 1997; 15:265-274.
57. **Dall'Olio F, Chiricolo M.** Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J* 2001; 18:841-850.
58. **Dall'Olio F, Malagolini M, Chiricolo M.** β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase and the Sialyl α 2,6-Galactosyl-linkage in tissues and cell lines. *Methods in Molecular Biology* 2007; 347:157-170.
59. **Song W, Zhang SW, Fu XY, Cao SL, Shen ZH, Gu JX.** Down-regulation of β 1,4-galactosyltransferase gene expression by cell-cycle suppressor gene p16. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1444:49-54.
60. **Wang XQ, Sun P, Paller A.** Inhibition of integrin-linked kinase/protein kinase b/akt signaling. Mechanism for ganglioside-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276; 44504-44511.
61. **Hernández D.** Anticuerpo contra el epítipo galactosil (α 1-3) galactosa (antígal). Utilidad de los niveles séricos en cáncer. *Rev Venez Oncol* 2007; 19:118-128.
62. **Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Mariani L, Syrjänen S, Favalli C, Syrjänen K.** Down-regulation of E-cadherin is closely associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but not with high-risk human papillomavirus (HPV) or disease outcome in cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006; 27(3): 215-223.
63. **Torrado J, Gutierrez-Hoyos A, Blasco-Olaetxea E, Larraz J.** Immunohistological patterns of blood group ABO and type 1 chain (Lewis a Lewis b) and type 2 chain (H-2 Y) antigens in normal uterine cervix. *Tissue Antigens* 1990; 38:8-11.
64. **Bara J, Mollicone R, Le Pendu J, Oriol R.** Evidence of an antigen common to human intestine, endocervix and mucinous ovarian cysts present exclusively in Ale[b] patients. *Bull Cancer* 1985; 72: 104-107.
65. **Inoue M, Sasagawa T, Saito J.** Expresión of blood group antigens ABH, Lewis a and Lewis b in fetal, normal and malignant tissues of the uterine endometrium. *Cancer* 1986; 60: 2985-2993.
66. **Sakamoto Y, Kamada M, Kishi Y, Mori T.** A clinicopathologic implications of ABO (H) blood group substances in the primary lesion of the uterine cervical carcinoma. *Acta Obstet Gynecol* 1985; 37: 2090-2096.
67. **Alexander CW, Soong SJ, Shingleton HM, Gore H, Wilkerson JA, Hatch KD, Phillips D, Dollar JR.** Immunohistochemistry of the blood group ABH isoantigens and Oxford Ca antigen as prognostic markers for stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 1986; 58: 2435-2096.
68. **Bahnassy AA, Zekri ARN, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O.** The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clin Pathol* 2007; 7:4.
69. **Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan YH, Clayman G, Ro JY, HittelmanWN, Lotan R, Hong WK, Mao L.** Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997; 14: 1799-1803.
70. **Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D.** High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56:3630-3633.
71. **Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T.** Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int* 1998; 48:580-585.
72. **Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson M.** Human papillomavirus genotyping and p16(INK4a) expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol* 2005; 18:267-273.
73. **Rocco JW, Sidransky D.** p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. *Exp Cell Res* 2001; 264:42-55.
74. **Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ.** Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the

- ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997; 11:957-972.
75. **Alameda F, Baro T, Mariñosos ML, Manresa JM, Costa C, Espinet B, Fuste P, Mancebo G, Carreras R, Sole F, Serrano S.** Carcinoma epidermoide invasor del cérvix uterino. Estudio de la expresión de p53, BCL-2, Ki 67, C-MYC y ciclina D1. *Patología (Mex)* 2006; 44:87-96.
76. **Keating JT, Aida Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Bradley J, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP.** Ki-67, Cyclin E and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg. Pathol* 2001; 25:884-891.
77. **Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R.** Conjunctive p16^{INK4a} Testing Significantly Increases Accuracy in Diagnosing High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2010; 133(3):395-406.