

Importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. Revisión.

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: Inmunohistoquímica, neoplasia intraepitelial cervical, cáncer cervical, VPH, alteraciones genéticas.

Resumen: Se evaluó la expresión de proteínas dependientes de genes en el epitelio cervical, en la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y en el carcinoma del cuello uterino (CC) a través de diversos estudios de inmunohistoquímica (IHQ). Se examinó la detección de ciertas proteínas como p53, bcl2, C-Myc, Ki 67, Ciclinas, P16 INK4a, p21, p27, β -catenina, Wnt y MCM, en relación con la evolución de la neoplasia intraepitelial, el carcinoma cervical y la infección con el virus del papiloma humano (VPH). Se señaló como la actividad transcripcional de diversos genes provoca alteraciones de la heterocigosis y pérdida de regiones cromosómicas que influyen en la sobreexpresión de proteínas o en la pérdida parcial de la expresión de algunas glicoproteínas en la superficie celular por la activación de genes del VPH.

Importance of immunohistochemical studies in the diagnosis and the prognostic evaluation of cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Review.

Invest Clin 2009; 50(2): 241 - 250

Key words: Immunohistochemistry, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, HPV, genetic alterations.

Abstract. Immunohistochemical studies in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma are evaluated in this review. A variety of proteins like p53, bcl2, C-Myc, Ki 67, Cyclines, P16 INK4a, p21, p27, β -catenin, Wnt and MCM, have been related to the development of cervical

neoplasia and human papilloma virus infection. It is described how transcriptional factors of genes induce loss of heterozygosity, numerical chromosome abnormality and inactivation of gene products or the partial loss of some membrane glycoproteins induced by oncogenic human papillomaviruses (HPV).

Recibido: 24-01-2008. Aceptado: 10-07-2008.

INTRODUCCIÓN

Las displasias del cérvix, conocidas desde hace años, como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y el carcinoma infiltrante del cuello uterino (CC), están relacionados con el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (1, 2). El VPH interfiere en el ciclo celular lo que provocará cambios en oncogenes, y terminará produciendo pérdida de la heterocigosis, así como pérdida de regiones cromosómicas específicas. Estas evidencias, parecieran señalar el probable papel de algunos genes supresores de tumores en la génesis del CC (3-5).

La expresión de diversas proteínas dependientes de genes en el epitelio cervical, puede ser evaluada a través de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Mediante esta técnica, se han examinado proteínas como p53, bcl2, C-Myc, Ki 67, Ciclinas, P16 INK4a, p21, p27, β -catenina y MCM en NIC y en CC. Algunos resultados de estas investigaciones han creado expectativas entre quienes aspiran lograr evidencias para precisar el pronóstico de NIC y del CC y su relación con el VPH. En este trabajo, se revisó y se evaluó el estado actual de estos estudios inmunohistoquímicos.

p53

La proteína oncosupresora p53 se sabe que funciona como guardián de la integridad del genoma de la célula huésped y está encargada de que el ciclo celular prograse tras comprobar que el genoma está intacto.

La proteína p53 es producto del gen *P53* y ante cualquier daño del ADN, se expresará como consecuencia del freno del ciclo celular a través de p21, un inhibidor del ciclo que provoca fallas en los mecanismos de proliferación celular y en la apoptosis. La muerte celular programada en la infección por VPH, es interferida a través de p53 por el oncogen E6 por el bloqueo del ciclo celular inducido por el inhibidor de la cinasa dependiente de la ciclina p21 y por Bax. Bax es una proteína proapoptótica presente en los epitelios indiferenciados que también puede ser degradada por E6 a través de la ubiquitina (6). Se sabe que p53 es inactivada por la oncoproteína supresora del VPH E6, la cual se une a la proteína p53, y promueve su degradación, por lo que su función se altera durante la infección con VPH de alto riesgo, sin que se produzca una verdadera mutación del gen (7-9). La proteína p53 no se expresa en el epitelio cervical normal. No siempre se observa inmunomarcaje para la proteína p53 en CC, y la experiencia nuestra en este sentido, ha sido similar a la de otros investigadores (10); sin embargo algunos consideran que la presencia de p53 se incrementa con los grados de NIC y con la malignidad, por lo que han planteado que esta proteína debería detectarse en el CC (11-13). Según otros investigadores, a pesar de que la infección con VPH de alto riesgo es la responsable de la sobreexpresión de p53, la expresión de esta proteína no puede considerarse como un factor de valor pronóstico (14), y finalmente, para otros, no pareciera existir ninguna relación directa

entre la positividad para VPH y el inmunomarcaje para p53 (10, 15, 16).

Bcl 2

La expresión de bcl 2 en el cuello uterino normal, es escasa, sin embargo se ha descrito un incremento de la misma en NIC y en carcinomas (17), por lo que se ha sugerido que la expresión de bcl 2 y de p53 está relacionada con la infección con VPH de alto riesgo (15). Sin embargo, en el estudio del CC y de su relación con p53 y bcl2 algunos investigadores presentan resultados contrapuestos que solo pueden ser significativos si se examinan desde un punto de vista estadístico (18), no obstante según otros, con estos anticuerpos no es posible predecir su evolución y menos aún las probables metástasis (19).

C-Myc

Las proteínas C-Myc y Ki 67 aumentan su expresión con la proliferación celular presente en NIC y en CC, pero sus resultados no pueden considerarse como de valor pronóstico (20). Existen escasos estudios sobre C-Myc y el CC, por lo que hasta ahora pareciera no existir una relación aparente entre C-Myc y VPH 16-18 (11, 20).

CICLINAS

Las ciclinas son moduladores del ciclo celular, algunas están relacionadas con el gen del retinoblastoma (*RB*) y actúan inactivando la pRb. La oncoproteína E7 del VPH interacciona con el gen *RB* que controla los factores de crecimiento que mueven el ciclo celular y de esta manera inhibe su función reguladora. Las ciclinas son metabolizadas por la ubiquitina en el núcleo y pasan al citoplasma celular durante la fase de síntesis para ser destruidas. En el CC la ciclina D1 se expresó en el citoplasma y en casos

de NIC se detectó en el núcleo y en el citoplasma (10). Algunos trabajos señalan la importancia de la ciclina-E en diversas neoplasias (21), ésta se ha detectado en cáncer de mama (22) y en CC (23-25). Se ha descrito también sobreexpresión de ciclina-A en NIC y en CC (26). La identificación de la ciclina D1 resulta útil en otras neoplasias pero su importancia no parece ser relevante en el CC (27).

Ki 67

La expresión de la Ciclina D1 es comparable a la de Ki67. Debe examinarse en detalle la posible relación entre C-Myc y Ciclina D1 pues es interesante observar que como ocurre con Ki67, tanto C-Myc como la Ciclina D1 se asocian con una mayor proliferación celular como se observa en el CC activado por VPH de alto riesgo (28).

β -catenina

La Ciclina D1 y la C-Myc son dianas de la vía WNT/APC/ β -catenina Como resultado de la activación de la vía WNT, se produce acumulación de β -catenina en el citosol del queratinocito, lo cual provoca la translocación de β -catenina al núcleo donde va a interactuar con factores de transcripción implicados en la diferenciación celular a través de su grupo amino terminal con la β -catenina para activar la transcripción de genes, como C-Myc y Ciclina D1, los cuales definitivamente parecieran estar involucrados en los procesos de proliferación y diferenciación celular presentes en el CC (29).

P16 INK4a

La p16 INK4a es un inhibidor de la ciclina dependiente de kinasa 4 y se sabe es expresado tanto en NIC como en el CC (30, 31). No parecen producirse alteraciones genéticas en el gen *P16* en casos de CC (32).

La actividad de p16 en células normales se produce a través de una inhibición de su proliferación. La p16INK4a es un indicador específico para NIC, especialmente en lesiones de alto grado y se destaca el hecho de que éste es más específico que Ki67 (32, 33). La expresión de p27 y de p21 ha sido comparada con p16 en NIC, sin que puedan hallarse diferencias significativas (34); no obstante, al examinar el rol de la Ciclina D1 en el CC, se señala su importancia de valor pronóstico en la expresión de la proteína p16 (35). En un estudio reciente, cuando se examinaron casos de CC utilizando tecnología de micromatrices para estudio de genes, se ha detectado la pérdida de expresión de p16 en casos que mostraron menor supervivencia, sin estar ella relacionada con la profundidad de la invasión ni con las metástasis ganglionares (36). Debe enfatizarse que la proteína p16, es un elemento de la vía p16_ciclinaD-cdk4/6/RB (37). En el estudio inmunohistoquímico de 212 pacientes con CC estudiados para p16, p21 y p27, se demostró que, si bien con p16 existen resultados esperanzadores, en general estas proteínas no pueden considerarse directamente como factores de valor pronóstico para el CC (34).

p27

El ciclo celular está controlado por complejos proteicos compuestos por ciclinas y ciclinas-dependientes de kinasas (cdk) que se dividen en dos familias estructuralmente relacionadas; la familia Cip/kip (p21, p27 y p57) en la cual estas proteínas funcionan como inhibidores preferentemente de cdk2 (complejos de ciclina A/E-cdk2), y la familia INK4 (p15, p16, p18 y p19), que inhibe los complejos que contienen Ciclina D (cyclin D-cdk4/6). La p27 tiene una función reguladora que responde a señales extracelulares, además de sus conocidas funciones en la diferenciación celular y en la apoptosis (38). El oncogen E7 del VPH-16

puede unirse a la p27 sin degradarla, y su inactivación no está relacionada con su transformación oncogénica (39). Se ha descrito aumento de la expresión de p27 en el epitelio normal de cuello uterino, (40) lo cual contrasta con la expresión aumentada de p27 en NIC y en el CC (41-43). En base a estos hallazgos, se puede concluir que p27 no tiene valor como indicador pronóstico en el CC (34).

p21

Es bien sabido que la proteína p21 puede considerarse como la ejecutora de p53, considerando que el gen de p21 está bajo el control transcripcional de p53 (44). La expresión de p21 que está disminuida o ausente en células en reposo, se puede involucrar en el control de la actividad de cdk en células proliferantes, además de su función de respuesta al daño del ADN deteniendo el ciclo celular y participando en su reparación o llevando a la célula a la muerte celular programada. La expresión de p21 desaparece al inactivarse la proteína por acción del oncogen E7 del VPH-16 y aunque pudiera sobreexpresarse por efecto de alguna mutación, su actividad no influye en el control del ciclo celular, ni tiene valor pronóstico en el CC (43). También previamente se había señalado que la disminución en el inmunomarcaje de p21, podría ser un indicador de mal pronóstico (45). Igualmente, el oncogen E7 del VPH-16 se puede unir a la p21 inactivada sin degradarla, lo que induce una exagerada actividad de cdk2 a pesar de que existan altos niveles de p21 (46).

Wnt

Las proteínas Wnt constituyen una familia de factores de crecimiento que controla la proliferación, la migración arquitectural y la organogénesis durante el desarrollo embriológico (47). Hallazgos recientes

han demostrado que las proteínas Wnt tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer a través de sus receptores y de una vía que se caracteriza por la acumulación de β -catenina en el citoplasma y en el núcleo. Los niveles de β -catenina en el citoplasma son controlados por la fosforilación que induce su unión con la ubiquitina y su ulterior degradación (48). En ausencia de Wnt, de glicógeno sintasa kinasa-3h (GSK-3h) se activa y fosforiliza la β -catenina degradándola. La activación de la vía de Wnt inhibe la acción de GSK-3h y provoca el exceso de β -catenina citoplasmática. El exceso de β -catenina va al núcleo para formar un complejo transcripcional con el Factor de células T (TCF) el cual se sabe activa la transcripción de genes como C-Myc y la ciclina D1 (49). Una fosfatasa PP2A está también involucrada en la degradación del complejo β -catenina inhibiendo la señalización de Wnt a través de APC y de la axina (50). Se ha descrito un modelo experimental de queratinocitos cultivados en los cuales la transformación que el VPH ejerce sobre ellos, requiere de un segundo golpe y este está representado por la adopción de la vía Wnt y más allá, ésta podría ser uno de los mecanismos para la activación de la transformación maligna del epitelio del cuello uterino. La identificación por IHQ de β -catenina podría tener un interés particular, sobretodo en la exploración de esta vía en NIC y CC (51).

MCM

El análisis de los resultados de estudios realizados en los ratones transgénicos K14E6 y K14E7 que expresaban los oncogenes E6 y E7 y en los que existía hiperplasia epitelial y tumores espontáneos en la piel, demostró como al ser éstos tratados con estrógenos, los roedores desarrollaron cáncer cervical (52). En estudios previos con ratones transgénicos y VPH-16 se había demos-

trado como el oncogén E7 inactivando la pRb afectaba la expresión de la proteínas p107 y p130, y como también al activar la familia de los factores de transcripción E2F, inducía una respuesta génica con presencia de una proteína que fue denominada "proteína minicromosómica de mantenimiento7" (MCM7). Esta proteína representa un componente de la ADN helicasa inducido por el gen *E2F* (53). La expresión de MCM7 se producía en el curso de la enfermedad neoplásica en estos ratones transgénicos en quienes la tinción por IHQ estaba limitada a las células parabasales y basales en el epitelio normal e hiperplásico, pero que ocupaba todas las capas epiteliales en la displasia y el cáncer cervical. Ese trabajo demostró en un enfoque experimental, en ratones, que es importante indagar sobre la búsqueda de proteínas biomarcadoras que reaccionen como p16 en los casos de NIC y CC (52). Estos estudios en ratones también demostraron cierto paralelismo entre los resultados con Ki67 y la Ciclina E y los observados en casos de cáncer del cérvix humano (32, 54, 55) como ya hemos comentado previamente. Otros modelos de proteínas MCM (MCM2 y MCM5) han sido utilizados como factores de valor pronóstico en el cáncer cervical, 56) y en realidad se sabe que casi todos los genes *MCM* pueden inducir los factores de transcripción E2F (57). La inestabilidad genómica inducida por los oncogenes virales E6 y E7 potencialmente conducen a la aparición de anomalías centrosómicas (58), ambos factores, la inestabilidad genómica y las anomalías centrosómicas se han observado en el modelo experimental de los ratones transgénicos. Todos estos cambios genómicos, son los responsables de la expresión anormal de MCM7.

EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Las proteínas E6 y E7 del VPH, son importantes por sus propiedades oncogénicas

ya que tienen la capacidad de inmortalizar y transformar las células del cuello uterino y por otra parte mantendrán el ambiente celular para que el genoma viral pueda subsistir mientras no se encuentre incorporado en los cromosomas (4). Algunas de las proteínas que pueden ser examinadas por IHQ dependen de la acción de los oncogenes E6 y E7 del VPH. Con la hibridación in situ (HinS) y amplificando la señal para los virus de alto riesgo con 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. Hemos examinado la presencia de infección genital con el virus del papiloma humano (VPH) por HinS utilizando sondas biotiniladas 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(6). 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 (4, 6).

LOS ANTÍGENOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS

Las células epiteliales y las secreciones de casi un 80% de las personas tienen ciertos oligosacáridos que se identifican como antígenos de grupos sanguíneos; antígenos estos que se pueden detectar en los epitelios normales y neoplásicos y en sus secreciones, en individuos que por ello se deno-

minan “secretoras” (59-61). En estudios previos se demostró que los antígenos de grupos sanguíneos ABH se encontraban presentes en las células del epitelio cervical normal (62) y posteriormente se demostraron en el útero neoplásico (63-65), sin embargo se ha señalado que la presencia de isoantígenos ABO en el epitelio exo y endocervical de mujeres “secretoras”, no se detecta en las identificadas como no secretoras (66). Desde hace casi veinte años, E Blasco-Olaetxea ha venido examinando el papel de estos oligosacáridos en las neoplasias y en estudios recientes (67) demostramos como en las lesiones premalignas denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC I y NIC II) hay pérdida parcial de la expresión antigénica de ABH, mientras que en NIC III y en el carcinoma epidermoide infiltrante del cuello uterino, la pérdida de la expresión de estos antígenos de grupos sanguíneos en pacientes “secretoras” es total. 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.

Los resultados de investigaciones sobre la inmunohistoquímica del cuello uterino y la infección con el VPH aquí presentados, complementan la información pertinente ya publicada en estudios previos sobre la ultraestructura del cervix 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 (68-71). Estudios sobre detección del VPH por hibridación in situ y avances en Biología Molecular realizados en el Laboratorio de Patología Molecular de Maracaibo han sido comentados a través de actualizaciones recientes ya mencionadas (4, 6).

REFERENCIAS

1. 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.
2. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. International Agency for Research on Cancer Multi-center Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-527.
3. Zur Hausen H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:342-350.
4. Molina J, Guzmán Bistoni C, Méndez V, Blasco-Olaetxea E, García Tamayo J. 2005. Alteraciones cromosómicas en el cáncer del cuello uterino. En *Vitae-Academia Biomédica Digital Octubre-Diciembre 2005*. <http://caibco.ucev.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeVeinticinco/>.
5. Karsemaekers AM, van de Vijver MJ, Kenter GG, Fleuren GJ. Genetic alterations during the progression of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Genes Chrom Cancer* 1999; 26:346-354.
6. 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.ucev.ve/?module=articulo&rv=7&n=228>
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 papilloma virus status. *Br J Cancer* 1994; 69:732-737.
8. Uchiyama M, Iwasaka T, Matsuo N, Hashisuga T, Mori M, Sugimori H. Correlation between HPV and P53 gene overexpression in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncology* 1997; 65:23-29.
9. Mittal KR, Lin O, Chan W, Goswami S, Demopoulus RI. Cervical squamous cell dysplasias and carcinomas with immunodetectable p53 frequently contain HPV. *Gynecol Oncol* 1995, 58:289-294.
10. 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.
11. Ngán HY, Tsao SW, Stanley M. Abnormal expression and mutation of p53 in cervical cancer. A study at protein and DNA levels. *Genitourin Med* 1997; 73:54-58.
12. Horn L,C, Fisher U, Hänel U, Kuhn H, Raptis G, Bilek K. P53 in surgically treated and pathologically staged cervical cancer: correlation with local tumor progression, but not with lymphatic spread. *Pathol Res Pract* 2001; 197, 605-609.
13. Oka K, Susuki Y, Nakano T. Expression of p27 and p53 in cervical squamous cell carcinoma patients treated with radiotherapy alone: radiotherapeutic effect and prognosis. *Cancer* 2000; 88:2766-2773.
14. Hunt CR, Hale RJ, Buckley CH, Hunt J. P53 expression in carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 1996; 49:971-974.
15. Cavuslu S, Goodland J, Hobbs C, Connor AM, Raju KS, Best JM, Canon J. Relationship between human papillomavirus infections and overexpression of p53 protein in cervical carcinomas and lymph node metastases. *J Med Virol* 1997; 53: 111-117.
16. Grace VM, Shalini JV, Lekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and BCL 2 proteins in HPV induce squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003; 91:51-58.
17. Tang SH, Cai QF, Ye XA. Expression of bcl 2 and p53 protein in cervical epithelial carcinogenesis. *Ai Zheng* 2003; 22:1057-1061.
18. Bitiren M, Cakmak EA, Goemen A, Inaloz SS, Sari I, Karakouk M, Aydin A The relationship between expression of p53/BCL2 and clinicopathologic criteria in cervix squamous cell carcinoma. *Eur J Gynecol Oncol* 2003; 24: 411-412.
19. Graflund M, Sorbe B, Karlson M. Immunohistochemical expression of p53, bcl-2 and p21 (WAF1/C1P1), in early cervi-

- cal carcinoma: correlations with clinical outcome. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12:290-298.
20. Alameda FP, Boluda S, Ferrer L, Baro T, Mariñoso L, Mancebo C, Carreras R, Serrano S. The Ki67 Labelling Index, is not a useful predictor for the follow up of cervical intraepithelial neoplasia1-. *J Low Gen Tract Dis.* 2004; 8:313-316.
 21. Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J* 1999, 13(8):773-780.
 22. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1566-1575.
 23. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16:339-347.
 24. Quade BJ, Park JJ, Crum CP, Sun D, Dutta A. In vivo cyclin E expression as a marker for early cervical neoplasia. *Mod Pathol* 1998, 11:1238-1246.
 25. Tae KY, Kyoung CE, Hoon Cho N, Hung Ko J, Wook Kim J, Ho Lee S. Expression of cyclin E and p27(KIP1) in cervical carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 153:41-50.
 26. Kanai M, Shiozawa T, Xin L, Nikaido T, Fujii S. Immunohistochemical detection of sex steroid receptors, cyclins, and cyclin-dependent kinases in the normal and neoplastic squamous epithelia of the uterine cervix. *Cancer* 1998; 82:1709-1719.
 27. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999; 73:223-228.
 28. Brychtova S, Brychta T, Sedlakova E, Kolar Z. Protoncogen C-Myc in uterine cervix carcinogenesis. *Neoplasma* 2004; 51:84-89.
 29. Uren A, Fallen S, Yuan H, Usubütün A, Küçükali T, Schlegel R, Toretsky JA. Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression. *Cancer Res* 2005; 65: 6199-6206.
 30. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998; 153:1741-1748.
 31. Agoff NF, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutosky LA. P16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki67 expression and detection of High-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16:665-673.
 32. Keating JT, Cviko A, Reithdorf S, Reithdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP. Ki67, Cyclin E and p16INK4 are complementary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:884-891.
 33. Middle-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Pöppinghaus A, Riethdorf L, Löning T. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, 21WAF and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch* 2001; 439:55-61.
 34. Van der Putte G, Holm R, Lie AK, Tropé C, Kristensen GB. Expression of p27, p21 and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol Oncol* 2003; 89:140-147
 35. Van der Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekalandt M, Holm R. Cyclins and proliferative markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 40-46.
 36. Masoudi H, van Nieker DJ, Gilks CB, Cheang M, Bilek K, Fisher U, Ehlen T, Millera D, Horn LC. Loss of p16INK4 expression in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix is an adverse prognostic marker. *Histopathology* 2006; 49:542-545.
 37. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 1997; 11:2090-2100.

38. **Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB.** Multiple functions of p27 (Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 2000; 183:18-27.
39. **Zehbe I, Ratsch A, Alunni-Fabbroni M, Burzlaff A, Bakos E, Durst M, Wilander E, Tommasino M.** Overriding of cyclin-dependent kinase inhibitors by high and low risk human papillomavirus types: evidence for an in vivo role in cervical lesions. *Oncogene* 1999; 18:2201-2211.
40. **Shiozawa T, Shiohara S, Kanai M, Konishi I, Fujii S, Nikaido T.** Expression of the cell cycle regulator p27(Kip1) in normal squamous epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix: immunohistochemistry and functional aspects of p27(Kip1). *Cancer* 2001; 92:3005-3011.
41. **Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R.** Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999; 73:223-228.
42. **Tae KY, Kyoung CE, Hoon CN, Hung KJ, Iek YW, Wook KJ, Ho LS.** Expression of cyclin E and p27(KIP1) in cervical carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 153:41-50.
43. **Huang LW, Chao SL, Hwang JL, Chou YY.** Down-regulation of p27 is associated with malignant transformation and aggressive phenotype of cervical neoplasms. *Gynecol Oncol* 2002; 85:524-528.
44. **El Deiry WS, Harper JW, Hill DE, Jackman J, Mercer WE, O'Connor PM, Pietenpol JA, Velculescu VE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B.** WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54:1169-1174.
45. **Giannoudis A, Herrington CS.** Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer* 2000; 89:1300-1307.
46. **Sherr CJ, Roberts JM.** Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9:1149-1163.
47. **Peifer M, Polakis P.** Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis: a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287:1606-1609.
48. **Liu C, Li Y, Semenov M, Semenov M, Ham C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, Ho X.** Control of b-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837-847.
49. **Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Zéev A.** The cyclin D1 gene is a target of the b-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:5522-5527.
50. **Kikuchi A.** Regulation of β -catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 243-248.
51. **Uren A, Fallen S, Yuan H, Usübütun A, Küçükali T, Schlegel R, Toretsky JA.** Activation of the Canonical Wnt Pathway during Genital Keratinocyte Transformation: A Model for Cervical Cancer Progression. *Cancer Res* 2005; 65:6199-6206.
52. **Brake T, Connor JP, Petereit DJ, Lambert PF.** Comparative Analysis of Cervical Cancer in Women and in a Human Papillomavirus-Transgenic Mouse Model: Identification of *Minichromosome Maintenance Protein 7* as an Informative Biomarker for Human Cervical Cancer. *Cancer Research* 2003; 63:8173-8180.
53. **Ishida S, Huang E, Zuza H, Spang R, Leone G, West M, Nevins JR.** Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol. Cell. Biol* 2001; 21:4684-4699.
54. **Cho NH, Kim YT, Kim JW.** Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int. J. Gynecol. Pathol* 1997, 16:339-347.
55. **Kim YT, Choi E K, Cho NH, Ko JH, Yang WI, Kim JW, Lee S H.** Expression of cyclin E and p27KIP1 in cervical carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 153: 41-50.

56. **Freeman A, Morris LA, Mills AD, Stoerber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N.** Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin. Cancer Res* 1999; 5:2121-2132.
57. **Ohtani K, Iwanaga R, Nakamura M, Ikeda M, Yabuta N, Tsuruga H, Nojima H.** Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene* 1999; 18:2299-2309.
58. **Duensing S, Lee L Y, Duensing A, Basile J, Piboonyiom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K.** The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97:10002-10007.
59. **Cuadrado E, Rodríguez Trinidad A, Blasco-Olaetxea E, Torrado J, López García JA, Arozena F.** Blood Group Isoantigens ABO(H) in Transitional Carcinoma of the Bladder. *Journal of Urology* 1986; 135:409-415.
60. **Torrado J, Blasco Olaetxea E, Cosme A, Gutierrez Hoyos A, Arenas JI, Cuadrado E.** Immunohistologic reaction of 20 Monoclonal Antibodies against non A non B glycoconjugates with normal human gut. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1987; 5: 693-698.
61. **Blasco-Olaetxea E, Cuadrado E, Etxaniz P, Martinez de Salinas J, Cosme A, Torrado J.** Immunological study of Blood Group substances in Recto colon diseases. *J Clin Nutr Gastroenterol* 1987; 2:23-30.
62. **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; 36:8-11.
63. **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.
64. **Inoue M, Sasagawa T, Saito J.** Expression 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.
65. **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.
66. **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.
67. **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.
68. **Luzardo-Batista M, García-Tamayo J, Nuñez-Montiel JT.** Anatomía submicroscópica del exocervix humano normal. *Invest Clin* 1969; 30:25-56.
69. **Luzardo-Batista M, García-Tamayo J, Nuñez-Montiel JT.** Ultraestructura del estrato espinoso del exocervix humano normal. *Rev Soc Ven Obst Ginecol* 1970; 30:13-18.
70. **García-Tamayo J, Nuñez-Montiel JT.** Investigación con el microscopio electrónico sobre la papilomatosis cérvico-vaginal. *Acta Med Ven* 1978; 25:132-138.
71. **Rincón-Morales F, García-Tamayo J.** Infección vulvar inducida por el virus del papiloma humano (VPH); aspectos clínicos y morfológicos con énfasis en los hallazgos colposcópicos y ultraestructurales. *Rev Ven Obst Ginecol* 1983; 43:203-215.