

Marcadores para el cribado del cáncer cervical

Zoraya De Guglielmo ¹, Armando Rodríguez ²

RESUMEN

Los organismos producen sustancias, generalmente proteínas, cuya concentración y nivel de detección varía entre células sanas, células enfermas o afecciones benignas, los cuales son usados como marcadores de una patología dada, incluyendo el cáncer. Justamente, la importancia o valor de un marcador dado va a depender de la precisión de su uso a nivel clínico y de investigación, para el diagnóstico, pronóstico y estadificación de la enfermedad, a tal punto que su detección puede ser fundamental para el establecimiento de una terapia o tratamiento a un paciente. A continuación, se presenta una revisión actualizada de los distintos marcadores utilizados en el cribado del cáncer uterino, incluyendo proteínas, ARN y cambios en secuencias de ADN, exponiendo sus ventajas y limitaciones.

Palabras clave: Cáncer uterino, cribado, marcadores

SUMMARY

Organisms produce substances, usually proteins, whose concentration and detection level varies between healthy cells, diseased cells or benign conditions, which are used as markers of a given pathology, including cancer. Precisely, the importance or value of a given marker will depend on the accuracy of their clinical and research use for the diagnosis, prognosis and staging of the disease. Thus, a marker detection may be central to the establishment of a therapy or treatment to a patient. Below a review is presented with an updated version of the various markers used in screening for uterine cancer, including proteins, RNA and DNA sequences changes, exposing their advantages and limitations.

Keywords: uterine cancer, screening markers

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical se ubica dentro de las primeras cuatro malignidades que afectan a mujeres en todo el mundo y es la segunda causa de muerte oncológica en muchos países de escasos recursos (1). En Venezuela, según estadísticas del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), en el año 2011 se produjeron 1331 muertes por esta malignidad, la mayoría en mujeres entre 25-44 años (2). La principal herramienta en salud pública para el cribado de esta patología es la citología vaginal o prueba de Papanicolaou que permite la obtención de células del cuello uterino para su observación con un microscopio y así detectar los cambios precursores del cáncer, por lo que ha contribuido a la reducción de la incidencia y mortalidad por esta enfermedad.

En los últimos años se ha probado la citología en medio

líquido, la cual presenta algunas ventajas respecto a la citología convencional, como una menor probabilidad de repetir la prueba de Papanicolaou y la capacidad para realizar pruebas para ADN de virus de papiloma humano (VPH) con el mismo material. Sin embargo, es más costosa y sensible en la detección de cambios celulares no asociados a cáncer, lo que trae como consecuencia la realización de evaluaciones innecesarias para descartar malignidad o lesiones asociadas. Aunque la prueba de Papanicolaou ha tenido más éxito que ninguna otra prueba de detección en la prevención del cáncer, tiene limitaciones que se ponen de manifiesto en la ocurrencia de aproximadamente 500 000 nuevos casos de cáncer cervical anualmente en el mundo. Estas incluyen la toma inadecuada de muestras, el error humano, la adhesión insatisfactoria de mujeres a los programas de cribado y la poca reproducibilidad de los resultados (3). A esto se unen poca sensibilidad y bajo valor predictivo negativo en comparación con los de procedimientos moleculares, evidenciados a partir de aproximadamente

¹Instituto de Oncología y Hematología-MPPS.

²FACES-UCV.

40 % de resultados negativos falsos y en al menos 40 % de nuevos casos de cáncer invasivo diagnosticados en mujeres con un Papanicolaou negativo recientemente (4).

Debido a esto, se ha buscado alternativas para mejorar el cribado del cáncer cervical, resaltando el uso de técnicas de biología molecular para la detección del VPH (agente causal de la patología), las cuales tienen alta reproducibilidad, sensibilidad y valor predictivo negativo, así como de biomarcadores que contribuyen en la identificación de Papanicolaou verdaderos positivos y en la resolución de resultados dudosos o de significado incierto. Precisamente, debido al aporte de las pruebas moleculares en la detección viral, diversos investigadores han señalado la detección de ADN de VPH de alto riesgo oncogénico como marcador de predicción para desarrollo de cáncer cervical (5, 6).

Otro factor que debe tomarse en cuenta en relación a la cobertura e impacto de los programas de cribado es la reciente introducción de vacunas preventivas para el VPH, las cuales pudieran tener una influencia sustancial en la prevalencia de la enfermedad y en la demanda de pruebas con valores predictivos altos para detectar posibles fallas en la vacunación y captar lesiones inducidas por tipos virales que no están incluidos en las vacunas (7, 8).

Con base en estas consideraciones, se realizó la presente revisión para describir el uso, ventajas y desventajas de distintos marcadores usados en el cribado del cáncer cervical.

Biomarcadores para el cribado del cáncer cervical

Desde hace dos décadas diversos estudios se han enfocado en la identificación de biomarcadores para desarrollar programas de cribado del cáncer cervical más eficientes y costo-efectivos, especialmente en aquellos países con mayor porcentaje de esta patología. Mucho se ha hablado de las ventajas de la detección del ADN de VPH, para lo que se utilizan métodos altamente sensibles, pero su especificidad es relativa al no permitir identificar la infección activa de la latente o aquellas lesiones de bajo grado o significado incierto que progresarán a lesiones de alto grado o cáncer. En tal sentido, son necesarios marcadores que posibiliten detectar eficazmente los casos con riesgo a desarrollar cáncer en un punto que permita la curación exitosa antes

del surgimiento de cáncer invasivo (9).

Tomando en cuenta que el riesgo de progresión a cáncer invasivo crece con el grado de la lesión y que esta malignidad es altamente prevenible ya que pueden transcurrir de 5 a 10 años para que una lesión precancerosa evolucione a tumor, estos marcadores deberían permitir el diagnóstico en etapas muy tempranas.

Biomarcadores de la desregulación del ciclo celular por la acción transformadora del VPH y biomarcadores asociados al grado de la lesión

Considerando que el agente etiológico del cáncer cervical es el VPH, muchos biomarcadores han surgido a partir del efecto de los virus de alto riesgo oncogénico en las células hospedadoras, cuyos genes E6 y E7 (así como sus productos), responsables de la actividad transformante del virus, tienen mayor afinidad por los genes supresores de tumor P53 y pRb (retinoblastoma) que los virus de bajo riesgo oncogénico, por lo que al infectar el epitelio e integrarse al genoma celular, expresan las proteínas E6 y E7 que inhiben la función de P53 (detener el ciclo celular en respuesta al daño del ADN, induciendo su reparación o la apoptosis cuando esto no es posible) y Rb (restringir la proliferación celular mediante la inhibición del factor transcripcional E2F en la fase G1 del ciclo), respectivamente. Entonces, la falta de P53 y la inhibición de Rb desencadenan la proliferación celular descontrolada (10). Al usar la expresión de la proteína P53 como marcador del cáncer cervical debe tomarse en cuenta que los resultados en estudios realizados por distintos investigadores son controversiales. En general, se ha señalado que no se expresa en el epitelio cervical normal y no siempre se observa inmunomarcaje en fases avanzadas del cáncer; sin embargo, según algunos autores, la expresión de la proteína es mayor al avanzar el grado de la lesión (11, 12).

Por otra parte, la regulación del ciclo celular resulta esencial tanto en los procesos de proliferación y crecimiento celular como en la división posterior a los daños producidos en el ADN. Esta regulación es realizada a través de complejos proteicos formados por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, de las siglas en inglés) cuyo funcionamiento se relaciona a procesos de fosforilación. Las ciclinas son proteínas sintetizadas durante la interfase y destruidas al final de la mitosis de cada ciclo. Actúan como reguladoras de la

actividad enzimática de las CDKs y su concentración varía a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular. Se agrupan en dos familias; la familia Cip/kip (incluye a las proteínas p21, p27 y p57, con sus respectivos genes, que interactúan e inhiben la actividad quinasa de los complejos CDK2/ciclina E, CDK4/ciclina D, CDK6/ciclina D, CDK2/ciclina A y CDK1/ciclina B) y la familia INK4 (incluye a las proteínas p15, p16, p18 y p19 que forman complejos con la ciclina D, e inhiben específicamente a CDK4 y CDK6, implicadas en el control de la fase G1). Estas enzimas, y la manera en que interactúan, han cobrado gran interés en las últimas dos décadas como blancos terapéuticos, no solo por su papel en la regulación del ciclo celular, sino por su acción en la transcripción genética y en la estabilidad genómica (13, 14).

En este grupo resalta p16INK4a, fosfoproteína que participa en la regulación del ciclo celular al inhibir las CDKs. Estas quinastas, a su vez, regulan el efecto de la proteína supresora de tumores pRb sobre el factor de transcripción E2F que estimula ciertos genes en la fase S del ciclo celular. Esta fosfoproteína sintetizada en la fase mitótica es el biomarcador más ampliamente evaluado en relación al cáncer cervical y corresponde a un elemento de la vía p16-ciclinaD-CDK4/6/RB. La expresión de p16 y la actividad de pRb son inversamente proporcionales, por lo que p16 se detecta cuando el supresor está alterado (mutado o inactivo) y se reduce o desaparece cuando el supresor tiene actividad normal. En más detalle, cuando la proteína E7 de VPH interactúa con la proteína pRb, interfiere en el control de la transición G1/S del ciclo, el cual se desregula a partir de la liberación del factor E2F (15, 16). Sin embargo, se ha observado positividad en la expresión de p16 en células normales, lo que implica el uso de criterios morfológicos para la mejor interpretación de los resultados; por ello, se ha recomendado la detección simultánea de p16 (como marcador de antiproliferación) y Ki67 (como marcador de proliferación). Así, se ha utilizado en ensayos de inmunotinción citológica junto con el marcador Ki67, para la identificación y confirmación de verdaderos positivos en la citología vaginal, mejorando la eficacia del cribado cervical mediante dicha prueba (17).

Este marcador puede ser medido por inmunohistoquímica y por ELISA, además de técnicas moleculares (16). En tal sentido, Masoudi y col. (18), en 2006, utilizaron

la técnica de microarreglos para evaluar su expresión en muestras de cáncer cervical y encontraron que esta disminuía y se perdía en los casos de menor sobrevida, sin estar relacionada con la magnitud de la invasión ni con las metástasis ganglionares. Así, pudiera representar un excelente marcador de progresión neoplásica, fácilmente detectable, que mejora la especificidad diagnóstica al permitir detectar lesiones de bajo grado que progresarán en complejidad.

Por su parte, Ki67 es un marcador nuclear de proliferación celular ampliamente utilizado en el pronóstico de distintas malignidades. Con base en lo expuesto, se ha propuesto la tinción dual de p16INKa/Ki67 en las citologías vaginales, tanto para el cribado como para la resolución de citologías atípicas o de significado incierto; los resultados de varios estudios muestran que esta tinción tiene una sensibilidad comparable, pero una especificidad mayor, a la detección del ADN viral, sugiriendo que puede contribuir en la identificación más certera de los casos que progresarían a cáncer invasor (19).

Otro marcador utilizado para evaluar el epitelio escamoso cervical, es el antígeno para citokeratina 17 (CK17) que, específicamente, permite diferenciar metaplasia escamosa inmadura y neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de alto grado (NIC3). Su expresión disminuye hasta desaparecer a medida que el epitelio metaplásico madura. Se ha señalado que, mediante inmunohistoquímica, puede ser positivo en algunas lesiones intraepiteliales y en metaplasia escamosa inmadura, pero no permite diferenciar entre lesiones con o sin displasia por lo que su valor como marcador requiere que se le use en combinación con otro, siendo recomendado p16 (20).

Cabe mencionar que la expresión de p16 en NIC ha sido comparada con las de p27 y p21 sin que puedan hallarse diferencias significativas, pero los resultados son controversiales, por lo que se resalta la necesidad de realizar más evaluaciones al respecto (21).

El ciclo celular también se ve afectado por la ocurrencia de mutaciones en protooncogenes, lo cual da lugar a genes anormales o a la activación de genes llamados oncogenes responsables de la transformación de una célula normal en una maligna. Ha sido muy estudiada la activación del protooncogén Myc (o c-MYC), el

cual codifica una proteína del núcleo celular que se une al ADN y facilita su transcripción, regulando así la actividad de otros genes. Su activación lo transforma en un oncogén que actúa sobre la proliferación celular, específicamente sobre el crecimiento y la división de las células en el paso de la fase G0/G1 a S. El oncogén *Myc* se encuentra frecuentemente sobreexpresado en cáncer cervical y varios estudios han descrito su activación en estadios premalignos, sugiriendo que su detección puede ser usada para evaluar lesiones displásicas; sin embargo, con VPH tipo 16 se ha encontrado que esta correlación entre expresión del gen *Myc* y progresión de la lesión cervical es débil (22). Ello implica limitaciones en cuanto al uso de este gen como marcador del cáncer cervical, o bien su uso en combinación con otro marcador. Para diferenciar lesiones cervicales de distinta magnitud, algunos investigadores también han señalado al antígeno de membrana MN (detectado mediante inmunohistoquímica en varias neoplasias) como biomarcador complementario ya que su expresión es casi nula en el tejido cervical normal e incrementa a medida que avanza el grado de la lesión (23).

En la búsqueda de nuevos indicadores, recientemente, Garbett y col. (24) identificaron patrones de biomarcadores mediante calorimetría diferencial de barrido y espectrometría de masa en sangre y orina de pacientes con cáncer cervical, así como en distintos grados de lesiones precursoras. Observaron cambios específicos en los termogramas para cada grupo de muestras e identificaron péptidos mediante la espectrometría de masa cuya abundancia estuvo correlacionada con el grado de la lesión, apuntando la utilidad de estas técnicas en el cribado del cáncer cervical como herramientas complementarias diagnósticas.

Otro marcador novedoso descrito en la patología quirúrgica para diferenciar entre lesiones intraepiteliales de distinto grado es la proteína D240, que ha servido como un nuevo marcador selectivo del endotelio linfático y se utiliza en la identificación de la presencia de invasión linfática en diversas neoplasias malignas incluyendo el carcinoma de cuello uterino y la neoplasia cervical; su expresión es fuerte en el epitelio cervical normal y va disminuyendo a medida que avanza el grado de la lesión, destacando que puede ser un marcador útil para distinguir neoplasias intraepiteliales cervicales de bajo grado (NIC 1) de las de alto grado (NIC 2 y NIC 3), cuando se combina con la evaluación inmunohistoquímica de p16 (25).

Integración del ADN de VPH y pérdida de la estabilidad cromosómica de la célula infectada.

El ADN de VPH usualmente se encuentra en forma episomal en lesiones precursoras cervicales benignas. Al integrarse al genoma celular, el genoma viral circular (generalmente de VPH de alto riesgo oncogénico) se rompe o interrumpe en la región E1/E2 haciéndose lineal, ocasionando la pérdida de la región de ruptura, lo que a su vez determina el incremento descontrolado de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, ocurriendo la transformación maligna. Esto se debe a la ausencia del producto del gen E2 que es un regulador transcripcional del promotor p97 ubicado río arriba de la región reguladora viral, del cual depende la activación de los oncogenes virales (el producto del E2 se une a p97 e inhibe su actividad promotora) (26, 27). El genoma viral prácticamente no comparte homología con el genoma celular por lo que se ha señalado que la integración ocurre a través de procesos de recombinación no homóloga empleados frecuentemente por las células durante la reparación de daños genéticos (28). Por otra parte, se ha observado que el porcentaje de formas integradas o mixtas del genoma viral es bajo en lesiones de bajo grado (NIC 1) e incrementa en lesiones de alto grado (NIC 2 y NIC 3). De esta manera, tal integración parece favorecer el crecimiento de las células hospedadoras transformadas siempre que se produzca el rompimiento de E2 y es considerada actualmente como un proceso que caracteriza las displasias malignas, resaltando la potencial utilidad de la detección del ADN viral de alto riesgo oncogénico y de la evaluación de su integración al genoma celular mediante métodos moleculares (por ejemplo, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), reacción en cadena de polimerasa (PCR) o hibridación), como herramientas de diagnóstico y determinación del riesgo de progresión de lesiones de bajo grado a lesiones de alto grado y cáncer. Sin embargo, es importante tomar en cuenta la falta de integración de VPH 16 en algunos carcinomas, lo que implica que este fenómeno no siempre es requerido para la transformación maligna y/o que existen otras vías en este proceso, y que la frecuencia de integración varía dependiendo del tipo viral, siendo mayor para los tipos 16, 18 y 45 que para los tipos 31 y 33 (todos de alto riesgo oncogénico). Así mismo, las lesiones precancerosas asociadas a VPH 16, 18 y 45, en general, progresan a cáncer más rápido que aquellas asociadas a VPH 31 o 33 (29, 30).

Por otra parte, tomando en cuenta lo ya expuesto, se puede deducir que en lesiones avanzadas y en cáncer debe haber una mayor expresión de los oncogenes virales E6 y E7. En este sentido, Sathish y col. (31) no detectaron ARNm de dichos oncogenes en muestras de NIC 1 y NIC 2, pero si en todas las muestras que evaluaron de NIC 3 y carcinoma invasivo de cuello, señalando la necesidad e importancia de realizar más estudios de este tipo para evaluar el uso de la determinación de mensajeros de los genes E6 y E7 como marcador de pronóstico y progresión en el cáncer de cuello uterino y lesiones asociadas.

Tradicionalmente se usan protocolos basados en la PCR para evidenciar la integración a partir de la falta de amplificación de fragmentos de E1 y/o E2, pero sus resultados solo son efectivos en ausencia de genoma de VPH en forma episomal. Esto es muy importante si se considera que en muchos cánceres cervicales primarios coexisten genomas virales integrados y episomales en la misma célula. Por otra parte, el ADN viral suele integrarse en secuencias repetitivas del genoma celular que incluyen a los elementos transponibles ALU, a partir de lo cual investigadores desarrollaron una PCR que usa *primers* o iniciadores específicos para secuencias virales y para dichas secuencias repetitivas (32). También se ha usado la transcripción reversa-PCR (RT-PCR) para la amplificación de transcritos de los oncogenes virales que permite distinguir ARNm de VPH derivados de genomas virales integrados y genomas virales episomales (33) y, en la última década, ha resaltado la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa. Esta técnica, así como la PCR múltiple, permite discriminar entre los diferentes estados físicos del genoma viral a partir de la cuantificación de la relación E2/E6 o E2/E7: en formas integradas puras no se observa amplificación de E2, en formas episomales puras la amplificación de E2 y E6 o E7 es equivalente o similar y en formas mixtas la amplificación de E2 es menor que la de E6 o E7. Por otra parte, se ha señalado que los resultados obtenidos por esta técnica concuerdan con los obtenidos mediante FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) y que, como la región viral E1/E2 puede fragmentarse en múltiples sitios durante la integración, debería evaluarse la totalidad de esta región para la correcta interpretación de los resultados (34).

Cabe mencionar que el proceso de integración del genoma viral no solo afecta a ciertos genes del virus, sino

también genes celulares interrumpidos durante dicho proceso. Aparte de las secuencias ALU, es conocido que un alto porcentaje de estos sitios corresponde a regiones genómicas repetitivas, altamente susceptibles a la ruptura (*CFSs o Common Fragile Sites*), las cuales facilitan la inserción de ADN exógeno por ser poco condensadas y transcripcionalmente activas. Sitios muy frecuentes de integración del genoma viral son los cromosomas 3p, 6q, 11q y 17q, por lo que se han relacionado con actividades supresoras de tumor y están siendo muy estudiados en los últimos años. Destaca la región 3p21.3 donde se ubica RASSF1A, gen efector de la familia RAS con propiedades antitumorales asociadas a procesos apoptóticos independientes de p53 (35).

Otros genes involucrados con el desarrollo de tumores donde ocurre integración de fragmentos genómicos virales son MYC, TP63 (de la familia de p53), NR4A2, APM-1, FANCC, TNFAIP2 y hTERT, lo que pudiera favorecer la activación o desregulación de estas secuencias que, en consecuencia, beneficiaría el desarrollo de malignidad (35, 36).

Marcadores de inestabilidad cromosomal

Se ha descrito que la integración del genoma viral está asociada a inestabilidad cromosomal, pudiendo generar grandes deleciones cromosomales y rearrreglos en el genoma celular que ocasionan una mayor susceptibilidad para que la célula hospedera sufra transformación maligna. La deleción alélica más frecuente se observa en el brazo corto del cromosoma 3, señalada como un evento precoz en la génesis tumoral cervical uterina (37, 38). Así, la aneuploidía evidenciada a partir de núcleos no diploides, es característica para lesiones cervicales asociadas a VPH, aún en lesiones precancerosas; esta aneuploidía incrementa con la displasia y se ha observado que precede a la integración del genoma de VPH en lesiones displásicas avanzadas, apoyando la noción de que tal integración es consecuencia (no causa) de inestabilidad cromosomal y transformación (39).

Otros estudios han puesto en evidencia que la pérdida de heterocigosidad es muy frecuente en cáncer cervical en los ya mencionados cromosomas 3p, 6q, 11q y 17q. Particularmente, en el cromosoma 3p14.2 se ubica el gen supresor FHIT (*Fragile Histidine Triad*), que es un sitio de integración frecuente del genoma de VPH; aunque su actividad y relevancia en la carcinogénesis no son

muy conocidas, está siendo estudiado para su uso como marcador o blanco terapéutico. Igualmente, RASSF1A, ubicado en la región 3p21.3, gen efector de la familia RAS; se ha observado que a partir de la integración del genoma viral ocurre pérdida de heterocigosidad LOH (siglas del inglés *Loss of Heterozygosity*) en 3p21 y la hipermetilación de la región promotora de RASSF1A, por lo que se considera que estos son mecanismos implicados en el silenciamiento genético que favorece el desarrollo del cáncer cervical (35).

Algunos investigadores estudiaron la relación entre el número de copias cromosómicas y el estado físico del genoma viral, encontrando tetrasomías y trisomías con las formas episomales, y aneusomías y polisomías con las formas integradas, especialmente en NIC 3 y carcinomas microinvasivos (40, 41). De esta manera, el estudio de la aneuploidía en una muestra dada pudiera incluirse en la evaluación de integración del ADN viral, de interés en la determinación de riesgo, progresión y pronóstico.

La pérdida de heterocigosidad también se ha descrito en microsatélites marcadores del cáncer cervical (como D3S1478, D3S1578 y D3S1076), observándose que pierden su integridad al avanzar el grado de malignidad de la lesión en las células escamosas del cérvix, causando la regulación deficiente de genes involucrados en el ciclo celular (27).

Marcadores microsatélites y micro ARN

Los microsatélites (SSR o STR por *Simple Sequence Repeat* y *Short Tandem Repeat*) son secuencias de ADN de pequeño tamaño (entre 2 y 6 pares de bases) que se repiten consecutivamente, con gran valor en la identificación de organismos y el diagnóstico molecular de patologías. En el cáncer cervical se han identificado varios marcadores genéticos tipo microsatélite que intervienen en la regulación de genes involucrados en procesos de fosforilación y reparación del ciclo celular, los cuales son estudiados mediante técnicas moleculares como PCR, RFLP e hibridación, observándose pérdida de heterocigosidad en su secuencia que ha sido relacionada con la progresión a neoplasia; los más destacados son D3S1260 (ubicado en 3p22,2), D3S1300 (en 3p14,2), D11S528 (en 11q23,3) (42).

Recientemente, han ganado interés moléculas llamadas micro ARN (miARN o miRNA), involucradas en

el mecanismo de ARN interferente (ARNi), para el estudio de lesiones cervicales. Corresponden a productos transcripcionales de la ARN polimerasa II, no codificantes, con una longitud aproximada de 21 nucleótidos cuya expresión diferencial depende de mecanismos de regulación a nivel transcripcional y postranscripcional, que intervienen en procesos de silenciamiento genético y, en consecuencia, poseen un gran valor terapéutico. Mediante secuenciación y microarreglos, se ha observado que VPH de alto riesgo oncogénico induce la expresión aberrante de muchos miARNs celulares y que la infección con VPH 18 no produce miARN viral detectable. Destaca el incremento de las moléculas miR-25, miR-92^a y miR-378 (identificadas como oncogénicas) y la disminución de miR-22, miR-27^a, miR-29^a y miR-100 (supresoras de tumores) con la progresión de la lesión cervical, en comparación a la expresión en tejido sano; dicha expresión estaría regulada por p53, E2F y c-Myc. Así, los patrones de expresión de estas moléculas pudieran servir para distinguir entre cérvix normal, lesiones NIC y cáncer cervical (43, 44). Eventualmente, pudieran ser usadas como herramientas terapéuticas en este cáncer y lesiones precursoras, considerando la identificación de moléculas con actividad supresora de tumores.

Marcadores epigenéticos

La epigenética es un fenómeno involucrado en distintos procesos biológicos, como el desarrollo embrionario, la carcinogénesis y la respuesta del sistema inmune. Abarca el estudio de la función genómica fuera del contexto del ADN en sí, por medio de la cual se produce alteraciones estables de la expresión genética sin implicar cambios en la secuencia de nucleótidos. Los cambios epigenéticos estudiados más ampliamente son la metilación del ADN (a través de ADN metiltransferasas), la acetilación de histonas y, más recientemente, el fenómeno de ARN interferente ya mencionado, involucrado en procesos de silenciamiento transcripcional a través de pequeñas moléculas de ARN de doble cadena (45).

Particularmente, la metilación del ADN se refiere a la incorporación de grupos metilo en residuos de citosina y es un mecanismo que afecta la conformación de la cromatina, pudiendo estimular o reprimir la expresión genética (46, 47). Así, la metilación de sitios CpG (citosina separada de guanina por un fosfato), dentro del promotor de un gen, puede llevar a su silenciamiento, lo cual se observa en genes supresores de tumor durante

diversos procesos oncogénicos, incluyendo el cáncer cervical y lesiones precancerosas asociadas; por su parte, la hipometilación del ADN pudiera favorecer la integración del genoma viral en el hospedador y está asociada a la inestabilidad de este material genético y a la activación y sobreexpresión de protooncogenes y oncogenes. Este fenómeno también ha sido estudiado en cáncer de pene, identificándose marcadores de progresión de malignidad y metástasis (48).

Algunos investigadores han observado variación en los patrones de metilación dependiendo del tipo de VPH y qué genomas de VPH tipo 16 metilados *in vitro* son transcripcionalmente incompetentes después de la transfección en cultivos celulares, lo que plantea la posibilidad de uso de este mecanismo en procedimientos terapéuticos; esta metilación se evidencia en células indiferenciadas, en tanto que en células diferenciadas el ADN viral está demetilado (46).

El nivel de metilación del ADN puede verse afectado por el nivel de folato en las células a partir de la provisión de grupos metilo por la enzima 5-metiltetrahidrofolato, observándose que el nivel de folato y la metilación aberrante del ADN muestran un cambio progresivo a través de los estadios de la patología cervical, desde células normales hasta cáncer, lo que señala al uso de patrones de hiper e hipometilación como biomarcadores predictivos del riesgo de cáncer cervical. En este sentido, se ha descrito asociación de un bajo nivel de folato con la infección con VPH de alto riesgo, lesiones NIC y cáncer cervical invasivo, así como mayor hipometilación global del ADN en mujeres con cáncer invasivo e incremento de metilación de los genes supresores de tumor CDH1, DAPK y HIC1 de manera gradual con el grado de la lesión neoplásica, lo que resalta el potencial de dichos genes como biomarcadores de progresión o riesgo de cáncer cervical.

También se ha identificado el patrón de metilación de los genes JAM3, TERT, EPB41L3 y C13ORF18, asociado a la infección con VPH de alto riesgo y al riesgo de progresión de lesiones de bajo grado a cáncer, en muestras de lavados cervico-vaginales, reportándose concordancia de estos resultados con los de detección de ADN de VPH de alto riesgo por biología molecular y de neoplasia cervical por citomorfología en las mismas pacientes. Estos patrones de hipermetilación e hipometilación, así como el estado de folato pueden ser evaluados mediante kits o estuches comerciales.

Por otra parte, existe evidencia de que la metilación del ADN de VPH pudiera ser igualmente importante a la metilación del ADN celular en el desarrollo de carcinogénesis cervical, pudiendo aportar nuevos biomarcadores para el cribado y pronóstico de esta patología; este mecanismo sería utilizado por el virus para alcanzar la infección persistente y evadir la defensa inmunitaria del hospedador mediante el silenciamiento de algunos genes propios, especialmente en la región L1 (49 - 54).

La metilación también afecta genes involucrados en la apoptosis, incluyendo receptores *decoy* (señuelo), los cuales reconocen y se unen a factores de crecimiento o citoquinas específicas, induciendo su silenciamiento al bloquear o inhibir la unión con su receptor habitual. En un estudio de muestras cervicales de pacientes con cáncer cervical, se observó un patrón de metilación anormal de los receptores *decoy* TNFRSF10C, TNFRSF10D, DcR1 y DcR2 (miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral) que conduce a su silenciamiento, sugiriendo que las células de esta malignidad obtienen ventajas de crecimiento por la inhibición de la expresión de los receptores como consecuencia de la metilación (55, 56).

Marcadores de estrés celular

Las proteínas de choque térmico (*HSP por Heat Shock Proteins*), como su nombre lo indica, son inducidas por estrés térmico, aunque también pueden reaccionar frente a estrés físico y químico en un amplio rango de especies. Se les considera chaperones moleculares, proteínas que tienen la propiedad común de modificar la estructura y las interacciones de otras proteínas. Están sobreexpresadas en un amplio rango de cánceres humanos y se encuentran implicadas en la proliferación, diferenciación, invasión, metástasis, muerte y reconocimiento de las células tumorales por parte del sistema inmune. La transcripción de estas proteínas requiere la activación del factor 1 de transcripción de proteínas de choque, el cual está sobreexpresado en cáncer y juega un papel importante en la invasión y metástasis. Aunque no tiene mucho peso en el diagnóstico, su sobreexpresión es indicativa de un mal pronóstico en términos de sobrevivencia y respuesta a la terapia en distintas malignidades (57, 58).

En las lesiones precedentes al cáncer cervical se ha

detectado la sobreexpresión de las proteínas de choque térmico HSP40, HSP60, HSP70 y gp96, cuyo nivel incrementa con el grado de la lesión. Actualmente, se estudia el uso de las proteínas HSP70 y gp96 para la elaboración de vacunas terapéuticas del cáncer cervical (59); en el año 2000, Liu y col. (60) ensamblaron y evaluaron una vacuna basada en ADN del péptido de E7 de VPH tipo 16 fusionado con ADN correspondiente a HSP70 como adyuvante, resaltando, con base en los resultados, la seguridad de la vacuna y su potencial uso en la terapia de esta malignidad. Igualmente, el antígeno de la anhidrasa carbónica 9 (CA9), proteína transmembrana activada por la baja tensión de oxígeno, se expresa en todas las lesiones intraepiteliales previas al cáncer y, además, se ha detectado en lesiones de significado incierto que progresan a lesión intraepitelial, lo que la señala como biomarcador de selección en este tipo de lesiones y como biomarcador diagnóstico de displasia y neoplasia cervical (61, 62).

Lamininas y cáncer cervical

Las lamininas constituyen una familia de macromoléculas que desempeñan un importante papel en el desarrollo y diferenciación celular. Son capaces tanto de estimular la adhesión y migración celular como de influir en la expresión génica. Esta influencia en el comportamiento celular depende en gran medida de su unión con una proteína de la membrana celular conocida como receptor de laminina (RL). El receptor de superficie para la laminina facilitaría la adhesión de las células a la membrana basal como paso previo a la invasión (63).

Como resultado de alteraciones en la estructura de la membrana basal en procesos tumorales el RL sufrirá modificaciones tanto en su número como en el grado de ocupación en diferentes carcinomas humanos. Así, la expresión de RL se ha relacionado con la capacidad de invasión y metástasis de diferentes tumores (63, 64). Particularmente en el cáncer cervical, se ha observado sobreexpresión de la laminina 5 y que anticuerpos dirigidos contra la cadena $\gamma 2$ de esta proteína de la matriz extracelular pueden identificar lesiones cervicales con capacidad invasiva sirviendo, en consecuencia, como marcador sensible de invasión temprana (65, 66, 67). Similarmente, otros estudios han puesto en evidencia que, fibroblastos asociados a tumores cervicales sintetizan elevadas cantidades de

laminina 1, favoreciendo la invasión de células sanas, la remodelación del estroma intersticial y la disminución y reemplazo de fibronectina y colágeno por una matriz rica en laminina (64).

CONCLUSIÓN

El uso de biomarcadores complementa y mejora la interpretación de las citologías, resaltando su utilidad para definir aquellos resultados de significado incierto; además, aporta información sobre el estado y características de la enfermedad, influyendo en el diagnóstico, selección de tratamiento, pronóstico y seguimiento clínico. Su efecto o papel en la génesis tumoral se observa a distintos niveles, incluyendo regulación, proliferación, síntesis de ácidos nucleicos y expresión genética. Pueden utilizarse individualmente, pero en algunos casos es recomendable usarlos en combinación con otro para afinar su aporte en la evaluación del proceso patológico, dependiendo también de la disponibilidad y las necesidades del médico o del investigador. Muchos de estos marcadores no solo tienen utilidad diagnóstica, sino también potencial terapéutico frente al cáncer uterino, de gran interés para aquellos casos donde las vacunas profilácticas son ineficientes. Se considera que la característica más importante de un buen marcador de selección es que permita detectar la patología en etapas tempranas, de allí que distintos estudios sobre el papel de la inestabilidad cromosomal en el cáncer uterino resalten la inclusión de técnicas de citogenética molecular para el diagnóstico temprano y la determinación de la predisposición genética en esta patología. También se ha resaltado la detección del ADN viral y la determinación del estado de dicho ADN mediante técnicas moleculares como marcador de predicción de cáncer uterino. Sobre esta base, el estudio, conocimiento e implementación de marcadores es fundamental en el abordaje del paciente con esta enfermedad así como en la identificación de individuos proclives a padecerla. Su uso adecuado contribuiría a la optimización de recursos para combatirla y reduciría sus efectos a nivel de población.

REFERENCIAS

1. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61 (2): 69-90.
2. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas: Anuario de mortalidad 2011. [Consulta noviembre

- 2015]. Disponible en: <http://www.bvs.gob.ve/anuario/Anuario2011.pdf>
3. American Cancer Society. Prevención y detección temprana del cáncer de cuello uterino. 2014. [Consulta noviembre 2015]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/prevencion-y-deteccion-temprana.html>
 4. Subramaniam A, Fauci J, Schneider K, Whitworth J, Erickson B, Kim K, et al. Invasive Cervical Cancer and screening: what are the rates of unscreened and underscreened women in the modern era? *J Low Genit Tract Dis.* 2011; 15 (2): 110-113.
 5. Ferris D, Wright T Jr, Litaker M, Richart R, Lorincz A, Sun X, et al. Comparison of two tests for detecting carcinogenic HPV in women with Papanicolaou smear reports of ASCUS and LSIL. *J Fam Prac.* 1998; 46(2): 136-141.
 6. Salmerón J, Lazcano-Ponce E, Lorincz A, Hernández M, Hernández P, Leyva A, et al. Comparison of HPV-based assays with Papanicolaou smears for cervical cancer screening in Morelos State, Mexico. *Cancer Causes Control.* 2003; 14 (6): 505-512.
 7. Franco E, Cuzick J, Hildesheim A, de Sanjose S. Issues in planning cervical cancer screening in the era of HPV vaccination. *Vaccine.* 2006; 24 (S3): 171-177.
 8. Bosch F, Castellsagué X, de Sanjosé S. HPV and cervical cancer: screening or vaccination? *Br J Cancer.* 2008; 98(1): 15-21.
 9. Wentzensen N, von Knebel M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers.* 2007; 23: 315-330.
 10. Bahnassy AA, Zekri AR, 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): 1-11.
 11. Alameda F, Baro T, Mariñoso M, Manresa J, Costa C, Espinet B et al. Carcinoma escamoso invasor del cérvix uterino. Estudio de la expresión de p53, BCL-2, Ki 67, C-MYC y ciclina D1. *Rev Mex Patol Clin.* 2007; 54(4): 150-158.
 12. 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.
 13. Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein I. Multiple functions of p27 (Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol.* 2000; 183 (1): 18-27.
 14. Shapiro G. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol.* 2006; 24(11): 1770-1783.
 15. Funk J, Waga S, Harry J, Espling E, Stillman B, Galloway D. 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 (16): 2090-2100.
 16. Sahasrabudhe V, Luhn P, Wentzensen N. Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. *Future Microbiol.* 2011; 6(9): 1083-1098.
 17. Gupta N, Srinivasan R, Rajwanshi A. Functional biomarkers in cervical precancer: an overview. *Diagn Cytopathol.* 2010; 38 (8): 618-623.
 18. Masoudi H, Van Nieker D, Gilks C, Cheang M, Bilek K, Fisher U et al. Loss of p16INK4 expression in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix is an adverse prognostic marker. *Histopathology.* 2006; 49 (5): 542-545.
 19. Donà M, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E et al. P16/Ki67 dual staining in cervicovaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2012; 126 (2): 198-202.
 20. Sari Aslani F, Safaei A, Pourjabali M, Momtahan M. Evaluation of Ki67, p16 and CK17 Markers in Differentiating Cervical Intraepithelial Neoplasia and Benign Lesions. *Iran J Med Sci.* 2013; 38 (1): 15-21.
 21. Lin J, Albers AE, Qin J, Kaufmann AM. Prognostic significance of overexpressed p16INK4a in patients with cervical cancer: A meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(9): e106384.
 22. Abba MC, Laguens RM, Dulout FN, Golijow CD. The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. *Mutat Res.* 2004; 557(2): 151-158.
 23. Liao S, Brewer C, Závada J, Pastorek J, Pastorekova S, Manetta A, et al. Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas. *Am J Pathol.* 1994; 145(3): 598-609.
 24. Garbett NC, Merchant ML, Helm CW, Jenson AB, Klein JB, Chaires JB. Detection of cervical cancer biomarker patterns in blood plasma and urine by differential scanning calorimetry and mass spectrometry. *PLoS One.* 2014; 9(1): e84710.
 25. Han H, Yang Y, Lu Z, He Q, Lin Z. Decreased D2-40 and increased p16INK4A immunoreactivities correlate with higher grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Diagnos Pathol.* 2011; 6:59.
 26. Doorvar J, Ely S, Sterlyng J, Mc Lean C, Crawford L.

- Specific interaction between HPV16 E1-E4 and cytoke-ratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991; 352 (6338): 824-827.
27. González-Ramírez E, Alarcón-Morales L, Martínez-Martínez A. Una nueva síntesis para el diagnóstico de cáncer cervicouterino. *Acta Universitaria*. 2012; 22 (8): 19-25.
 28. Einstein MH, Cruz Y, El-Awady MK, Popescu NC, Di-Paolo JA, van Ranst M, et al. Utilization of the human genome sequence localizes human papillomavirus type 16 ADN integrated into the TNFAIP2 gene in a fatal cervical cancer from a 39-year-old woman. *Clin Cancer Res* 2002; 8 (2): 549- 554.
 29. Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG. The integration of HPV 18 DNA in cervical carcinoma. *Mol Pathol*. 1999; 52 (5): 275-282.
 30. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res*. 2008; 68 (1): 307-313.
 31. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, Sridharan G, John S, Chandy G. Human papillomavirus 16 E6/E7 transcript and E2 gene status in patients with cervical neoplasia. *Mol Diagn*. 2004; 8 (1): 57- 64.
 32. Carmody M, Jones M, Tarraza H, Vary C. Use of the polymerase chain reaction to specifically amplify integrated HPV-16 DNA by virtue of its linkage to interspersed repetitive DNA. *Mol Cell Probes*. 1996; 10 (2): 107-116.
 33. Klaes R, Woerner S, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A. Detection of high risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*. 1999; 59 (24): 6132-6136.
 34. Fuji T, Masumoto N, Saito M, Hirao N, Niimi S, Mukai M, et al. Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol*. 2005; 14 (2): 103- 108.
 35. Yu MY, Tong JH, Chan PK, Lee TL, Chan MW, Chan AW et al. Hypermethylation of the tumor suppressor gene RASSF1A and frequent concomitant loss of heterozygosity at 3p21 in cervical cancers. *Int J Cancer*. 2003; 105 (2): 204-209.
 36. Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, et al. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogen*. 2003; 22 (46): 7233-7242.
 37. Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005; 158(1): 27-34.
 38. Roa J, Martínez R, Montenegro S, Roa I, Capurro I, Ibacache G, et al. Inestabilidad microsatelital en lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino. Correlación con el genotipo del virus papiloma humano. *Rev Méd Chile*. 2007; 135 (1): 37-44.
 39. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uterine. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(9): 3059-3063.
 40. Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol*. 2004; 202 (1): 23-33.
 41. Pett MR, Alazawi WO, Roberts I, Downen S, Smith DI, Stanley MA, et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res*. 2004; 64 (4):1359-1368.
 42. Elhamidi A, Hamoudi R, Kocjan G, Du M. Cervical Intraepithelial neoplasia: prognosis by combined LOH analysis of multiple loci. *Gynecol Oncol*. 2004; 94 (3): 671-679.
 43. Hua Y, Larsen N, Kalyana-Sundaram S, Kjems J, Chinnaiyan A, Peter M. miRConnect 2.0: identification of oncogenic, antagonistic miRNA families in three human cancers. *BMC Genomics*. 2013; 14:179-197.
 44. Wang X, Wang HK, Li Y, Hafner M, Banerjee NS, Tang S et al. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(11): 4262-4267.
 45. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; 429 (6990): 457-463.
 46. Kalantari M, Osann K, Calleja-Macías I, Kim S, Yan B, Jordan S et al. Methylation of human papillomavirus 16, 18, 31, and 45 L2 and L1 genes and the cellular DAPK gene: Considerations for use as biomarkers of the progression of cervical neoplasia. *Virology*. 2014; 448: 314-321.
 47. Sartor M, Dolinoy D, Jones T, Colacino J, Prince M, Carey T, et al. Genome-wide methylation and expression differences in HPV (+) and HPV (-) squamous cell

- carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. *Epigenetics*. 2011; 6 (6): 777-787.
48. Feber A, Arya M, de Winter P, Saqib M, Nigam R, Malone P, et al. Epigenetics markers of metastasis and HPV-induced tumorigenesis in penile cancer. *Clin Cancer Res*. 2015; 21 (5):1196-1206.
 49. Flatley J, McNeir K, Balasubramani L, Tidy J, Stuart E, Young T, et al. Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18 (10): 2782-2789.
 50. Yang N, Nijhuis E, Volders H, Eijnsink J, Lendvai A, Zhang B, et al. Gene promoter methylation patterns throughout the process of cervical carcinogenesis. *Cell Oncol*. 2010; 32 (1-2): 131-143.
 51. Eijnsink J, Yang N, Lendvai A, Klip H, Volders H, Buikema H, et al. Detection of cervical neoplasia by DNA methylation analysis in cervico-vaginal lavages, a feasibility study. *Gynecol Oncol*. 2011; 120 (2): 280-283.
 52. Kalantari M, Calleja-Macias I, Tewari D, Hagmar B, Lie K, Barrera-Saldana H, et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol*. 2004; 78 (23): 12762-12772.
 53. Clarke M, Wentzensen N, Mirabello L, Ghosh A, Wacholder S, Harari A, et al. Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012; 21(12): 2125–2137.
 54. Jiménez-Wences H, Peralta-Zaragoza O, Fernández-Tilapa G. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer. *Oncol Rep*. 2014; 31 (6): 2467-2476.
 55. Shivapurkar N, Toyooka S, Toyooka K, Reddy J, Miyajima K, Suzuki M, et al. Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *Int J Cancer*. 2004; 109 (5): 786-792.
 56. Narayan G, Xie D, Ishdorj G, Scotto L, Mansukhani M, Pothuri B, et al. Epigenetic inactivation of TRAIL decoy receptors at 8p12-21.3 commonly deleted region confers sensitivity to Apo2L/trail-Cisplatin combination therapy in cervical cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015; 55 (2): 178-189.
 57. Ciocca D, Calderwood S. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive and treatment implications. *Cell Stress and Chaperones*. 2005; 10 (2): 86–103.
 58. Vallespi M, García I. Las proteínas de estrés térmico en la inflamación y el cáncer. *Biotecnología Aplicada*. 2008; 25: 199-207.
 59. Instituto Nacional del Cáncer. Bethesda: Diccionario de cáncer. [2015, consulta noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=471775>.
 60. Liu D, Tsao Y, Kung J, Ding Y, Sytwu H, Xiao X, et al. Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. *J Virol*. 2000; 74 (6): 2888-2894.
 61. Kim K, Jang T, Kim J. HSP70 and ER expression in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Korean Med Sci*. 1998; 13(4):383-388.
 62. Hwang Y, Lee S, Kim S, Choi Y, Kim M, Lee C. Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer. *Yonsei Med J*. 2009; 50(3): 399–406.
 63. Fresno M. Moléculas de adhesión en carcinoma de colon. [Internet] Oviedo: ICVHAP 1997. [Consultado noviembre 2015] Disponible en: <http://www.conganat.org/icongreso/conferencias/009/index.html>
 64. Fullár A, Dudás J, Oláh L, Hollósi P, Papp Z, Sobel G, et al. Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC Cancer*. 2015; 15: 256.
 65. Skyldberg B, Salo S, Eriksson E, Aspenblad U, Moberger B, Tryggvason K, et al. Laminin-5 as a marker of invasiveness in cervical lesions. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91 (21): 1882–1887.
 66. Giannelli G, Antonaci S. Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2000; 18(6): 439-443.
 67. Andersson S, Hellström A, Angström T, Stendahl U, Auer G, Wallin K. The clinicopathologic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in cervical squamous carcinoma and adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2005; 15 (6): 1065-1072.