

# Infeción por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis

Marcela Lizano-Soberón<sup>1</sup>, Adela Carrillo-García<sup>1</sup> y Adriana Contreras-Paredes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

## Resumen

EL CÁNCER CÉRVICO UTERINO (CaCu) ocupa los primeros lugares como causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Una infección persistente de virus del papiloma humano (VPH) de tipos virales de alto riesgo oncogénico, es el factor etiológico principal en el desarrollo de esta neoplasia. Se conoce que solamente una pequeña fracción de lesiones cervicales infectadas con VPHs de alto riesgo evolucionan a lesiones de alto grado o cáncer.

Diversos estudios de la historia natural del cáncer cérvico uterino pretenden definir los factores de riesgo y marcadores moleculares que predigan el comportamiento de una lesión premaligna asociada con la infección de VPH. Los papilomavirus son pequeños virus de DNA, de doble cadena, cuya actividad transformante se explica principalmente por la actividad de sus oncoproteínas E6 y E7. Estas proteínas se unen a un sin número de reguladores celulares importantes en el control de procesos biológicos como: la apoptosis, proliferación celular, estabilidad cromosómica, transcripción de genes (oncogenes y genes supresores de tumor), diferenciación celular y la respuesta inmunológica, entre otros. Debido a que la expresión constitutiva de estas proteínas, es necesaria para la progresión del cáncer cervical, resulta un gran interés el descifrar las intrincadas redes de interrelaciones de E6 y E7 con las proteínas del huésped.

## Abstract

Cervical Cancer is one of the first causes of cancer mortality in Mexican women.

An infection with a high-risk Human Papillomavirus (HPV) is the major etiological agent of cervical cancer. It is well known that only a small number of cervical lesions infected with high risk HPVs evolve to higher-grade lesions or cancer. Several Studies involving the natural history of cervical cancer aim to determine the risk factors and molecular markers predicting the behavior of an HPV associated premalignant lesion.

Human papillomavirus are small double stranded DNA virus, whose transforming activities are explained mainly through its oncoproteins E6 and E7. These proteins bind to a vast number of cellular proteins important in controlling biological processes as: apoptosis, proliferation, chromosomal stability, gene transcription (oncogenes and suppressor genes), cellular differentiation, and immune response, among others.

Since constitutive expression of E6 and E7 is necessary for cervical cancer progression, it is a main concern to decipher the complex crosstalking cellular networks involved with these proteins.

**Key words:** Human Papillomavirus, cervical cancer, oncogenes.

**Palabras Clave:** Virus de papiloma humano, cáncer cervical, oncoproteínas

### Correspondencia:

**Marcela Lizano-Soberón**

Instituto Nacional de Cancerología,  
San Fernando # 22. Col. Sección XVI, Tlalpan. C.P. 14080. México D.F.  
e-Mail: lizano@servidor.unam.mx

Desde hace casi 30 años se sugirió que el Virus del Papiloma Humano (VPH) era el agente causal del cáncer del cérvix uterino. Esta idea le concedió el Premio Nobel en 2009 al profesor Harald zur Hausen (1). Actualmente se ha establecido que la infección persistente por tipos oncogénicos de VPH es la causa necesaria del cáncer del cérvix.

Mediante múltiples estudios epidemiológicos, moleculares y clínicos se ha demostrado que esta neoplasia es una secuela de una infección no resuelta de ciertos genotipos de VPH (2). En esencia todos los cánceres de cérvix contienen DNA de algún tipo de VPH de alto riesgo.

### *Epidemiología*

Los papilomavirus han cohabitado con la especie humana a través de miles de años, sufriendo pocos cambios en su composición genómica. Basado en el análisis de secuencia de DNA, se han reconocido más de 100 genotipos de VPH que causan un diverso rango de lesiones epiteliales. A nivel evolutivo todos los papilomavirus que se conocen se han agrupado en 16 géneros y los VPH se agrupan en 5 de estos géneros. Los dos géneros de VPH más importantes son los papilomavirus Alpha ( $\alpha$ ) y los Beta ( $\beta$ ). La mayoría de los VPH que infectan área genital pertenecen al género Alpha (3). El análisis de los genotipos de VPH resulta importante por distintas razones, dentro de éstas se encuentra que los VPH son tejido específicos y en general producen diferentes tipos de lesiones. Cerca de 35 tipos de VPH se identifican en lesiones benignas y malignas del tracto anogenital tanto en hombres como en mujeres; además, quince de estos tipos virales se asocian en diferente grado al cáncer de cérvix. El papilomavirus tipo 16 es el más prevalente de los VPH oncogénicos, responsable de más de la mitad de los tumores, mientras que el papilomavirus tipo 18 está involucrado en el 20% de los mismos (4). Resulta relevante mencionar los resultados de un estudio que involucró cerca de 2,000 mujeres de 9 países con diagnóstico confirmado de carcinoma escamoso de cérvix, así como 2,000 controles, el cual fue realizado con el fin de establecer la clasificación

epidemiológica de los diferentes tipos de VPH que colonizan el tracto genital humano (5). El panorama general fue que son pocos los tipos de VPH que contribuyen a las infecciones en el tracto anogenital y que generalmente se encuentran tanto en personas asintomáticos como en pacientes con cáncer. En el caso de los pacientes, los tipos virales más frecuentes fueron: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35; mientras que en el caso de los controles, los más prevalentes fueron los tipos: 16, 18, 45, 31, 6, 58, 35 y 33. En conclusión, fue propuesto que además de los tipos 16 y 18, los VPH-31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 deben de ser considerados oncogénicos (carcinogénicos) o tipos de “alto-riesgo”; mientras que los tipos 26, 53 y 56 son “probablemente de alto-riesgo”.

Los VPH también han sido implicados en el desarrollo de tumores malignos en sitios distintos a la región anogenital, como ano, vagina, vulva y pene e incluso cavidad bucal, pero con una fracción atribuible considerablemente menor a la del cáncer de cérvix, en el cual virtualmente el 100% de los cánceres son causados por VPH (Revisado por Parkin DM y col., 2006) (6).

La presencia de VPH también se ha correlacionado con otros tumores como el carcinoma escamoso de la conjuntiva, vejiga y uretra, pulmón, retina, mama, próstata, ovario y endometrio. Sin embargo, el papel de VPH en estos tumores es muy controvertido y no está descartada la posibilidad de contaminación en los resultados obtenidos por los diferentes estudios (Revisado por Trottier y col., 2009) (7) Por este motivo, resulta necesario obtener evidencia adicional que permita definir la asociación entre VPH y el riesgo subsecuente a estos tumores.

Las mujeres sexualmente activas, de cualquier edad, pueden infectarse con VPHs oncogénicos (8). Sin embargo, el cáncer de cérvix invasor en mujeres jóvenes infectadas con virus oncogénicos es raro y la prevalencia de VPH en mujeres de 40 años o mayores no se correlaciona con la alta tasa de cáncer cervical. Es la persistencia de VPHs oncogénicos lo que da lugar al desarrollo de lesiones precancerosas

y potencialmente al cáncer invasor, lo que puede llevar varios años para su desarrollo.

El cáncer de cérvix ocurre en dos formas predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinoma. El tipo histológico más comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está más frecuentemente asociado al VPH 16. El adenocarcinoma es el segundo tipo histológico más común y aunque el VPH tipo 16 también es el más frecuente, la proporción de los genotipos 18 y 45 aumenta significativamente en este tipo de tumores (4). Los estudios de citología, que incluyen a la prueba Pap convencional, se utilizan para detectar lesiones precancerosas, pero no es suficiente para detectar infecciones por VPH. Es claro que, el adenocarcinoma es más difícil de detectar por Pap que el carcinoma escamoso (9).

### *Historia Natural de la Infección por VPH*

La infección por VPH esencialmente es una enfermedad de transmisión sexual. De esta manera, tanto hombres como mujeres están involucrados en la cadena epidemiológica de la infección, pudiendo ser acarreadores asintomáticos, transmisores y también víctimas de la infección por VPH. Es por ello que los factores asociados con la infección por VPH esencialmente están relacionados con el comportamiento sexual, como es la edad de inicio de vida sexual, un alto número de parejas sexuales a lo largo de la vida, o contacto sexual con individuos de alto riesgo (10). Las infecciones genitales por VPH pueden detectarse en cérvix, vagina y vulva en mujeres; glánde, prepucio y piel del pene y escroto en hombres; y en canal anal y perianal tanto de mujeres como de hombres.

Aun cuando en personas jóvenes la infección por VPH es muy frecuente, la mayoría de las mujeres infectadas resuelven la infección espontáneamente (alrededor del 90%), persistiendo solo en una pequeña fracción de las mujeres (11). Es este grupo de acarreadoras crónicas de VPH de alto riesgo quienes presentan un riesgo incrementado de desarrollar lesiones del tracto anogenital. Algunos determinantes que han sido asociados a la progresión de las lesiones

son: tipo viral y variaciones intra-tipo de VPHs de alto riesgo, integración del genoma viral al celular y probablemente carga viral. Otros factores adicionales incluyen la alta paridad, tabaquismo y dieta pobre en vitaminas y minerales (12-14).

Muchos tipos de VPH inducen solamente lesiones productivas y no se asocian a cáncer humano. En dichas lesiones, la expresión de los productos de los genes virales se encuentra cuidadosamente regulada, de modo que las proteínas virales se expresan en momentos definidos y en cantidades controladas a medida que la célula infectada migra hacia la superficie epitelial. Los eventos que dan lugar a la producción de partículas virales en las capas superiores del epitelio, parecen ser comunes tanto en virus de alto como de bajo riesgo oncogénico. De esta manera, el cáncer es una consecuencia poco frecuente de la infección por VPH y los eventos iniciales que conducen a la transformación maligna por virus oncogénicos no están del todo esclarecidos. Una posibilidad es que la zona de transformación del cérvix es un sitio del epitelio donde los VPH de alto riesgo no logran regular apropiadamente su ciclo productivo; por lo tanto, la variación tanto en el nivel de expresión de las proteínas virales, como del momento en que esta expresión ocurre, puede repercutir en el desarrollo de cánceres en estos sitios.

Después de una infección natural solo la mitad de las mujeres desarrollan anticuerpos contra VPH detectables, los cuales probablemente no son protectores (15). Los VPH infectan el epitelio cervical sin entrar en la circulación, por lo que las partículas no se exponen eficazmente al sistema inmune. Como resultado, la vigilancia inmunológica típica, que involucra el tráfico de células especializadas desde el sitio de la infección hasta órganos linfoides secundarios, se encuentra limitada o abatida. Aunado a esto, una vez dentro de la célula, la partícula del papilomavirus puede utilizar múltiples mecanismos para abatir la respuesta inmune que es necesaria para la eliminación de la infección (16).

Los papilomavirus humanos también pueden alojarse de forma latente en las células epiteliales, evadien-

do la detección por el sistema inmune y permitiendo una reactivación futura. Actualmente, solo hay evidencias indirectas de las infecciones latentes de VPH en humanos, pero se especula que aun cuando el VPH no pueda ser detectado en una muestra en un momento dado, permanece la posibilidad de que el virus se encuentre en forma latente. La reactivación de infecciones latentes de VPH se ha reportado en pacientes inmunocomprometidos (17).

La historia natural del cáncer cérvico uterino implica la progresión gradual de una serie de etapas secuenciales en que las células del cérvix presentan ciertas anormalidades histológicas conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical, NIC I (displasia leve), NIC II (displasia moderada), NIC III (displasia severa/carcinoma in situ) y finalmente un cáncer invasor (18). La etiopatogenia de esta enfermedad se ha investigado detalladamente gracias al avance de la biología celular, molecular e inmunología. Estos avances han permitido conocer el papel del virus del papiloma humano en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino.

La infección por el virus de papiloma humano se puede clasificar en: primero una infección latente, que se caracteriza por la presencia de VPH en las células o tejidos que son aparentemente normales y sin ninguna manifestación de enfermedad. Sin embargo el virus esta ahí y en ocasiones puede ser detectado por técnicas específicas como Hibridación in situ o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente la infección subclínica se manifiesta por cambios microscópicos en el epitelio cervical (coilocitos, displasias) detectados en las citologías o cortes histológicos de los tejidos afectados. La presencia de VPH en este punto se puede verificar mediante el uso de un colposcopio que evidencia cambios de coloración en el cuello uterino después de aplicar una solución de ácido acético; estos cambios se asocian a la infección con VPH y una posible lesión premaligna. Finalmente la infección clínica se manifiesta por la aparición de tumores visibles y es en esta etapa donde podemos encontrar gran cantidad de tejido

positivo para VPH (19). Estos virus se encuentran viables y con capacidad de infectar otros tejidos. Sin embargo, no siempre la enfermedad se manifiesta durante esta última etapa ya que varios casos llegan a permanecer en periodo de latencia o subclínico, tiempo durante el cual se puede adquirir un estado de resistencia o regresión de las lesiones, o bien de progresión hacia un cáncer invasor (20).

Numerosos estudios han demostrado que la infección persistente con VPH parece ser de suma importancia en el desarrollo y avance de lesiones precancerosas a cáncer invasor, y que este proceso puede tomar de 1-10 años (19). Aun no existe un consenso en la definición precisa de una infección persistente por VPH; sin embargo la asociación con neoplasia intraepitelial cervical es más fuerte para una persistencia de 12 meses, que para una de 6 meses, aunque esta relación puede variar dependiendo del tipo viral (21). Algunos datos sugieren que el VPH 16 persiste en promedio mucho más tiempo infectando el epitelio en comparación con otros tipos de VPH (22), de tal manera que aquellas lesiones que presentan VPH16 podrían progresar a un cáncer más rápidamente que aquellas que no presentan VPH o tienen otro tipo viral. De igual manera se reporta que las infecciones con papilomavirus oncogénicos persisten por más tiempo que los no oncogénicos (19). Se ha demostrado que la infección con VPHs oncogénicos tiene un promedio de duración aproximada de 8 meses, mientras que la duración con VPHs no oncogénicos se estima en 4 meses (19).

Estudios transversales de la historia natural del cáncer cervical indican que cerca del 85% de las lesiones cervicales de alto grado presentan DNA de VPH, mientras que el 100% de los cánceres invasores de cérvix contienen secuencias de estos virus (23). De igual forma la prevalencia de VPH por grupos de edad muestra una distribución similar a su incidencia. En mujeres jóvenes la incidencia es alta y se acompaña además con infección de múltiples tipos de VPH, mientras que hay una disminución en la detección de VPH en los grupos de mujeres pre y postmenopáusicas (24, 25).

Actualmente se ha desarrollado la primera generación de vacunas profilácticas contra VPH, que incluye a la vacuna bivalente (contra VPH16 y 18) y la tetravalente (contra VPH16, 18, 6 y 11). Estas vacunas han mostrado una reducción significativa en el desarrollo de lesiones del cérvix, vagina, vulva y región anogenital (26). Sin embargo, para determinar su eficacia en la incidencia y mortalidad por cáncer cérvico-uterino, se requiere de un seguimiento a largo plazo.

Diversos estudios de la historia natural del cáncer cérvico uterino pretenden definir los factores de riesgo y marcadores que de alguna forma indiquen el comportamiento de una lesión premaligna. Los hallazgos al respecto repercutirán en un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno de las lesiones precursoras de cáncer cérvico uterino.

### *Participación del VPH en la Carcinogénesis Cervical*

Los virus del papiloma son pequeños virus de DNA de doble cadena, sin envoltura, cuyo genoma está constituido por aproximadamente 7200-8000 pb, el cual se divide en tres regiones: una región temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la replicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular, una región Tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (Long Control Region), que contiene la secuencia de DNA que permiten el control de la replicación y de la expresión del genoma viral (27).

El mecanismo de acción de los HPV de alto riesgo en el desarrollo de la neoplasia cervical, se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales E6 y E7. Estas tienen la capacidad de inmortalizar y transformar queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica. La expresión continua de estos genes, es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células del cérvix. Estudios del mecanismo molecu-

lar del proceso de transformación, han revelado un complejo patrón de interacciones de estas proteínas virales con reguladores celulares, envueltos en procesos biológicos como: la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular (28). Se considera que el proceso de integración del genoma del VPH al genoma de la célula hospedera es el evento fundamental en la progresión a cáncer (29), debido a la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 por la pérdida de E2, proteína implicada en su regulación.

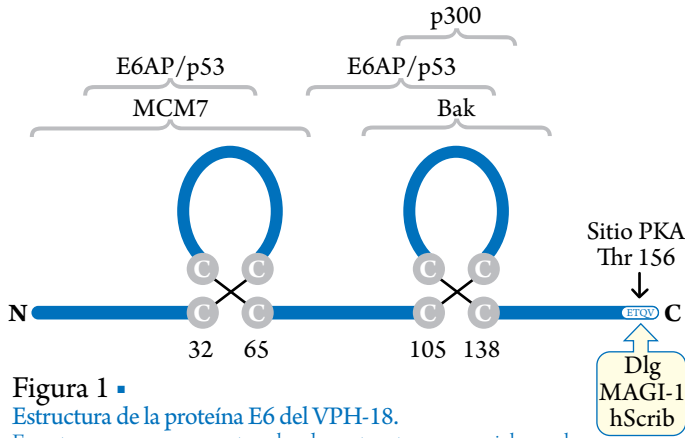
### *Características de la Proteína E6*

El gen E6 codifica para una proteína de aproximadamente 150 aminoácidos y contienen dos motivos de zinc altamente conservados, caracterizados por la presencia del motivo Cys-X-X-Cys, cuya integridad es esencial para su función (*Figura 1*) (30-31).

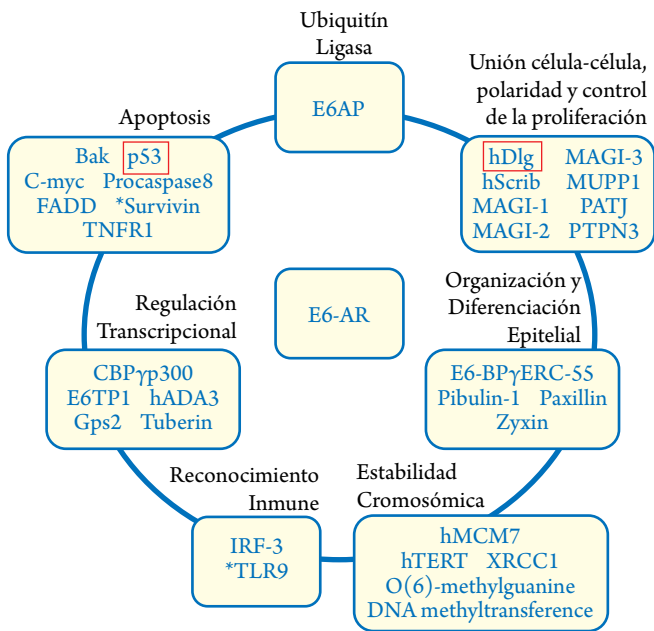
El gen E6 es uno de los primeros que se expresan durante el ciclo viral y tiene la capacidad de unirse a un sin número de blancos celulares que se muestran en la figura 2, lo que le permite bloquear la apoptosis, regular la transcripción viral, abatir la diferenciación celular y las interacciones célula-célula, e incrementar la inestabilidad cromosómica (32-35). Todos estos procesos fundamentales en el establecimiento de la carcinogénesis cervical (*Figura 2*).

### *Efecto de E6 sobre la Proliferación Celular*

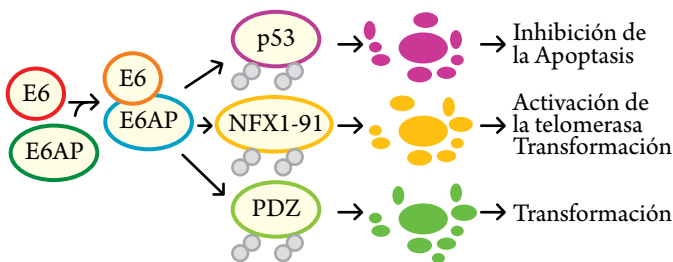
E6 puede activar la telomerasa, una ribonucleoproteína con función enzimática, importante para el mantenimiento de las estructuras teloméricas contenidas al final de los cromosomas. La actividad la subunidad catalítica de la transcriptasa reversa de la telomerasa (hTERT), se presenta en más del 90% de las células inmortalizadas y cancerosas, pero está ausente en las células somáticas normales (36). La pérdida de la actividad de la telomerasa en células normales, produce una erosión progresiva del DNA telomérico al final de los cromosomas, debido a una replicación incompleta del DNA. Finalmente, este fenómeno provoca inestabilidad cromosómica y la senescencia. El acortamiento de los telómeros sirve como un "reloj mitó-



**Figura 1 ■**  
Estructura de la proteína E6 del VPH-18. En este esquema se muestran las dos estructuras esenciales en la actividad de E6: sus dos dedos de zinc, como estructuras fundamentales para la interacción de la proteína con un gran número de blancos celulares y el carboxilo terminal, el cual contiene el sitio de unión a proteínas con dominios PDZ. Fuente: De la Cruz y Lizano, 2004 (31).



**Figura 2 ■**  
Proteínas celulares con las que interacciona la oncoproteína E6 de VPHs de alto riesgo.



**Figura 3 ■**  
Blancos celulares de la oncoproteína E6 de VPHs de alto riesgo involucrados en la transformación celular. La formación del complejo E6-E6AP facilita la degradación mediada por la ubiquitinación de las proteínas con dominios de unión PDZ, p53 y NFX1-9.

El complejo E6-E6AP, el cual es responsable de la regulación del ciclo de vida normal de la célula (37-38). La oncoproteína E6, es capaz de inducir la transcripción y la activación de hTERT, por un mecanismo que aunque aún no ha sido completamente dilucidado, se ha propuesto esta mediado por la degradación de NEX1-91 (repressor del promotor de hTERT), la cual es inducida por E6 al unirse con la proteína E6AP (39) (Figura 3).

La proteína E6, puede asociarse con el producto del gen supresor de tumores p53 y marcarlo para su degradación. El análisis de tumores humanos ha revelado que p53 es de los genes comúnmente mutados. Las condiciones de estrés celular como radiación UV, hipoxia o infecciones virales inducen a la proteína p53: la cantidad de la proteína puede ser incrementada por estabilización post-transcripcional, produciendo un bloqueo celular en la fase G1. Este bloqueo, permite a la célula reparar el daño al DNA antes de que el ciclo celular continúe (34).

La proteína p53, es un factor transcripcional que estimula la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y apoptosis, por ejemplo, es inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas (p21) (33). E6 se une a p53 y la conduce a su degradación a través de la vía de la ubiquitina. En este proceso, también participa la proteína celular asociada a E6 (E6-AP), que actúa como una ubiquitín ligasa (40).

Las mutantes de E6-AP incapaces de unirse a E6 no pueden interactuar con p53 y las proteínas mutantes de p53 que no se unen a E6, no son susceptibles a la degradación inducida por E6-AP, señalando que E6 es requerida para mediar la interacción p53/E6-AP. E6 al unirse a p53 también puede producir su retención en el citoplasma, bloqueando su translocación hacia el núcleo y por tanto inhibiendo su función, independiente del proceso de degradación (34).

La interacción de E6-p53 es importante para la progresión del ciclo celular. El gen p14, un producto alternativo de p16, es un supresor de tumores que induce el paro celular a través de p53, causando una eleva-

ción en los niveles de p21 y finalmente el paro en las fases G1 o G2. A diferencia de las células normales, en fibroblastos que expresan E6, pueden omitir el paro en el ciclo celular y continuar la proliferación a pesar de los altos niveles de p14. El análisis del mecanismo de E6 para abolir esta señal de paro celular, ha revelado que se trata de una ruta dependiente de p53 en la que existe un mecanismo de represión de los promotores de la ciclina B y cdc2.

La oncoproteína E6, también ha sido implicado en la prevención de apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de p53. Esta proteína, es capaz de unirse a Bak (un miembro pro apoptótico de la familia Bcl-2) a través de un mecanismo independiente de p53 y degradándolo muy probablemente por su reclutamiento, por medio de la proteína E6-AP vía ubiquitinación. Estudios bioquímicos, han revelado que Bak puede unirse a E6-AP en ausencia de E6, a diferencia de p53 (41).

Otro mecanismo por el cual la oncoproteína E6, podría estar regulando la apoptosis es a través de su unión con la proteína pro-apoptótica c-myc (42), a la cual marca para su degradación induciendo un aumento en la proliferación de las células infectadas. La proteína E6, también puede ejercer su efecto en apoptosis mediante la regulación negativa de la transcripción de otras proteínas pro-apoptóticas como la survivina (43).

La proteína E6 se puede unir a componentes de la maquinaria apoptótica de las células infectadas, como la molécula adaptadora FADD (Fas-associated death domain) y la pro-caspasa 8. Específicamente, E6 se une a los dominios de muerte DEDs de ambas proteínas y media su degradación, lo que evita que estas proteínas participen en la transmisión de la señal apoptótica (44).

### *E6 en la Regulación de la Transcripción Viral y Celular*

La oncoproteína E6 es capaz de regular positiva y negativamente la transcripción de genes celulares y virales. E6 interactúa con la proteína CBP, la cual puede activar la transcripción al menos por dos mecanismos:

la acetilación de histonas y proteínas no histonas y por la inducción de la unión de factores de transcripción a componentes de la maquinaria de transcripción basal. La unión de E6 a CBP, puede evitar ambos mecanismos. Cuando E6 se une a CBP, puede prevenir la acetilación de p53 mediada por CBP, reduciendo su afinidad por sitios de unión a DNA (33).

Por otro lado, E6 tiene la capacidad de interactuar con el complejo CBP/p300, provocando un bloqueo en sus actividades. CBP/p300 activa la transcripción dependiente de CREB, por medio del reclutamiento de la RNA helicasa A, un componente del complejo de la RNA polimerasa II, con un promotor con un sitio de unión a CREB. E6 compite por este sitio de unión con la RNA helicasa A, previniendo así su activación. La represión de la maquinaria transcripcional, afecta a una gran variedad de genes, especialmente a aquellos envueltos en la diferenciación celular y en la producción de citocinas involucradas en la señalización de la respuesta inmune (32).

La oncoproteína E6 se puede unir e inhibir la acción de otros coactivadores transcripcionales como hDAD3, que es crítico para reclutar a las acetilasas de histonas, involucradas en la expresión de genes supresores de tumor. La acción de E6 al unirse a hDAD3 podría inhibir la expresión de estos supresores de tumor (32).

La proteína E6, al igual que muchos oncogenes, aumenta la actividad del promotor del gen de VEGF y por tanto, su transcripción. VEGF es uno de los inductores más importantes en la angiogénesis: un proceso esencial para el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos un pre-requisito fundamental para la expansión progresiva de los tumores (45). El efecto estimulante de E6 sobre el promotor de VEGF puede tener un efecto positivo en la actividad de otros factores de transcripción como Sp-1. E6 también puede contribuir incrementado la señal de VEGF por interferir con la degradación mediada por la ubiquitinación del factor inducible de hipoxia 1alfa (HIF-1 $\alpha$ ): un factor de transcripción involucrado en la activación del promotor de VEGF en respuesta a hipoxia (46).

### *Contribución de E6 en la Pérdida de la Organización Epitelial y Diferenciación Celular*

La organización epitelial es muy importante en control del crecimiento y la proliferación en células normales y la pérdida de esta, en células infectadas por los VPHs de alto riesgo, favorece la duplicación del genoma viral. La oncoproteína E6 de HPV de alto riesgo, se une e inactiva varias proteínas involucradas en preservar la estructura epitelial, como la paxilina (47). Esta proteína que forma parte de las uniones de adhesión focal, participa en la organización de las fibras de actina y en la organización del citoesqueleto. La unión de E6 a esta proteína induce la pérdida de la integración epitelial, lo cual contribuye a la transformación viral (48). Además E6 tiene la capacidad de interactuar y evitar la función de proteínas que se unen a calcio, ERC-55 o E6-BP (49), lo cual evita que las células epiteliales sufran una diferenciación terminal. La unión de E6 a este grupo de proteínas en su conjunto, reduce la habilidad de las células infectadas para adherirse a la matriz extracelular, desarrollar una morfología normal, incrementar su capacidad duplicativa y por lo tanto su transformación.

### *La proteína E6 como mediadora de la respuesta inmune*

La proteína E6 interfiere con el sistema inmune para evitar el reconocimiento de células infectadas y con esto facilitar la supervivencia del virus y evita su eliminación. E6 interactúa con el factor regulador de interferón (IRF-3) (50). Cuando las células infectadas son detectadas por el sistema inmune, el IRF-3 induce su progresión a apoptosis, cuando E6 se une al IRF-3, evita su activación y su capacidad para inducir la muerte celular. Por otro lado, se ha reportado que la oncoproteína E6 es capaz de inhibir la transcripción de genes que codifican para receptores involucrados en la transducción de señales inducidas por el reconocimiento de patógenos como son los TLR (toll-like receptors) (51). Estas interacciones de E6 con las diferentes proteínas del sistema inmune, dan como resultado en una inhibición de la apoptosis y una persistencia del virus en la célula huésped, aspecto importante en la tumorigénesis celular.

### *E6 como Reguladora de la Unión Célula-Célula y la Polaridad Celular*

El potencial oncogénico de los HPV de alto riesgo, ha sido vinculado a la capacidad de la oncoproteína E6 para unirse a proteínas que controlan la adhesión, la polaridad y la proliferación celular; un ejemplo de esto es la capacidad que posee E6 de los VPHs de alto riesgo para unirse e inducir la degradación de proteínas de la familia MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) (52). Estas son proteínas andamio, que están localizadas en las regiones de contacto célula-célula como los sitios de unión entre células epiteliales. Se ha demostrado que estas proteínas son fundamentales para mantener la adhesión y polaridad celular, así como la estructura del cito-esqueleto, aspectos fundamentales en el control de la proliferación celular, la pérdida de estas características celulares puede contribuir al establecimiento de un proceso de carcinogénesis (32).

### *Características de las proteínas E7*

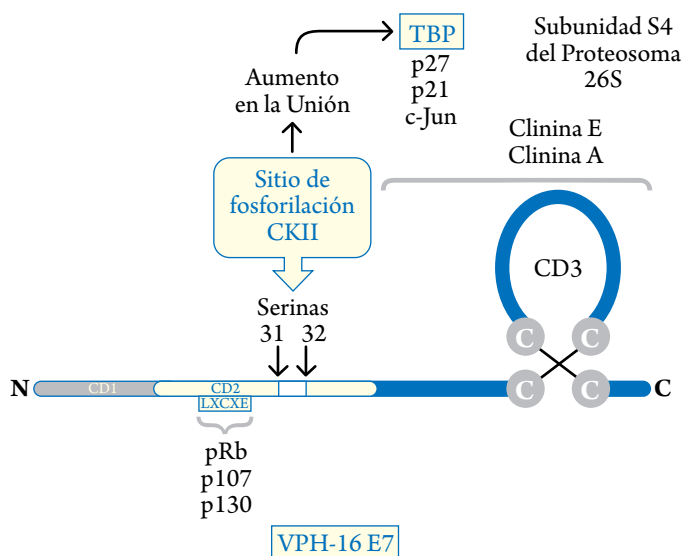
Las proteínas E7 de alto riesgo, son pequeños polipéptidos de aproximadamente 100 aminoácidos. Al igual que E6, E7 poseen un sitio con motivos de dedos de zinc en su extremo carboxilo terminal, el cual se utiliza para su dimerización. La proteína E7, es fosforilada por la caseína II (CK II) en el dominio N-terminal (53).

E7, está conformada por tres dominios llamados CD1, CD2 y CD3, basados en la homología con la proteína E1A del adenovirus (*Figura 4*). La región amino terminal de la proteína E7 del HPV 16, tiene homología con las proteínas Ad E1A y SV40 TAg. Estos dominios conservados, son críticos para las actividades transformantes para cada una de estas oncoproteínas, a través de estos dominios, estas proteínas interactúan con una gran variedad de proteínas celulares, incluyendo al producto del gen supresor de tumores del retinoblastoma pRb (54).

### *E7 en la Regulación del Ciclo Celular*

La proteína pRb, es un miembro de la familia de "proteínas de bolsillo" que incluye a p107 y p130.





**Figura 4 ■**  
Estructura de la proteína E7 del HPV-16. Se muestran sus tres dominios altamente conservados (CD1-CD3) y sus sitios de interacción con sus blancos celulares. Fuente: De la Cruz y Lizano 2004 (31).

Estas proteínas contienen regiones homólogas para su unión a E7 del VPH. La proteína supresora de tumores pRb, es la más estudiada dentro de esta familia y es el principal regulador negativo del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S.

El estado de fosforilación de pRB, se regula a través del ciclo celular. La proteína pRb, se fosforila en múltiples residuos de serina por ciclinas dependientes de cinasas en los límites G1/S y durante las fases S, G2, y M. Al final de la fase M, es defosforilada por una fosfatasa específica. En este estado de hipofosforilación, la proteína se encuentra activa y se evita la progresión a la fase S del ciclo celular (55).

La proteína E7, establece un complejo con la forma hipofosforilada de pRB, e induce su degradación. La inactivación de pRb induce la activación constitutiva del factor de transcripción E2F, el cual induce la activación de genes involucrados en la síntesis de DNA, durante la fase S del ciclo celular.

El mecanismo por el cual, la proteína E7 induce la degradación de pRb aún no ha sido completamente dilucidado, sin embargo, recientes estudios ha demostrado que esta actividad de E7, esta mediada por la proteasa de cisteínas

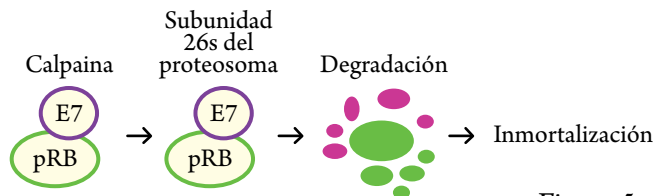
activada por calcio, llamada calpaína, la cual es reclutada por E7, antes de unirse a pRb (55-56) (Figura 5).

Un mecanismo importante en la regulación de la transcripción, esta dado por la remodelación de la cromatina a través de la acetilación por histonas. Los genes con alta actividad transcripcional, tienen un nivel alto de acetilación, como es el caso de pRb, el cual es acetilado por los coactivadores p300 y p/CAF (Factor asociado a p300). Esta modificación es necesaria para la participación de pRB en la diferenciación celular y es independiente de la actividad de E2F (57).

Se sabe que, la proteína E7 interactúa con p/CAF y reduce su actividad de acetiltransferasa, a si mismo, se ha reportado que esta enzima funciona como un coactivador de la transcripción de otros genes como p53, así que su inactivación además de la degradación de pRb, podrían explicar supresión de la diferenciación de los queratinocitos inducida por E7 (58).

La proteína E7, posee otras funciones independientes de pRb, como su unión a miembros de la familia de factores de transcripción AP-1, como c-jun, junB, junD y c-fos, todos ellos, cruciales en las vías de señalización relacionadas con proceso mitogénico y de diferenciación celular. E7 se une a c-jun y activa a su promotor por un mecanismo de transactivación.

El efecto de E7 en la progresión del ciclo celular vía factores de transcripción AP-1, puede ser independiente de pRb o dependiente de este. El mecanismo dependiente de pRb, se presenta por que el promotor de c-jun, contiene sitios AP-1, que son regulados por el complejo pRb/c-Jun. La unión de c-jun a los sitios AP-1 a través de pRb, produce la activación de



**Figura 5 ■**  
La degradación de pRB mediada por E7 esta mediada por la proteasa de cisteínas calpaína. El reclutamiento de la calpaína por E6 promueve un corte inicial de pRB, el cual es necesario para su posterior degradación por el proteosoma.

promotores inducidos por c-jun. En presencia de E7, este mecanismo de activación transcripción, es inhibido. El mecanismo de acción de E7 independiente de pRb, consiste en la unión de esta oncoproteína a c-jun, lo cual potencia la transactivación de genes involucrados en la progresión del ciclo celular y la mitosis (59).

### *Efecto de E7 en la Apoptosis*

Varios trabajos, han reportado la capacidad de E7 para inhibir de manera eficiente la apoptosis en queratinocitos. Este efecto lo lleva a cabo por varios mecanismos, el más conocido es el que se relaciona con su capacidad para producir una desregulación de E2F, a través de su interacción con pRb.

La oncoproteína E7 podría estar modulando la apoptosis por su interacción con la proteína 3 de unión al factor de crecimiento semejante a insulina (IGFBP-3). Esta proteína se sobreexpresa en células senescentes, suprime la proliferación e induce apoptosis. E7 se une a IGFBP-3 y provoca su proteólisis, aboliendo la senescencia celular (60).

Actualmente se ha identificado la capacidad de la proteína E7 para unirse a una proteína de 600 kDa, que es el factor asociado a la proteína pRb (p600), al parecer esta proteína está involucrada en procesos como la adhesión celular y la apoptosis, ya que la pérdida de esta proteína en células epiteliales, induce un crecimiento independiente de anclaje y una disminución en la apoptosis (60-61).

Actualmente existen factores epigenéticos y genéticos que se han reportado como cofactores en la transformación tumorigénica cervical. Este es el caso de la amplificación de algunos genes como: c-myc (62), PIK3CA (63), erbB (64) y c-IAP1 (65), la disminución en la expresión de PTEN (66) y mutaciones en H-Ras (67); sin embargo, su relación con el desarrollo de CaCu no ha sido claramente establecida. Es por ello que la expresión constitutiva de las oncoproteínas E6 y E7 sigue siendo el factor de riesgo más significativo para la progresión a cáncer cervical después de una

infección por VPH, por lo que resulta importante entender claramente los mecanismos moleculares que regulan la expresión de estas oncoproteínas.

### *Conclusiones*

La infección por virus del papiloma humano es la enfermedad de transmisión sexual más común, tanto en hombres como en mujeres y la persistencia de ésta es el principal agente causal del cáncer cérvico uterino. Aunque mucho se ha avanzado en el conocimiento de la actividad las oncoproteínas virales en diversos procesos biológicos, aun existen aspectos poco esclarecidos del proceso de transformación maligna inducido por el VPH. A medida que los hallazgos científicos determinan nuevas asociaciones de estas proteínas virales con proteínas celulares, el panorama se oscurece aun más, debido a las complicadas redes de interacciones que se evidencian. De este modo, los esfuerzos futuros deberán encaminarse a comprender la importancia de estas interacciones en el establecimiento del cáncer cérvico uterino.

Actualmente, las vacunas profilácticas contra VPH prometen disminuir de forma importante la incidencia del cáncer cérvico uterino, provocado por genotipos virales específicos. Sin embargo, dado que su efecto se manifestará a largo plazo y es posible el brote de otros tipos oncogénicos de VPH de poca repercusión actual, es necesario no bajar la guardia tanto en los programas de detección oportuna, como en la investigación dirigida a mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamientos eficaces.

### *Referencias*

1. zur Hausen H: Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; 78:1-30 ■
2. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-265 ■
3. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27 ■
4. Reimers LL, Anderson WF, Rosenberg PS, Henson DE, Castle PE. Etiologic Heterogeneity for Cervical Carcinoma by Histopathologic Type, using comparative age-

period-cohort models. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(3): 792-799 ▪

5. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-527 ▪

6. Pakin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24S3 (2006) S3/11-S3/25 ▪

7. Trottier H, Burchell AN. Epidemiology of Mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics* 2009; 12:291-307 ▪

8. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 2005;23:2388-2394 ▪

9. Herzog TJ, Monk BJ. Reducing the burden of glandular carcinomas of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:566-571 ▪

10. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110:S4-S7 ▪

11. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *J Am Med Assoc* 2001; 286:3106-3114 ▪

12. Castellsagué X, Munoz N. Chapter 3. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis. Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;20-28 ▪

13. Lizano M, De la Cruz-Hernández E, Carrillo García A, García Carrancá A, Dueñas González A, Hernández DM, Mohar A. Distribution of HPV-16 and -18 intra-typic variants in normal cytology, intraepithelial lesions and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecol Oncol* 2006; 102:230-235 ▪

14. Garcia-Closas R, Castellsagué, Bosch X, Gonzalez CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: A review of recent evidence. *Int J Cancer* 2005; 117:629-37 ▪

15. Stanley M. HPV: a master at avoiding the host defenses. *HPV Today* 2007; 11:1-16 ▪

16. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:79-89 ▪

17. Huh WK. Human Papillomavirus Infection: A concise review of natural history. *Obstetrics and Gynecology* 2009; 114:139-143 ▪

18. Woodman Ciaran B J, Collins S I, Young L S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews*, 2007; vol.7: 11-22 ▪

19. Schiffman M, Krüger Kjaer S. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *JNCI Monographs*, 2003; 31:14-19 ▪

20. Steenbergen RDM, de Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJE, Meijer CJLM. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 2005; 32S: S25-S33 ▪

21. Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, Smith JS. Persistent human papillomavirus infection and

cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008; 168:123-137 ▪

22. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodríguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005; 337(1): 76-84 ▪

23. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121(3): 621-32 ▪

24. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa L. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; 24S3: S3/42-S3/51 ▪

25. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infection and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008; 26S: k1-k16 ▪

26. Medeiros LR, Dornelles D, da Rosa MI, Bozzetti MC, Ruviano R, *Int J Gynecol Cancer* 2009;19: 1166-1176 ▪

27. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 2001; 82:15-33 ▪

28. von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229-2242 ▪

29. Jayshree RS, Sreenivas A, Tessa M, Krishna S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *J Med Res.* 2009; 13 :286-295 ▪

30. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20:7874-7878 ▪

31. De la Cruz E, Mohar A, Lizano Soberón M. 2004. Elementos viricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación. *Rev. Oncología* 6: 263-271 ▪

32. Thomas M, Pim D and Banks L. The role E6-p53 in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999; 18:7690-7700 ▪

33. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89:213-228 ▪

34. Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci* 2003; 28: 337-348 ▪

35. Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 331-341 ▪

36. Kiyono T, Foster SA, Koop JL, et al. Both Rb and p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998; 396: 84-88 ▪

37. Haga K, Ohno S, Yugawa T, et al. Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci* 2007; 98:147-154 ▪

38. Xu M, Luo W, Elzi DJ, et al. NFX1 interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress hTERT transcription

- in keratinocytes. *Mol Cell Biol* 2008;28: 4819-4828.
39. Gewin L, Myers H, Kiyono T, et al. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 2004; 18: 2269-2282.
  40. Werness B, Levine A, Howley B. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.
  41. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV 18 E6. *Oncogene* 1998; 17:2943-2954.
  42. Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M, Simizu B. Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology* 1997; 232:53-61.
  43. Borbely AA, Murvai M, Konya J, Beck Z, Gergely L, Li F, Veress G. Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol* 2006; 87:287-294.
  44. Filippova M, Parkhurst L, Duerksen J. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279:25729-25743.
  45. Guille J, Swerlick R, Caughman S. 1997, Transforming growth factor- $\alpha$ -induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) genes requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J* 1997; 16:750-759.
  46. Lopez O, Vilorio PA, Bequet RM, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel R. Oncogenes and tumor angiogenesis: The HPV 16 E6 oncoproteins activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene* 2000; 19:4611-4620.
  47. Tong X, Howley PM. 1997. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:4412-4417.
  48. Degenhardt YY, Silverstein S. Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the E6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *J Virol* 2001;75:11791-11802.
  49. Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* 1995; 269:529-531.
  50. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 1998; 12:2061-207.
  51. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 2007; 178:3186-3197.
  52. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M. Biding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:11612-11616.
  53. Munger K, Basile JR, Duensing S, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20: 7888-7898.
  54. Boyer SN, Wazer DE, Band V. 1996. E7 protein of human papillomavirus 16 induces degradation of the retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 1996; 56: 4620-4624.
  55. Darnell GA, Schroder WA, Antalis TM, et al. Human papillomavirus E7 requires the protease calpain to degrade the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 2007; 282: 37492-37500.
  56. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009; 19: 97-113.
  57. Nguyen DX, Baglia LA, Huang SM, et al. Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *Embo J* 2004; 23 (7):1609-1618.
  58. Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, Classon M, Jones DL, Schlegel R, Munger K: The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene* 2001; 20:3629-3640.
  59. Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ: Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol* 2006; 151: 2321-2335.
  60. Huh KW, DeMasi J, Ogawa H, et al. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11492-11497.
  61. DeMasi J, Huh KW, Nakatani Y, et al. Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p600 protein binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11486-1149.
  62. Herrick J, Conti C, Teissier S, et al. Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 1174-1179.
  63. Bertelsen BI, Steine SJ, Sandvei R, et al. Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *Int J Cancer* 2006; 118:1877-1883.
  64. Zhang A, Maner S, Betz R, et al. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2002; 101: 427-433.
  65. Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, et al. Expression of  $\text{cIAP1}$ , a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res* 2002; 62: 4860-4866.
  66. Cheung TH, Lo KW, Yim SF, et al. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 621-627.
  67. Alonio LV, Picconi MA, Dalbert D, et al. Ha-ras oncogene mutation associated to progression of papillomavirus induced lesions of uterine cervix. *J Clin Virol* 2003; 27: 263-269.