



03081

Universidad Nacional Autónoma ^{de} México

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

LA AMPLIFICACION DEL GENOMA DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO TIPOS 16 Y 18 EN EL CANCER
CERVICAL ESTA RELACIONADA CON LA
RETENCION DE LOS GENES E1/E2

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMÉDICA
BÁSICA

P R E S E N T A:

EL MÉDICO CIRUJANO

JAIME BERUMEN CAMPOS

MEXICO, JUNIO 1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SUMMARY.

Some human papillomaviruses (HPV) are associated with the genesis of cervical carcinomas. The most common viral types are 16 and 18. They account for up to 70% of the reported HPV in all cervical carcinomas with HPV16 being at least twice as frequent as HPV18. Viral integration has been proposed as an activation mechanism for progression from preinvasive advanced lesions (CIN III) to cervical cancers. This integration usually occurs within either the E1 or the E2 genes, in a way that the expression of E2 gene is missing. In fact, E2 protein is an important transcriptional regulator of HPV expression and its absence may result in increased expression of E6 and E7 oncogenes. However, HPV16 and 18 seem to behave differently in cervical cancer. Whereas HPV18 DNA is generally integrated into the cellular genome, HPV16 very often is not integrated.

***In vitro* replication of human papillomavirus has been shown to depend on the integrity of E1/E2 genes, and the differentiation state of epithelial cells. In benign and CIN lesions, the viral genome persists as replicating molecules in low copy numbers, in undifferentiated basal stem cells, and in high copy numbers in more differentiated superficial cells. However, in human cervical cancer, the role of E1/E2 genes and differentiation in viral DNA replication is unknown.**

This study was aimed to characterize the level of amplification (copy number/cell) of viral genome and its correlation with the presence of E1/E2 genes, in 63 HPV16 or HPV18 positive tumors of different clinical stages and histological types. The viral copy number/cell was assessed by dot-blot hybridization and the presence of E1/E2 genes by PCR and Southern blot. The copy number/cell was significantly lower in HPV18 than in HPV16 positive tumors (23 ± 8 and 457 ± 191 , respectively). Nearly half of the HPV16's (43%) were

distributed similarly to the HPV18's in the ranges of 50 or less copies, having its peak at the group of 1-10 copies, whereas the remaining HPV16's (57%) spread over the groups of 51 or more copies, with another peak at the group of 101-500. The E1/E2 region was absent in all tumors positive for HPV18 and present in 64% of those positive for HPV16. The HPV16 tumors that were negative for E1/E2 had a much lower viral copy number (17 ± 12) than the positive ones (582 ± 212), thus resembling HPV18-positive tumors. Viral copy number was negatively correlated with the clinical stage of the tumors, and directly associated with the degree of histological differentiation. However, these correlations are primarily attributable to the presence or absence of an intact E1/E2 region.

These data indicate that integration and inactivation of E2 are not essential for the development of HPV16-associated carcinomas and suggest that viral amplification could be an alternative mechanism for viral transformation.

RESUMEN.

Algunos virus del papiloma humano (HPV) están asociados con el desarrollo del cáncer del cérvix. Los tipos virales 16 y 18 son los más comunes y se encuentran en el 70% de los carcinomas del cérvix, siendo el HPV16 al menos 2 veces más frecuente que el HPV18. La integración del genoma viral ha sido propuesta como un mecanismo de activación, para la progresión de las neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (NIC III), a cáncer invasor. Durante la integración, el genoma viral se rompe en la región del gen E1 o E2 de manera que se impide la expresión del gen E2. La proteína E2 es un importante regulador transcripcional que modula la expresión de los genes del HPV y cuya ausencia permite un incremento en la expresión de los oncogenes virales E6 y E7. Sin embargo, los tipos 16 y 18 parecen comportarse de manera diferente en el cáncer cervical. A diferencia del HPV18, que generalmente se integra al genoma celular, el HPV16 muy frecuentemente no se encuentra integrado.

La replicación *in vitro* del virus del papiloma humano depende de la integridad de los genes E1/E2 y de la diferenciación de las células epiteliales. En las lesiones benignas y precancerosas, el genoma viral se encuentra episomal, en bajo número de copias en las células basales y muy amplificado en las células superficiales más diferenciadas. Sin embargo, en el cáncer cervical no se conoce el papel de los genes E1/E2 y la diferenciación en la replicación viral.

Este estudio en carcinomas cervicales fue diseñado para caracterizar el nivel de amplificación (número de copias/célula) del genoma viral y su correlación con la presencia de los genes E1/E2 en 63 tumores positivos para los tipos 16 o 18, de diferentes estadios clínicos y tipos histológicos. El número de copias/célula fue medido por la técnica de

hibridación en punto y la presencia de los genes E1/E2 por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el método de hibridación tipo *Southern blot*. El número de copias fue mucho más bajo en los tumores positivos para el HPV18 que en los positivos para el HPV16 (23 ± 8 y 457 ± 191 , respectivamente). Cerca de la mitad (43%) de los positivos para el HPV16 se distribuyeron de manera similar a los positivos para el HPV18, en los rangos de 50 o menos copias, con el pico máximo en el grupo de 1-10 copias. El resto de los positivos para el HPV16 (57%) se distribuyeron en los grupos por arriba de 50 copias, encontrándose el pico máximo en el grupo de 101-500 copias. Los genes E1/E2 estuvieron ausentes en todos los tumores positivos para el HPV18 y presentes en el 64% de los positivos para el HPV16. De éstos últimos, los negativos para E1/E2 tuvieron un número de copias mucho menor (17 ± 12) que los positivos para E1/E2 (582 ± 212). El número de copias se correlacionó negativamente con el estadio clínico y directamente con el grado de diferenciación histológica del tumor. Sin embargo, estas correlaciones son atribuibles primariamente a la presencia o ausencia de los genes E1/E2.

Estos datos indican que la integración e inactivación de E2 no son esenciales para el desarrollo de los tumores positivos para el HPV16 y sugieren que la amplificación del genoma viral pudiera ser un mecanismo alternativo en la transformación viral.

A mi esposa Rosa Elba y

A mis hijos Jaime César e Ilse Carolina por el cariño que les tengo y por las privaciones y dificultades que han pasado por estar a mi lado durante las diferentes etapas de mi formación académica.

Al Dr. Mario Castañeda Morales a quien debo gran parte de mi formación científica, en especial en lo relativo al análisis y crítica de las ideas y de los datos experimentales.

Esta tesis fue asesorada por el Dr. Alejandro García Carrancá del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y fue realizada en el Departamento de Biología Molecular del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad/Escuela Médico Militar de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

Agradecimientos:

Al General Secretario de la Defensa Nacional Antonio Riviello Bazán por el gran apoyo que brindó para la formación del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad/Escuela Médico Militar.

Al General de Brigada M.C. Jaime Cohén Yáñez, Coronel M.C. Rafael Santana Mondragón y al Coronel M.C. José Luis Amezcua Gastélum por su iniciativa y participación activa en la formación y desarrollo del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, así como por el apoyo material, moral y académico que me dieron durante el desarrollo de mi trabajo de tesis doctoral y por la estimulante amistad que me han ofrecido durante los diferentes períodos de mi formación académica.

Al los Generales de Brigada M.C. Leobardo Ruiz Pérez y Bernardo Bidart Ramos y al Coronel M.C. Ricardo Villarreal Martínez por el apoyo que han dado a la formación y desarrollo del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación.

A la Asociación Civil para el Fomento de Investigación de la Escuela Médico Militar por el apoyo económico que me dieron en diferentes momentos de mi formación académica.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por haberme dado la libertad suficiente para realizar esta tesis, por su participación activa en la discusión del trabajo y por la amistad que me ha brindado.

A las Biólogas Rosa María Ordoñez, Pilar Figueroa y Erika Segura, a la QBP Margarita Campos y en especial a la Bióloga Leonora Casas por su gran apoyo en la realización de una parte de los experimentos de esta tesis.

A mi hermano el Lic. Arturo Berumen por las múltiples discusiones de filosofía de la ciencia que sostuvimos y que fueron un estímulo durante el transcurso de mi formación científica.

No es fácil encontrar una pregunta sobre un tema de investigación que sea nueva y relevante y que justifique la tesis doctoral. Además, en esta etapa inicial se tiene el dilema de demostrar que es posible ser un investigador independiente generador de preguntas y capaz de contestarlas apropiadamente, o convencerse de que uno no sirve para ser un creador y conformarse con ser ayudante de investigación. Conforme se profundiza en un problema por medio de la revisión de la vasta literatura sobre el tema, pareciera que las preguntas interesantes han sido agotadas o son inaccesibles por tecnología tan compleja o por la falta de recursos y del tiempo que se requiere para resolverlos; y pareciera imposible competir con los grandes "monstruos" científicos de los países desarrollados consagrados por sus trabajos acaparadores de "todas" las preguntas nuevas e interesantes. Sin embargo, cuando se ha logrado un conocimiento mayor del tema por medio del análisis detallado de la información científica previa, empiezan a brotar poco a poco nuevas preguntas que al principio son modestas y poco a poco surgen preguntas importantes que no han sido tocadas por los grandes de los países desarrollados. Después empieza el conflicto de seleccionar alguna de las preguntas que ya se vislumbraron, con base en los recursos económicos, la tecnología necesaria y las posibilidades de éxito de que la resolución de la pregunta confirme la hipótesis o de lugar a la propuesta de una hipótesis alternativa relevante y que sea competitiva a nivel internacional.

La pregunta de investigación de esta tesis es modesta, resultado de 8 años de estudio, trabajo y esfuerzo y está basada en el análisis cuidadoso de la literatura previa, el análisis minucioso de los datos experimentales obtenidos en el período correspondiente al trabajo de maestría y en la circunstancia de la alta frecuencia de cáncer del cérvix en México.

Esta tesis se compone de 3 capítulos: 1) Una revisión del tema, 2) El artículo central de la

tesis tal como fue publicado en la revista *International Journal of Cancer* en marzo de 1994,
y 3) Un capítulo de resultados adicionales y de una discusión general.

RESUMEN.

Algunos virus del papiloma humano (HPV) están asociados con el desarrollo del cáncer del cérvix. Los tipos virales 16 y 18 son los más comunes y se encuentran en el 70% de los carcinomas del cérvix, siendo el HPV16 al menos 2 veces más frecuente que el HPV18. La integración del genoma viral ha sido propuesta como un mecanismo de activación, para la progresión de las neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (NIC III), a cáncer invasor. Durante la integración, el genoma viral se rompe en la región del gen E1 o E2 de manera que se impide la expresión del gen E2. La proteína E2 es un importante regulador transcripcional que modula la expresión de los genes del HPV y cuya ausencia permite un incremento en la expresión de los oncogenes virales E6 y E7. Sin embargo, los tipos 16 y 18 parecen comportarse de manera diferente en el cáncer cervical. A diferencia del HPV18, que generalmente se integra al genoma celular, el HPV16 muy frecuentemente no se encuentra integrado.

La replicación *in vitro* del virus del papiloma humano depende de la integridad de los genes E1/E2 y de la diferenciación de las células epiteliales. En las lesiones benignas y precancerosas, el genoma viral se encuentra episomal, en bajo número de copias en las células basales y muy amplificado en las células superficiales más diferenciadas. Sin embargo, en el cáncer cervical no se conoce el papel de los genes E1/E2 y la diferenciación en la replicación viral.

Este estudio en carcinomas cervicales fue diseñado para caracterizar el nivel de amplificación (número de copias/célula) del genoma viral y su correlación con la presencia de los genes E1/E2 en 63 tumores positivos para los tipos 16 o 18, de diferentes estadios clínicos y tipos histológicos. El número de copias/célula fue medido por la técnica de

hibridación en punto y la presencia de los genes E1/E2 por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el método de hibridación tipo *Southern blot*. El número de copias fue mucho más bajo en los tumores positivos para el HPV18 que en los positivos para el HPV16 (23 ± 8 y 457 ± 191 , respectivamente). Cerca de la mitad (43%) de los positivos para el HPV16 se distribuyeron de manera similar a los positivos para el HPV18, en los rangos de 50 o menos copias, con el pico máximo en el grupo de 1-10 copias. El resto de los positivos para el HPV16 (57%) se distribuyeron en los grupos por arriba de 50 copias, encontrándose el pico máximo en el grupo de 101-500 copias. Los genes E1/E2 estuvieron ausentes en todos los tumores positivos para el HPV18 y presentes en el 64% de los positivos para el HPV16. De éstos últimos, los negativos para E1/E2 tuvieron un número de copias mucho menor (17 ± 12) que los positivos para E1/E2 (582 ± 212). El número de copias se correlacionó negativamente con el estadio clínico y directamente con el grado de diferenciación histológica del tumor. Sin embargo, estas correlaciones son atribuibles primariamente a la presencia o ausencia de los genes E1/E2.

Estos datos indican que la integración e inactivación de E2 no son esenciales para el desarrollo de los tumores positivos para el HPV16 y sugieren que la amplificación del genoma viral pudiera ser un mecanismo alternativo en la transformación viral.

	Página
CAPITULO I. Revisión.	
"Cáncer de cérvix y virus del papiloma humano: De la epidemiología a la biología molecular".	
A. Magnitud del problema.	11
B. Historia natural y morfología del cáncer de cérvix.	12
C. Evidencias epidemiológicas de la etiología viral del cáncer de cérvix.	14
D. Evidencias de la participación del HPV en la génesis del cáncer de cérvix.	18
E. Otros factores asociados al cáncer de cérvix.	24
F. Biología del virus del papiloma humano.	25
G. Diferencias entre los virus oncogénicos y los no oncogénicos.	42
H. Carcinogénesis del cáncer de cérvix.	43
CAPITULO II. Reimpreso del artículo en inglés.	
Berumen, J., Casas, L., Segura E., Amezcua, J.L., García-Carrancá, A., Genome amplification of human papillomavirus type 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. <i>Int.J.Cancer</i> ,56, 640-645 (1994).	66
CAPITULO III. Resultados adicionales y discusión general.	
A. La distribución del genoma viral en las células cancerosas.	73
B. ¿Otros mecanismos de transformación del HPV?.	80
C. La integración del genoma viral no parece ser un evento al azar.	89
D. Implicaciones clínicas de este trabajo.	94
REFERENCIAS.	102

CAPITULO I.

REVISION. Cáncer del cérvix y virus del papiloma humano: De la epidemiología a la biología molecular.

A. Magnitud del problema.

El cáncer del cuello uterino (CaCu) es un problema de salud muy importante en todo el mundo. Se estima que cada año se diagnostican 500,000 nuevos casos de cáncer del cérvix, de los cuales mueren el 45% y ocupa el segundo lugar como causa de muerte por neoplasias entre las mujeres, y es rebasado solo por el cáncer de mama (Parkin et al., 1984). Sin embargo la prevalencia de la enfermedad es muy diferente entre los países desarrollados y los subdesarrollados. El número de casos es 4 a 8 veces mayor en estos últimos. En los países desarrollados ocupa el segundo lugar en frecuencia de cáncer en mujeres (7%) después del cáncer de mama (22%), mientras que en los países subdesarrollados sucede a la inversa, el CaCu es el tumor más frecuente en la población femenina (24%) y el cáncer de mama (15%) ocupa el segundo lugar (Peto, 1986).

En los países desarrollados, debido a la aplicación masiva de campañas de detección oportuna del CaCu y a los avances terapéuticos en esta área, ha disminuido notablemente la tasa de mortalidad de este padecimiento en las últimas dos décadas (Hakama, 1986; Nelson et al., 1984), pero se ha incrementado entre las mujeres jóvenes la incidencia del carcinoma *in situ* que se considera la lesión precursora del CaCu (Green, 1978; Nelson et al., 1984).

En México el cáncer del cérvix también es un problema de salud importante, representa

el 20% de todos los cánceres y el 31% de los cánceres que afectan a la población femenina, ocupando el primer lugar en incidencia y mortalidad. En relación a otros países de Latinoamérica, México ocupa el tercer lugar en la tasa de mortalidad por CaCu. La tasa de mortalidad nacional es de 9.5/100,000 mujeres, sin embargo, existe una gran variabilidad geográfica y regional en los diferentes estados de la república. Por ejemplo, en Yucatán y Nayarit es de 19.2 y 17.6 por 100,000 mujeres respectivamente, mientras que en Chihuahua y el Edo. de México es de 4.5 y 6.1/100,000 mujeres, respectivamente. En la ciudad de México cada año se presentan 3,500 nuevos casos, la tasa de mortalidad por cáncer del cérvix es de 11 por 100,000 mujeres y se calcula que la tasa de incidencia en mujeres mayores de 25 años es de 115 por 100,000 (Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, 1991; Instituto Nacional de Salud Pública, 1993).

B. Historia natural y morfología del cáncer del cérvix.

En la actualidad se considera que las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello uterino son parte del mismo padecimiento, que se presenta como un *continuum* de cambios y generalmente empieza como una neoplasia intraepitelial cervical (NIC) bien diferenciada (NIC I o displasia leve), pasa por una fase menos diferenciada (NIC II o displasia moderada), luego a una lesión intraepitelial indiferenciada (NIC III, la clásica displasia severa o carcinoma *in situ*), y finalmente termina en cáncer invasor en sus diversos estadios clínicos cuando las células neoplásicas del epitelio cervical han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente (Nelson et al., 1984). Desde el punto de vista clínico los carcinomas invasores se clasifican en 4 estadios dependiendo del grado de invasión, empezando por el

estadio I en el cual el cáncer ha invadido hasta 5 mm más allá de la membrana basal, hasta el estadio IV en el cual se encuentran metástasis en otros tejidos. Desde el punto de vista morfológico los tumores invasores se clasifican en epidermoides (queratinizantes y no queratinizantes), adenocarcinomas, adenoescamosos y células pequeñas de origen neuroendocrino.

Comunmente toda esta gama de lesiones presentan alteraciones del fenotipo celular (alargamiento nuclear, hipercromatismo, pleomorfismo, pérdida del relieve celular, cromatina gruesa o burda y principalmente mitosis anormales), de la arquitectura celular (lo extenso de esos cambios de la superficie del epitelio al tejido subyacente), y del contenido de DNA celular (aneuploidía), siendo mayores las alteraciones conforme las lesiones son más avanzadas (Reid et al., 1984).

Estas lesiones se inician en la unión escamocolumnar de la zona de transformación del epitelio del cérvix, generalmente como lesiones unifocales, y permanecen confinadas a ese sitio durante la fase intraepitelial (Burghardt, 1986). Aunque la invasión puede ocurrir en cualquier fase de la NIC, es mucho más probable que ocurra en el NIC III, que se considera una lesión más avanzada y agresiva; sin embargo el riesgo inmediato de invasión en una paciente individual aún no se puede predecir (Nelson et al., 1984; Franceschi et al., 1986). La transición a lesiones invasoras no es inevitable, incluso algunas lesiones regresan o permanecen preinvasoras durante toda la vida, y solo un porcentaje pequeño progresa a carcinoma invasor; el 7.5% de los NIC I, el 15% de los NIC II, y el 25% de los NIC III (Reid et al., 1984). El tiempo de evolución de las lesiones que progresan de NIC I a NIC III, y de este a cáncer invasor es muy variable, generalmente de 10 a 20 años. La edad

promedio de las mujeres que presentan NIC I es de 25 años y la de mujeres con cáncer invasor es de 50 años (Hakama, 1986; Zur Hausen, 1977).

En los últimos años ha quedado bien establecido que la detección, diagnóstico y erradicación de las lesiones precursoras previenen el desarrollo del cáncer invasor, por lo que se ha promovido la realización de campañas masivas para detectar el padecimiento en estas etapas iniciales (Nelson et al., 1984).

C. Evidencias epidemiológicas de la etiología viral del cáncer del cérvix.

La hipótesis de que factores transmitidos sexualmente pudieran estar involucrados en el desarrollo del cáncer del cérvix se basa en una variedad de observaciones clínicas y epidemiológicas desde 1842, cuando Rigoni-Stern reportó que este tumor se presentaba muy raramente en las monjas o en mujeres solteras y muy frecuente en prostitutas (Peto, 1986; Rotkin, 1973; Zur Hausen, 1976; Zur Hausen, 1987). Diversas observaciones clínicas han sido asociadas al cáncer del cérvix, sin embargo los hallazgos más consistentes de numerosos estudios epidemiológicos y que presentan un riesgo relativo elevado, son el inicio de la vida sexual activa a temprana edad y el antecedente de haber tenido múltiples parejas sexuales (Rotkin, 1973; Kessler, 1977; Brinton, 1986; Kessler, 1986). Estudios recientes sugieren que el número de parejas sexuales es el riesgo más importante para la enfermedad y que es independiente de la edad de la primera relación sexual, lo cual refuerza la hipótesis de que el cáncer del cérvix es causado por un agente infeccioso transmitido sexualmente (Harris et al., 1980; Reeves, 1985). Recientemente se ha postulado la hipótesis que en América Latina el comportamiento sexual del varón puede ser igual o más importante que el

comportamiento sexual de la mujer como determinante de un factor de riesgo elevado para el cáncer del cérvix (Buckley et al., 1981; Skegg et al., 1982).

Se han investigado múltiples agentes infecciosos para determinar la etiología venérea del cáncer del cérvix, y los más importantes son el virus del herpes simple tipo II (HSV) y el virus del papiloma humano.

Diversos hallazgos experimentales a partir de los años 60s sugirieron que el HSV era el agente infeccioso más importante asociado al CaCu: 1) Se encontraron anticuerpos específicos contra antígenos de este virus en el suero del 91% de las pacientes con CaCu, y solo en el 10-50% de los controles (Nelson et al., 1984; Rawls et al., 1980), 2) Demostraron la existencia de antígenos específicos (AG-4) en las células neoplásicas del 90% de las pacientes con CaCu (Nelson et al., 1984; Franceschi et al., 1986), 3) El incremento en la incidencia del carcinoma *in situ* (5 veces) era paralelo al aumento de las infecciones genitales por HSV (Naib et al., 1969), y 4) Se había demostrado que este virus era capaz de transformar *in vitro* células de roedores (Sugden, 1986; Duff and Rapp, 1973) y que producía lesiones en el DNA (aberraciones cromosómicas, amplificaciones génicas selectivas, activación de retrovirus endógenos y aumento del índice de mutación en algunos sistemas) (Schlehofer, 1986; 1986a). Sin embargo, en estudios posteriores se puso en duda la participación del HSV como candidato etiológico principal en el CaCu: 1) En algunos estudios epidemiológicos no se han encontrado diferencias séricas entre casos (pacientes con CaCu) y controles que habían tenido más de una pareja sexual, lo cual indica que la infección por HSV pudiera ser más bien un evento asociado colateralmente y 2) Más importante, con el advenimiento de las técnicas de hibridación de DNA, en la década de los

70s, solo en porcentajes muy bajos (2-17%) de carcinomas cervicales se detectó el DNA o RNA del HSV (Zur Hausen, 1976; Zur Hausen, 1983; McDougal et al., 1986).

A pesar de la dificultad e inconsistencia para demostrar la presencia del DNA, RNA y de proteínas específicas del HSV en el cáncer del cérvix, no se puede descartar la participación de este agente en la génesis del CaCu, ya que en algunos sistemas experimentales *in vitro* e *in vivo*, el virus puede actuar como un iniciador de la transformación a través de actividad mutagénica por mecanismos que no requieren necesariamente la expresión de proteínas o la retención del DNA viral: un mecanismo de "golpe y corrida" o mediante inserciones de secuencias parecidas al transposon "IS" (Sugden, 1986; McDougal et al., 1986). Sin embargo, todavía no hay evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis en el desarrollo del CaCu, por lo que este agente etiológico ha sido relegado a segundo término.

Conforme la hipótesis del HSV era menos convincente, hubo necesidad de buscar otro agente viral asociado al CaCu, y el HPV era un buen candidato ya que existían buenas razones para ello: 1) Se conocía desde principios de siglo que este virus era el factor etiológico de las verrugas humanas (Zur Hausen, 1991), 2) Se sabía que algunos virus del papiloma animales (bovino y del conejo) eran tumorigénicos (Pfister, 1984), 3) Era frecuente que los pacientes con epidermodisplasia verruciforme, una entidad rara de la piel asociada al virus del papiloma, presentaran a edades tempranas cáncer epidermoide de la piel en los sitios expuestos a la luz solar (Orth et al., 1977), 4) Se habían encontrado, en 1968 por medio de la microscopía electrónica (ME), partículas virales idénticas a las encontradas en las verrugas comunes, en las células del condiloma acuminado, una

patología frecuente en el tracto genital (Almeida et al., 1969), 5) Las características epidemiológicas del condiloma acuminado eran muy similares a las del CaCu, y principalmente 6) Existía un número sustancial de reportes anecdóticos de la conversión maligna del condiloma acuminado, principalmente después de una larga duración y de ser resistentes a tratamiento (Zur Hausen, 1987b). Esta hipótesis no tuvo suficiente aceptación inicialmente, ya que era más bien excepcional que el condiloma acuminado se presentara en el cuello uterino, y además no se había podido demostrar la presencia de partículas virales en el CaCu, y resultaron fallidos los primeros intentos por encontrar el DNA del HPV en el condiloma acuminado y en el CaCu mediante sondas radiactivas procedentes del virus de las verrugas comunes (Zur Hausen et al., 1974). Se dio un avance importante en favor de esta hipótesis en 1976, cuando se caracterizó morfológicamente al condiloma acuminado y se descubrió una variedad microscópica de condiloma que había pasado desapercibida por mucho tiempo y que se diagnosticaba erróneamente como displasia del cérvix: el condiloma plano (Meissels et al., 1976). Esta lesión producida por HPV fue reconocida morfológicamente por la presencia de coilocitos y disqueratocitos en las capas superficiales del epitelio escamoso del cérvix. Estas células muestran grados leves de pleomorfismo nuclear, cromatina borrosa y confusa, binucleación, y cambios citoplásmicos característicos, consistentes en cavitación perinuclear y aumento de la densidad del citoplasma en la periferia en el caso de los coilocitos y de queratinización en el caso de los disqueratocitos (Meissels y Morin, 1986). Posteriormente se detectaron partículas virales en el 50% de estas lesiones por técnicas de ME e inmunohistoquímicas (Lancaster et al., 1983). Posteriormente se han efectuado múltiples estudios morfológicos y epidemiológicos que

sugieren una asociación entre el condiloma plano y el NIC I-II, pero no con el NIC III y el CaCu. Por ejemplo, los estigmas morfológicos de la infección viral se presentan muy frecuentemente (40-50%) en las lesiones menores (NIC I), disminuyen (5-10%) con los grados progresivos de lesiones premaligna (NIC II-III) y raramente se presentan en el cáncer invasor (Reid y Fu, 1986). La observación de antígenos de la cápside del HPV cae desde 36% en las lesiones benignas hasta el 9% en el NIC III (Reid and Fu, 1986; Kurman et al., 1981; Gupta et al., 1986). En contraste, el fenotipo maligno de las células, las alteraciones de la arquitectura del epitelio y las alteraciones del contenido de DNA se incrementan de NIC I a NIC III. Por ejemplo, la aneuploidía aumenta desde el 8% en el NIC I hasta el 82% en el NIC III (Reid y Fu, 1986; Hughes et al., 1987; Fu et al., 1986). Un hallazgo posterior que apoyó la asociación entre el condiloma y el NIC fue la diferenciación histológica de una variedad nueva de condiloma plano, el "condiloma plano atípico", que presenta simultáneamente datos de condiloma y NIC en la misma célula, y sugiere la transición de una lesión aparentemente benigna a una maligna. Esta lesión atípica corresponde al 10% de todos los condilomas planos del cérvix (Meisels et al., 1981). Por otra parte, en estudios prospectivos se ha encontrado que el 6% de los condilomas planos y el 13% de los atípicos evolucionan a NIC, y el 2% a cáncer invasor (Meisels y Morin, 1986; Reid y Fu, 1986).

D. Evidencias de la participación del HPV en la génesis del cáncer del cérvix.

1. Detección y purificación del genoma del HPV en cánceres cervicales.

El gran salto en la asociación del HPV y el CaCu se realizó en la década de los 80s, con la

purificación del HPV 6 de un condiloma acuminado (Gissmann y Zur Hausen, 1980) y la aplicación posterior de dos nuevas metodologías del DNA recombinante: la clonación génica y la hibridación del DNA a baja estringencia (Law et al., 1979). Con estos métodos se pudieron identificar y aislar de cánceres cervicales, el genoma del HPV16 en 1983 (Dürst et al., 1983) y el HPV18 en 1984 (Boshart et al., 1984).

Actualmente se han encontrado más de 75 tipos diferentes de HPV, de acuerdo a su secuencia de nucleótidos (12th International Papillomavirus Conference, Baltimore 1993). De todos ellos, solo algunos 20 se han encontrado asociados a tumores de la región genital (Tabla 1). Los tipos virales más comunes en las lesiones genitales benignas son el HPV 6 y 11 y en las lesiones neoplásicas precursoras y el cáncer invasor los tipos 16 y 18 (Tabla 1). Los HPVs tipo 6 y 11 se encuentran en el 90-100% de las lesiones benignas de la región genital (Condiloma acuminado y condiloma plano) y en el 10-20% de las lesiones precancerosas tempranas del cuello uterino (Condiloma atípico y NIC I) y muy raramente (2%) en las lesiones avanzadas (NIC II/III y cáncer invasor) (De Villiers et al., 1981; Gissmann et al., 1982; Gissmann et al., 1983; Gross et al., 1986; Grussendorf-Conen, 1986). En las lesiones precancerosas de bajo y alto riesgo y en el cáncer invasor existe una gran divergencia de estudio a estudio y de región a región. En el 90% (Gissmann y Schneider, 1986) de los carcinomas *in situ* o invasores, se ha encontrado algún tipo de HPV mediante hibridación a baja estringencia. De éstos el 50-90% (Gissmann y Schneider, 1986; Dürst et al., 1983; Boshart et al., 1984) corresponden al tipo 16 y 18 (el 16 se ha encontrado 3 veces más frecuente que el 18) y el resto aún no han sido tipificados. En el 10% restante no se puede descartar la presencia del HPV, ya que en condiciones de baja

estringsencia disminuye 20 veces la sensibilidad de la hibridación y pudiera encontrarse algún otro HPV nuevo en pocas copias. En el 20-80% de las lesiones preneoplásicas se han encontrado los tipos 16 y 18 (Fukushima et al., 1985; Crum et al., 1985; Millan et al., 1986), en el 20% el tipo 31, y en el 40% otros HPVs desconocidos (Lorincz et al., 1986). En el condiloma acuminado y plano ordinario es raro encontrar los tipos 16 o 18 (5%) (Gissmann y Schneider, 1986), pero en el condiloma plano atípico con figuras mitóticas anormales hay autores que reportan la presencia del HPV16 hasta en el 70% (Meisels y Morin, 1986; Crum et al., 1984). Recientemente, mediante la técnica de hibridación *in situ*, varios grupos han comunicado la presencia del HPV, incluyendo los tipos 16 y 18, en el 5-30% (Schneider et al., 1985; Macnab et al., 1986; Meanwell et al., 1987) de las citologías normales del cérvix, de las cuales el 75% presentaron en un período de 6 meses estigmas morfológicos de infección viral (Gissmann y Schneider, 1986). Es notable la variación tan grande que existe en los porcentajes de frecuencia de los tipos virales en lesiones similares, dependiendo de los diferentes reportes, y es más evidente en las diferentes zonas geográficas. En promedio, el HPV16 se ha encontrado en el 60% de los casos de Europa y Sudamérica, y en el 40% en EUA y Africa (Dürst et al., 1983). No es claro si esto refleja una verdadera heterogeneidad geográfica en la incidencia para determinado virus, o si los individuos de diferentes razas son más susceptibles a un tipo más que a otro (Gissmann y Schneider, 1986). También se ha encontrado el HPV en una proporción muy elevada de otros tumores epidermoides de la región genital, como es el cáncer de vulva, vagina y pene (McCance, 1986) así como en las lesiones premalignas de la vulva (Gupta et al., 1987), la papulosis bowenoide del pene (Kawashima et al., 1986; Gross et al., 1986), y en el semen

Tabla 1. Lesiones asociadas a los diversos tipos de virus del papiloma humano.

Localización	Lesiones Benignas	Lesiones Neoplásicas	Tipo Viral
PIEL	Verrugas		1,2,3,4,7,10,26-29, 41,60,65
	Epidermodisplasia Verruciforme		3,5,8,9,12,14,15,17 19-25,36,38,46,47,49 50
		Carcinoma <i>in situ</i> e invasor	5,8,14,17,20,36,47
VULVA, PENEANO	Condiloma Acuminado	Tumor de Buschke-Loewenstein	6,11
		Papulosis Bowenoide Enfermedad de Bowen	16,18,33,34,39 16,18,33
		Cáncer Epidermoide	16,18 6,11
CUELLO UTERINO, VAGINA	Condiloma Acuminado Condiloma Plano	Neoplasia Intra-epitelial	16,18,30,31,33,34 35,39,40,43,44,45 51,52,56-59,61-64 66,67
		Cáncer Epidermoide	16,18,31,33,35,39, 45,51,52,56,58
		Adenocarcinoma	16,18,35
			6,11,16,18,42
CAVIDAD ORAL	Hiperplasia Epitelial Focal		13,3,2
LARINGE	Papilomatosis		6,11

a. Los tipos virales en negritas, son los más frecuentes.

Tabla 2. Frecuencia de diferentes tipos de HPV en células epiteliales de cérvix de mujeres sanas.

Lugar	N	Virus del Papiloma Humano (%)					Total(+)	Ref.
		6/11	16	18	30s	Otros		
USA ^a	1566	1	1	1	1	4	6	113
España ^b	130	-	3	0	2	-	5	138
Colombia ^b	98	-	9	2	1	1	13	138
USA ^b	453	11 ^c	3		3 ^d	-	18	174
Holanda ^b	156 ^c		4				14	132
Holanda ^b	1555 ^f		1				4	132

a. Southern blot, b. PCR, c. Se reporta 6/11 a la vez con 42 y otros, d. Se reportan los 30s con el 39,45,51 y 52, e. Este grupo es de 15-34 años, f. Este grupo de 35-55 años.

Tabla 3. Frecuencia de diferentes tipos de HPV en las lesiones precancerosas del cérvix.

Lugar	N	Virus del Papiloma Humano (%)					Total(+)	Ref.
		6/11	16	18	30s	Otros		
NIC BG								
USA ^a	377	17	16	4	11	21	70	113
USA/Bzl ^a	63	16	19	2	14 ^c	21	71	100
USA ^b	125	22 ^d	36		34 ^e	-	92	174
JAPON ^a	38	-	76	-	-	-	-	190
NIC AG								
USA ^a	261	3	47	5	19	13	87	113
USA/Bzl ^a	93	11	49	3	16 ^c	11	90	100
USA ^b	50	18	62		10	-	90	174
USA/Bzl ^a	35	-	57	-	-	-	-	190

a. Southern blot, b. PCR, c. NIC I se tomó como bajo grado (BG) y NIC II y III como alto grado (AG), y los 30s únicamente incluyen el 31, d. Se reporta 6/11 a la vez con 42 y otros, e. Se reportan los 30s con el 39,45,51 y 52.

Tabla 4. Frecuencia de diferentes tipos de HPV en el cáncer del cérvix.

Lugar	N	Virus del papiloma humano (%)					Total(+)	Ref.
		6/11	16	18	30s	Otros		
USA ^a	153		47	24	8	11	90	113
España ^b	142		46	4	8	11	69	138
Colombia ^b	87		51	6	9	7	72	138
USA/Bzl ^a	58		41	22	5 ^c	17	87	100
USA ^a	100		46	16	2 ^c	-	64	220
Australia ^d	212		55	18	8 ^e	-	80	79
Holanda ^b	70		49	-	-	-	-	91
Japón ^a	45		54	18	7 ^f	-	62	53

a. Southern blot, b. PCR, c. Unicamente incluye 31, d. HIS-¹²⁵I, e. Incluye solo el 31/33, f. Solo incluye el 33

y células epiteliales del pene de los esposos de las mujeres con CaCu (Grussendorf-Conen et al., 1986; Ostrow et al., 1986).

2. Estudios de seguimiento.

En estudios de seguimiento de casos, se ha encontrado que la historia natural de las diferentes lesiones del cérvix es afectada de diferente manera de acuerdo al tipo viral que presenta inicialmente: el 45% de las lesiones con HPV16 y el 27.3% con HPV18 progresaron por NIC I hasta NIC III, a diferencia de las que contienen el HPV 6 y 11 que progresaron el 0 y 13%, respectivamente (Syrjanen et al., 1986).

3. Transformación *in vitro*.

La detección y purificación de este virus de las células del CaCu, cumple con los primeros dos postulados de Koch para asociar etiológicamente a un agente infeccioso con una enfermedad, pero era necesaria una prueba directa de esta relación etiológica, es decir la

transformación del epitelio sano del cérvix humano por la exposición al HPV. Esta prueba se obtuvo parcialmente hace algunos años: epitelios del cérvix sanos que fueron expuestos al HPV 11 e injertados debajo de la cápsula renal de ratones atímicos, se transformaron en epitelios displásicos (Kreider et al., 1985; Kreider et al., 1987).

Además, recientemente mediante experimentos de transfección con el HPV16, se ha logrado la transformación maligna *in vitro* de fibroblastos y queratinocitos humanos (Yasumoto et al., 1986; Pirisi et al., 1987).

E. Otros factores asociados al cáncer del cérvix.

La presencia del HPV por sí sola no ha podido explicar algunos hechos relacionados con la iniciación y progresión del tumor y parece no ser suficiente para producir el CaCu. Los datos más importantes que sugieren otros mecanismos involucrados en la génesis del CaCu son: 1) La incidencia de las infecciones por el HPV es mayor que la del NIC y la de éste mayor que la del cáncer invasor, 2) El desarrollo del CaCu a partir de las neoplasias preinvasoras del cérvix puede tardar de 10 a 25 años a pesar de tener el HPV (Nelson et al., 1984; Franceschi et al., 1986), 3) Sólo un porcentaje muy pequeño, alrededor del 10%, de las neoplasias preinvasoras con el HPV evolucionan a CaCu (Reid et al., 1984; Hakama, 1986; Zur Hausen, 1987), 4) Los oncogenes E6 y E7 solos o en combinación no han podido transformar una célula normal en cultivo a menos de ser co-transfectados con un oncogen como c-Ha-ras (Matlashewski et al., 1987) y 5) cuando se fusionan células tumorales del cuello uterino con células normales se inhibe la expresión de los oncogenes virales y se revierte el fenotipo maligno. Esto indica que durante el proceso maligno se requiere la

pérdida de alguna función celular que regula la expresión viral (Zur Hausen, 1991; Zur hausen, 1987b). Esta función es encendida cuando las células híbridas son trasplantadas en el animal atómico, lo cual sugiere que pudiera ser regulada por un factor hormonal.

Por otra parte, estudios epidemiológicos han asociado otros factores etiológicos con la génesis del CaCu como son el tabaquismo, las hormonas sexuales, la dieta, infecciones crónicas del cérvix, el virus del Herpes y el estado del sistema inmunológico, los cuales pudieran participar en alguna etapa del desarrollo del tumor (Brinton, 1986; Paterson, 1986; Halpert et al., 1986).

F. Biología del Virus del Papiloma Humano.

El HPV se compone de una molécula de DNA circular de doble hebra, de aproximadamente 8 Kb, asociada a histonas formando nucleosomas y de una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros hechos de 2 proteínas estructurales y no tiene envoltura. Los virus del papiloma son muy específicos para la especie y el tejido que infectan y tienen un tropismo preferencial por las células epiteliales escamosas. La expresión del ciclo viral completo parece estar limitado a las células completamente diferenciadas del epitelio-escamoso. Por mucho tiempo se ha intentado sin éxito establecer un sistema en cultivo de células para mantener y reproducir al HPV. Esto ha sido debido a que la expresión del genoma del HPV es muy específica y muy restringida a los queratinocitos, a los que ha sido difícil diferenciar *in vitro*. El aislamiento de líneas celulares derivadas de cánceres del cérvix que contienen el genoma del HPV ha permitido estudiar la expresión del genoma viral. Sin embargo estos sistemas no han permitido el análisis de la replicación viral ya que el genoma viral se

encuentra integrado a los cromosomas celulares. Esto también ha dificultado el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la génesis del CaCu y la mayoría de los conocimientos actuales se han obtenido de la extrapolación de hallazgos en modelos de transformación en líneas celulares, de tumorigenicidad en ratones atímicos y del estudio de tumores genitales (Syrjanen, 1987; Schiller et al., 1984).

1. Estructura del genoma.

Por análisis comparativo de secuencias se ha observado que los diferentes tipos virales tienen una organización muy conservada y la homología de secuencias entre ellos va de moderada (45%) a alta (85%) (Pfister, 1984; Syrjanen, 1987; Schiller et al., 1984; Broker y Chow, 1986; Giri y Danos, 1986). Los diferentes genes están codificados en una sola de las hebras del DNA, lo cual indica que la transcripción es unidireccional. Esta cadena codificadora contiene 8 genes. De ellos, 6 son designados como tempranos (E) y 2 como tardíos (L). Esta designación se basó en las propiedades biológicas del genoma del virus del papiloma bovino tipo 1 (BPV1). Cerca del 70% del genoma del BPV1 se designó como temprano (early) ya que se encontró que era suficiente para inducir la transformación y la replicación autónoma en células de roedores *in vitro* (Lowy et al., 1980). El resto del genoma, la región tardía, es necesaria para permitir el ciclo viral completo con la encapsidación del virus. Los RNAs mensajeros que codifican para las proteínas involucradas en la transformación y la replicación terminan en un sitio de poliadenilación "temprano" y los que codifican para las proteínas estructurales de la cápside terminan en un sitio de poliadenilación "tardío" (Baker y Noe, 1989). Sin embargo, ahora se sabe que el gen E4 de los HPVs, clasificado inicialmente como temprano participa en encapsidación

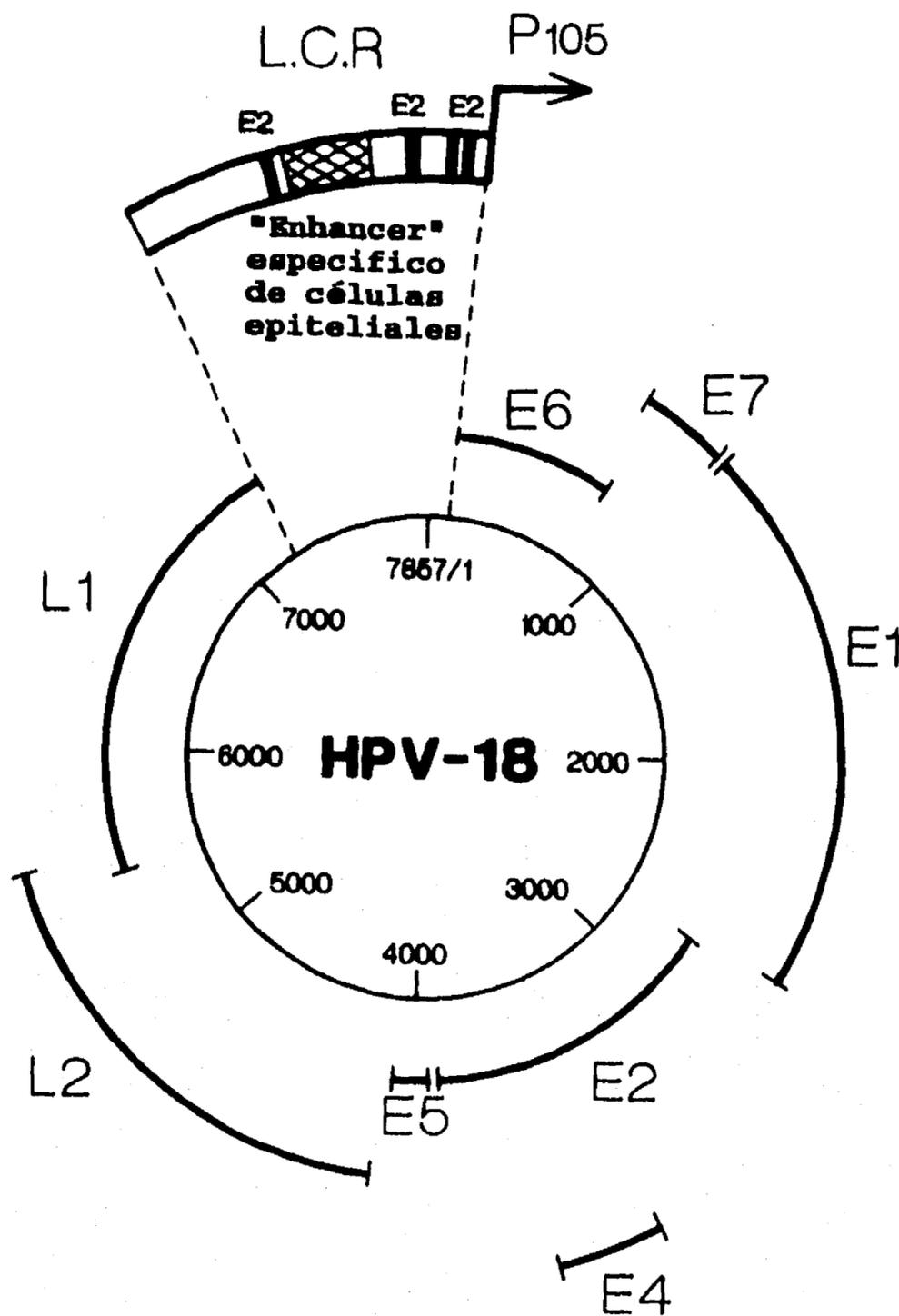


Figura 1. Mapa genómico del HPV18. El genoma está dibujado en forma circular de acuerdo a la numeración de la secuencia de nucleótidos y se muestran los genes en los tres diferentes marcos de lectura. También se muestran los sitios de unión a E2 y el "enhancer" dentro de la región larga de control de la expresión del genoma viral (LCR). El promotor P₁₀₅ está señalado como una flecha. La estructura del genoma del HPV16 y el resto de los papilomavirus es muy similar.

Tabla 5. Genes de los virus del papiloma.

Genes	Tamaño de la Proteína	Función	Función Demostrada en
E1	68 a 72 Kd	Replicación	BPV1, HPV16
E2	48 Kd	Regulador transcripcional Replicación	PVs, BPV1
E4	17 Kd	Maduración viral	HPV
E5	7 Kd 15 Kd	Transformación Transformación?	BPV1 HPV16?
E6	18 Kd	Transformación Activador transcripcional	BPV1, HPV16/18 BPV1, HPV16
E7	16 a 20 Kd	Transformación Activador transcripcional	HPV16/18 HPV16/18
L1	56 Kd	Proteína mayor de la cápside	PVs
L2	78 Kd	Proteína menor de la cápside	PVs

y se considera un gen tardío.

Además de estas regiones, el genoma viral tiene una región de 800 pb conocida como "región de control" (LCR) o región regulatoria 5' arriba (URR), la cual contiene muchos elementos de regulación de la transcripción. La localización y el tamaño de esta región está bien conservada entre los HPVs. Está localizada entre el final de L1 y el inicio de E6. Sin embargo las secuencias son muy divergentes y aunque presentan motivos comunes, estos están arreglados en combinaciones diferentes en cada HPV. Los genes tempranos que se

conocen son E6, E7, E1, E2, E5 y los tardíos L1, L2 y E4 (figura 1, tabla 5).

En los HPVs oncogénicos los genes E6 y E7 están involucrados en la transformación maligna, y su función se describirá más ampliamente en una sección posterior. La proteína E1 forma un complejo con la E2 el cual está involucrado en la replicación del genoma viral. E2 también regula la expresión de los marcos de lectura tempranos, y en especial reprime la expresión de E6 y E7 y tiene funciones de transactivación de otros genes celulares. Los genes L1 y L2 codifican para proteínas de la cápside. Los genes tempranos se pueden expresar en las infecciones no productivas así como en las productivas y los genes tardíos solo en las productivas.

a. Oncogenes virales. El virus del papiloma contiene 3 funciones transformantes las cuales están codificadas por los genes E5, E6 y E7. La actividad transformante de la proteína E5 ha sido estudiada principalmente en el BPV1 (Schiller et al., 1986; Schlegel et al., 1986). La proteína E5 es un polipéptido pequeño que contiene un dominio hidrofóbico en su región amino terminal, el cual es responsable de su unión a la membrana plasmática en la célula infectada. La secuencia de aminoácidos (aa) de E5 es muy divergente entre los virus del papiloma. La proteína E5 es la más pequeña de los PV (7 Kd) y es poco probable que contenga una función enzimática intrínseca. La proteína E5 es capaz de incrementar la actividad de los receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor estimulante de colonias (CSF1) en células NIH 3T3 a través de la inhibición de la regulación interna de los receptores (Martin et al., 1989). Recientemente se ha encontrado que E5 interactúa con una proteína celular de 16 Kd la cual es un componente de la ATPasa vacuolar (Goldstein et al., 1991). Esta interacción juega un papel en el bombeo de protones

interfiriendo la internalización y degradación de los receptores. En los HPV el gen E5 no está bien conservado y la homología con la secuencia del gen E5 del BPV1 es parcial, sólo está conservada la región muy hidrofóbica (60%). El gen E5 del HPV16 clonado en un vector retroviral es capaz de transformar queratinocitos murinos *in vitro* (Leptak et al., 1991). En los cánceres naturales producidos por el HPV, el gen E5 frecuentemente se rompe o queda aislado del promotor durante la integración del genoma viral por lo que es poco probable que sea importante en la génesis del cáncer del cérvix.

Los productos de los genes E6 y E7 son pequeños polipéptidos que contienen motivos Cys-X-X-Cys, los cuales pueden unir zinc *in vitro* y sugieren que tienen una estructura parecida a las proteínas dedos de zinc (Barbosa et al., 1989). Estas proteínas las han encontrado en el núcleo celular de las células infectadas. Recientemente se ha encontrado que las proteínas E6 y E7 de los HPV oncogénicos, principalmente el HPV16 y el HPV18, cooperan en la transformación de queratinocitos humanos *in vitro* (Hawley-Nelson et al., 1989; Munger et al., 1989). Además, ambas son transactivadores transcripcionales (Desaintes et al., 1992; Phelps et al., 1988; Sedman et al., 1991).

El gen E6 codifica para una proteína de 21 Kd, la cual se ha encontrado en el núcleo y la membrana plasmática, y tiene gran afinidad por el DNA (Halbert et al., 1991; Mallon et al., 1987). Al igual que las proteínas E1A y E1B del adenovirus, se ha demostrado que la proteína E6 del HPV16 y HPV18 también interactúa con la proteína codificada por el gen supresor p53 (Werness et al., 1990). Caracterizaciones adicionales de esta interacción indican que E6 pudiera promover la degradación específica de p53 por medio de la vía de la Ubiquitina (Scheffner et al., 1990). Este parece ser uno de los mecanismos mediante los

cuales la porción nuclear de la proteína E6 contribuye a la transformación. No se sabe si la porción membranal tenga algún otro tipo de función parecida a la de algún oncogen membranal. Por análisis de la secuencia de aminoácidos, esta proteína muestra cierta homología con el factor de crecimiento epidérmico, lo que sugiere un mecanismo de acción similar (Halbert et al., 1991).

La proteína E7 es una fosfoproteína de 98 aminoácidos (14 Kd) localizada en el núcleo y el citoplasma celular (Smotkin et al., 1987), a la cual no se le ha encontrado una función enzimática intrínseca. Los primeros 37 aminoácidos del extremo amino terminal contienen regiones parecidas a los dominios conservados 1 y 2 de la proteína E1a del Adenovirus. Se ha demostrado que esta región de la proteína E1a es necesaria para la transformación y media las interacciones con el producto del gen tumoral supresor del retinoblastoma (p105-RB). Secuencias similares en la proteína del antígeno T del virus SV40 (T Ag) también están involucradas con la unión de la proteína RB. Se ha demostrado que al igual que las proteínas E1A y T Ag, la proteína E7 de los HPV16 y 18 es capaz de unirse a la proteína p105-RB (Dyson et al., 1989; Munger et al., 1989). Para las 3 proteínas, E1A, T Ag y E7 se ha sugerido un mecanismo de acción similar, que involucra la interferencia de la función de la proteína RB en el control de la proliferación de las células normales. La unión de E7 a la proteína RB pudiera explicar su función de transactivador transcripcional. Se ha demostrado que la proteína E7 del HPV16 es capaz de disociar a la proteína RB de un complejo formado con el factor celular E2F (Chellapan et al., 1991; Nevins, 1991; Phelps et al., 1991). Se ha demostrado que la interacción de RB con E2F juega un papel esencial en la regulación de la proliferación celular (Nevins, 1991).

b. Los genes E1 y E2. Los otros dos genes tempranos son el E1 y el E2, los cuales están involucrados en la replicación del genoma viral y E2 también con la regulación de la expresión de los genes virales. Su función se ha estudiado principalmente en modelos *in vitro* con el BPV1 y muy recientemente con los HPVs. El gen E1 está muy conservado en su extremo correspondiente a la región C-terminal de la proteína y es esencial para la replicación del genoma viral. La proteína E1 se une al origen de replicación del genoma viral y al polipéptido E2.

El producto del gen E1 es el más grande y mejor conservado en los papilomavirus (Giri y Danos, 1986). Se distinguen dos regiones en la secuencia primaria: 1) la región carboxilo terminal de 300 aa es muy conservada en los papilomavirus y se ha encontrado que hasta el 40% de los aminoácidos son idénticos entre papilomavirus tan distantes como el BPV1 y el HPV18. En la región amino terminal sólo son conservados unos pocos aminoácidos que incluyen las secuencias putativas de localización nuclear, lo cual coincide con la localización nuclear de la proteína en las células transformadas (Blitz and Laimins, 1991; Santucci et al., 1990; Sun et al., 1990). No tiene propiedades de transactivador y consistentemente con esto no es una proteína de unión al DNA secuencia específica. Se han definido genéticamente dos funciones para E1, un dominio de replicación (R) y un dominio modulador (M) que corresponden a los extremos 5' y 3' de E1 (Howley, 1991; Lambert, 1991). Recientemente se ha mostrado que E1 actúa como una entidad genética única en la iniciación de la replicación del BPV1 y expresa una sola proteína de 68 Kd que corresponde al tamaño completo del gen E1 (Santucci et al., 1990; Sun et al., 1990). En la región carboxilo terminal se ha asignado una zona de unión al nucleótido ATP (Santucci et al.,

1990); una mutación en el residuo 434 inhibe las propiedades de unión al ATP (Sun et al., 1990). No se le han encontrado funciones de ATPasa, helicasa o de proteína de iniciación de la replicación.

Tanto estructuralmente como en sus características bioquímicas E2 está bien conservado entre los papilomavirus. Inicialmente en el BPV1 (Spalholz et al., 1985) y posteriormente en varios HPVs (Bernard et al., 1989; Hirochika et al., 1987; Hirochika et al., 1988; Phelps y Howley, 1987) se demostró que E2 era un eficiente activador de la transcripción de la región regulatoria del genoma viral. El producto completo del gen E2 es una proteína de 50 Kd, la cual presenta tres dominios. Esta estructura está bien conservada entre los papilomavirus a pesar de la divergencia en la estructura primaria. Por ejemplo, la homología de los dominios conservados amino y carboxilo-terminales de E2 entre el BPV1 y el HPV18 es de sólo el 30%, mientras que la región de la bisagra es completamente divergente. La parte N-terminal de E2 contiene el dominio de activación de la transcripción, mientras que la parte C-terminal contiene el dominio para la dimerización y unión con el DNA. Esta organización es típica de la estructura general de las proteínas transactivadoras transcripcionales en eucariotes. Sin embargo, ninguno de los dos dominios corresponden exactamente a ninguna de las clases de estructuras que se han definido para otros transactivadores previamente (Mitchell and Tjian, 1989). Por ejemplo, el dominio transactivador de la proteína E2 del HPV18 contiene α -hélices y un contenido relativamente alto de residuos de glutamina mientras que el dominio de dimerización y unión al DNA contiene α -hélices y tres leucinas que pudieran definir una estructura parecida a un cierre de leucinas (Ham et al., 1991).

c. **Los genes tardíos.** A diferencia de los genes tempranos, la expresión de los genes tardíos ocurre exclusivamente en las infecciones productivas. En ellas se han encontrado 3 polipéptidos expresados en gran proporción en células diferenciadas terminalmente, los cuales están codificados por los genes E4, L1 y L2. Las proteínas L1 y L2 son componentes de la cápside, la primera es más abundante y tiene un peso de 55,000 daltones; la segunda de 70,000 daltones es menos abundante. El papel exacto de la proteína E4 no se conoce todavía, pero parece estar muy relacionada con el estado de diferenciación del queratinocito infectado. En todos los PV, el gen E4 está contenido dentro del gen E2 pero es traducido de un marco de lectura diferente. La secuencia del gen E4 es parcialmente conservada, incluso algunos de los genes E4 no tienen el codón de iniciación. Por lo tanto parece que el producto principal del gen E4 pudiera ser traducido de un RNA mensajero reempalmado de E1-E4, usando el codón de iniciación de E1. La proteína E4 de los HPV1 y 16 se ha encontrado asociada con las citokeratinas de las células infectadas o transfectadas, y recientemente se ha sugerido que E4 altera la rigidez del citoesqueleto de los queratinocitos terminalmente diferenciados (Doorbar et al., 1991; Rogel-Gaillard et al., 1992). No se conoce el papel de estas interacciones en la multiplicación viral.

2. Regulación de la Transcripción.

En la regulación de la transcripción del genoma viral participan factores virales y celulares que actúan a través de los múltiples motivos que existen en el LCR.

a. **Participación de la proteína E2.** Se ha demostrado que la proteína E2 se une al DNA en la secuencia palindrómica ACCGNNNCGGT, que está muy repetida en el LCR de todos los papilomavirus (Androphy et al., 1987). E2 se une a esta secuencia como dímero

(Dostatni et al., 1988; McBride et al., 1988; 1989) y cuando menos dos de estas secuencias son necesarias para una eficiente transactivación de la transcripción *in vivo* (Hawley-Nelson et al., 1988; Spalholz et al., 1987; Thierry et al., 1990). E2 es un transactivador muy potente y se sabe que tiene una acción sinérgica con varios factores de transcripción celulares como SP1 y USF (Ham et al., 1991; Spalholz et al., 1991; Li et al., 1991).

Sin embargo, se ha observado que E2 reprime la transcripción de los promotores P₉₇ y P₁₀₅ de los HPV16 y 18, respectivamente, los cuales dirigen la síntesis de todas las proteínas tempranas incluyendo E6 y E7 (Bernard et al., 1989; Romanczuk et al., 1990; Thierry and Howley, 1991; Thierry and Yaniv, 1987). En esta acción represora, la proteína E2 se une a dos sitios cercanos a la caja TATA de los promotores P₁₀₅ y P₉₇ (Romanczuk et al., 1990; Thierry y Howley, 1991). Esto sugiere que el mecanismo de represión de E2 es a través de impedir estéricamente la formación o entrada del complejo de iniciación de la transcripción al sitio de unión. La represión *in vitro* se pierde por mutaciones en el sitio de unión a E2 más próximo a la caja TATA (Dostatni et al., 1991).

b. Factores celulares involucrados en la regulación del HPV. El LCR de los HPV16 y 18 contiene secuencias "enhancers" transcripcionales los cuales funcionan en células epiteliales humanas (Cripe et al., 1987; Gius et al., 1988; Gloss et al., 1987; Thierry et al., 1987; Thierry y Yaniv, 1987) y de roedores (Cid et al., 1993). Estos "enhancers" no contienen sitios de unión a E2 y su regulación es independiente de la expresión de los genes virales. Se ha demostrado por experimentos de "footprinting" y de retardamiento, que muchos factores celulares interactúan con los LCRs de los HPVs (García-Carrancá et al., 1988; Gloss et al., 1989) y algunos de ellos se han logrado identificar. El LCR de los HPV16 y 18

interactúa con un conjunto común de factores de transcripción generales, como son el CTF/NF1, SP1, AP1 y el receptor de glucocorticoide/progesterona, los cuales de alguna manera participan en la regulación de la transcripción de los HPVs (Cripe et al., 1990; García-Carrancá et al., 1988; Gloss et al., 1989). Esto indica que la regulación de la transcripción del genoma viral es estrictamente modulada por complejas interacciones entre factores celulares y virales. *In vivo*, la regulación de la transcripción parece que depende del estado de diferenciación del queratinocito, así como de señales externas como estímulos hormonales. En relación a esto último, se ha encontrado que el LCR de los HPV16 y 18 contienen secuencias específicas para la unión del receptor de glucocorticoides y el receptor de la progesterona. Coincidentalmente, se sabe que ambas hormonas influyen el estado de diferenciación de los queratinocitos hospederos.

Análisis funcionales de los sitios AP1, indican que estos sitios pueden unir con mucha afinidad heterodímeros de las oncoproteínas celulares Jun/Fos (Cripe et al., 1990; Thierry et al., 1992). Si estos elementos se mutan en el LCR del HPV18 se pierde la actividad del promotor P_{105} , específica en los queratinocitos.

3. Replicación del genoma viral.

Se distinguen 3 etapas en la replicación viral. La primera es una amplificación transitoria o de establecimiento, en la cual el genoma viral infectante se replica hasta 50-200 copias por célula. Después viene una etapa de mantenimiento durante las divisiones celulares sucesivas de las células infectadas, en la cual el número de copias se mantiene estable mediante una replicación regulada y acoplada a la fase S del ciclo celular. Finalmente, después de la multiplicación vegetativa sigue una multiplicación masiva del genoma viral, la síntesis de

la cápside protéica y la maduración viral con la subsecuente liberación de partículas infecciosas y descamación de los queratinocitos hospederos terminalmente diferenciados. Entre los pequeños virus de DNA (SV40, polio y papilomavirus), la fase de mantenimiento regulada del número de copias es única en los papilomavirus y en ella parecen estar involucrados mecanismos de amplificación genómica muy similares a los que ocurren durante la replicación del DNA celular. La diferenciación de las células epiteliales está muy relacionada con la replicación del genoma viral. Estos virus inicialmente infectan células indiferenciadas en división, de la capa basal del epitelio escamoso epidermoide, donde se replican hasta alcanzar un número de copias estable. Por el contrario, la replicación vegetativa y la maduración viral solo ocurren en las capas superficiales córneas del epitelio, que consisten de queratinocitos apoptóticos terminalmente diferenciados en los cuales el DNA celular ya no se replica (Fuchs, 1990; 1990b; Turyk et al., 1989). Esta relación probablemente refleja modificaciones que ocurren dentro de la célula hospedera, produciendo señales que pueden modular la expresión de los genes virales responsables de la replicación del DNA viral y de la maduración de las partículas virales. La inhabilidad de los métodos de cultivo habituales para reproducir *in vitro* las diversas etapas de la diferenciación epitelial, explican las dificultades en establecer modelos celulares para la propagación de los HPV.

La amplificación del genoma viral en lesiones del cérvix se ha estudiado principalmente mediante la técnica de hibridación *in situ*. En los condilomas y lesiones preneoplásicas, las señales del DNA viral son muy heterogéneas entre muestras diferentes. En las células basales se observa muy poca o ninguna señal y la intensidad de la señal del DNA aumenta

conforme aumenta la diferenciación celular, estando las señales más intensas en las capas superficiales del epitelio. En células vecinas con un aparente grado de diferenciación similar el nivel de amplificación viral puede ser muy diferente (Stoler et al., 1989). En los carcinomas cervicales existe poca información al respecto.

Recientemente se ha reportado la amplificación vegetativa del HPV31b (Bedell et al., 1991) y del HPV16 (Sterling et al., 1990) en dos sistemas experimentales diferentes, que permiten la diferenciación y estratificación del epitelio. El primero utiliza un cultivo de queratinocitos en capas (raft) (Asselineau et al., 1985; 1987) y el segundo el injerto en ratones desnudos de células W12, una línea celular que fue previamente aislada de una neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (Stanley et al., 1989). Aunque estos sistemas son muy prometedores, los avances recientes más importantes en la replicación del papilomavirus se han obtenidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* utilizando el BPV1.

Se ha utilizado un ensayo de corto tiempo con células C127 de ratón, a las cuales se les transfecta el genoma del BPV1 conjuntamente con vectores de expresión que codifican para los genes E1 y E2 (Ustav y Stenlund, 1991). Otro avance importante ha sido la utilización de sistemas de expresión en eucariotes (baculovirus, virus de la vaccinia); (Yang et al., 1991; Blitz y Laimins, 1991; Santucci et al., 1990) para sobreproducir las proteínas E1 y E2, las cuales se usan posteriormente en sistemas de replicación reconstruidos *in vitro*. Con estos sistemas se ha podido determinar el tamaño mínimo de los orígenes de replicación (ORIs) en el genoma viral, utilizando deleciones progresivas de la secuencia viral. En ambos sistemas experimentales sólo se han observado las fases de establecimiento y mantenimiento de la replicación y no la de replicación vegetativa masiva.

a. El origen de replicación. El origen de replicación en el BPV1 se encuentra alrededor del nucleótido + 1 e incluye el sitio único de HpaI. Consiste de la primera parte del palíndrome de una secuencia de unión de E2 (sitio 12 del genoma del BPV1), una región rica en A/Ts y un palíndrome de 18 pb rico en A/Ts. La estructura de este palíndrome es muy conservada entre los papilomavirus y la inserción de un conector (linker) entre las secuencias invertidas repetidas interrumpe la función del ORI (Ustav et al., 1991; Yang et al., 1991). Una organización similar alrededor del nucleótido + 1 se encuentra en el genoma del HPV18.

b. Papel de las proteínas E1 y E2 en la replicación. La proteína E2 forma homodímeros y en contraste con E1 se une con una gran afinidad al DNA en la secuencia palindrómica específica ACCG(N)₄CGGT localizada en el LCR de los papilomavirus. En experimentos de cotransfección, la expresión de E2 conjuntamente con la coexpresión de la proteína E1 completa es necesaria y suficiente para permitir la replicación del BPV1 (Ustav y Stenlund, 1991). La proteína E2 está directamente involucrada en la iniciación de la replicación y se requiere del péptido completo (Ustav y Stenlund, 1991; Mohr et al., 1990; Ustav et al., 1991). La eficiencia de E1 para iniciar por sí sola la replicación es muy baja y depende de su concentración (Yang et al., 1991), mientras que en experimentos de cotransfección con E2, la eficiencia de replicación es muy alta (Ustav y Stenlund, 1991). A una región de la porción amino terminal de E1 se le ha atribuido una actividad de unión al DNA (Santucci et al., 1990). La proteína E1 producida en bacterias se une específicamente a las regiones 7819-93 (afinidad fuerte) y 7457-7818 (afinidad débil) del genoma viral (Ustav et al., 1991; Wilson y Ludes, 1991). Se ha demostrado la formación de un complejo entre E1 y E2 *in*

vitro (Blitz y Laiminis, 1991; Mohr et al., 1990). Para la unión de E1 a E2 se requiere la región de los aa 384 al 516 de la porción C-terminal (Lusky y Fontane, 1991). No se sabe si E1 está presente como monómero en el complejo E1/E2. Tampoco se sabe si E2 es dimérico dentro del complejo de inicio de la replicación (como lo es para la transactivación) y tampoco si la secuencia palindrónica de E2 que está dentro de la región del ORI es necesaria para la unión del complejo E1/E2 al DNA. Más bien E2 estimula y dirige la unión de E1 al sitio ORI a través de su interacción con E1 pero no con el DNA, o estabiliza el complejo preestablecido de E1-DNA en presencia de cantidades limitadas de E1 (Yang et al., 1991). La proteína E1 tiene actividad de helicasa y también interactúa con la DNA polimerasa α -primasa (Li and Botchan, 1993). E2 pudiera ser un mecanismo de control de la replicación ya que sólo estando fosforilada se une a E1 (Lusky y Fontane, 1991; Mohr et al., 1990). Las mutaciones que afectan uno de los sitios de fosforilación (Ser 301) incrementan 20 veces la replicación (McBride y Howley, 1991). Además, E2 está involucrado en la replicación por otro mecanismo diferente a la participación en el complejo E1/E2 (Lambert, 1991); parece ser que alterar la estructura de la cromatina en la región del ORI, facilitando el desenrollamiento y la desnaturalización del DNA viral (Yang et al., 1991).

c. Participación de factores celulares en la replicación. La replicación del genoma viral es bidireccional (Ustav et al., 1991; Yang et al., 1991) y participan muchos factores celulares que normalmente participan en la replicación del DNA celular, como son la DNA helicasa, las topoisomerasas, la DNA polimerasa α /primasa, δ o ϵ (Gasser, 1991; Hubsscher y Thommes, 1992; Linn, 1991; So y Downey, 1992).

No se conocen los mecanismos que regulan la replicación del genoma viral, como por ejemplo el estrecho control del número de copias del genoma extracromosomal en las células infectadas y la prevención de la reiniciación de la replicación. La replicación de los HPVs no se conoce en modelos *in vitro* e *in vivo* y pudiera estar muy influenciada, al menos la fase vegetativa masiva, por factores celulares ya que se observa solamente en los queratinocitos terminalmente diferenciados.

La participación de factores de transcripción y secuencias "enhancers" en la regulación de la replicación del DNA parece ser muy común, como se ha visto en diversos sistemas biológicos, como en el virus del polio y el SV40. La unión entre la regulación de la transcripción y la replicación a través de la utilización de las mismas proteínas de unión secuencia específica al DNA, sugiere que vías comunes regulan el ensamblaje del complejo de replicación y transcripción. Algunos datos sugieren que las proteínas transcripcionales, como por ejemplo E2, participarían en la replicación bloqueando el efecto represivo de las histonas del "core" al unirse al DNA, asegurando que la maquinaria de replicación pueda formarse. Otro camino por el cual los factores de transcripción participarían, sería a través de hacer contacto con proteínas involucradas en la replicación para estabilizar el complejo de pre-iniciación. En modelos *in vitro* con el BPV1, en presencia de cantidades limitadas de las proteínas E1 y E2, la proteína VP16 del virus del herpes (HSV) que activa específicamente la transcripción de los genes tempranos del HSV, estimula la replicación del BPV1. Esta estimulación parece depender de la interacción del dominio de activación de la proteína VP16 con el aparato de la replicación, en especial con la proteína de replicación A (RPA) (R Li and M Botchan, 1993). RPA es una proteína estabilizadora de

DNA de simple hebra y juegan un papel importante en la replicación del DNA genómico. RPA tiene afinidad por E2 y se ha demostrado que es necesaria para la replicación *in vitro* del BPV1. La proteína RPA ayudaría a la proteína E1 (helicasa) a desenrollar el DNA estabilizando e inhibiendo la renaturalización de las hebras separadas de DNA. Por analogía con el modelo de SV40, se puede predecir que el complejo E1-E2 unido al origen de replicación tiene una afinidad mayor por la proteína RPA y este complejo en conjunto permite ensamblar la proteína DNA polimerasa α -primasa (Li and Botchan, 1993).

Por otra parte, la proteína p53 que interfiere específicamente el inicio de la fase S por su acción transcripcional, también impide la replicación del DNA al interactuar e inhibir directamente la proteína RPA. La proteína p53 inhibe la replicación del SV40 al unirse al antígeno T e impedir la desnaturalización del origen de replicación (Dutta et al., 1993). No se conoce el papel de p53 en la regulación de la replicación del HPV.

G. Diferencias entre los virus oncogénicos y los no oncogénicos.

Los genes E6 y E7 están relativamente bien conservados dentro los papilomavirus independientemente de que estén asociados o no con un potencial oncogénico *in vivo*. Sin embargo, las proteínas E6 y E7 codificadas por el HPV 6 y 11, a diferencia de los HPV16 y 18, no son oncogénicas en cultivos celulares (Halbert et al., 1991). Esta diferencia parece estar ligada a propiedades intrínsecas de las proteínas E6 y E7 y a la regulación de su transcripción. Por ejemplo, las proteínas E6 y E7 de los virus de alto riesgo se pueden unir eficientemente a las proteínas p53 y Rb, mientras que las de los virus de bajo riesgo se unen muy debilmente (Dyson et al., 1989; Werness et al., 1990; Eliyahu et al., 1989; Finlay et

al., 1989, Munger et al., 1989). Esto pudiera explicar la proliferación celular limitada que inducen los HPVs de bajo riesgo en las lesiones benignas.

Por otra parte, los genes E6 y E7 de los virus no oncogénicos (6 y 11) se transcriben de manera diferente. E6 se traduce de un RNAm no procesado que contiene toda la región temprana, mientras que E7 se traduce a partir de un mensajero que se inicia en un promotor específico enseguida del gen E7 (Sedman et al., 1991; Smotkin et al., 1989).

H. Carcinogénesis del cáncer de cérvix.

Aunque existen evidencias muy fuertes de la participación del HPV en el desarrollo del carcinoma cervical, aún no se sabe con exactitud cuáles son los mecanismos moleculares mediante los cuales el HPV participa en la génesis del cáncer del cérvix y las neoplasias precursoras. No se sabe si la evolución de las células infectadas por el HPV hasta el desarrollo del cáncer del cérvix requiere de varias lesiones o alteraciones sucesivas de la maquinaria genética celular al avanzar por cada estadio de la lesión. Parece claro que la evolución de las infecciones iniciales hasta lesiones benignas o lesiones preinvasoras avanzadas es influenciada directamente por el tipo viral. Mientras que los tipos 16 y 18 hacen avanzar la enfermedad hasta NIC III y eventualmente a invasión, el HPV 6 y 11 sólo lo hacen hasta NIC I (Syrjanen et al., 1986). Sin embargo, la evolución del NIC III a cáncer invasor parece claro que requiere de otros eventos moleculares aparte de la presencia del genoma viral. Los fenómenos moleculares que suceden en este límite biológico probablemente son los más importantes en el desarrollo de invasión y delimitarían la posibilidad de que una lesión preinvasora pudiera regresar o no hacia un estadio menos

agresivo. Para tener una idea más precisa de la participación del virus en el desarrollo del cáncer invasor es necesario considerar las observaciones de los reportes previos en relación a la expresión, amplificación y estatus del genoma viral entre las lesiones precancerosas y cancerosas, así como las obtenidas en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales.

1. Estatus y expresión del genoma viral en las líneas celulares derivadas de cánceres cervicales.

La integración del genoma del HPV se ha estudiado extensivamente en líneas celulares derivadas de cánceres del cérvix, principalmente mediante la técnica de hibridación tipo "Southern blot" y electroforesis en dos dimensiones, y en algunos casos con hibridación *in situ* sobre los cromosomas (ver la tabla 6). En la mayoría de las líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales positivos para el HPV16 o 18, incluyendo SiHa y HeLa, se ha encontrado el genoma viral integrado con patrones muy similares en cuanto a la pérdida o interrupción de los genes virales. Notablemente el genoma viral integrado está generalmente interrumpido y con pérdida variable de parte de su genoma desde E1/E2 hasta L1/L2. La porción del genoma viral que se encuentra integrada al genoma celular contiene los genes E6/E7 y la región de control LCR. En algunas líneas celulares no se pierden regiones virales, sin embargo el genoma viral está interrumpido en algún sitio de la región E1-E5. La interrupción ocurre en el extremo 3' del gen E1 o en el gen E2 antes de la señal de poliadenilación temprana. La única excepción se encuentra en las células CaSki, que presenta completo el genoma viral del HPV16 e íntegro el gen E2. Por otra parte, hay una línea celular derivada de una lesión preinvasora, la CC7T/VGH positiva para el HPV16, que además de presentar el genoma viral integrado lo tiene en forma

episomal

Tabla 6. Estatus del genoma viral en líneas celulares derivadas de cáncer del cérvix positivas para el HPV16 o el HPV18.

Línea Celular	Estatus del HPV	Regiones Perdidas	Copias	Sitios Integ.	Cromosomas	Ref.
HPV16 (+)						
CaSki	I	0 (E2c)	600 ^b	11 ^j	2,4,7,11,15,17	148,6,134
SiHa	I	E2-E4 ^g	1	1 ^a	13q14-13q32	148,6,40
QG-U	I	0 (E1-5i)				188
QG-H	I	0 (E1-E5i)		2		188
SKG-IIIb	I	E1-L2				188
CC7T/VGH	E,I	0 ^h	600,50	?		95
SKv	I	E2-L2 ^k	1	1	12q14-q15	184,23
HPV18 (+)						
HeLa	I	E2-L2	10-50 ^e	4 ^b	8,9,5,22 ^f	158,40
141,178,						185,40
C4-I	I	E2-L2	1	1	8 ^c	148
C4-II	I	E2-L2		1		185,158
SW756	I	0 (E2i)	10-50 ^e	1	12q13 ^d	40
ME180	I	E2-L2 ^l	< 1	1		148,229
MS751	I	E2-L2 ^l	< 1	1		148,229
SKG-I	I	0 (E1-E5i)				188
SKG-II	I	0 (E1-E5i)				188

I=integrado, E=episomal, c=completo, i=interumpido

a. Flanqueado por secuencias repetidas alu y O del DNA humano.

b. Tres sitios, integrados cerca de c-myc, c-abl y c-sis.

c. integrado 3' de c-myc

d. Es una región frágil.

e. Amplificado con DNA tumoral.

f. Los cromosomas 5 y 22 son anormales, y 3 de los cuatro sitios corresponden a sitios frágiles.

g. E2-E4 se rompen en el nucleótido 3132-3384

h. La mayoría parece estar amplificado en tandem.

i. Son oligómeros concatenados o interconectados.

j. En 11 cromosomas diferentes.

k. En el extremo 5' de la integración esta roto L2 en 4474 y en el 3' el E2 en la posición 3361. En este extremo con la secuencia celular se encuentra una secuencia invertida repetida.

l. Además, les falta parte del LCR.

en un número alto de copias y con el gen E2 íntegro.

En la mayoría de las líneas celulares el genoma viral se integra en un sólo sitio del genoma celular, sin embargo en algunas como en HeLa se ha encontrado integrado en 4 sitios diferentes y en CaSki al menos en 11 cromosomas diferentes. El número de copias es variable de una línea celular a otra, y varía de 1 a 50 copias/célula en las líneas celulares que presentan el genoma viral integrado con la delección o interrupción de los genes E1/E2 y es independiente del tipo viral. Es notable que las dos únicas líneas celulares positivas para el HPV16 que presentan íntegro el genoma viral (CaSki y CC7T/VGH) tienen alrededor de 600 copias/célula. Las múltiples copias del genoma viral integrado generalmente se encuentran en tandem.

En las diferentes líneas celulares no se han encontrado sitios de integración en el DNA celular comunes o consenso entre ellas por lo que se supone que el sitio de integración en el DNA celular es al azar. Sin embargo, en algunos casos el genoma viral se ha encontrado integrado en sitios frágiles, relativamente cerca de algún oncogen o en secuencias repetidas como Alu.

En todas las líneas celulares estudiadas el genoma viral integrado se encuentra transcribiéndose activamente. Aunque existen variaciones de una línea celular a otra y de un reporte a otro, se han encontrado varios transcritos de RNA de diversos tamaños que varían de 0.6 a 8.4 Kb (ver tabla 7). La mayoría de estos transcritos codifican para los genes E6 y E7 y en algunos casos también para el gen E1. En ninguna línea celular se han encontrado transcritos de la región tardía (L). En las células CaSki algunos de los transcritos codifican para el gen E2, lo cual concuerda con la integridad de la región

Tabla 7. Expresión de los genes virales en las líneas celulares positivas para el HPV16 o el HPV18.

Línea Celular	RNAs Mensajeros (Kb)	Genes	Referencia
HPV16 (+)			
CaSki	1.5, 2.3, 4.5	E6/E7,E1	192, 149
CaSki	3.6	E6/E7/E1/E2	6
	1.5, 1.0	E6/E7^E2	
	0.6	E2	
SiHa	4.6, 4.1	E6,E7,SC	6
	1.6, 1.4	E6,E7,E1	
SiHa	6.2, 4.3, 2.8, 2.1	E6,E7,E1	149
QG-H	8.4, 6.5, 4.8	E6,E7	188
QG-H	4.2, 2.4, 1.2	E6,E7	189
QG-U	6.0, 2.7, 1.8	E6,E7	188
QG-U	5.0, 3.6	E6,E7	189
	2.4, 2.0, 1.3	E6,E7,E2,E4	
SKG-IIIb	6.4, 3.3, 1.9	E6,E7	188
HPV18 (+)			
HeLa	1.6, 3.6-3.5	E6,E7,E1	149, 185
756	1.5, 6.5	E6,E7,E1	185
MS751	1.65	E6,E7	149
C4-I	1.5, 4.2, 5.5	E6,E7,E1	185
C-4 II	1.65	E6,E7,E1	149
SKG-I		E6,E7,E1	188
SKG-II		E6,E7,E1	188
ME180	2.5	E1	149

SC=secuencias celulares.

temprana (E) en el genoma viral integrado. Casi todos los RNAm virales se transcriben a partir del promotor localizado en la región de control, P₉₇ en el HPV16 y P₁₀₅ en el HPV18 y terminan en las secuencias celulares que flanquean al genoma viral (Pater et al., 1985; Schwarz et al., 1985; Popescu et al., 1987; Shirasawa et al., 1987; Baker et al., 1987).

La diferencia en los tamaños de los transcritos depende por un lado de la distancia a la que se localizan las señales de poliadenilación en el DNA celular que flanquea el lado 3' del genoma viral y por otro lado de los diferentes sitios de corte y empalme (splicing) que se utilizan durante la maduración del RNA heteronuclear. Uno de ellos se encuentra procesado y parece ser el mensajero preferencial para la traducción de E7, mientras que el otro, no procesado, es utilizado preferencialmente para traducir el producto del gen E6. Además, para los tipos oncogénicos se han encontrado *in vitro* transcritos diferentes de la región E6 (2 para el HPV16 y 1 para el HPV18), E6'I y E6'II generados por el procesamiento alternativo del RNAm de E6, los cuales no se encuentran para los tipos 6 y 11 (Schneider-Gadicke et al., 1988).

2. Estatus y expresión del genoma viral en lesiones benignas del cérvix.

Las lesiones benignas como el condiloma acuminado son producidas por virus de bajo riesgo como los tipos 6 y 11 y son lesiones productivas. En estas lesiones el genoma viral se encuentra en forma episomal, amplificado miles de copias por célula y la replicación viral se realiza hasta la producción de viriones maduros. Mediante la técnica de "Northern blot" se han encontrado transcritos policistrónicos de 1.4 (el más importante), 1.7, 1.85, 2.7 y 3.2 Kb (Lehn et al., 1984) que se inician en el promotor temprano.

Mediante la técnica de hibridación *in situ* se ha encontrado que la replicación y la transcripción son escasas o nulas en las células basales y aumentan con la diferenciación del epitelio cervical, siendo más intensas en la capa más superficial. El incremento mayor se da en la transición del estrato espinoso al granuloso. Los coilocitos son los más activos. Los transcritos de los genes E4 y E5 son los más intensos y empiezan en las células parabasales.

Los transcritos de E6-E7 son negativos en las células basales y parabasales, y siguen el mismo patrón que E4-E5 pero son 10 veces menos intensos. Los transcritos de E1 y E2 dan señales muy fuertes en los núcleos y muy débiles en el citoplasma de las células de los estratos medio y superior. Los transcritos de L1 y L2 se presentan solo en la superficie y el porcentaje de células positivas varía de una muestra a otra (Stoler y Broker, 1986; Stoler et al., 1989).

3. Estatus del genoma y expresión de los genes virales en las lesiones preinvasoras y los cánceres cervicales.

Es generalmente aceptado que el genoma viral se encuentra en forma episomal en las lesiones preinvasoras e integrado en el cáncer invasor del cérvix. Sin embargo, se ha encontrado el genoma viral integrado en lesiones preinvasoras principalmente en el NIC de alto grado y en forma episomal en cánceres invasores y existen divergencias importantes entre los diferentes reportes. La mayoría de los estudios se han realizados en tumores positivos para el HPV16 y existe solo un reporte con tumores positivos para el HPV18, lo cual es explicable puesto que las lesiones positivas para este virus son mucho menos frecuentes. El estatus del genoma viral en las NIC y el cáncer invasor parece muy diferente entre los dos tipos virales (ver tabla 8). Por un lado, el tipo 18 se encuentra episomal en todas las lesiones preinvasoras e integrado en todos los cánceres y se parece a lo encontrado en la mayoría de las líneas celulares. Aunque en la mayoría de las NIC el tipo 16 se presenta en forma episomal, se presenta en forma integrada en un porcentaje pequeño en la mayoría de los estudios y en un porcentaje muy alto, hasta del 90% en algunos estudios (ver tabla 8). Y por otra parte, en los cánceres invasores positivos para el HPV16 no todos

Tabla 8. Diferencias en el estatus del genoma viral (integrado vs. episomal) en lesiones premalignas y tumores invasores del cuello uterino.

Lugar	Preinvasoras (%)				Invasoras (%)				Ref
	N	E	E+I	I	N	E	E+I	I	
HPV16 (+)									
Ale/Brazil	18	44	39	17	—				106
Alemania	6	100			5		20	80	41
Japón	19	11		89	3			100	190
USA	43	93	7		40	28	20	52	30
Japón	7	57		43	10	10	40	50	53
India	70	90	1	9	42	26	5	69 ^a	32
Japón	—				34	71	6	23	120
China	—				6			100 ^b	21
Alemania	—				4			100 ^c	107
USA	—				14	14		86 ^d	222
Inglaterra	—				31	77		23	127
HPV18 (+)									
USA	16	100			23		4	96	30

N=tamaño de la muestra, E=episomal, I=integrado.

a. En todos está interrumpido E2.

b. Dos se rompen en E1 y 4 en E2.

c. En 3 está interrumpida o deletada la región E1/E2 y en otro L1/L2.

d. Se encuentran deleciones completas o parciales y rearrreglos en E1/E2 en 11 tumores.

los tumores presentan el virus integrado. Aunque en la mayoría de los trabajos predominan los tumores con el virus integrado, en algunos trabajos el porcentaje mayoritario (70%) de los tumores presentan el virus sólo en forma episomal o en combinación con formas integradas (ver tabla 8).

Al igual que en las líneas celulares e independientemente del tipo viral, en la gran mayoría de los tumores, el genoma viral integrado se encuentra deletado a nivel de la región E1-L1 o interrumpido a nivel de E1-E2 quedando el gen E2 interrumpido cuando el rompimiento

es en el gen E2 o sin posibilidades de expresarse a partir del promotor temprano cuando el rompimiento es en el gen E1. Sin embargo, no se ha estudiado en detalle a nivel de la secuencia de nucleótidos del genoma viral los sitios de rompimiento en un número grande de tumores. Tampoco se han encontrado sitios específicos en el DNA celular que sean preferidos para la integración del HPV. Existen pocos trabajos y con pocos tumores en los que se han estudiado los sitios de integración en el DNA celular (ver tabla 9).

En algunos de ellos se ha encontrado el virus integrado en bandas cromosómicas que también contienen algún oncogen celular como c-myc, sin embargo las distancias entre ellos son hasta de 270 kb y no se sabe si el virus tiene alguna influencia directa sobre la expresión o la inducción de rearrreglos de esos oncogenes. En un trabajo previo, después de hacer una biblioteca genómica con una enzima que no corta el genoma viral y aislar las clonas que contenían al virus, se secuenciaron las uniones 5' y 3' del DNA viral y el DNA celular y se encontró que en el extremo 5' las secuencias eran muy parecidas, lo cual sugiere que pudiera estar involucrado un mecanismo de recombinación homólogo durante la integración (ver tabla 9). Al igual que en las líneas celulares, en las lesiones preinvasoras e invasoras positivas para el tipo 16 se observan RNAs mensajeros policistrónicos de diferentes tamaños cuando se analiza el RNA mediante la técnica de "Northern blot". Este tipo de análisis no se ha realizado para el HPV18 porque son poco frecuentes los cánceres y muy escasa las NIC positivas para este tipo viral. En las NIC y los SCC que tienen el HPV16 en forma episomal, predomina el transcrito de 1.6-1.8 Kb, que codifica para todos los genes tempranos, excepto E1. En los SSC que contienen el HPV integrado predomina un transcrito de 1.3 Kb que codifica solamente para los genes E6 y E7 (ver tabla 10).

Tabla 9. Sitos de integración de genes virales en tumores humanos.

Ref.	Disrupción del HPV	Copias	Sitios Integ.	Cromosoma^a	Secuencia Celular
HPV16 (+)					
23		20-50	1	8q24.1	
23		50-100	2	8q24.1 ^b	
96	5' 4235 3' 1320		1		homología 5' ^c
40			2	20pter-20q13 ^c 3p25-3qter ^d	
HPV18 (+)					
23		2-5	1	8q24	
23		2-5	1	2p24	

a. En la banda 8q24.1 esta c-myc y en la 2p24 esta N-myc.

b. Además se encontró en un cromosoma marcador.

c. En esta banda está también el oncogen c-src-1.

d. Esta banda contiene el oncogen c-raf-1.

e. El DNA celular en extremo 5' presenta homología con la secuencia viral.

Todos estos transcritos se inician en el promotor P₉₇ del LCR y terminan en la región de poliadenilación temprana (E) en las que tienen el virus en forma episomal y se continúan con secuencias de DNA celular cuando el virus está integrado. Se ha observado también que los diferentes transcritos presentan recortes y empalmes a diferentes niveles y son muy similares a los encontrados en las líneas celulares. Sin embargo, el transcrito E6*II se presenta mucho más frecuentemente en las NIC-AG y las lesiones invasoras que en las benignas o preinvasoras. El significado clínico y biológico de esta observación aún no se conoce (ver tabla 11).

En estudios más detallados realizados con la técnica de hibridación *in situ* sobre cortes histológicos y con un mayor número de muestras se ha observado que la expresión de los

Tabla 10. RNAm policistrónicos en lesiones preinvasoras e invasoras del cérvix positivas para el HPV16^a.

Dx. His.	N	Estatus del DNA	RNAm (Kb)	Genes
NIC	5	E	4.2	E6,E7,E1,E2,E4,E5
			2.2	E6,E7,E2,E4,E5
			1.6 ^b	E6,E7,E2,E4,E5
			1.4	E2,E4,E5
SCC	1	I+E	4.2	E6,E7,E1
			3.4	E6,E7,E2,E4,E5
			1.8 ^b	E6,E7,E2,E4,E5
SCC	1	I	4.2	E1
			1.8	E6,E7
			1.3 ^b	E6,E7

a. Tomado de la referencia 189.

b. Transcrito más intenso.

Tabla 11. Diferentes transcritos de los genes E6/E7 del HPV16 en células del cérvix de mujeres con diferentes lesiones.

Diagnóstico Histológico	N	Frecuencia		
		E6/E7	E6/E7^a	E6/E7^b
Normal	10	9	9	1
NIC I	3	3	3	0
NIC II/III	9	9	9	4
CaEp	11	11	11	8

a. Tomado de la referencia 88.

b. Estudio con TR-PCR (Transcriptasa Reversa-PCR)

genes virales es muy diferente entre las NIC de bajo grado y las NIC de alto grado y el cáncer invasor, y además entre las positivas para los tipos 16 y 18, lo cual parece estar relacionado con el estatus del genoma viral.

En las NIC de bajo grado el patrón de expresión está muy ligado a la diferenciación y es muy similar al observado en los condilomas. La expresión de los genes tempranos (E), al igual que la amplificación del genoma viral, aumenta con la diferenciación celular, desde las capas celulares basales hacia las superficiales, siendo más bien escasa en la capa basal. Los genes E4-5 son los más intensos y se observan a partir del estrato parabasal. En cambio E6/E7 son menos intensos que E4-E5 y se encuentran preferentemente en los estratos medio y superficial. Los transcritos de los genes E1-E2 se observan en el núcleo y ocasionalmente muy débiles en el citoplasma de las células superficiales. Las señales nucleares pudieran representar secuencias de los intrones removidos de los RNAm E1⁺E4, E6-E7-E1⁺E4 y E6-E7-E2. Los transcritos de la región tardía (L) se observan principalmente en las capas diferenciadas y más intensamente en los coilocitos (Stoler et al., 1992; Dürst et al., 1992; Crum et al., 1988). Esto sugiere que el promotor de la región tardía (L) pudiera estar regulada por factores celulares que dependen del estado de diferenciación celular. En un trabajo previo se ha reportado que la expresión de E7 aumenta conforme aumenta la diferenciación, a diferencia de E6 que permanece sin cambio, lo cual sugiere que pudiera haber un promotor o un sitio aceptor en E7 que es activo solo en las células diferenciadas (Higgins et al., 1992).

En las NIC de alto grado y el cáncer no se observa una diferenciación completa y la habilidad del virus para mantener una infección productiva se pierde porque ya no se

expresan mensajeros tardíos (L) funcionales. Por ejemplo, en las lesiones de alto grado, la intensidad de los transcritos de los genes virales y el nivel de amplificación del genoma viral es menor que en las de bajo grado, como es de esperarse en células menos diferenciadas, pero en general es más uniforme en los diferentes estratos del epitelio incluyendo las células basales. Es raro detectar transcritos de la región tardía (L) y la mayoría de las lesiones positivas para el tipo 16 expresan todos los genes de la región temprana, y en general los transcritos de los genes E6/E7 son más abundantes que los de la región E4-E5, lo cual sugiere que existe un patrón mixto del genoma viral, algunos genomas están episomales y otros integrados. En las lesiones positivas para el tipo 18 casi exclusivamente se expresan los genes E6/E7 y en algunos tumores se encuentran señales nucleares intensas de E1 y en general no se observan señales de E2 y de E4-E5. Este patrón concuerda con la integración del genoma viral.

En los tumores invasores epidermoides también se observan estos patrones de expresión que están asociados al estatus del genoma viral y en los tumores poco diferenciados son muy similares a los que se observan en las NIC de alto grado. En la mayoría de los tumores invasores positivos para el HPV16 se expresan todos los genes tempranos incluyendo E2 (ver tabla 12), siendo la intensidad de los transcritos de los genes E6/E7 igual o mayor que los de la región E4-E5, lo cual sugiere un patrón mixto del genoma viral. En los tumores invasores positivos para el HPV18 y una proporción pequeña de los positivos para el HPV16 (ver tabla 12) solo se observan transcritos muy intensos de E6/E7 y de E1, pero no de E2 ni del resto de los genes virales lo cual concuerda con el patrón de integración del genoma viral. En los adenocarcinomas y carcinomas de células pequeñas el patrón de expresión de

Tabla 12. Frecuencia de expresión de los genes virales en lesiones preinvasoras e invasoras del cérvix positivas para el HPV16 o 18.^a

Diagnóstico Histológico	N		E6/7+		E4/5+		L1	
	16	18	16	18	16	18	16	18
NIC BG	10	1	10	1	10	1	6	1
NIC AG	16	2	16	2	15	0	1	0
SCC	29	13	29	13	26	0	3	0
ACC	4	7	4	7	4	0	2	3

a. Tomado de la referencia 202.

* La no expresión de E4/E5 es indicación de integración.

los genes virales también se correlaciona con el tipo viral (Stoler et al., 1992; Dürst et al., 1992).

En algunos tumores que tienen lesiones invasoras y preinvasoras, se ha observado que el patrón y la intensidad de la expresión de los genes virales es igual en ambos lados de la lesión (Stoler et al., 1992). La diferencia en los patrones de expresión entre las lesiones positivas para el HPV16 y el 18 concuerda con la diferencia en la frecuencia de integración del genoma viral en ambos tipos de tumores (comparar tablas 8 y 12). Es notable que estos patrones de expresión asociados al estatus del genoma viral parece que son independientes del tipo celular (epidermoide, glandular o células pequeñas indiferenciadas) y del grado de diferenciación de las lesiones. Además, en relación a la intensidad de la expresión de los genes E6-E7 no existe una diferencia sustancial entre los tres patrones de expresión, los cuales más bien se diferencian por la presencia de transcritos de E2 y E4-E5, que son mucho más fuertes en los patrones episomales en las NIC de bajo grado (Stoler et al., 1992; Broker et al., 1989; Dürst et al., 1992).

4. Modelos de transformación *in vitro*.

En los primeros ensayos donde se probó la capacidad transformante del HPV, se demostró que, aunque a baja eficiencia los HPV16 y 18 podían transformar líneas celulares de roedor y en conjunto con el oncogen c-ras activado también podían transformar células de riñón de rata recién nacida. En estos sistemas experimentales, se observó que los genes transformantes eran E6 y E7. Recientemente, se ha demostrado que los genes E6 y E7 de los virus de alto riesgo, pero no los de bajo riesgo, pueden transformar queratinocitos humanos primarios (de prepucio o de cérvix normal) después de ser transfectados y cultivados *in vitro* (Munger et al., 1989; Hawley-Nelson et al., 1989; Dürst et al., 1987; Kaur y McDougall, 1988; McCance et al., 1988; Pirisi et al., 1987; Schlegel et al., 1988). Estos queratinocitos transfectados se han podido establecer como líneas celulares y tienen un período de vida incrementado pero no son tumorigénicos en ratones atímicos. Sin embargo, las células en las que se ha integrado el genoma viral se hacen resistentes a la diferenciación inducida por altas concentraciones de calcio en el medio de cultivo. Estos expresan los productos de los genes E6 y E7. Análisis genéticos han indicado que E6 y E7 juntos son necesarios y suficientes para immortalizar a los queratinocitos *in vitro* (Hawley-Nelson et al., 1989; Munger et al., 1989).

En cultivos organotrópicos estas células immortalizadas desarrollan características de crecimiento similares a las neoplasias intraepiteliales del cérvix (Hudson et al., 1990; Woodworth, 1990). Aunque las células transformadas por E6/E7, al principio no producen tumores en ratones atímicos, cuando son mantenidas en cultivo por mucho tiempo algunas se convierten en clonas tumorigénicas (Hurlin et al., 1991; Pecoraro et al., 1991). Este

resultado muestra que estas infecciones virales pueden contribuir al crecimiento maligno, al inducir el crecimiento celular y permitir la manifestación de otras lesiones espontáneas. En estos cultivos celulares se ha observado inestabilidad cromosómica, la cual pudiera ser la causa de los cambios progresivos adicionales.

5. Modelo de la participación del HPV en la carcinogénesis cervical.

La mayoría de los autores aceptan que la integración del genoma viral pudiera ser el paso limitante entre las lesiones NIC-AG y el cáncer invasor, hipótesis que ha sido basada principalmente en las observaciones en líneas celulares derivadas de cáncer del cérvix. En ella se propone que la integración del HPV es necesaria para desreprimir la expresión de los oncogenes E6 y E7. Durante la integración, el genoma viral generalmente se interrumpe a nivel de E1/E2 impidiéndose la expresión del gen E2 y con ello se permite la expresión de los oncogenes virales E6 y E7.

Sin embargo, como se analizó anteriormente la integración muy frecuentemente no se observa en los cánceres invasores positivos para el HPV16 y ocasionalmente se observa en lesiones preinvasoras (ver tabla 8), lo cual sugiere que la participación del HPV pudiera ser diferente en ambos grupos de tumores. En los tumores positivos para el HPV18 la integración parece ser un paso obligado, mientras que en los positivos para el HPV16 la integración del genoma viral pareciera ser un evento opcional.

Lo que es común en ambos grupos de tumores es la expresión de los genes E6 y E7 (ver tabla 12), lo cual sugiere que estas proteínas son el punto clave en la transformación celular y la existencia de un mecanismo de transformación en posición "trans" (Halbert et al., 1991; Schwarz et al., 1986; Takebe et al., 1987).

Esto implica que el efecto represivo de E2 sobre la expresión de los oncogenes del HPV16 es diferente al del HPV18, o que de alguna manera el genoma del HPV16 evita el efecto represivo de E2, como pudiera ser un aumento en la amplificación del genoma viral.

La participación en "trans" de las proteínas E6 y E7 en el proceso canceroso está apoyado fuertemente por su capacidad de immortalización *in vitro* y la acción que ejercen sobre algunas proteínas celulares involucradas en la regulación de la proliferación celular (p53 y Rb). Las proteínas Rb y p53 parece que juegan un papel importante en la regulación de la duplicación del DNA celular y del ciclo celular. La interferencia con su función conlleva a la desregulación del ciclo celular, la inestabilidad cromosómica y la aneuploidía, como regularmente se observa en individuos infectados con los virus de alto riesgo. La inhibición de estas proteínas celulares parece ser un paso obligado en la progresión tumoral, puesto que los cánceres de cérvix negativos para el HPV, a diferencia de los que presentan el HPV, tienen mutaciones en los genes p53 y Rb (Scheffner et al., 1990; 1991). Estas mutaciones pudieran ser la consecuencia de la acción de otros agentes carcinogénicos, como por ejemplo el tabaco u otros agentes infecciosos, que aún no han sido identificados.

Aunque el papel de las proteínas E6 y E7 se ha demostrado claramente en la transformación *in vitro* de células epiteliales humanas, su papel exacto *in vivo* aún es confuso. Es notorio que la transformación celular *in vitro* obtenida con la combinación de E6 y E7 no refleja totalmente la conversión oncogénica vista *in vivo*, ya que las células transformadas *in vitro* no son tumorigénicas en ratones atímicos, mientras que las líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales son muy tumorigénicas en ensayos similares. Sin embargo, la importancia de las proteínas E6 y E7 en la proliferación celular y el

desarrollo tumoral se hace muy evidente cuando células cancerosas del cérvix que contienen el genoma del HPV, son transfectadas con construcciones para producir RNAs antisentido de E6 y E7 bajo control hormonal, reducen notablemente su proliferación celular y se convierten en no tumorigénicas (von Knebel-Doerberitz et al., 1988; Crook et al., 1989). Por lo que E6 y E7 parecen no solo participar en la iniciación del proceso tumoral, sino que también pudieran participar en el mantenimiento de la proliferación celular y el fenotipo maligno.

Aunque la expresión de los genes E6 y E7 no parece ser una diferencia cualitativa entre los tumores invasores y los preinvasores, pudiera existir entre ellos una diferencia cuantitativa a nivel de los diferentes estratos celulares del epitelio cervical. Inicialmente el virus infecta las células basales del epitelio cervical y por efecto de algunos mecanismos celulares no conocidos la expresión viral permanece reprimida. Conforme las células basales empiezan a diferenciarse y avanzar de la base a la superficie en el epitelio cervical, permiten la expresión y replicación del genoma viral. En el caso del HPV6 y 11, la diferenciación celular sería casi completa pero con un aumento en la proliferación celular produciéndose un condiloma acuminado o plano. En el caso de las células infectadas por el virus 16 o 18 predominarían paulatinamente los estímulos que promueven la proliferación celular sobre los que promueven la diferenciación celular. Por ejemplo, en el caso del NIC de bajo grado en el que se observan células neoplásicas en la mitad basal de las capas celulares del epitelio cervical y células bien diferenciadas en la otra mitad que da a la luz vaginal, la resistencia a la diferenciación sería menor que los estímulos proliferativos. Y en las etapas más avanzadas de la lesión, como el NIC de alto grado donde la mayoría de las células son

neoplásicas y poco diferenciadas, los estímulos proliferativos serían mayores que los de la diferenciación. Finalmente la transición a invasión pudiera estar asociada a un estímulo mucho mayor o sostenido de los mecanismos que promueven la proliferación celular.

El incremento de los estímulos proliferativos pudiera estar asociado en parte a un aumento paulatino de la expresión de los genes E6 y E7 por efecto de estímulos intra o extracelulares sobre la expresión viral o a un aumento en la amplificación del genoma viral en el caso del HPV16, el cual ocasionalmente pudiera integrarse y asegurar la expresión sostenida de E6 y E7. En el caso de las lesiones positivas para el HPV18 el panorama pudiera ser un poco diferente. Por ejemplo, el hecho de que la frecuencia del HPV18 sea mucho menor en los NIC (menos del 5%) que en los carcinomas invasores (alrededor del 20%) sugiere que la transición de NIC a carcinoma invasor es acelerada por el HPV18. Esto sugiere que la integración habitual del HPV18 permite una expresión masiva y sostenida de los genes E6 y E7 cuyo estímulo proliferativo sobrepasa rápidamente los estímulos de diferenciación.

No se conocen los estímulos que promueven la integración del genoma viral, pero la gran diferencia que existe en la frecuencia de integración entre el HPV16 y el HPV18, sugiere que la secuencia de bases de la región E1/E2 del HPV18 pudiera ser un factor importante que lo hace más susceptible a la integración.

Además de la participación de E2 en la modulación de la expresión genética de los oncogenes E6 y E7, existen evidencias de la participación de algunos factores celulares. Por ejemplo, se sabe que el factor transcripcional TEF-1 y su co-activador asociado, los cuales se expresan preferencialmente en queratinocitos, son esenciales para la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 del HPV16, y en parte determinan la especificidad celular de los

HPV (Ishiji et al., 1992). Existen otros factores celulares que dependen de estímulos humorales y mecanismos de metilación intracelular del DNA y que parecen ser diferentes en las células benignas y malignas. Se ha postulado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF) pudieran ser factores humorales que inhiben la expresión de los genes virales en las células no tumorigénicas (Zur Hausen, 1989; Braun et al., 1990; Woodworth et al., 1990, Yasumoto et al., 1991). Ambos disminuyen la expresión de E6 y E7 en las células inmortalizadas *in vitro*, pero no en las células malignas. El mecanismo molecular de esta inhibición aún no se conoce.

La represión selectiva de E6/E7 observada en híbridos no tumorigénicos y en queratinocitos inmortalizados cuando son trasplantados en ratones atímicos, también se observa cuando estas células son tratadas *in vitro* con la 5'azacitidina, un potente agente desmetilante (Rosl et al., 1988). Las células malignas no responden a este medicamento y tampoco se reprime la expresión de E6/E7 en ratones atímicos. En las células no malignas *in vitro* o en los animales, el estímulo desencadenante de la represión de la expresión viral pudiera depender de la desmetilación de algunos genes celulares, los cuales deberían estar mutados o reprimidos en las células cancerosas.

Otros tipos de evidencias experimentales han demostrado que algunos genes celulares en las células no malignas tienen un efecto supresor sobre la región de regulación (LCR) del virus que gobierna la expresión de E6/E7. La expresión constitutiva de un gen reportero bajo el control del LCR del HPV18 en líneas celulares de cáncer del cérvix desaparece cuando se forman híbridos con células normales (Rosl et al., 1991). La supresión ocurre por inhibición del inicio de la transcripción y es inactivada 4 horas después del tratamiento con

cicloheximida, lo cual indica que la supresión es debida a una proteína de vida media corta. En este sistema la represión de la expresión del promotor viral de la construcción con el gen reportero, no es acompañada por una represión del DNA del HPV endógeno de las células cancerosas. Esta diferencia en la regulación entre el DNA viral endógeno y exógeno pudiera ser debida a algún efecto en "cis" del DNA celular que flanquea el DNA viral en el sitio de la integración. Por lo cual, la expresión de E6 y E7 pudiera ser modulada dependiendo del sitio de la integración del HPV en el genoma celular (von Knebel-Doerberitz M. et al., 1991; Romanczuck et al., 1990).

Así pues, parece que las diferencias en la regulación de los genes E6 y E7 en las células no malignas en cultivos de tejidos y después de la inoculación en ratones atímicos es controlada por la localización de la integración del DNA viral y por la metilación y desmetilación de algunos genes celulares que suprimen la expresión de los genes virales.

Además de la metilación de genes celulares involucrados en la regulación de los genes virales, la metilación directa de los genes virales puede contribuir a la modificación de la expresión de los genes virales. En híbridos de células HeLa y fibroblastos humanos, el DNA del HPV18 está más metilado que en las células malignas de la misma clona de células Hela (Rosl et al., 1988). Estos factores intracelulares de interferencia pudieran funcionar a través de producir patrones específicos de metilación y desmetilación.

Es probable que la pérdida de esta función celular de control de la expresión viral esté relacionada con alguna región del cromosoma 11, la cual se lesiona o se pierde en un estadio más avanzado del proceso tumoral, puesto que híbridos de células cancerosas con fibroblastos normales que perdieron el fenotipo maligno contienen solo el cromosoma 11 de

la célula normal (Saxón et al., 1986; Koi et al., 1989). Sin embargo, la lesión de este mecanismo debería ser más bien poco frecuente, ya que la alteración final de la función sería el resultado de la lesión de ambos alelos.

Con la integración del genoma viral pudieran obtenerse ventajas adicionales si se insertara en sitios específicos del DNA celular y activar en posición "cis" algunos oncogenes involucrados en el desarrollo del cáncer. Los sitios de inserción en el DNA celular son muy variados y no hay un patrón característico (Schwarz et al., 1985). Sin embargo, en algunas líneas celulares y en algunos tumores el HPV se ha encontrado insertado cerca de algún oncogen celular (c-myc, c-ha-ras, c-src) por lo que la activación en cis de secuencias celulares pudiera ser un mecanismo de transformación en algunos tumores (Dürst et al., 1987). La participación de oncogenes celulares en el desarrollo del tumor no ha sido estudiada ampliamente. Reportes aislados muestran la amplificación y/o rearrreglos de c-myc y c-ha-ras en porcentajes altos de estadios avanzados del cáncer invasor (Riou et al., 1984; Ocadiz et al., 1987). Sin embargo no ha sido establecida la participación de estos oncogenes en el paso de NIC III a carcinoma invasor, y no se sabe si estas alteraciones son necesarias para promover un estadio más avanzado del tumor o simplemente son una alteración secundaria de la célula maligna. Sin embargo, el hecho de que la transformación de células normales en cultivo con los genes E6 y E7 solo es posible cuando se utiliza simultáneamente el oncogen c-ha-ras hace suponer que la participación de algunos oncogenes celulares pudiera ser importante en la progresión de las lesiones preinvasoras a invasoras.

Todos estos datos sugieren que el desarrollo del cáncer del cuello uterino se da por lesiones

génicas sucesivas en varias etapas y concuerda con el desarrollo multifactorial de otros cánceres en seres humanos, en los cuales se han encontrado lesiones génicas de diversos tipos en varios oncogenes celulares y/o genes supresores (Land et al., 1983).

CAPITULO II. Reimpreso del artículo en inglés publicado en la revista *Int. J. Cancer*: 56, 640-645 (1994).

En este capítulo se presenta el reimpreso del artículo en inglés titulado "GENOME AMPLIFICATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES 16 AND 18 IN CERVICAL CARCINOMAS IS RELATED TO THE RETENTION OF E1/E2 GENES", tal y como fue publicado el día 1 de marzo de 1994 en la revista *International Journal of Cancer*: 56, 640-645 (1994) y representa el trabajo principal de esta tesis.

GENOME AMPLIFICATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES 16 AND 18 IN CERVICAL CARCINOMAS IS RELATED TO THE RETENTION OF E1/E2 GENES

Jaime BERUMEN^{1,3}, Leonora CASAS¹, Erika SEGURA¹, José L. AMEZCUA¹ and Alejandro GARCIA-CARRANCA²

¹Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad-Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Apdo. Postal 35-556, 11649 Mexico City; and ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apdo. Postal 70-228, 04510 Mexico City, Mexico.

The level of amplification (copy number/cell) of HPV16 and HPV18 viral genomes and its correlation with the presence of E1/E2 genes were analyzed in a sample of 42 HPV16- and 21 HPV18-positive cervical carcinomas of different clinical stages and histological types. The viral copy number/cell was assessed by dot-blot hybridization and the presence of E1/E2 genes by PCR and Southern blot. The copy number/cell was significantly lower in HPV18-positive than in HPV16-positive tumours (23 ± 8 and 457 ± 191 respectively). Nearly half of the HPV16s (43%) were distributed similarly to the HPV18s in the ranges of 50 or less copies, having its peak at the group of 1 to 10 copies, whereas the remaining HPV16s (57%) spread over the groups of 51 or more copies, with another peak at the group of 101 to 500. The E1/E2 region was absent in all tumours positive for HPV18 and present in 64% of those positive for HPV16. The HPV16 tumours negative for E1/E2 had a much lower viral copy number (17 ± 12) than the positive ones (562 ± 212), thus resembling HPV18-positive tumours. Viral copy number was negatively correlated with the clinical stage of the tumours and directly associated with the degree of histological differentiation. However, these correlations are primarily attributable to the presence or absence of an intact E1/E2 region.
© 1994 Wiley-Liss, Inc.

Some human papillomavirus (HPV) are associated with the genesis of cervical carcinomas. The most common viral types are 16 and 18 (for review, see Gissmann *et al.*, 1987). They account for up to 70% of the reported HPV in all cervical carcinomas, HPV16 being at least twice as frequent as HPV18 (Lorinez *et al.*, 1992).

Integration has been proposed as an activation mechanism for progression from pre-invasive advanced lesions (CIN III) to cervical cancers (Schwarz *et al.*, 1985; Schneider-Maunoury *et al.*, 1987). This integration usually occurs within either the E1 or the E2 open reading frames (ORF) in a manner that results in the loss of expression of the 2 genes (Schwarz *et al.*, 1985; Choo *et al.*, 1987; Wilezynski *et al.*, 1988). In fact, E2 protein is an important transcriptional regulator of HPV expression and its absence may result in increased expression of E6 and E7 oncogenes (for review, see Ham *et al.*, 1991).

In vitro replication of bovine and human papillomavirus has been shown to depend on the integrity of E1 and E2 genes (Ustav and Stenlund, 1991; Del Vecchio *et al.*, 1992). However, in human cervical cancer the role of E1 and E2 genes in viral replication has remained elusive, mainly because of the shortage of appropriate *in vivo* models. The amplification of human papillomavirus genomes either *in vitro* or *in vivo* is known to depend on the differentiation of epithelial cells (Bedell *et al.*, 1991). In benign and CIN lesions, the viral genome persists as replicating molecules in low copy numbers in undifferentiated basal stem cells and in high copy numbers in more differentiated superficial cells (Schneider *et al.*, 1987; Dürst *et al.*, 1992; Stoler *et al.*, 1992). No clear data are available concerning replication related to cell differentiation in invasive carcinomas (Schneider *et al.*, 1987). On the other hand, clinical and molecular data suggest that HPV16 and HPV18 behave differently. Malignant tumours infected with HPV18 generally show integration of viral DNA into the cellular genome (Cullen *et al.*, 1991), whereas in HPV16 tumours the virus is

not always integrated (Meanwell *et al.*, 1987; Matsukura *et al.*, 1989; Cullen *et al.*, 1991). In addition, HPV16 has been found more often associated with well-differentiated carcinomas than has HPV18 (Walker *et al.*, 1989). This study in cervical carcinomas is aimed to characterize the level of amplification (copy number/cell) of viral genome and its correlation with the presence of E1/E2 genes in 63 HPV16- or HPV18-positive tumours of different clinical stages and histological types.

MATERIAL AND METHODS

Samples and experimental design

In a previous study (data not shown) we typed, by dot blot, DNA from 110 cervical carcinomas of patients attending the Oncology Hospital of Instituto Mexicano del Seguro Social in Mexico City during June and July 1987: 42 were positive for HPV16 and 21 for HPV18. The clinical information matching each case was collected according to the criteria of the FIGO and tumours were classified histologically according to the criteria of Reagan quoted by Walker *et al.* (1989). The viral DNA copy number/cell was studied in all positive tumours by dot blot. The presence of E1/E2 and E6/E7 genes was explored by PCR in only 25 tumours positive for HPV16 and 20 for HPV18. Additionally, E1/E2 was confirmed by genomic Southern blot in 12 samples previously positive for E1/E2 by PCR.

Determination of viral copy number/cell

The copy number/cell was calculated by dot-blot hybridization. The DNA concentration was measured spectrophotometrically at 260 nm (Beckmann DU65, Palo Alto, CA), as described by Sambrook *et al.* (1989). The DNA samples were denatured with 0.5 N NaOH/1.5 M NaCl before they were separately spotted in the same Hybond-N⁺ (Amersham, Aylesburg, UK) filter and included: 10 µg of each tumour, 10 µg of human placental genome (HPG; negative control), 725 and 1450 pg of DNA of HPV16 and HPV18 (positive controls). The spotting procedure was performed using a commercial filtering apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA).

Filters were sequentially hybridized with HPV16, HPV18 and HPG probes. The HPV probes were provided by Dr. L. Gissmann and Dr. H. zur Hausen (DKFZ, Heidelberg, Germany) cloned into the vector pBR322. Plasmid amplification and inserts purification were done as described by Walker *et al.* (1989). The conditions for probe labelling, hybridization (Tm-25), washing (Tm-5: 0.1 × SSPE at 65°C) and X-ray exposure of the filters were the same as for Southern blots (see below). The autoradiograms were analyzed by densitometry (Beckmann DU65). The estimation of the actual amount of DNA of each tumour sample remaining in the filter was standardized with

³To whom correspondence and reprint requests should be addressed, at Department of Obstetrics and Gynecology, Loyola University Medical Center, 2160 South First Avenue, Maywood, IL 60153, USA. Fax: (708) 216-1196.

the median intensity value of the dots of the film corresponding to the hybridization with the HPG probe.

In order to calculate the copy number/cell the following assumptions were made: (1) each diploid human cell contains approximately 6 pg of DNA (6×10^9 base pairs; Sambrook *et al.*, 1989), therefore 10 μ g of DNA are derived from 1.7×10^6 cells; (2) there is an even distribution of copy number/cell in all tumour cells and the tumour is not contaminated with normal tissue (see discussion); (3) the viral genome contains approximately 8000 base pairs, therefore 14.5 pg of viral DNA represent 1.7×10^6 viral copies, equivalent to 1 copy per cell.

A dot-blot hybridization experiment was run in parallel to obtain a standard curve of dot-blot intensity for HPV16 viral DNA corresponding to 1, 10, 30, 100, 300, 1,000, 3,000 and 10,000 copies/cell in the same conditions as for tumour samples. A non-linear regression analysis of this data gave the best fit into a hyperbolic equation (Fig. 1, $r = 0.99, p < 0.005$), and the copy number/cell of a given tumour was then extrapolated from this curve. It is worth noting that the linear part of

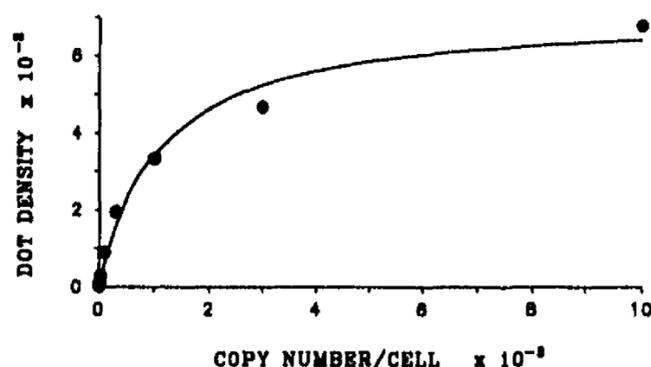


FIGURE 1 - Standard curve of dot-blot intensity for HPV16 viral DNA corresponding to 1, 10, 30, 100, 300, 1,000, 3,000 and 10,000 copies/cell (see "Material and Methods"); $r = 0.99, p < 0.005$.

the hyperbole ranges from 1 to 1000 copies (Fig. 1) and that only 3 tumours fell out of that region (Fig. 4).

PCR analysis of viral regions

Twenty-five HPV16- and 20 HPV18-positive samples were picked up (those in which enough DNA was left from previous experiments) to explore the presence of E1/E2 and E6/E7 ORFs by PCR. The sequence, location and expected size of the PCR product of the used oligonucleotides are given in Figure 2. Separate assays were conducted for each region in each sample. Negative (500 ng of DNA of blood cells and distilled water) and positive (1 ng and 100 fg of viral DNA) controls were included in each series of experiments. Briefly, 50 μ l of tumour DNA were added to achieve a final volume of 50 μ l containing 30 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 200 μ M of each dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 1 μ M of each oligonucleotide, 100 ng/ μ l of bovine serum albumin and 1 U of Taq DNA polymerase (GIBCO-BRL). After covering the mixture with a layer of paraffin oil and denaturing for 5 min at 94°C, the reaction was carried out over 40 cycles in a DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT). Station 1 was set at 94°C for 1 min, station 2 at 55°C for 2 min and station 3 at 72°C for 3 min, with increments of 6 sec every cycle. After this, the reaction was kept at 72°C for another 10 min. After the PCR was completed, aliquots of 10 μ l were electrophoresed for 1 hr at 100 V in 1.5% agarose gels with 0.3 μ g/ml ethidium bromide. The specific fragments were detected by UV and confirmed by Southern-blot hybridization, using as probes the E6/E7 and E1/E2 fragments amplified by PCR from the complete genomes of HPV16 and HPV18. Probe labelling, DNA transfer, conditions for hybridization and X-ray exposition (2 to 24 hr) were done as described below.

Analysis of E1/E2 regions by genomic Southern blot

Genomic DNA (10 μ g) from 12 HPV16 tumours positive for E1/E2 by PCR were subsequently digested with the restriction enzymes BamHI and PstI (GIBCO-BRL) in the conditions recommended by the manufacturer and then electrophoresed

HPV	REGION	SEQUENCE (5'-3')	LOCATION
16	E6/E7	ATGCACCAAAAAGAGAACTGC GGATCAGCCATGGTAGATTA	83-102 875-856
	E1/E2	TAATCTACCATGGCTGATCC GGTCACGTTGCCATTCATA	856-875 3787-3768
18	E6/E7	ATGGCGCCCTTTGAGGATCC TTACTGCTGGGATGCACACC	105-134 907-888
	E1/E2	GGTGTGCATCCAGCAGTAA TTCATTCCTGCACCTGTCC	888-907 3801-3782

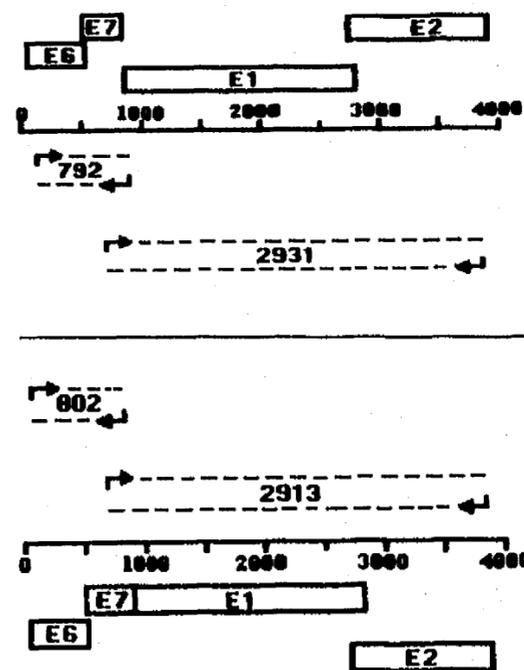


FIGURE 2 - Oligonucleotides used in this study and schematic localization of the amplified regions. Oligonucleotides are shown in a 5' to 3' orientation, along with their position relative to the corresponding maps for HPV16 (Seedorf *et al.*, 1985) and HPV18 (Cole and Danos, 1987). Portions of these maps are shown along with the corresponding fragments obtained after PCR amplification of the respective regions. Sizes of the expected PCR products are indicated in base pairs.

in agarose gels for 6 hr at 50 V. Gels were treated for 10 min in 0.25 N HCl, 30 min in 0.5 N NaOH/1.5 M NaCl and blotted onto Hybond+ filters (Amersham) with 0.4 N NaOH using a VacuGene System (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The filters were pre-hybridized overnight at 42°C (Tm-25) in 6 × SSPE (1 × SSPE = 180 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.7), 40% formamide, 5 × Denhardt solution (0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% Ficoll 400 and 0.1% BSA fraction V), 1% SDS and 20 µg/ml of denatured salmon sperm DNA. Afterwards, 1 or 2 × 10⁶ dpm/ml of de-natured HPV16-labeled probe was added (randomly primed as described below) and hybridized over 48 hr. The filters were then washed twice at 60°C for 15 min with 2 × SSPE-0.1% SDS, 0.2 × SSPE-0.1% SDS and 0.1 × SSPE-0.1% SDS (Tm-10) and exposed in X-ray films with an enhancing tungsten screen at -70°C for 1 to 10 days. The filter was de-hybridized in the conditions recommended by the manufacturer and then re-probed in the same conditions with the 2.8-kb PstI-fragment of HPV16 probe (E1/E2). The probes were labeled by random priming with [α -³²P] dATP (NEN, Boston, MA) to achieve a specific activity of 1 to 2 × 10⁹ dpm/µg DNA as described (Sambrook *et al.*, 1989).

Statistical analysis

For the copy number/cell the results are expressed as the mean ± SEM of N experiments. The Spearman's rank correlation test was used to assess the association between copy number/cell and the clinical stage of the tumours. The Mann-Whitney U-test was used to assess the significance of differences on the copy number/cell and either χ^2 or Fisher's exact test when appropriate was used to assess the significance of differences on the presence of E1/E2 among the groups. A difference was considered significant at a level of $p < 0.05$.

RESULTS

Copy number/cell

Nearly half of HPV16 tumours (Fig. 3a) gave weak dot-blot hybridization signals similar to the HPV18s (Fig. 3b) and those remaining had bigger and more intense dots. In the densitometric analysis the copy number/cell varied over a wide range in tumours infected with HPV16 (1-7392, mean = 457 ± 191). The mean was significantly lower ($p < 0.01$) and the range narrower in the HPV18-containing tumours (1-156, mean = 23 ± 8). Furthermore, when the percentage of tumours of the 2 groups were plotted against the copy number/cell over the range of 1 to 1000 or more (Fig. 4), it was clear that the HPV18 tumours were concentrated (85.7%) within the categories of 50 or less copies/cell having a peak at the 1-10 category. One part (42.9%) of the HPV16s behaved similarly to the HPV18s within the categories of 50 or less copies, while the remaining HPV16s (57.1%) spread over the categories of 51 or more copies with a peak at the category of 101-500 (see Fig. 4).

Table I shows that the HPV16 tumours of clinical stage I had the highest mean copy number/cell, with a declining trend towards stage IV. When the copy number and clinical stage of HPV16 tumours were related with Spearman's rank test, a significant negative correlation for the 2 variables was found ($r = -0.67$, $p < 0.001$). In HPV16-positive tumours the mean copy number of the squamous large-cell non-keratinizing (LCNK) carcinomas was much lower than in tumours of other histological types ($p < 0.05$; Table I). The same analysis for distribution according to clinical stage and histological type was done for HPV18-containing tumours and no correlations could be established, as the copy number/cell was consistently low in this group.

Presence of viral region E1/E2

There was a marked difference on the relative frequency of the presence of E1/E2 region found by PCR between the

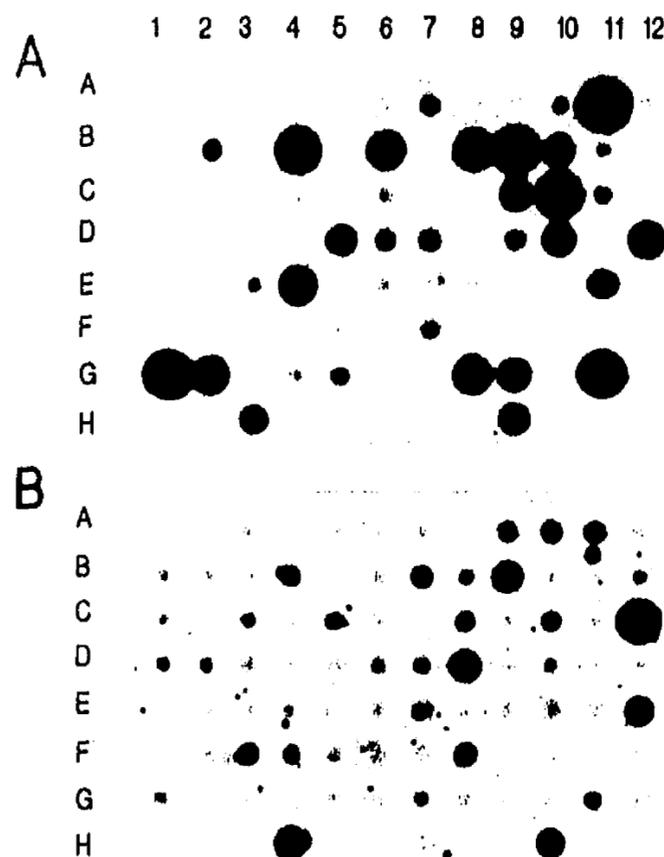


FIGURE 3 - Dot-blot autoradiograms of HPV DNA copy number assays. In (a) the filter was hybridized with the HPV16 probe and in (b) the same filter was hybridized with HPV18 probe. In both panels, the positions A1 to G12 correspond to 10 µg of DNA of cervical carcinomas, and positions H3 and H9 to 50 and 100 copies of HPV16 genome respectively; positions H4 and H10 correspond to 100 and 50 copies of HPV18 genome respectively; H11 and H12 contain 10 µg human placental genome as negative controls (see "Material and Methods").

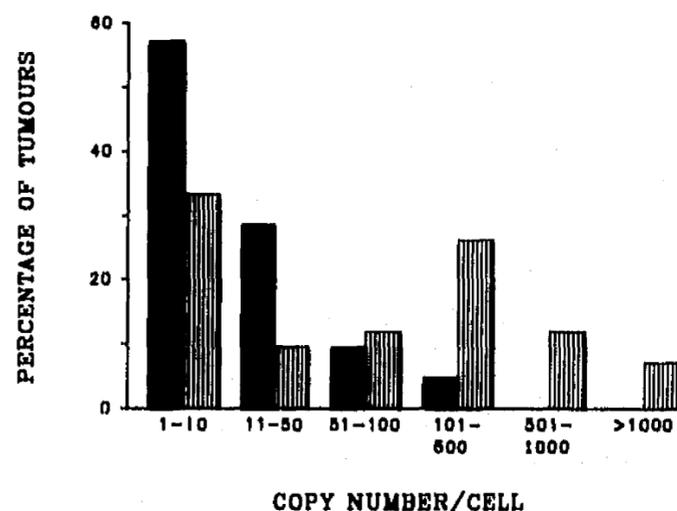


FIGURE 4 - Frequency distribution of HPV16 (n = 42, ▨) and HPV18 (n = 21, ■) cervical cancers according to the copy number/cell.

HPV18 and the HPV16 tumours. This region was amplified in 16 out of 25 (64%) HPV16 carcinomas and in none of the HPV18-positive samples ($p < 0.00001$; Fig. 5). When present, the amplified band of the E1/E2 region was of the expected

TABLE I - VIRAL COPY NUMBER IN HPV16-POSITIVE TUMOUR SAMPLES ACCORDING TO CLINICAL STAGE AND HISTOPATHOLOGICAL TYPE (N = 42)

Clinical stage	Copy number/cell		Histological type
	Mean	SEM (N)	
I	798 ± 219	(3)	LCNK
II	723 ± 412	(19)	LCK
III	179 ± 61	(17)	ACC
IV	1	(3)	ASCC

Numbers represent the mean ± SEM of (N) samples. LCNK, squamous large-cell non-keratinizing carcinoma; LCK, squamous large-cell keratinizing carcinoma; ACC, adeno cell carcinoma; ASCC, adeno-squamous-cell carcinoma.

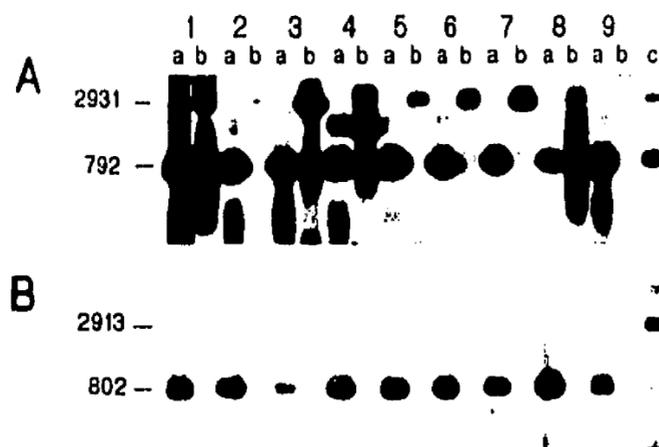


FIGURE 5 - Southern-blot autoradiograms of E1/E2 and E6/E7 ORFs amplified by PCR. (a) corresponds to HPV16-positive samples and (b) to HPV18-positive samples. In both panels, lane a corresponds to the E6/E7 reaction of a tumoral sample, b to E1/E2 reaction of the same sample and c to PCR reaction (5 µl of a dilution 1/50) of both regions amplified separately from 100 fg of HPV16 or HPV18 genomes. Size of the products in base pairs is indicated.

TABLE II - VIRAL COPY NUMBER IN HPV16-POSITIVE TUMOUR SAMPLES ACCORDING TO THE STATUS OF E1/E2 GENES (N = 25)

Clinical stage	Copy number/cell	
	E1/E2 (+)	E1/E2 (-)
I	798 ± 219 (3)	—
II	541 ± 338 (10)	29 ± 27 (4)
III	500 ± 114 (3)	9 ± 4 (4)
IV	—	1 (1)
Histological type		
LCNK	344 ± 145 (6)	17 ± 12 (9)
LCK	453 ± 195 (5)	—
ACC/ASCC	995 ± 639 (5)	—
Total	582 ± 212 (16)	17 ± 12 (9)

Numbers represent the mean ± SEM of (N) samples.

size in all cases but one (Fig. 5). As expected, all the tumour DNA samples explored by PCR exhibited an intact E6/E7 region (Fig. 5).

All DNA samples from HPV16-positive adeno-cell carcinoma, adeno-squamous-cell carcinoma and squamous large-cell keratinizing (LCK) carcinoma (N = 10) chosen to explore the E1/E2 region by PCR presented this region, contrasting ($p < 0.01$) with the group of LCNK (n = 15), in which only 6 were positive for this region (Table II). In those cases for which sufficient DNA was available for Southern blot analysis (n = 12), the results of PCR could be reproduced. All samples showed the predicted band of 2.8 kb corresponding to E1/E2 genes when the tumour DNA was digested with PstI and

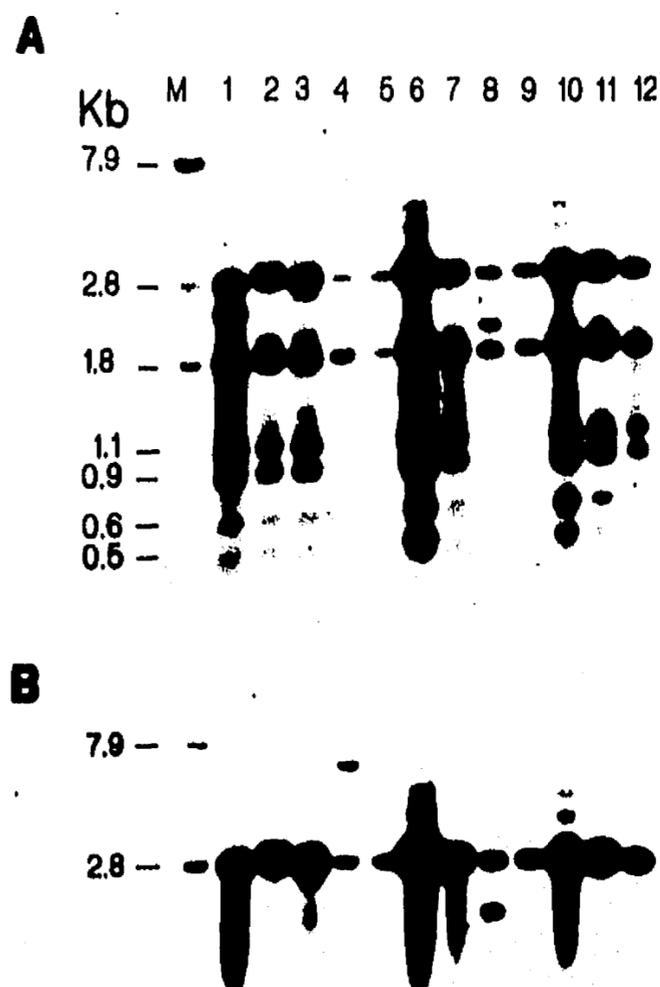


FIGURE 6 - Autoradiogram of genomic Southern-blot analysis of HPV16 carcinomas positive for E1/E2 region by PCR. DNA of 12 HPV16 carcinomas (lines 1-12) were sequentially digested with PstI and BamHI restriction enzymes, Southern blotting and hybridized with the complete genome (a) or with the 2.8-kb PstI fragment (E1/E2) of HPV16 probe (b), as described in "Material and Methods". As size markers and sensitivity controls in line M, 50 pg of intact HPV16 genome plus 50 pg of HPV16 genome digested with BamHI/PstI were applied; the size of the bands in kb is indicated and E1/E2 ORF corresponds to the 2.8-kb band.

BamHI restriction enzymes (Seedorf *et al.*, 1985) and hybridized either with the complete genome or the 2.8-kb PstI fragment (E1/E2) of HPV16 probe (see Fig. 6). These data suggest that the E1/E2 fragment is represented in the majority of cells or at least in a great number of them.

The episomal or integrated state of the viral genomes was not explored extensively in this study; nevertheless in all tumours with an intact E1/E2 region, viral genomes seemed to

be predominantly episomal, but 5 also showed extra bands suggesting the existence of integrated forms as deduced by the restriction patterns (PstI/BamHI) observed in the Southern blots (Fig. 6, lanes 1, 4, 6, 8 and 10).

Correlation between E1/E2 and copy number/cell

As stated before, all HPV18 tumours had a low copy number (less than 156) and none of those tested by PCR had detectable E1/E2. It can be seen in Table II that for HPV16 tumours the presence of E1/E2, independently of the clinical stage or histological type was accompanied by a much higher copy number than observed in the samples negative for the region. All HPV16 tumours in which E1/E2 region was amplified, except 2 which had 4 and 34 copies/cell, belonged to the categories of 51 or more copy number/cell, whereas all but one of the negative samples for E1/E2 were grouped among the low copy numbers, having less than 50 copies/cell.

Furthermore, the correlation described before for the overall population of HPV16 tumours between the clinical stage and the copy number/cell disappeared when the samples were grouped according to the presence or absence of E1/E2 (Table II). Likewise, the differences in copy number between the LCNK and the other histological types became immaterial under the criterion of the presence of E1/E2 (Table II) and it is evident that the LCNKs can be divided into 2 groups, one with a high copy number/cell (344 ± 145) positive for E1/E2 and the other with a low copy number/cell (17 ± 12 , $p < 0.01$) negative for E1/E2 (Table II).

DISCUSSION

This study is an attempt to characterize the quantitative relationship between the viral copy number/cell and the status of E1/E2 ORFs of HPV16 and HPV18 in cervical carcinomas.

It is important to consider some limitations in the meaning of what is described as the copy number/cell. The assumptions on which this concept is based may, in fact, not lead to calculate the actual copy number/cell. Just to mention some limitations, the concept does not take into account the possibility of an uneven distribution of the viral genome among the cells, a fact that has already been observed (Meanwell *et al.*, 1987; Schneider *et al.*, 1987). Other considerations ignored are the variation of the nuclear DNA ploidy in tumoral cells and the magnitude of non-epithelial mass and normal cells in the tumours. It is also possible that for "high copy numbers" the readings of the X-ray film signals may fall out of the linear part of the standard curve. This was the case of only 3 tumours in this study and probably affects the accuracy of the estimate of the absolute value of the "copy number". However, since the considerations are made about the relative differences and not the absolute copy number per cell, this problem does not invalidate the data. In spite of these limitations, the value "copy number/cell" as determined in this study is an index of the representation of the viral genome in the DNA of the sample and the term is preserved to comply with the contemporary literature in the field.

The behaviour of the HPV18 tumours as a single population with a rather low copy number coincided with the disruption or absence of E1/E2 ORFs, evidencing a relationship between the integrity of E1/E2 and the copy number which is further stressed by the distribution of HPV16 tumours into 2 distinct sets, one resembling HPV18 tumours, with low copy number and scarce frequency of amplification of E1/E2, and another with a much higher copy number, always exhibiting the E1/E2 region.

Although the amplified E1/E2 fragment was generally of the expected size, we cannot rule out the possibility that small deletions or point mutations existed in some cases. However, the direct correlation between the number of copies and the

presence of the E1/E2 region suggests that these genes were functional in the majority of cases in which they were amplified. The possibility that the amplified E1/E2 were derived from condylomatous or pre-neoplastic cells co-existing with malignant cells seems unlikely, since no histological lesions of this kind were reported in tumours positive for the region.

It has been demonstrated that viral replication is associated with the degree of epithelial differentiation (Bedell *et al.*, 1991). In condylomata plana and acuminata and CIN the *in situ* hybridization signals of HPV are concentrated in the most differentiated epithelial cells of the cervix (Schneider *et al.*, 1987; Dürst *et al.*, 1992; Stoler *et al.*, 1992). These observations were extended in this study, as the keratinizing invasive tumours showed a high mean number of viral copies/cell and E1/E2 was always amplified. In contrast, the less differentiated LCNK had a lower mean copy number/cell and more remarkably, the E1/E2 region was absent in two thirds of them, coinciding with the cases in which there was a low copy number. The fact that the remaining third of LCNK amplified E1/E2 and had a high copy number may suggest that the integrity of the region rather than the degree of differentiation is the primary determinant of viral replication.

It is quite remarkable that for HPV16 tumours as a whole the copy number/cell decreases as the clinical stage progresses. However, this relationship disappears when the tumours are classified according to the presence or absence of E1/E2. This study could not gather a sample big enough to establish a significant correlation between the clinical stage and the presence of E1/E2 and this remains to be clarified in further studies. However, it is interesting to recall that, in cell lines derived from cervical carcinomas, the number of copies falls with increasing cellular passages (Di Lorenzo *et al.*, 1992) at the same pace that integration events increase (Bedell *et al.*, 1991).

Our data provide evidence that in invasive carcinomas the integrity of E1/E2 is essential for viral replication and that its disruption impairs the ability of the viral genome to replicate, a fact already observed in cell lines where the replication of bovine and human papillomavirus depends on the integrity of E1 and E2 genes and the formation of E1/E2 protein's complex (Ustav and Stenlund, 1991; Del Vecchio *et al.*, 1992).

The frequency of retention of E1/E2 in HPV16 tumours that we found (64%) is considerably higher than the value (21%) found by other authors (Wilezynski *et al.*, 1988). It is generally assumed that E1/E2 is disrupted whenever the virus is integrated to the host chromosome. There is a great deal of variation (from 30 to 100%) in the reported frequencies of viral integration in HPV16 carcinomas (Meanwell *et al.*, 1987; Choo *et al.*, 1987; Matsukura *et al.*, 1989; Cullen *et al.*, 1991), probably reflecting epidemiological differences among the population studied. Such variation does not exist for HPV18 tumours, where integration of the viral genome is constantly found (Cullen *et al.*, 1991). In this sense, our results with the status of E1/E2 are in agreement with the studies reporting a relatively low frequency of viral integration in HPV16-positive carcinomas (Meanwell *et al.*, 1987; Matsukura *et al.*, 1989) and a high frequency of integration in HPV18 carcinomas (Cullen *et al.*, 1991).

Our data suggest that integration and inactivation of E2 are not always essential for the development of HPV16 carcinomas, which in this respect are different from HPV18 tumours. In addition, this finding is consistent with previous observations of simultaneous increased expression of E6 and E7 with E2 gene in keratinocytes immortalized by HPV16 (Nasser *et al.*, 1991) and in a high proportion of HPV16 carcinomas (Dürst *et al.*, 1992; Stoler *et al.*, 1992).

It has been demonstrated that the level of transcription of the E6, E7 and E2 in different HPV16 immortalized human keratinocyte cell lines was similar independently of the varia-

tion of the number of viral gene copies per cell (Nasseri *et al.*, 1991). However, in these cell lines the HPV DNA copy number ranges from 1 to 20, whereas in cervical cancers the range goes from 1 to more than 7,000 copies/cell, as shown in this study. It might be of great interest to explore whether a high gene dosage provides an alternative mechanism for de-regulation of E6/E7 ORFs even in the absence of viral integration.

There is increasing agreement on the higher clinical aggressiveness of HPV18-containing compared with HPV16-containing tumours (Kurman *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1989; Lorincz *et al.*, 1992), a feature that may be related to differences in viral integration and loss of function of E2 ORF (Cullen *et al.*, 1991). In view of this and our findings it appears interesting to

investigate whether the HPV16-positive tumours that are similar to the HPV18 population in terms of loss of E1/E2 and low copy number also show clinical behaviour similar to that of the HPV18s.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. R. de la Huerta who provided the tumor samples and the clinical information and to Dr. L. Gissmann for critical reading of the manuscript. Special thanks to Ms. M. Hashizume and Ms. R.-M. Ordoñez for secretarial assistance. This work was supported by the Secretariat of National Defense of Mexico.

REFERENCES

- BIDELL, M.A., HUDSON, J.B., GOLUB, T.R., TURK, M.E., HOSKEN, M., WILBANKS, G.D. and LAMINS, L.A., Amplification of human papillomavirus genomes *in vivo* is dependent on epithelial differentiation. *J. Virol.*, **65**, 2254-2260 (1991).
- CHOO, K.B., PAN, C.C. and HAN, S.H., Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology*, **161**, 259-261 (1987).
- COLE, S.T. and DANOS, O., Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 products. *J. mol. Biol.*, **193**, 599-608 (1987).
- CULLEN, A.P., REID, R., CAMPION, M. and LORINCZ, A.T., Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia. *J. Virol.*, **65**, 606-612 (1991).
- DEL VECCHIO, A.M., ROMANCZUK, H., HOWLEY, P.M. and BAKER, C.C., Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J. Virol.*, **66**, 5949-5958 (1992).
- DI LORENZO, T.P., TAICHMAN, L.B. and STEINBERG, B.M., Replication and persistence of HPV DNA in cultured cells derived from laryngeal papillomas. *Virology*, **186**, 148-153 (1992).
- DÜRST, M., GLITZ, D., SCHNEIDER, A. and ZUR HAUSEN, H., Human papillomavirus type-16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by *in situ* hybridization. *Virology*, **189**, 132-140 (1992).
- GISSMANN, L., DÜRST, M., OLTERSDORF, T. and VON KNEBEL DOEBERITZ, M., Human papillomaviruses and cervical cancer. *Cancer Cells*, **5**, 275-280 (1987).
- HAM, J., DOSTAYNI, N., GAUTHIER, J. and YANIV, M., The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *TIBS*, **16**, 440-444 (1991).
- KURMAN, R.J., SCHEFFMAN, M.H., LANCASTER, W.D., REID, R., JENSON, B., TEMPLE, G.F. and LORINCZ, A.T., Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, **159**, 293-296 (1988).
- LORINCZ, A.T., REID, R., JENSON, B., GREENBERG, M.D., LANCASTER, W. and KURMAN, R.J., Human papillomavirus infection of the cervix: relative-risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet. Gynecol.*, **79**, 329-337 (1992).
- MATSUKURA, T., KOI, S. and SUGASE, M., Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology*, **172**, 63-72 (1989).
- MEANWELL, C.A., COX, M.F., BLACKLEDGE, G. and MAITLAND, N.J., HPV16 DNA and malignant cervical epithelium: Implications for the aetiology and behavior of cervical neoplasia. *Lancet*, **1**, 703-707 (1987).
- NASSERI, M., GAGE, J.R., LORINCZ, A. and WETSTEIN, F.O., Human papillomavirus-type-16-immortalized cervical keratinocytes contain transcripts encoding E6, E7, and E2 initiated at the P97 promoter and express high levels of E7. *Virology*, **184**, 131-140 (1991).
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T., *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989).
- SCHNEIDER, A., OLTERSDORF, T., SCHNEIDER, V. and GISSMANN, L., Distribution pattern of human papilloma-virus-16 genome in cervical neoplasia by molecular *in situ* hybridization of tissue sections. *Int. J. Cancer*, **39**, 717-721 (1987).
- SCHNEIDER-MAUNOURY, S., CROISSANT, O. and ORTH, G., Integration of human papillomavirus-type-16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J. Virol.*, **61**, 3295-3298 (1987).
- SCHWARZ, E., FRESSE, U.K., GISSMANN, L., MAYER, W., ROGGENBUCK, B., STREMLAU, A. and ZUR HAUSEN, H., Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature (Lond.)*, **314**, 111-114 (1985).
- SEEDORF, K., KRÄMMER, G., DÜRST, M., SUHAI, S. and RÖWEKAMP, W.G., Human papillomavirus-type-16 DNA sequence. *Virology*, **145**, 181-185 (1985).
- STOLER, M.H., RHODES, C.H., WHITECK, A., WOLINSKY, S.M., CHOW, L.T. and BROKER, T.R., Human papillomavirus-type-16 and -18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum. Pathol.*, **23**, 117-128 (1992).
- USTAV, M. and STENLUND, A., Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.*, **10**, 449-457 (1991).
- WALKER, J., BLOSS, J.D., LIAO, S-Y, BERMAN, M., BERGEN, S. and WILCZYNSKI, S.P., Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet. Gynecol.*, **74**, 781-785 (1989).
- WILCZYNSKI, S.P., PEARLMAN, L. and WALKER, J., Identification of HPV16 early genes retained in cervical carcinomas. *Virology*, **166**, 624-627 (1988).

CAPITULO III. Resultados adicionales y discusión general.

A. La distribución del genoma viral en las células cancerosas.

Este estudio es un intento para caracterizar la relación cuantitativa entre el número de copias virales/célula y el estatus de los genes E1/E2 en carcinomas del cérvix positivos para el HPV16 o el HPV18.

Es importante considerar algunas limitaciones en el significado de lo que llamamos número de copias/célula. Las suposiciones en las cuales se basó este concepto pudieran en efecto calcular incorrectamente el número real de copias/célula. Por ejemplo, en los cálculos no se tomó en cuenta la posibilidad de una distribución desigual del genoma viral entre las células del tumor, un hecho que se ha observado aisladamente en otros trabajos (Meanwell et al., 1987; Schneider et al., 1987). Con el método de hibridación en punto (HP) utilizado en este trabajo para cuantificar el número de copias, no se puede predecir si la distribución y la cantidad de genomas virales es uniforme entre las células cancerosas, porque se utiliza DNA en solución purificado de un homogeneizado celular del tumor. Este método tiene una sensibilidad de 1 *pg* de DNA, lo cual equivale aproximadamente a 117 000 copias virales y corresponde a 0.07 copias/célula si se exploran 10 *ug* de DNA (1.7×10^6 células) y el genoma viral se encuentra distribuido uniformemente en todas las células cancerosas. El cálculo de 100 copias/célula en un tumor, pudiera corresponder a diferentes combinaciones en cuanto al número de células positivas o en la distribución del número de copias entre las células. Por ejemplo, este cálculo se obtendría igualmente si cada célula del tumor tuviera 100 copias o si solo el 10% o el 1% de ellas tuvieran 1000 o 10,000 copias, respectivamente y el resto fueran negativas o tuvieran solo 1 copia. El significado biológico en un caso y en

otro pudiera ser muy diferente y no correspondería a lo que se está expresando con el número promedio de copias/célula.

Igualmente, la medición de la integridad de los genes E1/E2 que se midió en el DNA en solución, inicialmente mediante la PCR, pudiera no representar el mismo fenómeno en la mayoría de las células. La PCR tiene una sensibilidad en nuestro laboratorio de 1 fg de DNA viral, que equivale aproximadamente a 117 copias virales y a 1 copia por cada 725 células si se exploraron 500 ng de DNA tumoral (los cuales derivan de 85,000 células). La amplificación del fragmento E1/E2 por PCR pudiera deberse a que todas las células tienen 1 o más copias del genoma viral en forma episomal o a que solo 1 de cada 725 células tuvieran 1 copias en forma episomal y el resto (724 células) tuvieran el genoma viral integrado con los genes E1/E2 interrumpidos, o combinaciones de ambos. En el segundo caso, la interpretación del resultado de la PCR como un tumor positivo para E1/E2 sería una interpretación falsa de la realidad. La medición de la integridad de la región E1/E2 mediante la técnica de *Southern blot*, que tiene una sensibilidad menor a la PCR y similar a la HP (la sensibilidad es de 1 copia cada 14 células), nos daría una idea más aproximada de la cantidad de células en las que estaría presente íntegra la región E1/E2. Con esta técnica, se confirmó la banda de E1/E2 en todos los tumores explorados (12 de 16 positivos por PCR) y se detectaron solo formas episomales en 7 tumores y un patrón mixto (episomal e integrado) en los 5 tumores restantes, siendo mucho más intensas las bandas de las formas episomales, lo cual indica que el patrón episomal fue el más predominante en esos tumores y que los genes E1/E2 están presentes en la mayoría de las células tumorales que contienen el genoma viral. Sin embargo, esta técnica tampoco nos dice que proporción de células

tienen el genoma viral.

Otras consideraciones ignoradas son la variación en la ploidia del DNA nuclear en las células tumorales y la proporción de células normales o no epiteliales en el tumor. También es posible que para los tumores con un número alto de copias las señales en las placas de rayos-X puedan caer en la parte no lineal de la curva estándar. Este fue el caso de solo 3 tumores en este estudio y probablemente afecta la precisión de la estimación del valor absoluto del "número de copias". A pesar de estas limitaciones, el valor "número de copias/célula" como fue determinado en este estudio es un índice de la representación del genoma viral en el DNA del tumor y debido a que las consideraciones están hechas en relación a las diferencias relativas y no al valor absoluto del número de copias/célula, este problema no invalida los datos.

Para explorar las diferencias en la distribución y la cantidad de genomas virales entre las células de un tumor y si estas afectan el cálculo del número de copias/célula, se hibridaron cortes histológicos de algunos de los tumores reportados en este estudio (cap.II) con sondas biotiniladas del HPV16 o 18 mediante la técnica de hibridación *in situ*. En la tabla 1 se muestra el patrón nuclear de la señales de hibridación *in situ*, el porcentaje de células epiteliales en el tejido, el número de copias y la presencia de los genes E1/E2. La distribución de la señal no fue uniforme en muchos de los tejidos e igualmente el porcentaje de células epiteliales en el tejido fue muy variable, lo cual indica claramente que la estimación del valor del número de copias no es completamente real en todos los tumores. Además, se observa que existen patrones de hibridación muy variables y frecuentemente se presentan mezclas de ellos en las células de un mismo tumor, es decir células que sólo

Tabla 1. Señal de hibridación *in situ*, número de copias y presencia de los genes E1/E2 en cánceres cervicales positivos para HPV16 y HPV18.

Tumor	Tipo Celular ^a	% Células epiteliales	Patrón Nuclear ^b	Número Copias	Genes E1/E2
HPV 16 (+)					
T58	LCNK	100	1	2	-
T104	LCNK	60	1	3	-
T83	ASCC	100	1	336	+
T110	LCNK	100	1	5	-
T72	LCK	100	1	126	+
T71	LCNK	80	1	335	+
T81	LCNK	100	1-5	16	-
T91	LCNK	90	1-5	85	+
T105	LCNK	60	1-5	1	-
T100	LCNK	40	1-5	2	-
T76	LCNK	80	1-5	111	-
T111	LCNK	100	1-5	16	-
T74	ACC	90	Un	669	+
T108	LCNK	70	Un-1	468	+
T106	LCK	80	Un-1	271	+
T65	LCK	80	Un-5	437	+
T64	LCK	100	Un-5	7392	+
HPV 18 (+)					
T84	LCNK	100	1	1	-
T87	ASCC	100	1	61	-
T70	LCNK	80	1	2	-
T59	LCNK	90	1	7	-
T54	LCNK	60	1	15	-
T107	LCK	80	1	45	-

a. LCNK= Carcinoma epidermoide no queratinizante de células grandes, LCK= Carcinoma epidermoide queratinizante de células grandes, ACC= Adenocarcinoma, ASCC= Carcinoma adenoescamoso. b. El patrón nuclear se clasificó en: 1= 1 punto, 1-5= 1-5 puntos, Un= más de 5 a incontables puntos o una mancha.

contienen un punto y células que contienen muchos puntos o una mancha. El número de copias se pudiera corregir relativamente fácil de acuerdo al porcentaje de células epiteliales cancerosas en el tumor, pero sería muy difícil o poco confiable corregirlo en relación a la

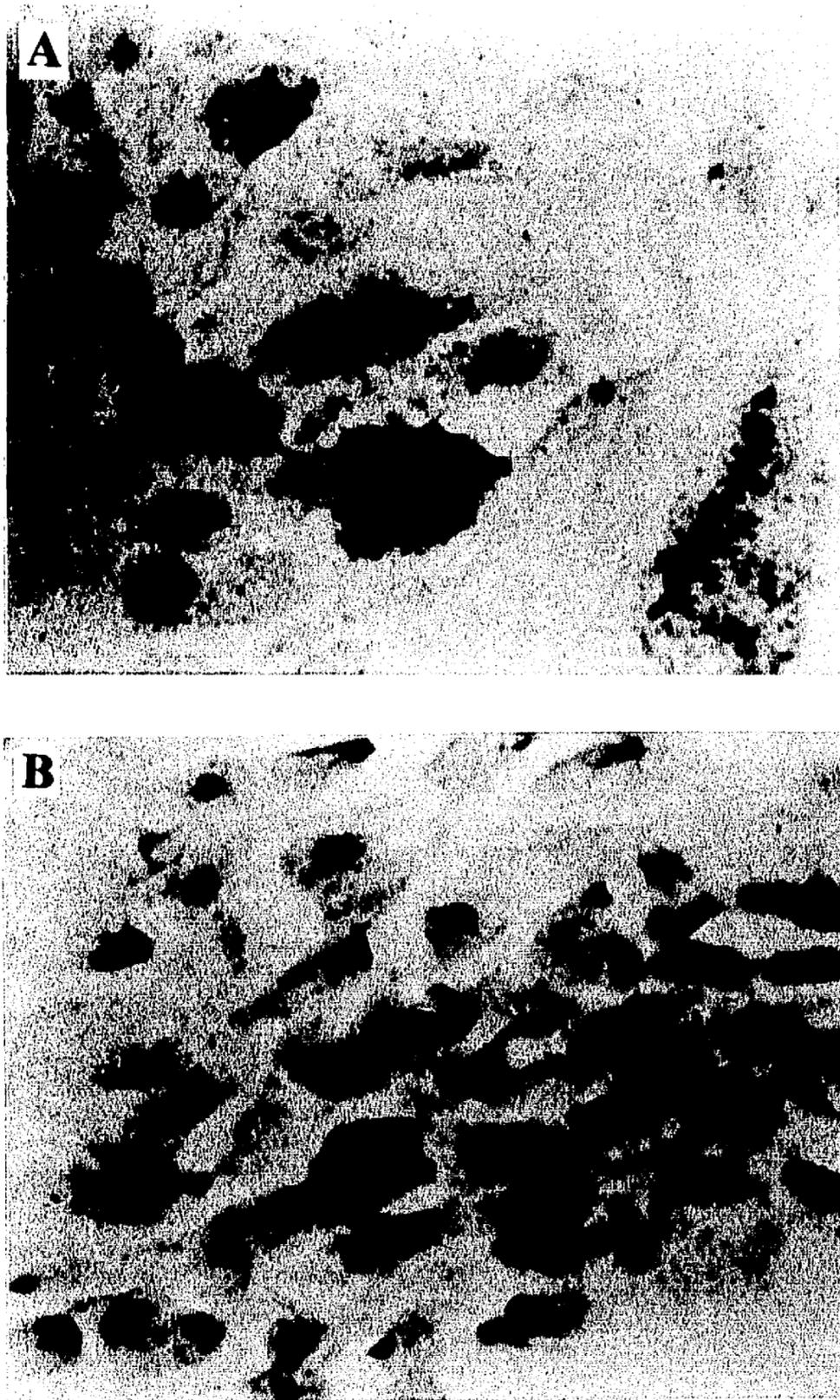


Figura 1. Hibridación *in situ* con sondas biotiniladas en carcinomas de cérvix. Se muestra la señal de hibridación obtenida con sondas biotiniladas, el panel A corresponde a un tumor positivo para el HPV16 y el B a uno para el HPV18. La señal de hibridación es de color guinda-morado oscuro y la contratinción del tejido es color rosa (colorante rojo rápido nuclear). El patrón nuclear de la señal de hibridación es claramente diferente entre los dos tipos virales, el positivo para el HPV16 presenta células que tienen desde 1 hasta incontables puntos y el positivo para el 18 solo células con 1 punto. La intensidad de la señal es similar en ambos tumores. Amplificación 1000X.

Tabla 2. Patrón nuclear de la señal de la hibridación *in situ* en cánceres cervicales positivos para HPV16 y HPV18.

Tipo HPV	No. casos	Patrón nuclear (%)		
		1 punto	Mixtos	
			1-5 puntos	1-incontables puntos.
16 ^a	17	35	35	30
18	6	100	—	—

a. Los tumores clasificados en los grupos con 1-5 y 1-incontables coexisten células con diferentes cantidades de puntos.

Tabla 3. Correlación entre la señal de la hibridación *in situ* y el número de copias/célula del genoma viral.

Tipo HPV	Número de copias/célula		
	1-5 puntos	1-incontables puntos	total
HPV16	87 ± 36	1847 ± 1388	604 ± 427
HPV18	22 ± 10	—	22 ± 10

Los datos se reportan como la media ± SEM.

Tabla 4. Correlación entre el patrón nuclear y la presencia de los genes E1/E2.

Tipo HPV	E1/E2+ (%) (no. positivos/no. explorados)		Total
	1-5 puntos	1-incontables puntos	
HPV16	33.0 (4/12)	100 (5/5)	52.9 (9/17)
HPV18	0 (0/6)	—	0 (0/6)

distribución y patrón de la señal de hibridación en los tumores que presentan un patrón mixto.

Aunque, mediante la hibridación *in situ* también es difícil resolver el problema del valor absoluto del número de copias/célula, nuevamente se observan diferencias muy claras entre los tumores positivos para el HPV16 y el HPV18 principalmente en relación al patrón nuclear de la señal de hibridación (figura 1, tabla 1 y 2), las cuáles están relacionadas con el número de copias y la presencia de E1/E2. Por ejemplo, todos los tumores positivos para el HPV18 presentan solo un punto en el núcleo, mientras que solo el 35% de los positivos para el HPV16 presentan este patrón y el resto presentan patrones mixtos de 1-5 puntos (35%) o 1-incontables puntos (30%). Por otra parte, el número de copias se encontró relacionado con el patrón nuclear. Los tumores con un patrón nuclear de 1-5 puntos presentaron mucho menos copias por célula que los que presentan el patrón de 1-incontables puntos (tabla 3). Así mismo, en el 100% de los tumores que presentaron incontables puntos y sólo en el 33% del grupo 1-5 puntos se amplificó la banda E1/E2

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

($p < 0.05$; tabla 4), lo cual concuerda con la relación de E1/E2 y el número de copias.

B. ¿Otros mecanismos de transformación del HPV?

1. A través de la amplificación genética.

En este trabajo fue muy clara la relación directa entre la integridad de E1/E2 y el número de copias/célula. Se encontraron dos poblaciones de tumores positivos para el HPV16. Un primer grupo, el más numeroso (64%), en el que los tumores tienen íntegros los genes E1/E2 y presentaron un número alto de copias del genoma viral, y un segundo grupo (36%) similar al grupo de los tumores positivos para el HPV18, en el que los tumores presentaron interrumpidos los genes E1/E2 y tienen un bajo número de copias/célula.

Aunque el fragmento amplificado de E1/E2 fue generalmente del tamaño esperado, no se puede garantizar que estos genes y sus productos sean funcionales, porque mediante la PCR no se puede descartar la presencia de pequeñas deleciones o mutaciones puntuales. Sin embargo, la correlación directa entre el número de copias y la presencia de E1/E2 sugiere que estos genes fueron funcionales en la mayoría de los tumores donde se amplificaron. Sin embargo el dominio de E2 involucrado con la replicación del genoma viral pudiera estar normal y alterado el dominio relacionado con la acción transactivadora de E2 y con ello la desrepresión de la expresión de los genes E6 y E7. La posibilidad de que las bandas amplificadas de E1/E2 deriven de células condilomatosas o preneoplásicas de lesiones co-existentes con las células tumorales parece poco probable porque no se reportaron lesiones histológicas de este tipo en los tumores positivos para esta región.

La frecuencia de retención de los genes E1/E2 en los tumores HPV16 encontrada en este

trabajo (64%) es bastante más alta que la encontrada (21%) por otros autores (Wilczynski et al. 1988). En general es aceptado que durante la integración del genoma viral se rompen o interrumpen los genes E1/E2. Existe una gran variación (30 a 100%) en la frecuencia reportada de integración del genoma viral en los carcinomas positivos para el HPV16 (Meanwell et al., 1987; Choo et al., 1987; Matsukura et al., 1989; Cullen et al., 1991) y probablemente refleja diferencias epidemiológicas entre las poblaciones estudiadas. Tal variación no existe para los carcinomas positivos para el HPV18 en los cuales el virus está siempre integrado (Cullen et al., 1991). En este sentido, nuestros resultados están de acuerdo con los estudios que reportan una frecuencia relativamente baja de integración en los carcinomas positivos para el HPV16 (Meanwell et al., 1987; Matsukura et al., 1989) y una alta frecuencia de integración en los positivos para el HPV18 (Cullen et al., 1991).

Es de aceptación general que un paso limitante en el fenómeno de transformación de NIC III a carcinoma invasor es la integración del genoma del HPV con la disrupción consiguiente de la región E1/E2 y con ello la desrepresión de la expresión de los genes E6 y E7. Sin embargo, nuestros datos claramente sugieren que la integración y la inactivación de E2 no siempre es esencial para el desarrollo de los carcinomas positivos para el HPV16, los cuales en este respecto son diferentes de los positivos para el HPV18.

Sería de gran interés explorar si un nivel alto de amplificación del genoma viral pudiera ser un mecanismo alternativo para la desregulación de los genes E6/E7 incluso en ausencia de la integración del genoma viral. Se ha observado que el nivel de transcripción de los genes E6, E7 y E2 en diferentes líneas celulares de queratinocitos humanos immortalizados por el HPV16 es muy similar independientemente de la variación del número de copias

virales/célula (Nasseri et al., 1991). Sin embargo, en estas líneas celulares el número de copias de genomas virales/célula varió de 1 a 20, mientras que en los carcinomas estudiados el rango fue de 1 a más de 7000 copias/célula como se demostró en este estudio.

En primer lugar habría que explorar en estos tumores cuál es el estado de la expresión de los genes E6, E7 y E2. Las dos respuestas más plausibles a esta pregunta pudieran ser: 1) Que el gen E2 se exprese y los genes E6 y E7 no se expresen, y por lo tanto quedaría en duda la participación del HPV en estos tumores, al menos a través de la acción de las proteínas E6 y E7. Sin embargo uno se preguntaría qué está haciendo el genoma del HPV y a un nivel alto de amplificación dentro de las células, si generalmente las células tumorales al volverse más agresivas pueden perder características genotípicas que no ejercen una presión selectiva en favor del crecimiento celular; 2) Que los genes E2, E6 y E7 se expresen. En base a estudios previos, se esperaría que esta última opción sería la respuesta más acertada. En experimentos *in vitro* se ha observado que la represión de la proteína E2 sobre el LCR del HPV16 es mucho menos fuerte que la represión que ejerce E2 sobre el LCR del HPV18. Además, en células transformadas *in vitro* (Nasseri et al., 1991) y en un porcentaje mayoritario de tumores invasores del cérvix mediante la técnica de hibridación *in situ* se han encontrado simultáneamente transcritos de los genes E2, E6 y E7 (Dürst et al., 1992; Stoler et al., 1992).

Si lo último resulta lo correcto, una nueva pregunta resultaría ¿Cuál es el papel de la amplificación del genoma viral en la expresión de E6 y E7 para vencer la represión de E2?. Para resolver esta pregunta sería necesario explorar las relaciones estequiométricas entre los transcritos y/o proteínas de E2 y E6/E7 con el número de copias. Tres respuestas

plausibles pudieran ser: 1) Que la relación estequiométrica sea menor de 1, o sea mayor expresión de E6/E7, 2) Que la relación estequiométrica sea de 1 y 3) Que sea mayor de 1, o sea mayor cantidad de transcritos y proteína de E2. La expresión de los 3 genes está regulada por el mismo promotor temprano (P_{97}) y se esperaría un relación estequiométrica de 1 entre E2 y E6/E7. En cualquier caso, una gran parte de la proteína E2 pudiera estar ocupada en la replicación del genoma viral y quedarían muchos sitios libres de E2 en el promotor P_{97} , lo cual permitiría la expresión de E6/E7.

Actualmente, estamos estudiando la expresión de los genes E2, E6 y E7, así como el número de copias del genoma viral/célula, en dos grupos de tumores positivos para el HPV16, uno positivo (N=11) y otro negativo para E1/E2 (N=25), de muestras de un proyecto en colaboración en el que se está investigando la respuesta inmunológica humoral y celular contra las proteínas oncogénicas del virus en el suero de mujeres con cáncer del cérvix (Dr. Benítez/Dr. Gissmann). El nivel de la expresión genética la estamos estudiando con la técnica de hibridación en punto y la TR-PCR (Transcripción Reversa-PCR). En los 2 primeros tumores explorados (TR-PCR) positivos para E1/E2, se encontraron transcritos de los genes E6/E7 (figura 2).

En otros tumores humanos se han encontrado amplificaciones de algunos oncogenes celulares, y este parece ser un mecanismo utilizado frecuentemente para incrementar la expresión genética, por lo que la suposición de que la amplificación del genoma viral pudiera ser un mecanismo alternativo a la integración del genoma viral para promover la desrepresión de E6/E7 pudiera ser muy factible. Además, es interesante mencionar que en el proceso de transformación del BPV1, el genoma viral permanece en forma episomal con

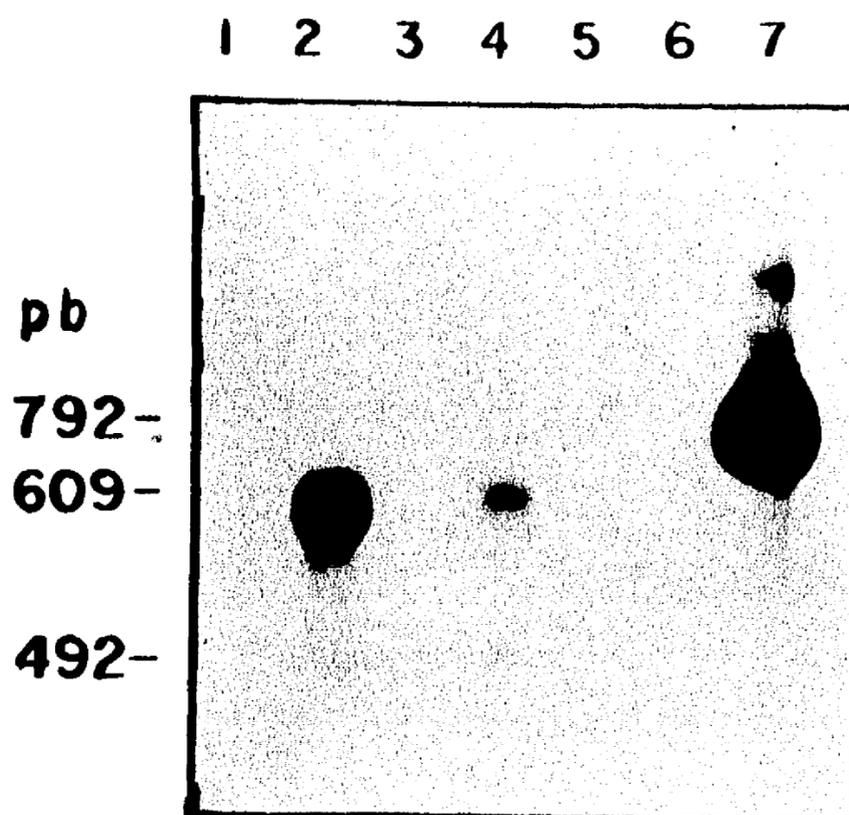


Figura 2. Expresión de los genes E6/E7 en carcinomas HPV16 (+), E1/E2 (+). Se muestra un "Southern blot" de la reacción de TR-PCR hibridada con la sonda radiactiva E6/E7. Los carriles 2 y 4 corresponden a las reacciones de 2 tumores E1/E2 (+) con los oligos antisentido, 1 y 3 a los mismos tumores pero con los oligos en sentido, 5 y 6 a controles negativos (placenta humana) y 7 a un control positivo (1 ng del DNA del HPV16). La banda de 792 pb correspondería al transcrito sin recortar y las de 609 y 492 a dos transcritos recortados.

el gen E2 íntegro, el cual normalmente activa la transcripción de los oncogenes del virus. Si la amplificación o la integración son dos alternativas para desreprimir E6/E7, sería interesante observar el fenómeno en las lesiones preinvasoras. Deberíamos encontrar una proporción elevada de lesiones preinvasoras que contienen el genoma viral muy amplificado en forma episomal y con los genes E1/E2 íntegros y otra población menor con el virus integrado y un bajo número de copias.

Existen estudios previos en los que se ha estudiado por separado el estatus del HPV y semicuantitativamente el nivel de amplificación del genoma viral en las lesiones preinvasoras del cérvix. Existen variaciones entre los reportes en relación al porcentaje de lesiones preinvasoras que presentan el virus integrado, pero en general lo encuentran

integrado en un porcentaje bajo de los NIC III (ver la tabla 8 del cap.I). En neoplasias preinvasoras positivas para el HPV16 se ha encontrado que los niveles de genoma viral aumentan conforme se incrementa el grado de la lesión de NIC I a NIC III (Cuzick et al., 1992; Bavin et al.,1993), lo cual aparentemente se contrapone con el hecho de que la amplificación está relacionada con la diferenciación. Esta discrepancia pudiera explicarse de dos maneras: 1) Que no todas las lesiones de alto grado son poco diferenciadas y pudiera haber algunas bien diferenciadas; y 2) Sencillamente por el hecho de que en las lesiones de bajo grado bien diferenciadas, solo una tercera parte de las células epiteliales tienen el virus a diferencia de las de alto grado, en las cuales todas las células contienen el virus.

Por otra parte, no todas las lesiones con NIC III positivas para el HPV16 tienen niveles altos de genoma viral. Por ejemplo, en los estudios previos solo el 55% (Cuzick et al., 1992) o el 66% (Bavin et al., 1993) de ellos tuvieron niveles altos.

En la tabla 5 se muestran los resultados de un estudio previo en el que analizamos mediante la PCR la presencia del HPV16 y el HPV18 con oligos específicos y otros HPVs con oligos universales en 238 controles, 55 NICs y 89 carcinomas invasores, y medimos semicuantitativamente la cantidad de DNA amplificado, de acuerdo a la intensidad de las bandas, que se clasificaron en débiles, intermedias y fuertes (tabla 5 y figura 3). Tanto en la columna del HPV16 como del total (tabla 5) se observa claramente que en los casos controles (mujeres con citología cervical normal) positivos predominan las bandas débiles e intermedias, y el porcentaje de muestras positivas con bandas fuertes es mucho mayor conforme aumenta la severidad de la lesión hasta NIC-AG. También es muy notorio que ninguno de los casos controles o de NIC-BG son positivos para el HPV18 y la gran mayoría

Tabla 5. Frecuencia del HPV de acuerdo a la intensidad de la señal por PCR en muestras cervicales de un estudio de casos y controles.

Intensidad Banda de DNA	Frecuencia del HPV no. positivos (%)				TOTAL
	16	18	16L	OTROS	
Controles (N=238)					
Débil	13 (6)	0	0	44 (19)	57 (24)
Intermedia	28 (12)	0	0	19 (8)	47 (20)
Fuerte	4 (2)	0	0	19 (8)	23 (10)
Total (+)	45 (19)	0	13 (6)	82 (34)	140 (59)
NIC-BG (N=33)					
Débil	3 (9)	0	0	3 (9)	6 (12)
Intermedia	6 (18)	0	0	4 (12)	10 (30)
Fuerte	11 (33)	0	0	2 (6)	13 (39)
Total (+)	20 (61)	0	1 (3)	9 (27)	30 (91)
NIC-AG (N=22)					
Débil	0	0	0	2 (9)	2 (9)
Intermedia	3 (14)	0	0	3 (14)	6 (27)
Fuerte	7 (32)	1 (5)	0	5 (23)	13 (59)
Total (+)	10 (46)	1 (5)	0	10 (46)	21 (96)
Ca. Invasor (N=89)					
Débil	6 (7)	3 (3)	0 (0)	5 (6)	14 (16)
Intermedia	15 (17)	2 (2)	0 (0)	7 (8)	24 (27)
Fuerte	21 (24)	5 (6)	0 (0)	11 (12)	37 (42)
Total (+)	42 (47)	10 (11)	2 (2)	23 (26)	77 (87)

NIC-BG=Lesión epidermoide intraepitelial de bajo grado, NIC-AG=Lesión epidermoide intraepitelial de alto grado.

de los tumores positivos para este virus se concentran en el grupo invasor. Analizando el fenómeno de la intensidad de la banda solo en los tumores positivos para el HPV16 (tabla 6) se observa más claramente que el porcentaje de tumores con bandas fuertes aumenta desde el grupo control hasta el NIC-AG y vuelve a bajar ligeramente en el grupo de Ca invasor, el cual presenta una distribución similar a la observada previamente (ver figura



Figura 3. PCR con oligos específicos para el HPV16 y HPV18. Se muestra un gel de electroforesis de DNA con una alícuota de la reacción de PCR para el HPV16 y 18 de 17 muestras (N1-N17). El carril M corresponde al control de peso molecular 1 Kb "leader", el NC al

control negativo (DNA de leucocitos) y el PC al control positivos (1 ng de HPV16 y HPV18 + NC). La banda de 792 pb corresponde al HPV16 y la de 530 al HPV18. Se observa claramente que la intensidad de las bandas de las muestras positivas para el HPV16 es muy variable.

Tabla 6. Intensidad de la banda de la PCR en tumores positivos para el HPV16 en muestras cervicales de un estudio de casos y controles.

Intensidad DNA HPV16	Frecuencia del HPV no. positivos (%)			
	Controles (N=45)	NIC-BG (N=20)	NIC-AG (N=10)	Invasor (N=42)
Débil	13 (29)	3 (15)	0	6 (14)
Intermedio	28 (62)	6 (30)	3 (30)	15 (36)
Fuerte	4 (9)	11 (55)	7 (70)	21 (50)

4, capítulo II). Es interesante notar que la distribución de los tumores preinvasores e invasores en conjunto pareciera que sigue aproximadamente una curva estándar en relación al número de copias. En la primera parte de la curva el número de copias aumenta de NIC I a NIC III (Cuzick et al., 1992; Bavin et al., 1993) y en la segunda parte disminuye de CaCu I hasta CaCu IV (capítulo II) y el límite pudiera estar entre el NIC III y el carcinoma invasor grado I. Para demostrar esta distribución estamos calculando el número de copias en las muestras de este último estudio, que incluyen lesiones pre e invasoras. También, sería interesante investigar si estas diferencias en el nivel de amplificación del genoma viral en los NIC está relacionado, al igual que en los cánceres invasores, con la disrupción de los genes E1/E2, fenómeno que estamos explorando actualmente mediante la PCR.

Finalmente, la demostración de que la amplificación del genoma viral pudiera ser un mecanismo de transformación sería a través de diseñar un modelo *in vitro* en queratinocitos en el cual después de la transfección se pueda modular el nivel de amplificación del genoma viral y observar a diferentes tiempos su comportamiento en cuanto a el fenotipo neoplásico y la cinética de crecimiento celular.

2. Participación de otros genes virales.

Dos genes virales que también se estarían expresando cuando el virus está en forma episomal y que pudieran estar involucrados *per se* en el proceso tumoral son el gen E2 y el E5. Por ejemplo, se sabe que la proteína E2, además de reprimir la expresión de E6 y E7, tiene funciones de transactivador de los genes virales y en cultivos de células transformadas con el BPV1 se ha encontrado que algunos genes celulares son transactivados por E2. Estos genes aún no se han identificado y no se sabe si la proteína E2 de los HPVs

tenga también esa propiedad. Sin embargo, buscando la secuencia de DNA que reconoce la proteína E2 (ACCGNNNCGGT) en todos los genes humanos secuenciados que están en el "GenBank", se encontró en 3000 genes humanos, de los cuales 50 fueron oncogenes y 7 de ellos presentan la secuencia (ACCGNNNCGGT) en la región de control de la expresión genética. Estos genes son c-myc, c-ha-ras, c-sis, c-k-ras, c-trk, c-N-ras y c-fgr y sería interesante investigar el nivel de su expresión genética en los tumores que presentan los genes E1/E2 y compararlo con los que no los presentan.

Por otra parte, el gen E5 es un oncogen bien demostrado en modelos de transformación *in vitro* con el BPV1. Para el gen E5 de los HPVs existen algunas evidencias de su capacidad transformante en cultivos de células y sería interesante explorar el nivel de expresión de este gen en los tumores que tienen íntegra la región E1/E2, ya que aparentemente su expresión también esta bajo control del promotor P₉₇.

C. La integración del genoma viral no parece ser un evento al azar.

Se ha demostrado en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales y en pocas series de carcinomas cervicales que durante la integración el genoma viral se abre en la región E1/E2. Sin embargo, no se han encontrado regiones específicas en el DNA celular en las que se integre preferencialmente el genoma viral. Tanto en las líneas celulares (tabla 6, cap.I) como en los tumores humanos (tabla 9, cap.I) el genoma del HPV se ha encontrado, mediante la técnica de hibridación *in situ*, integrado en diversos cromosomas, lo cual sugiere que se trata de un evento al azar.

Sin embargo, nuestros datos sugieren que el fenómeno pudiera no ser al azar. Por ejemplo,

la frecuencia de disrupción de los genes E1/E2 fue muy diferente ($p < 0.05$) entre el virus 16 (36%) y el 18 (100%). Estos datos sugieren que la integración pudiera depender en parte de la secuencia de los genes E1/E2 que se ve favorecida en los genes del HPV18. Para conocer un poco más este fenómeno, exploramos por separado los genes E1 y E2 mediante la PCR en los tumores que presentaron interrumpida la región E1/E2 (E1/E2-) y encontramos que en los tumores positivos para el HPV16 la frecuencia de amplificación de E1, E2 o ninguno de los dos fue similar, mientras que en los positivos para el HPV18 se amplificó mucho más frecuente el gen E2 ($p < 0.05$), lo cual indica que el rompimiento es principalmente en el gen E1 y que pudiera estar asociado a una secuencia específica en éste gen (tabla 7, figura 4). Actualmente, en los tumores negativos para E1 o E2 o para ambos, estamos explorando por PCR las regiones 5' y 3' de los genes E1 y E2 para cercar la región que se rompió en esos tumores y observar si existe una secuencia consenso o de rompimiento frecuente involucrada en la integración del genoma viral.

Tabla 7. Frecuencia de amplificación por separado de los genes E1 y/o E2 en carcinomas cervicales positivos para el HPV16 o HPV18, negativos para E1/E2.

HPV	Frecuencia (%)			
	E1	E2	Ambos	Ninguno
16	2/9 (22.2)	3/9 (33.3)	0	4/9 (44.4)
18	3/20 (15)	10/20 (50)	1/20 (5)	6/20 (30)

Por otra parte, si existen regiones de rompimiento frecuente en los genes E1/E2 sería de esperarse que también existieran secuencias específicas en el DNA humano que fueran reconocidas por las secuencia del HPV mediante un mecanismo de recombinación general.

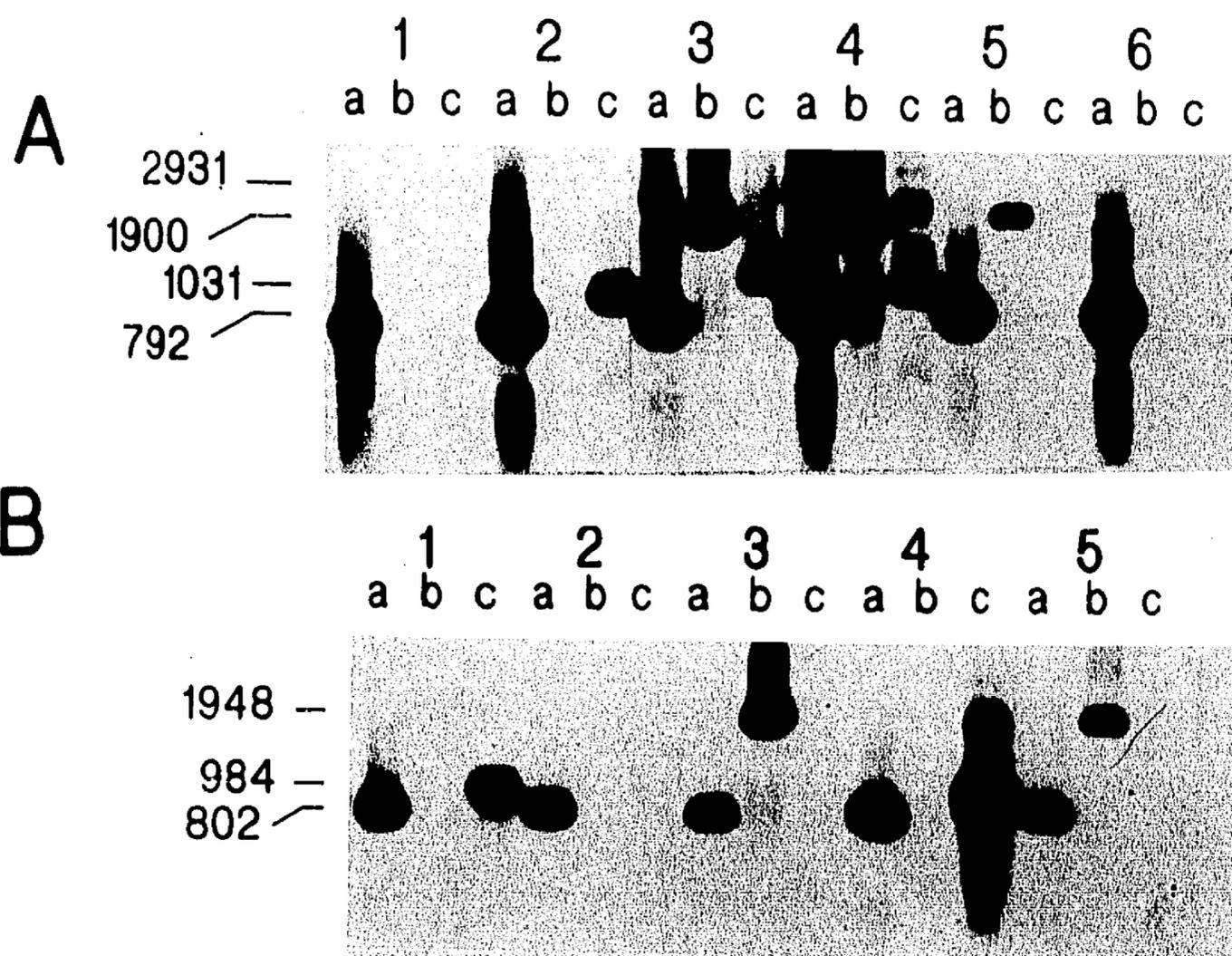


Figura 4. Amplificación por PCR de los genes E1 y E2 en muestras de DNA de carcinomas negativos o positivos para la región E1/E2. El panel A corresponde a los tumores positivos para el HPV16 y el panel B para los tumores positivos para el HPV18. Después de efectuar la electroforesis en geles de agarosa de las reacciones de la PCR, se efectuó la transferencia a filtros de nylon y se realizó la hibridación tipo "Southern blot" con sondas radiactivas (ver material y métodos del capítulo II). En cada panel, el carril *a* corresponde a la mezcla de las reacciones para E6E/ y E1/E2, el *b* a la reacción de E1 y el *c* a la reacción de E2. Se indica el peso molecular de los productos en pb.

Aunque no se han encontrado cromosomas o regiones de cromosomas específicas preferidas para la integración del HPV, no se han explorado estas regiones a nivel de la secuencia del DNA. No existen reportes en carcinomas cervicales en cuanto a las secuencias de DNA humano que flanquean el genoma viral y solo existe un trabajo previo en un carcinoma tonsilar, donde se encontró el HPV6c integrado en el cromosoma 10. Después de construir una biblioteca genómica y secuenciar los extremos de DNA humano que flanqueaban al genoma viral, se encontró una homología con el DNA viral en el extremo 5', lo cual sugiere que la integración pudiera llevarse a cabo mediante un mecanismo de recombinación homóloga. Sería interesante secuenciar los fragmentos de DNA celular que flanquean el genoma viral en una población grande de carcinomas cervicales en los que el virus esté integrado y comparar si existen secuencias comunes de integración aunque pertenezcan a diferentes cromosomas. Para secuenciar las regiones de DNA celular que flanquean al genoma viral, se han realizado bibliotecas de DNA del tumor utilizando enzimas de restricción que cortan por fuera del genoma viral, se aíslan las clonas que contienen el virus y se secuencian. Sin embargo, este método es bastante laborioso y difícilmente se pueden explorar un número grande de tumores. Una estrategia alternativa que estamos desarrollando en mi laboratorio es la utilización de la PCR divergente, para la cual se digiere previamente el DNA tumoral con una o varias enzimas de restricción que corten por fuera del genoma viral y que produzcan extremos romos, se circularizan con la DNA ligasa T4 los fragmentos que contienen el genoma viral y las secuencias celulares que los flanquean y finalmente se realiza la PCR utilizando oligos divergentes dirigidos contra los extremos del genoma viral (región E1/E2).

Si es cierto, que existen diferencias asociadas a la integración, se pudiera preguntar si los dos grupos de tumores positivos para el HPV16 (E1/E2- con pocas copias y E1/E2+ con muchas copias) presentan variedades diferentes del HPV16 en relación a la secuencia de nucleótidos de E1/E2. En un proyecto (Drs. Benítez/Gissmann) en el que estamos tipificando el genoma viral en cánceres invasores del cuello uterino mediante la técnica de "Southern blot" hemos encontrado que aproximadamente el 30% (tabla 8) de los tumores positivos para el HPV16 presentan variaciones (RFLPs) en la región E1/E2, y pareciera que se trata de una variedad nueva de HPV16 (figura 5). Aunque esta variante no parecen estar asociada al número de copias ni a la integración, sugiere que no sería raro encontrar otras variaciones en la secuencia de los genes E1/E2 del HPV16 que estuvieran involucradas en la integración del genoma viral y sería interesante secuenciar los genes E1/E2 en una grupo de tumores preinvasores para ver si existe variabilidad de los subtipos de HPV16 en esa región y comparar con las secuencias de esos genes en los tumores invasores en que el genoma viral está integrado. Si se encontrarán subtipos virales del HPV16 en este sentido se podría predecir en que lesiones preinvasoras el genoma viral se pudiera integrar.

Tabla 8. Frecuencia de una variedad mutante de la región E1/E2 en muestras positivas para HPV16 analizadas mediante la técnica de "Southern Blot" (N=43).

Frecuencia de la región E1/E2 (%)		
Silvestre (2817 pb)	Mutante (2701 pb)	Total
21 (49 %)	10 (23 %)	31 (72 %)

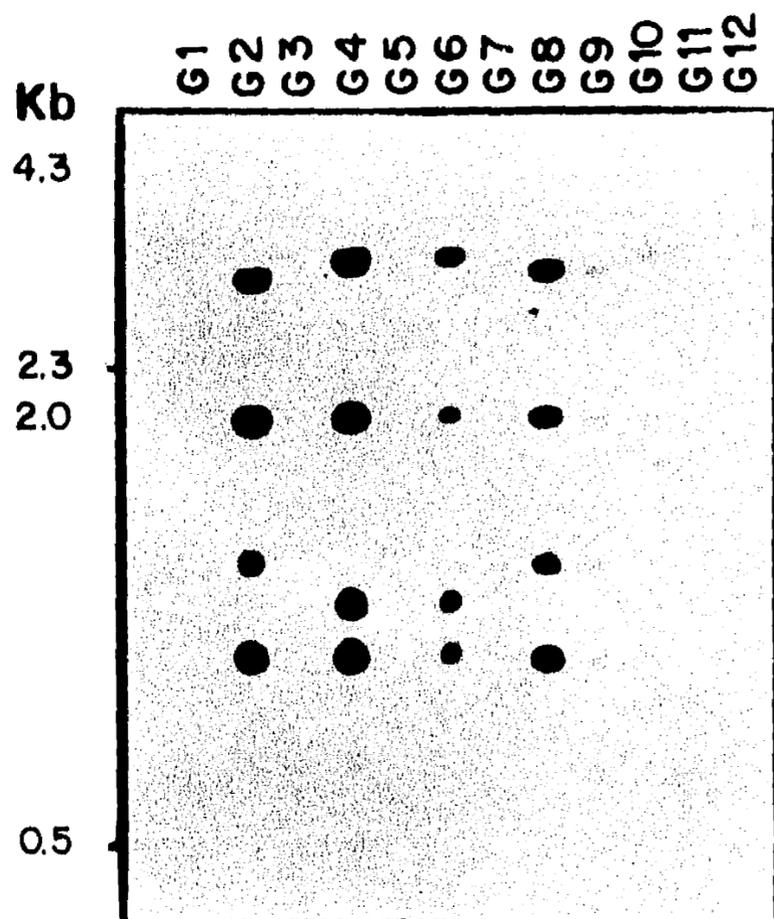


Figura 5. Variación del patrón de restricción del HPV16 en carcinomas cervicales. Se muestra un fotografía de una autoradiografía de un "Southern blot" de 12 tumores invasores de cérvix digeridos con las enzimas BamHI/PstI e hibridados con la sonda radiactiva del HPV16. Los tumores G4, G6 y G10 presentan el patrón esperado y los tumores G2, G8 y G9 presentan un patrón diferente. En estos últimos, la banda superior (E1/E2) ha perdido 116 pb, los mismos que se han adicionado a la 3era. banda que corresponde a la colindancia de la región E2 con L2 y coincide con la pérdida (mutación) del sitio PstI silvestre y la ganancia de un nuevo sitio PstI (mutación) en el extremo 3' del gen E2.

Por último, para demostrar que una región es esencial para la integración, habría que demostrarlo en un modelo de integración *in vitro* en queratinocitos humanos. En este modelo se podrían utilizar construcciones genéticas con combinaciones de los virus 16 y 18, en las cuales se intercambien solo la región E1/E2, E1, E2 o subregiones de estos genes y comparar su comportamiento en relación a lo encontrado en los tumores humanos.

D. Implicaciones clínicas de este trabajo.

1. Evolución y estadios clínicos.

En este trabajo (ver cap.II), en el que se incluyeron los tumores positivos por la técnica de

hibridación en punto (HP) de una muestra de N=110, se encontraron dos poblaciones de tumores positivos para el HPV16 en relación al número de copias, una de ellas agrupada en el rango de 1-50 copias y la otra en el rango de 100-500 copias/célula. Cuando los tumores negativos de esta muestra se exploraron mediante la PCR, un buen número de ellos fueron positivos para el HPV16 (ver tabla 9). Esto indica que existe un tercer grupo de tumores positivos para el HPV16 en relación al número de copias/célula, los cuales tienen mucho menos de 1 copia por célula o mejor dicho que sólo algunas células tienen el genoma viral. Como se puede observar en la tabla 9, este fenómeno no se observó para el HPV18 y la diferencia fue muy significativa ($p < 0.05$). ¿Cuál es el significado biológico de esta observación?. Es muy notorio que en los tumores positivos para el tipo 16 por HP, tanto el número de copias/célula (tabla 1, cap.II) como la frecuencia de infección (tabla 10) disminuyen conforme progresa el estadio clínico del tumor. Cuando se incluyen los datos de la PCR, la disminución en la frecuencia de infección desaparece (tabla 10), lo cual sugiere que los tumores negativos por HP y positivos por PCR pertenecen a estadios clínicos avanzados y estaría de acuerdo con la disminución del número de copias con el estadio clínico y que este grupo representaría una etapa extrema en cuanto a la pérdida del número de copias. Sin embargo, el hecho de que el HPV18 no se presentó en este tipo de tumores, indica que los tumores con muy pocas copias/célula ($< < 1$) pudieran representar un fenómeno biológico muy diferente a los tumores con 1-50 copias/célula.

Por ejemplo, en los tumores positivos para el virus 16 por HP, la correlación negativa entre el número de copias y el estadio clínico desaparece cuando los tumores son clasificados de acuerdo con la presencia o ausencia de la región E1/E2, lo cual supondría que el rompimiento

Tabla 9. Frecuencia acumulada del HPV16 y el HPV18 en carcinomas cervicales explorados por la técnica de hibridación en punto (HP) y la PCR (N=110).

Método^a	Frecuencia Acumulativa del HPV (%)	
	16	18
HP	42 (38.2)	21 (19.1)
PCR	57 (51.8)	22 (20)

a. Sólo se exploraron por PCR las muestras negativas por HP.

Tabla 10. Distribución de HPV16 por estadio clínico en cánceres cervicales explorados por la técnica de hibridación en punto y la PCR.

Método^a	Frecuencia Acumulativa del HPV16 (%)			
	I	Estadio Clínico		IV
		II	III	
HP	3/6 (50)	19/53 (36)	17/39 (44)	3/12 (25)
PCR	3/6 (50)	27/53 (51)	22/39 (56)	5/12 (42)

a. Sólo se exploraron por PCR las muestras negativas por HP.

de E1/E2 es paralelo al estadio clínico. Si este fuera el caso, la disminución en el número de copias en este grupo de tumores representaría más bien un efecto secundario de la adquisición de una ventaja selectiva en el crecimiento tumoral, como sería la integración del genoma viral. En este estudio no se contó con una muestra suficientemente grande para establecer una correlación entre el estadio clínico y el estatus de los genes E1/E2, problema que aún está pendiente. Sin embargo, es interesante hacer notar que en líneas celulares derivadas de cánceres del cérvix, el número de copias disminuye conforme aumenta el número de pasajes celulares (Di Lorenzo et al. 1992), al mismo tiempo que aumentan los eventos de integración (Bedell et al., 1991). La pregunta siguiente en este sentido sería si también en los tumores humanos aumenta la frecuencia de integración con el estadio clínico y con ello la disminución del número de copias virales o si esta disminución es simplemente un reflejo de que las células cancerosas ya no necesitan el HPV y empiezan a deshacerse de él como consecuencia de la ganancia de nuevos errores genéticos que le confieren mayor velocidad de crecimiento.

2. Implicaciones en la clasificación morfológica del carcinoma cervical.

Se ha demostrado que la replicación viral está asociada con el grado de diferenciación de las células epiteliales (Bedell et al. 1991). En las células del condiloma plano y acuminado, y del NIC las señales de hibridación *in situ* del HPV están concentradas en las células epiteliales más diferenciadas (Schneider et al., 1987; Dürst et al., 1992; Stoler et al., 1992). Estas observaciones fueron extendidas en este estudio, ya que en los tumores invasores queratinizantes se observaron números de copias virales/célula muy altos y los genes E1/E2 se amplificaron siempre. En contraste, los tumores no queratinizantes (LCNK), menos

diferenciados, tuvieron en promedio un número de copias más bajo y notablemente la región E1/E2 estuvo ausente en 2/3 de ellos, en especial en los casos que tuvieron un número de copias bajos. El hecho de que la tercera parte restante de los tumores LCNK amplificaran E1/E2 y tuvieron un número alto de copias pudiera sugerir que la integridad de la región, más que el grado de diferenciación es el determinante primario de la replicación viral. Sin embargo, queda la duda de si los tumores fueron clasificados correctamente en cuanto al nivel de queratinización o más bien si el parámetro de queratinización es suficiente para determinar el grado de diferenciación celular y sería importante determinar si los tumores clasificados como epidermoides no queratinizantes (LCNK) se componen de dos grupos morfológicamente diferentes. También queda por dilucidar si la deficiencia de la diferenciación celular es responsable de la ruptura de la región E1/E2 o si la disrupción de estos genes impide la diferenciación. Lo último pareciera ser lo más plausible, como ha sido observado en líneas celulares donde la ruptura o producción de mutaciones en los genes E1 o E2 impide la diferenciación (Romanczuk and Howley, 1992; Bedell et al., 1991).

3. La integración consistente del HPV18 pudiera ser el motivo de su mayor agresividad clínica.

Hay varios tipos de evidencias clínicas que indican que los tumores positivos para el HPV18 son más agresivos clínicamente que los positivos para el HPV16 (Kurman et al., 1988; Walker et al., 1989; Lorincz et al., 1992). Por ejemplo, se ha observado que las pacientes con carcinomas cervicales positivos para el HPV18 tienen una frecuencia mayor de metástasis ganglionares, mayor resistencia al tratamiento y mayor frecuencia de recidivas

que las pacientes positivas para el HPV16 (Walker et al., 1989). También en la mayoría de los estudios las mujeres con el HPV18 son mucho más jóvenes que las positivas para el HPV16.

Por otra parte la frecuencia del HPV18 en neoplasias preinvasoras es muy baja (3%) y comparada con la frecuencia observada en los cánceres invasores (15-20%) sugiere que el tránsito de las lesiones preinvasoras positivas para el HPV18 hacia la invasión es muy rápido. Esto concuerda con lo que se observa en modelos de transformación *in vitro* de queratinocitos, el HPV18 es 10 veces más activo que el HPV16. Se ha observado *in vitro* que no existen diferencias en la actividad oncogénica de los genes E6 y E7 entre el HPV16 y el HPV18, y más bien la diferencia esta en LCR.

Así pues, pareciera que la integración consistente del genoma viral con la consiguiente desregulación de los genes E6/E7, estuviera asociada a una mayor agresividad clínica en los tumores positivos para el HPV18 (Cullen et al., 1991). Si esto es cierto, el comportamiento clínico de los cánceres invasores positivos para el HPV16 que tienen el virus integrado sería muy similar al grupo de los positivos para el HPV18. Esta hipótesis la estamos investigando en el proyecto en colaboración (Drs. Benítez/Gissmann) en el que además de los objetivos inmunológicos antes mencionados se está estudiando la evolución clínica de la enferma.

4. Nuevos marcadores diagnósticos para evaluar el riesgo de la infección por el HPV.

La utilización de la detección y tipificación del HPV como marcadores diagnósticos y pronósticos en el NIC y el cáncer invasor ha sido muy discutido. Principalmente porque no se conoce cuál es el riesgo de progresión de las lesiones preinvasoras según los diferentes tipos virales, no existe un tratamiento específico contra el virus y los tratamientos clínicos

convencionales (asa diatérmica, láser, etc.) se deciden en base a los diagnósticos clínico e histológico.

El desarrollo de nuevos marcadores diagnósticos como el nivel de la amplificación del genoma viral, la disrupción de los genes E1/E2 y la integración pudieran ser de mayor utilidad clínica puesto que la asociación con los estadios avanzados del NIC es muy alto y mucho mayor que la sola tipificación del virus (ver tabla 5).

Existen dos niveles diagnósticos, en los cuales se pudiera utilizar la tipificación, la detección de amplificación y el estatus del genoma viral. Un primer nivel sería, en conjunto con la citología exfoliativa, para detectar a las mujeres con lesiones cervicales. Aunque la citología exfoliativa sigue siendo el método más barato y más sencillo utilizado para la detección oportuna del NIC y el cáncer invasor en la población femenina general, tiene un 20% de falsas negativas y problemas serios para predecir el diagnóstico subyacente de la lesión. Aproximadamente, el 5% de las citologías presentan evidencias de anormalidad. De éstas, el 10% presentan discariosis severa, que usualmente la lesión subyacente corresponde a un NIC III; esto es indicación suficiente para referir a la paciente a la colposcopia. Sin embargo, la mayoría de las citologías anormales presentan discariosis leve o moderada, en las cuales la patología subyacente es muy variable. En las biopsias de estas lesiones se observa que 1/3 presentan NIC III, un tercio tienen NIC I/II y el tercio restante tienen un cérvix normal o con lesiones mínimas que no llegan a NIC I. Esto indica que la citología aparte de tener un 20% de falsas negativas, tienen un bajo índice de predicción con respecto a la biopsia. El manejo de las pacientes que presentan discariosis leves o moderadas es muy controversial y pudieran beneficiarse de una prueba no invasora que predijera con precisión

qué mujeres tienen un NIC III subyacente. De preferencia la prueba debería estar basada en material tomado en la misma ocasión que se realiza la citología exfoliativa. La detección y tipificación del HPV *per se* o en combinación con la citología no parece ser suficiente para predecir el diagnóstico subyacente. La frecuencia de detección de los HPVs 16/18 es de 41% para las discariosis leves/moderadas y de 58% para las severas. Sin embargo, adicionalmente a la citología y la tipificación del HPV, la detección del nivel de amplificación parece ser un buen parámetro de predicción de la lesión subyacente. El otro nivel en el que pudiera ser útil la determinación de los parámetros virales mencionados anteriormente sería en la precisión del pronóstico de la lesión cervical.

IV. REFERENCIAS.

1. ALMEIDA, J.D., ORICL, J.D., STANNARD, L.M. (1969). Characterization of the virus found in human genital warts. *Microbios* 3: 225-229.
2. ANDROPHY E.J., LOWY D.R., SCHILLER J.T. (1987). Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 325: 70-3.
3. ASSELINEAU, D., BERNARD, B.A. AND DARMON, M. (1987), Three dimensional culture of human keratinocytes on a dermal equivalent. A model system to study epidermal morphogenesis and differentiation *in vitro*. In Lowe, N. and Mailbach, H. (ed) *Models in Dermatology*, 1-7, Karger, Basel, Switzerland.
4. ASSELINEAU, D., BERNARD, B., BAILLY, C. AND DARMON, M. (1985), Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. *Exp Cell Res* 159: 536-9.
5. BAKER, C.C. AND NOE, J.S. (1989), Transcriptional termination between bovine papillomavirus type 1 (BPV1) early and late polyadenylation sites blocks late transcription in BPV1 transformed cells. *J Virol* 63: 3529-34.
6. BAKER, C.C., PHELPS, W.C., LINDGREN, V., BRAUN, M.J., GONDA, M.A., AND HOWLEY, P.M. (1987), Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 61: 962-971.
7. BARBOSA, M.S., LOWY, D.R. AND SCHILLER, J. T. (1989), Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 63: 1404-7.
8. BAVIN P.J., GILES J.A., DEERY A., CROW J., GRIFFITHS P.D., EMERY V.C., WALKER P.G. (1993). Use of semi-quantitative PCR for human papillomavirus DNA type 16 to identify women with high grade cervical disease in a population presenting with a mildly dyskaryotic smear report. *Br J Cancer* 67: 602-605.
9. BECKER T.M., WEELER C.M., MCGOUGH N.S., JORDAN S.W., DORIN M., MILLER J. (1991). Cervical papillomavirus infection and cervical dysplasia in hispanic, Native american and non-hispanic white women in New Mexico. *Am J Public Health* 81: 582-586.
10. BEDELL, M.A., HUDSON, J.B., GOLUB, T.R., TURYSK, M.E., HOSKEN, M., WILBANKS, G.D., & LAIMINS, L.A. (1991), Amplification of human papillomavirus genomes *in vitro* is dependent on epithelial differentiation. *J Virol*

65: 2254-2260.

11. BERNARD, B.A., BAILLY, C., LENOIR, M.C., DARRNON, M., THIERRY, F. AND YANIV, M. (1989). The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol*. 63: 4317-24.
12. BLITZ, I.L. AND LAIMINS, L.A. (1991), The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator *in vitro*. *J Virol* 65: 649-56.
13. BOSCHART, M., GISSMANN, L., IKENBERG, H., KLEINHEINZ, A., SCHEURLEN, W., & ZUR HAUSEN, H. (1984), A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3: 1151-1157.
14. BRAUN, L., DÜRST M., MIKUMO R. AND GRUPPUSO P., (1990) Differential response of nonetumorigenic and tumorigenic human papillomavirus type 16-positive epithelial cells to transforming growth factor B1. *Cancer Res* 50: 7324-7332.
15. BRINTON, L.A. (1986). Current epidemiological studies-Emerging hypotheses. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 17. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
16. BROKER T. R., CHOW L.T., CHIN M.T., RHODES C. R., WOLINSKY S. M., WHITBECK A. AND STOLER M.H. (1989). A Molecular Portrait of Human Papillomas Carcinogenesis. *Cancer Cells* 7: 197-208.
17. BROKER T., AND CHOW L. (1986). Human Papillomaviruses of the Genital Mucosa: Electron Microscopic Analyses of DNA Heteroduplex Formed with HPV Types 6, 11, and 18. *Cancer Cells* 4: 589-594.
18. BUKLEY, J.D., HARRIS, R.W.C., DOLL, R., VESSEY, M.P. AND WILLIAMS, P.T. (1981), Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri. *Lancet* 2: 1010-1014.
19. BURGHARDT, E. (1986). Natural history of cervical lesions. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 81. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
20. CHELLAPAN, S.P., HIEBERT, S., MUDRYJ, M., HOROWITZ, J.M. AND NEVINS, J.R. (1991), The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65: 1053-61.

21. CHOO, K.B., PAN, C.C., AND HAN, S.H. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* 161: 259-261.
22. CID-ARREGUI, A., AUEWARAKUL, P., GARCIA-CARRANCA, A., OVSEIOVICH, R., GAISSERT, H. GISSMANN, L. (1993). Characterization of the Human Papillomavirus (HPV) type 18 upstream regulatory region in transgenic mice. *J Virol* in press.
23. COUTURIER J, SASTRE-GARAU X, SCHNEIDER-MAUNOURY S, LABIB A AND ORTH G. (1991). Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for protooncogene expression. *J Virol* 65: 4534-4538.
24. CRIPE, T.P., HAUGEN, T.H., TURK, J.P., TABATABAI, F., SCHMID, P.G., DURTS, M., GISSMANN, L., ROMAN, A., & TUREK, L.P. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by keratinocyte-dependent enhancer and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* 6: 3745-3753.
25. CRIPE, T.P., ALDERBORN, A., ANDERSON, R.D., PAKKINEN, S., BERGMAN, P., HAUGEN, T.H., PETERSON, U. AND TUREK, L.P. (1990), Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P₉₇ promoter by a 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP1-responsive modules. *New Biologist* 2: 450-63.
26. CROOK T., BANKS L., SMITH K., AND CRAWFORD L. (1989). Amplification and Overexpression of c-myc Proto-Oncogene Correlate With the Loss of Glucocorticoid Dependence in Rodent Cells Transformed by Human Papillomavirus Type 16. *Mol Carcinog* 2: 308-313.
27. CRUM C.P., IKENBERG H., RICHART R.M., GISSMANN L. (1984). Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N Engl J Med* 310: 880-883.
28. CRUM, C. H., NUOVO G., FRIEDMAN D. and SILVERSTEIN S. J. (1988), Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frames in genital precancers. *J Virol* 62: 84-90.
29. CRUM C.P., MITAO M., LEVINE R.U., SILVERSTEIN, S. (1985). Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J Virol* 54: 675-681.
30. CULLEN, A.P., REID, R., CAMPION, M., AND LÖRINCZ A.T., (1991), Analysis

- of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 65: 606-612.
31. CUZICK J., TERRY G., HO L., HOLLINGWORTH T., ANDERSON M. (1992). Human papillomavirus type 16 DNA in cervical smears as predictor of high-grade cervical cancer. *Lancet* 339: 959-960.
 32. DAS B.C., SHARMA J.K., GOPALAKRISHNA V., LUTHRA U.K. (1992). Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* 73: 2327-2336.
 33. DE VILLIERS E., GISSMANN L., AND ZUR HAUSEN H. (1981). Molecular cloning of Viral DNA from human Genital Warts. *J Virol* 40: 932-935.
 34. DESAINTE, C., HALLEZ, S., VAN ALPHEN, P. AND BURNY, A. (1992), Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 66: 325-33.
 35. DiLORENZO, T.P., TAICHMAN, L.B., AND STEINBERG, B.M. (1992). Replication and persistence of HPV DNA in cultured cells derived from laryngeal papillomas. *Virol* 186: 148-153.
 36. DOORBAR, J., ELY, S., STERLING, J., MCLEAN, C. AND CRAWFORD, L. (1991), Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352: 824-7.
 37. DOSTATNI, N., LAMBERT, P.F., SOUSA, R., HAM, J., HOWLEY, P.M. AND YANIV, M. (1991), The functional BPV1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev* 5: 1657-71.
 38. DOSTATNI, N., THIERRY, F. AND YANIV, M. (1988), A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *Embo J* 7: 3807-16.
 39. DUFF, R., RAPP, F. (1973). Oncogenic transformation of hamster embryo cells after exposure to inactivated herpes simplex virus type I. *J Virol* 12: 209-217.
 40. DÜRST M., CROCE C., GISSMANN L., SCHWARZ E., HUEBNER K. (1987). Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *PNAS* 84: 1070-1074.
 41. DÜRST M, KLEINHEINZ A, HOTZ M AND GISSMANN L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 66: 1515-1522.

42. DÜRST, M., GISSMANN, L., IKENBERG, H., & ZUR HAUSEN H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *PNAS* 80: 3812-3815.
43. DÜRST, M., GLITZ, D., SCHNEIDER, A., ZUR HAUSEN, H., (1992), Human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: Analysis by in situ hybridization. *Virology* 189: 132-140.
44. DUTTA A., RUPPERT JM., ASTER JC., WINCHESTER E. (1993). Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* 365: 79-82.
45. DYSON, N., HOWLEY, P.M., MÜNGER, K. AND HARLOW, E. (1989), The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-7.
46. ELIYAHU D., MICHALOVITZ D., ELIYAHU S., PINHASI-KIMHI O., AND OREN M. (1989). Wild-Type p53 Can Inhibit Oncogene-Mediated Focus Formation. *PNAS* 86: 8763-8767.
47. FINLAY, C.A., P.W. HINDS, A.J. LEVINE (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093.
48. FRANCESCHI, S., VECCHIA, C., DECARLI, A. (1986). Relation of cervical neoplasia with sexual factors, including specific venereal disease. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 65. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
49. FU, Y., SAITO, K., SAITO, A., HALL, T., REID, R. (1986). Stem cells evolution in preneoplastic and neoplastic squamous genital lesions. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 293. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
50. FUCHS, E. (1990b). Epidermal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 2: 1028-35.
51. FUCHS, E. (1990), Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 111: 2807-14.
52. FUKUSHIMA M., OKAGAKI T., TWIGGS L., CLARK B., ZACHOW K., OSTROW R., AND FARAS A. (1985). Histological Types of Carcinoma of the Uterine Cervix and the Detectability of Human Papillomavirus DNA. *Cancer Res* 45: 3252-3255.
53. FUKUSHIMA M, YAMAKAWA Y, SHIMANO S, HASHIMOTO M, SAWADA Y AND FUJINAGA K. (1990). The physical state of human papillomavirus 16 DNA

- in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 66: 2155-2161.
54. GARCIA-CARRANCA, A., THIERRY, F. AND YANIV, M. (1988), Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol* 62: 4321-4330.
 55. GASSER, S.M. (1991), Replication origins, factors and attachment sites. *Current Opinion Cell Biol* 3: 407-413.
 56. GIRI I., AND DANOS O. (1986). Papillomavirus Genomes: From Sequence data to Biological Properties. *TIGS* 227-232.
 57. GISSMANN L., WOLNIK L., IKENBERG H., KOLDOVSKY U., SCHNURCH H., ZUR HAUSEN H. (1983). Human Papillomavirus Types 6 and 11 DNA Sequences in Genital and Laryngeal Papillomas and in Some Cervical Cancers. *PNAS* 80: 560-563.
 58. GISSMANN, L., SCHNEIDER, A. (1986). Human Papillomavirus DNA in preneoplastic and neoplastic genital lesions. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 217. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 59. GISSMANN L., DIEHL V., SCHULTZ-COULON H., ZUR HAUSEN H. (1982). Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA from a laryngeal papilloma. *J Virol* 44: 393-400.
 60. GISSMANN L., ZUR HAUSEN H. (1980). Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *Int J Cancer* 25: 605-609.
 61. GIUS, D., GROSSMAN, S., BEDELL, M.A. AND LAIMINS, L.A. (1988), Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J Virol* 62: 665-72.
 62. GLOSS, B., CHONG, T. AND BERNARD, H.U. (1989), Numerous nuclear proteins bind the long control region of human papillomavirus type 16: a subset of 6 of 23 DNase I protected segments coincides with the location of the cell specific enhancer. *J Virol* 63: 1142-52.
 63. GLOSS, B., BERNARD, H.U., SEEDORF, K. AND KLOCK, G. (1987), The upstream regulatory region of the human papillomavirus -16 contains an E2 protein independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J* 6: 3735-43.
 64. GOLDSTEIN, D.J., FINBOW, M. E., ANDRESSON, T., MCLEAN, P., SMITH,

- K., BUBB, V., AND SCHLEGEL, R. (1991), Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases. *Nature* 353: 347-9.
65. GREEN, G.H. (1978), Cervical cancer and cytology screening in New Zealand. *Br J Obstet Gynecol* 85: 881-886.
66. GROSS, G., IKENBERG, H., DE VILLERS, E., SCHNEIDER, A., WAGNER, D., GISSMANN, L. (1986). Bowenoid papulosis: A venereally transmissible disease as reservoir for HPV16. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 149. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
67. GRUSSENDORF-CONEN E. (1986). In situ hybridization with papillomavirus DNA in genital lesions. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 239. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
68. GRUSSENDORF-CONEN E., DE VILLIERS E. AND GISSMANN L. (1986). Human Papillomavirus Genomes in Penile Smears of Healthy Men. *Lancet* 1092.
69. GUPTA, J., SCHNEIDER, A., SHAH, K. (1986). Detection of Papillomavirus antigen and DNA in cells and tissues. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 247. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
70. GUPTA J., PILOTTI S., RILKE F., AND SHAH K. (1987). Association of Human Papillomavirus Type 16 With Neoplastic Lesions of the Vulva and Other Genital Sites by in Situ Hybridization. *Am J Pathol* 127: 206-215.
71. HAKAMA, M. (1986). Efficacy of screening for cervical cancer. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 45. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
72. HALBERT, C.L., DEMERS, W. AND GALLOWAY, D.A. (1991), The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 65: 473-478.
73. HALPERT R., FRUCHTER R., SEDLIS A., BUTT K., BOYCE J., SILLMAN F. (1986). Human Papillomavirus and Lower Genital Neoplasia in Renal Transplant Patients. *Obstet Gynecol* 68: 251-258.
74. HAM, J., DOSTATNI, N., GAUTHIER J., and YANIV, M., (1991) The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *TIBS* 16: 440-444.
75. HARRIS R.W.C., BRINTON L.A., COWDEL R.H., SKEGG D.C.G., SMITH P.G., VESSEY M.P., DOLL R. (1980). Characteristics of women with dysplasia or carcinoma *in situ* of the cervix uteri. *Br J Cancer* 42: 359-369.

76. HAWLEY-NELSON, P., ANDROPHY, E.J., LOWY, D.R. AND SCHILLER, J.T. (1988), The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer. *EMBO J* 7: 525-31.
77. HAWLEY-NELSON, P., VOUSDEN, K.H., HUBBERT, N.L., LOWY, D.R., & SCHILLER, J.T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize primary human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8: 3905-10.
78. HIGGINS, GEOFFREY D, UZELIN DIANA M, PHILLIPS GAEL E, MCEVOY P, MARIN R AND BURRELL CHRISTOPHER J. (1992). Transcription patterns of human papillomavirus type 16 in genital intraepithelial neoplasia: evidence for promoter usage within the E7 open reading frame during epithelial differentiation. *J Gen Virol* 73: 2047-2057.
79. HIGGINS G.D., DAVY M., RODER D., UZELIN D.M., PHILLIPS G.E., BURRELL CH.J. (1991). Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA. *Lancet* 338: 910-13.
80. HIROCHIKA, H., HIROCHIKA, R., BROKER, T.R. AND CHOW, L.T. (1988), Functional mapping of the human papillomavirus type 11 transcriptional enhancer and its interaction with the trans-acting E2 proteins. *Genes Dev* 2: 54-67.
81. HIROCHIKA, H., BROKER, T.R. AND CHOW, L.T. (1987), Enhancers and transacting E2 transcriptional factors of papillomaviruses. *J Virol* 61: 2599-606.
82. HOWLEY, P.M. (1991), Papillomavirinae and their replication. In Fields, B.N., Knirpe, D.M. et al (ed) *Fundamental Virology*, 743-768, Raven Press Ltd., New York
83. HÜBSCHER, U. AND THÖMMES, P. (1992), DNA polymerase ϵ : in search of a function. *TIBS* 17: 55-58.
84. HUDSON, J.B., BEDELL, M.A., McCANCE, D.J., & LAIMINS, L.A. (1990). Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes *in vitro* by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol* 64: 519-526.
85. HUGHES R., NEILL W., AND NORVAL M. (1987). Nuclear DNA Analysis of Koilocytic and Premalignant Lesions of the Uterine Cervix. *Br Med J* 294: 267-269.
86. HURLIN, P.J., KAUR, P. SMITH, P.P., PEREZ-REYES, N., BLANTON, A. AND MCDUGAL, J.K. (1991), Progression of human papillomavirus type 18 immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *PNAS* 88: 570-574.
87. ISHIJI T., LACE MJ., PARKKINEN S., ANDERSON RD., HAUGEN TH., CRIPE

- TP., XIAO JH., DAVIDSON I., CHAMBON P., TUREK LP. (1992). Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J. 11: 2271-81.*
88. JOHNSON M.A., BLOMFIELD P.I., BEVAN I.S., WOODMAN C.B.J., YOUNG L.S. (1990). Analysis of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcription in cervical carcinomas and normal cervical epithelium using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol 71: 1473-1479.*
89. KAUR, P. AND MCDOUGALL, J.K. (1988), Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. *J Virol 62: 1917-24.*
90. KAWASHIMA M., JABLONSKA S., FAVRE M., OBALEK S., CROISSANT O., AND ORTH G. (1986). Characterization of a New of Human Papillomavirus Found in a lesion of Bowen's Disease of the Skin. *J Virol 57: 688-692.*
91. KENTER G G, CORNELISSE C J, JIWA N M, AARTSEN E J, HERMANS J, MOOI W, HEINTZ A P M AND FLEUREN G J. (1993). Human papillomavirus type 16 in tumor tissue of low-stage squamous carcinoma of the uterine cervix in relation to ploidy grade and prognosis. *Cancer 71: 397-401.*
92. KESSLER I. (1986). Cervical cancer: Social and sexual correlates. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 55. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
93. KESSLER, I. (1977), Venereal factors in human cervical cancer. *Cancer 39: 1912-1919.*
94. KOI, M. MORITA, H., YAMADA, H., SATOH, H., BARRET, J.C. AND OSHIMURA, M. (1989), Normal human chromosome 11 supresses tumorigenicity of human cervical tumor cell line Si-Ha. *Mol Carcinog 2: 12-21.*
95. KONG-BUNG CHOO, WING-FAI CHEUNG, LIP-NYIN LIEW, HSIEN-HSIUNG LEE AND SHOU-HWA HAN. (1989). Presence of catenated human papillomavirus type 16 episomes in a cervical carcinoma cell line. *J Virol 63: 782-789.*
96. KONG-BUNG CHOO, HSIEN-HSIUNG LEE, CHAO-CHIH PAN, SHEUE-MEI WU, LIP-NYIN LIEW, WING-FAI CHEUNG AND SHOU-HWA HAN. (1988). Sequence duplication and internal deletion in the integrated human papillomavirus type 16 genome cloned from a cervical carcinoma. *J Virol 62: 1659-1666.*
97. KREIDER J., HOWETT M., WOLFE S., BARTLETT G., ZAINO R., SEDLACEK T., AND MORTEL R. (1985). Morphological Transformation *in vivo* of Human

- Uterine Cervix With Papillomavirus from Condylomata Acuminata. *Nature* 317: 639-641.
98. KREIDER J., HOWETT M., LEORE-DUPREE A., ZAINO R., AND WEBER. (1987). Laboratory Production *in vivo* of Infectious Human Papillomavirus Type 11. *J Virol* 61: 590-593.
 99. KURMAN R., SHAH K., LANCASTER W. AND JENSON A. (1981). Immunoperoxidase Localization of Papillomavirus Antigens in Cervical Dysplasia and Vulvar Condylomas. *Am J Obstet Gynecol* 140: 931-935.
 100. KURMAN ROBERT J, SCHIFFMAN MARK H, LANCASTER WAYNE D, REID RICHARD, JENSON A BENNETT, TEMPLE GARY F AND LORINCZ ATTILA T. (1988). Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: A possible role for type 18 in rapid progression. *Am J Obstet Gynecol* 159: 293-96.
 101. LAMBERT, P.F. (1991). Papillomavirus DNA replication. *J Virol* 65: 3417-20.
 102. LANCASTER W., KURMAN R., SANZ L., PERRY S., JENSON A. (1983). Human Papillomavirus: Detection of Viral DNA Sequences and Evidence for Molecular Heterogeneity in Metaplasias and Dysplasias of the Uterine Cervix. *Intervirol* 20: 202-212.
 103. LAND, H. PARADA, L.F. AND WEINBERG, R.A. (1983), Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222: 771-778.
 104. LAW MF, LANCASTER WD, HOWLEY PM. (1979). Conserved sequences among the genomes of papillomaviruses. *J Virol* 32: 199-207.
 105. LEHN H., ERNST M. AND SAUER G. (1984). Transcription of Episomal Papillomavirus DNA in Human Condylomata Acuminata and Buschke-Lowenstein Tumours. *J Gen Virol* 65: 2003-2010.
 106. LEHN H., VILLA L.L., MARZIONA F., HILGARTH M., HILLEMANS H-G., SAUER G. (1988). Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J Gen Virol* 69: 187-196.
 107. LEHEN H., KRIEG P., SAUER G. (1985). Papillomavirus genomes in human cervical tumors: Analysis of their transcriptional activity. *PNAS* 82: 5540-5544.
 108. LEPTAK, C., RAMON Y CAJAL, S., KULKE, R., HORWITZ, B.H., RIESE, D. 2., DOTTO, G.P., AND DI MAIO, D. (1991), Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol* 65: 7078-83.

109. LI R., KNIGHT JD., JACKSON SP., TJIAN R., BOTCHAN MR. (1991). Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* 65: 493-505.
110. LI R., BOTCHAN M. (1993). The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate *in vitro* BPV-1 DNA replication. *Cell* 73: 1207-1221.
111. LINN, S. (1991), How many Pols does it take to replicate nuclear DNA?. *Cell* 66: 185-187.
112. LORINCZ A, LANCASTER W, KURMAN R, JENSON B, TEMPLE G. (1986). Characterization of Human Papillomaviruses in cervical neoplasias and their detection in routine clinical screening. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 225. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
113. LORINCZ A, REID R, JENSON B, GREENBERG M D, LANCASTER W KURMAN R J. (1992). Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79: 328-337.
114. LOWY, D.R., DVORETZKY, I., SHOBER, R., LAW, M.F., ENGEL, L. AND HOWLEY, P.M. (1980). *in vitro* tumorigenic transformation by a defined sub-genomic fragment of bovine papilloma virus DNA. *Nature* 287: 72-74.
115. LUSKY, M. AND FONTANE, E. (1991), Formation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 proteins is modulated by E2 phosphorylation and depends upon sequences within the carboxyl terminus of E1. *PNAS* 88: 6363-7.
116. MACNAB J., WALKINSHAW S., CORDINER J., AND CLEMENTS B. (1986). Human Papillomavirus in Clinically and Histologically Normal Tissue of Patients With Genital Cancer. *N Engl J Med* 315: 1052-1058.
117. MALLON R., WOJCIECHOWICZ D., AND DEFENDI V. (1987). DNA-Binding Activity of Papillomavirus Proteins. *J Virol* 61: 1655-1660.
118. MARTIN, P., VASS, W.C., SCHILLER, J.T., LOWY, D.R. AND VELU, T.J. (1989), The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell* 59: 21-32.
119. MATLASHEWSKI G., SCHNEIDER J., BANKS L., JONES N., MURRAY A., AND CRAWFORD L. (1987). Human Papillomavirus type 16 DNA Cooperates with Activated ras in Transforming Primary Cells. *EMBO J* 6: 1741-1746.
120. MATSUKURA T., KOIS. AND SUGASE M. (1989). Both Episomal and Integrated

Forms of Human Papillomavirus Type 16 are Involved in Invasive Cervical Cancers.
Virology 172: 63-72.

121. McBRIDE, A.A. AND HOWLEY, P.M. (1991), Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *J Virol* 65: 6528-34.
122. McBRIDE, A.A., BYRNE, J.C. AND HOWLEY, P.M. (1989), E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *PNAS* 86: 510-4.
123. McBRIDE, A.A., SCHLEGEL, R. AND HOWLEY, P.M. (1988), The carboxy terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity. *EMBO J* 7: 533-9.
124. McCANCE, D.J. (1986). Human papillomaviruses and cancer. *Biochem Biophys Acta* 823: 195-205.
125. McCANCE D.J., KOPAN R., FUCHS E., AND LAIMINS L.A. (1988). Human Papillomavirus Type 16 Alters Human Epithelial Cell Differentiation *in vitro*. *PNAS* 85: 7169-7173.
126. McDUGAL J, BECKMANN A, GALLOWAY D. (1986). The enigma of viral nucleic acids in genital neoplasia. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 199. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
127. MEANWELL, C.A., COX, M.F., BLACKLEDGE, G., MAITLAND, N.J. (1987). HPV16 DNA and malignant cervical epithelium: implications for the aetiology and behavior of cervical neoplasia. *Lancet March* 28: 703-707.
128. MEISELS A, FORTIN R, ROY M. (1976) Condylomatous lesions of the cervix: II cytologic, colposcopic and histologic study. *Acta Cytol* 21: 379-390.
129. MEISELS A, MORIN C. (1986). Flat condyloma of the cervix: Two variants with different prognosis. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 115. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
130. MEISELS A., ROY M., FORTIER M., MORIN C., CASAS-CORDERO M., SHAH K., AND TURGEON H. (1981). Human Papillomavirus Infection of the Cervix. *Acta Cytol* 25: 7-16.
131. MEISELS A., FORTIN R., ROY M. (1976). Condylomatous lesions of cervix and vagina. I. Cytologic pattern. *Acta Cytol* 20: 505-509.

132. MELKER P.W.J., HOPMAN E., VAN DEN BRULE A.J.C., RISSEELLE K. J., VAN DIEST P.J., BLEKER O.P., HELMERHORST T., SCHIPPER M.E. I., MEIJER CH., WALBOOMERS J.L., JAN M M. (1993). Prevalence of HPV in cyto-morphologically normal cervical smears as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 53: 919-923.
133. MILLAN D., DAVIS J., TORBET T., AND CAMPO M. (1986). DNA Sequences of Human Papillomavirus Types 11,16, and 18 in Lesions of the Uterine Cervix in the West of Scotland. *Br Med J* 293: 93-96.
134. MINCHEVA A., GISSMANN L., ZUR HAUSEN H. (1987). Chromosomal integration sites of human papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by in situ hybridization. *Med Microbiol Immunol* 176: 245-256.
135. MITCHELL, P.J. AND TJIAN, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-8.
136. MOHR, I.J., CLARK, R., SUN, S., ANDROPHY, E.J., MACPHERSON, P., BOTCHAN, M.R. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250: 1694-1699.
137. MUNGER, K., PHELPS, W.C., BUBB, V., HOWLEY, P.M., & SCHLEGEL, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63: 4417-4421.
138. MUÑOZ N, BOSCH F X, DE SANJOSÉ S, TAFUR L, IZARZUGAZA I, GILI M, VILADIU P, NAVARRO C, MARTOS C, ASCUNCE N, GONZALEZ L C, KALDOR J MRRERO E, LORINCZ A, SANTAMARÍA M, ALONSO DE RUIZ P, ARISTIZABAL N AND SHAH K. (1992). The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 52: 743-749.
139. NAIB ZM, NAHMIAS AJ, JOSEY W., KRAMER JH. (1969). Genital herpetic infection. Association with cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 23: 940-945.
140. NASSERI, M., GAGE, J.R., LORINCZ, A., AND WETTSTEIN F.O. (1991). Human papillomavirus type 16 immortalized cervical keratinocytes contain transcripts encoding E6, E7, and E2 initiated at the P97 promoter and express high levels of E7. *Virol* 184: 131-140.
141. NELSON JH, AVERETTE HE, RICHART RM. (1984). Dysplasia, carcinoma in situ, and early invasive cervical carcinoma. *CA-A Cancer J For Clinicians* 34: 306-

.327.

142. NEVINS, J.R. (1991), Transcriptional activation by viral regulatory proteins. *TIBS* 16: 435-39.
143. NUOVO GERARD J, DARFLER MARLENE M, IMPRAIM CHAKA C AND BROMLEY SUSAN E. (1991). Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. *Am J Pathol* 138: 53-58.
144. OCADIZ R., SAUCEDA R., CRUZ M., GRAEF A., AND GARIGLIO P. (1987). High Correlation Between Molecular Alterations of the c-myc Oncogene and Carcinoma of the Uterine Cervix. *Cancer Res* 47: 4173-4177.
145. ORTH G., FAVRE M., CROISSANT O. (1977). Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 24: 108-120.
146. OSTROW R., ZACHOW K., NILMURA M., OKAGAKI T., MULLER S., BENDER M., AND FARAS A. (1986). Detection of Papillomavirus DNA in Human Semen. *Science* 231: 731-733.
147. PARKIN D.M. (1984). Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull WHO* 62: 163-182.
148. PATER M.M. AND PATER A. (1985). Human Papillomavirus Types 16 and 18 Sequences in Carcinoma Cell Lines of the Cervix. *Virol* 145: 313-318.
149. PATER MARY M AND PATER ALAN. (1988). Expression of human papillomavirus types 16 and 18 DNA sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Med Virol* 26: 185-195.
150. PATERSON VESSEY M. (1986). *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 29. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
151. PECORARO G., MORGAN L., AND DEFENDI V. (1991). Evolution of *in vitro* Transformation and Tumorigenesis of HPV16 and HPV18 Immortalized Primary Cervical Epithelial Cells. *Am J Pathol* 138: 1-8.
152. PETO R. (1986). Introduction: Geographic patterns and trends. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 3. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
153. PFISTER H. (1984). Biology and Biochemistry of Papillomaviruses. *Reviews Physiol Biochem Pharmacol* 99: 112.

154. PHELPS, W.C., & HOWLEY, P.M. (1987). Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 61: 1630-1638.
155. PHELPS, W.C., BAGCHI, S., BARNES, J.A., RAYCHAUDHURI, P., KRAUS, V., MÜNGER, K., HOWLEY, P.M., ET AL. (1991). Analysis of transactivation by human papillomavirus type 16 E7 and Adenovirus 12S E1A suggests a common mechanism. *J Virol* 65: 6922.
156. PHELPS, W.C., YEE, C.L., MÜNGER K., & HOWLEY P.M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to adenovirus E1a. *Cell* 53: 539-547.
157. PIRISI L., YASUMOTO S., FELLER M., DONIGER J., AND DIPAULO J. (1987). Transformation of Human Fibroblasts and Keratinocytes with Human Papillomavirus Type 16 DNA. *J Virol* 61: 1061-1066.
158. POPESCU N. C., AMSBAUGH S.C., DIPAULO J.A. (1987). Human papillomavirus type 18 DNA is integrated at a single Chromosome site in cervical carcinoma cell line SW756. *J Virol* 51: 1682-1685.
159. RAWLS WE, CLARK A, SMITH KO, DOCHERTY J, GILMAN C, GRAHAM S. (1980). Viruses in naturally occurring cancers. *Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, vol. 7, p. 117.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
160. REEVES W., BRINTON L.A., BRENES M.M., QUIROZ E., RAWLS W., De BRITTON R.C. (1985). Case-control study of cervical cancer in Herrera province. *Int J Cancer* 36: 55-60.
161. REID R, FU Y. (1986). Is there a morphologic spectrum linking condyloma to cervical cancer. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer, p. 91.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
162. REID R, CRUM CP, HERSCHMAN BR, FU YS, BRAUN L, SHAH K, AGRONOW S, STANHOPE C. (1984). Genital warts and cervical cancer. III. Subclinical papillomaviral infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuous morphologic and biologic change. *Cancer* 53: 943-953.
163. RIOU G., BARROIS M., TORDJMAN I., DUTRONQUAY V. AND ORTH G. (1984). Cancérologie. Présence de Génomes de Papillomavirus et Amplification des Oncogenes c-myc et c-Ha-ras Dans des Cancers Envahissants du col de l'utérus. *C.R. Acad. Sc. Paris, t. 299, Série III, No. 14.*
164. ROGEL-GAILLARD, C., BREITBURD, F. AND ORTH, G. (1992). Human

- papillomavirus type 1 E4 proteins differing by their N-terminal ends have distinct cellular localisations when transiently expressed *in vitro*. *J Virol* 66: 816-23.
165. ROMANCZUK, H., THIERRY, F., & HOWLEY, P.M. (1990). Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105. *J Virol* 64: 2849-2859.
 166. ROMANCZUK H., HOWLEY P. (1992). Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *PNAS* 89: 3159-3163.
 167. ROSL, F., ACHTSTATTER, T., BAUKNECHT, T., HUTTER, K.J., FUTTERMAN, G., AND ZUR HAUSEN, H. (1991). Extinction of HPV18 upstream regulatory region in cervical carcinoma cells after fusion with non-malignant keratinocytes under non-selective conditions. *EMBO J* 10: 1337-1345.
 168. ROSL, F., DÜRST, M., AND ZUR HAUSEN, H. (1988). Selective suppression of human papillomavirus transcription in non-tumorigenic cells by 5'-azacytidine. *EMBO J* 7: 1321-1328.
 169. ROTKIN I.D. (1973). A Comparison Review of Key Epidemiological Studies in Cervical Cancer Related to Current Searches for Transmissible Agents. *Cancer Res* 33: 1353-1367.
 170. SANTUCCI, S., ANDROPHY, E.J., BONNE, A.C. AND CLERTANT, P. (1990). Proteins encoded by the bovine papillomavirus E1 open reading frame: expression in heterologous systems and in virally transformed cells. *J Virol* 64: 6027-39.
 171. SAXON, P.J., SRIVATSAN, E.S., STANBRIDGE, E.J. (1986). Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. *EMBO J* 5: 3461-3466.
 172. SCHEFFNER, M., WERNESS, B.A., HUIBREGTSE, J.M., LEVINE, A.J. AND HOWLEY, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomaviruses types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-36.
 173. SCHEFFNER M., Munger K., Byrne J. and Howley P. (1991). The state of the P53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *PNAS* 88: 5523-5527.
 174. SCHIFMAN M.H., BAUER H.M., HOOVER R.N., GLASS A.G., CADELL D.M., RUSH B.B., SOTT D.R., SHERMAN M.E, KURMAN R.J, WACHOLDER S., STANTON C.K., MANOS M.M. (1993). Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl*

Cancer Inst 85: 958-964.

175. SCHILLER J., VASS W. AND LOWY D. (1984). Identification of a Second Transforming Region in Bovine Papillomavirus DNA. *PNAS* 81: 7880-7884.
176. SCHILLER J., VASS W., VOUSDEN K. AND LOWY D. (1986). E5 Open Reading Frame of Bovine Papillomavirus Type Encodes a Transforming Gene. *J Virol* 57: 1-6.
177. SCHLEGEL, R., PHELPS, W.C., ZHANG, Y.I. AND BARBOSA, M. (1988). Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J* 7: 3181-7.
178. SCHLEGEL, R., WADE, G.M., RABSON, M.S. AND YANG, Y.C. (1986). The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. *Science* 233: 464-7.
179. SCHLEHOFER J. (1986). Interactions of Herpes Simplex virus infections with host cell DNA. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 211. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
180. SCHLEHOFER, J.R., EHRBAR, M. AND ZUR HAUSEN, H. (1986a). Vaccinia virus, herpes simplex virus and carcinogens induced DNA amplification in a human cell line and support replication of a herpesvirus dependent parvovirus. *Virol* 152: 110-117.
181. SCHNEIDER A., KRAUS H., SCHUHMAN R., AND GISSMANN L. (1985). Papillomavirus Infection of the Lower Genital Tract: Detection of Viral DNA in Gynecological Swabs. *Int J Cancer* 35: 443-448.
182. SCHNEIDER, A., OLTERS DORF, T., SCHNEIDER, V. AND GISSMANN, L. (1987). Distribution pattern of human papilloma virus 16 genome in cervical neoplasia by molecular in situ hybridization of tissue sections. *Int J Cancer* 39: 717-721.
183. SCHNEIDER-GADICKE L., KAUL S., SCHWYZ E., GAUSEPOHL H., FRANK R., AND BASTERT. (1988). Identification of the Human Papillomavirus Type 18 E6 and E6 Proteins in Nuclear Protein Fractions from Human Cervical Carcinoma Cells Grown in the Nude Mouse or *in vitro*. *Cancer Res* 48: 2969-2974.
184. SCHNEIDER-MAUNOURY S, CROISSANT O AND ORTH G. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* 61: 3295-3298.

185. SCHWARZ, E., FRESSE, U.K., GISSMANN, L., MAYER, W., ROGGENBUCK, B., STREMLAU A., & ZUR HAUSEN H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314: 111-114.
186. SCHWARZ, E., SCHNEIDER-GADICKE, A., ROGGENBUCK, B., MAYER, W., GISSMANN, L., & ZUR HAUSEN H. (1986). Expression of human papillomavirus DNA in cervical carcinoma cell lines. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 281. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
187. SEDMAN S., BARBOSA M., VASS W., HUBBERT N., HAAS J., LOWY D., AND SCHILLER. (1991). The Full-Length E6 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Has Transforming and Trans-activating Activities and Cooperates with E7 To Immortalize Keratinocytes in Culture. *J Virol* 65: 4860-4866.
188. SHIRASAWA, H., TOMITA, Y., SEKIYA, S., TAKAMIZAWA, H. AND SIMIZU, B. (1987). Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J Gen Virol* 68: 583-591.
189. SHIRASAWA H, TOMITA Y, KUBOTA K, KASAI T, SEKIYA S, TAKAMISAWA H AND SIMIZU B. (1988). Transcriptional differences of the human papillomavirus type 16 genome between precancerous lesions and invasive carcinomas. *J Virol* 62: 1022-1027.
190. SHIRASAWA H, TOMITA Y, KUBOTA K, KASAI T, SEKIYA S, TAKAMISAWA H AND SIMIZU B. (1986). Detection of human papillomavirus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. *J Gen Virol* 67: 2011-2015.
191. SKEGG C.D.G., CORWIN P.A., PAUL C., DOLL R. (1982). Importance of the male factor in cancer of the cervix. *Lancet* 581-583.
192. SMOTKIN D., WETTSTEIN F.O. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of E7 protein. *PNAS* 83: 4680-4684.
193. SMOTKIN, D., PROKOPH, H. AND WETTSTEIN, F.O. (1987). The mayor human papillomavirus protein in cervical cancer is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol* 61: 1685-1689.
194. SMOTKIN, D., PROKOPH, H. AND WETTSTEIN, F.O. (1989), Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol* 63: 1441-7.
195. SO, A.G. AND DOWNEY, K.M. (1992). Eukaryotic DNA replication. *CRC Crit Rev*

Biochem Molec Biol 27: 129-155.

196. SPALHOLZ, B.A., LAMBERT, P.F., YEE, C.L. AND HOWLEY, P.M. (1987). Bovine papillomavirus transcriptional regulation: localization of the E2-responsive elements of the long control region. *J Virol* 61: 2128-37.
197. SPALHOLZ, B.A., VANDE POL, S.B. AND HOWLEY, P.M. (1991). Characterization of the cis elements involved in the basal and E2-transactivated expression of the bovine papillomavirus P2443 promoter. *J Virol* 64: 743-753.
198. SPALHOLZ, B.A., YANG, Y.C. AND HOWLEY, P.M. (1985). Transactivation of a bovine papillomavirus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 42: 183-91.
199. STANLEY, M.A., BROWNE, H.M., APPLEBY, M.W. AND MINSON, A.C. (1989). Properties of a non-tumorigenic human cervical epithelial cell line. *Int J Cancer* 43: 672-76.
200. STERLING, J., STALLEY, M., GATWARD, G. AND MINSON, T. (1990). Production of human papillomavirus type 16 virions in a keratinocyte cell line. *J Virol* 64: 6305-7.
201. STOLER, M.H. AND BROKER T.R. (1986). In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and Messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma. *Human Pathol* 17: 1250-1258.
202. STOLER, M.H., RHODES, CH. R., WHITBECK A., WOLINSKY, S.M., CHOW, L.T., BROKER, T.R. (1992). Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Human Pathol* 23: 117-128.
203. STOLER, M.H., WOLINSKY S. M., WHITBECK A., BROKER T. R. AND CHOW L. (1989). Differentiation-linked human papillomavirus type 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA Probes. *Virol* 172: 331-340.
204. SUGDEN B. (1986). *Cancer Cells 4/DNA Tumor Viruses*, p. 77. Cold Spring Harbor laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
205. SUN, S., THORNER, L., LENTZ, M., MACPHERSON, P. AND BOTCHAN, M. (1990). Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 64: 5093-105.
206. SYRJANEN K, MANTYJARAVI R, PARKKINEN S, VAYRYNEN M, SAARIKOSKI S, SYRJANEN S, CASTREN O. (1986). Prospective follow-up in

- assessment of the biological behavior of cervical HPV-associated dysplastic lesions. *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 167. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
207. SYRJANEN KJ. (1987). Biology of human papillomavirus (HPV) infections and their role in squamous cell carcinogenesis. *Medical Biology* 65: 21-39.
 208. TAKEBEN N., TSUNOKAWA Y., NOZAWA S., TERADA M., SUGIMURA. (1987). Conservation of E6 and E7 Regions of Human Papillomavirus Types 16 and 18 Present in Cervical Cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 837-844.
 209. THIERRY, F., SPYROU, G., YANIV, M. AND HOWLEY, P.M. (1992). Two API sites binding JunB are essential for HPV18 transcription in keratinocytes. *J Virol*.
 210. THIERRY, F., DOSTATNI, N., ARNOS, F. AND YANIV, M. (1990). Cooperative activation of transcription by bovine papillomavirus type 1 E2 can occur over a large distance. *Mol Cell Biol* 10: 4431-4437.
 211. THIERRY, F. & YANIV, M. (1987). The BPV-1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV-18 regulatory region. *EMBO J* 6: 3391-3397.
 212. THIERRY, F., HEARD, J.M., DARTMANN, K. AND YANIV, M. (1987). Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J Virol* 61: 134-42.
 213. THIERRY, F. AND HOWLEY, P.M. (1991). Functional analysis of E2 mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biologist* 3: 90-100.
 214. TIDY J.A., PARRY G.C.N., WARD P., COLEMAN D.V., PETO J., MALCOLM A.B., FARREL P.J. (1989). High rate of human papillomavirus type 16 infection in cytologically normal cervixes. *Lancet February* 25: 434.
 215. TURYK, M.E., GOLUB, T.R., WOOD, N.B., HAWKINS, J.L. AND WILBANKS, G.D. (1989). Growth and characterization of epithelial cells from normal human uterine ectocervix and endocervix. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 544-56.
 216. USTAV, M., USTAV, E., SZYMANSKI, P. AND STENLUND, A. (1991). Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J* 10: 4321-4329.
 217. USTAV, M., and STENLUND, A. (1991). Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 10:

449-457.

218. VON KNEBEL, M., BAUKNECHT, T., BARTSH, D. et al. (1991). Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *PNAS* 88: 1411-1415.
219. VON KNEBEL, M., OLTERS DORF T., SCHWARS, E. AND GISSMANN, L. (1988). Correlation of modified human papillomavirus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 48: 3780-3786.
220. WALKER J, BLOSS JEFFREY D, SHU-YUAN LIAO, BERMAN M, BERGEN S AND WILCZYNSKI SHARON P. (1989). Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 74: 781-785.
221. WERNESS, B.A., LEVINE, A.J., & HOWLEY, P.M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248: 76-79.
222. WILCZYNSKI S P, PEARLMAN L AND WALKER J. (1988). Identification of HPV16 early genes retained in cervical carcinomas. *Virology* 166: 624-627.
223. WILSON, V.G. AND LUDES, M.J. (1991). A bovine papillomavirus E1 related protein binds specifically to bovine papillomavirus DNA. *J Virol* 65: 5314-22.
224. WOODWORTH, C.D., WAGGONER, S., BARNES, W., STOLER, M.H. AND DiPAOLO, J.A. (1990). Human cervical and foreskin epithelial cells immortalized by human papillomavirus DNAs exhibit dysplastic differentiation *in vivo*. *Cancer Res* 50: 3709-3715.
225. XIAO X., CAO M., MILLER T., CAO Z., BENEDICT Y. (1988). Papillomavirus DNA in cervical carcinoma specimens from central China. *Lancet* October 15: 902.
226. YANG, L., LI, R., MOHR, I.J., CLARK, R. AND BOTCHAN, M.R. (1991). Activation of BPV-1 replication *in vitro* by the transcription factor E2. *Nature* 353: 628-32.
227. YASUMOTO S., BURKHARDT A., DONIGER J., AND DiPAOLO. (1986). Human Papillomavirus Type 16 DNA-Induced Malignant Transformation of NIH 3T3 Cells. *J Virol* 57: 572-577.
228. YASUMOTO, S., TANIGUCHI, A., SOHMA, K. (1991). Epidermal growth factor (EGF) elicits down-regulation of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6/E7 mRNA at the transcriptional level in an EGF-stimulated human keratinocyte cell

line: Functional role of EGF-responsive silencer in the HPV-16 long control region. *J Virol* 65: 2000-2009.

229. YEE C., KRISHNAN-HEWLETT I., BAKER C.C., SCHLEGEL R., HOWLEY P.M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119: 361-366.
230. ZUR HAUSEN H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 78: 1-30.
231. ZUR HAUSEN H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 36: 794.
232. ZUR HAUSEN H. (1983). Herpes simplex virus in human genital cancer. *Int Rev Exp Pathol* 25: 307-326.
233. ZUR HAUSEN H, MEINHOF W, SCHEIBER W, BORNKAMM GW. (1974). Attempts to detect virus specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human warts virus. *Int J Cancer* 13: 650-656.
234. ZUR HAUSEN H. (1991). Virus in human cancers. *Science* 231: 1167-1173.
235. ZUR HAUSEN, H. (1989). Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 49: 4677-4881.
236. ZUR HAUSEN, H., & SCHNEIDER, A. (1987b). The role of papillomavirus in human anogenital cancer. In "The Papovaviridae" (N: Salzman and P.M. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 245-263. Plenum, New York.
237. ZUR HAUSEN H. (1987). Papillomaviruses in human cancer. *Cancer* 59:1692-1696.