

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“El cáncer orofaríngeo y su asociación con la
infección por el Virus del Papiloma Humano”**

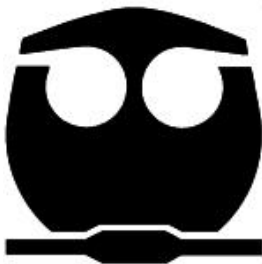
Trabajo Monográfico de Actualización

Que para obtener el título de:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

Presenta

KATIA CAROLINA JÁCOME AMBARIO



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2022



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. MARTIN FUENTES RUTH EDITH

Vocal: Prof. TIRADO MENDOZA ROCIO GABRIELA

Secretario: Prof. PLETT TORRES TANYA

1er Suplente: Prof. CORONA ROMERO ATZIRI

2do Suplente: Prof. DIAZ GARCIA FRANCISCO JAVIER

ASESOR DEL TEMA:

Prof. PLETT TORRES TANYA

SUSTENTANTE:

JÁCOME AMBARIO KATIA CAROLINA

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por su amor, ejemplo y apoyo incondicional.

A mi familia y amigos, por el cariño y ayuda que me brindan.

A la Dra. Tanya Plett, por su amable asesoría y excelente disposición para la realización de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Introducción	1
Capítulo 1. Virus del Papiloma Humano (HPV)	3
1.1 Genoma y proteínas	4
1.2 Clasificación taxonómica.....	5
1.3 Infección por HPV.....	7
Capítulo 2. Cáncer orofaríngeo (OPC)	10
2.1 Factores de riesgo.....	12
Capítulo 3. Asociación entre la infección por HPV y el desarrollo de cáncer orofaríngeo	16
3.1 Epidemiología	16
3.2 Historia natural de la infección.....	24
3.2.1 Ciclo viral	27
3.2.2 Estructura y funciones de las proteínas y de la LCR de los HPV oncogénicos	32
3.3 Persistencia viral y el proceso de transformación de las células.....	68
3.3.1 Integración al DNA del hospedero.....	73
3.3.2 Papel de las oncoproteínas en la malignidad celular por el evento de integración del genoma viral	77
3.4 Respuesta inmune contra el HPV en el OPC	87
3.4.1 Respuesta inmune durante la infección productiva por HPV	89
3.4.2 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	90
3.4.3 Anticuerpos anti-HPV.....	95
3.4.4 Mecanismos que contribuyen a la evasión inmunitaria tumoral en OPC.....	99
3.5 Diagnóstico, tratamiento y prevención por vacunación del OPC HPV+	105
3.5.1 Diagnóstico	105
3.5.2 Tratamiento.....	111
3.5.3 Vacunación	114
Capítulo 4. OPC HPV+ en México	118
Conclusiones	121
Referencias	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cápside.....	3
Figura 2. Esquema linealizado del genoma de la familia <i>Papillomaviridae</i>	4
Figura 3. Árbol filogenético de los tipos de HPV reconocidos hasta 2018.	7
Figura 4. Esquema de los casos de cáncer atribuibles a HPV en EUA.....	9
Figura 5. Vías aerodigestivas superiores.....	11
Figura 6. Patrón de edad de la prevalencia de HPV oral en población estadounidense (14-69 años).....	17
Figura 7. Diferencia en seroconversión tras la infección genital por HPV-16 entre sexos.....	18
Figura 8. Asociación entre el número de parejas sexuales orales de por vida con la prevalencia de HPV oral en los hombres y mujeres en la población estadounidense de 14 a 69 años.....	19
Figura 9. Prevalencia oral de HPV de alto riesgo e incidencia de OPC en la población de EUA en función de la edad.....	23
Figura 10. Amígdalas y criptas amigdalares.....	25
Figura 11. Genoma de HPV-16.....	26
Figura 12. Esquema linealizado del genoma de HPV-16.....	26
Figura 13. Esquema de las 3 fases en el ciclo productivo del HPV.....	28
Figura 14. Organización del ciclo infeccioso de HPV dentro del epitelio.....	30
Figura 15. Cortes de lesiones en mucosa causadas por HPV-16 teñidas con anticuerpos.....	31
Figura 16. Corte de una lesión en mucosa causada por HPV-16.....	32
Figura 17. Diagrama de la LCR de HPV-16.....	33
Figura 18. Esquema de algunos mRNAs policistrónicos de p97 y p670 en HPV-16.....	34
Figura 19. Esquema que resume la estructura de HPV-16 E7 y las funciones descritas para sus CR.....	35
Figura 20. Esquema que resume el papel de la proteína E7 en la alteración del ciclo celular.....	39
Figura 21. Modelo de listones de E6 del HPV-16.....	42
Figura 22. Diagrama de algunas de las proteínas celulares con las que interacciona E6 de HPV de alto riesgo.....	43
Figura 23. Resumen de la cooperación de E6 y E7 en la alteración del ciclo celular.....	47
Figura 24. Esquema de los sitios de unión de E2 y E1 en el LCR de HPV-16.....	48
Figura 25. Modelo de listones de E2 de HPV-16.....	49
Figura 26. Mitad de un complejo E1 y E2 de HPV-18.....	50
Figura 27. Diagrama de la estructura lineal de la proteína BPV-1 E1 y sus dominios.....	51
Figura 28. Estructura del DBD de BPV-1 E1.....	52
Figura 29. Estructura del HD hexamérico unido a ADP de BPV-1 E1.....	52
Figura 30. Modelo de replicación del HPV.....	53
Figura 31. Modelo de listones de un canal iónico hexamérico generado por la proteína HPV-16 E5 <i>in vitro</i>	54
Figura 32. Esquema de la secuencia lineal de E4 antes de su proteólisis progresiva en el extremo N-terminal.....	58
Figura 33. Estructura de la proteína L1 de HPV-16.....	61
Figura 34. Reconstrucciones 3D de la cápside vacía de HPV-16.....	62
Figura 35. Modelo de la interacción de la cápside de HPV con la membrana basal o matriz extracelular y la superficie celular.....	63
Figura 36. Esquema del DNA circular del HPV y su integración en el DNA de la célula hospedera.....	75
Figura 37. Propuesta de la cooperación de E6 y E7 en la transformación maligna.....	85
Figura 38. Esquema de CIN 1, 2 y 3 y CC.....	87
Figura 39. Estructura de una cripta amigdalal.....	88

Figura 40. Perfiles de anticuerpos posibles según la etapa de la infección por HPV.....	97
Figura 41. Inmunohistoquímica de p16 en OPC.....	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Función de las proteínas de PV.....	4
Tabla 2. Principales diferencias entre el OPC HPV+ y HPV-.....	15
Tabla 3. Funciones de las proteínas de HPV de alto riesgo (HPV-16).....	66
Tabla 4. Comparación de las funciones descritas para las oncoproteínas de HPV-HR y las alteraciones celulares que dictan colectivamente el crecimiento maligno	84

LISTA DE ABREVIATURAS

A3A: <i>Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like 3A</i>	DNMT1: <i>DNA Methyltransferase 1</i>
AIDS: <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>	E6AP: <i>E6 Associated Protein</i>
AJCC: <i>American Joint Committee on Cancer</i>	EBV: <i>Epstein-Barr Virus</i>
AP-1: <i>Activator Protein 1</i>	EGF: <i>Epidermal Growth Factor</i>
APC: <i>Antigen Presenting Cell</i>	EGFR: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ATM: <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	ER α : <i>Estrogen Receptor alpha</i>
C/EBP: <i>CCAAT/enhancer Binding Proteins</i>	EUA: <i>Estados Unidos de América</i>
CBP: <i>CREB Binding Protein</i>	FADD: <i>Fas Associated Via Death Domain</i>
CC: <i>Cervical Cancer</i>	FasL: <i>Fas Ligand</i>
CCL2: <i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i>	FHIT: <i>Fragile Histidine Triad</i>
cdc: <i>Cell Division Control Protein</i>	FRA: <i>Fragile sites</i>
CDK: <i>Cyclin Dependent Kinase</i>	GLOBOCAN: <i>Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence</i>
CDKN2A: <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>	GM-CSF: <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
CDP: <i>CCAAT-Displacement Protein</i>	HATs: <i>Histone Acetyltransferases</i>
CE-VADS: <i>Cáncer Escamoso de las Vías Aerodigestivas Superiores</i>	HC: <i>Hybrid Capture</i>
CHEK1: <i>Checkpoint Kinase 1</i>	HCV: <i>Hepatitis C Virus</i>
CIN: <i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>	HD: <i>Helicase Domain</i>
CKI: <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor</i>	HECT: <i>Homologous to E6AP Carboxy-Terminus</i>
CK2: <i>Casein Kinase 2</i>	HIF-1 α : <i>Hypoxia Inducible Factor 1α</i>
CMV: <i>Cytomegalovirus</i>	HIS: <i>Hibridación in situ</i>
CR: <i>Conserved Regions</i>	HIV: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
CSF-1: <i>Colony Stimulating Factor 1</i>	HLA: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
CTL: <i>Cytotoxic T Cell Lymphocytes</i>	HNC: <i>Head and Neck Cancers</i>
Cyp: <i>Cyclophilin</i>	HNSCC: <i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
DBD: <i>DNA-Binding Domain</i>	HPV: <i>Human Papillomavirus</i>
DC: <i>Dendritic Cells</i>	HR: <i>High Risk</i>
DHFR: <i>Dihydrofolate Reductase</i>	HSIL: <i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesions</i>
DIPS-PCR: <i>Detection of Integrated Papillomavirus Sequence Polymerase Chain Reaction</i>	HSPG: <i>Heparan Sulphate Proteoglycans</i>
DNA: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>	hTERT: <i>human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
dsDNA: <i>double-stranded Deoxyribonucleic Acid</i>	

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

ICON-S: *The International Collaboration on Oropharyngeal Cancer Network for Staging*

IDO: *Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*

IFN: *Interferons*

IGFBP-3: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3*

iNOS: *inducible Nitric Oxide Synthase*

IRF: *Interferon Regulatory Factor*

ISGF3: *Interferon Stimulated Gene Factor 3*

ITS: *Infección de Transmisión Sexual*

LC: *Langerhans Cells*

LCR: *Long Control Region*

LR: *Low Risk*

LSIL: *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions*

MAGI: *Membrane Associated Guanylate Kinase*

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*

MCM: *Minichromosome Maintenance*

MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

Mdm2: *Murine double minute 2*

MDSCs: *Myeloid-Derived Suppressor Cells*

MGMT: *O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase*

MHC: *Major Histocompatibility Complex*

MIP1 α : *Macrophage Inflammatory Protein 1 α*

MPP2: *M Phase Phosphoprotein 2*

mRNAs: *messenger Ribonucleic Acid*

ND10: *Nuclear Domain 10*

NES: *Nuclear Export Signal*

NF1: *Neurofibromin 1*

NF-IL6: *Nuclear Factor Interleukin-6*

NF- κ B: *Nuclear Factor kappa B*

NFX1: *Nuclear Transcription Factor, X-Box Binding 1*

NHERF-1: *Sodium-Hydrogen Exchanger Regulatory Factor 1*

NK: *Natural Killer*

NKT: *Natural Killer T*

NLS: *Nuclear Localization Signal*

NuMA: *Nucleus and Mitotic Apparatus*

O6MGT: *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*

Oct1: *Organic Cation Transporter 1*

OMS: *Organización Mundial de la Salud*

OPC: *Oropharyngeal Cancer*

ORF: *Open Reading Frame*

PAH: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PD-1: *Programmed Death-1*

PD-L1: *Programmed Death-ligand 1*

PEF-1: *Penta-EF-hand domain containing 1*

PGE2: *Prostaglandin E2*

PKB: *Protein Kinase B*

pRb: *Proteína del retinoblastoma*

PV: *Papilomavirus*

RFC5: *Replication Factor C Subunit 5*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

RPA: *Replication Protein A*

RT-PCR: *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SIL: *Squamous Intraepithelial Lesions*

SNX17: *Sorting Nexin-17*

SYCP2: *Synaptonemal Complex Protein 2*

TAA: *Tumor Associated Antigens*

TAM: *Tumor-Associated Macrophages*

TAP: *Transporter Associated with Antigen Processing*

Tat: *Trans-Activating regulatory protein*

TBP: *Tata-box Binding Protein*

TEF: *Transcription Enhancer Factor*

TFIID: *Transcription Factor IID*

TGF- β : *Transforming growth factor β*

Th1: *Type 1 T helper cell*

TIL: *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*

TK: *Thymidine kinase*

TLR: *Toll-like Receptor*

TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*

TNM: *Tumor-Nodule-Metastasis*

TP53: *Tumor Protein 53*

TRAIL: *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

TSNA: *Tobacco Specific Nitrosamines*

V-ATPasa: *ATP-asa vacuolar*

VEGF: *Vascular Endothelial Cell Growth Factor*

VLP: *Virus-Like Particle*

XRCC1: *X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1*

Introducción

La infección por el Virus del Papiloma Humano (HPV, del inglés *Human Papillomavirus*) es reconocida como un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de orofaringe (OPC, siglas en inglés de *Oropharyngeal Cancer*) y es la principal causa de un aumento dramático y continuo en la incidencia de este cáncer en numerosos países. El vínculo causal entre esta Infección de Transmisión Sexual (ITS) y el desarrollo de OPC ha llevado a un cambio de paradigma en la comprensión del riesgo de esta patología, antes asociada únicamente al consumo de alcohol y tabaco, pues al ser causado por un agente biológico, el OPC positivo a la presencia del virus (HPV+) posee características epidemiológicas, patológicas y clínicas únicas, ya que su mecanismo de carcinogénesis está mediado por proteínas virales que interfieren en múltiples vías de regulación celular y que pueden inducir la inmortalización y transformación de las células infectadas.

Hasta ahora, la mayoría de las investigaciones sobre cáncer asociado al HPV se han enfocado en el cáncer cervicouterino debido a su alta mortalidad y prevalencia, pero recientemente la incidencia del OPC HPV+ ha incrementado, representando un riesgo a la salud pública al que no se le ha prestado la atención debida y cuyo impacto comienza a manifestarse. De esta forma, estudiarlo a profundidad en este momento, es fundamental para el desarrollo de intervenciones oportunas que reviertan las tendencias observadas y mejoren el tratamiento de esta enfermedad.

La hipótesis de este trabajo radica en que la asociación entre la infección por HPV y OPC HPV+ reside en los mecanismos moleculares oncogénicos inherentes del HPV y la conducta sexual de ciertas poblaciones, factores que han llevado al aumento significativo de esta enfermedad en los últimos años. La presente revisión bibliográfica tiene como objetivo general recopilar el conocimiento actual de la asociación entre la infección por HPV y el desarrollo de OPC a través de una revisión bibliográfica exhaustiva que permita la consulta de este tema en una sola fuente. De manera particular, la presente revisión tiene como meta describir la historia natural de la infección por HPV, el mecanismo de carcinogénesis generado por el virus y el papel que juega la respuesta inmune contra el HPV y contra el OPC HPV+. Asimismo, con la finalidad de sentar un precedente de las deficiencias en el registro y estudio del OPC HPV+ en México, este escrito busca proporcionar información sobre la epidemiología y factores asociados, diagnóstico,

tratamiento y prevención por vacunación del OPC HPV+ así como señalar algunas de las principales preguntas de investigación pendientes por resolver y los actuales retos en la atención del OPC HPV+.

El presente trabajo incluye la información y los puntos de discusión más importantes del OPC HPV+, mismos que fueron seleccionados mediante la revisión de publicaciones recientes (procurando no fueran mayores a 10 años) acerca de este padecimiento en revistas indexadas utilizando los motores de búsqueda Google Académico y PubMed. Como resultado, esta redacción proporciona información sobre la epidemiología del OPC HPV+, las características moleculares de la infección por HPV, el mecanismo de carcinogénesis viral, el papel que juega la respuesta inmune contra la infección por HPV y contra el OPC, así como el estado actual del diagnóstico, tratamiento y prevención por vacunación del OPC HPV+. Este trabajo no representa una guía clínica, pero la información recopilada podría ser utilizada de forma auxiliar para la implementación de estrategias orientadas a mitigar los factores de riesgo de esta patología en la población, así como para identificar (y en el futuro corregir) las deficiencias que actualmente enfrenta la prevención, detección y tratamiento del OPC HPV+.

Capítulo 1. Virus del Papiloma Humano (HPV)

El término Virus del Papiloma Humano (HPV, del inglés *Human Papillomavirus*) designa a los virus miembros de la familia *Papillomaviridae* cuyo hospedero es el humano. Los Papilomavirus (PV), cuyo nombre hace alusión a los papilomas o lesiones verrucosas que causan en el hospedero, infectan células epiteliales de piel o de mucosas y son estrictamente específicos de su hospedero [1] por lo que es necesario usar cultivos epiteliales del organismo que infectan para reproducir la infección productiva *in vitro* [2]. Los PV infectan mamíferos, reptiles, aves y peces [1], siendo el ser humano el hospedero más estudiado. Todos los PV generan viriones no envueltos con una cápside icosaédrica de ~55 nm de diámetro (Figura 1) que protege su única copia de DNA (siglas en inglés de *Deoxyribonucleic Acid*) circular de doble cadena [1] que se conforma de tres grandes regiones: la región larga de control (LCR, del Inglés *Long Control Region*) que separa a la región de expresión temprana (E, del inglés *Early*) de la región de expresión tardía (L, del inglés *Late*) [1]. El tamaño del DNA de los PV puede variar de 5.7 a 8.6 Kbp, mientras que el genoma de los HPV varía entre 7 y 8 Kbp [1].

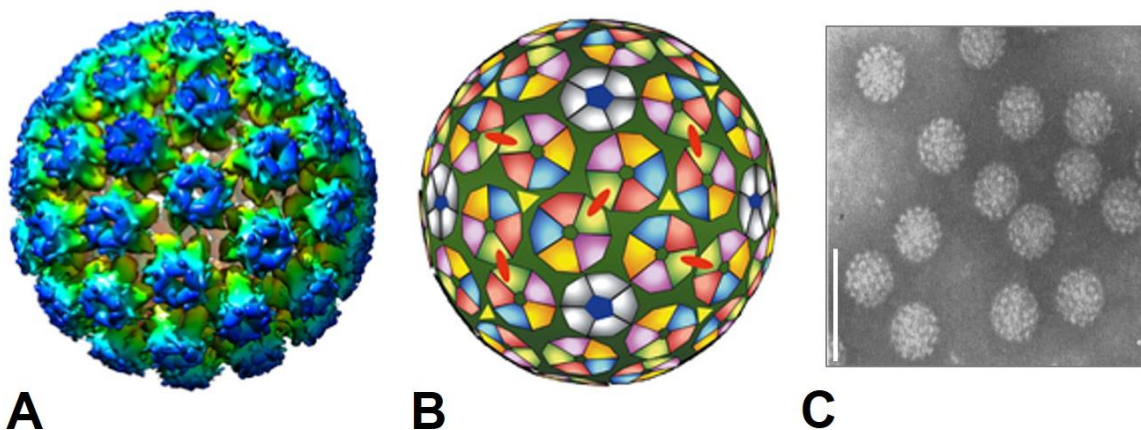


Figura 1. Cápside. (A) Representación atómica de la cápside del HPV-16 [3]. (B) Esquema de una cápside icosaédrica de la familia *Papillomaviridae* representando los 72 capsómeros pentaméricos de la proteína principal de la cápside (L1) en una disposición T=7 [1, 4]. (C) Micrografía electrónica de contraste negativo de viriones de HPV-1, la barra representa 100 nm. Modificado de [5].

1.1 Genoma y proteínas

El genoma de los PV es circular y la mayoría de los miembros secuenciados contienen 9-10 marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) denominados E1-E8 y L1-L2 [1], separados por LCR, una región poco conservada entre los miembros de la familia que contiene elementos de regulación y el sitio de origen para la transcripción y replicación viral [6, 7]. Todos los PV codifican las proteínas virales E1, E2, L1 y L2, los demás ORF E presentes varían de acuerdo al tipo de PV en cuestión (Figura 2) [1]. Cabe mencionar que los ORF E9 y E10 se han descrito, pero existen en pocos miembros de los géneros Delta, Xi y Kappa [8, 9].

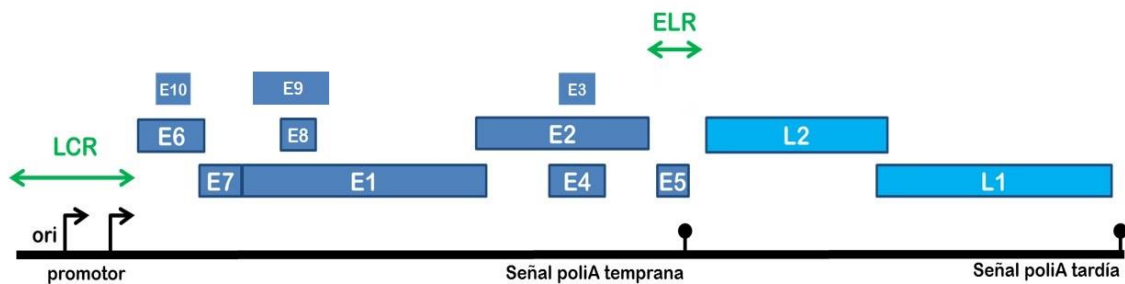


Figura 2. Esquema linealizado del genoma de la familia *Papillomaviridae*. Se observan los ORF tempranos E1-10 y los ORF tardíos L1 y L2. Modificado de [9] y [10].

La transcripción del genoma viral se lleva a cabo en una sola dirección y da lugar a una gran variedad de mRNAs (siglas en inglés de *messenger Ribonucleic Acid*) que pueden ser traducidos como proteínas policistrónicas o de fusión [1]. Los mRNAs de la región temprana (E) codifican polipéptidos no estructurales implicados en la transcripción, replicación y transformación de la célula huésped, mientras que los mRNAs tardíos (L) codifican proteínas de cápside [1]. Las funciones de cada ORF en el establecimiento y progresión de la infección se discutirán a detalle en los siguientes capítulos, pero de manera general se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Función de las proteínas de PV

Proteína	Principal función descrita
E1	Regulación de la replicación viral
E2	Regulación de la replicación y transcripción viral
E3*	No se ha demostrado que codifique una proteína por lo que se desconoce su función (presente en pocos PV)

Proteína	Principal función descrita
E4	Salida del virus de la célula del hospedero
E5	Oncoproteína
E6	Oncoproteína
E7	Oncoproteína
E8*	Inhibición de la transcripción y replicación viral (presente en pocos PV)
E9*	No se ha demostrado que codifique una proteína por lo que se desconoce su función (presente en pocos PV)
E10*	Rol en la transformación celular (presente en pocos PV)
L1	Proteína principal de la cápside
L2	Proteína menor de la cápside

*Proteínas no expresadas en HPV [6]. Fuentes: [9-11].

1.2 Clasificación taxonómica

Debido a la falta de sistemas robustos para el cultivo de HPV, la taxonomía de los PV no se basa en serología sino en el grado de homología de su DNA, por lo que se tienen genotipos y no serotipos [6, 12]. La evolución de los PV es más lenta que la de cualquier otro grupo de virus estudiado por la alta fidelidad en su replicación [1], ya que utiliza las polimerasas con actividad correctora de errores (*proof-reading*) de la célula que infecta. A pesar de que las mutaciones en el DNA viral ocurren en frecuencias no muy diferentes de las del genoma del hospedero [6], la evolución de los PV procede a través de mutación y deriva genética y sin haberse documentado ejemplos de recombinación, por lo que su genoma se ha mantenido prácticamente intacto durante millones de años [1].

Los miembros de la familia *Papillomaviridae* se clasifican en los niveles taxonómicos de subfamilia, género, especie, tipo, variante y subvariante, utilizando el grado de identidad en la secuencia de nucleótidos de la proteína L1 de acuerdo a lo acordado en el taller sobre PV realizado en Quebec en 1995 [13], ya que es el ORF más conservado dentro del genoma viral [6]. Los miembros de diferentes subfamilias comparten <45% de homología, diferentes géneros comparten <60%, diferentes especies comparten 60%-70%, dentro de una especie distintos tipos de PV comparten <90% de homología, mientras que las diferencias entre 1%-10% de homología definen una variante y menos del 1% una subvariante [14]. Desde 1970 los PV se han descrito como tipos, y no como especies, debido a su gran cantidad, con el resultado de que las especies

actualmente descritas típicamente agrupan tipos de PV con propiedades biológicas y patológicas similares [1, 6].

La nomenclatura de los PV refleja que son virus estrictamente específicos de su especie hospedero, por ejemplo: *Human Papillomavirus Type 1* (HPV-1), *Bovine Papillomavirus Type 6* (BPV-6). La nomenclatura de los PV a nivel de especie y superior está determinada por el Grupo de Estudio *Papillomaviridae* del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) [1], pero por debajo del nivel de especie, nombrar los tipos de PV es responsabilidad del Centro de Referencia Internacional de HPV o del Centro de Referencia de Papillomavirus Animal [6]. En el caso del HPV, si tras secuenciar el genoma del posible virus nuevo se confirma que se trata de un nuevo tipo (<10% de homología con otro tipo de HPV), se asigna un número único de tipo de HPV y se publica en la página del *International Papillomavirus Reference Center* (www.hpvcenter.se).

Actualmente la familia *Papillomaviridae* cuenta con 221 tipos de HPV reconocidos, que están agrupados en 5 de los 53 géneros que la conforman [15]: alfa (65 tipos), beta (54 tipos), gamma (98 tipos), mu (3 tipos) y nu (1 tipo) (Figura 3). Los géneros alfa y beta están conformados por los HPV con mayor relevancia clínica: alfa-papillomavirus contiene a los virus asociados con lesiones en mucosa oral y genital, mientras que el género beta incluye todos los tipos de HPV que preferentemente infectan la piel [1, 6, 16].

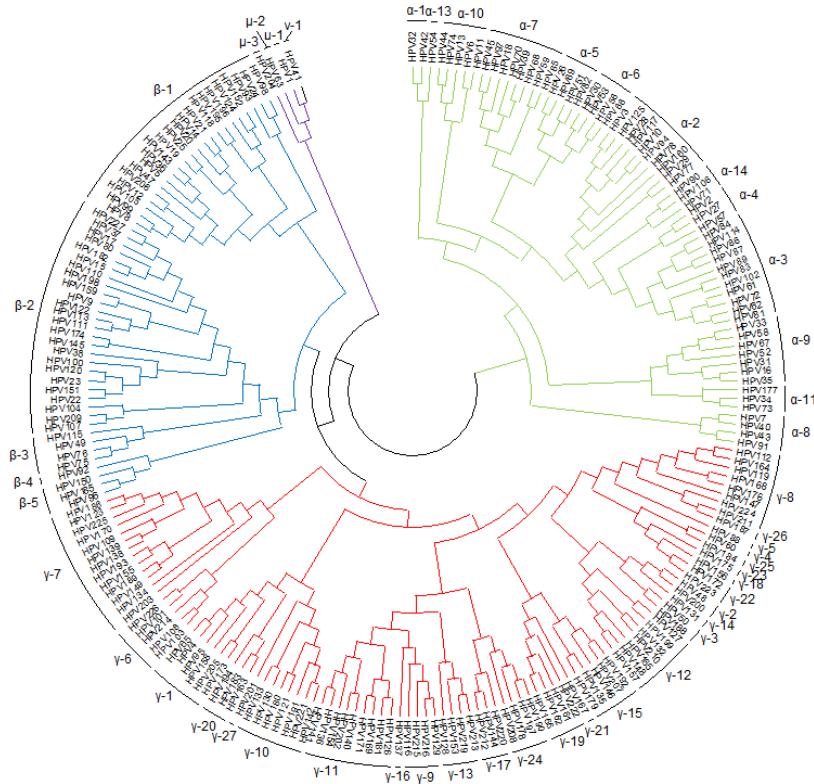


Figura 3. Árbol filogenético de los tipos de HPV reconocidos hasta 2018. Se muestran los géneros alfa (verde), beta (azul), gamma (rojo), mu (morado) y nu (negro) de HPV [17].

1.3 Infección por HPV

En el ser humano, la infección por HPV es considerada la ITS más común en el mundo: la mayoría de las mujeres y hombres sexualmente activos se infectarán por lo menos una vez a lo largo de sus vidas con algún tipo de HPV [18]. En Estados Unidos de América (EUA) se estima que alrededor de 79 millones de personas están infectadas, con 14 millones de casos nuevos cada año [19].

Los HPV tienen tropismo por epitelios escamosos estratificados del ser humano como la piel y la mucosa oral y/o del tracto ano-genital [16]. Tras infectar el tejido, el ciclo viral avanza a medida que las células epiteliales infectadas se diferencian, habiendo síntesis del genoma viral en las capas epiteliales intermedias y ensamblaje de viriones cerca de la superficie epitelial [16]. Si bien las infecciones por HPV suelen ser asintomáticas y autolimitadas, existen casos en que la infección puede causar lesiones proliferativas visibles (verrugas) o asociarse con el desarrollo de cáncer [18, 20].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido los padecimientos relacionados con el HPV como amenazas mundiales para la salud pública, al grado que declaró a los HPV-16 y HPV-18 como agentes cancerígenos para los humanos y ha reiterado la recomendación de incluir la vacuna contra HPV en los programas nacionales de inmunización [21, 22]. Al ser una ITS, los factores asociados con la infección esencialmente están relacionados a la conducta sexual, como: la edad de inicio de la vida sexual, al alto número de parejas sexuales a lo largo de la vida y al contacto sexual con individuos de alto riesgo [16, 23].

Dependiendo de su asociación con el desarrollo de neoplasias malignas, los tipos de HPV han sido clasificados como de alto y bajo riesgo. Dicha clasificación de los tipos de HPV es posible ya que entre los miembros de cada categoría la mayoría de los tipos comparten ancestros con propiedades biológicas y patológicas similares que giran alrededor de un mismo nicho ecológico [6]. Los tipos de HPV que causan lesiones hiperplásicas (verrugas) se les denomina de bajo riesgo, como lo son los HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 y 81 [24], mientras que los tipos de HPV que suelen ser encontrados en carcinomas o asociados a esta clase de lesiones se les llama de alto riesgo, pues se considera que promueven la progresión de la lesión inicial a cáncer [24]. Los tipos de HPV que pertenecen a esta categoría son 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82, destacándose la prevalencia de los HPV-16 y 18 [16, 24].

La infección incidente con un tipo de HPV de alto riesgo no es sinónimo de cáncer, de hecho, el principal factor de riesgo para la progresión hacia el cáncer es una infección persistente [25, 26]. En el proceso, una vez que el HPV de alto riesgo infecta las células, interfiere con su funcionamiento normal y provoca la división celular descontrolada [16]. Las células infectadas generalmente son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune, sin embargo, cuando esto no ocurre y transcurre el tiempo, pueden adquirir características anormales y crear una lesión que progrese a cáncer. Es preciso enfatizar que el HPV no causa cáncer directamente ya que es un proceso multietápico, pero los cambios que causa en las células infectadas pueden llevar a su inmortalización y transformación. Estos cambios se desarrollan muy lentamente y el cáncer puede no diagnosticarse hasta décadas después de que una persona se infectó con el virus [27].

La progresión a cáncer es una consecuencia poco frecuente de la infección por HPV [28], ya que la transformación celular y la replicación viral son mutuamente

excluyentes [1]. De hecho, a pesar de la alta prevalencia del virus, la mayoría de las personas eliminan la infección de forma espontánea [26, 29] y actualmente no hay forma de predecir quién tendrá solo una infección temporal y quién desarrollará cáncer. El cáncer cervicouterino (CC, del inglés *Cervical Cancer*) es el más conocido de los cánceres causados por el HPV y actualmente se sabe que la infección con HPV de alto riesgo es el factor etiológico más relevante en su desarrollo [16]. De igual forma, la infección por HPV también puede causar cáncer de vagina, vulva, pene, ano y orofaringe (OPC, del inglés *Oropharyngeal Cancer*) [30]. De estos seis tipos de cáncer asociados al HPV, el CC es el único con una prueba para detectarlo en etapas tempranas y hoy día es uno de los cánceres más prevenibles [30], mientras que los otros tipos de cáncer asociados a HPV suelen detectarse hasta que causan un deterioro en la salud (Figura 4).

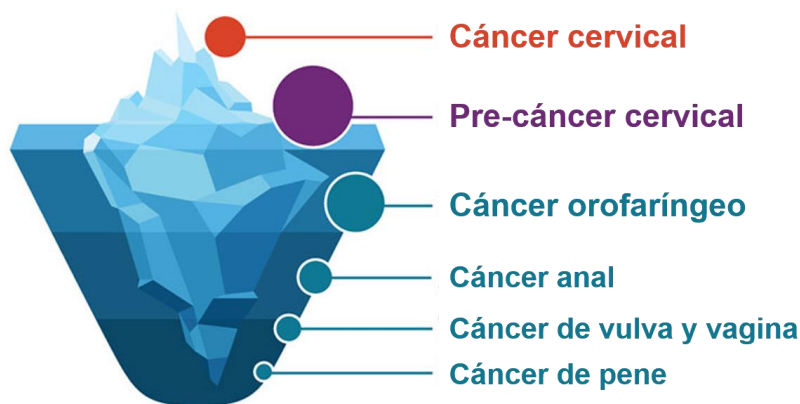


Figura 4. Esquema de los casos de cáncer atribuibles a HPV en EUA. Contrario al CC que cuenta con una prueba de detección temprana, otros tipos de cáncer asociados a la infección por HPV como el OPC, se detectan usualmente de forma tardía. Modificado de [31, 32].

La infección por HPV causa hasta el 4.5% (640,000 casos) de todos los casos nuevos de cáncer en todo el mundo, lo que representa el 29.5% de todos los cánceres relacionados con infecciones [33]. La carga mundial de CC sigue siendo mayor que la de otros cánceres atribuibles al HPV, sin embargo, en las últimas décadas se ha observado un aumento en la incidencia del OPC HPV+ en múltiples países [33-40].

Capítulo 2. Cáncer orofaríngeo (OPC)

El término “cáncer” engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales que proliferan y se diseminan de manera descontrolada [41]. El cáncer puede resultar de la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células en el cuerpo, por lo que hay más de cien tipos distintos que pueden variar significativamente en su comportamiento [42]. En la mayoría de los tipos de cáncer, la multiplicación anormal de células conlleva a la formación de masas, denominadas tumores, que pueden ser benignos o malignos, pero solo los tumores malignos se denominan cáncer y son peligrosos por su capacidad de invadir, realizar metástasis y destruir estructuras adyacentes [42].

Las células cancerosas poseen anomalías en los mecanismos que regulan su proliferación, diferenciación y supervivencia [42]. Esta serie de anomalías se acumulan por años, por lo que el desarrollo del cáncer es un proceso en el que las células se vuelven malignas gradualmente [43]. Para que una célula normal se transforme en cancerosa, se requieren cambios en múltiples genes, principalmente oncogenes y genes supresores de tumores. El inicio del tumor comienza cuando una sola célula mutada comienza a proliferar anormalmente como resultado de dicha alteración genética [43]. La progresión del tumor continúa a medida que ocurren mutaciones adicionales dentro de las células de la población tumoral, algunas de las cuales confieren ventajas a algunas células, lo cual conduce a un proceso de selección clonal que continúa durante todo el desarrollo del tumor [43]. La selección de células con capacidad progresivamente creciente de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis da como resultado tumores de crecimiento más rápido y cada vez más malignos. Las alteraciones esenciales en la fisiología celular que dictan colectivamente el crecimiento maligno son: menor dependencia de factores de crecimiento externos, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, promoción de la angiogénesis, invasión de tejidos y metástasis, alteración de las interacciones célula-célula y célula-matriz, diferenciación pobre, y cambios en la estructura y función de la membrana celular [42-44].

El cáncer de cabeza y cuello (HNC, del inglés *Head and Neck Cancers*) es un grupo heterogéneo de neoplasias que usualmente se desarrollan a partir de las células epiteliales escamosas dentro de la mucosa que recubre el tracto aerodigestivo superior

[45], por lo que recientemente este grupo de tumores también se ha denominado cáncer escamoso de las vías aerodigestivas superiores (CE-VADS) o carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, del inglés *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*). Este grupo de patologías incluyen tumores que comienzan en varios lugares de la cabeza y el cuello (sin incluir los cánceres cerebrales u oculares) como los senos paranasales, cavidad nasal, laringe, cavidad oral y faringe (Figura 5) [46]. Los sitios de origen más comunes de HNC son la cavidad oral y la orofaringe [21].

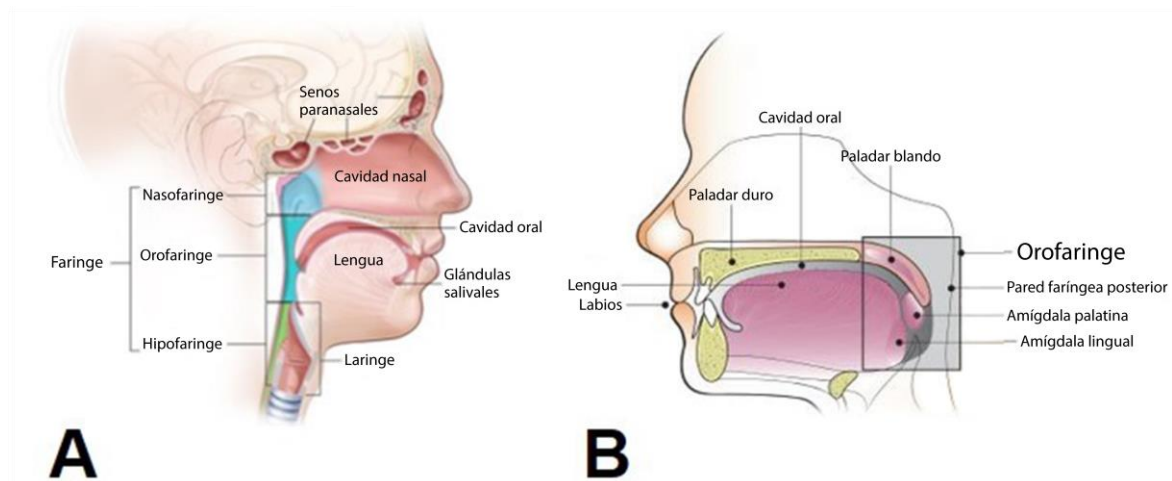


Figura 5. Vías aerodigestivas superiores. (A) El cuello se divide en dos sitios anatómicamente distintos a pesar de ser un espacio continuo: cavidad oral y faringe. Modificado de [47]. (B) Diagrama de la cavidad oral (abarca la mucosa labial y bucal, los dos tercios frontales de la lengua, la almohadilla retromolar, el piso de la boca, la encía y el paladar duro) y orofaringe (abarca las amígdalas palatinas y linguales, la tercera parte posterior de la lengua, el paladar blando y la pared faríngea posterior). Modificado de [46].

El HNC ocupa el sexto lugar mundial en prevalencia entre las neoplasias de todas las localizaciones [48]. Se estima que aproximadamente 650,000 nuevos casos al año son diagnosticados en todo el mundo, con mayor prevalencia en el sexo masculino [48]. Se estima que la incidencia de HNC representa el 4% de todos los casos de cáncer a nivel mundial [48], pero las cifras varían de un país a otro y existe una clara división entre regiones del mundo: si bien el HNC forma uno de los cánceres más comunes en los países del sur y sudeste asiático (India 18%, Pakistán 16%), sólo representan el 1%-6% de todos los cánceres en los países occidentales (EUA 4%, Brasil 5%) [48]. Por otra parte, el cáncer de cavidad oral es la forma predominante de HNC en los países del sudeste asiático, mientras que el OPC es el más común en el mundo occidental [48]. Estas

diferencias en el sitio de la enfermedad pueden estar relacionadas con los hábitos prevalentes en las regiones respectivas [49].

2.1 Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de HNC son el consumo excesivo de alcohol y tabaco [21, 47-52], ambos están clasificados en el grupo I de agentes carcinógenos de la IARC (siglas en inglés de *International Agency for Research on Cancer*), es decir, hay evidencia suficiente de que favorecen la aparición y desarrollo de cáncer en humanos. Tan sólo en productos de tabaco (para fumar o no) se han identificado más de 70 sustancias carcinogénicas, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, del inglés *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) y nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA, del inglés *Tobacco Specific Nitrosamines*) [53] que producen las mutaciones en el DNA usualmente encontradas en HNC [52]. Los efectos del alcohol son menos claros, pero su mecanismo de acción podría explicarse a través de su producto metabólico acetaldehído, que daña el DNA y atrapa el glutatión, que es un péptido antioxidante importante en la desintoxicación de carcinógenos. Además, el alcohol puede inducir estrés oxidativo a través del citocromo CYP2E1, lo que puede provocar una inflamación crónica de tejido [54]. Existe un riesgo aumentado de cáncer oral y faríngeo 20 veces mayor para los sujetos que abusan del tabaco, y un aumento de 5 veces para aquellos que abusan del alcohol; la combinación de ambos conlleva a un riesgo 50 veces mayor [53].

El número total de casos nuevos de HNC diagnosticados se ha mantenido estable a nivel mundial (con sus respectivas diferencias geográficas), sin embargo, en varios países se ha registrado una incidencia creciente de OPC en pacientes jóvenes (<60 años) sin relación con los factores clásicos de etilismo o tabaquismo [21, 55]. Estas inusuales tendencias demográficas y de perfil de los pacientes, llevaron a la exploración de otros factores de riesgo en el desarrollo de OPC, y varios estudios hechos a partir del análisis de muestras archivadas en distintos países, demostró que la infección de HPV con subtipos de alto riesgo era el factor responsable de las tendencias de OPC, tras observarse el aumento en la infección por este virus en las muestras a lo largo del tiempo [56-60]. Por lo tanto, en OPC existen dos vías moleculares diferentes de carcinogénesis, una cuyo principal factor de riesgo es la exposición a agentes carcinogénicos presentes en el tabaco y alcohol (tumores OPC HPV-) sin la participación de la infección por HPV, y

la otra inducida por la infección activa y persistente de HPV de alto riesgo (tumores OPC HPV+) [55] (Tabla 2). El patrón de expresión genética de ambos es distinto, y el cáncer parece ocurrir por la acumulación de cambios genéticos diferentes:

- a) Mutaciones en TP53, un gen supresor de tumores que induce el arresto del ciclo celular y promueve la apoptosis en respuesta a daño al DNA [61]. Se ha observado que los tumores HPV+ poseen TP53 silvestre en comparación con los HPV-, que albergan frecuentes mutaciones de TP53 y pérdida de heterocigosidad [62, 63].
- b) Diferencias en la expresión de p16, el producto polipeptídico del gen CDKN2A que funciona como regulador negativo de la progresión del ciclo celular al evitar la inactivación de pRb (proteína del retinoblastoma), un factor supresor de tumores [62], por lo que su malfuncionamiento conduce a la pérdida de control del punto de restricción en la fase G1 del ciclo celular y favorece la transformación celular [62]. En los tumores OPC HPV- la expresión de p16 se ve disminuida, lo cual se correlaciona con la metilación del promotor de p16 y la pérdida de heterocigosidad [62-64], mientras que los tumores OPC HPV+ poseen un promotor de p16 no metilado y hay sobreexpresión de dicha proteína [62, 64].
- c) Diferencias en la expresión del gen de ciclina D en 11q13, ya que su amplificación y sobreexpresión es una alteración común observada en OPC HPV- que lleva a la inactivación de pRb por complejos ciclina D-CDK4/6 y una rápida transición a la fase S [65]. Esta alteración genética no se observa en tumores HPV+ ya que la ciclina D se encuentra regulada a la baja debido a la sobreexpresión de p16 [62, 64].
- d) Diferencias en la expresión de otros genes, por ejemplo, los tumores HPV- sobreexpresan un conjunto pequeño de genes específicos del ciclo celular, incluidas las ciclinas D y A [62], a diferencia de los HPV+, que sobreexpresan un conjunto más grande, como la ciclina E2 (asociada a G1), la ciclina B1 (asociada a G2), SYCP2 (siglas en inglés de *Synaptonemal Complex Protein 2*), v-myb (proto-oncogen), RFC5 (siglas en inglés de *Replication Factor C Subunit 5*), y DNMT1 (siglas en inglés de *DNA Methyltransferase 1*); genes que promueven la replicación del DNA y la mitosis celular, incluido el antígeno PCNA (siglas en

inglés de *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), E2F, cdc2 (cdc, del inglés *Cell Division Control Protein*), cdc7 y MCM (siglas en inglés de *Minichromosome Maintenance*), lo que implica que los casos de cáncer HPV+ son más activos en la división celular [62, 64].

- e) El número total de aberraciones cromosómicas por tumor es significativamente menor en los tumores HPV+ [64]. El OPC HPV- se caracteriza por deleciones cromosómicas severas en 3p, 5q, 9p, 15q y 18q en comparación con los tumores HPV+, que presentan pérdidas cromosómicas ocasionales con bajos niveles de pérdida de heterocigosidad en 3p, 9p y 17p [63, 64]. Entre los genes supresores de tumores diana para estos *loci* están FHIT (siglas en inglés de *Fragile Histidine Triad*) en 3p14.3, CDKN2A (siglas en inglés de *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) en 9p21 y TP53 (siglas en inglés de *Tumor Protein 53*) en 17p13 [64]. Por otra parte, las pérdidas de 11q son más frecuentes en OPC HPV-, donde se encuentran varios genes de reparación del DNA, como ATM (siglas en inglés de *Ataxia Telangiectasia Mutated*) y CHEK1 (siglas en inglés de *Checkpoint Kinase 1*) [64]. Los tumores HPV- también se caracterizan por amplificaciones en 11q13; los genes candidatos en la región 11q13 adquirida, cuyos productos han demostrado estar sobreexpresados, incluyen CCND1 (ciclina D1), CTTN (cortactina) y FADD (siglas en inglés de *Fas Associated Via Death Domain*), lo que resulta en la desregulación del control del ciclo celular y la migración [64].

Aunado a su etiología y patrón de expresión genética, los casos OPC HPV+ y HPV- pueden identificarse como entidades tumorales distintas mediante sus características epidemiológicas: en comparación con HPV-, los pacientes con OPC HPV+ suelen ser hombres más jóvenes, de estatus socioeconómico más alto y tienen un mejor pronóstico de supervivencia a 5 años [21, 27, 45]. Cabe mencionar que, a pesar de que este cáncer es causado por dos mecanismos distintos, el estilo de vida que lleva a la infección con HPV y el consumo excesivo de tabaco y alcohol puede tener un efecto sinérgico [66]: el tabaco y alcohol se han identificado como factores de pronóstico negativo en pacientes con OPC HPV+ [55], aunque el grado de patogenia aún es desconocido [66].

Actualmente se estima que la fracción de OPC causados a nivel mundial por la infección con HPV es del 18-28%, siendo la mayoría causados por los factores de riesgo

clásicos (consumo excesivo de tabaco y alcohol) [27, 67, 68]. Sin embargo, el porcentaje de OPC HPV+ se eleva hasta 60% en países como EUA, Japón, Australia [68], República Checa, Suecia, Corea del Sur y Francia [21]. Entre los casos OPC HPV+, el HPV-16 está presente en el 80-90% [21, 33, 69] seguido por HPV-33 y HPV-18 [33, 50, 69]. La contribución relativa de otros subtipos de alto riesgo existe, pero no es significativa. A pesar de que la infección con HPV no es una causa necesaria ni suficiente para el desarrollo de OPC, es claro que el HPV juega un papel importante en la patogenia de este cáncer, cuya principal área afectada son las amígdalas y cuyo número de casos va en ascenso [21]. La epidemiología del papel del HPV en el desarrollo de OPC, su mecanismo de carcinogénesis y las implicaciones del diagnóstico y tratamiento de esta patología se revisará con mayor detalle en el siguiente capítulo.

Tabla 2. Principales diferencias entre el OPC HPV+ y HPV-

	OPC HPV+	OPC HPV-
Principales factores de riesgo para el desarrollo de OPC	Infección persistente con subtipos de alto riesgo de HPV	Consumo excesivo de alcohol y tabaco
Expresión genética	TP53 silvestre, expresión de ciclina D disminuida, sobreexpresión de p16 y de un gran conjunto de genes específicos del ciclo celular	TP53 mutado, sobreexpresión de ciclina D y A y expresión de p16 disminuida
Aberraciones cromosómicas por tumor	Pérdidas cromosómicas ocasionales con bajos niveles de pérdida de heterocigosidad en 3p, 9p y 17p	Deleciones cromosómicas severas en 3p, 5q, 9p, 15q y 18q
Características epidemiológicas	Hombres <60 años, estatus socioeconómico alto, mejor pronóstico de supervivencia a 5 años	Hombres >60 años, peor pronóstico de supervivencia a 5 años

Fuentes: [52-69]

Capítulo 3. Asociación entre la infección por HPV y el desarrollo de cáncer orofaríngeo

3.1 Epidemiología

Actualmente, los casos de OPC relacionados con el tabaquismo y el abuso del alcohol están disminuyendo, mientras que los atribuibles a la infección con subtipos de alto riesgo de HPV van al alza en múltiples países [27, 34, 38, 68, 70-74]. Como se mencionó, el HPV y su correlación con el OPC varía según la región geográfica, presentándose una mayor incidencia y prevalencia entre la población caucásica en el mundo occidental especialmente de Norteamérica y el Norte de Europa [60], a comparación con el mundo oriental [27, 60, 74-77]. El impacto más grande se ha visto en EUA donde el OPC es ahora el cáncer asociado a HPV más común, sobrepasando al CC en 2018 [78].

La infección por HPV es considerada la ITS más común a nivel mundial [1], por lo que la mayoría de las mujeres y hombres sexualmente activos se infectarán por lo menos una vez a lo largo de sus vidas. En EUA, se estima que aproximadamente 10% de los hombres y 3.6% de mujeres tienen una infección oral por HPV [79] y que 7 de cada 100 hombres y 1 de cada 100 mujeres portan tipos de HPV potencialmente cancerígenos en la boca [80]. El HPV-16 está particularmente asociado al OPC, con una contribución relativa de 80-90%, seguido por HPV-33 (1.4-6.4%) y HPV-18 (0.7-4.7%) [21, 33, 50, 69]. La contribución relativa de otros subtipos de alto riesgo como el HPV-31, 45, 52, 58, existe en todo el mundo pero no es significativa (<2%) [33], además que la prevalencia y distribución de los tipos de HPV varía por país [81].

Los pacientes con OPC HPV+ suelen ser hombres caucásicos [27, 34, 38, 68, 70-73] menores de 60 años [27, 36, 82], de nivel socioeconómico alto [83] en países económicamente desarrollados, especialmente en Norteamérica y el Norte de Europa [48, 60]. Estos pacientes generalmente no poseen un amplio historial de abuso de alcohol o tabaco [21, 55, 83], sino que su principal factor de riesgo son conductas sexuales que facilitan la transmisión del HPV [27, 45, 69]. Es importante resaltar la diferencia en la incidencia de OPC HPV+ entre sexos, pues a pesar de que tanto hombres como mujeres están involucrados en la cadena epidemiológica de la infección, la prevalencia de OPC asociado a HPV es mayor en hombres, alcanzando proporciones de 4:1 respecto a las

mujeres [79]. El mejor entendimiento de la relación entre la prevalencia de infección oral por HPV y la incidencia de OPC se ha dado en EUA, donde se sabe que los hombres tienen un mayor número de parejas sexuales que las mujeres [79], sin embargo, la conducta sexual (que es un rasgo modificable) no es la única explicación para la diferencia en prevalencia de OPC HPV+ entre sexos, sino que han surgido las siguientes hipótesis:

a) Mayor prevalencia de infecciones orales por HPV-16 en hombres.

El patrón de edad en la prevalencia de HPV oral es similar entre hombres y mujeres de población general (Figura 6), con una prevalencia máxima observada en individuos de 30-34 años y nuevamente entre 60-64 años, sin embargo, la prevalencia absoluta del HPV oral (cualquier tipo) es 3 veces mayor en hombres que en mujeres [79], y la infección oral prevalente con HPV-16 es 6 veces más común en hombres que en mujeres [80].

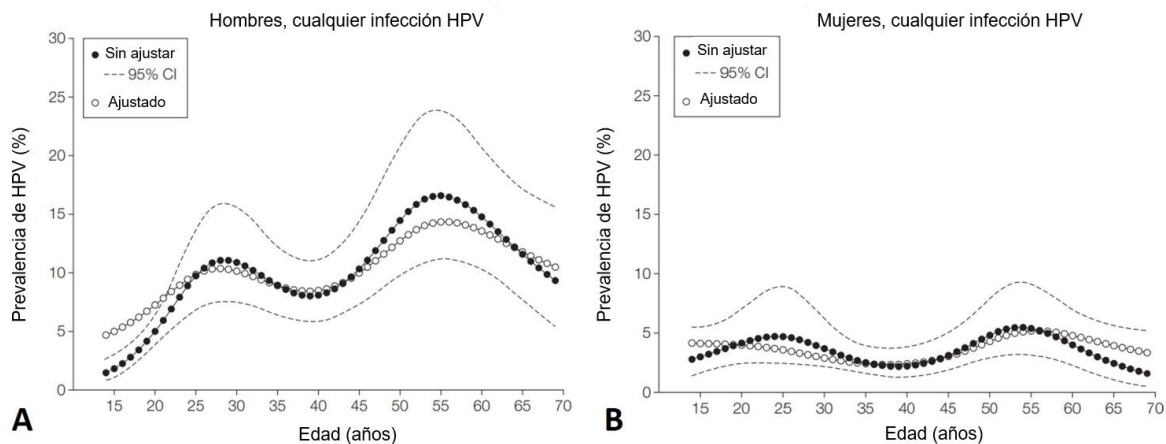


Figura 6. Patrón de edad de la prevalencia de HPV oral en población estadounidense (14-69 años) (A) Hombres (B) Mujeres. La curva con etiquetas sin relleno es el modelo ajustado para sexo, población, estado civil, número de parejas sexuales y hábito tabáquico mientras que las líneas discontinuas representan el I.C. del 95%. Se observa una distribución bimodal parecida, pero sólo fue significativa en hombres. Modificado de [79].

En hombres y mujeres, la mayoría de las infecciones orales recientemente adquiridas con tipos oncogénicos de HPV son eliminadas en 1 año [84, 85]. Sin embargo, el 40% de las infecciones orales en hombres por HPV-16 se sabe persisten por más de 4 años [85], con el tiempo de persistencia aumentando significativamente con la edad [74], lo que sugiere que el aumento de la

prevalencia de HPV-16 oral detectado en los hombres en edades más avanzadas probablemente se deba a la persistencia de las infecciones y no a una mayor adquisición [86].

b) Seroconversión reducida en hombres.

Sólo una fracción de hombres y mujeres presentan una respuesta de anticuerpos detectable 9-24 meses después de la infección genital por HPV [87, 88], y a pesar de la mayor prevalencia genital y oral de DNA del HPV observada en los hombres [68], las mujeres (independientemente de la población estudiada) demuestran una mayor seroconversión al HPV-16 [89-98] (Figura 7).

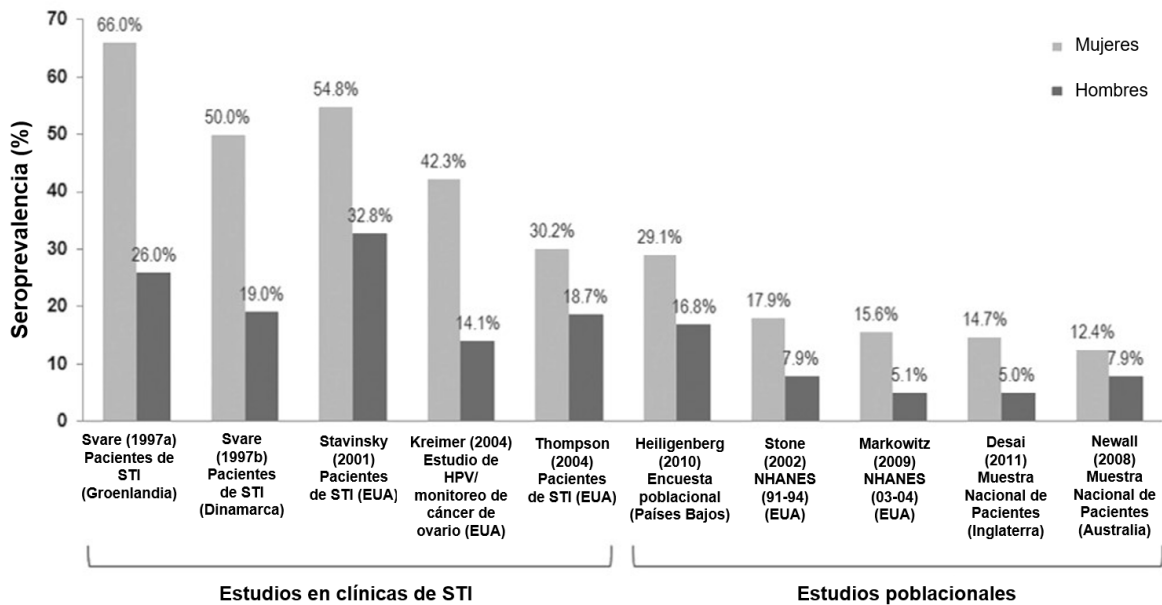


Figura 7. Diferencia en seroconversión tras la infección genital por HPV-16 en hombres y mujeres. La prevalencia de anticuerpos anti-cápside (anti-L1) en mujeres es significativamente mayor que en hombres en diversas partes del mundo (incluso en mujeres provenientes de población general). Modificado de [68].

En las mujeres no vacunadas con títulos altos de anticuerpos anti-HPV-16, hubo una reducción del 50% en el riesgo contra futuras infecciones genitales por HPV-16 [99, 100], mientras que la seropositividad al HPV-16 en hombres no vacunados no se asoció con un riesgo reducido de infección futura por HPV-16, independientemente del nivel de anticuerpos [101]. La seroconversión reducida podría explicar por qué el riesgo de los hombres de contraer una nueva infección

oral por HPV se mantiene constante a lo largo de la vida [27], mientras que en las mujeres se observa una disminución en la detección del HPV en la cavidad oral a través de los años desde la primera actividad sexual [84]. Este punto también explicaría la diferencia en la prevalencia de HPV oral de alto riesgo de acuerdo al número de parejas sexuales orales descrita en EUA, donde el aumento fue tres veces mayor para hombres que para mujeres, con una meseta en los hombres con aproximadamente 15 parejas sexuales orales en contraste con aproximadamente cinco parejas en las mujeres (Figura 8), es decir, la prevalencia de la infección oral por HPV continúa aumentando en los hombres con más de cinco parejas, pero no en las mujeres [27].

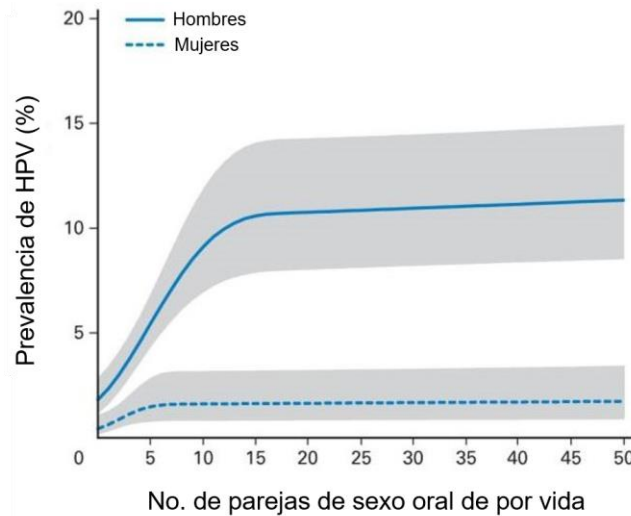


Figura 8. Asociación entre el número de parejas sexuales orales de por vida con la prevalencia de HPV oral en hombres y mujeres estadounidenses de 14 a 69 años. A partir de 5 parejas sexuales, la prevalencia de HPV oral de alto riesgo por pareja sexual se mantiene constante en las mujeres (línea discontinua), mientras que en los hombres (línea continua) la prevalencia sigue aumentando hasta las 15 parejas sexuales orales. El área sombreada representa el I.C. del 95%. Modificado de [27].

Adicionalmente, es posible que, a través del sexo genital convencional, las mujeres adquieran la infección por HPV al principio de sus experiencias sexuales y seroconviertan con poca exposición, mientras que los hombres requieren un mayor número de parejas sexuales. La protección adquirida tras la infección genital puede no necesariamente afectar la adquisición de nuevas infecciones orales por HPV, pero puede promover su eliminación, evitando así la progresión al cáncer [102].

La seroconversión reducida podría estar asociada con características que retrasan o interfieren con la presentación de antígenos y el montaje de la respuesta inmune. Al respecto se ha propuesto que, aunque el pene es un sitio anatómico con una alta prevalencia de DNA del HPV, la queratinización de este tejido escamoso y del prepucio los asemejan inmunológicamente a la piel, por lo que los tipos de HPV oncogénicos (que infectan preferentemente epitelio no queratinizado) tienen una baja tasa de replicación en estos tejidos [103]. Sin embargo, en los genitales masculinos la uretra es un tejido permisivo a la infección por HPV al ser epitelio estratificado no queratinizado, estableciéndose infecciones virales productivas y por lo tanto transmisibles a la pareja sexual [103]. Otro aspecto importante es que las infecciones en genitales masculinos son más transitorias que en genitales femeninos [12]: 4-7 meses y 8-12 meses, respectivamente [103]. Al mismo tiempo, a pesar de la alta frecuencia de detección de DNA de HPV en los genitales masculinos externos, la producción de viriones no es eficiente por el grado de diferenciación del tejido, la respuesta inmune y descamación de la zona [103], lo que posiblemente evita que se monte una respuesta serológica anti-cápside satisfactoria que proteja contra infecciones posteriores de HPV.

c) Mayor transmisión de HPV de mujer a hombre.

La dinámica de transmisión del HPV depende de factores virales y del huésped, tales como la susceptibilidad, número de contactos por unidad de tiempo, la probabilidad de transmisión y la duración del periodo infeccioso [104]. A pesar de que no se reconoce como un factor de riesgo para el OPC HPV+, vale la pena mencionar que las tasas de transmisión del HPV por sexo oral difieren según el sexo de la pareja, con una mayor transmisión de mujer a hombre en comparación con la de hombre a mujer [68]. Las parejas femeninas de pacientes con OPC HPV+ no parecen tener una mayor prevalencia de infección oral por HPV en comparación con la población femenina general de la misma edad (1.2% vs. 1.3%) [82], mientras que realizar sexo oral a una mujer más de una vez por semana se ha asociado con un riesgo mayor de contraer una infección oral por HPV [105]. El aumento en la probabilidad de transmisión de la infección de mujer a hombre se relaciona con la resistencia y duración de la infección en el tejido: las células

epiteliales de la piel del pene son más resistentes a la infección por HPV en comparación el epitelio cervical (donde hay altos niveles de replicación del virus) y a que la duración de la infección por HPV es más corta en hombres que en mujeres [12, 68, 103].

Al ser una ITS, la principal vía de transmisión del HPV es por contacto con la piel y mucosas de una pareja sexual infectada [79, 106]. A pesar de que la transmisión orofaríngea del virus sigue sin estar totalmente descrita, el sexo oral puede provocar la propagación de la infección desde la mucosa genital a la cavidad oral [106] y evidencia de la asociación entre el comportamiento sexual oral y el riesgo de adquirir una infección oral incidente y/o persistente por HPV existe y continúa emergiendo [105, 107-112], además, el comportamiento sexual oral se reporta como el principal predictor de infección oral por HPV-16 [113]. Sin embargo, también se ha informado que cualquier actividad sexual, no solo el sexo oral, puede estar asociada con la detección oral del HPV [79, 84, 113, 114], esto incluye relaciones sexuales vaginales o anales y autoinoculación [80, 106, 115, 116]. Además de la transmisión horizontal clásica durante la vida sexual, existe una transmisión vertical durante el periodo prenatal en aproximadamente el 20% de los casos, habiéndose detectado DNA del HPV en líquido amniótico, membranas fetales, cordón umbilical y placenta [106, 117].

Al transmitirse por contacto sexual en la mayoría de los casos [79, 106], los factores de riesgo asociados con la infección por HPV esencialmente están relacionados con prácticas sexuales de los individuos que facilitan la transmisión del HPV como:

- a) Edad temprana de inicio de la vida sexual [83, 106, 118]. Se ha relacionado con el aumento del promedio de parejas sexuales de por vida [55] y al aumento de los comportamientos sexuales orales [27].
- b) Diferencias de edad con la pareja sexual [119]. Se ha relacionado con la baja aceptación del uso de condón por parte de parejas sexuales mayores [120] y a la mayor detección y persistencia de HPV en hombres mayores [27].
- c) Alto número de parejas sexuales a lo largo de la vida [78, 83, 106]. Incluye contacto sexual con individuos de alto riesgo o participación en relaciones no monógamas [12, 106, 118]. El aumento del riesgo se debe a la exposición

incrementada. En general, los hombres tienen más parejas sexuales que las mujeres, por lo que esta conducta contribuye a explicar la mayor prevalencia de OPC en hombres (4:1) [79]. El número de parejas sexuales orales a lo largo de la vida parece ser la medida conductual más fuerte, consistente y específicamente asociada con OPC HPV+ [74, 121].

- d) Práctica de relaciones sexuales orales. Aunque cualquier actividad sexual (no solo el sexo oral) puede estar relacionada con la detección oral del HPV [113, 114], existe una fuerte asociación entre el comportamiento sexual oral y la infección oral prevalente por HPV [105, 107-112]. El comportamiento sexual oral difiere drásticamente según la región geográfica, el género, el grupo de edad y la población [113, 121], lo cual podría explicar las diferencias epidemiológicas observadas en la infección oral por HPV entre los distintos grupos. En particular, la proporción de hombres y mujeres con antecedentes de sexo oral ha aumentado significativamente en los grupos más jóvenes en comparación con los de mayor edad [121].
- e) Uso de condón [118, 119]. La efectividad del uso del condón para prevenir la infección por HPV ha sido inconsistente hasta ahora, pues algunos estudios respaldan el papel del condón como barrera contra la exposición al HPV [119, 122], mientras que otros afirman que el uso de condón no parece proteger adecuadamente contra el virus, ya que puede transmitirse a través del contacto con cualquier sitio infectado que no esté cubierto [106, 123, 124].
- f) Historia previa de ITS [118, 119]. El HPV es una ITS muy común, pero entre individuos con historia previa de otras ITS por ejemplo chlamydia, gonorrea, HIV (siglas en inglés de *Human Immunodeficiency Virus*), HCV (siglas en inglés de *Hepatitis C Virus*) [125-127]) se relaciona con prácticas sexuales de riesgo y con sistemas inmunitarios susceptibles [128, 129]. Cabe resaltar la relación entre HPV-HIV, pues debido al papel crítico del sistema inmune del huésped en la eliminación de la infección por HPV, la infección por HIV se ha correlacionado con la prevalencia de infecciones persistentes por HPV [126].
- g) Persistencia de la infección [84]. La infección oral persistente por HPV de alto riesgo es el principal factor de riesgo para la progresión a OPC HPV+ [21, 74, 84].

Algunos determinantes que han sido asociados a la progresión de una infección persistente a OPC HPV+ son el tipo viral, subvariantes de los HPV de alto riesgo, integración del genoma viral al genoma celular y carga viral [52, 130-132].

Por lo general, después de infectarse con HPV se necesitan varios años para que se desarrolle el cáncer: para el CC, el periodo de latencia se ha estimado en 20-30 años al comparar la edad media en la prevalencia máxima de la infección con la edad media en el momento del diagnóstico [27, 133]. Tomando esta guía para OPC HPV+, un estudio en EUA estimó el periodo de latencia promedio en 10-30 años suponiendo que ambos picos de prevalencia contribuyen al riesgo de OPC (Figura 9), aunque es sabido que la infección por HPV en hombres aumenta en prevalencia conforme mayor es la edad [27], por lo que es factible que el segundo pico tenga mayor relevancia en la patogenia en hombres y que el OPC HPV+ tarde sólo una década en desarrollarse.

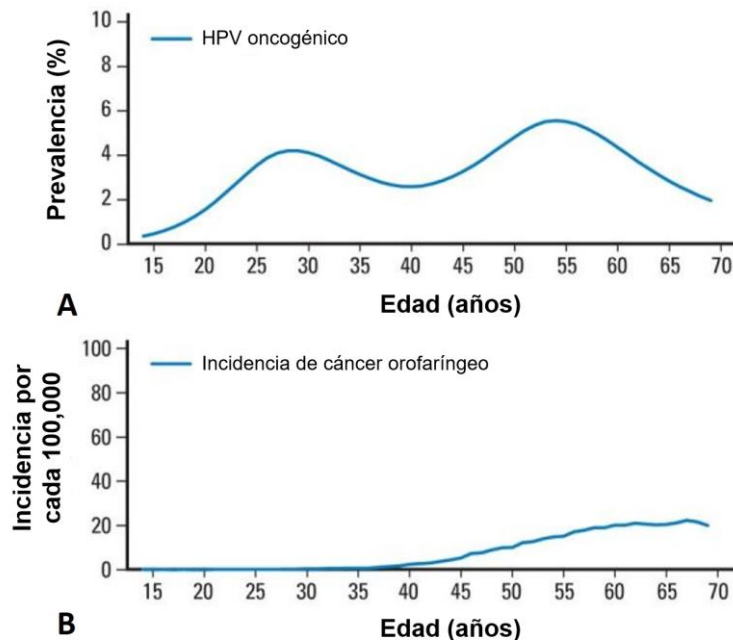


Figura 9. Prevalencia oral de HPV de alto riesgo e incidencia de OPC en la población de EUA en función de la edad. (A) Prevalencia oral de HPV de alto riesgo en la población de EUA en función de la edad. (B) Incidencia de OPC en función de la edad. Modificado de [27]. La prevalencia de infección oral por tipos oncogénicos del HPV alcanza su punto máximo a las edades de 25 a 30 años y de 55 a 60 años, y la edad media en el momento del diagnóstico de OPC es de 63 años [134] (58 años para OPC HPV+ [56]).

A pesar de la alta incidencia de la infección por HPV, la mayoría de los individuos inmunocompetentes son capaces de eliminar la infección sin manifestaciones clínicas

debido al desarrollo gradual de una respuesta inmune contra el HPV [87, 88, 135]. La infección por HPV con o sin tratamiento puede variar desde regresión espontánea hasta cáncer [11], y al día de hoy no hay manera de saber qué persona desarrollará cuál. Para comprender los diferentes resultados de la infección, se revisará a continuación la estructura del genoma del HPV y sus patrones de expresión en el epitelio durante la infección.

3.2 Historia natural de la infección

La mayor parte del conocimiento sobre la epidemiología del HPV y su mecanismo de infección se relaciona con su estudio en el cérvix, y aunque la adquisición de una infección oral por HPV oncogénico es menos frecuente en comparación con la genital [85], se sabe que el virus infecta más frecuentemente la orofaringe, especialmente las amígdalas (palatinas, faríngea y lingual) que otros sitios en la cabeza y el cuello [60, 136]. La susceptibilidad de las amígdalas a la infección por HPV se ha sugerido puede deberse a:

- El carácter discontinuo del epitelio de las criptas de las amígdalas, que facilita la entrada del virus sin el trauma descrito en el CC (Figura 10) [137-142].
- La exposición de la superficie extensa de células epiteliales basales en las criptas de las amígdalas, que facilita la interacción con el HPV y la creación de un reservorio viral amplio [139].
- Ser tejido mucoso de transición [62, 139], susceptibilidad compartida entre las amígdalas y el cérvix, debido a la interrupción de la barrera epitelial de ambos tejidos, siendo la yuxtaposición entre las células epiteliales escamosas y el tejido linfático en las amígdalas, y el empalme escamoso-columnar en el cuello uterino [143, 144].
- El tejido linfoide en las amígdalas puede favorecer la infección persistente por HPV debido a que el epitelio de la cripta tiene una alta expresión de PD-L1 (siglas en inglés de *Programmed Death-ligand 1*) que puede suprimir las respuestas inmunológicas mediadas por células T [139, 140, 145].

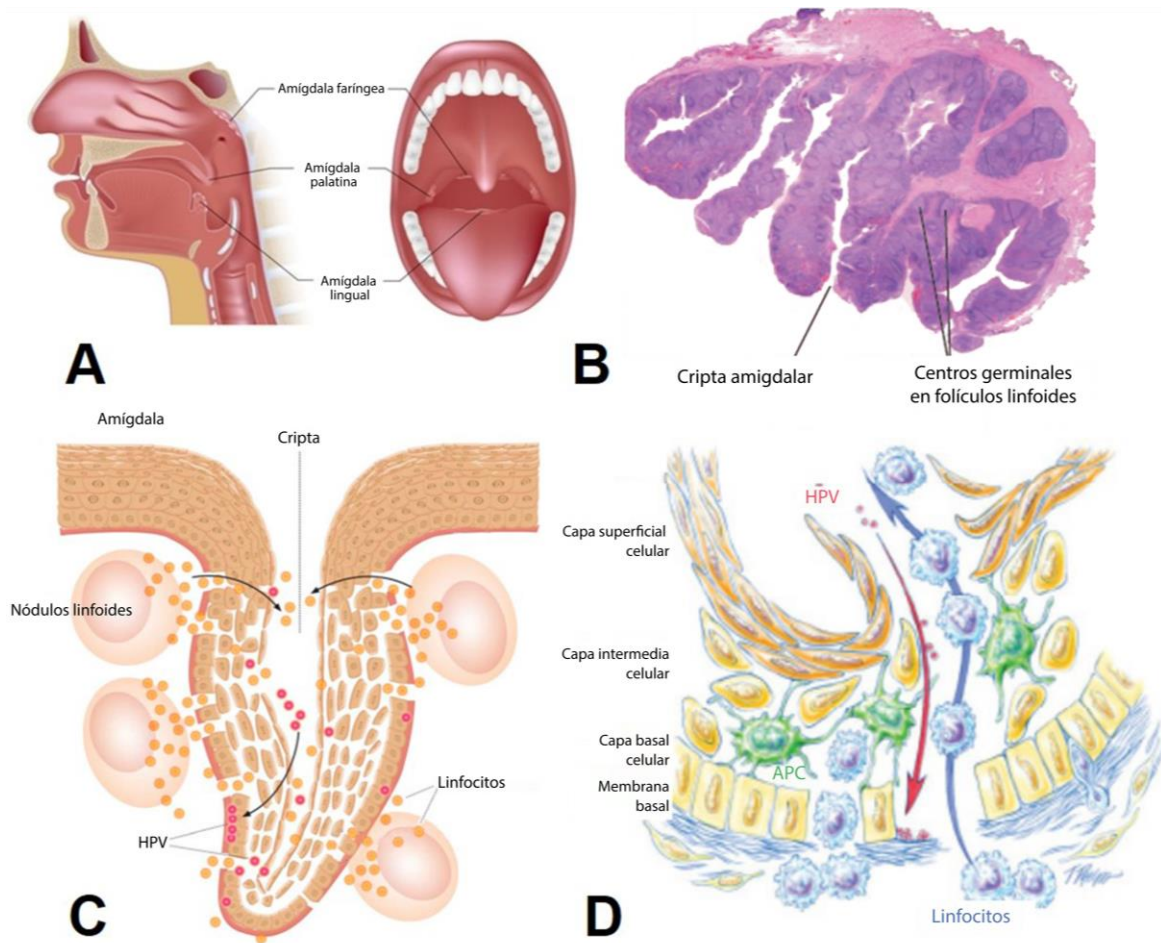


Figura 10. Amígdalas y criptas amigdalares. (A) Esquema de la ubicación de las amígdalas palatinas, faríngea y lingual, modificado de [146]. (B) Corte histológico de amígdala palatina (10x), modificado de [147]. Se observan invaginaciones profundas (criptas) que aumentan el área total de superficie para fomentar la captura de antígenos que ingresan al tracto aerodigestivo superior [140, 141]. Las interacciones entre las células B y las células T en el epitelio contribuyen a la primera línea de defensa en la orofaringe, y la presencia de células B de memoria (centros germinales) contribuye a la respuesta de anticuerpos [148]. (C) y (D) Representación de la cripta amigdalare y el tráfico de células inmunes y HPV. Las criptas de las amígdalas constan de un epitelio reticular interrumpido diseñado para facilitar el tráfico de antígenos, linfocitos y células presentadoras de antígeno, esta pérdida de integridad estructural deja la membrana basal expuesta a las partículas virales, modificado de [137-139, 141].

El genoma del HPV consiste en una molécula de DNA circular de doble cadena de 6.8-8 kbp [149] que se puede dividir en tres regiones funcionalmente distintas: la LCR, la región de expresión temprana y la región tardía. La LCR solo contiene sitios de unión para factores de transcripción virales y celulares, desempeñando un papel regulador en la transcripción y replicación del genoma viral en la célula hospedera [106]. El HPV contiene 8 ORFs (Figura 11 y 12), que codifican para funciones tempranas (E) o tardías (L) [149].

La región E codifica proteínas expresadas en las fases iniciales del ciclo viral por lo que son las únicas producidas en las capas inferiores del epitelio y están involucradas en la replicación viral (E1), la activación o la represión del DNA viral (E2), promoción de la proliferación celular (E5, E6 y E7) y liberación de viriones (E4) [20, 149, 150]. La región tardía codifica dos proteínas (L1 y L2) que conforman la cápside [1, 20, 149, 150] y se expresan durante las fases finales del ciclo viral en las células escamosas diferenciadas que se encuentran en la capa superficial del epitelio [106].

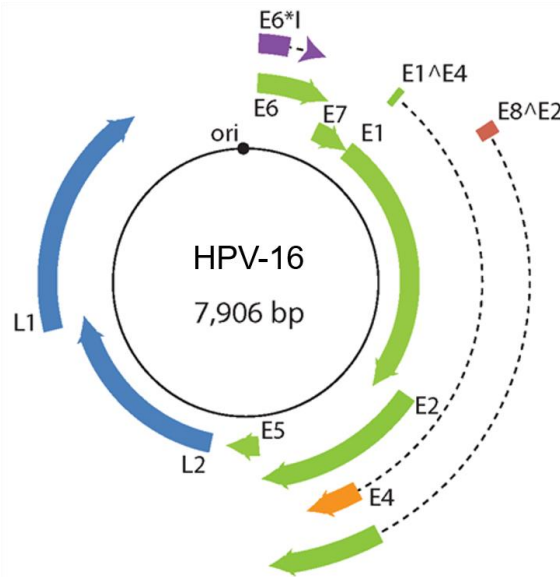


Figura 11. Genoma de HPV-16. Se observan los ORF tempranos E1, E2, E4, E5, E6 and E7, y los ORF tardíos L1 y L2. Las líneas punteadas representan secuencias de intrones. El círculo negro representa el origen viral de replicación (*ori*). Se muestra el ORF de E8, pero no existe evidencia que asocie dicho ORF con una proteína viral. Modificado de [1].

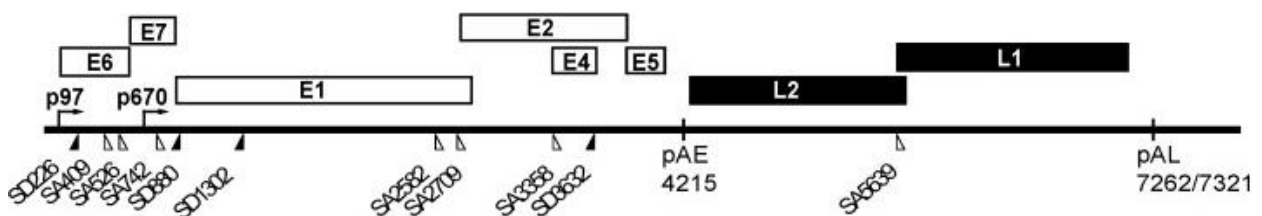


Figura 12. Esquema linealizado del genoma de HPV-16. Se muestran los ORF tempranos (E) y tardíos (L), los promotores p97 y p670 y las señales de poliadenilación temprana (pAE) y tardía (pAL). Los triángulos negros representan los sitios de empalme 5' y los triángulos blancos representan los sitios de empalme 3'. La LCR no se muestra, pero abarca desde el final de L1 hasta el inicio de E6. Modificado de [151].

La síntesis de DNA viral y la expresión secuencial de las diferentes proteínas del HPV depende del estado de diferenciación del queratinocito infectado [106, 152, 153]. La infección inicia en células basales no diferenciadas y termina con la generación de partículas virales maduras en queratinocitos diferenciados en los estratos epiteliales superiores [152]. En las siguientes secciones se describirán los cambios en los queratinocitos que crean un microambiente adecuado para la replicación productiva. También se describirá la estructura y funciones de las proteínas de HPV de alto riesgo responsables de la transformación de la célula permisiva. Dicha descripción se hará desde un enfoque para el HPV-16, el genotipo más relevante para el OPC [154].

3.2.1 Ciclo viral

Después de la entrada a la célula hospedera, se distinguen 3 fases en el ciclo del HPV: eventos tempranos, amplificación del genoma viral y producción de viriones (Figura 13). En las lesiones productivas, el ciclo infeccioso del HPV está vinculado a la diferenciación del queratinocito infectado y la expresión de los genes virales se encuentra regulada, de modo que las proteínas se expresan en un orden definido y en cantidades controladas conforme la célula infectada se diferencia al moverse hacia la superficie epitelial [2, 11, 139]. La infección inicial por el HPV ocurre en queratinocitos basales no diferenciados [152], mismos que se dividen continuamente para proporcionar células para la región suprabasal del epitelio [106]: tras la división de la célula basal, una de las células hijas se diferencia a medida que migra a través del epitelio hasta que se descama de la superficie, lo que da como resultado que la progenie de cada célula basal genere un volumen de tejido significativo [11]. Por lo tanto, al infectar las células basales que se están dividiendo continuamente, el HPV asegura un reservorio de células infectadas y puede establecer infecciones persistentes en las que el genoma viral se replica junto con el DNA del hospedero [106, 155].

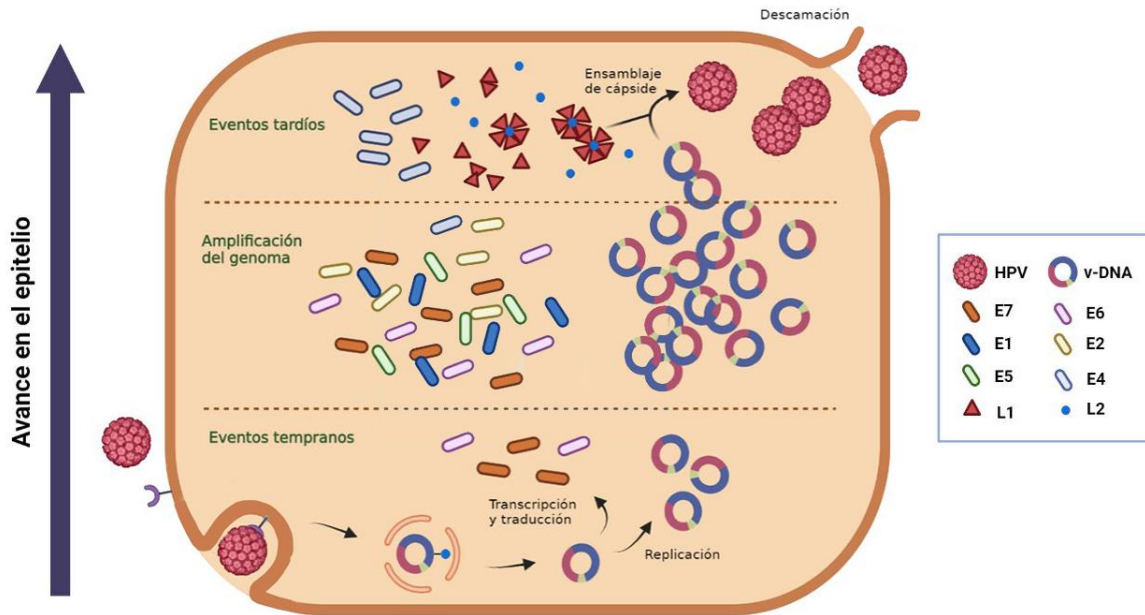


Figura 13. Esquema de las 3 fases en el ciclo productivo del HPV. Figura de Katia Jácome e Hiram Moreno, Biorender, 2021, construida con información de las fuentes [1, 2, 11, 12, 16, 103, 106, 139, 143, 152-156, 159, 163, 167-170].

Eventos tempranos

El HPV accede a los queratinocitos basales por la exposición resultante de microabrasiones durante el contacto sexual o por el aspecto discontinuo propio del epitelio en la orofaringe [139]. La interacción de la cápside del virión con los receptores celulares está mediada por las proteínas L1 y L2, que a su vez promueven la internalización mediante un proceso similar a la macropinocitosis [156]. Después, el virión se transporta desde endosomas tempranos hasta endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares que facilitan el desmontaje de la cápside. Durante este proceso, el DNA viral (vDNA) permanece unido a L2. El complejo L2-vDNA transita a la red trans-Golgi, permaneciendo allí hasta el inicio de la mitosis [1]. Durante la mitosis, después de la disgregación de la membrana nuclear, el genoma viral puede asociarse con cuerpos nucleares ND10 [156].

Después de acceder al núcleo de los queratinocitos basales, el genoma del HPV se establece como un elemento extracromosómico que se replica siguiendo el ritmo de la división celular, estableciendo un nivel bajo de episomas virales (50-100 copias/célula) [143]. También se inicia un bajo nivel de expresión de E6 y E7 (E7 es la primera proteína que se detecta) [103] debido a factores de transcripción de las células basales que interactúan con el promotor temprano (p97) en la LCR [2, 12, 153, 157]. La transcripción

de estas dos proteínas conduce a una mayor proliferación y retrasa la diferenciación de las células epiteliales resultantes [106]. Esta fase inicial representa el estado latente de la infección que implica una baja expresión viral y se considera un mecanismo para evitar la detección por el sistema inmune, promoviendo el mantenimiento del genoma viral y la proliferación de las células epiteliales basales [11, 16, 142]. A medida que las células basales experimentan su ciclo, un subconjunto de células hijas sale de la membrana basal para estratificarse y diferenciarse a medida que migran a través del epitelio hasta que se descaman de la superficie [158]. Para garantizar la segregación de los episomas hacia las células hijas, el HPV utiliza los cromosomas mitóticos del hospedero como vehículo [1, 155].

Tras el inicio de la diferenciación en las células hijas infectadas, se activa la etapa productiva del ciclo infeccioso del HPV [11]. Si bien los HPV de bajo riesgo comienzan la replicación en las células basales que aún están proliferando, esta fase en HPV de alto riesgo (como el HPV-16) se limita a las células que han salido del ciclo celular y no sintetizan DNA [159]. Por lo anterior, el HPV de alto riesgo debe desacoplar la replicación y la diferenciación celular [1] mediante la expresión de E6 y E7 desde la capa basal del epitelio [152]. Al respecto, se ha demostrado que las proteínas E6 y E7 juegan un papel clave en el reingreso al ciclo celular [152] y en usurpar el entorno celular para permitir la replicación viral [1]. El resultado es una mayor proliferación de las células basales y suprabasales infectadas [149] y la expresión de genes necesarios para la transición G1/S y la síntesis de DNA [160], lo que admite la amplificación del genoma viral en células no permisivas [141, 161, 162].

Mientras que la célula infectada migra hacia las capas intermedias del epitelio y se diferencia, además de E6 y E7, se expresa E5, proteína que complementa las funciones de E6 y E7 al modular la proliferación celular [2]. También se expresan las proteínas E1 y E2 [2, 153] para activar y limitar la replicación del genoma viral [1], manteniendo un número de copias bajo y constante en las células proliferantes [1, 106]. En conjunto, E6, E7, E5, E1 y E2 permiten el mantenimiento del genoma viral (Figura 13 y 14) [11].

Amplificación del genoma

La etapa productiva del ciclo viral ocurre en las capas epiteliales media y superior [2], de manera que conforme las células infectadas migran hacia capas superficiales y continúan

su programa de diferenciación, el número de copias del DNA viral y la expresión de los genes virales aumentan [1, 12, 106]. Durante esta etapa, hay un cambio hacia la amplificación a gran escala de DNA viral [1, 163] debido a la activación del promotor dependiente de diferenciación (p670) [164, 165]. Una vez que la replicación viral en altos niveles ha terminado, la concentración de la proteína E2 aumenta, reprimiendo la expresión de E6 y E7 para continuar con el proceso de diferenciación de la célula y la eventual generación de viriones [166]. Además, el inicio de la amplificación del genoma viral a gran escala coincide con el inicio de la expresión de E4, que marca el comienzo de los eventos para la producción de viriones (Figura 13 y 14) [159].

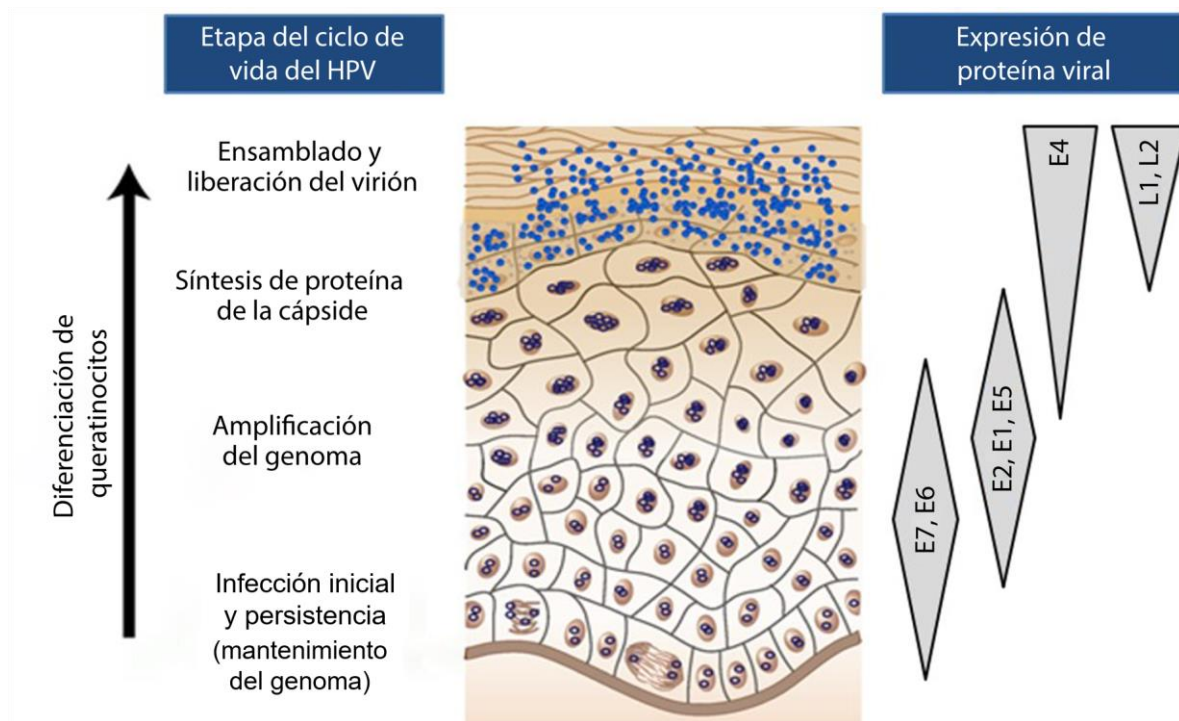


Figura 14. Organización del ciclo infeccioso de HPV dentro del epitelio. Las diferentes etapas del ciclo viral asociadas a la diferenciación celular se muestran a la izquierda. El momento de la expresión y los niveles de proteína asociados se resumen a la derecha. El mantenimiento y amplificación del genoma viral se ve facilitado por la expresión de E6, E7, E5, E1 y E2, mientras que la expresión de L1 y L2 permite la formación de viriones infecciosos y E4 su liberación. Modificado de [1].

Producción de viriones

En la infección viral productiva, E4 es la única proteína temprana que persiste hasta la superficie epitelial (Figura 14, 15 y 16) [2]. Los eventos de producción de viriones

comienzan tras la finalización de los eventos tempranos del ciclo viral, aunque pueden superponerse en una región tan delgada como de una capa celular [2]. Tras una mayor diferenciación, las proteínas de la cápside L1 y L2 se expresan en las capas superiores del epitelio [16], permitiendo el ensamblaje de viriones infecciosos [2]. La expresión de E4 precede a la expresión de L2, que a su vez, parece preceder ligeramente a la expresión de L1 [167]. L1 y L2 se expresan en el citoplasma de las células terminalmente diferenciadas cerca de la superficie del epitelio antes de ubicarse en el núcleo [2, 168], donde se ensamblan los viriones [169]. Estas proteínas se polimerizan en una cápside icosaédrica que empaqueta una copia del dsDNA (del inglés *double-stranded Deoxyribonucleic Acid*) circular viral asociada con histonas del hospedero [1, 170] (hasta ahora, aún se desconoce si la encapsidación del genoma viral tiene lugar durante o después del ensamblaje de la cápside [171, 172]). Durante su formación, las cápsides de HPV requieren maduración por formación de enlaces disulfuro intermoleculares en L1 en el núcleo de la célula [1]. Los viriones maduros son liberados por el proceso de descamación del epitelio al terminar la diferenciación de los queratinocitos [11, 152, 173], y su presencia en la superficie de las áreas infectadas permite la transmisión por contacto entre piel y mucosas durante el acto sexual, completando así el ciclo viral [106].

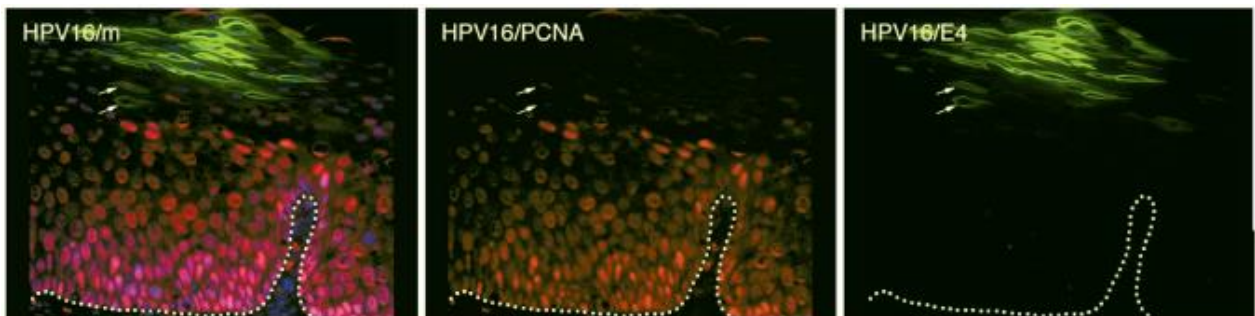


Figura 15. Cortes de lesiones en mucosa causadas por HPV-16 teñidas con anticuerpos. Tinción con anti-E4 (verde), anti-PCNA (rojo) y con DAPI (azul, para visualizar los núcleos celulares) (20x). Imagen fusionada a la izquierda (HPV16/m) [2]. Los marcadores subrogados de la expresión de E7 (PCNA rojo) generalmente persisten en las capas epiteliales superiores, pero se pierden después de la expresión de E4 (verde). E4 rara vez se detecta en las capas epiteliales inferiores. Las células que expresan tanto E4 como PCNA se indican mediante flechas. La línea discontinua indica la posición de las capas basales.

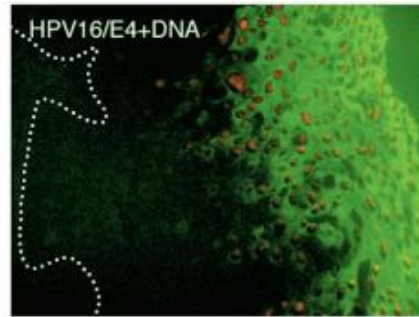


Figura 16. Corte de una lesión en mucosa causada por HPV-16. Se muestra el DNA viral amplificado (rojo, anti-PCNA) y la expresión de E4 (verde, anti-E4) (10x) [2]. El inicio de la amplificación activa del genoma viral coincide con el inicio de expresión de E4 en una banda de células en las capas epiteliales media y superior. La línea discontinua indica la posición de la capa basal.

3.2.2 Estructura y funciones de las proteínas y de la LCR de los HPV oncogénicos

A continuación, se describe la estructura y funciones de las proteínas y la LCR de los HPV de alto riesgo en el orden de expresión en el ciclo viral, con un enfoque marcado para HPV-16, el genotipo más relevante para el OPC HPV+.

LCR

Todos los HPV tienen una región no codificante entre los ORF de L1 y E6 denominada LCR [1]. La LCR del HPV-16 (aproximadamente 1 kb de longitud [16]) consiste en un arreglo de sitios de unión para factores de transcripción, que incluye cuatro sitios de unión para E2, un sitio de unión para E1 (el origen de replicación u *ori*), múltiples sitios de unión para al menos 12 factores de transcripción celular y una secuencia promotora para los genes E [174, 175]. Dos de los 4 sitios de unión de E2 dividen a la LCR en 3 regiones funcionalmente distintas denominadas segmento 5', segmento central y segmento 3' (Figura 17) [176]. El segmento 5' contiene la señal de terminación de la transcripción y un sitio de poliadenilación para mRNAs tardíos (pAL), el segmento central contiene el *enhancer* específico de epitelio que contiene la mayoría de los sitios de unión para factores de transcripción del tejido y el segmento 3' contiene el origen de la replicación (*ori*) y el promotor para E6 y E7, p97 (Figura 17) [176].

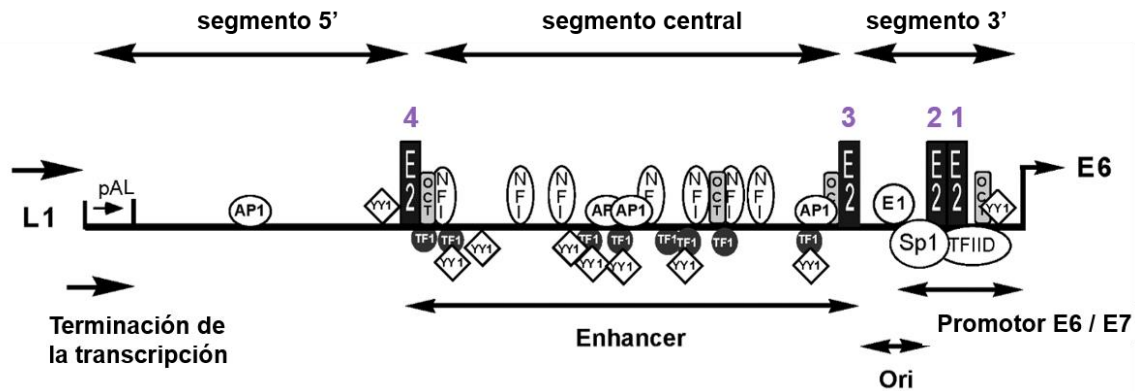


Figura 17. Diagrama de la LCR de HPV-16. Se indican los segmentos 5', central y 3'. LCR contiene sitios de unión para varios factores de transcripción viral y celular que activan o reprimen el promotor p97, algunos de los cuales se denotan en la imagen mediante la abreviatura utilizada en el texto, con la excepción de TEF-1, que se denota TF1. Modificado de [176].

Además de proporcionar especificidad de tejido, el segmento central de la LCR de HPV-16 participa en la modulación de la expresión génica viral en respuesta al estado fisiológico y de diferenciación del queratinocito gracias a la unión de diversos factores de transcripción celular al *enhancer* [176, 177]. Hay más de 20 sitios en el *enhancer* del HPV-16 a los cuales se unen factores como AP-1 (siglas en inglés de *Activator Protein 1*), C/EBP (del inglés *CCAAT/enhancer Binding Proteins*), receptor de glucocorticoides, receptor de progesterona, NF1 (siglas en inglés de *Neurofibromin 1*), NF-IL6 (siglas en inglés de *Nuclear Factor Interleukin-6*), NF-κB (siglas en inglés de *Transcription Nuclear Factor kappa B*), Oct1 (siglas en inglés de *Organic Cation Transporter 1*), PEF-1 (siglas en inglés de *Penta-EF-hand domain containing 1*), CDP (siglas en inglés de *CCAAT-displacement protein*), TEF-1 (TEF siglas en inglés de *Transcription Enhancer Factor*), TEF-2, YY1 (repressor transcripcional), TFIID (siglas en inglés de *Transcription Factor IID*) y Sp1 (factor de transcripción) [176, 177]. Dichos factores de transcripción celular pueden modular la acción de la LCR positivamente (ej. TFIID, Sp1, AP-1, NF1, Oct1, TEF-1, receptores de esteroides) o negativamente (ej. YY1, NF-κB, C/EBP) [16, 174, 175].

Durante el ciclo viral productivo, las proteínas de HPV se expresan a partir de transcritos policistrónicos (Figura 18). Los transcritos tempranos o E inician en p97 (en el segmento 3' de la LCR), cuya actividad está modulada por la unión de factores de transcripción celulares y E2 [176], pero tras la diferenciación de la célula hospedera, la expresión génica tardía o L sucede a partir el promotor p670 que se encuentra en el ORF

E7 (Figura 12) y cuya activación implica el uso alternativo de sitios de *splicing* y de secuencias de poliadenilación [175].

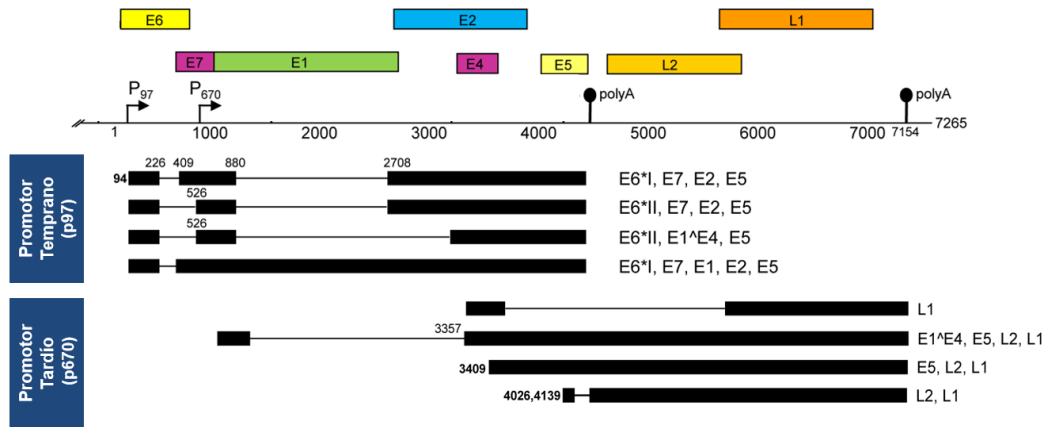


Figura 18. Esquema de algunos mRNAs policistrónicos de p97 y p670 en HPV-16. Modificado de [10].

E7

La fase productiva del ciclo viral se lleva a cabo en células diferenciadas. Estas células han salido del ciclo celular, por lo que el HPV debe neutralizar los controles de vigilancia que se activan cuando la célula inicia la replicación de DNA no programada [160]. Para ello, HPV-16 tiene a E7, E5 y E6, que son oncoproteínas virales debido a su papel en la estimulación de la proliferación y supervivencia celular así como la modulación de la diferenciación de queratinocitos [178].

E7 del HPV-16 es una fosfoproteína de 98 aminoácidos conformada por 3 dominios denominados Regiones Conservadas (CR del inglés *Conserved Regions*) 1, 2 y 3 por su homología estructural y funcional con las proteínas transformantes E1A de los adenovirus y el antígeno T de los poliomavirus [179]. La región CR3 de E7 no posee una extensa homología con las proteínas mencionadas, pero CR1 sí comparte una pequeña porción y CR2 comparte casi toda la secuencia [180, 181]. En HPV-16, CR1 abarca los residuos 1-15 de E7 (Figura 19), siendo importante para la transformación celular y la degradación de pRb sin contribuir directamente a su unión [158]. CR2 contiene los residuos 16-38 y el motivo conservado Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) que establece interacciones de alta afinidad con pRb [181], contiene un sitio de reconocimiento para cinasa de caseína 2 (CK2, del inglés *Casein Kinase 2*) y el sitio de unión para el complejo

ciclina A-E2F [158, 179]. CR3 comprende los residuos 39-98 del extremo carboxilo, es un dominio de unión a zinc compuesto por dos motivos CXXC separados por 29 aminoácidos formando un dedo de zinc similar al de E6 por lo que se sugiere que ambas proteínas surgieron de un antepasado común [16, 181, 182]. Los 2 motivos CXXC son importantes para la dimerización de E7 [183], aunque no hay evidencia de que E7 exista como un dímero *in vivo* y/o que la dimerización sea necesaria para las actividades biológicas de la proteína [158]. Esta región también contiene un sitio de unión de pRb de baja afinidad [184].

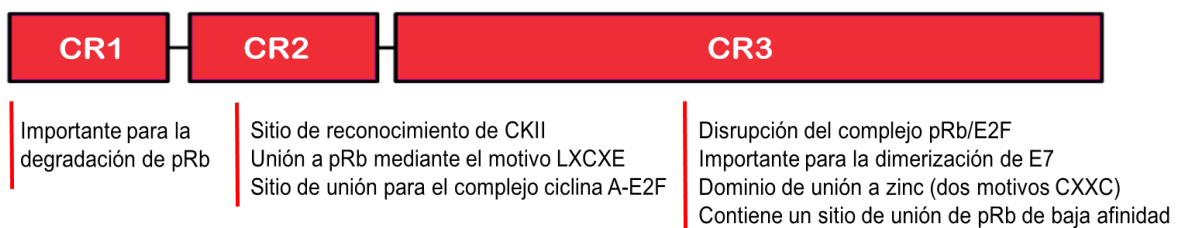


Figura 19. Esquema que resume la estructura de HPV-16 E7 y las funciones descritas para sus CR. Katia Jácome, Powerpoint, 2021, construida con la información de las fuentes: [158, 179-184].

El peso molecular de E7 se ha reportado entre 14 y 21 kDa, diferencias que se han explicado parcialmente por la carga negativa de la proteína en el extremo amino y posiblemente por una modificación postraducciona no identificada durante el procesamiento y tránsito de la proteína a través de los diferentes compartimentos celulares que genera una isoforma diferente a la fosforilada [185]. E7 del HPV-16 se encuentra principalmente en el citoplasma [186], posee dos secuencias de localización nuclear o NLS (siglas en inglés de *Nuclear Localization Signal*) y una de exportación nuclear o NES (siglas en inglés de *Nuclear Export Signal*) para desplazarse entre el citoplasma y el núcleo [187] y también se transporta al núcleo por una vía dependiente de Ran no clásica que no involucra los principales receptores de importación Kap β citosólicos [188]. Las concentraciones de E7 son bajas dentro de la célula infectada porque su vida media es <2 h [189] y se ubiquitina en el extremo N-terminal para su degradación por el proteasoma [190].

E7 perturba el vínculo entre la diferenciación celular y la proliferación en el epitelio normal, lo que permite que el virus se replique en células en proceso de diferenciación [152, 159]. La proteína E7 interactúa con una amplia gama de proteínas celulares con

funciones reguladoras del ciclo celular o que son factores de transcripción con el fin de inducir inhibición de la diferenciación celular, progresión del ciclo de G1 a S e inestabilidad cromosómica [16, 191].

a) Papel de E7 en la proliferación y diferenciación celular por la interacción con proteínas reguladoras del ciclo celular [152].

- **pRb.** E7 interactúa y neutraliza las funciones de pRb, p107 y p130 que son proteínas de bolsillo (del inglés *pocket proteins*) que controlan el ciclo celular regulando negativamente por asociación directa la actividad de varios factores de transcripción, como los miembros de la familia E2F [192]. E7 desregula el ciclo celular principalmente uniéndose y promoviendo la degradación de la proteína supresora de tumores pRb, un regulador negativo del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S [190, 193]. En las células quiescentes, pRb está hipofosforilada y forma un complejo con E2F (pRb/E2F), manteniéndolo secuestrado durante la fase G1 del ciclo celular [193]. Este factor de transcripción consiste en una subunidad E2F unida a un miembro de la familia DP [194] y es reprimido por pRB, p107 y p130: la unión de éstas enmascara el dominio de activación transcripcional de los complejos E2F/DP y los convierte en represores transcripcionales que restringen la entrada de la fase S [195]. Los factores de transcripción E2F controlan la expresión de la DNA polimerasa α , enzimas de la biosíntesis de nucleótidos (deshidrofolato reductasa y la cinasa de timidina), y la ciclina E, un activador de CDK2 (CDK, del inglés *Cyclin Dependent Kinase*) [152]. En células normales, la actividad de E2F está regulada por la fosforilación de pRb dependiente de ciclina/CDK [152] a lo largo del ciclo celular: cuando las células quiescentes reciben señales mitogénicas, se expresan las ciclinas de tipo D específicas de G1 (D1, D2 y D3) que activan a las cinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4 y CDK6, respectivamente) que fosforilan pRb a la mitad de G1. Esto provoca la liberación de E2F y la expresión de proteínas esenciales para la progresión del ciclo celular [192].

E7 es capaz de unirse al complejo E2F-pRb y desestabilizarlo, liberando a E2F de manera anticipada y promoviendo la degradación de

pRb [152]. La inactivación de pRb induce la activación constitutiva del factor de transcripción E2F, conduciendo a una progresión prematura de la célula a fase S (Figura 20) [152, 193, 196]. El mecanismo por el cual la proteína E7 induce la degradación de pRb aún no ha sido completamente dilucidado, pero se sabe que está mediado por la calpaína, una proteasa de cisteínas activada por calcio que es reclutada por E7 para hacer un corte a pRb para su posterior degradación [196, 197]. Se ha descrito que E7 es capaz de inducir el marcaje atípico con ubiquitina de proteínas de bolsillo relacionadas con pRb como p107, p130 y p600 [152, 198, 199] por medio de la culina 2 (proteína que forma parte del complejo ubiquitina-ligasa), lo que conduce a su degradación por el proteasoma 26S, ya que E7 también interacciona con la subunidad 4 del mismo [152, 200].

La activación de CDK4 y CDK6 está regulada, ya que representa un evento clave para la entrada al ciclo celular por la fosforilación de pRb. Las proteínas p16, p15, p18 y p19 inhiben a CDK4 y CDK6 para promover la hipofosforilación de pRb, el secuestro de E2F y el arresto en G1 [201, 202]. Sin embargo, la interacción de E7 del HPV-16 con pRb libera a E2F en ausencia de complejos CDK4 y CDK6 activos, por lo que las altas concentraciones de p16 no logran detener el avance del ciclo celular [192]. Debido a los mecanismos de retroalimentación entre pRb y p16, la sobreexpresión de p16 es evidente al analizarla por inmunohistoquímica cuando existe la inactivación de pRb por E7, sirviendo como un marcador subrogado de esta proteína viral [193].

- **CDK2.** La activación prematura de E2F por E7 lleva a la expresión de proteínas necesarias para entrar a la fase S, tales como CDK2 y las ciclinas A y E, proteínas que regulan la transición entre distintas fases del ciclo celular [196]. Asimismo, E7 puede asociarse y mantener activos a los complejos ciclina A/CDK2 y ciclina E/CDK2 [203] y puede promover el aumento de las concentraciones de CDK2 por la inducción de la transcripción de *cdc25A*, una fosfatasa de tirosinas que remueve los grupos fosfato que inhiben a CDK2 (Figura 20) [204]. Esta activación atípica de CDK2 en células que expresan la proteína E7 del HPV-16 conduce a la

inducción aberrante de centrosomas supernumerarios y la aneuploidía [205].

- **p21 y p27.** Por el contrario, E7 inactiva los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (CKI, del inglés *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor*) p21 y p27, que juegan un papel importante en el acoplamiento del paro del ciclo celular y la diferenciación en los queratinocitos al inhibir la acción de CDK2 y promover el arresto de crecimiento celular (Figura 20) [16].
- **p107, p130 y p/CAF.** Las proteínas p130 y p107 usan un dominio conservado para inhibir la actividad de CDK [206]. De esta forma, cuando E7 inhibe a estas proteínas, CDK2 permanece activa (Figura 20) [152]. Aunado a esto, p107 disminuye la fosforilación de histona H1 por reducción en la actividad de las cinasas [206] (los niveles de fosforilación de la histona H1 son bajos en la fase G1 e incrementan en S y G2 [207]). Así, E7 puede regular la transición G2/M del ciclo celular al inhibir a p107, lo que lleva a que la cinasa de la histona H1 esté activa participando en la progresión del ciclo viral [199]. E7 también está involucrada en la alteración de la diferenciación celular, al respecto, el gen que codifica para pRb es acetilado por los coactivadores p300 y p/CAF (factor asociado a p300) para participar en la diferenciación celular de manera independiente de su actividad con E2F [196]. Se sabe que la proteína E7 interactúa con p/CAF y reduce su actividad de acetiltransferasa para reducir la expresión de pRb lo que altera la diferenciación de la célula del hospedero [196, 208].

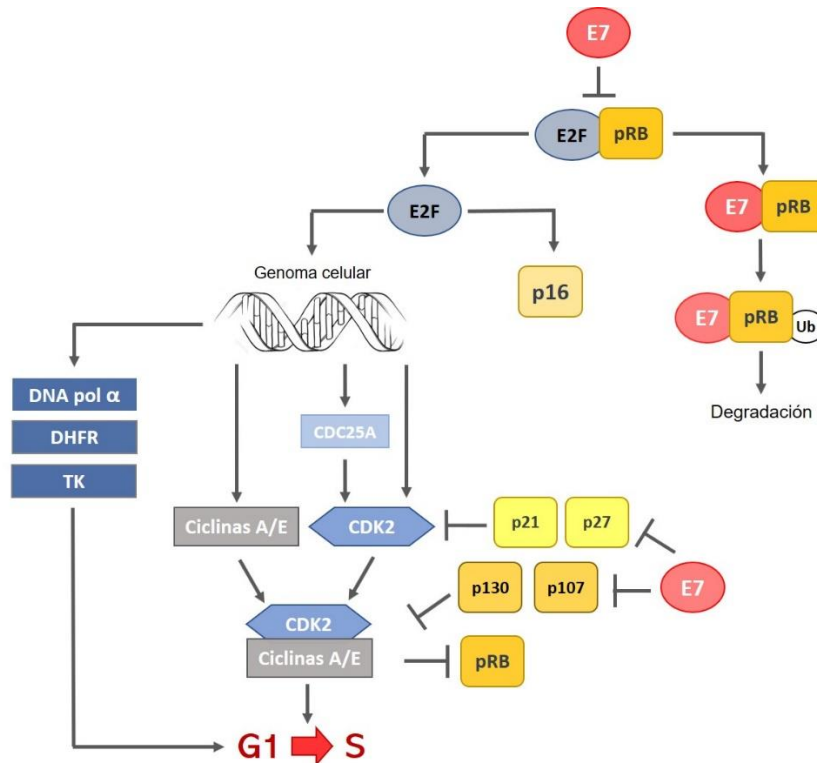


Figura 20. Esquema que resume el papel de la proteína E7 en la alteración del ciclo celular. La proteína E7 inhibe la formación de complejos entre pRb y E2F y participa en la disociación de los ya formados para activar la transcripción de genes que promueven el inicio de la fase S del ciclo celular, tales como la deshidrofolato reductasa (DHFR, del inglés *Dihydrofolate Reductase*), la cinasa de timidina (TK, del inglés *Thymidine Kinase*), la DNA polimerasa α (DNA pol α), cdc25A, ciclina A y E. E7 también disocia los complejos formados por los represores p21, p27, p107 y p130 para evitar la inhibición de las cinasas activadas y fomentar la progresión de la célula hacia la fase S. Hiram Moreno, Powerpoint, 2021, construida con la información de las fuentes: [16, 152, 190-208].

- **TGF- β .** El factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés *Transforming Growth Factor beta*) es una citocina que restringe el crecimiento de las células epiteliales, sin embargo, E7 de los HPVs de alto riesgo puede inhibir su función por diversas vías, por ejemplo, reprimiendo el promotor de la citocina al liberar E2F de pRb [209], promoviendo la resistencia al TGF- β extracelular posiblemente por la inactivación de p21 y p27 [210], o por influir en las proteínas de bolsillo pRB, p107 y p130 que auxilian a p15, una CKI inducida por TGF- β que es específica de CDK4 y CDK6 [211].
- **α -glucosidasa.** E7 interactúa y activa alostéricamente a la α -glucosidasa [212], llevando al agotamiento de las reservas de glucógeno intracelular

ocasionando la hiperproliferación celular. El agotamiento de las reservas de glucógeno también puede ser el resultado de los requerimientos de energía de células que proliferan rápidamente [152].

- **AP-1 y c-Myc.** E7 interactúa a través de su dominio tipo dedo de zinc con los factores de transcripción AP-1 (c-Jun, JunB, JunD y c-Fos) y c-Myc, cruciales en la señalización mitogénica y de diferenciación celular [158]. Al respecto, se ha reportado que E7 del HPV-18 aumenta las concentraciones de c-Myc y se une a éste para aumentar su capacidad de transactivación [205].

b) Evasión de la respuesta inmune al interferir con distintas vías de señalización.

- **TNF α .** El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*) producido por las células T citotóxicas induce el arresto en G1 y promueve la diferenciación en células normales [213], sin embargo, los queratinocitos que expresan E7 proliferan en presencia de esta citocina al parecer por la inactivación de las proteínas de bolsillo [213, 214].
- **TAP1.** E7 genera la regulación negativa de TAP1 (siglas en inglés de *Transporter Associated with Antigen Processing 1*), una proteína clave para el transporte de péptidos desde el citosol al retículo endoplasmático, reduciendo la presentación de antígenos por MHC I (siglas en inglés de *Major Histocompatibility Complex*), afectando la respuesta de las células T citotóxicas [215].
- **IFN.** Los interferones (IFN) son citocinas citostáticas que se producen en respuesta a infecciones virales. E7 puede interactuar con p48, el componente de unión al DNA de ISGF-3 (siglas en inglés de *Interferon Stimulated Gene Factor 3*) y prevenir su translocación nuclear tras la estimulación con IFN- α [216], comprometiendo la señalización por esta citocina. Además, E7 también puede inactivar al factor de transcripción IRF1 (IRF, del inglés *Interferon Regulatory Factor*) inducido por IFN- γ que a su vez puede regular la expresión de IFN- β [217]. Secuencias en los dominios de homología amino terminal CR1 y CR2 y en el carboxilo

terminal de E7 que pueden interactuar con la histona desacetilasa Mi2 β , el factor de transcripción MPP2 (siglas en inglés de *M Phase Phosphoprotein 2*) y AP-1, contribuyen a la anulación de la actividad transcripcional de IRF1 [152, 217].

- **TGF- β .** El TGF- β es una citocina que regula la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, pero la proteína E7 de HPVs oncogénicos reprime el promotor de TGF de la célula al liberar E2F de pRb [209]. Se ha observado la pérdida de la expresión del receptor 1 de TGF- β y el fenotipo de resistencia a TGF- β [152], posiblemente por la inhibición de las proteínas de bolsillo [158].

- c) Inestabilidad cromosómica. Antes de la aparición de alteraciones cromosómicas, la expresión transitoria de E7 en queratinocitos humanos produce anomalías numéricas del centrosoma, debido a una mayor síntesis de centriolos [218]. El desarrollo de dichas anomalías y la inestabilidad genómica resultante se asocian a la función mutagénica de E7 de HPVs de alto riesgo [152], posiblemente porque su asociación con la tubulina y altera su ensamblaje en los centrosomas [191]. Aún se desconoce si el desacoplamiento de la duplicación del centrosoma y la división celular tienen un impacto positivo en la replicación viral o si representan un daño celular secundario debido a este proceso [152].

E6

El gen E6 de HPV-16 codifica para una proteína de 151 aminoácidos con un peso molecular calculado de 18 kDa [16]. Posee 2 dominios de unión a zinc (dedos de zinc) altamente conservados [219] con un motivo Cys-X-X-Cys cada uno, caracterizados por estructuras secundarias $\alpha\beta\alpha\beta$ separadas por 30 residuos [16] y cuya integridad es esencial para la función de E6 [178, 219]. Además, el dominio de unión a zinc en el extremo amino terminal contiene una región de dimerización [178] (se muestra en púrpura en la Figura 21). Ambos dominios de unión a zinc están conectados por una hélice formando una cavidad con la que E6 puede unirse al motivo LXXLL compuesto de hélices ricas en leucina y que se encuentra en distintas proteínas celulares [219]. Este motivo también se ha descrito como “motivo Lxx ϕ Lsh”, donde xx es un dipéptido y uno de los

residuos es Asp, Glu, Asn o Gln; ϕ es un residuo hidrofóbico; s es un aminoácido pequeño y h un aminoácido capaz de crear puentes de hidrógeno [1, 4, 219]. E6 es inestable *in vivo* si no está unido a un péptido LXXLL adecuado, por lo que se cree que las interacciones LXXLL-E6 hacen que E6 adopte su conformación final [178]. Una de las proteínas más importantes unidas por E6 mediante este motivo es la proteína asociada a E6 o E6AP (del inglés *E6 Associated Protein*). Este complejo se une a una proteína supresora de tumores muy importante llamada p53, estimulando su ubiquitinación y degradación por el proteasoma [178].

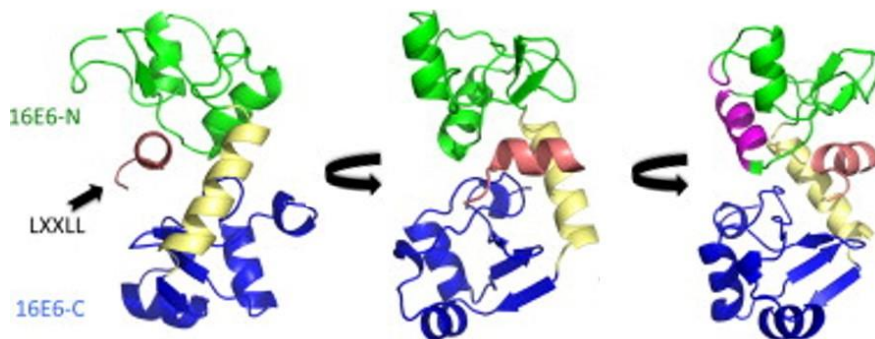


Figura 21. Modelo de listones de E6 del HPV-16. El motivo LXXLL de E6AP (color salmón) reside en un bolsillo profundo. Se observa la hélice de conexión entre dominios (amarilla), el extremo N-terminal (verde), C-terminal (azul) y el dominio de dimerización (púrpura, en la última imagen) [178].

Todas las proteínas E6 de HPVs de alto riesgo poseen un dominio C-terminal altamente conservado (Figura 21) que no está involucrado en la unión y degradación de p53, pero que contribuye a su actividad transformante [178]. Esta región contiene una secuencia de aproximadamente 8 residuos designada XT/SXV encargada de la interacción de E6 con proteínas que contienen dominio PDZ [178, 220]. La integridad de este motivo es esencial, ya que la variación de 1 aminoácido tiene un efecto importante sobre las propiedades de E6 para degradar proteínas celulares [221]. Los dominios PDZ son motivos de 80-90 aminoácidos presentes en una gran variedad de proteínas involucradas en la agrupación de canales iónicos, en enzimas de señalización y en moléculas de adhesión a estructuras específicas en la interfaz membrana-citoesqueleto [160]. E6 se une de manera específica a ciertos dominios PDZ [160] gracias a un motivo α -helicoidal llamado caja L2G. Este motivo se encuentra en E6AP (en la enzima y el sustrato) [178, 222], llevando a la degradación de la proteína unida (por ejemplo p53) por E6AP y proteasoma, incluso induciendo la autoubiquitinación de E6AP [16, 160, 178]. De

hecho, la degradación mediada por ubiquitina de las proteínas PDZ es hasta la fecha una propiedad exclusiva de las proteínas E6 del HPV de alto riesgo (Figura 22) en comparación con las oncoproteínas de otros virus [160].

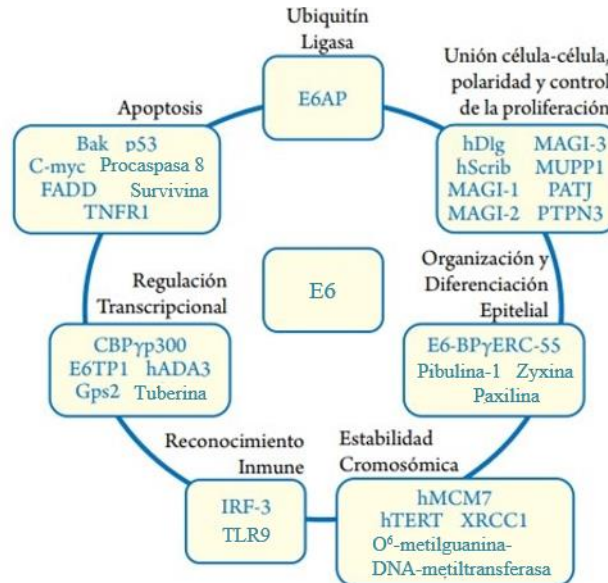


Figura 22. Diagrama de algunas de las proteínas celulares con las que interacciona E6 de HPV de alto riesgo. Modificado de [196].

En las células infectadas, E6 se localiza en el núcleo y citoplasma en bajas cantidades, pero favorece la replicación del HPV mediante la ubiquitinación y degradación gradual de sus blancos celulares, dependiendo de la diferenciación y su localización celular [160, 196]. E6 puede encontrarse como proteína truncada en el extremo carboxilo por la expresión de un subconjunto de transcritos empalmados llamados E6* [1] cuyo número depende del tipo de HPV (HPV-16 presenta 4 especies: E6* I-IV) [178]. E6* consisten en la mitad del primer dominio de unión a zinc de E6 y en una secuencia variable y no conservada de aminoácidos que se unen a E6 y E6AP, pero no con el motivo LXXLL, y se propone que regulan la resistencia de la célula infectada a la apoptosis mediada por TNF α [16, 178, 223]. De esta forma, E6 tiene diversas funciones para crear un entorno favorable para la replicación viral, interfiriendo con la apoptosis, diferenciación y proliferación celular [160].

a) Inhibición de la apoptosis.

- **p53.** E6 tiene actividad antiapoptótica por mediar la degradación de p53 al formar un complejo con E6AP [16]. p53 es un factor transcripcional cuya

expresión se induce en condiciones de estrés celular (radiación UV, hipoxia e infecciones virales) para evitar la proliferación de células que contienen DNA anormal ya que estimula la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis [160]. p53 limita la replicación viral, ya que, una vez activado por la inducción no programada de la replicación del DNA, puede promover el arresto del ciclo celular en el punto de control G1/S o la apoptosis de la célula infectada [224, 225]. La degradación de p53 mediada por E6AP se observa sólo en células que expresan la E6, ya que en células no infectadas esta proteína se inactiva mediante la ligasa de ubiquitina Mdm2 (del inglés *Murine Double Minute 2*) [160]. E6AP es producto del gen UBE3A y es el prototipo de la familia de dominios HECT (del inglés *Homologous to E6AP Carboxy-Terminus*) de ligasas de ubiquitina, cuyo dominio N-terminal media el reconocimiento del sustrato, mientras que la ubiquitinación del sustrato es catalizada por el dominio conservado C-terminal [226]. Después de la unión con E6AP, la estructura de E6 cambia y puede interactuar con p53 por una región C-terminal (diferente del motivo de unión a PDZ) que se une al dominio de unión al DNA de p53 para formar el complejo E6-E6AP-p53 y para comenzar su ubiquitinación [178, 219-229]. Tras la degradación de p53, se evita la detención del crecimiento y la apoptosis en respuesta al daño del DNA, extendiendo así el tiempo de vida del queratinocito infectado [160, 178, 196]. La función de p53 también es bloqueada cuando E6 promueve la degradación de las acetiltransferasas de histona (HATs, del inglés *Histone Acetyltransferases*) como TIP60, CBP (siglas en inglés de *CREB Binding Protein*) y p300 [230], moléculas que además de permitir la remodelación cromosómica, funcionan como co-activadores de p53 [178, 230].

- **Mecanismos antiapoptóticos independientes de p53.** E6 también está implicada en la prevención de la apoptosis a través la degradación de la proteína pro-apoptótica Bak [178, 231], al cambiar la capacidad de unión de la procaspasa 8 a sí misma o a FADD [178, 232] (aunque las isoformas E6* pueden estabilizar a la procaspasa 8 en lugar de acelerar su degradación) [233] o por la transactivación del promotor de la survivina [16,

234]. Además, E6 promueve la activación de NF- κ B, ya sea por la inactivación de proteínas celulares con motivo PDZ, por la inactivación de la desubiquitinasa CYLD (desubiquitinasa de Lys 63) o por interacción con NFX1-91 (NFX1, siglas en inglés de *Nuclear Transcription Factor, X-Box Binding 1*), resultando en el incremento del inhibidor de la apoptosis cIAP2 [178, 235, 236]. E6 también es capaz de inhibir a IRF3, reprimiendo la respuesta celular a interferón que a su vez es afectada por la inhibición de p53 y p300/CBP [178]. Asimismo, existe resistencia celular a la apoptosis mediada por TNF en altas concentraciones de las isoformas de E6 (E6 y E6*) [223] y también debido a que no se detecta al virus por la inhibición de la transcripción del TLR9 (TLR, del inglés *Toll-like Receptor*) [16, 237]. Por otra parte, similar a otros virus, se evita la apoptosis al generar resistencia al Ca^{2+} en queratinocitos por la interacción entre E6BP (una proteína de unión a Ca^{2+} de retículo endoplásmico) y E6-E6AP [238, 239].

b) Papel en la proliferación y diferenciación celular.

El HPV desacopla la replicación y la diferenciación celular para la fase productiva del ciclo viral. Al respecto, E6 altera la integridad de las uniones celulares que son necesarias para mantener la morfología, la proliferación y la migración de queratinocitos bajo control [160] mediante la interacción y degradación de las proteínas con dominio PDZ localizadas en las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular, tales como MAGI-1 [221], hDlg [240] y hScrib [241]. La paxilina, presente en adherencias focales también se une a E6, pero a través de su motivo LXXLL [160, 242]. Asimismo, la diferenciación epitelial responde a la señalización mediada por Ca^{2+} , por lo que E6BP también desacopla la diferenciación terminal en las células infectadas [160]. E6 también promueve la proliferación celular al degradar a NHERF-1 (siglas en inglés de *Sodium-Hydrogen Exchanger Regulatory Factor 1*), lo que lleva a la activación de la vía de señalización PI3K/AKT [16, 243], al incrementar la actividad de la vía de señalización de MAPK (siglas en inglés de *Mitogen-Activated Protein Kinase*) [16, 244] y al promover la degradación de MAGI-2 y -3 (siglas en inglés de *Membrane Associated Guanylate Kinase*), lo que resulta en la activación de PKB (siglas en inglés de *Protein Kinase B*) [16, 160, 221].

c) Inestabilidad cromosómica.

Se ha observado la acumulación de anomalías del centrosoma (números anormales de centrosomas y multinucleización) a lo largo del tiempo en células que expresan E6 [245].

d) Actividades secundarias.

E6 entorpece la reparación del DNA, activa el gen inductor de angiogénesis VEGF (siglas en inglés de *Vascular Endothelial Cell Growth Factor*) y de la telomerasa celular. Estas funciones se revisarán en el capítulo 3.3 ya que están implicadas en el proceso de transformación celular pero no son indispensables para completar la infección productiva de HPV-16.

Cooperación de E6 y E7

Las oncoproteínas E6 y E7 de HPV de alto riesgo cooperan y usurpan el entorno celular para permitir la replicación viral en queratinocitos no permisivos para la síntesis de DNA [159]. E7 subvierte los puntos de control que acoplan la diferenciación y replicación al inactivar las proteínas de bolsillo, lo que permite el acceso del genoma viral a la maquinaria de replicación del hospedero [152]. La respuesta de la célula a esta proliferación no programada sería desencadenar la apoptosis o el arresto celular, pero estos mecanismos son superados por la proteína E6 mediante su efecto sobre una variedad de proteínas celulares, principalmente p53 (Figura 23) [160].

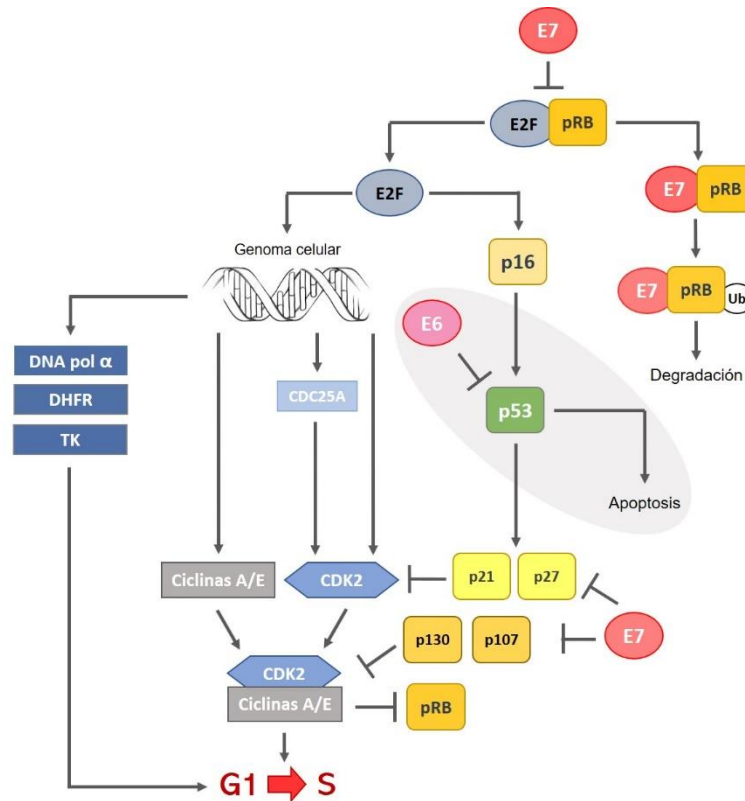


Figura 23. Resumen de la cooperación de E6 y E7 en la alteración del ciclo celular. Ante el avance no programado a fase S por E7, la proteína E6 bloquea la respuesta celular para inducir arresto celular y/o apoptosis, principalmente por p53 (sombreado en gris). Hiram Moreno, Powerpoint, 2021, construida con la información de las fuentes: [16, 152, 160, 178, 190-208, 229, 246].

La expresión de E6/E7 altera significativamente la expresión de genes, con un aumento significativo en la transcripción de aquellos asociados con el metabolismo del DNA y el RNA, especialmente factores de transcripción, factores de *splicing* y elementos de replicación [16, 246]. La expresión de E7 promueve la proliferación celular al liberar E2F por la degradación de pRb [152], evento que lleva a la regulación positiva y estabilización de p53 [178]. Por otra parte, E6 induce la degradación de p53 [229], inhibiendo el paro del ciclo celular y la apoptosis (Figura 23) [16, 178]. De esta forma, la pérdida de E6 del HPV-16 permite la acumulación de p53 y disminuye la presencia del genoma viral en células infectas [178, 247]. La falta de control en el ciclo celular y de mecanismos de respuesta a daño del DNA conducen a la inestabilidad del genoma en la célula hospedera [246] que pueden provocar problemas en la continuación y conclusión del ciclo viral, para evitar esto, la actividad del promotor de E6/E7 (p97) está intensamente modulada por factores de transcripción celular y la proteína viral E2 [248].

E2

La proteína E2 es el regulador principal de la transcripción viral y contribuye al control del número de copias de genoma viral en las células basales indiferenciadas al modular la expresión de las proteínas de replicación viral [175, 249].

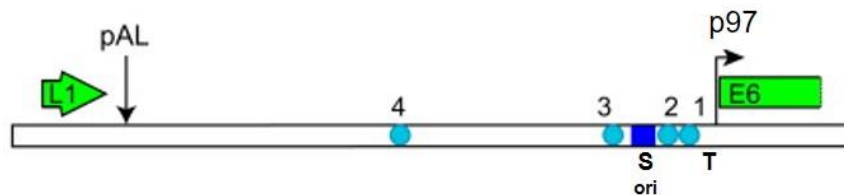


Figura 24. Esquema de los sitios de unión de E2 y E1 en el LCR de HPV-16. Sitios para E2 en azul claro y para E1 en azul oscuro (*ori*). Se indica el sitio de unión de Sp1 como “S” y la caja TATA como “T”. Modificado de [250].

Los HPV de alto riesgo contienen cuatro sitios de unión para la proteína E2 río arriba de p97 en la LCR (Figura 24) [250]. Ahí, E2 se une como un homodímero a sus sitios de reconocimiento palindrómico (ACCN₆GGT o ACCGN₄CGGT) [250] reprimiendo o activando la expresión de E6 y E7, dependiendo del número y disposición de los sitios de unión, de la afinidad relativa de E2 por cada uno de ellos y del nivel de expresión de esta proteína [175-177]. La unión de E2 a sitios distales a p97 estimula la transcripción temprana viral a bajo nivel, mientras que la unión a los sitios proximales del promotor la inhibe [248] ya que evita la unión de Sp1 y el factor de unión de caja TATA (TBP, del inglés *Tata-box Binding Protein*) a sus sitios respectivos (Fig 16 y 23) [251]. También se ha demostrado que los factores de transcripción celular CEF-1 y CEF-2 se unen estrechamente al sitio de E2 1 y 3, respectivamente (Figura 24) y aumentan la transcripción de los genes E6 y E7 en ausencia de E2 [177]. Las proteínas E2 tienen aproximadamente 400-500 aminoácidos y consisten en un dominio de dimerización y de unión a DNA en el extremo C-terminal de aproximadamente 100 aminoácidos y un dominio de transactivación N-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos con una estructura muy restringida que se altera fácilmente por delección y por mutaciones puntuales no conservativas [250, 252]. La región intermedia se denomina bisagra y varía en longitud y en composición entre las proteínas E2 [250]. En HPV-16 la bisagra es una región no estructurada que no se requiere para las funciones de transcripción y

replicación de E2, pero forma un enlace flexible entre los dos dominios que evita el impedimento estérico (Figura 25) [252].

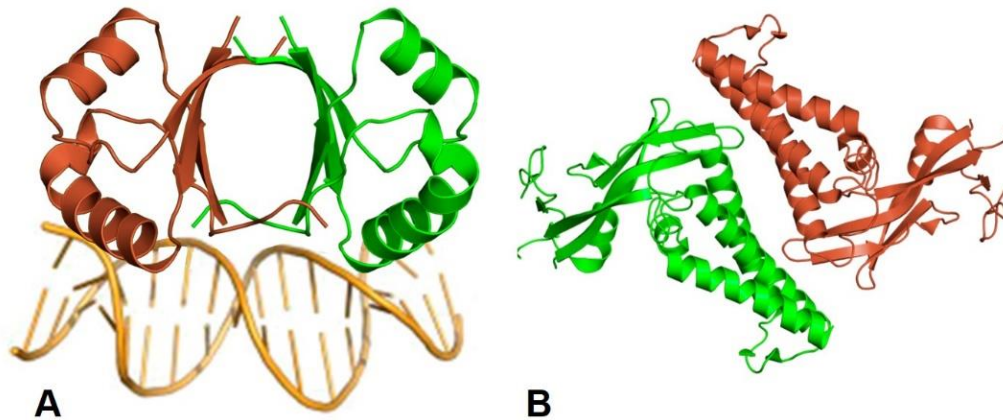


Figura 25. Modelo de listones de E2 de HPV-16. (A) Dominio de dimerización y unión a DNA (residuos: 285-365) en homodímero con unión a DNA [253]. (B) Dominio de transactivación (residuos: 1-201) en homodímero. La bisagra no se muestra [254].

Además de la regulación transcripcional, E2 desempeña múltiples funciones clave en el ciclo viral, tales como [250]:

a) Papel en el inicio de la replicación viral.

E2 dimerica es esencial para la replicación del DNA viral *in vivo* al formar con E1 dimerico un complejo que posee una mayor especificidad por el origen de replicación del genoma viral [255]. Los dos dominios de E2 están involucrados en dirigir a E1 al origen y evitar su interacción con el DNA celular: el C-terminal es útil para la dimerización y unión al *ori* mientras que el dominio N-terminal de transactivación se une a E1 (Figura 26) [256]. Tras la unión de E1 al DNA y en presencia de ATP, E1 se hexameriza y E2 es desplazada [257].

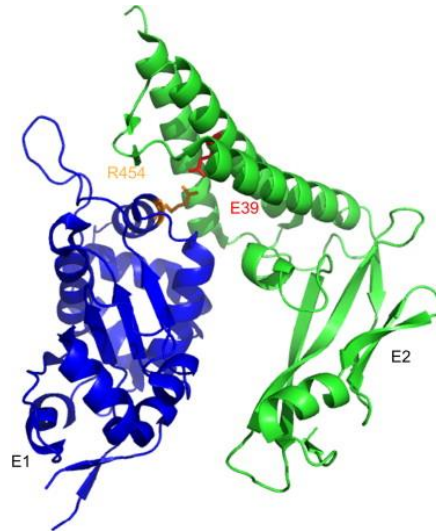


Figura 26. Mitad de un complejo E1 y E2 de HPV-18. Se muestra el dominio N-terminal de E2 (verde) y dominio C-terminal de E1 (azul). Se resaltan los aminoácidos E39 (rojo) y R454 (naranja), que unen ambas proteínas [250].

b) Regulación de la transcripción viral.

E2 puede activar y reprimir la transcripción viral; la expresión/acumulación a alto nivel de E2 lleva a una regulación a la baja de p97 por lo que se reprime la expresión de E6 y E7, finalizando la replicación a gran escala del DNA viral [2]. La actividad de p97 en HPV-16 está modulada por la interacción de factores de transcripción celular y por la concentración de E2, que lleva a la ocupación variable de sus 4 sitios de unión en LCR (Figura 24): la activación se debe a la unión de E2 a un sitio de alta afinidad denominado BS-4 (sitio de unión 4), mientras que la represión está mediada por la unión de E2 a otros sitios de baja afinidad que se superponen con sitios de unión de factores de transcripción celulares que promueven la actividad del promotor [248]. Cantidades bajas de E2 activan el promotor al unirse a BS-4 como un dímero y generan más proteínas tempranas (E), incluida E2, que ocupa progresivamente los sitios E2 de baja afinidad BS-1, -2 y -3, conduciendo a la eventual represión de la transcripción del promotor temprano. Dicha represión no es total, sino que la transcripción se mantiene activa en un cierto nivel debido a la unión de E2 a BS-4 [248]. Al inhibir la transcripción de E6 y E7, E2 provoca arresto celular en la fase G2 para promover la diferenciación de los queratinocitos, evento que se requiere para la expresión génica tardía y la generación de viriones. Además, se ha observado que la expresión de E2 también puede inducir apoptosis en los queratinocitos infectados [258-260].

c) Repartición del genoma viral.

E2 juega un papel clave en el mantenimiento del genoma viral al garantizar que los episomas se dividan entre las células hijas durante la mitosis por la unión no covalente de los genomas virales replicados a los cromosomas del hospedero [1, 261]. Cabe mencionar que el dominio de unión al DNA de E2 no es necesario para su asociación con los cromosomas mitóticos, por lo que se ha sugerido que existe una proteína celular que media esta interacción [261, 262].

E1

E1 está codificada por el ORF más grande conservado del genoma de los PV [1]. E1 de HPV-16 contiene aproximadamente 600 aminoácidos y se puede dividir en tres segmentos funcionales (Figura 27 y 28): una región N-terminal reguladora y de transporte nuclear, un dominio central de unión al DNA (DBD, del inglés *DNA-Binding Domain*) que reconoce con baja afinidad a sitios específicos en el *ori* y un dominio enzimático C-terminal para el autoensamblaje en hexámeros con actividad de ATPasa y helicasa (HD, del inglés *Helicase Domain*) [256, 263-265]. Los dominios DBD y HD son suficientes para la replicación del DNA viral *in vitro* y forman el núcleo molecular que impulsa la replicación del DNA viral (Figura 29) [266].

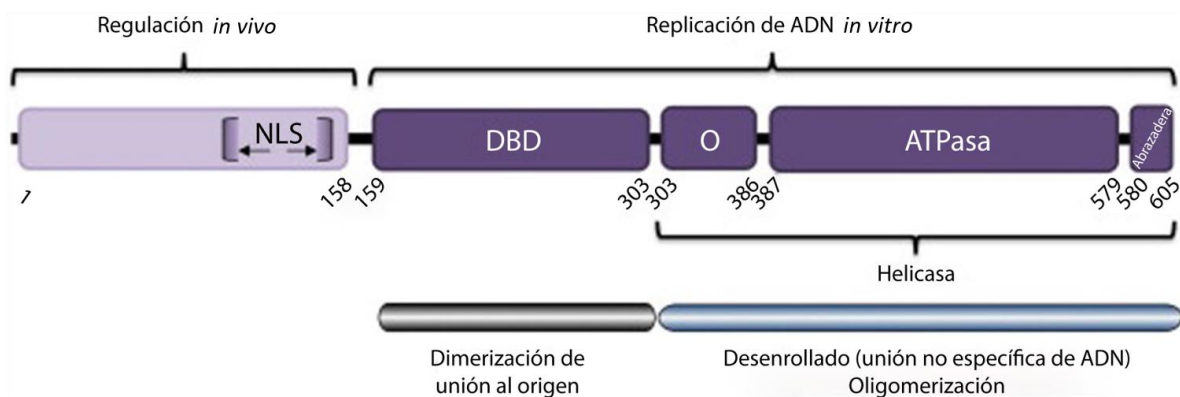


Figura 27. Diagrama de la estructura lineal de la proteína BPV1 E1 y sus dominios. La región reguladora N-terminal se muestra en morado claro (esencial para la replicación óptima *in vivo*) mientras que los dominios requeridos para la replicación del DNA viral *in vitro* se muestran en morado oscuro. El diagrama señala la ubicación de la NLS, el DBD, el dominio de oligomerización (O) y el dominio de unión a ATP (ATPase). Las últimas dos regiones comprenden el HD. La parte inferior de la figura resume las funciones principales de DBD (unión al *ori* y dimerización de E1) y HD (oligomerización y relajación del DNA). Modificado de [256].

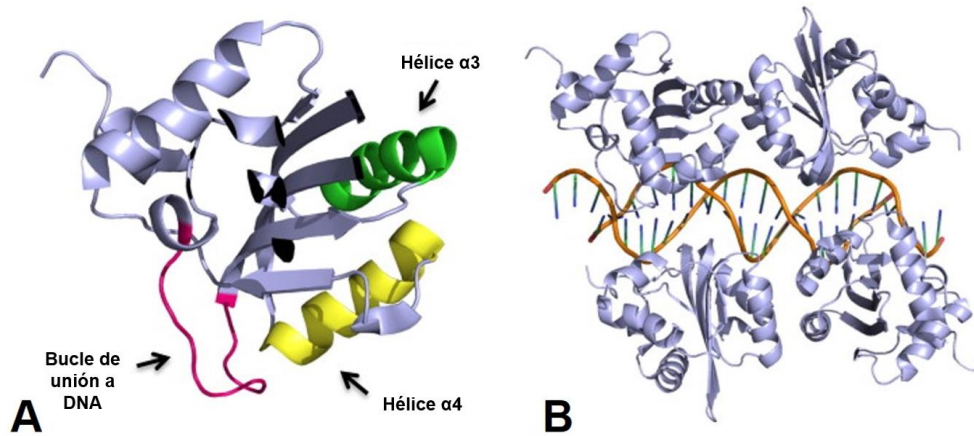


Figura 28. Estructura del DBD de BPV1 E1. (A) Se señala la ubicación del bucle de unión al DNA (rosa), la hélice de unión al DNA (hélice $\alpha 4$, amarilla) y la hélice de dimerización (hélice $\alpha 3$, verde). Se requiere la capacidad del DBD para unirse al DNA como dímero para el ensamblaje de E1 como un doble hexámero competente en replicación en el *ori*. (B) Estructura de dos dímeros DBD E1 BPV1 unidos al DNA. Los dos dímeros DBD están unidos en caras separadas de la doble hélice y no interactúan entre sí. Modificado de [256].

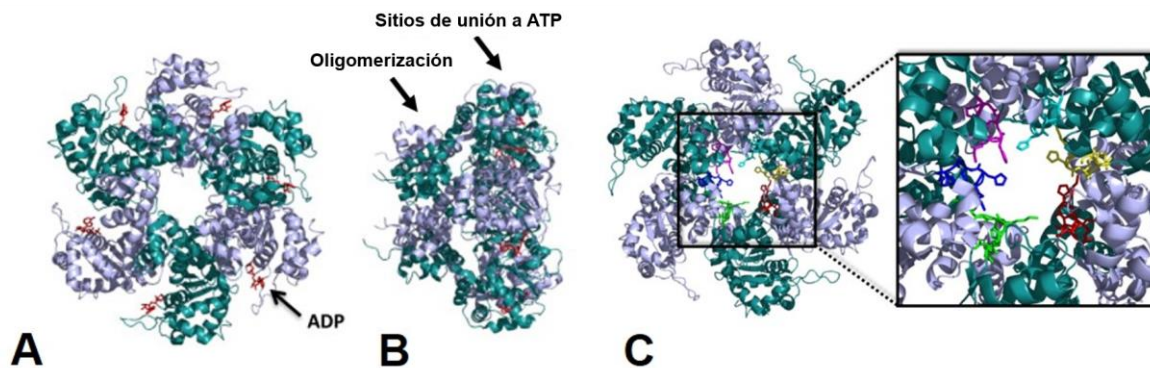


Figura 29. Estructura del HD hexamérico unido a ADP de BPV1 E1. Los seis monómeros E1 están coloreados en morado y verde de forma alterna y ADP se muestra en rojo. (A) La vista frontal muestra cómo se ensamblan los seis monómeros para crear un canal central. (B) La vista lateral muestra el anillo formado por los seis dominios de oligomerización y el subdominio más grande formado por el sitio de unión a ATP. (C) Las seis horquillas β de unión al DNA se resaltan en diferentes colores. Modificado de [256, 267].

E1 es la única enzima codificada por HPV, es una helicasa de DNA y una hidrolasa de ATP esencial para la replicación y amplificación del cromosoma viral en el núcleo de las células infectadas [256, 267], que proporcionan los demás factores de replicación requeridos [268]. La proteína E1 inicia la síntesis de DNA viral desde el *ori*, pero tiene una afinidad relativamente baja y una baja especificidad de secuencia [256, 264]. Como resultado, altas concentraciones de E1 pueden unirse al DNA

inespecíficamente e iniciar la replicación fuera del *ori* [269, 270], sin embargo, su reclutamiento se facilita mediante la unión a E2 [255]. Además de su papel en la iniciación de la replicación, E1 también se requiere *in vitro* para desenrollar el DNA viral y desplazar las histonas H1 asociadas [256, 268].

La replicación se inicia mediante el reclutamiento de E1 dimérico por E2 dimérico en el *ori* (Figura 30 A) [257]. Este complejo inicia el reclutamiento de moléculas E1 adicionales y el ensamblaje del intermediario E1 en doble trímero (DT) que, tras la hidrólisis de ATP, se convierte rápidamente en un doble hexámero, cada uno rodeando una cadena de DNA. Este complejo desenrolla el DNA y posiblemente es útil para el reclutamiento de factores de replicación ya que interactúa con elementos de la maquinaria de replicación del DNA celular como el complejo de DNA polimerasa α -primasa (Pol α -prim), proteína de replicación A (RPA, del inglés *Replication Protein A*) y topoisomerasa I (Topo I) (Figura 30 B) [256].

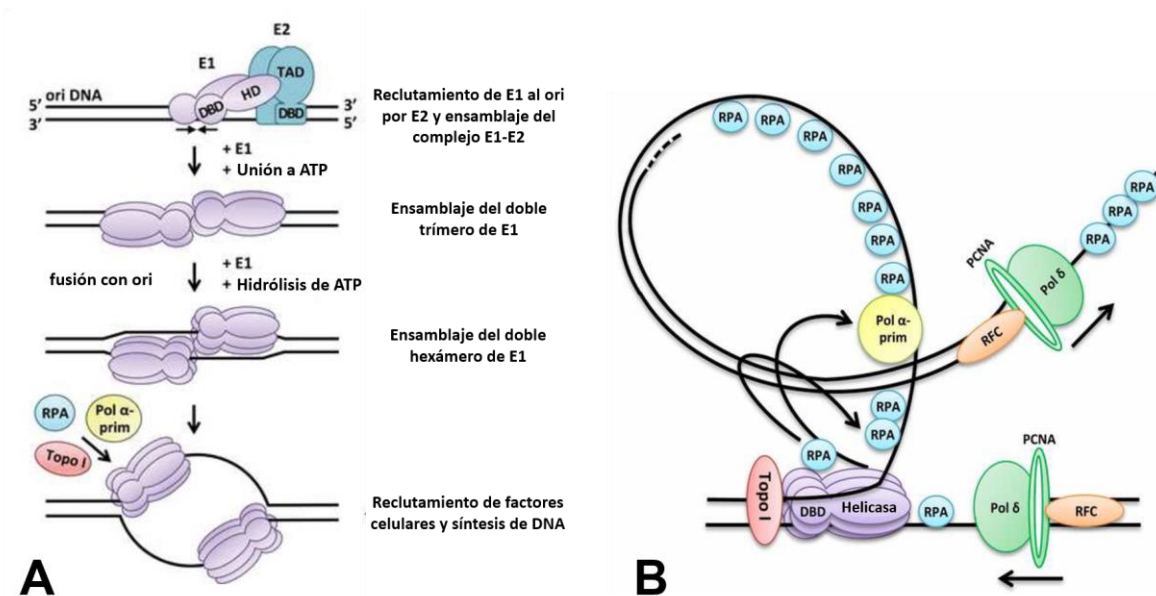


Figura 30. Modelo de replicación del HPV. (A) Esquema del inicio de la replicación del DNA de HPV. (B) Modelo propuesto para la horquilla de replicación del DNA de HPV (solo se muestra uno de los dos hexámeros). La proteína E1 (en púrpura) se muestra orientada con su dominio DBD hacia el dsDNA desenrollado. Modificado de [256].

E5

E5 es una proteína corta (40-85 aminoácidos), hidrofóbica y transmembranal codificada por algunos PV [271]. Además del carácter hidrofóbico, no hay gran similitud entre las diferentes proteínas E5 [1, 271]. En particular, la proteína E5 de HPV-16 contiene 83 residuos y tiene un peso molecular estimado en 10 kDa [271]. La proteína E5 presenta tres hélices transmembranales y regiones hidrofílicas cortas en los extremos carboxilo y amino [272, 273]. En HPV-16, el extremo carboxilo de E5 es necesario para aumentar la activación dependiente de ligando del receptor con actividad de cinasa de tirosinas EGFR (siglas en inglés de *Epidermal Growth Factor Receptor*) y para evitar la disminución de pH en endosomas [271]. Los tres dominios hidrofóbicos sirven como segmentos de anclaje a membranas [271], pero el primer dominio hidrofóbico (N-terminal) es necesario para inducir el crecimiento independiente de anclaje y la invasividad de los queratinocitos humanos infectados [274], E5 de HPV-16 parece autoasociarse a través de interacciones no covalentes entre sus dominios transmembranales [275] y posiblemente también a través de enlaces disulfuro para formar estructuras hexaméricas en anillo que muestran actividad de canal iónico en liposomas (Figura 31) [271, 275].

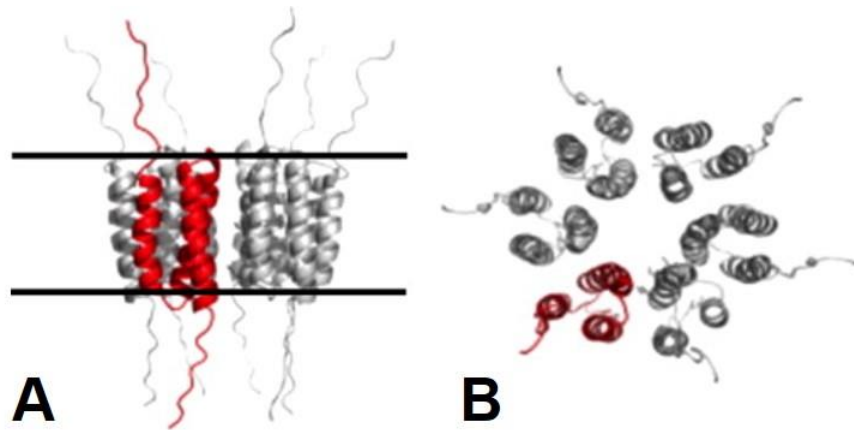


Figura 31. Modelo de listones de un canal iónico hexamérico generado por la proteína HPV-16 E5 *in vitro*. (A) Vista lateral del canal hexamérico. Un monómero de E5 con tres segmentos transmembranales se resalta en rojo (la membrana se representa mediante las líneas horizontales). (B) Vista axial de las mismas representaciones [271].

E5 parece ser importante en el curso temprano de la infección por HPV [149] y se localiza principalmente en las membranas del retículo endoplasmático, aunque en expresiones altas también está presente en las membranas del aparato de Golgi, en la

membrana plasmática y en la envoltura nuclear [271]. El rol de cooperación que E5 tiene con E6 y E7 para promover la transformación celular [16] es evidente ya que modula la actividad de diversas proteínas celulares, aunque es posible que en realidad tenga solo uno o dos objetivos directos, que a su vez median numerosas interacciones indirectas responsables de sus diversas actividades biológicas [271]. La actividad de canal iónico recientemente descrita para HPV-16 E5 proporciona otro posible mecanismo de cómo E5 puede influir en múltiples actividades biológicas sin unirse directamente a numerosos objetivos [271]. Las principales actividades de la proteína E5 de HPV-16 se describen a continuación:

a) Perturbación del tráfico de endosomas mediante 3 mecanismos.

- **Canal iónico.** E5 parece modular la acidificación de los endosomas a través de su actividad de canal iónico [271].
- **V-ATPasa.** E5 se une a la subunidad 16K de la V-ATPasa (ATP-asa vacuolar), enzima responsable del mantenimiento de la acidificación de los organelos celulares [11, 271]. La unión perjudica la función de la V-ATPasa, lo que interfiere con la acidificación de endosomas y resulta en un reciclaje alterado de receptores y moléculas de MHC a la superficie celular, así como en la perturbación de la comunicación celular por uniones estrechas [11, 271].
- **Reorganización del citoesqueleto.** E5 puede inhibir la fusión de vesículas. Por ejemplo, E5 inhibe específicamente la fusión de vesículas endosómicas con EGFR, aumentando el reciclaje de este receptor a la superficie celular, lo cual incrementa la sensibilidad de la célula a EGF (siglas en inglés de *Epidermal Growth Factor*) [271, 276].

b) Evasión de la respuesta inmune mediante 3 mecanismos.

- **Disminución de la presentación de MHC-I en la superficie celular.** E5 disminuye el reconocimiento de la célula infectada y/o tumoral por los linfocitos T CD8+ y NK (siglas en inglés de *Natural Killer*) [277, 278] al interactuar directamente con la cadena pesada (HC, del inglés *Heavy Chain*) del complejo MHC-I, sin que esta interacción sea específica para un

haplotipo particular [277, 279]. E5 también puede retener el MHC-I en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático al interferir con el transportador asociado con el procesamiento de antígenos TAP [271, 279]. La calnexina, una chaperona molecular involucrada en el transporte de MHC-I a la superficie celular, también interactúa con E5 y es necesaria para la retención intracelular de MHC-I [280]. Las interacciones descritas están mediadas por 4 motivos de di-leucina en el primer dominio hidrofóbico de E5 [279].

- **Alteración de la maduración de MHC-II.** E5 bloquea la carga de péptidos y el transporte de MHC-II a la superficie celular [271] ya que inhibe la acidificación de los endosomas tardíos. Este efecto, bloquea el procesamiento endosómico de la cadena invariante (Ii) de MHC-II, una chaperona involucrada en la maduración de las moléculas de MHC-II que requiere de degradación endosomal para la carga del péptido antigénico en las moléculas de MHC-II [271]. De esta forma, al interferir en la función del MHC-II, se evade el reconocimiento inmune de los queratinocitos infectados [271, 281].
- **Promoción de la degradación de CD1d.** E5 inhibe la producción de citocinas mediada por CD1d, una molécula centinela que une la inmunidad innata y adaptativa, ya que promueve su degradación por vía del proteosoma [282].

c) Proliferación celular por 3 mecanismos.

- **Alteración de la comunicación célula-célula.** E5 disminuye la fosforilación de la conexina por la alteración de la subunidad 16K de la V-ATPasa, lo cual desacopla las uniones estrechas de los queratinocitos, provocando una menor sensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento de las células circundantes que no están infectadas [271, 283].
- **Inhibición de la apoptosis.** E5 previene la apoptosis por daño al DNA mediante múltiples mecanismos [149]. E5 protege de la apoptosis inducida por la radiación UV a través de la señalización dependiente de EGF de la PI3K y ERK1/2 [284]. E5 también inhibe la apoptosis inducida por el

peróxido de hidrógeno al estimular la ubiquitinación y la degradación proteasómica de la proteína pro-apoptótica Bax a través de una vía dependiente de COX-2-PGE-2-proteína cinasa A [285]. Adicionalmente, E5 también protege de la apoptosis inducida por TRAIL (del inglés *TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand*) y FasL (del inglés *Fas Ligand*), posiblemente como un mecanismo conjunto para escapar de la detección por el sistema inmune [286].

- **Estimulación de la proliferación celular.** La proteína E5 es considerada la tercera oncoproteína del HPV ya que coopera con E6 y E7 para permitir que los queratinocitos diferenciados mantengan la síntesis de DNA (fase S) y su capacidad proliferativa [271, 287]. Un mecanismo propuesto es el aumento de la vida media de receptores de factores de crecimiento como el EGFR [283] y aumento de su concentración en la superficie celular, llevando a la sensibilización al EGF y al aumento de señales mitogénicas [16, 271, 283]. En el pasado, se sugirió que E5 aumentaba los niveles de EGFR al acelerar el transporte del receptor desde los endosomas a la superficie celular o al reducir su degradación al inhibir la acidificación endosomal [288]. Sin embargo, estudios más recientes han revelado que E5 influye en el transporte del EGFR al inhibir la fusión de vesículas por la reorganización del citoesqueleto [16, 271, 276]. Además, E5 mantiene el estímulo de proliferación celular dado por la cascada de señalización de EGFR [16] al promover la activación prolongada de las rutas MAPK y PI3K-AKT en respuesta a EGF [271]. Por otra parte, el genoma de HPV tiene sitios de unión para los factores de transcripción AP-1, tales como homo y heterodímeros de c-fos y c-jun, y se ha reportado que E5 coopera con EGF para incrementar los niveles de estas proteínas, lo cual se relaciona con una mayor actividad de p97 [289], llevando al posible aumento de la transcripción de proteínas virales [271]. E5 también neutraliza la acción de los inhibidores de CDK del ciclo celular p21 y p27, favoreciendo la fase S en la célula infectada [287]. Adicionalmente, mediante múltiples vías dependientes de EGFR, E5 también es capaz de aumentar la expresión del VEGF [290] y contribuir al crecimiento independiente de anclaje [285]. Aunado a lo anterior, se ha descrito que E5 interfiere en la diferenciación

celular al obstaculizar la endocitosis del factor de crecimiento de queratinocitos KGFR/FGFR2b [16].

E4

Las proteínas E4 son los productos génicos más abundantes y más divergentes de los PV [169]: se expresan a partir de un mRNA empalmado denominado E1[^]E4 (Figura 11) que une los primeros aminoácidos de la proteína E1 y todo el ORF de E4, que existe como una secuencia alterna en la región que codifica el dominio de “bisagra” de E2 [1, 169]. El producto da lugar a varias especies de proteínas E4 más cortas a medida que se escinde progresivamente el extremo N-terminal [169]. Dado que los mRNA que codifican para E1 y E4 comparten el mismo codón de inicio, las abundancias relativas de síntesis de los dos mRNA individuales se controlan a nivel de selección del sitio de empalme [2]. La región N-terminal de todas las proteínas E4 contienen un motivo de leucina conservado (LLXLL) y un clúster de prolina importantes para la asociación con queratina y el arresto del ciclo celular, respectivamente [291]. Por otra parte, el extremo C-terminal de la proteína se considera como una región de oligomerización que altera la dinámica de queratina dentro de la célula debido a su motivo de agregación beta [292]. Se cree que este motivo está regulado en la proteína de longitud completa, y que su capacidad de agregación está controlada por la fosforilación y la escisión proteolítica de E4 (Figura 32) [169].

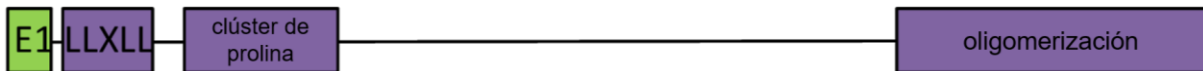


Figura 32. Esquema de la secuencia lineal de E4 antes de su proteólisis progresiva en el extremo N-terminal. Modificado de [293].

En HPV-16, E4 completa es de 17 kDa y de ella se originan péptidos de 16, 11 y 10 kDa [12]. E4 es predominantemente citoplasmática, aunque también puede encontrarse en bajas concentraciones en el núcleo [169]. Las modificaciones postranscripcionales que sufre E4 se dan a medida que los queratinocitos infectados migran a través de las capas epiteliales, acumulándose los péptidos más pequeños en las capas epiteliales media y superior durante la infección productiva [12, 16, 169, 294]. Las funciones de E4 se describen a continuación [295]:

a) Liberación de viriones.

Los viriones del HPV son liberados de la célula infectada por descamación, pero las proteínas E4 favorecen este proceso (en especial cuando son fosforiladas por MAPK en la fase S) al unirse a queratina [169]. Este proceso altera el transcurso normal de queratinización de la célula y lleva a la desorganización y al colapso del citoesqueleto [16, 169, 296, 297]. Al respecto, las citoqueratinas en las células epiteliales existen como filamentos insolubles y como monómeros solubles en un equilibrio dinámico dado por la fosforilación (generando monómeros) y la asociación con el "factor de solubilidad" celular 14-3-3, pero en presencia de multímeros de E4 la red de filamentos se reticula, y aunque el factor de solubilidad 14-3-3 todavía puede unirse, los monómeros de queratina fosforilados no pueden solubilizarse adecuadamente [169]. De esta forma, en las capas epiteliales superiores, E4 es escindida en su N-terminal por la calpaína y se ensambla en fibras de tipo amiloide que desorganizan el citoesqueleto optimizando la liberación de viriones en células descamadas [298]. Además, la unión de E4 a las mitocondrias por su motivo de leucina, puede promover la apoptosis al inducir la aglomeración de mitocondrias por su desprendimiento de los microtúbulos [16, 173].

b) Arresto celular en G2.

Las especies de E4 16kDa generan paro celular en G2 [12, 291], posiblemente para contrarrestar la proliferación de queratinocitos mediada por E6 y E7 en las capas epiteliales intermedias [12, 268, 299]. Para esta función es esencial el dominio de arresto (clúster de prolina) en E4 que se piensa contiene un motivo de unión a ciclina, un sitio de fosforilación dependiente de CDK y una NLS [291]. E4 de HPV-16 tiene el efecto de detener el ciclo celular de queratinocitos con un contenido de DNA 4n, de esta forma, la mayoría de las células infectadas entran en arresto tras la replicación en la fase S inducida por E6 y E7. Este arresto en G2 puede que se manifieste *in vivo* como un arresto en estado de pseudo-fase S, en el que se puede continuar la replicación del genoma viral pero no del celular, ya que el HPV posee sus propias proteínas de inicio de replicación (E1 y E2) y no es afectado por el arresto [291], manteniendo la cantidad de nucleótidos y de factores de replicación en niveles adecuados para el virus, situación similar a la que ocurre con otros virus (como CMV, siglas en inglés de *Cytomegalovirus* y EBV, siglas en

inglés de *Epstein-Barr Virus*) [268, 293]. Dicha inhibición de la transición G2/M del ciclo celular por la isoforma 16 kDa de E4 se da mediante el secuestro del complejo celular CDK1/Cyc B1 en la red de citoqueratina para prevenir su acumulación nuclear [16, 169, 268, 291, 295]. Dada su localización genómica y su expresión coordinada, es posible que E2 y E4 cooperen para promover el arresto celular en G2 [299].

c) Regulación de la transcripción viral.

La presencia de E4 parece importante para la regulación de la expresión de las proteínas tempranas (E) y la inhibición de la expresión prematura de las proteínas tardías L1 y L2 [12, 299]. Aunque los mecanismos por los cuales E4 contribuye a estos procesos se desconocen [169], podría deberse a que el ORF de E4 posee un elemento potenciador de empalme requerido para el empalme de mRNA viral temprano [299]. Por otra parte, E4 podría bloquear la expresión prematura de genes tardíos al establecer un fuerte acoplamiento con la señal de poliadenilación temprana [299]. Al inhibir la expresión prematura de las proteínas de cápside, E4 influye indirectamente en la capacidad del HPV para evadir la respuesta inmunológica [299]. Cabe mencionar que, en infecciones productivas de HPV, E4 es útil como marcador de las etapas finales del ciclo viral [2]. Los marcadores de expresión de E6 y E7 se pierden poco después de la aparición de E4 (Figura 15), lo cual se explica debido a que E2 muestra un patrón de expresión similar al de E4, y niveles altos de E2 conducen a la inhibición del promotor p97 encargado de la expresión de E6 y E7 [2].

La expresión en alto nivel de E4 coincide con la amplificación del DNA de HPV en células en diferenciación de las capas intermedias del epitelio, y persiste en las células que expresan las proteínas de la cápside y que se encuentran en plena producción de viriones en la superficie [169, 268]. Su nivel de expresión y función apunta a un papel importante de E4 en las etapas tardías del ciclo viral [2, 159], sin embargo, históricamente E4 se clasificó como una proteína temprana (E) porque se encuentra en la región E del genoma viral, entre genes que regulan el ciclo celular y el mantenimiento del DNA viral, aunque no se ha descrito ninguna función de E4 durante las primeras etapas del ciclo viral [169].

L1 y L2

La cápside de los HPV está compuesta por dos proteínas virales altamente conservadas: la principal es L1, con un peso de aproximadamente 55 kDa y la menor es L2, de aproximadamente 75 kDa [1, 300]. La longitud de L1 y L2 es de aproximadamente 500 aminoácidos, aunque varía ligeramente entre los genotipos de PV [300]. Las cápsides de los HPV tienen un diámetro máximo de aproximadamente 60 nm compuesto de 360 moléculas de L1 y hasta 72 moléculas de L2 [300, 301]. Para formar la cápside, L1 se autoensambla en capsómeros de cinco moléculas gracias a la interacción de sus dominios y por puentes disulfuro; setenta y dos capsómeros se asocian para formar una red icosaédrica T=7 (Figura 33 A) [301]. El centro de cada capsómero se compone de un sándwich β antiparalelo al que contribuyen ocho láminas β , etiquetadas de la letra B a I. Los bucles superficiales BC, DE, FG y HI conectan a las láminas β y contienen los principales epítomos neutralizantes (Figura 33 B) [302, 303]. Aunque las proteínas L1 están muy bien conservadas entre los PV, los bucles son distintos entre los diferentes tipos virales [300], lo cual se traduce en diferencias estructurales responsables de la especificidad de los anticuerpos neutralizantes por tipo de HPV [304]. Las cinco moléculas L1 dentro de un capsómero están íntimamente asociadas mediante sus estructuras secundarias (Figura 33 C). La mayor parte del extremo carboxilo de L1 está expuesto, lo que proporciona superficies de unión a receptores para la entrada a la célula hospedadora y favorece la creación de anticuerpos neutralizantes [301]. A diferencia de L2, L1 puede autoasociarse para formar VLPs (del inglés *Virus-Like Particles*) [4] que inducen anticuerpos neutralizantes y son la base de las vacunas existentes para el HPV [131].

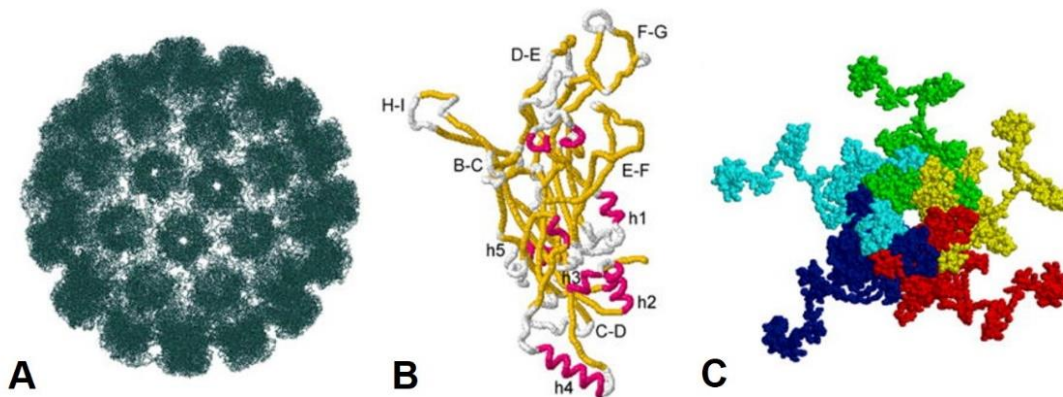


Figura 33. Estructura de la proteína L1 de HPV-16. (A) Estructura de una cápside T=7 de HPV-16. (B) Monómero de L1: las hélices α están resaltadas en rosa, los cinco bucles de superficie están marcados en blanco (además del bucle interno C-D). (C) Vista superior de un pentámero L1 (figura de estrella). Los monómeros de L1 se muestran en diferentes colores para resaltar el entrelazado de las moléculas [301].

Los viriones de HPV pueden contener hasta 72 proteínas L2 (aún se desconoce si L2 está presente en algunos o todos los capsómeros *in vivo*) [300]. L2 está mayormente oculta dentro de la cápside (Figura 34) y sólo pequeñas porciones del extremo amino (residuos 60–120) están expuestas [305]. El extremo amino se pliega hacia el interior de la cápside, haciéndolo inaccesible [306], pero después de la unión celular esta región experimenta cambios conformacionales [301]. En L2 de HPV-11 se describió un sitio de unión a L1 en su extremo carboxilo caracterizado por ser rico en prolina, similar al motivo rico en prolina responsable de interacciones proteína-proteína descrito en E4 [4].

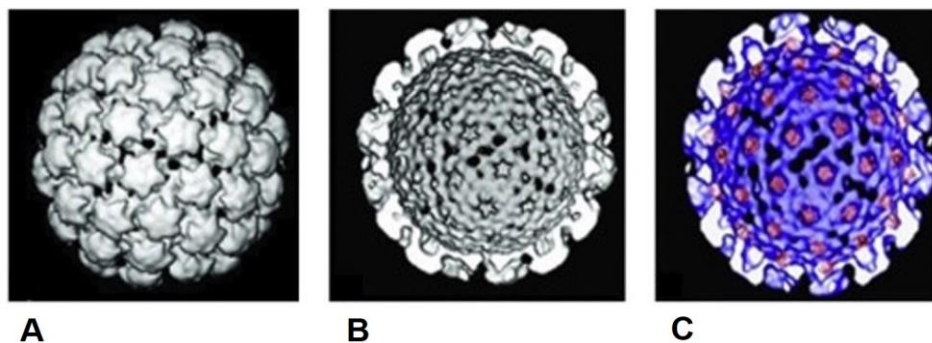


Figura 34. Reconstrucciones 3D de la cápside vacía de HPV-16. (A) Vista exterior (B) Vista interior (C) Disposición de L1 (azul) y L2 (rojo) [307].

La inhibición exitosa de la expresión génica tardía (L) al comienzo del ciclo viral es esencial para la persistencia de la infección. La expresión de L1 y L2 está restringida a queratinocitos diferenciados terminalmente ya que su inducción prematura podría resultar en la detección por parte la respuesta inmune y la eliminación del virus [299]. Las proteínas de la cápside desempeñan roles críticos para el establecimiento de la infección viral ya que protegen el material genético viral y son necesarias para la entrada del virus a la célula blanco, el escape endosómico, el transporte nuclear del DNA viral en las células basales y el ensamblaje y estabilidad del virión en las células epiteliales en diferenciación [1, 4, 300, 308]. La interacción del virión con la superficie de las células es principalmente por L1, mientras que L2 contribuye a interacciones secundarias en el establecimiento de la infección [308].

a) Unión a la célula hospedera.

El principal receptor de unión de viriones de HPV son los proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG, siglas en inglés de *Heparan Sulphate Proteoglycans*) [301]. Antes de entrar a las células blanco, los viriones se unen a HSPG en la membrana basal del epitelio (HSPG1) [308] (Figura 35) para después ser transportados mediante protuberancias ricas en actina hacia los queratinocitos basales, donde interactúan con HSPG presente en la superficie celular (HSPG2). Esta interacción induce cambios conformacionales en L1 y L2 que son un requisito para la interacción con un receptor secundario diferente a HSPG aún no identificado (se ha sugerido el receptor de adhesión celular $\alpha 6$ -integrina, pero su participación en la infección por HPV es controvertida) [308-310]. Se ha propuesto que los cambios conformacionales de L1 (que parecen afectar al bucle BC) resultan en una afinidad reducida de la cápside con HSPG, lo que ayuda a su transferencia al receptor secundario [306]. En L2, los cambios conformacionales dan como resultado la exposición de un sitio de reconocimiento y escisión por parte de la convertasa de furina celular en el extremo amino terminal. Esta escisión ocurre en la superficie celular y es esencial para el escape endosómico del DNA viral en las siguientes etapas del establecimiento de la infección [306-311].

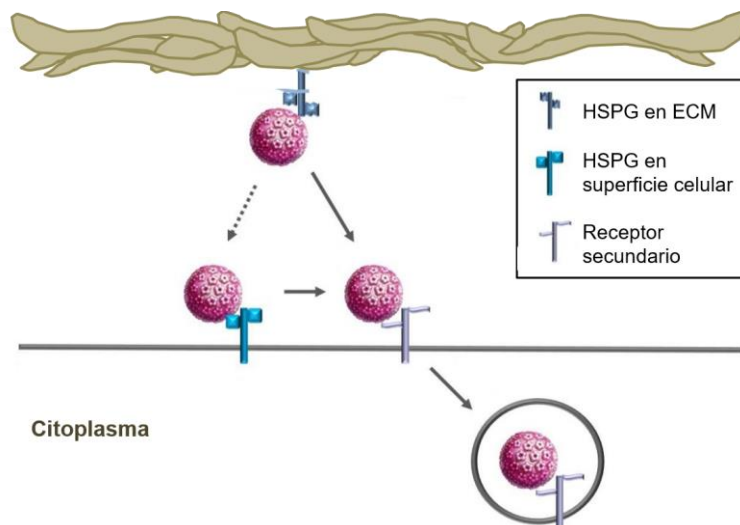


Figura 35. Modelo de la interacción de la cápside de HPV con la membrana basal o matriz extracelular y la superficie celular. HSPG, un receptor de superficie celular expresado ampliamente, se sugiere como el receptor de unión inicial para los HPV y se encuentra con frecuencia en la matriz extracelular y en la superficie de la mayoría de las células. Modificado de [308].

Los viriones de HPV pueden asociarse con diferentes linajes celulares debido a la presencia universal de HSPG, pero sólo completan su ciclo viral en queratinocitos diferenciados del epitelio escamoso [308]. Por lo tanto, si bien los primeros eventos de infección pueden ser similares en los tipos de células permisivas y no permisivas, existe una restricción de las funciones replicativas virales y la producción de viriones que está determinada por factores vinculados al programa de diferenciación de queratinocitos [308].

b) Internalización de viriones.

El virus se internaliza en un proceso parecido a la macropinocitosis [312] que toma aproximadamente 14 horas [301], posiblemente con el uso de microdominios enriquecidos con tetraspanina [313]. Se han observado diferencias sutiles al estudiar la internalización utilizando células inmunes, por ejemplo, las VLP de L1 ingresan a las células a través de mecanismos dependientes de clatrina o de caveolas, mientras que las VLP de L1/L2 son internalizadas por mecanismos independientes de estos procesos, lo que sugiere que L2 puede afectar la vía de ingreso a estas células [314]. Por otra parte, no existe una diferencia clara en los mecanismos de ingreso en las células epiteliales con respecto a las L1-VLP y L1/L2-VLP, pero se ha propuesto que la escisión por furina expone en la superficie de la cápsida una región previamente oculta de L2 que puede unirse al receptor de entrada desconocido y facilitar la entrada del virus, haciéndolo capaz de explotar rutas alternativas en caso del bloqueo de la ruta típica [4].

c) Exposición del genoma viral y salida de endosomas.

Inicialmente, las L1-VLP y L1/L2-VLP parecen transitar de manera similar, pasando de endosomas tempranos a endosomas tardíos [315], pero en éstos últimos, donde se requiere el pH bajo para el desnudamiento del DNA viral (vDNA), la contribución de L1 al proceso de entrada viral parece terminar [316], pues el DNA empaquetado dentro de las L1-VLP no es capaz de escapar de los endosomas tardíos, a diferencia de los VLP que contienen L2, donde el complejo genoma viral-L2 escapa y es transportado a la red trans-Golgi antes de ser llevado al núcleo [317]. Esta separación del complejo genoma viral-L2 (L2-vDNA) y L1 parece estar mediada por la acción de la ciclofilina (Cyp, siglas en inglés de *Cyclophilin*) y SNX17 (siglas en inglés de *Sorting Nexin-17*) [318, 319]. El escape

endosómico de L2-vDNA podría explicarse por una región en el extremo carboxilo de L2 que contiene residuos hidrofóbicos adyacentes a aminoácidos cargados positivamente que en conjunto tienen actividad disruptora de membrana [301]. La delección y las mutaciones puntuales dentro de esta región producen pseudovirus no infecciosos *in vitro*, a pesar de que las interacciones de la superficie celular no se afectan [301]. Como se mencionó, la escisión de L2 por furina en la superficie celular también es esencial para el escape endosómico [306, 311], aunque no está claro cómo este procesamiento proteolítico contribuye después a la salida de los endosomas [301].

d) Transporte del DNA viral al núcleo.

L2 transporta y acompaña el genoma viral al núcleo [301]. Al respecto, se ha descrito que la proteína L2 del HPV-16 accede al núcleo al interactuar mediante 40 aminoácidos en su región C-terminal con la red de microtúbulos a través de la dineína [301, 320]. Pese a la presencia de la NLS en L2, se sabe que el complejo L2-vDNA, requiere la descomposición de la envoltura nuclear durante la mitosis para ingresar al núcleo [321]. Una vez dentro del núcleo, L2-vDNA viaja a los cuerpos nucleares ND10 (siglas en inglés de *Nuclear Domain 10*) para los eventos de transcripción y replicación tempranos de la infección [322]. Algunos estudios sugieren interacciones entre L2 (residuos amino-terminales 1-50) y E2 en ND-10 al inicio de la infección, lo que propone un papel de L2 en la transcripción viral temprana a medida que se inicia la infección [4].

e) Formación de viriones.

Las proteínas estructurales L1 y L2 se expresan en la etapa tardía del ciclo viral para formar las cápsides que empaquetarán los genomas amplificados y que darán lugar a los viriones de HPV [1]. En queratinocitos terminalmente diferenciados, L1 y L2 de HPV-16 se transcriben a partir del promotor tardío p670 [4, 316] y son transportadas al núcleo utilizando el heterodímero de carioferina $\alpha\beta 1$ [323]. Una región polibásica altamente conservada en el extremo carboxilo de L1 media su importación en forma de capsómeros pentaméricos para su posterior ensamblaje en cápsides [324, 325], mientras que L2 es importada al núcleo a través de los poros nucleares al interactuar con carioferinas y Hsp70, y gracias a NLS presentes en sus extremos amino y carboxilo [4]. L1 y L2 tienen

actividad de unión al DNA *in vitro* mediada por la región polibásica C-terminal de L1 y el extremo N-terminal de L2 [326, 327], lo que sugiere que ambas proteínas pueden ayudar en el empaquetamiento del genoma al unirse directamente al DNA sin especificidad de secuencia [4]. También se ha reportado que L2 es necesaria para la encapsidación eficiente del genoma viral en BPV1 [328], aunque el efecto puede que sea menos pronunciado para HPV-16 [4]. Tras la interacción con el genoma viral circular de ~8 kbp unido a histonas celulares, L1 y L2 se ensamblan a nivel de capsómeros [329] y polimerizan para dar lugar a la cápside [4], cuya maduración se da por la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre los capsómeros adyacentes de L1 [316]. De esta forma, los viriones maduros son liberados de la superficie del epitelio escamoso [1], completando el ciclo viral.

A manera de resumen, en la Tabla 3 se integran las funciones mencionadas en este capítulo de las proteínas de HPV de alto riesgo (HPV-16).

Tabla 3. Funciones de las proteínas de HPV de alto riesgo (HPV-16)

Proteína	Funciones	Fuentes
E1	Replicación del genoma viral: helicasa viral	256, 267
E2	Regulador principal de la transcripción viral, especialmente de E6 y E7 Reclutar E1 al <i>ori</i> para iniciar la replicación viral Repartir el genoma viral a células hijas Inducir arresto celular y apoptosis	175, 248, 249 255-257 1, 261 258-260
E4	Favorecer la liberación de viriones Inducir arresto celular Regular la transcripción viral de proteínas L Escapar a la respuesta inmune	169, 296-298 12, 291 12, 299 12, 299
E5	Oncoproteína Perturbar el tráfico y acidificación de endosomas Estimular la proliferación celular Alterar la comunicación célula-célula Escapar a la respuesta inmune Inhibir la apoptosis	178 11, 271, 276 16, 271, 283, 287, 271, 283 271, 277-282 149, 284-286

Proteína	Funciones	Fuentes
E6	Oncoproteína Evitar la apoptosis Estimular la proliferación celular Inhibir la diferenciación celular Inducir inestabilidad cromosómica Escapar a la respuesta inmune Activar la telomerasa y el gen inductor de angiogénesis VEGF Entorpecer la reparación del DNA	178 16, 160, 223, 235, 236, 238 16, 160, 240-243 160 245 16, 223, 237 * *
E7	Oncoproteína Estimular la proliferación celular Inhibir la diferenciación celular Escapar a la respuesta inmune Inducir inestabilidad cromosómica	178 152,159 16, 196, 208 158, 209, 213-217 152, 191, 218,
L1	Componente principal de la cápside Entrada viral: Interacciones iniciales con el hospedero Empaquetar el vDNA Formar viriones	1 301, 308 326, 327 329
L2	Componente menor de la cápside Entrada viral: Interacciones secundarias con el hospedero Permitir la salida del vDNA de los endosomas del hospedero Empaquetar el vDNA Formar viriones	1 306 317 326, 327 329

* Estas funciones se revisarán en el capítulo 3.3

La historia natural de una infección por HPV de alto riesgo con o sin tratamiento varía desde la regresión espontánea hasta la persistencia, dependiendo de la capacidad del sistema inmunológico para detectar y eliminar la infección. De las personas infectadas que no logran eliminar la infección, algunas pueden desarrollar una infección latente asintomática, mientras que otras corren el riesgo de desarrollar cáncer [106]. La progresión oncogénica no es un resultado típico de la infección [1], pero a lo largo de aquellas infecciones persistentes por HPV de alto riesgo, una desregulación en la expresión de sus oncoproteínas puede conducir al desarrollo de lesiones cancerosas [156] donde la replicación del genoma viral es prácticamente nula y no se generan viriones (infección abortiva) [2, 12]. Los diferentes eventos y funciones de las oncoproteínas del HPV necesarias para la progresión carcinogénica de una lesión de HPV de alto riesgo se revisarán en el siguiente capítulo.

3.3 Persistencia viral y el proceso de transformación de las células

La infección con tipos de HPV de alto riesgo interfiere en el control de distintos procesos biológicos con el fin de generar y mantener el fenotipo transformado que permite la replicación del virus y la formación de viriones [16]. La mayoría de los individuos inmunocompetentes son capaces de eliminar la infección sin manifestaciones clínicas [84, 85], pero una porción de las personas infectadas que no logran eliminar la infección corren el riesgo de desarrollar cáncer [106, 149] debido a que a lo largo de la infección persistente, ocurre la desregulación en la expresión de las oncoproteínas virales que favorece que las células infectadas adquieran características anormales que pueden conducir al desarrollo y progresión de lesiones cancerosas [156]. Algunos determinantes que han sido asociados a la persistencia y progresión maligna de lesiones HPV+ son [52, 130-132, 149]:

a) Factores de riesgo virales

- **HPV de alto riesgo.** Como se explicó en el capítulo 3, dependiendo de su asociación con el desarrollo de neoplasias malignas, los tipos de HPV que infectan mucosas han sido clasificados como de alto o bajo riesgo (oncogénicos o no oncogénicos) [24]. La persistencia de un tipo de HPV de alto riesgo (HR, por sus siglas en inglés de *High Risk*) es el factor de riesgo clave para la progresión a OPC HPV+ [21, 25, 26, 74, 84], siendo el HPV-16 el más importante debido a su alta prevalencia (80-90% de los casos) [21, 33, 50, 69], su tasa de persistencia (40% de las infecciones orales por HPV-16 se han detectado de forma persistente durante 4 años o más) [85] y su capacidad para promover la progresión de la infección a cáncer [131]. En cambio, la infección persistente con tipos de HPV de bajo riesgo (LR, por sus siglas en inglés de *Low Risk*) no es un factor de riesgo para desarrollar OPC debido a que sus oncoproteínas carecen de actividad transformante *in vitro* e *in vivo* [20, 160, 330]. Por ejemplo, a diferencia de lo que ocurre con HPV-HR [221, 331, 332], las proteínas E6 de tipos de HPV-LR degradan p53 y BAX con menor eficacia [331, 333], no aumentan la actividad de la telomerasa celular [178] y carecen de motivos de unión a PDZ [240, 334], por lo que son incapaces de inducir la degradación de una

amplia gama de proteínas celulares [221, 331, 332]. Además, en general, las LR-E7 no promueven eficazmente la degradación de pRb [192, 335].

Las diferencias en actividad y potencial transformante entre las oncoproteínas de HPV-HR y -LR reside en las diferencias genéticas en sus ORF tempranos [131]. Las secuencias de los genes E6 y E7 del género alfa (los tipos de HPV que infectan preferentemente la mucosa oral o anogenital en humanos y primates) [1] están muy conservadas (>75% y >65% de homología, respectivamente), sin embargo, cuando sólo se consideran los tipos de HPV-HR del género alfa, las homologías aumentan hasta el 80% para las secuencias E6 y hasta el 70% para las secuencias E7 [16].

- **Variantes y subvariantes.** Las variantes se definen como HPV que difieren más de 1% pero menos de 10% en la secuencia genética de L1 [6], y algunas variantes de los HPV-HR se caracterizan por una mayor actividad oncogénica [14, 336]. Por ejemplo, el HPV-16 posee 4 variantes (A, B, C y D) y 10 subvariantes. Los nombres originales de las subvariantes derivan del área geográfica de las poblaciones en las que se aislaron inicialmente, pero se recomienda ya no usar dicha terminología y en cambio usar las siguientes claves alfabéticas: A1-A3 para la subvariante Europea, A4 para la Asiática, B1 para la Africana-1 Afr1a, B2 para la Africana-1 Afr1b, C para la Africana-2 Afr2a, D1 para la Norteamericana (NA)1, D2 para la Asiática-Americana (AA)2 y D3 para la Asiática-Americana (AA)1 [14, 337, 338].

Todas las variantes y subvariantes de HPV-16 son carcinogénicas, aunque difieren en su capacidad para establecer infecciones persistentes e inducir el desarrollo de malignidad [339, 340]. Las variantes virales B, C, D y subvariante A4 son más propensas que las A1-A3 a causar persistencia, de hecho, las variantes B, C y D del HPV-16 se han asociado con un riesgo de cáncer al menos cinco veces mayor en comparación con las A1-A3 [340, 341]. Aunado a esto, mutaciones puntuales en el ORF de E6 (E6-T350G) y en LCR (LCR-G7518A) se han asociado con la persistencia de la infección y carcinogénesis, respectivamente [342, 343]. Los polimorfismos entre variantes sólo se han estudiado en CC, por lo que hoy día se desconoce el impacto que tienen en OPC HPV+.

- **Carga viral.** La carga viral alta es un fuerte predictor de la persistencia del HPV oral [344, 345]: por cada disminución x10 en el número de copias, hay un aumento x3 en la probabilidad de eliminación de la infección [345]. En general las lesiones cancerosas HPV+ en orofaringe presentan una amplia variación en la carga viral (10-15,400 copias de HPV-16 por copia de beta-actina) [346-350] pero se ha observado un aumento en la carga viral de HPV-16 antes de progresar a OPC [345].

b) Factores de riesgo no virales

- **Mutágenos.** La orofaringe está expuesta al contacto con agentes carcinógenos como lo son el alcohol y el tabaco, que pueden inducir mutaciones que favorecen la iniciación de tumores [42, 52, 54]. El tabaquismo se ha asociado con una mayor probabilidad de contraer una infección oral por HPV-HR en hombres: en comparación con los que nunca han fumado, el riesgo es tres veces mayor en los fumadores actuales y dos veces mayor en los exfumadores. Asimismo, el tabaquismo actual se ha asociado con una mayor persistencia de la infección oral [85, 86]. El mecanismo biológico exacto de este vínculo aún no se ha establecido, pero se sabe que la exposición al tabaco aumenta la permeabilidad de la mucosa oral y respiratoria e induce efectos proinflamatorios e inmunosupresores que podrían facilitar la infección por HPV [85, 351, 352].
- **Hormonas.** Las hormonas, en particular los estrógenos (hormona sexual femenina), son importantes promotores de tumores en algunos cánceres humanos [42]. Evidencia contradictoria presenta una relación pro y anticancerígena entre el estrógeno y el HPV [353]. Con relación a su papel en la transformación celular, históricamente, la evidencia ha sugerido que la señalización de estrógenos en combinación con cánceres relacionados con HPV aumenta su progresión, además que el estrógeno está involucrado en la carcinogénesis al promover la progresión del ciclo celular, la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis, lo que hace que las células sean vulnerables a mutaciones [354-356].

En el CC y en OPC, las oncoproteínas del HPV inducen la expresión de A3A o APOBEC3A (siglas en inglés de *Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like 3A*) [357], una desaminasa de citidinas del DNA con efectos antivirales por la destrucción de DNA extraño [358]. En condiciones normales, A3A es inducida por interferón y se expresa altamente en queratinocitos, monocitos y macrófagos [358, 359], sin embargo, se ha reportado que en presencia de HPV, A3A también es inducida por el tratamiento con estrógeno, por lo que en este contexto, se ha especulado que los genes de HPV inducen A3A activando la señalización del receptor de estrógeno [357]. A pesar de que es parte de la respuesta inmune antiviral, se ha informado que A3A promueve la hipermutación del DNA del HPV y su integración al genoma del hospedero, e influye en el desarrollo de tumores en el CC y líneas celulares de OPC [357, 360].

Un hallazgo importante es que el estrógeno se asoció con OPC, una enfermedad más común en los hombres que en mujeres, mientras que la expresión de A3A en OPC se asocia con un buen pronóstico clínico [353]. Si bien se necesitan más estudios, se ha propuesto que el alto nivel de estrógeno circulante en las mujeres podría ayudar en la eliminación de la infección del HPV por inhibición del ciclo viral en la región de la cabeza y el cuello a través de A3A, molécula que induce roturas de doble cadena en el DNA para promover el arresto del ciclo celular y la apoptosis [353, 361, 362]. Además, la hipermutación del DNA del HPV por A3A se asocia con un pronóstico favorable, probablemente debido a una mayor inmunogenicidad [363, 364]. Se puede observar más evidencia clínica estrogénica (más allá de las diferencias en frecuencia y gravedad del OPC HPV+ entre sexos) en varios estudios clínicos que indican que la expresión del ER α (siglas en inglés de *Estrogen Receptor alpha*) se correlaciona con la supervivencia del paciente y que algunos tumores HPV+ han respondido muy bien al tratamiento con estrógenos [365-368].

- **Sistema inmunológico comprometido.** La persistencia y progresión a cáncer de una lesión HPV+ depende en gran parte de la capacidad del sistema inmune del hospedero para combatir la infección [126, 369]. La

mayoría de los individuos inmunocompetentes son capaces de eliminar la infección sin manifestaciones clínicas debido al desarrollo gradual de una respuesta inmune contra el HPV [87, 88, 135], pero se ha encontrado que las personas inmunocomprometidas como aquellas con HIV/AIDS (AIDS, del inglés *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) o que son receptores de trasplantes de órganos, tienen tasas más altas de cánceres relacionados con el HPV [42]. La inmunosupresión crea un entorno permisivo para la oncogénesis mediada por virus [141], por lo que un sistema inmunológico más débil podría reducir la tasa de erradicación de las infecciones oncogénicas por HPV o podría promover la reactivación de una infección por HPV latente [111, 370]. Varios estudios sugieren que las alteraciones en la respuesta inmune celular juega un papel importante en la persistencia del HPV [371], particularmente recuentos bajos de linfocitos CD4+, células que tienen un papel importante en el control de la infección [371, 372].

Cabe resaltar la relación entre HPV, HIV y el OPC: la infección por HIV reduce la probabilidad de eliminación del HPV [373, 374] por la inmunosupresión inducida [375], lo que se correlaciona con un riesgo 2 a 3 veces mayor (comparado con individuos HIV-) de tener una infección persistente por HPV [376], aumentando el riesgo de desarrollar OPC [375]. La cuenta baja de CD4+ no es el único factor involucrado en la infección persistente por HPV en individuos HIV+ [371, 373, 377, 378]. El HIV puede interactuar con el HPV y alterar su ciclo natural de infección en formas que no se limitan a la disminución en el recuento de células CD4+, y aunque esto no se ha estudiado en la orofaringe, se ha descrito que mujeres HIV+ tienen una respuesta alterada de citocinas ante la infección por HPV en la mucosa cervical, con niveles de IL-10 (citocina inmunosupresora) hasta 6 veces más altos que los de las mujeres HIV- y HPV+ [371, 379]. Asimismo, se ha descrito que la proteína Tat-1 (Tat, siglas en inglés de *Trans-Activating regulatory protein*) del HIV-1 se puede expresar en células alrededor del estroma cervical y puede ser incorporada a los queratinocitos infectados por HPV llevando a un aumento en la expresión de E6 y E7. Tat-1 también puede promover la migración de queratinocitos infectados, mientras que la expresión aberrante de citocinas por los linfocitos T

infectados por HIV puede modular la respuesta inmune local y la expresión de genes del HPV en queratinocitos [380].

- **Predisposición genética.** Se ha informado del papel de los polimorfismos del antígeno leucocitario humano (HLA, siglas en inglés de *Human Leukocyte Antigen*) en la susceptibilidad al CC y la infección persistente por HPV [381]. Para OPC, aunque ningún polimorfismo de HLA se ha asociado como factor de riesgo para este tipo de cáncer HPV+ o la persistencia del virus, se ha descrito una asociación protectora con el haplotipo de clase II HLA-DRB1*1301–HLA-DQA1*0103–HLA-DQB1*0603 [381]. Estos polimorfismos de HLA son comunes en población europea y también se han asociado con una disminución del riesgo de CC [382].

Además, se ha descrito que el polimorfismo de p53 en el codón 72 que puede codificar para arginina o prolina, puede modificar el riesgo de desarrollar cáncer HPV+ [383]. Al respecto, se ha reportado que la variante de arginina podría ser un marcador de susceptibilidad [384] ya que es más prevalente en el CC probablemente porque es más susceptible a la degradación por E6 de HPV-16 [383], pero análisis similares en diferentes poblaciones no apoyaron estos hallazgos [11, 385, 386].

3.3.1 Integración al DNA del hospedero

Actualmente, el modelo más validado para explicar el potencial oncogénico de la infección persistente por HPV-HR es la integración del DNA episomal del virus al genoma de la célula hospedera, un evento que no es parte del ciclo normal de replicación del HPV y que no brinda ninguna ventaja productiva, pues dicha integración conduce a una infección abortiva en la que las células ya no pueden producir nuevas partículas virales [387, 388]. Se estima que la integración ocurre entre el 70% y el 85% de los casos OPC HPV+ [106], y las formas episomales e integradas del DNA de HPV-16 pueden coexistir [389-391]. Por lo tanto, el DNA viral a menudo, pero no siempre, está presente de forma integrada [1]. El porcentaje restante de OPC HPV+ sin integración del genoma viral se ha explicado por otro mecanismo, que consiste en un aumento de la expresión de los oncogenes E6 y E7 del genoma episomal del HPV, posiblemente a través de cambios en la cromatina alrededor del promotor p97, ya que la persistencia (con o sin integración) de HPV

contribuye a una amplia variedad de regulaciones epigenéticas en el hospedero, como cambios en la metilación, remodelación de la cromatina, modificaciones de histonas y regulación ascendente/descendente de micro-RNA [392, 393]. Dicho lo anterior, a pesar de que la integración del DNA de HPV no es un paso estrictamente necesario para la carcinogénesis [350], es el modelo actualmente más validado y más frecuentemente observado en la práctica clínica [106], por lo que será el mecanismo que se discutirá a continuación.

Durante la infección productiva del HPV, el genoma viral se mantiene episomal y su número de copias y expresión está altamente asociado con el programa de diferenciación de la célula hospedera [2]. Sin embargo, las infecciones persistentes por HPV-HR pueden desencadenar inestabilidad genómica en la célula debido a la desregulación gradual de sus oncoproteínas [149] y posteriormente promover la integración del DNA viral en el genoma del hospedero [394, 395], lo cual suele ser un paso en el camino hacia la carcinogénesis inducida por HPV [106]. Esta inserción es el resultado de una recombinación no homóloga y requiere que el genoma del HPV se vuelva lineal para proporcionar un sustrato para la inserción en el genoma del hospedero. La linealización del genoma viral puede producirse tras el daño a la molécula de vDNA o tras el colapso de las horquillas de replicación, generando roturas de doble hebra [396]. Los eventos de integración no parecen ser específicos con respecto a dónde suceden en el DNA del hospedero [150, 397], pero se ha encontrado que el genoma del HPV se integra con más frecuencia en sitios frágiles [353, 398, 399] que son regiones grandes (~150 kb a ~1 Mb), altamente inestables distribuidas por todo el genoma humano, que muestran tendencia a formar roturas de cromosomas y cromátidas, por lo que son blancos preferenciales para el intercambio de cromátidas hermanas, translocaciones, deleciones, amplificación de genes e integración de DNA plasmídico [398].

La integración del vDNA en el DNA de la célula infectada suele interrumpir los ORF de E1 y E2 [52, 106], y se eliminan los genes adyacentes E4, E5 y parte de L2 [149]. En contraste, los ORF de E6 y E7 y el LCR generalmente permanecen intactos (Figura 36) [132, 149]. La pérdida de función de las proteínas E1 y E2 como resultado del evento de integración genera una disminución en la replicación del genoma viral [16, 52], mientras que la disrupción del ORF de E2 deriva en la sobreexpresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 [346]. Durante el ciclo productivo, cuando el HPV ingresa a la célula

hospedera, la transcripción de E6 y E7 se da por la interacción de factores propios de las células basales con el promotor temprano de HPV (p97), así como por la estimulación de E2. Más adelante, una vez que la replicación del genoma viral a altos niveles ha terminado, los niveles de la proteína E2 aumentan y reprimen a p97 (y por ende la expresión de E6 y E7) para permitir el progreso de diferenciación de la célula, que a su vez permitirá la producción de viriones [166]. Por lo tanto, la ausencia de E2 por el evento de integración y la estimulación de p97 por los factores de transcripción celulares [177], da como resultado una sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7, lo cual puede derivar en la transformación de la célula [174].

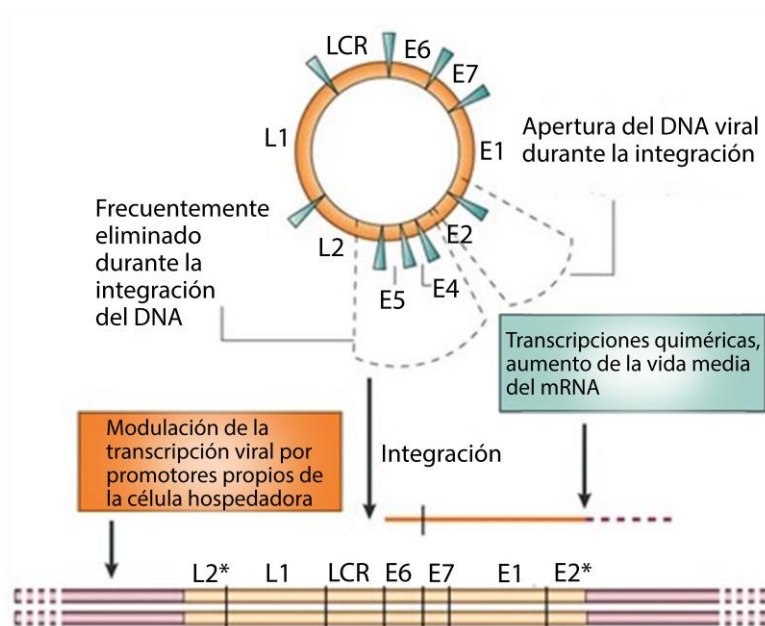


Figura 36. Esquema del DNA circular del HPV y su integración en el DNA de la célula hospedera. E4, E5 y parte de L2, E2 y E1 ORF se eliminan regularmente después de la integración (los genes parciales están señalados con un asterisco). Además, la transcripción viral puede incrementarse por los promotores propios de la célula que flanquean la región donde se inserta el vDNA. Modificado de [149].

La actividad de E2 depende del estado físico de la cromatina: E2 reprime el p97 integrado pero activa el p97 episomal [174]. Esto se puede atribuir a la capacidad de E2 para preservar la acetilación de la cromatina al interactuar con CBP, una acetil transferasa de histonas [174, 400]. Se ha planteado la hipótesis de que la represión de la transcripción del vDNA integrado puede ser para mantener la capacidad de diferenciación celular y concluir el ciclo viral, algo que las células tumorales no pueden hacer [401, 402]. La pérdida de E2 también implica la pérdida de su actividad pro-apoptótica [258-260], un

seguro para evitar problemas en la continuación y conclusión del ciclo viral debido a la inestabilidad en el tejido infectado [246, 248]. Otro punto clave es la pérdida del ORF de E4, que también funciona como un regulador interno de la actividad de E6 y E7 al generar paro celular en G2 para contrarrestar la proliferación de queratinocitos mediada por ambas oncoproteínas en las capas epiteliales intermedias [268, 291, 299], además que E4 juega un papel importante en la finalización del ciclo viral al dar inicio a los eventos tardíos (L) [159].

La integración del genoma viral también puede causar mutagénesis insercional, causando reordenamientos cromosómicos, activación de protooncogenes, alteración o desregulación de funciones celulares críticas y alterando la expresión de factores de crecimiento y sus receptores [403-405]. Se ha propuesto que la mutagénesis insercional es el principal factor promotor en la progresión de cánceres asociados a HPV [406]. Aún queda por determinar si los sitios frágiles son el objetivo de la integración viral simplemente por su inestabilidad innata o si las integraciones en ellos contribuyen específicamente de manera mutacional a la evolución de estos tumores debido a su inestabilidad genómica [398], por ejemplo, alteraciones en los cromosomas 3, 11 y 16 son más frecuentes en OPC HPV+ (comparado con OPC HPV-), y todas ellas se han correlacionado con la integración del vDNA en sitios frágiles (FRA) del genoma celular [64]. Al respecto se ha descrito lo siguiente:

- **FRA3B, amplificación de 3q.** La ganancia en 3q se encuentra con frecuencia en los carcinomas de células escamosas y se considera un evento clave en la progresión a cáncer de las lesiones premalignas de pulmón y cuello uterino [407, 408]. Numerosos protooncogenes se encuentran en el cromosoma 3q, p. ej. ATR, PIK3CA, TP63, TERC, DCUN1D1, LAMP3 y RPL35A [64].
- **FRA11F, pérdida de 11q.** La integración del HPV puede provocar una pérdida prolongada en 11q, donde se encuentran varios genes de reparación del DNA, como ATM y CHEK1 [409, 410].
- **FRA16D, pérdida de 16q.** Contiene al gen WWOX, potente supresor del crecimiento tumoral al mediar la apoptosis inducida por TNF- α [411, 412].

3.3.2 Papel de las oncoproteínas en la malignidad celular por el evento de integración del genoma viral

Cuando el genoma del HPV se integra en el DNA nuclear del hospedero, hay sobreexpresión de E6 y E7 [106] debido a la actividad de los factores de transcripción celular, a los promotores celulares que flanquean el lugar de inserción del vDNA [149] y a que la vida útil de su mRNA aumenta al ser transcrito como parte de un ORF celular (mRNA quimérico) (Figura 36) [16, 106, 149]. Durante la infección productiva, E5, E6 y E7 interfieren con el control de procesos biológicos importantes para generar y mantener el fenotipo transformado que permite la replicación del virus y la formación de viriones, pero sus niveles desregulados en las células infectadas causan la pérdida de control en el ciclo celular y en mecanismos de respuesta a daño del DNA que pueden conducir a la acumulación de aberraciones genéticas que favorecen la progresión del hospedero hacia un fenotipo maligno [149, 413]. Diferentes funciones de las oncoproteínas HPV-HR discutidas en el capítulo 3.2 contribuyen directamente a generar cambios celulares que conducen a la inmortalización y, en última instancia, a la transformación maligna completa de la célula [160]:

E5

Se ha reportado que HPV-16 E5 tiene actividad transformante *in vitro* [11]. Puede promover la formación de tumores en líneas celulares de ratón [289, 414], promover las etapas de progresión de la carcinogénesis cutánea en ratones transgénicos [415], mejorar la capacidad de E6 y E7 para inmortalizar queratinocitos humanos primarios [416] y aumentar la motilidad e invasividad de los mismos [274, 417]. E5 es importante durante las primeras etapas de la infección productiva y sus funciones complementan a las de E6 y E7, sin embargo, de las tres oncoproteínas de HPV-HR, E5 juega un papel menor en la transformación, ya que cuando el vDNA episomal se integra en el DNA de la célula hospedera, se elimina el ORF de E5 (Figura 36) [418], por lo que la expresión de E5 es frecuentemente no detectada a medida que la lesión progresa hacia la malignidad [149, 279]. En aquellos casos donde E5 no se elimina o que las copias episomales coexisten con las integradas, su cooperación en la transformación maligna podría asociarse a las diversas funciones revisadas en el capítulo 3.2 que pueden facilitar la sobrevivencia de la célula en condiciones no aptas que promueven su transformación maligna. Asimismo, debido al desacoplamiento de las uniones estrechas célula-célula propiciado por E5,

existe desensibilización a señales inhibitoras de crecimiento [271, 283], crecimiento independiente de anclaje [285] e invasión a la matriz extracelular [274, 419]. E5 también participa en la inhibición de la diferenciación de queratinocitos [16], en la prevención de la apoptosis por daño al DNA [106] y en la sensibilización a EGF, que lleva a la proliferación celular, rearreglo del citoesqueleto [419] y se suma al crecimiento independiente de anclaje [271, 289]. Otros papeles descritos para E5 implicados en el proceso de transformación son la inestabilidad genómica que genera transformación celular y progresión neoplásica en rondas posteriores de división celular [420-422] por la formación de células binucleadas (fusión célula-célula) y por la duplicación del número de cromosomas por endorreplicación [420, 421]. Asimismo, E5 promueve el crecimiento tumoral y metástasis por la activación del gen inductor de angiogénesis VEGF y el subtipo EP4 del receptor de prostaglandina E2 [423]. Por lo tanto, E5 podría desempeñar un papel en el desarrollo temprano de la neoplasia, sin embargo, al contrario de E6 y E7, no parece ser imprescindible para el mantenimiento del fenotipo transformado [16, 150].

E6 y E7

La oncogenicidad de los HPV-HR se atribuye principalmente a las oncoproteínas E6 y E7, que se retienen y expresan selectivamente durante todas las etapas de la progresión carcinogénica [139]. Durante la infección productiva, E6 y E7 son necesarias para conferir la capacidad de sostener la replicación viral en células que normalmente no serían permisivas [161, 162], ya que la expresión de E7 promueve la proliferación celular al inducir la progresión del ciclo celular de la fase de reposo (G1) a la de síntesis (S) [152], mientras que E6 neutraliza los mecanismos de reparación del DNA, paro del ciclo celular, y apoptosis que se activan como respuesta a la acción de E7 [16, 178].

Las proteínas E6 y E7 de HPV-HR tienen la capacidad de immortalizar y transformar varias líneas celulares [424], confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica [16, 191]. Son capaces de immortalizar de forma independiente varios tipos de células humanas en cultivo de tejidos [1, 424, 425], y aunque algunos estudios han sugerido que E7 es un oncogén más potente en comparación con E6 [426, 427], la eficiencia de transformación general aumenta cuando se expresan juntas [178, 424, 425]. Estas dos proteínas interactúan con un sin número de reguladores celulares importantes en el control de procesos biológicos como: la apoptosis, proliferación celular, estabilidad

cromosómica, transcripción de genes, diferenciación celular, respuesta inmunológica, entre otros (descripción en capítulo 3.2). Por ello, el papel de estas proteínas en la transformación podría asociarse con la exacerbación de sus funciones debido a la desregulación de su expresión por la pérdida de E2 en el evento de inserción, dando como resultado pérdida de control en el ciclo celular y en mecanismos de respuesta a daño del DNA que conducen sinérgicamente a la oncogénesis por la inestabilidad del genoma en el tejido infectado y acumulación de mutaciones [16]. De manera específica se puede encontrar lo siguiente para cada una de las oncoproteínas:

a) E6

- **Acumulación de mutaciones genómicas en los queratinocitos infectados.** Las mutaciones son debido a la degradación de p53 y otras proteínas reparadoras del DNA como XRCC1 (siglas en inglés de *X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1*) [428], O6MGT (siglas en inglés de *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) [178], MGMT (del inglés *O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase*) [429] y MCM7 (MCM, siglas en inglés de *Minichromosome Maintenance Complex Component*) [16], aumentando la inestabilidad genética de las células infectadas [152, 430].
- **Inhibición de la apoptosis.** E6 bloquea la apoptosis por medio de su interacción con diversas moléculas, como p53 [160], Bak [178], procaspasa 8 [178], MAGI-2 y -3 [221], NF-KB [178], IRF3 [178], TLR9 [16], TNF [233], entre otras, permitiendo la extensión del tiempo de vida de las células infectadas en condiciones no aptas y dejando a la célula desprotegida de los efectos perjudiciales de las mutaciones en su DNA [160].
- **Promoción de la proliferación celular y crecimiento independiente de anclaje.** Al incrementar la actividad de la vía de señalización de MAPK [244], y al entorpecer las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular por la interacción de E6 con proteínas como MAGI-1 [221], hDIg [240], hScrib [241], paxillina [242]. La pérdida de la adhesión, polaridad celular y estructura del citoesqueleto puede contribuir al establecimiento de un proceso de carcinogénesis [431], ya que el contacto celular con la matriz y otras células es necesario para mantener la morfología y para controlar la

proliferación y migración celular [160]. La pérdida de la dependencia del anclaje juega un papel importante en la oncogénesis, pues contribuye al desarrollo de un fenotipo metastásico [160].

- **Entorpecimiento de la diferenciación celular.** E6 de HPV-16 afecta la diferenciación al interrumpir el contacto entre las células y la matriz extracelular [106, 160] y posiblemente al interactuar con el receptor E6BP, lo cual aumenta la resistencia de los queratinocitos al calcio [238, 239].

b) E7

- **Promoción de la proliferación celular.** E7 inhibe la expresión o acción de reguladores negativos del ciclo celular (pRb, p107 y p130 [190, 193], p21, p27 [16], TGF- β 2 [16, 208]) mientras activa proteínas relacionadas con la promoción de la transición celular G1/S y la síntesis de DNA (A/CDK2, E/CDK2 [203], Cdc25A [204], AP-1 [205]) [1, 424]. E7 también activa la enzima α -glucosidasa [212], lo que puede impulsar la hiperproliferación celular por agotamiento de reservas de glucógeno o representar los requerimientos de energía de células que proliferan descontroladamente [152]. Además, E7 provoca un incremento en los niveles del factor de transcripción c-Myc y aumenta su actividad de transactivación [205]. c-Myc forma parte de la familia de protooncogenes MYC, que se encuentra entre los genes más estudiados en el cáncer ya que activan la expresión de muchos otros involucrados en la proliferación y a menudo se expresan de forma constitutiva en el cáncer [432].
- **Entorpecimiento de la diferenciación celular.** Los reguladores negativos del ciclo celular mencionados en el párrafo anterior juegan un papel importante en promover la diferenciación en los queratinocitos [16], por lo que al ser inhibidos por E7 se perturba el estrecho vínculo entre la diferenciación celular y la proliferación en el epitelio normal, lo que permite que el virus se replique en células en proceso de diferenciación que ya han salido del ciclo celular y no son permisivas para la síntesis de DNA [152, 159].

Las funciones adicionales descritas para E6 y E7 que no son indispensables para completar la infección productiva de HPV pero están implicadas en el proceso de transformación maligna son:

a) E6

- **Activación de la telomerasa celular.** E6 puede inducir la transcripción de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT, del en inglés de *Human Telomerase Reverse Transcriptase*) por un mecanismo que parece estar mediado por la degradación de NFX1-91 (represor del promotor de hTERT) por E6/EAP [433, 434]. Se desconoce la razón por la que el HPV activa la telomerasa, ya que la inmortalización de las células no es necesaria para la replicación del HPV. Una posibilidad es que la activación de la telomerasa permita una extensión de la vida útil de los queratinocitos que proporciona una ventaja para la replicación, o el hecho de que TERT tenga otras funciones además del alargamiento de los telómeros, tales como la inhibición de la apoptosis, le confiere a ciertos HPV la oportunidad de aumentar su replicación o supervivencia celular [178, 435]. Al entorpecer el proceso de senescencia celular con la telomerasa, se estimula la inmortalización de las células infectadas [160, 401], en consecuencia, existe una fuerte correlación entre la capacidad de E6 de ciertos tipos de HPV para activar el promotor TERT y su asociación con el cáncer [436].
- **Activación del gen del VEGF.** Se ha propuesto que el efecto estimulante de E6 sobre el promotor de VEGF puede deberse a un efecto secundario positivo en la actividad de otros factores de transcripción como Sp-1, o ser la respuesta a la degradación del factor inducible de hipoxia 1 alfa (HIF-1 α , siglas en inglés de *Hypoxia Inducible Factor 1 α*), un factor de transcripción involucrado en la activación del promotor de VEGF en respuesta a hipoxia [437]. El reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos hacia las células transformadas es un paso esencial para la expansión progresiva de los tumores [44].

- **Inestabilidad genómica.** Esta se debe a la acumulación de anomalías del centrosoma y/o multinucleización en células que expresan E6 [245].

b) E7

- **Inhibición de la apoptosis.** E7 se une y promueve la proteólisis de IGFBP-3 (siglas en inglés de *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3*), una proteína que suprime la proliferación e induce apoptosis y que se sobreexpresa en células senescentes [438]. Además, se ha descrito que la pérdida de pRb en células epiteliales, causa una disminución en la apoptosis e induce el crecimiento independiente de anclaje [427].
- **Inestabilidad genómica.** Se pueden encontrar centrosomas supernumerarios y aneuploidía por la activación atípica de CDK2 en células que expresan la proteína E7 del HPV-16 [205]. Esta proteína también induce defectos en la alineación cromosómica durante la prometáfase al provocar la deslocalización de la dineína de los husos mitóticos e interactuar con la proteína 1 del NuMA (siglas en inglés de *Nucleus and Mitotic Apparatus*) [412, 439]. Esta interrupción de la red NuMA/dineína puede resultar en errores mitóticos que harían que una célula infectada sea más propensa a la acumulación de aneuploidía. E7 produce anomalías numéricas del centrosoma en queratinocitos humanos, causadas por una mayor síntesis de centriolos [218]. La capacidad de E7 de HPV-HR para inducir rápidamente anomalías del centrosoma y una mayor plasticidad del genoma celular del hospedero apunta a una función importante de esta proteína como un agente mutagénico inductor de mitosis [152].

En general, durante la infección productiva, E5, E6 y E7 desarrollan una amplia gama de funciones que interfieren con el control de procesos biológicos importantes, por lo que sus niveles aumentados contribuyen directamente a generar cambios celulares que conducen a la acumulación de alteraciones genómicas en los queratinocitos infectados que pueden conducir al desarrollo de cáncer [160, 427]. Dichas alteraciones se acumulan durante

años, y en el caso de OPC HPV+ el cáncer puede no diagnosticarse hasta 1-3 décadas después de que una persona se infectó con el virus [27].

En el capítulo 3 se mencionaron las alteraciones esenciales en la fisiología celular que dictan colectivamente el crecimiento maligno, que en resumen son [42-44]:

- a) Menor dependencia de factores de crecimiento externos. Las células cancerosas estimulan su propia proliferación y, por lo tanto, dependen menos de factores de crecimiento de fuentes fisiológicas. Esto se puede hacer produciéndolos o provocando anomalías en los sistemas de señalización intracelular (p. ej. promover la actividad de los receptores de factores de crecimiento como el EGFR).
- b) Evasión de la apoptosis. Las células transformadas exhiben un mayor tiempo de vida en comparación con sus contrapartes normales, lo cual permite que las células continúen su ciclo celular en condiciones no aptas (p. ej. después de daño al DNA).
- c) Potencial replicativo ilimitado. Puede ser por altos niveles de telomerasa, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento o bloqueo de la detención en los puntos de control del ciclo celular.
- d) Promoción de la angiogénesis. Las células cancerosas secretan factores de crecimiento que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos para suministrar oxígeno y nutrientes a las células tumorales en proliferación. Esto también puede brindar una oportunidad inmediata para que las células cancerosas ingresen al sistema circulatorio y comiencen el proceso metastásico.
- e) Alteración de las interacciones célula-célula y célula-matriz. Representan la pérdida de interacciones que mantienen la morfología, proliferación y migración celular bajo control. Esto contribuye a la capacidad de las células malignas para invadir y hacer metástasis.

- f) Invasión de tejidos y metástasis. Producción de enzimas que degradan la matriz extracelular y permiten que las células cancerosas invadan tejidos, canales linfáticos y vasos sanguíneos, también puede ser un efecto secundario de la pérdida de anclaje y la promoción de angiogénesis.
- g) Diferenciación pobre. Pérdida de respuesta a agentes inductores de la diferenciación, para promover la proliferación activa continua, ya que la mayoría de las células completamente diferenciadas cesan la división celular o se dividen en pocas ocasiones.
- h) Cambios en la estructura y función de la membrana celular. Componentes alterados de la membrana, aparición de antígenos asociados a tumores, mecanismos de transducción de señales alterados (incluidos receptores de factores de crecimiento constitutivos, cascadas de fosforilación y mecanismos de desfosforilación) y consumo incrementado de biomoléculas.

En la tabla 4, se presenta una comparación de las alteraciones de las células cancerosas y las funciones de las oncoproteínas de HPV-HR discutidas anteriormente:

Tabla 4. Comparación de las funciones descritas para las oncoproteínas de HPV-HR y las alteraciones celulares que dictan colectivamente el crecimiento maligno

Alteración	E5*	E6	E7
Menor dependencia de factores de crecimiento externos	X	X	X
Evasión de la apoptosis	X	X	
Potencial replicativo ilimitado		X	X
Promoción de la angiogénesis	X	X	
Invasión de tejidos y metástasis	X	X	
Alteración de las interacciones célula-célula y célula-matriz	X	X	
Diferenciación pobre	X	X	X
Cambios en la estructura y función de la membrana celular	X	X	

* A pesar de sus funciones como oncoproteína, E5 juega un papel menor en la transformación maligna en comparación con E6 y E7 [16, 150, 418].

Por lo tanto, la desregulación en la expresión de las oncoproteínas virales a lo largo de la infección persistente puede iniciar el proceso de transformación y ayudar a mantener el fenotipo maligno [106, 139, 387], ya que favorece que las células infectadas adquieran características anormales en los mecanismos que regulan su proliferación, diferenciación y supervivencia [42], lo que puede conducir al desarrollo y progresión de lesiones cancerosas [156]. Al respecto, E6 y E7 se expresan de forma consistente en los tumores OPC HPV+ [139] y son necesarias para la inducción y mantenimiento del fenotipo transformado [387]. Las funciones individuales de estas oncoproteínas en el desarrollo de la malignidad se han estudiado en ratones transgénicos, y se encontró que las células que expresan E7 exhiben una tasa mucho más alta de promoción de tumores que las que expresan E6 [427], por lo que E7 causa principalmente tumores benignos y altamente diferenciados, mientras que E6 contribuye débilmente a las primeras etapas, actuando principalmente durante la progresión del tumor, acelerando la conversión maligna de los tumores benignos (Tabla 4) [160, 440]. Esto sugiere que las dos oncoproteínas juegan diferentes roles en el proceso de carcinogénesis y actúan cooperativamente para inducir la transformación maligna celular (Figura 37) [160].

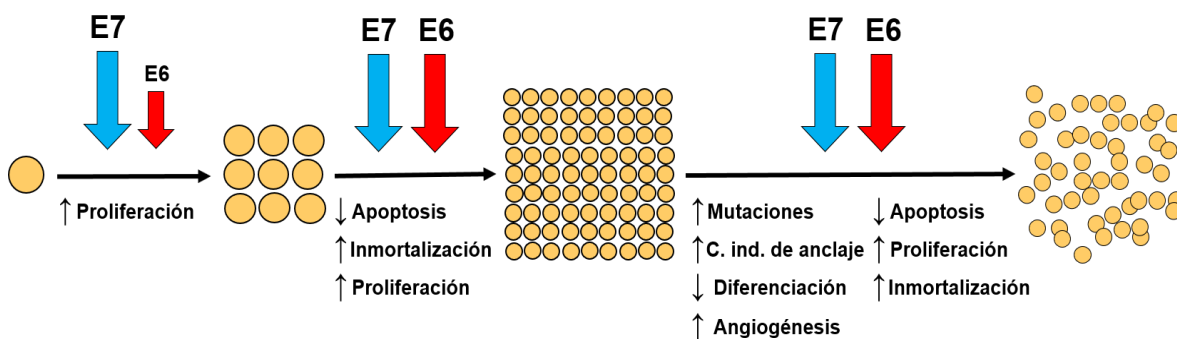


Figura 37. Propuesta de la cooperación de E6 y E7 en la transformación maligna. E7 causa principalmente tumores benignos, mientras que E6 acelera su conversión maligna por acumulación de mutaciones debido a las funciones discutidas anteriormente. Modificado de [160].

E6 y E7 promueven la oncogénesis por diferentes mecanismos (Tabla 4), y aunque su expresión individual puede inducir hiperplasia epitelial (E7) y tumores (E6) [440], la eficiencia de transformación maligna aumenta cuando se expresan juntas [178, 424, 441]. Sin embargo, los queratinocitos transformados por E6 y E7 solo forman tumores malignos en ratones desnudos después de que se induce la expresión de

oncogenes [442] o después de un gran número de pases en cultivo de tejidos [160], lo que indica que las células están transformadas sólo parcialmente [443]. La falta de capacidad de los queratinocitos orales inmortalizados para formar tumores indica que, aunque la desregulación de las oncoproteínas del HPV en infecciones persistentes es un evento necesario para la progresión a OPC HPV+ [21, 25, 26, 74, 84], la infección con HPV por sí sola puede no ser suficiente [443] y que se requieren otros eventos genéticos para la transformación maligna completa, por ejemplo, mayor expresión de oncogenes del hospedero, formación de nuevos oncogenes o expresión insuficiente de genes supresores de tumores [43]. La hipótesis de que la infección persistente por HPV *in vivo* podría requerir eventos moleculares oncogénicos adicionales se basa en la rara aparición de cáncer en comparación con la alta prevalencia de infección por HPV y el largo periodo de incubación entre la infección inicial y el desarrollo del cáncer [140]. La exposición a carcinógenos ambientales como el tabaco y alcohol que están en contacto directo con el epitelio oral [85], puede ser un cofactor importante para la progresión maligna de las células infectadas por el HPV [405]. Al respecto, los queratinocitos orales humanos pueden transformarse completamente *in vitro* mediante la exposición secuencial a un HPV-HR y carcinógenos químicos [396], p. ej. N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina [405] y 4-nitroquinolina-N-óxido [427]. Actualmente no está claro el grado de relevancia que la exposición a carcinógenos puede tener con la infección por HPV para causar OPC [66], pero posiblemente a través de una acción sinérgica combinada, más de un factor de riesgo está involucrado en el desarrollo y progresión de OPC HPV+ [405].

Por último, cabe mencionar que el CC se ha utilizado desde hace tiempo como modelo en la patogénesis de las neoplasias malignas mediadas por la infección por HPV en diferentes zonas anatómicas (pene, vulva, orofaringe, etc.) debido a la presencia general de células cancerosas que expresan E6 y E7 en capas superficiales del epitelio (en lugar de seguir el patrón de expresión viral de la infección productiva) en las diferentes zonas anatómicas afectadas [1, 139]. En el CC, la infección persistente por HPV causa lesiones precursoras del cáncer llamadas lesiones intraepiteliales escamosas (SIL, siglas en inglés de *Squamous Intraepithelial Lesions*) que se clasifican en 3 grupos de riesgo progresivo según la proporción de epitelio anormal, designados como Neoplasia Intraepitelial de Cérvix (CIN, del inglés *Cervical Intraepithelial Neoplasia*) 1, 2 ó 3 [444]. Las SIL pueden ser de bajo grado (LSIL, del inglés *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions*) cuando abarcan menos de un tercio del epitelio (CIN1) y de alto grado (HSIL, del

inglés *High-grade Squamous Intraepithelial Lesions*) cuando abarcan dos tercios (CIN2) o más (CIN3, carcinoma *in situ*) de todo el epitelio cervical (Figura 38) [444-446]. Las lesiones CIN1 normalmente conservan la capacidad de completar el ciclo productivo del HPV y producir partículas de virus, pero las CIN2 y 3 están asociadas con un mayor riesgo de integración del genoma viral, acumulación de cambios genéticos y progresión a cáncer [20].

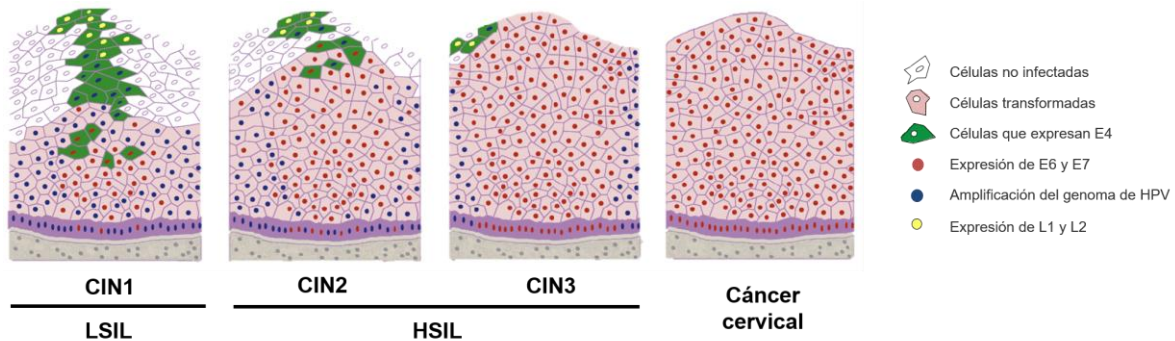


Figura 38. Esquema de CIN 1, 2 y 3 y CC. Conforme avanza el grado de la lesión, la expresión de E6 y E7 se desplaza a capas más superficiales del epitelio hasta llegar al punto donde se expresan en todo el tejido. Modificado de [447].

Este modelo es parcialmente útil para explicar la patogénesis del OPC HPV+, ya que comparte el evento de integración del vDNA al genoma del hospedero, la inestabilidad genómica incrementada por la desregulación de las oncoproteínas de HPV y la expresión de E6 y E7 en las capas superficiales del epitelio, pero a diferencia del CC, en OPC no se han identificado lesiones precursoras intraepiteliales [139] por lo que no se ha podido verificar hasta qué grado la progresión del cáncer es similar entre ambas zonas anatómicas.

3.4 Respuesta inmune contra el HPV en el OPC

El desarrollo de cáncer en las amígdalas inducido por un agente biológico puede parecer paradójico, dado que las amígdalas son tejidos linfoides asociados a mucosas que participan en la defensa del hospedero al captar antígenos que ingresan al tracto aerodigestivo superior para ser presentados a células de la respuesta inmune [448]. El contacto antígeno-sistema inmune se da en las criptas de las amígdalas [140, 141], donde se pueden distinguir cuatro compartimentos histológicamente bien definidos que

participan en dicha respuesta inmune (Figura 39): el epitelio reticulado que reviste a las criptas y que tiene una membrana basal porosa que facilita el tráfico de células inmunológicas [137-139], los centros germinales (agregados de linfocitos B), cada uno rodeado por una zona del manto de linfocitos densos y pequeños, y entre centros germinales (zona extrafolicular) se encuentran áreas de células T [449].

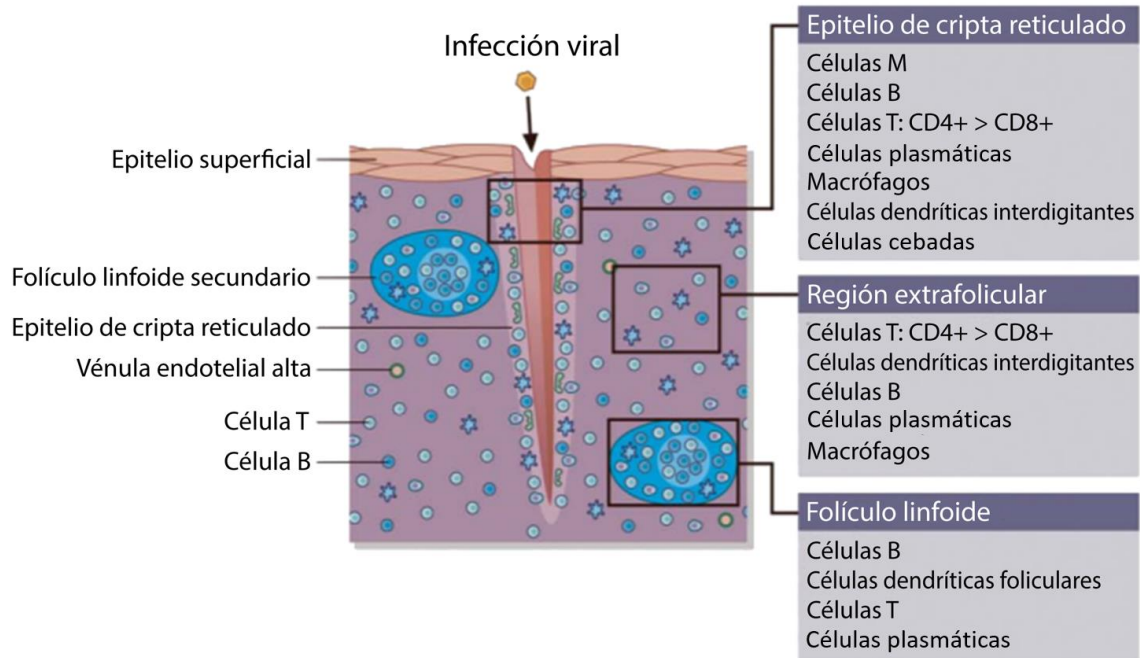


Figura 39. Estructura de una cripta amigdalal. Las criptas están revestidas por epitelio reticulado y tienen otros compartimentos especializados, incluidos los centros germinales (azul claro), zona del manto (azul oscuro) y regiones extrafoliculares (morado). Las criptas constan no solo de células epiteliales, sino también de células inmunológicas. Modificado de [448].

A pesar de que las amígdalas son un tejido con actividad inmunológica, se ha sugerido que tras el establecimiento de la infección por HPV en el epitelio reticulado de las criptas, el tejido favorece la infección persistente por HPV debido a la alta expresión de PD-L1 [139], una proteína que se induce en respuesta a citocinas inflamatorias como el IFN- γ y se une a su receptor PD-1 (siglas en inglés de *Programmed Death-1*) presente en las células T. Esta unión, lleva a las células a apoptosis, anergia y agotamiento funcional, efecto que protege a los tejidos de la inflamación mediada por células T [145]. La modulación de la duración y amplitud de la respuesta inmunitaria montada en las amígdalas es importante debido a que las criptas son susceptibles a la acumulación de moléculas ajenas al hospedero, por lo que el tejido está sujeto a una activación inmune crónica, lo cual impulsa la expresión de PD-L1 para proteger la auto-tolerancia [145, 450].

La expresión selectiva de PD-L1 en la profundidad de las criptas hace a esta región un sitio inmunológico privilegiado que facilita la evasión inmunitaria del HPV por la inhibición de la función efectora de las células T [145].

3.4.1 Respuesta inmune durante la infección productiva por HPV

Un mecanismo para la eliminación del HPV es la descamación gradual de las células infectadas, aunque este escenario conduce a una resolución parcial con posible mantenimiento de la infección latente en una o más células basales [11]. Por otra parte, la respuesta inmune mediada por células juega un papel central en la eliminación de las infecciones por HPV [18] y su activación conduce a la acumulación de células T en la vecindad de la lesión más un cierto grado de infiltración [20]. Al respecto, la respuesta inmune innata tiene una importante contribución por medio de las células dendríticas. Estas células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen Presenting Cell*) son esenciales para la inducción de la respuesta adaptativa contra proteínas tempranas del HPV ya que activan a linfocitos T y B [53, 369]. Por otra parte, los macrófagos remueven los remanentes de las células infectas y secretan citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-17 que promueven la infiltración de otras células inmunitarias en el sitio de la infección [451, 452] y las células NK destruyen células infectadas que tienen un número bajo de MHC-I o cuyos TLR9 fueron activados por DNA viral [453].

Una vez que se ha montado la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T citotóxicos (CTL, del inglés *Cytotoxic T Cell Lymphocytes*) o CD8+ y las células T auxiliares de tipo 1 (Th1, del inglés *Type 1 T helper cell*) o CD4+ son los componentes más importantes de la respuesta celular para eliminar la infección [11]. Los CTL reconocen y eliminan a las células infectadas [277] y los CD4+ Th1 producen citocinas proinflamatorias que inducen un estado antiviral en las células y ayudan a la activación de las CTL [11]. Idealmente, las células diana para la lisis mediada por CTL son los queratinocitos infectados en las capas intermedias del epitelio escamoso, donde las proteínas tempranas de HPV se expresan abundantemente, contrario a las proteínas tardías, que se expresan en las capas superficiales del epitelio donde las células infectadas se están desprendiendo y están fuera del alcance de los linfocitos [11]. Por último, la activación de linfocitos B y secreción de anticuerpos anti-HPV, especialmente anti-cápside, ha demostrado proteger contra infecciones futuras, mientras que los

anticuerpos contra las proteínas tempranas se han propuesto como marcadores de la etapa de la infección y pronóstico de la enfermedad [11, 454].

3.4.2 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

La respuesta inmune innata y la adaptativa participan en el control de las infecciones por HPV, pero a su vez, el virus posee diferentes estrategias que evitan o inhiben la respuesta inmune del hospedero para impedir el reconocimiento y eliminación de las células infectadas [18]:

a) Ignorancia inmunológica.

Una estrategia viral clave para evitar al sistema inmunológico es mantener un perfil bajo. Diversos factores minimizan la exposición del HPV al sistema inmune, reduciendo la oportunidad de detección de la amenaza por parte del hospedero [11]:

- La infección por HPV no causa necrosis, viremia, ni citólisis, lo que provoca una nula o baja liberación de citocinas proinflamatorias en el entorno local [455].
- El HPV es un patógeno intracelular cuyas proteínas no son secretadas y que en general se expresan en un nivel bajo [456].
- La producción de viriones sucede en las capas superiores del epitelio, donde la presencia de células inmunitarias es menor [316], además de que los viriones son liberados de queratinocitos en proceso descamación, por lo que no se emiten señales de peligro por la muerte de las células infectadas [453].

b) Modulación de la apoptosis.

E6 y E7 promueven la resistencia celular a la apoptosis mediada por TNF producido por los CTL [214, 223].

c) Desregulación de las respuestas al interferón.

Los IFN son citocinas antivirales, inmunoestimuladoras e inhibidoras de la proliferación celular [456]. Los IFN de tipo I (α , β , κ) son la primera línea de

defensa inmunitaria contra las infecciones virales, provocando el llamado estado antiviral en las células infectadas y mejorando las respuestas inmunitarias mediante la estimulación de las DC [456]. El HPV ha desarrollado una gran cantidad de mecanismos que limitan este mecanismo clave de defensa antiviral [1]:

- E6 inhibe a IRF3 y anula su capacidad para inducir la expresión de IFN- β [456] y la apoptosis de células infectadas [20, 178].
- E6 interfiere con la cinasa TYK2 necesaria para la activación de la transcripción de genes estimulados por IFN, cuyos productos asumen roles diversos en la respuesta antiviral celular [457].
- E7 es capaz de inhibir los factores de transcripción IRF9 e IRF1, inhibiendo la formación del complejo de transcripción de ISGF3 y bloqueando la transcripción de IFN- β , respectivamente [20, 217, 456].
- E7 puede interactuar con p48, el componente de unión al DNA de ISGF3 y prevenir su translocación nuclear tras la estimulación con IFN- α , lo cual compromete severamente la señalización celular por esta molécula [216].

d) Modulación de las APC.

Las APC profesionales son células inmunes que expresan constitutivamente moléculas MHC-II en su superficie y se especializan en presentar antígenos a las células T [458]. Entre ellas, las DC y las células de Langerhans (LC, del inglés *Langerhans Cells*) son APC importantes en la presentación de antígenos asociados al HPV para activar la proliferación de CTL [458, 459]. Por lo tanto, la interferencia de HPV en el tráfico y la maduración de APC ayuda a la evasión inmune del virus al limitar la estimulación de las células T efectoras [369]. Al respecto, las lesiones HPV+ se caracterizan por una disminución en el número de LC y DC (con alteraciones morfológicas adicionales) [11], esto se ha atribuido a la expresión reducida de E-cadherina en queratinocitos infectados por la acción de E6 y E7, ya que las APC normalmente se adhieren a los queratinocitos a través de esta molécula y migran fuera de las áreas con expresión reducida de E-cadherina [456, 460, 461]. Asimismo, las LC y DC vecinas a la lesión muestran fenotipos inmaduros, caracterizados por baja concentración de moléculas MHC y de

moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 [369]. Esto se ha atribuido a L2 y E7, aunque el mecanismo sigue siendo desconocido [11, 456].

El HPV también puede interferir en los procesos de las APC al inhibir la transcripción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias en los queratinocitos infectados, necesarias para desencadenar el inicio de la respuesta inmune [11, 456]. Se ha observado que E6 y E7 inactivan a NF- κ B, factor importante para la producción de citocinas proinflamatorias (p. ej. IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, TGF- α y - β y TNF- α) [11, 18, 462]. Asimismo, regulan a la baja la secreción de MIP1 α (siglas en inglés de *Macrophage Inflammatory Protein 1 α*) [18], lo que conduce a una menor atracción de APC hacia las regiones infectadas [456]. Por otra parte, E7 regula negativamente a CXCL14, una quimiocina ampliamente expresada en tejidos normales como células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y ciertas células inmunes, para atraer DC, monocitos, neutrófilos y NK [18]. E7 también inhibe la expresión de CCL20 en queratinocitos, necesaria para la migración de LC inmaduras [18]. Al mismo tiempo, E6 inhibe la liberación de MCP-1 (siglas en inglés de *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), lo que interfiere con la quimiotaxis de los macrófagos [18].

e) Perturbación del procesamiento y presentación de antígenos.

Las MHC-I y -II desempeñan un papel fundamental en la rama adaptativa del sistema inmunológico, ya que ambas comparten la tarea de presentar péptidos en la superficie de las células para ser examinados por células T: la presentación de antígeno mediante MHC-II por APC (profesionales o no profesionales) activa las células T *naïve* para montar una respuesta inmunitaria celular específica [463], mientras que la presentación de antígeno por MHC-I en células nucleadas es utilizada por las CTL para reconocer y destruir células infectadas y tumorales [277]. De esta forma, las proteínas MHC son esenciales para el montaje de la respuesta inmune adaptativa y el HPV también posee mecanismos para regular negativamente a estas proteínas y a los componentes de su maquinaria de procesamiento de antígeno, previniendo así la presentación inmune de péptidos virales y disminuyendo el reconocimiento por CTL de las células infectadas [215, 271]. Al respecto, E5 disminuye la presencia de MHC-I en la superficie celular al interactuar directamente con el componente de cadena pesada del MHC-I [277,

279]. Se ha observado que la baja en la expresión se limita a los tipos HLA-A y -B, sin disminución en la expresión total de HLA-C y -E [464], así que como todavía se expresan HLA-C y -E, las células infectadas con HPV no se convierten en objetivos de las NK, que en general destruyen las células con expresión reducida del MHC-I [456, 464]. E5 también inhibe el procesamiento endosómico de la cadena invariante (Ii) de MHC-II, afectando la carga adecuada de péptidos en la molécula y provocando la expresión disminuida de MHC-II en la superficie celular [271] y junto con E7, pueden retener el MHC-I en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático al interactuar con TAP1 [271, 279], una proteína clave para el transporte de péptidos antigénicos desde el citosol al retículo endoplasmático, donde se montan a las moléculas MHC-I nacientes [215]. Por otra parte, E7 reprime el promotor del gen de cadena pesada del MHC-I [456] y junto con E6, inhibe la transcripción del receptor TLR9, facilitando la evasión de la respuesta inmune innata [16, 237].

Además de las estrategias de evasión inmunitaria del HPV para amortiguar la expresión de MHC, la ausencia de inflamación/escasa liberación de citocinas locales debido al carácter no citolítico de la infección por HPV y el bajo nivel de expresión de las proteínas del HPV, alteran la presentación adecuada de antígenos y pueden desempeñar un papel en la promoción de la tolerancia inmunitaria al HPV [11, 20]. Además, la tolerancia y la anergia de las células T se han relacionado con el hecho de que los queratinocitos pueden expresar MHC-II tras la estimulación con citocinas (en particular IFN- γ) y presentar antígenos a las células T *naïve* [11, 465], sin embargo, al no ser APC profesionales, los queratinocitos expresan BB-1 como ligando para CD28 en lugar de B7-1 o B7-2, lo que causa la falta de entrega de señales coestimuladoras necesarias para la activación de las células T [11].

f) Polarización del fenotipo de células T.

Además de una respuesta CTL, se necesita una respuesta robusta de células T CD4+ para la eliminación eficaz de HPV [456]. Durante su activación, las células T CD4+ *naïve* tienen el potencial de diferenciarse en varios linajes efectoros Th según las señales que reciben del entorno de citocinas locales [369]. Una respuesta inmune anti-viral requiere una respuesta Th1 [20], por lo tanto, otro

mecanismo de evasión inmunitaria empleado por HPV es modificar la composición de las células T CD4+ en el microambiente de la lesión al inducir un cambio de la diferenciación de Th1 a Th2 [18]. Las células Th1 producen principalmente citocinas proinflamatorias (IFN γ , IL-1 β , IL-18 e IL-2) y generan respuestas inmunes celulares contra patógenos intracelulares como bacterias y virus. Por el contrario, las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y promueven respuestas inmunes humorales contra patógenos extracelulares [18].

La influencia de HPV en la polarización de CD4+ se ha asociado a que E5 promueve el secuestro y degradación de CD1d, una molécula centinela expresada en la superficie de varias APC que une la inmunidad innata y adaptativa y que puede modular la polarización Th1/Th2 [282, 456], además de que E5 también inhibe la producción de IL-12 (mediada por CD1d), una citocina proinflamatoria que promueve la diferenciación a Th1 [282].

g) Deterioro de la actividad de las células NK.

Las células NK están asociadas con la regresión de lesiones inducidas por HPV [11] y el deterioro en su actividad se ha encontrado en pacientes con infección persistente por HPV y cáncer cervical (CC) [466]. Se ha descrito que la expresión aumentada de IL-10 y la regulación a la baja de los IFN-I en las lesiones HPV+ (debido a la promoción de Th2 y la expresión de E6/E7 en queratinocitos infectados) suprime la diferenciación y activación de las células NK [369]. Además, la producción de IL-10 genera un entorno inmunosupresor que disminuye la expresión de MHC-I mientras aumenta la de moléculas MHC no clásicas como HLA-G, que pueden inhibir la actividad de NK y CTL, además de modular en las APC su maduración, tráfico y presentación [456, 467].

Como se mencionó anteriormente, E5 promueve el secuestro y degradación de CD1d [456], una proteína MHC no clásica que activa una clase especial de células T, conocidas como células T asesinas naturales (NKT, siglas en inglés de *Natural Killer T*) [468]. A menudo se les considera células inmunes innatas porque expresan un TCR semi-invariante y liberan grandes cantidades de citocinas proinflamatorias al reconocer a las moléculas CD1d que presentan antígenos lipídicos en la superficie de las APC y de las células tumorales [369]. La

disminución de CD1d resultado de la expresión de E5 podría ayudar a las células infectadas por HPV a evadir la actividad de las células NKT [369].

3.4.3 Anticuerpos anti-HPV

Durante el ciclo viral, las proteínas tempranas del HPV llevan a cabo sus funciones en el interior de las células infectadas, mientras que las proteínas tardías (cápside), se expresan en las capas superiores del epitelio para el armado de las partículas virales. Este proceso dificulta la exposición de los antígenos virales al sistema inmunológico y retarda el montaje de la respuesta humoral frente a la infección por HPV [11]. Sin embargo, eventualmente la producción de anticuerpos anti-HPV es generada contra todas las proteínas del HPV, aunque los anticuerpos contra las proteínas L1, E4, E6 y E7 del HPV-16 son los más estudiados [453, 469].

A pesar de que en pacientes con lesiones HPV+ se presentan niveles elevados de citocinas Th2 (IL-4, IL-10, IL-6) promotoras de la liberación de anticuerpos [470], la presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-HPV no es efectiva para la eliminación del virus tras establecerse la infección debido a la naturaleza intracelular y no lítica del HPV [11, 471]. Sin embargo, la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-HPV ha demostrado ser útil para proteger de infecciones futuras al bloquear la unión del virus a las células epiteliales de la mucosa [11]. Dichos anticuerpos reconocen principalmente a la proteína principal de cápside L1 [1, 18], donde los epítomos neutralizantes se encuentran en los bucles superficiales que conectan a las láminas β , sin que ninguna región sea inmunodominante (1-10 péptidos reconocibles, ubicados a lo largo de la proteína) [302, 303, 472]. A pesar de que L1 está muy conservada entre los HPV, la inmunidad por anticuerpos es altamente específica del tipo de HPV, por lo que la neutralización cruzada entre tipos es débil y no consistente, posiblemente por las diferencias de conformación entre los bucles de distintos tipos virales [1, 304, 473].

En términos de inmunidad contra el HPV, se pueden esperar diferentes isotipos de inmunoglobulinas [103]:

- **IgM**, marcador de primoinfección, encontrado en etapas tempranas de la respuesta inmune.

- **IgA**, marcador de respuesta inmunológica de memoria en mucosa, encontrado después del cambio de isotipo de inmunoglobulina.
- **IgG**, marcador de la respuesta inmunológica de memoria sistémica, encontrado después del cambio de isotipo.

Las IgG sérica e IgA en mucosa contra HPV juegan un papel importante en la defensa del hospedero, considerándose su presencia simultánea como un factor protector contra la infección subsiguiente [11, 12], aunque se ha sugerido que las IgA son más relevantes que las IgG en la neutralización de viriones debido a que son una línea de defensa en el sitio real de infección local y de generación más rápida contra el HPV [11, 471].

Como se mencionó anteriormente, la infección por HPV también genera una respuesta humoral contra las proteínas tempranas del HPV, que aunque no es protectora, continúa bajo investigación por su posible uso como biomarcador de la etapa de la infección [453]. Basado en el comportamiento de expresión de proteínas durante el ciclo infeccioso del HPV (Figura 40), la detección de anticuerpos anti-E7 se ha asociado a infecciones en etapas iniciales y los anti-E4 a infecciones productivas en etapa de replicación viral abundante [12, 103], de manera que los anticuerpos IgM+IgA+IgG e IgA+IgG anti-E4, se consideran un marcador de exposición al HPV al ser frecuentes en ausencia del vDNA, mientras que los perfiles de anticuerpos anti-E7 que incluyen IgM son marcadores de exposición reciente a la infección viral, ya que son poco frecuentes una vez que se ha eliminado la infección probablemente por la breve y baja expresión de la proteína al inicio del ciclo viral [12]. La detección exclusiva de isotipos de memoria (IgA o IgG) anti-E4 y/o anti-E7 sugiere que se cursan/cursaron infecciones persistentes [12]. Asimismo, la respuesta humoral generada se ha sugerido como biomarcador de la gravedad de las lesiones HPV+ con fenotipo maligno, especialmente en cérvix, donde E4 está prácticamente ausente en el tejido afectado, mientras que la expresión de E7 se da en todas las capas, por lo que la respuesta anti-E4 se ha asociado con lesiones de bajo grado y los anticuerpos anti-E7 con lesiones de alto grado y CC [103, 169, 474].

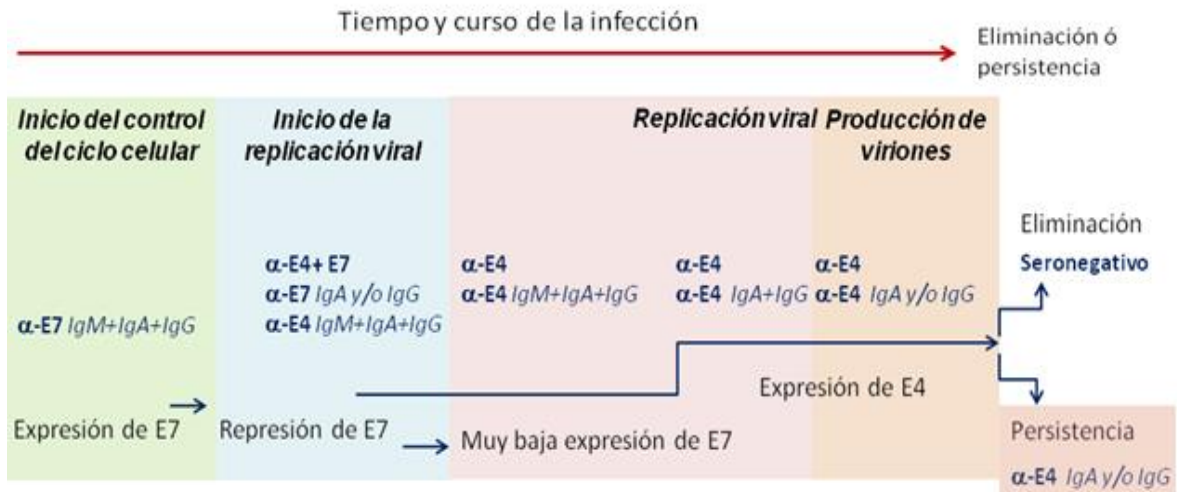


Figura 40. Perfiles de anticuerpos posibles según la etapa de la infección por HPV. Modificado de [12].

Los perfiles de inmunoglobulinas observados durante una infección por HPV pueden reflejar no solo la etapa de la infección, sino también su localización anatómica [103]. La combinación de los anticuerpos generados dan lugar a perfiles serológicos que pueden auxiliar a diferenciar el sitio donde está presente el cáncer asociado al HPV, como ha sido el caso del perfil anti-E4 + anti-E7 para lesiones CIN 1-2 [475] y anti-E1/E2 + anti-E6 para OPC [454]. Los anticuerpos anti-E6 se asocian diferencial y significativamente al OPC [27, 103, 448], convirtiéndolo en un biomarcador prometedor para este tipo de cáncer por su especificidad ya que su presencia no está asociada con cánceres en otros sitios de la cabeza y cuello [476] y hay escasa presencia sérica en individuos sanos (0.5% a 5%) [27], además que se ha reportado su detección en algunos pacientes más de 10 años antes del diagnóstico de OPC [448, 476]. Actualmente no existen resultados concluyentes sobre el uso de anticuerpos anti-HPV en la población general para la detección y diagnóstico de cánceres asociados al HPV [475], pero estos biomarcadores (en combinación con algoritmos y otras pruebas moleculares) podrían brindar una ventaja en el futuro para identificar individuos con alto riesgo de desarrollar cáncer [27].

Seroconversión dependiente del sexo

Las diferencias en las tasas de seroconversión al HPV según el sexo se han estudiado mayormente para las infecciones genitales, donde solo una porción de pacientes no vacunados presentan una respuesta de anticuerpos detectable, siendo el porcentaje de

seroconversión al HPV-16 y -18 más alto en mujeres [68]. Se ha sugerido que a través del sexo genital convencional, las mujeres adquieren la infección por HPV al principio de su vida sexual y la mitad es capaz de montar una respuesta inmune protectora contra futuras infecciones por HPV-HR [99, 100], mientras que los hombres requieren un mayor exposición para seroconvertir [27] y la respuesta humoral resultante no es protectora, ya que las reinfecciones en hombres son comunes independientemente del título de anticuerpos [12, 101] y se observa una rápida disminución de los títulos de IgG anti-HPV después de la eliminación viral (6 meses) [103].

La diferencia en la tasa de seroconversión al HPV entre sexos no es ninguna novedad, pues se han observado diferencias en la respuesta inmunitaria para otras infecciones [477] y como regla general, las hembras exhiben respuestas inmunes humorales y celulares más robustas a los desafíos antigénicos [478, 479], lo cual resulta en una susceptibilidad diferencial de hombres y mujeres a enfermedades autoinmunes, neoplasias y enfermedades infecciosas, además de afectar el resultado de la vacunación [480]. Dicho aumento en la respuesta inmune se ha demostrado no solo depende del cromosoma X sino también de la amplia gama de efectos de las hormonas sexuales sobre el sistema inmunológico y los órganos diana [353, 481-483]. Además de las diferencias inmunológicas intrínsecas entre hombres y mujeres, las características anatómicas de los genitales masculinos influyen en el establecimiento de la infección por HPV y la presentación inmune de antígenos virales, lo cual podría explicar en parte la seroconversión distinta entre sexos a través del sexo genital: el pene y el prepucio están formados por un epitelio escamoso queratinizado (piel), mientras que el cérvix y la vagina se conforman de epitelio no queratinizado [103]. Aunque el pene es un sitio anatómico con una alta prevalencia de DNA del HPV, los HPV-HR infectan preferentemente epitelio no queratinizado, por lo que tienen una baja tasa de replicación en este tejido a comparación de tejidos permisivos como la uretra o cérvix [103]. Adicionalmente, las infecciones en genitales masculinos son más transitorias que en genitales femeninos (4-7 meses vs 8-12 meses) ya que el pene y el prepucio cuentan con una alta respuesta inmune (alto número de LC, similar a la piel), que aunado a la descamación de la zona, facilita el control temprano de la infección [103]. Evidencia de esto es que los hombres presentan una mayor frecuencia de IgG anti-E7 cuando la infección es en el pene, lo que sugiere una respuesta inmune de memoria contra una infección que ha sido eliminada antes de que la replicación viral se detectara (generación de anticuerpos anti-E4),

mientras que la prevalencia de IgG+IgA anti-E4 es mayor en hombres con infección por HPV-16 en la uretra [103]. En resumen, al ser menos productivas y más transitorias las infecciones por HPV en genitales masculinos que en los femeninos, el montaje de una respuesta serológica satisfactoria que proteja contra infecciones posteriores por HPV se dificulta [12].

A diferencia de la zona genital, la información respecto a la respuesta humoral montada en la orofaringe según el sexo es poca, pero se sabe que es más frecuente encontrar anticuerpos de tipo IgA anti-HPV-16 y -18 en la mucosa oral de hombres que en mujeres [484] y que los hombres con OPC tienden a presentar con mayor frecuencia anticuerpos anti-E6 y/o E7 que las mujeres con esta enfermedad [485]. En ambos sexos, la mayoría de las infecciones orales recientemente adquiridas con tipos oncogénicos de HPV son eliminadas en 1 año [84, 85]. Sin embargo, el riesgo de los hombres de contraer una nueva infección oral por HPV se mantiene constante a lo largo de la vida [27], mientras que en las mujeres se observa una disminución [84], además que la prevalencia y el tiempo de persistencia de la infección oral por HPV en hombres aumenta significativamente con la edad [27, 74], lo cual podría deberse al deterioro de la respuesta inmunitaria del hospedero debido a las estrategias de evasión inmune desplegadas por el virus o por la elevación de citocinas inflamatorias que eventualmente deriva en tolerancia [86]. En hombres, la protección adquirida tras la infección genital puede que no evite la adquisición de nuevas infecciones orales por HPV, pero es posible que contribuya a promover su eliminación [102].

3.4.4 Mecanismos que contribuyen a la evasión inmunitaria tumoral en OPC

La persistencia y progresión a cáncer de una lesión HPV+ depende en gran parte de la capacidad del sistema inmune del hospedero para combatir la infección [126, 369], ya que para que se desarrolle el cáncer el virus tiene que evadir la detección inmunológica durante un periodo prolongado que permita que las anomalías genéticas se acumulen en la célula infectada [20]. La mayoría de los individuos inmunocompetentes son capaces de eliminar la infección por HPV sin manifestaciones clínicas [84, 85], mientras que personas inmunocomprometidas tienen tasas más altas de cánceres relacionados con el HPV [42]. Cuando el sistema inmunológico no logra eliminar la infección por HPV-HR y se desarrolla OPC [20, 106, 149], éste aún juega un papel importante en la supresión del tumor [145]. En un entorno con funcionamiento normal, las alteraciones en las células transformadas

por HPV desencadenan el desarrollo de antígenos asociados a tumores (TAA, siglas en inglés de *Tumor Associated Antigens*) que son reconocidos por el sistema inmunológico y promueven la destrucción de la célula anormal [450]. Sin embargo, se han descrito varios mecanismos para la resistencia de los tumores al reconocimiento y eliminación [145], y después de una fase de equilibrio, el sistema inmunológico puede perder la capacidad de erradicar las células cancerosas, además que la mutación progresiva del tumor le brinda ventajas a las células anormales para suprimir, alterar o escapar del sistema inmunológico [450, 486, 487]. En OPC HPV+, los mecanismos de evasión inmune discutidos anteriormente para infecciones productivas por HPV también están activos en los tumores, excepto por el no reconocimiento de la infección, dado que como resultado de la pérdida de E2 (integración del vDNA), E6 y E7 se sobreexpresan, lo que resulta en más objetivos para el ataque inmunológico, pero también aumenta el riesgo de transformación maligna [456]. Los mecanismos de evasión inmunitaria de las células transformadas malignamente por influencia del HPV incluyen:

a) Modulación de la actividad de APC.

En los cánceres HPV+, la infiltración baja de LC en los tumores se ha asociado con la gravedad de CC y OPC [488]. Este fenómeno se ha atribuido al efecto de E6 y E7 en la expresión disminuida de CCL20, una quimiocina que atrae LC a los sitios de inflamación [488]. Además, los tumores asociados al HPV poseen una menor expresión de E-cadherina y CCR7, lo que resulta en una reducción de las APC que migran hacia tejidos linfoides secundarios [369]. La maduración de DC también se inhibe en muchos cánceres como consecuencia de la secreción de factores inmunosupresores derivados de células tumorales, como IL-10, TGF- β , IL-6, PGE2 (siglas en inglés de *Prostaglandin E2*) y GM-CSF (siglas en inglés de *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) [369]. Por lo tanto, la interferencia del HPV con el tráfico y la maduración de LC y DC limita su capacidad para activar células T efectoras específicas para TAA que tras la activación por APC, migrarían al microambiente tumoral y promoverían la eliminación de las células malignas [369, 450].

b) Perturbación del procesamiento y presentación de antígenos en la célula.

Varios componentes de la maquinaria de procesamiento de antígenos de HLA-I (ej. LMP2, TAP1 y tapasina) están subexpresados en los tumores OPC HPC+ en

comparación con el epitelio normal adyacente [489]. Por lo tanto, a pesar de la alta expresión de oncoproteínas en las células cancerosas, es posible que los antígenos virales no se procesen ni presenten eficazmente al sistema inmunológico [448], lo que conduce a la resistencia a la lisis mediada por CTL [490]. Otra anomalía descrita en el procesamiento de antígenos en células cancerosas HPV+ es la expresión de FasL, que conduce a la inducción de moléculas co-inhibidoras de la familia B7 y de antígenos no clásicos de HLA-I como HLA-G y HLA-E que pueden inhibir la actividad de NK, CTL y DC [456, 490].

c) Deterioro en la actividad de las células NK.

Se ha observado que existe cierta resistencia de las células cancerosas al ataque por NK, quienes al mismo tiempo, presentan una actividad disminuida y restringida de citocinas inmunoestimuladoras [491]. El deterioro de la actividad de las células NK en OPC HPV+ puede estar mediado por sobreexpresión de TGF- β por las células malignas, que reduce la expresión de varios receptores activadores de NK, incluidos NKp30, NKp44, NKp46, CD16 y NKG2D [466, 490]. Además, la alteración de la actividad de las células NK podría estar mediada por la sobreexpresión en APC y células anormales de factores inmunosupresores inducidos por el tumor [369].

d) Reclutamiento de células inmunosupresoras.

El reclutamiento de células inmunosupresoras como macrófagos asociados a tumores, células supresoras de origen mieloide y células T reguladoras, es una estrategia de evasión inmune que existe exclusivamente en los tumores HPV+ y no durante la infección normal [456]. Estas células reguladoras se encuentran naturalmente en sitios de inflamación, actuando como retroalimentación negativa para las respuestas inmunes efectoras al inducir un microentorno caracterizado por la secreción de citocinas inmunosupresoras (TGF- β , IL-6, IL-10, PGE2, adenosina, etc.) [369, 450, 490]. En un entorno tumoral asociado al HPV, el reclutamiento de estas células reguladoras a menudo aumenta [369], y el perfil de citocinas alterado ayuda a deteriorar la vigilancia inmunológica y, por lo tanto, contribuye a la evasión del tumor [18, 456].

Los macrófagos asociados a tumores (TAM, siglas en inglés de *Tumor-Associated Macrophages*) son reclutados al microambiente tumoral mediante la secreción del CSF-1 (siglas en inglés de *Colony Stimulating Factor 1*), CCL2, 3, 4, 5 y 8, y VEGF, una vez que se ha establecido la transformación maligna inducida por HPV [490]. Los TAM son macrófagos con fenotipo M2 que promueven la progresión de las lesiones asociadas al HPV [456] mediante la estimulación de la remodelación tisular, angiogénesis vía TGF- β , VEGF, GM-CSF, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, promoción de la migración e invasión de células tumorales a través de metaloproteinasas de matriz, TNF- α , e IL-1, e inducción de inmunosupresión vía TGF- β , PGE2 e IL-10 [490]. Los procesos de inmunosupresión inducidos por TAM consisten en la inducción de apoptosis de las células CTL y la estimulación de la diferenciación de CD4+ Th2 y T_{reg} (T reguladoras) [456]. Se ha sugerido que la muerte de CTL podría deberse a que la polarización M2 de los macrófagos conduce a una producción insuficiente de IL-12, un factor liberado por macrófagos M1 que es un estimulante necesario para la supervivencia, diferenciación y función de las CTL. Por otra parte, la polarización de las células Th2 es promovida por las citocinas inmunosupresoras (IL-4, IL-10 e IL-13) producidas por los TAM, que a su vez estimula la polarización de TAM e inhibe la respuesta de otras células inmunes efectoras. Además, los TAM desempeñan funciones importantes en el reclutamiento, diferenciación y estimulación de T_{reg} a través de citocinas derivadas de M2 como CCL22 e IL-10 [369, 492].

El número de las células supresoras de origen mieloide (MDSCs, por sus siglas en inglés de *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) a menudo aumenta en varios tipos de cáncer, incluido el OPC HPV+ [490], donde su presencia significativa en sangre y tumores se ha asociado con un mal pronóstico [369]. Las MDSCs son una población heterogénea de células mieloides inmaduras que consisten en granulocitos, macrófagos y DC con funciones inmunosupresoras [369]. Los mecanismos subyacentes a la expansión y activación de las MDSCs en los cánceres asociados a HPV no se conocen totalmente, pero al igual que los TAM, es probable que sean estimuladas por una variedad de factores solubles, como GM-CSF, VEGF, TNF- α , PGE2, IL-1 β , IL-6 e IL-10, que son secretados por el tumor y las células inmunes infiltradas [369]. Las MDSCs pueden producir moléculas inmunosupresoras como TGF- β , IL-10, arginasa 1 (Arg-1), óxido nítrico

sintasa inducible (iNOS, siglas en inglés de *Inducible Nitric Oxide Synthase*), IDO (siglas en inglés de *Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*), PD-L1 y especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) [493] que actúan de forma directa o indirecta para inhibir la supervivencia y la proliferación de las CTL, alterar la función de las células NK y promover el reclutamiento y la inducción de células T_{reg} [369]. Estas últimas, son células T con propiedades inmunoreguladoras que son reclutadas por tumores y que están relacionadas con la progresión de OPC HPV+ [448, 456]. Pacientes con estos tumores tienen un perfil consistente con una fuerte respuesta inmune adaptativa (mayor proporción de memoria efectora y células T efectoras) en comparación con OPC HPV-, donde prevalece una inmunidad innata [25]. Las células T juegan un papel crítico en la respuesta inmune contra OPC [448], pues tras ser activadas migran al microambiente del tumor, donde se infiltran y son estimuladas por su antígeno para ejercer su acción inmune [450]. Al respecto, los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, por sus siglas en inglés de *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*) son una población heterogénea compuesta por linfocitos CTL, Th CD4+ y T_{reg} FOXP3+ [494]. Los CTL tienen la capacidad de destruir las células tumorales por la liberación de moléculas como perforina, granzima, TNF- α y Fas-L [495] con la posterior propagación de TAA que generan respuestas inmunes secundarias [494]. Por otra parte, las células CD4+ secretan citocinas que influyen en la respuesta inmune dependiendo de su fenotipo de diferenciación: las células Th1 CD4+ facilitan el rechazo tumoral al promover la función de las CTL, mientras que las células Th2 CD4+ promueven la producción de anticuerpos [18, 490].

Por último, las T_{reg} tienen funciones inmunosupresoras que mantienen la respuesta inmune bajo control, evitando reacciones inmunes exageradas y protegiendo la auto-tolerancia [448]. La respuesta de TIL se encuentra en casi todos los pacientes con tumores HPV+, mientras que la respuesta sistémica se encuentra solo en una fracción, lo que destaca la importancia de la respuesta inmune local [496]. Los TIL se han relacionado con un mejor pronóstico en diferentes tipos de cáncer (CC, ovario y colon [496]), pero pueden actuar como un arma de doble filo, ya que pueden contribuir tanto a la destrucción de las células tumorales, como a facilitar su desarrollo [490].

A pesar de la importante respuesta local de células T en pacientes con OPC HPV+ [448], los tumores se desarrollan debido a dos mecanismos de evasión contra las células T. El primero es que el microambiente tumoral puede llevar a la apoptosis, anergia y agotamiento funcional de las CTL por el desequilibrio en el perfil de citocinas local, por la expresión de FasL local [490], por la represión de la expresión de la cadena ζ de CD3 del TCR [456] debido a la producción de ROS por las MDSCs [497] y por la expresión aumentada de PD-L1 por células malignas y TAM en la periferia del tumor como barrera del entorno inflamatorio [145]. El segundo mecanismo de evasión es la elevada frecuencia de T_{reg} , lo que se han relacionado con la progresión tumoral al inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, prevenir la activación de CTL, evitar la proliferación de linfocitos T CD4+ y NK y activar las funciones inmunosupresoras de las células inmunes mediante IL-10 y mecanismos dependientes de TGF β [456]. Las T_{reg} infiltran masas tumorales, especialmente en la etapa inicial de la progresión tumoral [456]. En el OPC, los tumores HPV+ están fuertemente infiltrados con T_{regs} y células T efectoras, incluso más que los casos HPV-, posiblemente porque OPC HPV+ expresa antígenos virales [496]. El equilibrio entre las células T_{reg} y las células T efectoras en el tumor es importante para la progresión del cáncer e influye en la gravedad de la enfermedad: una relación local alta de CD8+/ T_{reg} se asocia con un mejor resultado clínico [448], mientras que los niveles elevados de T_{reg} se han relacionado con un peor pronóstico [18, 456, 496].

La historia natural de una infección por HPV-HR con o sin tratamiento varía desde la regresión espontánea hasta la persistencia dependiendo de la capacidad del sistema inmunitario para detectar y eliminar la infección [126, 369]. Múltiples aspectos del ciclo infeccioso del HPV contribuyen a la evasión inmune, especialmente sus oncoproteínas, pero a pesar de la presencia de dichos mecanismos en las células infectadas y cancerosas, el desarrollo de OPC no es un resultado común de la infección incidente por HPV, pues en la mayoría de los casos el virus es eliminado antes de que se presente alguna manifestación clínica [20, 456].

3.5 Diagnóstico, tratamiento y prevención por vacunación del OPC HPV+

3.5.1 Diagnóstico

Actualmente, los casos de OPC relacionados con el tabaquismo y el abuso del alcohol están disminuyendo, mientras que los atribuibles a la infección con subtipos de HPV-HR van al alza en múltiples países desde hace varias décadas [27, 34, 38, 68, 70-74], sin embargo, todavía no existen pautas estandarizadas para detectarlo en una etapa temprana ni para predecir el riesgo de desarrollarlo [86, 453]. Actualmente el CC es el único cáncer asociado al HPV con una prueba de detección recomendada: la prueba de Papanicolaou, que puede detectar los cambios morfológicos de las lesiones precancerosas en el epitelio cervical, de las cuales se conoce su patrón histológico así como su riesgo de progresión a carcinoma invasivo [106, 139]. Desafortunadamente, un equivalente a la prueba de Papanicolaou en la orofaringe como prueba de detección temprana no es factible debido a que en varios estudios ha demostrado detectar casos de OPC solamente en lesiones accesibles para muestreo, por lo que tiene una utilidad limitada para poblaciones sin lesiones visibles [139, 498], además que no se han identificado lesiones precursoras de OPC [106, 139], ni se conoce el proceso y riesgo de progresión a carcinoma invasivo [139, 476].

Detección de la infección por HPV y el OPC

A pesar de que no existen pruebas clínicas validadas para detectar en una etapa temprana el OPC HPV+ ni para predecir el riesgo de desarrollarlo [86], existen biomarcadores ampliamente utilizados para intentar detectar este tipo de cáncer, sin embargo, la falta de estandarización de protocolos (diferentes técnicas de detección, muestreo, almacenamiento y procesamiento de muestras) no ha aportado claridad al campo [52]. Entre los biomarcadores disponibles se encuentran:

a) DNA del HPV

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la infección por HPV incluyen hibridación *in situ* (HIS), *Southern Blot*, captura de híbridos (HC, siglas en inglés de *Hybrid Capture*), hibridación en línea reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) [150].

La PCR es el método más utilizado debido a numerosas ventajas, como su bajo costo, alta sensibilidad y disponibilidad en entornos clínicos y laboratorios [106, 139, 150]. Además, la PCR se puede aplicar a distintos tipos de muestras [106, 139], por ello, se han explorado métodos de muestreo menos invasivos que las biopsias. La saliva obtenida por enjuague bucal y gárgaras [85, 346], fue propuesta como muestra para el diagnóstico para OPC HPV+ pero su sensibilidad fue baja [62, 453], además que este método no proporciona una muestra específica de la orofaringe [85]. La citología exfoliativa también se propuso, pero las criptas amigdalares profundas son difíciles de muestrear [139] y las células exfoliadas podrían no ser específicas de la orofaringe [62].

Debe tomarse en cuenta que la detección del DNA del HPV en la orofaringe no es suficiente para predecir el desarrollo posterior de OPC [139] y dar positivo para infección por HPV no prueba la persistencia de la infección, e incluso si el paciente ya tiene OPC, la presencia de una infección por HPV no es suficiente para probar la causalidad viral ya que podría reflejar una infección transitoria no relacionada con el proceso carcinogénico [67], pero debido a la baja prevalencia de infección oral por HPV-16 (~1.0%) en individuos sanos [27], la detección de la infección prevalente por el HPV-HR en las células exfoliadas orales está significativamente asociada con OPC [21, 74, 84]. En cambio, como la integración del DNA del HPV en el genoma del huésped sí es un predictor de la progresión de una infección a una neoplasia [52, 130-132], se ha establecido un ensayo de PCR específico mediado por ligación para la detección de la secuencia integrada (DIPS-PCR siglas en inglés de *Detection of Integrated Papillomavirus Sequence Polymerase Chain Reaction*) [150].

b) mRNA de HPV

Contrario a la detección del DNA viral, la detección de mRNA del HPV en muestras de tumor se considera más específica para evaluar la infección activa y el probable rol oncogénico del virus [55, 62, 106]. Al respecto, los casos de OPC HPV+ negativos a mRNA de E6, han mostrado un pronóstico más cercano al de los tumores HPV- [499]. La actividad transcripcional puede detectarse mediante PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) o *Northern Blot* para transcritos mRNA de E6/E7

[193]. Aunque la detección de mRNA para la determinación del HPV en OPC es ampliamente recomendada, es una prueba de que se realiza casi exclusivamente en entornos de investigación [55, 106, 500].

c) p16

Al explorar el valor de los marcadores subrogados de transformación celular, la expresión de p16 ha sido el marcador que muestra la asociación más consistente con el estándar de oro de la actividad transcripcional de HPV [66, 67, 475]. p16 es un regulador negativo del ciclo celular que evita la inactivación por fosforilación de pRb, sin embargo, la inactivación de pRb por E7 es independiente de cinasas, lo cual deriva en altas concentraciones de p16 sin efecto en el paro del ciclo celular [149, 192, 391]. La sobreexpresión de p16 ante E7 puede verificarse inmunohistoquímicamente en muestras de citología de base líquida y en biopsias de tejido y se considera un marcador subrogado confiable de la infección activa por HPV [67, 193, 453, 500]. Como las pruebas de expresión de mRNA no están disponibles de forma rutinaria en muchos laboratorios de diagnóstico clínico, en dicho entorno la inmunohistoquímica de p16 se considera una herramienta versátil y conveniente para determinar indirectamente la actividad transcripcional de HPV: posee alta sensibilidad, es costo-efectiva, se puede aplicar en biopsias y citología de cepillo [106] y tiene una alta correlación de tinción con la expresión de mRNA de HPV E6/E7 [193]. La determinación de p16 en OPC ayuda a diferenciar entre tumores HPV+ y HPV- por lo que puede ser usado como marcador sustituto para detectar OPC HPV+ [51]. Esto se debe a que en tumores orofaríngeos HPV- p16 es poco frecuente ya que es silenciada mediante múltiples alteraciones genéticas para interrumpir el control del ciclo celular por pRb y favorecer la transformación celular [62-64]. Por otra parte, en los tumores HPV+, E7 interfiere con esta vía y en consecuencia, no se requiere la inactivación de p16 [64].

d) Biomarcadores inmunológicos.

Un biomarcador que no se utiliza actualmente en la clínica pero que parece prometedor para el diagnóstico de OPC es la detección de anticuerpos anti-E6 del HPV-16 [453] por *Western Blot*, ELISA y el método de serología multiplex basado en perlas (multiplex-GST) [16], ya que los anticuerpos anti-E6 se asocian diferencial y significativamente al OPC [27, 103, 448]. Contrario a los anticuerpos

anti-E7 [501], la presencia de anti-E6 no está asociada con otros cánceres causados por HPV [476] y tienen escasa presencia en individuos sin OPC HPV+ [27]. Asimismo, la detección de anti-E6 tiene una sensibilidad mayor al 90% y una especificidad mayor al 99% para el diagnóstico de OPC HPV+ [453, 502, 503] y se ha detectado en algunos pacientes más de 10 años antes del diagnóstico de OPC [448, 476, 502]. Estas observaciones sugieren que anti-E6 junto con algoritmos y otras pruebas moleculares, podría ser una herramienta de prevención para identificar individuos con alto riesgo de desarrollar cáncer en regiones donde la fracción de OPC atribuible a HPV es mayor que la HPV- [503]. Por otra parte, se ha propuesto que otros biomarcadores inmunológicos podrían tener utilidad pronóstica en OPC, como el nivel de células CD8+ circulantes, proporción de CD4+/CD8+ circulantes, estimación por inmunohistoquímica de TIL CD8+ y FOXP3+, expresión de MHC-I y elaboración de perfiles de citocinas [91], pero todos ellos requieren más estudio y validación en comparación con los marcadores utilizados actualmente (HPV DNA y p16) [448].

Aunque la expresión de p16 y la detección del DNA del HPV se correlacionan con OPC HPV+, ninguna de las pruebas por sí sola es un método óptimo para establecer la oncogénesis mediada por HPV [66, 106, 500, 502]. La proporción de HNC HPV+ se sobrestima al usar solamente PCR [502] ya que la detección del DNA del HPV es un indicador de la presencia viral pero no determina la presencia de una infección activa [66, 453], ni prueba la oncogénesis viral. De esta forma, el DNA del HPV puede reflejar una infección transitoria en una malignidad atribuible al consumo de tabaco y alcohol [67, 504]. Por otra parte, la detección exclusiva de p16 tiene una proporción significativa de falsos positivos (cerca del 20% de los OPC p16+ son HPV-) [106] ya que esta molécula puede sobreexpresarse en otros cánceres no asociados a HPV o en tejido sano [66, 453, 505]. Por lo tanto, confiar exclusivamente en la tinción de p16 o la detección de DNA para la identificación de cánceres relacionados con el HPV conduce a una clasificación errónea y, en consecuencia, a tratamientos inadecuados [500]. El estado de HPV del cáncer debe decidirse por la infección activa del HPV [66, 67, 453], y se ha observado que la prueba de p16 y/o HPV-mRNA además de HPV-DNA produce la aproximación más precisa para juzgar el rol causante del HPV en HNC [33, 67, 106, 453]. En consecuencia, para identificar infecciones activas por HPV en OPC, se recomienda una prueba inicial de

tinción de p16, que de ser positiva, deber ser seguida de una prueba de detección del DNA del HPV [139, 500].

Diagnóstico y evaluación del OPC

El diagnóstico y evaluación de OPC comienza con una revisión del historial clínico del paciente para la búsqueda de cáncer, una encuesta de factores de riesgo y un examen físico de cabeza y cuello, prestando especial atención a los síntomas de dolor de garganta persistente, disfagia crónica, odinofagia persistente y otalgia [82]. Debido a que estos síntomas pueden asociarse a otras patologías, el examen físico debe incluir una inspección especial del complejo amigdalino, la base de la lengua y una evaluación cuidadosa de adenopatías [139], además, se pueden utilizar otras pruebas y procedimientos para detectar un tumor, como la PET-CT, la biopsia y la resonancia magnética. Si se encuentra cáncer, se busca en el tejido tumoral el DNA del HPV y/o p16 [139]. Al respecto, aunque no existe un protocolo estándar de diagnóstico de OPC HPV+, el *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* recomienda en la 8ª edición del *Cancer Staging Manual* (Enero 2018) determinar la presencia del HPV en el cáncer [139, 506] para establecer su etapa clínica y patológica usando el sistema tumor-ganglio-metástasis (TNM, siglas del inglés *Tumor-Nodule-Metastasis*), un sistema unificado de estadificación del cáncer ampliamente empleado que fue creado para ayudar con la evaluación de la etapa de la enfermedad, facilitar la selección del tratamiento y determinar el pronóstico y la estratificación del riesgo. El sistema categoriza tumores con base en una evaluación de tres características principales: tamaño del tumor primario (T), presencia de ganglios linfáticos con metástasis (N) y metástasis a distancia (M) [130, 507]. Por otra parte, la positividad para el HPV se determina mediante inmunohistoquímica para p16 en el tejido tumoral, donde los casos con una intensidad de tinción moderada (+2/3) y una tinción difusa ($\geq 75\%$ de expresión nuclear y citoplasmática en las células tumorales) se clasifican como probablemente asociados a HPV (Figura 41) [506, 508]. Cabe mencionar que aunque p16 se considera un biomarcador subrogado confiable para detectar la infección activa por HPV, el manual de la AJCC no ofrece un método estandarizado para tomar la muestra ni para realizar la inmunohistoquímica y tampoco menciona la necesidad de realizar pruebas complementarias como la detección del DNA del HPV para evitar falsos positivos [106, 508, 509].

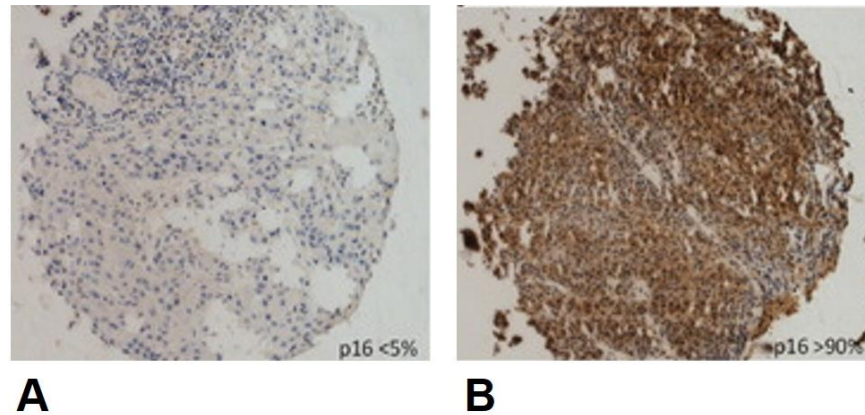


Figura 41. Inmunohistoquímica de p16 en OPC. (A) Expresión de p16 negativa (<5% de células tumorales teñidas). (B) Expresión de p16 positiva (>90% de células tumorales teñidas) [51].

La separación de la clasificación TNM de OPC dependiendo de su asociación a HPV representa un cambio significativo con respecto a la 7ª edición del *AJCC Cancer Staging Manual*, que sólo abordaba el comportamiento de los cánceres típicamente asociados con el abuso de tabaco y alcohol (HPV-) [506]. El algoritmo de estadificación de dicha edición no describía adecuadamente los casos OPC HPV+ ya que carecía de la capacidad para diferenciar entre etapas (los subgrupos no tenían una supervivencia significativamente diferente entre sí), no tenía equilibrio numérico entre los grupos (estaba sesgado hacia etapas avanzadas de la enfermedad) y carecía de capacidad predictiva (la etapa no daba una buena aproximación de pronóstico/supervivencia) [51, 86, 130, 506]. La revisión reciente de la estadificación TNM propuesta por AJCC se basa en la evidencia emergente y acumulada de OPC HPV+ como una entidad tumoral separada de los tumores OPC clásicos (HPV-) y en estudios como el ICON-S (siglas en inglés de *The International Collaboration on Oropharyngeal Cancer Network for Staging*) [510], donde se mostró que la estadificación AJCC 7ª edición era deficiente para la separación de etapas de pacientes HPV+ y propuso nuevas clasificaciones de estadios para OPC HPV+ que se incorporaron en la 8ª edición.

El AJCC también introdujo la clasificación TNM clínica (cTNM) que está basada en los resultados de las pruebas realizadas antes del tratamiento y la clasificación patológica (pTNM) que está basada en lo que se encuentra durante la cirugía para determinar la etapa (I-IV) del OPC HPV+ [502, 506]. Una vez que se determinan T, N y M, se combinan y se asigna una etapa, donde la más alta refleja cáncer más avanzado. Esta nueva clasificación no incluye carcinoma *in situ* debido al patrón no agresivo de invasión de OPC

HPV+ [506], y se introduce el término T0 para designar el carcinoma de células escamosas en ganglios linfáticos, entidad clínica que surge de una lesión primaria no detectada y que es frecuente en OPC HPV+ [511, 512]. Este nuevo paradigma para OPC HPV+ mejorará la estadificación de los pacientes con fines de manejo y pronóstico [506], por ejemplo, el 48% de los cánceres en estadios III y IV HPV+ según los criterios de estadificación del AJCC 7ª edición, serían estadio I utilizando el AJCC 8ª edición [513]. Tan solo el beneficio psicológico de tener un cáncer en estadio I en comparación con un estadio IV es significativo, y permitirá a los médicos tranquilizar a sus pacientes al informarles que tienen un buen pronóstico [506].

3.5.2 Tratamiento

Una vez que el cáncer se ha detectado, el plan de tratamiento del paciente depende de varios factores, como su edad, estado general de salud, la ubicación exacta del tumor y la etapa del cáncer. El tratamiento para el cáncer de cabeza y cuello puede incluir cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida o una combinación de tratamientos [47]. Independientemente de la opción terapéutica escogida, el OPC HPV+ responde ampliamente y tiene un pronóstico excelente [51, 506, 514-517], con hasta un 50% de reducción absoluta del riesgo de muerte [518-522] así como un bajo riesgo de recurrencia, en comparación con pacientes HPV- [139, 519, 522]. Cabe mencionar que fumar tabaco y tener un estadio tumoral más avanzado contrarrestan en parte esta respuesta terapéutica favorable, lo que significa que el riesgo de mortalidad en estos pacientes se eleva a un nivel comparable al de los pacientes OPC HPV- [523].

Se han sugerido varios mecanismos para explicar por qué el OPC HPV+ responde mejor al tratamiento en comparación con el OPC HPV- [139]:

- a) Sensibilidad incrementada inherente. Los mecanismos moleculares subyacentes para dicha sensibilidad aumentada se desconocen y son objeto de una intensa investigación [55, 448], pero se ha sugerido que, de alguna manera, la quimioterapia y radioterapia podrían reactivar a p53 en los tumores HPV+ [60, 139] o participar en la activación del sistema inmunológico para atacar a las células tumorales [448].

- b) Genes TP53 e INK4a intactos. Se ha observado que los tumores HPV+ poseen genes silvestres para p53 y p16 en comparación con los HPV-, donde son inactivados por alteraciones genéticas como mutaciones, pérdida de heterocigosidad e hipermetilación [62, 63]. La presencia de ambos genes intactos significa que las vías apoptóticas a través de p53 y p16 se conservan [62] y podrían activarse mediante radiación o quimioterapia, haciendo sensibles al tratamiento a las células tumorales [52, 62, 448].
- c) Menor acumulación de mutaciones. OPC HPV+ tiene en promedio menos mutaciones que OPC HPV- (aparte de p53 y p16) [63, 64, 524, 525] debido a que a las oncoproteínas de HPV interrumpen varias vías celulares sin la necesidad de causar alteraciones genéticas [64]. Por lo tanto, la probabilidad de que el OPC HPV+ obtenga una mutación que le proporcione una ventaja de crecimiento que derive en un comportamiento más agresivo y menor respuesta, es menor que en los casos de cáncer HPV- [139].
- d) Respuesta inmune. Al ser un agente externo, la persistencia del HPV en las amígdalas podría promover una respuesta inmune a antígenos específicos del virus que sea útil para detectar y eliminar tumores [448, 526]. Otra hipótesis es que la radiación y quimioterapia preparan al sistema inmunológico para combatir al tumor, ya que las lesiones a las células cancerosas y la inflamación local causadas por el tratamiento pueden generar una presentación cruzada aumentada o más eficiente de los antígenos del HPV en las células tumorales moribundas y mejorar el reclutamiento de CTL específicos del tumor. Asimismo, esta presentación de una señal de peligro y un antígeno extraño podría inducir que la respuesta inmune rompa la tolerancia provocada por el tumor [448].
- e) Ausencia de cancerización de campo. Al contrario de OPC HPV+, el OPC HPV- presenta cambios genéticos tempranos en epitelios de los cuales pueden surgir múltiples lesiones independientes [51, 52], por lo que su progresión locoregional es mayor y dificulta el tratamiento de las lesiones [527].
- f) Pacientes. Los pacientes OPC HPV+ son generalmente más jóvenes y saludables que sus contrapartes HPV-, usualmente no tienen antecedentes de tabaquismo y

tienen menos comorbilidades, lo cual podría influir en el mejor control de este tipo de cáncer y su mayor supervivencia [106, 137].

A pesar de que el OPC HPV+ tiene un perfil clínico, histológico y molecular diferente, así como un pronóstico significativamente mejor independientemente del tratamiento y del estadio en el momento del diagnóstico en comparación con OPC HPV- [47, 51, 448], actualmente el tratamiento para ambos tipos de OPC es el mismo: extirpación quirúrgica con quimioterapia y/o radioterapia [51, 86]. El excelente pronóstico del OPC HPV+ recalca la importancia de minimizar los efectos secundarios relacionados con el tratamiento, especialmente porque dichos procedimientos a menudo tienen consecuencias importantes en funciones como respirar, tragar y hablar, así como un significativo deterioro estético [518]. Esto es ciertamente pertinente para pacientes más jóvenes y sanos con una esperanza de vida prolongada, cuya calidad de vida estaría siendo afectada negativamente al someter a un tratamiento innecesariamente tóxico [55].

Actualmente se están realizando ensayos clínicos para estudiar la desintensificación de los tratamientos para reducir la toxicidad [502, 518], siendo las principales sugerencias una reducción de la dosis de radiación (combinada con cirugía o quimioterapia), eliminación de la quimioterapia, y uso de radiación, quimioterapia o cirugía sola para pacientes de muy bajo riesgo [502, 518, 528], siendo la primera opción la que posee más apoyo, ya que se ha demostrado ampliamente que OPC HPV+ es notablemente sensible a la radioterapia [51, 520] y los pacientes con radioterapia sola se comparan favorablemente con los tratados con enfoques de quimiorradioterapia más intensivos, pero sin sus efectos tóxicos sistémicos [51].

Asimismo, se han desarrollado opciones de tratamiento no convencionales con el interés de desarrollar terapias más dirigidas y menos tóxicas. Entre ellas, las inmunoterapias son las más atractivas, ya que buscan activar al propio sistema inmunológico del paciente o superar la inmunosupresión inducida por el tumor [369, 448] para combatir el cáncer HPV+ y permitir su erradicación o suprimir su crecimiento a largo plazo [450]. Este tratamiento puede ser específico, lo que reduce la toxicidad asociada a la terapia; puede ser dinámico, en el sentido de que la respuesta inmune puede evolucionar con el cáncer; puede ser un tratamiento de tipo sistémico, por lo que puede atacar a las células metastásicas y puede desarrollar memoria [97, 448]. Las opciones de

inmunoterapia para OPC HPV+ que existen o están en desarrollo incluyen la transferencia adoptiva de células T, terapia con anticuerpos monoclonales y vacunas terapéuticas que están basadas en péptidos, DC, ácidos nucleicos o su combinación [529]. Se anticipa que la combinación de diferentes enfoques inmunoterapéuticos tendrá el potencial de superar múltiples barreras en la inmunosupresión mediada por HPV y así restaurar una respuesta inmunitaria eficaz para eliminar los tumores asociados al HPV [369].

3.5.3 Vacunación

La OMS reconoce la importancia de las enfermedades relacionadas con el HPV como amenazas para la salud pública mundial y ha reiterado la recomendación de incluir las vacunas contra el HPV en los programas nacionales de inmunización [22]. Actualmente existen tres vacunas para la prevención de la infección por HPV: Cervarix® elaborada por GlaxoSmithKline, es bivalente para HPV-16 y -18 adyuvada con monofosforil lípido A e hidróxido de aluminio [530]; Gardasil® y Gardasil 9® elaboradas por Merck, la primera es tetravalente para HPV-6, -11, -16, -18 y la segunda es nonavalente ya que incluye además a HPV-31, -33, -45, -52, -58, ambas están adyuvadas con hidroxifosfato sulfato de aluminio [531, 532]. Las tres vacunas se basan en partículas no infecciosas similares al virus o VLPs de L1 producidas por tecnología de DNA recombinante en un sistema de expresión en Baculovirus [530] (Cervarix®) y en *Saccharomyces cerevisiae* (Gardasil® y Gardasil 9®) [531, 532] y están aprobadas en todo el mundo para la prevención de cáncer de vulva, vagina, ano y cérvix, así como de verrugas genitales, dependiendo de los tipos de HPV incluidos en cada vacuna. El objetivo principal de la profilaxis contra el HPV es la producción de anticuerpos anti-L1 con el fin de evitar la infección inicial y así, evitar la formación del cáncer asociado a HPV [450, 533]. Dicho esto, ninguna de las vacunas elimina la infección por HPV ni trata las enfermedades asociadas al HPV ya existentes [369, 530-532], por lo cual se sugiere que la vacuna contra el HPV se aplique a preadolescentes (9-14 años), es decir, antes del inicio de la actividad sexual y, por tanto, antes de cualquier exposición a la infección por HPV [46, 135, 534].

Al comparar la respuesta serológica obtenida por vacunación contra la conferida por la infección natural por HPV, se observa que los anticuerpos neutralizantes anti-L1 generados a partir de las vacunas profilácticas son más abundantes (2 a 3 órdenes logarítmicos) [135, 533, 535, 536], permanecen en sangre en niveles altos durante más

tiempo [18], se desarrollan en prácticamente todos los sujetos [135, 537] y más rápidamente [18, 135, 538]. Esto se ha atribuido al hecho de que las VLP del HPV cuando se administran como vacuna se inyectan por debajo de la capas basales de la piel y por lo tanto, interactúan con DC, mientras que por infección natural a través de las capas suprabasales HPV interactúa con LC [538]. Ambas APC han demostrado *in vitro* internalizar por igual las VLP del HPV, sin embargo, solo las DC se activan e inducen inmunidad específica contra el HPV [456, 538].

Los datos de extensos ensayos clínicos y de la vigilancia de seguridad posterior a la comercialización indican que las tres vacunas contra el HPV existentes son seguras y brindan una protección eficaz y duradera contra las enfermedades causadas por las infecciones por el HPV [22, 533]. Se ha demostrado que las vacunas tienen una eficacia del 90% al 100% en la prevención de infecciones por los genotipos del HPV incluidos en la vacuna y lesiones precancerosas anogenitales asociadas [533]. De hecho, en los países donde se implementó y monitoreó la vacunación contra el HPV, se ha producido una reducción significativa en la prevalencia de los tipos de HPV inyectados [539-541], lo cual se ha atribuido a la vacunación individual e inmunidad colectiva generada [542]. No hay evidencia de que la protección contra el HPV conferida por la vacunación disminuya con el tiempo, y a la fecha, la protección contra los tipos de HPV a los que se han dirigido las vacunas se estima que dura al menos 10 años con Gardasil® [543], al menos 9 años con Cervarix® [544], y al menos 6 años con Gardasil 9® [545]. Al comparar estas vacunas con un placebo, no hubo diferencia significativa en el riesgo de eventos adversos graves [546] y las reacciones adversas más habituales fueron las comunes a la vacunación como dolor leve, enrojecimiento o hinchazón en el brazo donde se aplicó la inyección, mareos o desmayos, náuseas y dolor de cabeza [541].

Durante años, ninguna vacuna contra el HPV fue aprobada como preventiva de cánceres OPC HPV+ debido al requisito regulatorio de proveer puntos finales clínicamente identificables en los ensayos clínicos, como lesiones precancerosas, mismas que no se han descrito para OPC [27, 547]. Ante esta imposibilidad, distintas instituciones de salud recomendaban a las agencias reguladoras que aceptaran como punto final la eficacia de la vacuna contra la infección incidente y persistente por HPV [548]. Finalmente, en junio de 2020, la FDA aprobó la adición de su uso para la prevención de cánceres de orofaringe y otros cánceres de cabeza y cuello causados por tipos de virus del papiloma humano (HPV) incluidos en la vacuna Gardasil 9® [549], lo cual

potencialmente derivará en otras agencias a nivel internacional aprobando esta indicación en los siguientes años.

Se espera que la vacunación contra el HPV tenga resultados prometedores en la prevención de OPC HPV+, ya que las vacunas protegen contra los tipos de HPV que mayormente lo causan (especialmente HPV-16) [69]. Estudios previos han encontrado que la vacunación contra el HPV se asocia con una disminución significativa de la infección oral con los tipos de HPV en la vacuna en individuos vacunados *versus* no vacunados, lo que sugiere un beneficio potencial para reducir los casos futuros de OPC [84, 502, 547, 550]. Se necesitan más estudios para demostrar la eficacia de estas vacunas en la prevención del desarrollo de OPC [551], pero si la eficacia es la misma que la observada en los sitios anogenitales (90-100%), las vacunas dirigidas al HPV-16 y -18 podrían prevenir potencialmente el 90.5% de los casos OPC HPV+ a nivel mundial, con un 4.5% adicional cubierto con los tipos adicionales en Gardasil 9 (95% total), lo cual se estima que representa una prevención del 21.3% de OPC en todo el mundo (independientemente del estado del HPV) [33]. Además, al reducir la incidencia y transmisión del HPV anogenital, la vacuna también ayudaría a reducir la incidencia y la transmisión sexual del HPV oral, e indirectamente, la incidencia de OPC HPV+ [22].

La vacunación contra el HPV es hoy en día la opción de prevención más prometedora para detener la tendencia creciente de OPC HPV+ [547], pero a pesar de la evidencia que respalda la seguridad y eficacia de las vacunas para prevenir varios tipos de cánceres HPV+, las tasas de vacunación siguen siendo bajas [18, 135], especialmente en hombres, dado que la OMS prioriza la vacunación de niñas (9-14 años) para la prevención de CC debido a que su tasa de incidencia mundial es mayor que cualquier otro sitio de cáncer relacionado con el HPV [22, 33] y exhorta a los países a posponer temporalmente la implementación de estrategias de vacunación contra el HPV para hombres y grupos de mayor edad (>15 años), ya que desvían recursos de la vacunación de la población objetivo principal (generan restricciones de suministro global y deja a los países con una alta carga de CC sin acceso a la vacuna) [22]. Debido a esto, aunque a partir de 2019, 100 países ya incluyen vacunas contra el HPV en sus programas nacionales de inmunización [552], solo unos pocos apoyan la vacunación independiente del sexo para adolescentes/adultos jóvenes (entre ellos Australia, Estados Unidos, Canadá, Gran Bretaña, Italia, Noruega y España) [553]. Este enfoque es costo-efectivo ahora, pero las cifras de OPC van en aumento desde hace décadas y en países como

EUA, el OPC ya superó al CC en casos anuales [33], además de que deja desprotegidas poblaciones como los hombres que tienen sexo con hombres. La OMS también recomienda que este aplazamiento en la vacunación de poblaciones secundarias se mantenga hasta que >80% de las niñas estén vacunadas, para así lograr tener inmunidad colectiva y reducir el riesgo de infección por HPV en los niños [22], sin embargo, la vacunación en las mujeres no ha alcanzado la tasa necesaria para conferir protección a todo el sexo opuesto [18, 19, 135, 547].

Las barreras para la vacunación contra el HPV (inicio o finalización) se han estudiado en la triada padre-paciente-médico, y se han descrito principalmente como: preocupación de los padres sobre la seguridad de la vacuna, la percepción de que el riesgo de infección por HPV o enfermedad relacionada con el HPV es bajo, pensamientos (carentes de evidencia científica [135]) sobre la propensión a la promiscuidad y/o al inicio temprano de la actividad sexual en las niñas vacunadas y poco interés en vacunarse por parte de las mujeres adultas jóvenes sexualmente inactivas, casadas o en una relación monógama [554]. También se ha encontrado que los proveedores de atención médica no sienten la necesidad de brindar recomendaciones sólidas para la vacuna ya que no ven al HPV como una amenaza grave para la salud, no son conscientes de que además de prevenir CC, el HPV puede prevenir otros cánceres, se sienten incómodos al participar en conversaciones sobre sexualidad con padres o pacientes adolescentes [555], o tienen limitaciones de tiempo durante una visita para discutir toda la información necesaria para una decisión informada por parte del padre o del paciente [556]. Sin duda, el facilitador principal de la vacunación contra el HPV es una recomendación sólida del personal de salud, por lo que los proveedores de atención médica pueden mejorar la utilización de la vacuna contra el HPV asumiendo un papel activo con los pacientes [135].

Capítulo 4. OPC HPV+ en México

El OPC HPV+ tiene una de las incidencias de cáncer de más rápido crecimiento en varios países [27, 34, 38, 68, 70-74], sin embargo, en México la información epidemiológica con relación al OPC es escasa y existe un subregistro de los casos nacionales (los registros de cáncer no recopilan de forma rutinaria datos sobre si el HPV se detecta en el tumor) y la última fuente oficial de casos data de hace casi 20 años [557].

Los estudios sobre la incidencia, prevalencia y comportamiento de la infección por HPV en México se han centrado mayormente en genitales y ano, y entre los estudios de HNC asociados a HPV, la mayoría sólo aborda el cáncer de cavidad oral y/o el cáncer de laringe. Los estudios en población mexicana sobre infección oral y/o cáncer orofaríngeo que existen poseen limitaciones: son antiguos, usan una población pequeña, no cuentan con grupo control, usualmente no estudian persistencia y/o la presencia de HPV se confirma sólo por detección de DNA. Además, no es posible la estimación de indicadores robustos a partir de ellos, ya que los estudios tienen diferencias en el diseño, muestra, procesamiento, población (población sana, de riesgo, mujeres, hombres) y región geográfica cubierta (se ha observado prevalencia selectiva entre regiones) [81, 558, 559].

A pesar de estas limitaciones, GLOBOCAN 2020 (siglas en inglés de *Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence*) que es un proyecto de la IARC, reportó para México 328 casos de OPC entre las 195,499 neoplasias malignas diagnosticadas ese año, y estimó una tasa de incidencia y mortalidad anual ajustada de: hombres 0.28 y 0.19, y mujeres 0.09 y 0.05, respectivamente (casos por 100,000 habitantes) [560]. Sin embargo, no es posible discernir la fracción atribuible al HPV, además que la IARC recomienda interpretar con precaución sus estimados, dado que <3% de la población de Centroamérica (incluyendo a México) está cubierta por registros de cáncer de alta calidad [561]. En otras palabras, por la cantidad y características de los estudios realizados en población mexicana y los sesgos asociados al subregistro del OPC HPV+, los indicadores nacionales e internacionales no proporcionan un panorama de la verdadera situación de esta enfermedad en México, lo cual podría representar una debilidad importante dado que en México se han descrito factores de riesgo en el desarrollo del OPC: inicio sexual temprano [562], presencia de variantes AA de HPV-16 [338] y variantes con polimorfismos LCR-G7518A y E6-T350G [339] (asociados con persistencia y carcinogénesis) [338, 342,

343]. Asimismo, en México el CC es un problema de salud pública y se ha descrito que la transmisión del HPV por sexo oral es mayor de mujer a hombre [68, 560].

A pesar de que existen muchas preguntas acerca de la situación del OPC HPV+ en México, no es necesario esperar a que todas sean resueltas para impulsar la reevaluación de cómo se diagnostica y trata a los pacientes con esta enfermedad. Entre las guías de práctica clínica del Instituto Mexicano del Seguro Social no existe ningún protocolo de prevención, diagnóstico y tratamiento del OPC, sólo del carcinoma epidermoide de laringe [563] y cavidad oral [564], ambos enfocados al tabaquismo y alcoholismo como agentes causantes. Ambas guías mencionan brevemente al HPV como factor de riesgo y recomiendan investigar en la historia clínica el antecedente de infecciones por HPV, pero no ofrece información sobre pruebas de laboratorio para establecer el estatus actual de HPV, ni qué procedimiento se debería seguir si se obtuviera un resultado positivo. Debido a que la prueba de HPV no se realiza rutinariamente a las biopsias de OPC, las opciones de tratamiento para los pacientes HPV+ en México siguen siendo innecesariamente agresivas [563, 564].

Desde 2012, la vacuna anti-HPV se encuentra dentro del esquema nacional de vacunación de la Secretaría de Salud, y se aplica de forma gratuita a niñas de quinto grado de primaria y niñas de 11 años de edad no escolarizadas como parte de la estrategia para prevenir el CC [565, 566]. La vacunación contra el HPV en los niños puede reducir el riesgo de transmisión a las parejas sexuales y, por lo tanto, disminuir el riesgo de enfermedades relacionadas con el HPV en la población, pero este enfoque es complicado de aplicar en México cuando el CC es el segundo cáncer con mayor incidencia y mortalidad en la mujer desde el 2006 [560, 567, 568]. Actualmente, la Ciudad de México es el único estado del país donde se les aplica la vacuna anti-HPV a los niños desde el 2017 [569]. Los datos acerca de la cobertura nacional alcanzada hasta ahora con la vacuna anti-HPV no están disponibles para consulta, por lo que no es posible ofrecer un comentario acerca de la inmunidad colectiva en México contra el OPC HPV+. Sin embargo, se ha documentado la alta aceptabilidad de la vacuna en México: estudios muestran que la vacuna tiene una aceptación mayor al 80% independientemente del sexo, presencia de co-morbilidades como HIV e incluso ante la falta de información de la vacuna, y que los promotores más importantes de aceptabilidad fueron desear protegerse de la transmisión del HPV o del cáncer y que la vacuna estuviera disponible de forma gratuita [567, 570, 571]. Por otra parte, las barreras para la aceptación de la vacuna

contra el HPV se basan en información errónea sobre el HPV y la vacuna, por ejemplo, no sentirse en riesgo de contraer HPV, oposición de la pareja a la vacuna, dudas sobre la seguridad de la vacuna y posibles efectos adversos posteriores [567, 571]. Sin embargo, es importante señalar que dichos estudios fueron realizados en zonas urbanas y que un alto índice de aceptación no necesariamente significa un alto índice de vacunación [572].

Ante la ausencia de información nacional actual del OPC HPV+, falta de algoritmos para identificar individuos en riesgo de desarrollarlo y ausencia de guías para detectarlo y tratarlo, la vacunación profiláctica contra el HPV tiene el mayor potencial para prevenir que este carcinoma se convierta en una amenaza para la salud de los mexicanos. Recibir información sobre los beneficios de la vacuna contra el HPV y los riesgos de infección por HPV por parte de un médico ha sido un predictor significativo de la voluntad de madres e hijas adolescentes para vacunar [567, 571-573], por lo que un rol más activo por parte de los servicios de atención médica para informar acerca de la vacuna y facilitar su acceso, así como actividades de educación para la salud que busquen evitar o disminuir los factores de riesgo en el contagio de HPV, podrían marcar la diferencia en el control de esta enfermedad cuya marcha se desconoce en nuestro país.

Conclusiones

La asociación entre la infección por HPV y OPC HPV+ reside en los mecanismos moleculares oncogénicos inherentes del HPV y la conducta sexual de ciertas poblaciones, factores que han llevado al aumento significativo de los casos de OPC atribuibles a la infección prevalente con subtipos de alto riesgo de HPV (principalmente HPV-16) en múltiples países, afectando desproporcionadamente a los hombres. La mayoría de los individuos son capaces de eliminar la infección oral por HPV sin manifestaciones clínicas, pero una fracción de los sujetos que no logran eliminar la infección corre el riesgo de desarrollar OPC debido a que a lo largo de la infección persistente puede ocurrir la integración del DNA del virus al genoma de la célula hospedera, lo que deriva en mutagénesis insercional y la desregulación en la expresión de las oncoproteínas del HPV, que favorecen que las células infectadas adquieran características anormales por diversos mecanismos y pueden conducir al desarrollo y progresión de lesiones cancerosas.

Actualmente no es posible detectar el OPC HPV+ en etapas tempranas, por lo que la vacunación contra el HPV es la opción más prometedora de prevención para detener la tendencia creciente de OPC HPV+, pero las tasas de vacunación siguen siendo bajas, especialmente en hombres. Aunado a esto, todavía no se cuenta con un protocolo ampliamente utilizado para el diagnóstico de esta patología, lo cual retrasa la terapia, y los regímenes terapéuticos existentes siguen siendo los mismos que para el OPC HPV-, a pesar de que se ha demostrado que son entidades tumorales distintas, por lo que los pacientes con OPC HPV+ continúan siendo expuestos a tratamientos innecesariamente agresivos que a menudo tienen consecuencias serias en funciones como respirar, tragar y hablar, así como un significativo deterioro estético.

Dados los aumentos mundiales en la incidencia de OPC HPV+ durante las últimas décadas, es de interés para cada país aclarar en qué medida la carga de OPC ha aumentado en su territorio y el impacto que podría tener en su población. En el caso de México, el OPC HPV+ representa una amenaza latente cuya información es escasa y se encuentra desactualizada; esta situación podría cambiar a través de programas de vigilancia sanitaria y estudios epidemiológicos que permitan estimar la fracción de casos

OPC asociada a HPV y los determinantes de adquisición, eliminación y persistencia de la infección oral por HPV en los mexicanos, con el fin de identificar poblaciones de alto riesgo e implementar servicios de salud preventivos y de atención temprana.

Referencias

1. Van Doorslaer, K., et al., *ICTV virus taxonomy profile: Papillomaviridae*. Journal of General Virology, 2018. **99**(8): p. 989-990.
2. Peh, W.L., et al., *Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease*. Journal of virology, 2002. **76**(20): p. 10401-10416.
3. Guan, J., et al., *Cryoelectron microscopy maps of human papillomavirus 16 reveal L2 densities and heparin binding site*. Structure, 2017. **25**(2): p. 253-263.
4. Wang, J.W. and R.B. Roden, *L2, the minor capsid protein of papillomavirus*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 175-186.
5. Anisimová, E., et al., *Presence and type specificity of papillomavirus antibodies demonstrable by immunoelectron microscopy tests in samples from patients with warts*. Journal of general virology, 1990. **71**(2): p. 419-422.
6. De Villiers, E.-M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
7. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. The Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
8. Van Doorslaer, K., et al., *The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database*. Nucleic acids research, 2017. **45**(D1): p. D499-D506.
9. Van Doorslaer, K., et al., *Identification of unusual E6 and E7 proteins within avian papillomaviruses: cellular localization, biophysical characterization, and phylogenetic analysis*. Journal of virology, 2009. **83**(17): p. 8759-8770.
10. Episteme., P. *Protein Information. Papillomavirus Episteme*. . s.f.
11. Sanclemente, G. and D. Gill, *Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2002. **16**(3): p. 231-240.
12. Plett-Torres, T., *Factores de riesgo asociados al comportamiento de anticuerpos contra las proteínas E4 y E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16, en parejas heterosexuales*. Tesis de doctorado. 2010, Instituto Nacional de Salud Pública: Centro de investigaciones sobre enfermedades infecciosas.
13. Bzhalava, D., C. Eklund, and J. Dillner, *International standardization and classification of human papillomavirus types*. Virology, 2015. **476**: p. 341-344.
14. Burk, R.D., A. Harari, and Z. Chen, *Human papillomavirus genome variants*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 232-243.
15. International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center, *HPV Reference clones*. s.f., www.hpvcenter.se.
16. Pedroza-Saavedra, A., et al., *Molecular bases of human papillomavirus pathogenesis in the development of cervical cancer*. Human Papillomavirus and Related Diseases—From Bench to Bedside—Research Aspects. Rijeka, Croatia: InTech, 2012: p. 249-290.
17. Mühr, L.S.A., C. Eklund, and J. Dillner, *Towards quality and order in human papillomavirus research*. Virology, 2018. **519**: p. 74-76.
18. Wakabayashi, R., et al., *The host-microbe interplay in human papillomavirus-induced carcinogenesis*. Microorganisms, 2019. **7**(7): p. 199.
19. Satterwhite, C.L., et al., *Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008*. Sexually transmitted diseases, 2013. **40**(3): p. 187-193.
20. Doorbar, J., et al., *The biology and life-cycle of human papillomaviruses*. Vaccine, 2012. **30**: p. F55-F70.
21. Cancer, I.A.f.R.o., *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Biological agents-Volume 100B*. Vol 100B. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2012.
22. Organization, W.H., *Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017—Recommendations*. Vaccine, 2017. **35**(43): p. 5753-5755.
23. Castellsagué, X., *Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer*. Gynecologic oncology, 2008. **110**(3): p. S4-S7.

24. Muñoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. New England journal of medicine, 2003. **348**(6): p. 518-527.
25. Ho, G.Y., et al., *Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 1995. **87**(18): p. 1365-1371.
26. Molano, M., et al., *Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study*. American journal of epidemiology, 2003. **158**(5): p. 486-494.
27. Gillison, M.L., et al., *Epidemiology of human papillomavirus–positive head and neck squamous cell carcinoma*. Journal of clinical oncology, 2015. **33**(29): p. 3235.
28. Bosch, F.X., Y.L. Qiao, and X. Castellsagué, *CHAPTER 2 The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2006. **94**: p. S8-S21.
29. Franco, E.L., et al., *Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer*. The Journal of infectious diseases, 1999. **180**(5): p. 1415-1423.
30. Centers for Disease Control and Prevention, *HPV Diseases and Cancers*. 2019, <https://www.cdc.gov/hpv/parents/cancer.html>.
31. Senkomago, V., et al., *Human papillomavirus–attributable cancers—United States, 2012–2016*. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2019. **68**(33): p. 724.
32. Centers for Disease Control and Prevention, *HPV Cancers are Preventable*. 2019, <https://www.cdc.gov/hpv/hcp/protecting-patients.html>.
33. de Sanjosé, S., et al., *Burden of human papillomavirus (HPV)-related cancers attributable to HPV6/11/16/18/31/33/45/52 and 58*. JNCI cancer spectrum, 2018. **2**(4): p. pky045.
34. Braakhuis, B.J., O. Visser, and C.R. Leemans, *Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults*. Oral oncology, 2009. **45**(9): p. e85-e89.
35. Hocking, J., et al., *Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers*. British journal of cancer, 2011. **104**(5): p. 886-891.
36. Chaturvedi, A.K., et al., *Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers*. Journal of clinical oncology, 2013. **31**(36): p. 4550.
37. Forte, T., et al., *Incidence trends in head and neck cancers and human papillomavirus (HPV)-associated oropharyngeal cancer in Canada, 1992–2009*. Cancer Causes & Control, 2012. **23**(8): p. 1343-1348.
38. Hammarstedt, L., et al., *The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing*. Acta otolaryngologica, 2007. **127**(9): p. 988-992.
39. Fakhry, C., et al., *Oropharyngeal cancer survivorship in Denmark, 1977–2012*. Oral oncology, 2015. **51**(11): p. 982-984.
40. Robinson, K.L. and G.J. Macfarlane, *Oropharyngeal cancer incidence and mortality in Scotland: are rates still increasing?* Oral oncology, 2003. **39**(1): p. 31-36.
41. Sarkar, S., et al., *Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(10): p. 21087-21113.
42. Cooper, G.M. and R. Hausman, *A molecular approach*. The Cell. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.
43. Weinberg, R. and D. Hanahan, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
44. Ruddon, R. and F. Holland, *What makes a cancer cell a cancer cell*. Hoolland-Frei Cancer Medicine, 2003.
45. Joseph, A.W. and G. D'Souza, *Epidemiology of human papillomavirus-related head and neck cancer*. Otolaryngologic Clinics of North America, 2012. **45**(4): p. 739-764.
46. Centers for Disease Control and Prevention. *Head and Neck Cancers*. 2018 [cited 2020 Mayo].
47. Centers for Disease Control and Prevention. *Head and Neck Cancers*. 2017 [cited 2020 Mayo].

48. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: a cancer journal for clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
49. Joshi, P., et al., *Head and neck cancers in developing countries*. Rambam Maimonides medical journal, 2014. **5**(2).
50. Saraiya, M., et al., *US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2015. **107**(6).
51. Fischer, C.A., et al., *Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality?* International journal of cancer, 2010. **126**(5): p. 1256-1262.
52. Goon, P.K., et al., *HPV & head and neck cancer: a descriptive update*. Head & neck oncology, 2009. **1**(1): p. 1-8.
53. Singhavi, H., et al., *Tobacco carcinogen research to aid understanding of cancer risk and influence policy*. Laryngoscope investigative otolaryngology, 2018. **3**(5): p. 372-376.
54. LoConte, N.K., et al., *Alcohol and cancer: a statement of the American Society of Clinical Oncology*. Journal of Clinical Oncology, 2018. **36**(1): p. 83-93.
55. Tribius, S. and M. Hoffmann, *Human papilloma virus infection in head and neck cancer*. Deutsches Ärzteblatt International, 2013. **110**(11): p. 184.
56. Chaturvedi, A.K., et al., *Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States*. Journal of clinical oncology, 2011. **29**(32): p. 4294.
57. Hong, A.M., et al., *Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets*. Vaccine, 2010. **28**(19): p. 3269-3272.
58. Rodrigo, J.P., et al., *Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990–2009)*. International journal of cancer, 2014. **134**(2): p. 487-492.
59. Rietbergen, M.M., et al., *Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm*. International journal of cancer, 2013. **132**(7): p. 1565-1571.
60. Mehanna, H., et al., *Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region*. Head & neck, 2013. **35**(5): p. 747-755.
61. Levine, A.J. and M. Oren, *The first 30 years of p53: growing ever more complex*. Nature reviews cancer, 2009. **9**(10): p. 749-758.
62. Pannone, G., et al., *The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview*. Infectious agents and cancer, 2011. **6**(1): p. 1-11.
63. Braakhuis, B.J., et al., *Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus*. Journal of the national cancer institute, 2004. **96**(13): p. 998-1006.
64. Klussmann, J.P., et al., *Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(5): p. 1779-1786.
65. Lu, X.D., et al., *Potential clinical implications of HPV status and expressions of p53 and cyclin D1 among oropharyngeal cancer patients*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2018. **47**(10): p. 945-953.
66. Sabu, A., et al., *Human papillomavirus detection in oropharyngeal squamous cell carcinoma using p16 immunohistochemistry*. International Journal of Applied and Basic Medical Research, 2019. **9**(4): p. 212.
67. Castellsagué, X., et al., *HPV involvement in head and neck cancers: comprehensive assessment of biomarkers in 3680 patients*. Journal of the National Cancer Institute, 2016. **108**(6): p. djv403.
68. Giuliano, A.R., et al., *E UROGIN 2014 roadmap: Differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection*. International Journal of Cancer, 2015. **136**(12): p. 2752-2760.

69. Kreimer, A.R., et al., *Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review*. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2005. **14**(2): p. 467-475.
70. Conway, D., et al., *Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990–1999)—recent trends and regional variation*. *Oral oncology*, 2006. **42**(6): p. 586-592.
71. National Cancer Institute. *Surveillance epidemiology and end results cancer statistics 1992-2009 (SEER 13)*. 2018 [cited 2020 Mayo].
72. Blomberg, M., et al., *Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978–2007: focus on human papillomavirus associated sites*. *International journal of cancer*, 2011. **129**(3): p. 733-741.
73. Guntinas-Lichius, O., et al., *Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database*. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 2010. **136**(1): p. 55-63.
74. Gillison, M.L., et al., *Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis*. *Vaccine*, 2012. **30**: p. F34-F54.
75. Adilbay, D., et al., *HPV infection and P16 expression in oral and oropharyngeal cancer in Kazakhstan*. *Infectious agents and cancer*, 2018. **13**(1): p. 1-4.
76. Toman, J., et al., *HPV-positive oropharyngeal cancer via p16 immunohistochemistry in Japan*. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 2017. **126**(2): p. 152-158.
77. Kouketsu, A., et al., *Detection of human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: a cohort study of Japanese patients*. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 2016. **45**(8): p. 565-572.
78. Van Dyne, E.A., et al., *Trends in human papillomavirus–associated cancers—United States, 1999–2015*. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2018. **67**(33): p. 918.
79. Gillison, M.L., et al., *Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010*. *Jama*, 2012. **307**(7): p. 693-703.
80. Sonawane, K., et al., *Oral human papillomavirus infection: differences in prevalence between sexes and concordance with genital human papillomavirus infection, NHANES 2011 to 2014*. *Annals of internal medicine*, 2017. **167**(10): p. 714-724.
81. Kreimer, A.R., et al., *The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men*. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2011. **20**(1): p. 172-182.
82. D'Souza, G., et al., *Oral human papillomavirus (HPV) infection in HPV-positive patients with oropharyngeal cancer and their partners*. *Journal of Clinical Oncology*, 2014. **32**(23): p. 2408.
83. Majchrzak, E., et al., *Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature*. *Radiology and oncology*, 2014. **48**(1): p. 1.
84. Schlecht, N.F., et al., *Risk of oral human papillomavirus infection among sexually active female adolescents receiving the quadrivalent vaccine*. *JAMA network open*, 2019. **2**(10): p. e1914031-e1914031.
85. Kreimer, A.R., et al., *Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study*. *The Lancet*, 2013. **382**(9895): p. 877-887.
86. Campbell, C.M.P., et al., *Long-term persistence of oral human papillomavirus type 16: the HPV Infection in Men (HIM) study*. *Cancer prevention research*, 2015. **8**(3): p. 190-196.
87. Carter, J.J., et al., *Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection*. *Journal of Infectious Diseases*, 2000. **181**(6): p. 1911-1919.
88. Lu, B., R. Viscidi, and L. Villa. *Capsid antibody response to genital HPV 6, 11, 16, and 18 infection in healthy men. in 28th International Papillomavirus Conference, San Juan, Puerto Rico*. 2012.
89. Desai, S., et al., *Prevalence of human papillomavirus antibodies in males and females in England*. *Sexually transmitted diseases*, 2011. **38**(7): p. 622-629.
90. Heiligenberg, M., et al., *Seroprevalence and determinants of eight high-risk human papillomavirus types in homosexual men, heterosexual men, and women: a population-based study in Amsterdam*. *Sexually transmitted diseases*, 2010. **37**(11): p. 672-680.
91. Kreimer, A.R., et al., *Gender differences in sexual biomarkers and behaviors associated with human papillomavirus-16, -18, and -33 seroprevalence*. *Sexually transmitted diseases*, 2004. **31**(4): p. 247-256.

92. Markowitz, L.E., et al., *Seroprevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004*. The Journal of infectious diseases, 2009. **200**(7): p. 1059-1067.
93. Newall, A.T., et al., *Population seroprevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 in men, women, and children in Australia*. Clinical infectious diseases, 2008. **46**(11): p. 1647-1655.
94. Slavinsky Iii, J., et al., *Seroepidemiology of low and high oncogenic risk types of human papillomavirus in a predominantly male cohort of STD clinic patients*. International journal of STD & AIDS, 2001. **12**(8): p. 516-523.
95. Stone, K.M., et al., *Seroprevalence of human papillomavirus type 16 infection in the United States*. The Journal of infectious diseases, 2002. **186**(10): p. 1396-1402.
96. Svare, E.I., et al., *Seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles is lower in high-risk men than in high-risk women*. Journal of Infectious Diseases, 1997. **176**(4): p. 876-883.
97. Thompson, D.L., et al., *Seroepidemiology of infection with human papillomavirus 16, in men and women attending sexually transmitted disease clinics in the United States*. Journal of Infectious Diseases, 2004. **190**(9): p. 1563-1574.
98. Edelstein, Z.R., et al., *Serum antibody response following genital α 9 human papillomavirus infection in young men*. Journal of Infectious Diseases, 2011. **204**(2): p. 209-216.
99. Ho, G.Y., et al., *Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles*. The Journal of infectious diseases, 2002. **186**(6): p. 737-742.
100. Safaeian, M., et al., *Epidemiological study of anti-HPV16/18 seropositivity and subsequent risk of HPV16 and-18 infections*. Journal of the National Cancer Institute, 2010. **102**(21): p. 1653-1662.
101. Lu, B., et al., *Prevalent serum antibody is not a marker of immune protection against acquisition of oncogenic HPV16 in men*. Cancer research, 2012. **72**(3): p. 676-685.
102. Rettig, E., A.P. Kiess, and C. Fakhry, *The role of sexual behavior in head and neck cancer: implications for prevention and therapy*. Expert review of anticancer therapy, 2015. **15**(1): p. 35-49.
103. Plett-Torres, T., et al., *Frequency of antibodies against E4 and E7 from human papillomavirus type 16 in Mexican soldiers*. Archives of virology, 2007. **152**(1): p. 97.
104. Veldhuijzen, N.J., et al., *Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus*. The Lancet infectious diseases, 2010. **10**(12): p. 862-874.
105. Edelstein, Z.R., et al., *Rates and determinants of oral human papillomavirus (HPV) infection in young men*. Sexually transmitted diseases, 2012. **39**(11): p. 860.
106. Campisi, G. and V. Panzarella, *Human Papillomavirus Infection: A Risk Factor for Oral and Oropharyngeal Cancers*. Textbook of Oral Cancer: Prevention, Diagnosis and Management, 2020: p. 32.
107. Prendes, B.L., et al., *Oral human papillomavirus infection in men who have sex with men with anal squamous intraepithelial lesions*. Head & neck, 2016. **38**(S1): p. E399-E405.
108. D'Souza, G., et al., *Oral human papillomavirus (HPV) infection among unvaccinated high-risk young adults*. Cancers, 2014. **6**(3): p. 1691-1704.
109. Dahlstrom, K.R., et al., *Sexual transmission of oral human papillomavirus infection among men*. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 2014. **23**(12): p. 2959-2964.
110. Lang Kuhs, K.A., et al., *Prevalence of and risk factors for oral human papillomavirus among young women in Costa Rica*. The Journal of infectious diseases, 2013. **208**(10): p. 1643-1652.
111. Beachler, D.C., et al., *Risk factors for acquisition and clearance of oral human papillomavirus infection among HIV-infected and HIV-uninfected adults*. American journal of epidemiology, 2015. **181**(1): p. 40-53.
112. Pickard, R.K., et al., *The prevalence and incidence of oral human papillomavirus infection among young men and women, aged 18–30 years*. Sexually transmitted diseases, 2012. **39**(7): p. 559-566.
113. D'Souza, G., et al., *Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection*. PloS one, 2014. **9**(1): p. e86023.

114. D'Souza, G., et al., *Sex differences in risk factors and natural history of oral human papillomavirus infection*. The Journal of infectious diseases, 2016. **213**(12): p. 1893-1896.
115. Sabeena, S., et al., *Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus*. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2017. **43**(3): p. 429-435.
116. Eggersmann, T., et al., *Prevalence of oral HPV infection in cervical HPV positive women and their sexual partners*. Archives of gynecology and obstetrics, 2019. **299**(6): p. 1659-1665.
117. Syrjänen, S., *Current concepts on human papillomavirus infections in children*. Apmis, 2010. **118**(6-7): p. 494-509.
118. Chelimo, C., et al., *Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer*. Journal of Infection, 2013. **66**(3): p. 207-217.
119. Herrera-Ortiz, A., et al., *College women, HPV genotyping and sexual behavior before HPV vaccination: Results from samples stored for a long time*. Journal of infection and public health, 2018. **11**(2): p. 286-289.
120. Jin, F., et al., *Sexual partner's age as a risk factor for HIV seroconversion in a cohort of HIV-negative homosexual men in Sydney*. AIDS and Behavior, 2013. **17**(7): p. 2426-2429.
121. Heck, J.E., et al., *Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium*. International journal of epidemiology, 2010. **39**(1): p. 166-181.
122. Lam, J.U.H., et al., *Condom use in prevention of Human Papillomavirus infections and cervical neoplasia: systematic review of longitudinal studies*. Journal of medical screening, 2014. **21**(1): p. 38-50.
123. Baldwin, S.B., et al., *Condom use and other factors affecting penile human papillomavirus detection in men attending a sexually transmitted disease clinic*. Sexually transmitted diseases, 2004. **31**(10): p. 601-607.
124. Svare, E., et al., *Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic*. Sexually transmitted infections, 2002. **78**(3): p. 215-218.
125. Nakashima, K., et al., *Prevalence of human papillomavirus infection in the oropharynx and urine among sexually active men: a comparative study of infection by papillomavirus and other organisms, including Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma spp., and Ureaplasma spp*. BMC infectious diseases, 2014. **14**(1): p. 1-8.
126. Guidry, J. and R. Scott, *The interaction between human papillomavirus and other viruses*. Virus research, 2017. **231**: p. 139-147.
127. Soares, C.C., et al., *HIV-1, HBV, HCV, HTLV, HPV-16/18, and Treponema pallidum infections in a sample of Brazilian men who have sex with men*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e102676.
128. Rollo, F., et al., *Prevalence and determinants of oral infection by human papillomavirus in HIV-infected and uninfected men who have sex with men*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0184623.
129. Tota, J.E., et al., *Risk of oral tongue cancer among immunocompromised transplant recipients and human immunodeficiency virus-infected individuals in the United States*. Cancer, 2018. **124**(12): p. 2515-2522.
130. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nature reviews cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
131. Burk, R.D., Z. Chen, and K. Van Doorslaer, *Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity*. Public health genomics, 2009. **12**(5-6): p. 281-290.
132. Peitsaro, P., B. Johansson, and S. Syrjänen, *Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique*. Journal of clinical microbiology, 2002. **40**(3): p. 886-891.
133. Schiffman, M. and D. Solomon, *Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic cotesting*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(24): p. 2324-2331.
134. Chaturvedi, A.K., et al., *Incidence trends for human papillomavirus-related and-unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States*. Journal of clinical oncology, 2008. **26**(4): p. 612-619.
135. Valentino, K. and C.B. Poronsky, *Human papillomavirus infection and vaccination*. Journal of pediatric nursing, 2016. **31**(2): p. e155-e166.

136. Abogunrin, S., et al., *Prevalence of human papillomavirus in head and neck cancers in European populations: a meta-analysis*. BMC cancer, 2014. **14**(1): p. 1-13.
137. Elrefaey, S., et al., *HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice*. Acta Otorhinolaryngologica Italica, 2014. **34**(5): p. 299.
138. Chi, A.C., T.A. Day, and B.W. Neville, *Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update*. CA: a cancer journal for clinicians, 2015. **65**(5): p. 401-421.
139. Berman, T.A. and J.T. Schiller, *Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: one cause, two diseases*. Cancer, 2017. **123**(12): p. 2219-2229.
140. Pai, S.I. and W.H. Westra, *Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2009. **4**: p. 49-70.
141. Howard, J.D. and C.H. Chung. *Biology of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer*. in *Seminars in radiation oncology*. 2012. Elsevier.
142. Mansur, C.P. and E.J. Androphy, *Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1993. **1155**(3): p. 323-345.
143. Graham, S.V., *The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review*. Clinical science, 2017. **131**(17): p. 2201-2221.
144. Thompson, I., et al., *A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium*. Archives of oral biology, 2001. **46**(12): p. 1091-1098.
145. Lyford-Pike, S., et al., *Evidence for a role of the PD-1: PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer research, 2013. **73**(6): p. 1733-1741.
146. Alila Medical Media, *Tónoles con vista boca abierta y vista sagital*. s.f., <https://www.shutterstock.com/es/image-vector/tonsils-open-mouth-view-sagittal-120865165>.
147. Marieb, E. and L. Smith, *Human Anatomy & Physiology Laboratory Manual*. 2016, Pearson: EUA.
148. Bernstein, J., E. Baekkevold, and P. Brandtzaeg, *Immunobiology of the Tonsils and Adenoids En Mucosal Immunology*. 2005, Academic Press: EUA.
149. Zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nature reviews cancer, 2002. **2**(5): p. 342-350.
150. Gutiérrez-Xicoténcatl, L., et al., *Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer*. Salud publica de Mexico, 2009. **51**: p. s479-s488.
151. Wu, C., N. Kajitani, and S. Schwartz, *Splicing and polyadenylation of human papillomavirus type 16 mRNAs*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(2): p. 366.
152. MuÈnger, K., et al., *Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein*. Oncogene, 2001. **20**(54): p. 7888-7898.
153. Middleton, K., et al., *Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers*. Journal of virology, 2003. **77**(19): p. 10186-10201.
154. Campisi, G., et al., *Human papillomavirus: Its identikit and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions*. International journal of oncology, 2007. **30**(4): p. 813-823.
155. You, J., *Papillomavirus interaction with cellular chromatin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2010. **1799**(3-4): p. 192-199.
156. Campos, S.K., *Subcellular trafficking of the papillomavirus genome during initial infection: the remarkable abilities of minor capsid protein L2*. Viruses, 2017. **9**(12): p. 370.
157. Moody, C.A. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. Nature Reviews Cancer, 2010. **10**(8): p. 550-560.
158. McLaughlin-Drubin, M.E. and K. Mùnger, *The human papillomavirus E7 oncoprotein*. Virology, 2009. **384**(2): p. 335-344.
159. Doorbar, J., et al., *Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivousing high-affinity synthetic fabs to E4*. Virology, 1997. **238**(1): p. 40-52.
160. Mantovani, F. and L. Banks, *The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression*. Oncogene, 2001. **20**(54): p. 7874-7887.

161. Cheng, S., et al., *Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes*. Genes & development, 1995. **9**(19): p. 2335-2349.
162. Woodworth, C., et al., *Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection*. Oncogene, 1992. **7**(4): p. 619-626.
163. McBride, A.A., *Replication and partitioning of papillomavirus genomes*. Advances in virus research, 2008. **72**: p. 155-205.
164. Chow, L., et al., *Human papillomavirus types 6 and 11 mRNAs from genital condylomata acuminata*. Journal of Virology, 1987. **61**(8): p. 2581-2588.
165. Nasser, M., et al., *A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1[^] E4 protein*. Virology, 1987. **159**(2): p. 433-439.
166. Tindle, R.W., *Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(1): p. 59-64.
167. Florin, L., et al., *Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2*. Virology, 2002. **295**(1): p. 97-107.
168. Lee, C. and L.A. Laimins, *The differentiation-dependent life cycle of human papillomaviruses in keratinocytes*, in *The papillomaviruses*. 2007, Springer. p. 45-67.
169. Doorbar, J., *The E4 protein; structure, function and patterns of expression*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 80-98.
170. Mose Larsen, P., et al., *A clinical study using human papillomavirus type-specific markers to determine the type of HPV present in cervical lesions*. Cancer Cells, 1987. **5**: p. 319-327.
171. Conway, M. and C. Meyers, *Replication and assembly of human papillomaviruses*. Journal of dental research, 2009. **88**(4): p. 307-317.
172. Holmgren, S.C., et al., *The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle*. Journal of virology, 2005. **79**(7): p. 3938-3948.
173. Raj, K., et al., *E1[^] E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria*. Journal of virology, 2004. **78**(13): p. 7199-7207.
174. Schmidt, M.T., A.K. Olejnik, and A. Goździcka-Józefiak, *The HPV16 E2 transcriptional regulator mode of action depends on the physical state of the viral genome*. Acta Biochimica Polonica, 2005. **52**(4): p. 823-832.
175. Spink, K.M. and L.A. Laimins, *Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification*. Journal of virology, 2005. **79**(8): p. 4918-4926.
176. O'Connor, M., S.-Y. Chan, and H.-U. Bernard, *Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs*. Human papillomaviruses, 1995: p. 21-40.
177. Lewis, H., et al., *Cellular transcription factors regulate human papillomavirus type 16 gene expression by binding to a subset of the DNA sequences recognized by the viral E2 protein*. Journal of general virology, 1999. **80**(8): p. 2087-2096.
178. Pol, S.B.V. and A.J. Klingelutz, *Papillomavirus E6 oncoproteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 115-137.
179. Barbosa, M., et al., *The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation*. The EMBO journal, 1990. **9**(1): p. 153-160.
180. Phelps, W.C., et al., *The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A*. Cell, 1988. **53**(4): p. 539-547.
181. Roman, A. and K. Munger, *The papillomavirus E7 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 138-168.
182. Brokaw, J.L., C.L. Yee, and K. Münger, *A mutational analysis of the amino terminal domain of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein*. Virology, 1994. **205**(2): p. 603-607.
183. CLEMENS, K.E., et al., *Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo*. Virology, 1995. **214**(1): p. 289-293.
184. Braspenning, J., et al., *The CXXC Zn binding motifs of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein are not required for its in vitro transforming activity in rodent cells*. Oncogene, 1998. **16**(8): p. 1085-1089.

185. Valdovinos-Torres, H., et al., *Different isoforms of HPV-16 E7 protein are present in cytoplasm and nucleus*. The open virology journal, 2008. **2**: p. 15.
186. Nguyen, C.L., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component γ -tubulin*. Journal of virology, 2007. **81**(24): p. 13533-13543.
187. Knapp, A.A., et al., *Identification of the nuclear localization and export signals of high risk HPV16 E7 oncoprotein*. Virology, 2009. **383**(1): p. 60-68.
188. Angeline, M., E. Merle, and J. Moroianu, *The E7 oncoprotein of high-risk human papillomavirus type 16 enters the nucleus via a nonclassical Ran-dependent pathway*. Virology, 2003. **317**(1): p. 13-23.
189. Smotkin, D. and F. Wettstein, *The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein*. Journal of virology, 1987. **61**(5): p. 1686-1689.
190. Reinstein, E., et al., *Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue*. Oncogene, 2000. **19**(51): p. 5944-5950.
191. Zeffass-Thome, K., et al., *Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein*. Oncogene, 1996. **13**(11): p. 2323-2330.
192. Giarrè, M., et al., *Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest*. Journal of virology, 2001. **75**(10): p. 4705-4712.
193. Hoffmann, M., et al., *p16INK4a overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer*. International journal of cancer, 2010. **127**(7): p. 1595-1602.
194. Bandara, L., et al., *Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F*. The EMBO Journal, 1993. **12**(11): p. 4317-4324.
195. Luo, R.X., A.A. Postigo, and D.C. Dean, *Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription*. Cell, 1998. **92**(4): p. 463-473.
196. Lizano-Soberón, M., A. Carrillo-García, and A. Contreras-Paredes, *Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis*. Cancerología, 2009. **4**: p. 205-16.
197. Darnell, G.A., et al., *Human papillomavirus E7 requires the protease calpain to degrade the retinoblastoma protein*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(52): p. 37492-37500.
198. Zhang, B., W. Chen, and A. Roman, *The E7 proteins of low-and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(2): p. 437-442.
199. Davies, R., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation*. Journal of Virology, 1993. **67**(5): p. 2521-2528.
200. Berezutskaya, E. and S. Bagchi, *The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(48): p. 30135-30140.
201. Lukas, J., et al., *Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16*. Nature, 1995. **375**(6531): p. 503-506.
202. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes & development, 1999. **13**(12): p. 1501-1512.
203. Ghittoni, R., et al., *The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses*. Virus genes, 2010. **40**(1): p. 1-13.
204. Jayshree, R., et al., *Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis*. Indian Journal of Medical Research, 2009. **130**(3).
205. Vallejo-Ruiz, V., et al., *La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular*. Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 2015. **53**(Supl 2): p. S172-7.
206. Castaño, E., Y. Kleyner, and B.D. Dynlacht, *Dual cyclin-binding domains are required for p107 to function as a kinase inhibitor*. Molecular and cellular biology, 1998. **18**(9): p. 5380-5391.
207. Bustillos, A. *Efectos de la depleción de la histona H4 en células de cáncer de mama: proliferación y respuesta a interferón*. Tesis de doctorado. 2017 [cited 2020 Mayo].

208. Nguyen, D.X., et al., *Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein*. The EMBO journal, 2004. **23**(7): p. 1609-1618.
209. Murvai, M., et al., *Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) promoter*. Archives of virology, 2004. **149**(12): p. 2379-2392.
210. Datto, M.B., et al., *Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(12): p. 5545-5549.
211. Hannon, G.J. and D. Beach, *p15 INK4B is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest*. Nature, 1994. **371**(6494): p. 257-261.
212. Zwerschke, W., et al., *Allosteric activation of acid α -glucosidase by the human papillomavirus E7 protein*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(13): p. 9534-9541.
213. Basile, J.R., V. Zacny, and K. Münger, *The cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(25): p. 22522-22528.
214. Villa, L.L., et al., *Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18*. Molecular carcinogenesis, 1992. **6**(1): p. 5-9.
215. Vambutas, A., et al., *Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport*. Clinical Immunology, 2001. **101**(1): p. 94-99.
216. Barnard, P., E. Payne, and N.A. McMillan, *The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon- α* . Virology, 2000. **277**(2): p. 411-419.
217. Park, J.-S., et al., *Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein: implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(10): p. 6764-6769.
218. Duensing, S., et al., *The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(18): p. 10002-10007.
219. Liu, Y., et al., *Determinants of stability for the E6 protein of papillomavirus type 16*. Journal of molecular biology, 2009. **386**(4): p. 1123-1137.
220. Pim, D., V. Tomaic, and L. Banks, *The human papillomavirus (HPV) E6* proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein*. Journal of virology, 2009. **83**(19): p. 9863-9874.
221. Thomas, M., et al., *HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation*. Oncogene, 2001. **20**(39): p. 5431-5439.
222. Chen, J.J., et al., *Identification of an α helical motif sufficient for association with papillomavirus E6*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(22): p. 13537-13544.
223. Filippova, M., et al., *Complexes of human papillomavirus type 16 E6 proteins form pseudo-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis*. Journal of virology, 2009. **83**(1): p. 210-227.
224. Alarcon-Vargas, D. and Z.e. Ronai, *p53-Mdm2—the affair that never ends*. Carcinogenesis, 2002. **23**(4): p. 541-547.
225. Lacroix, M., R.-A. Toillon, and G. Leclercq, *p53 and breast cancer, an update*. Endocrine-related cancer, 2006. **13**(2): p. 293-325.
226. Schwarz, S.E., J.L. Rosa, and M. Scheffner, *Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(20): p. 12148-12154.
227. Nominé, Y., et al., *Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis*. Molecular cell, 2006. **21**(5): p. 665-678.

228. Zanier, K., et al., *Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53*. *Structure*, 2012. **20**(4): p. 604-617.
229. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. *Cell*, 1993. **75**(3): p. 495-505.
230. Jha, S., et al., *Destabilization of TIP60 by human papillomavirus E6 results in attenuation of TIP60-dependent transcriptional regulation and apoptotic pathway*. *Molecular cell*, 2010. **38**(5): p. 700-711.
231. Thomas, M. and L. Banks, *Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types*. *Journal of General Virology*, 1999. **80**(6): p. 1513-1517.
232. Filippova, M., et al., *The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity*. *Journal of virology*, 2007. **81**(8): p. 4116-4129.
233. Tungteakkhun, S.S., et al., *The full-length isoform of human papillomavirus 16 E6 and its splice variant E6* bind to different sites on the procaspase 8 death effector domain*. *Journal of virology*, 2010. **84**(3): p. 1453-1463.
234. Yuan, H., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis*. *Oncogene*, 2005. **24**(32): p. 5069-5078.
235. D'Costa, Z.J., et al., *Screening of drugs to counteract human papillomavirus 16 E6 repression of E-cadherin expression*. *Investigational new drugs*, 2012. **30**(6): p. 2236-2251.
236. James, M.A., J.H. Lee, and A.J. Klingelutz, *Human papillomavirus type 16 E6 activates NF- κ B, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner*. *Journal of virology*, 2006. **80**(11): p. 5301-5307.
237. Hasan, U.A., et al., *TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16*. *The Journal of Immunology*, 2007. **178**(5): p. 3186-3197.
238. Chen, J.J., et al., *Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein*. *Science*, 1995. **269**(5223): p. 529-531.
239. Sherman, L., et al., *Inhibition of serum-and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation*. *Virology*, 1997. **237**(2): p. 296-306.
240. Kiyono, T., et al., *Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(21): p. 11612-11616.
241. Nakagawa, S. and J.M. Huibregtse, *Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase*. *Molecular and cellular biology*, 2000. **20**(21): p. 8244-8253.
242. Sastry, S.K. and K. Burridge, *Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics*. *Experimental cell research*, 2000. **261**(1): p. 25-36.
243. Accardi, R., et al., *E6 and E7 from human papillomavirus type 16 cooperate to target the PDZ protein Na/H exchange regulatory factor 1*. *Journal of virology*, 2011. **85**(16): p. 8208-8216.
244. Chakrabarti, O., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras*. *Journal of virology*, 2004. **78**(11): p. 5934-5945.
245. Duensing, S., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype*. *Cancer research*, 2001. **61**(6): p. 2356-2360.
246. Garner-Hamrick, P.A., et al., *Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system*. *Journal of virology*, 2004. **78**(17): p. 9041-9050.
247. Wang, H.-K., et al., *Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes*. *Genes & development*, 2009. **23**(2): p. 181-194.
248. Steger, G. and S. Corbach, *Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein*. *Journal of virology*, 1997. **71**(1): p. 50-58.

249. Stubenrauch, F., H.B. Lim, and L.A. Laimins, *Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31*. Journal of virology, 1998. **72**(2): p. 1071-1077.
250. McBride, A.A., *The papillomavirus E2 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 57-79.
251. Tan, S.-H., et al., *The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID*. Journal of virology, 1994. **68**(10): p. 6411-6420.
252. Gauthier, J.-M., J. Dillner, and M. Yaniv, *Structural analysis of the human papillomavirus type 16-E2 transactivator with antipeptide antibodies reveals a high mobility region linking the transactivation and the DNA-binding domains*. Nucleic acids research, 1991. **19**(25): p. 7073-7079.
253. Hegde, R.S. and E.J. Androphy, *Crystal structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus type 16: implications for its DNA binding-site selection mechanism*. Journal of molecular biology, 1998. **284**(5): p. 1479-1489.
254. Antson, A.A., et al., *Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 805-809.
255. Masterson, P.J., et al., *A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase α -primase p68 subunit*. Journal of virology, 1998. **72**(9): p. 7407-7419.
256. Bergvall, M., T. Melendy, and J. Archambault, *The E1 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 35-56.
257. Sanders, C.M. and A. Stenlund, *Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor*. The EMBO journal, 1998. **17**(23): p. 7044-7055.
258. Desaintes, C., et al., *Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis*. The EMBO journal, 1997. **16**(3): p. 504-514.
259. Desaintes, C., et al., *Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells*. Oncogene, 1999. **18**(32): p. 4538-4545.
260. Webster, K., et al., *The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(1): p. 87-94.
261. Skiadopoulos, M.H. and A.A. McBride, *Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin*. Journal of virology, 1998. **72**(3): p. 2079-2088.
262. Bastien, N. and A.A. McBride, *Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes*. Virology, 2000. **270**(1): p. 124-134.
263. Morin, G., et al., *A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication*. Journal of virology, 2011. **85**(11): p. 5287-5300.
264. Auster, A.S. and L. Joshua-Tor, *The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1: crystal structure, dimerization, and DNA binding*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(5): p. 3733-3742.
265. Castella, S., D. Burgin, and C.M. Sanders, *Role of ATP hydrolysis in the DNA translocase activity of the bovine papillomavirus (BPV-1) E1 helicase*. Nucleic acids research, 2006. **34**(13): p. 3731-3741.
266. Amin, A.A., et al., *Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro*. Virology, 2000. **272**(1): p. 137-150.
267. Enemark, E.J. and L. Joshua-Tor, *Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase*. Nature, 2006. **442**(7100): p. 270-275.
268. Swindle, C.S. and J.A. Engler, *Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1*. Journal of Virology, 1998. **72**(3): p. 1994-2001.
269. Yang, L., et al., *Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 628-632.
270. Kuo, S.-R., et al., *Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(39): p. 24058-24065.

271. DiMaio, D. and L.M. Petti, *The E5 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 99-114.
272. Alonso, A. and J. Reed, *Modelling of the human papillomavirus type 16 E5 protein*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2002. **1601**(1): p. 9-18.
273. Yang, D.-H., A.G. Wildeman, and F.J. Sharom, *Overexpression, purification, and structural analysis of the hydrophobic E5 protein from human papillomavirus type 16*. Protein expression and purification, 2003. **30**(1): p. 1-10.
274. Barbaresi, S., et al., *Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain*. Journal of general virology, 2010. **91**(2): p. 521-530.
275. Wetherill, L.F., et al., *High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors*. Journal of virology, 2012. **86**(9): p. 5341-5351.
276. Supryniewicz, F.A., et al., *The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification*. Journal of virology, 2010. **84**(20): p. 10619-10629.
277. Ashrafi, G.H., et al., *E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain*. International journal of cancer, 2006. **119**(9): p. 2105-2112.
278. Ashrafi, G.H., et al., *E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I*. International Journal of Cancer, 2005. **113**(2): p. 276-283.
279. Cortese, M.S., G.H. Ashrafi, and M.S. Campo, *All 4 di-leucine motifs in the first hydrophobic domain of the E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 are essential for surface MHC class I downregulation activity and E5 endomembrane localization*. International journal of cancer, 2010. **126**(7): p. 1675-1682.
280. Gruener, M., et al., *The E5 protein of the human papillomavirus type 16 down-regulates HLA-I surface expression in calnexin-expressing but not in calnexin-deficient cells*. Virology journal, 2007. **4**(1): p. 1-15.
281. Zhang, B., et al., *The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ* . Virology, 2003. **310**(1): p. 100-108.
282. Miura, S., et al., *CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV*. Journal of virology, 2010. **84**(22): p. 11614-11623.
283. Tomakidi, P., et al., *Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes*. European journal of cell biology, 2000. **79**(6): p. 407-412.
284. Zhang, B., D.F. Spandau, and A. Roman, *E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis*. Journal of Virology, 2002. **76**(1): p. 220-231.
285. Oh, J.-M., et al., *Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells*. Carcinogenesis, 2010. **31**(3): p. 402-410.
286. Kabsch, K., et al., *The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures*. Intervirology, 2004. **47**(1): p. 48-56.
287. Pedroza-Saavedra, A., et al., *The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27Kip1*. Virology, 2010. **400**(1): p. 44-52.
288. Straight, S.W., B. Herman, and D.J. McCance, *The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes*. Journal of virology, 1995. **69**(5): p. 3185-3192.
289. Leechanachai, P., et al., *The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus*. Oncogene, 1992. **7**(1): p. 19-25.
290. Kim, S.-H., et al., *Involvement of NF- κ B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein*. Carcinogenesis, 2009. **30**(5): p. 753-757.

291. Davy, C.E., et al., *Identification of a G2 arrest domain in the E1^Δ E4 protein of human papillomavirus type 16*. Journal of virology, 2002. **76**(19): p. 9806-9818.
292. McIntosh, P.B., et al., *Structural analysis reveals an amyloid form of the human papillomavirus type 16 E1^Δ E4 protein and provides a molecular basis for its accumulation*. Journal of virology, 2008. **82**(16): p. 8196-8203.
293. Papillomavirus Episteme. *E4 Protein*. s.f. [cited 2020 Mayo].
294. Maglennon, G.A., P. McIntosh, and J. Doorbar, *Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression*. Virology, 2011. **414**(2): p. 153-163.
295. Nakahara, T., et al., *Human papillomavirus type 16 E1^Δ E4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle*. Journal of virology, 2005. **79**(20): p. 13150-13165.
296. Roberts, S., et al., *Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells*. Journal of virology, 1994. **68**(10): p. 6432-6445.
297. Bryan, J.T., et al., *The human papillomavirus type 11 E1^Δ E4 protein is phosphorylated in genital epithelium*. Virology, 2000. **268**(2): p. 430-439.
298. Khan, J., et al., *Role of calpain in the formation of human papillomavirus type 16 E1^Δ E4 amyloid fibers and reorganization of the keratin network*. Journal of virology, 2011. **85**(19): p. 9984-9997.
299. Rush, M., X. Zhao, and S. Schwartz, *A splicing enhancer in the E4 coding region of human papillomavirus type 16 is required for early mRNA splicing and polyadenylation as well as inhibition of premature late gene expression*. Journal of virology, 2005. **79**(18): p. 12002-12015.
300. Icenogle, J., *Analysis of the Sequences of the L1 and L2 Capsid Proteins of Papillomaviruses*. Centres for Disease Control, Atlanta, Georgia, 1995. **3**: p. III-90.
301. Sapp, M. and M. Bienkowska-Haba, *Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus*. The FEBS journal, 2009. **276**(24): p. 7206-7216.
302. Carter, J.J., et al., *Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1*. Journal of virology, 2003. **77**(21): p. 11625-11632.
303. Roth, S.D., et al., *Characterization of neutralizing epitopes within the major capsid protein of human papillomavirus type 33*. Virology journal, 2006. **3**(1): p. 1-11.
304. Bishop, B., et al., *Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(43): p. 31803-31811.
305. Kondo, K., et al., *Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region*. Virology, 2007. **358**(2): p. 266-272.
306. Day, P.M., et al., *Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by I2 cross-neutralizing and I1 type-specific antibodies*. Journal of virology, 2008. **82**(9): p. 4638-4646.
307. Buck, C.B. and B.L. Trus, *The papillomavirus virion: a machine built to hide molecular Achilles' heels*. Viral molecular machines, 2012: p. 403-422.
308. Horvath, C.A., et al., *Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview*. Virology journal, 2010. **7**(1): p. 1-7.
309. Yang, R., et al., *Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection*. Journal of virology, 2003. **77**(6): p. 3531-3541.
310. Selinka, H.-C., et al., *Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus*. Journal of virology, 2007. **81**(20): p. 10970-10980.
311. Richards, R.M., et al., *Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(5): p. 1522-1527.

312. Schelhaas, M., et al., *Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin-and lipid raft-independent endocytosis*. PLoS pathogens, 2012. **8**(4): p. e1002657.
313. Spoden, G., et al., *Clathrin-and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16— involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs)*. PLoS one, 2008. **3**(10): p. e3313.
314. Bousarghin, L., et al., *Human papillomavirus 16 virus-like particles use heparan sulfates to bind dendritic cells and colocalize with langerin in Langerhans cells*. Journal of general virology, 2005. **86**(5): p. 1297-1305.
315. Day, P.M., D.R. Lowy, and J.T. Schiller, *Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway*. Virology, 2003. **307**(1): p. 1-11.
316. Buck, C.B., P.M. Day, and B.L. Trus, *The papillomavirus major capsid protein L1*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 169-174.
317. Day, P.M., et al., *Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection*. Journal of virology, 2013. **87**(7): p. 3862-3870.
318. Bergant, M. and L. Banks, *SNX17 facilitates infection with diverse papillomavirus types*. Journal of virology, 2013. **87**(2): p. 1270-1273.
319. Bienkowska-Haba, M., et al., *Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry*. Journal of virology, 2012. **86**(18): p. 9875-9887.
320. Florin, L., et al., *Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein I2*. Journal of virology, 2006. **80**(13): p. 6691-6696.
321. Pyeon, D., et al., *Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression*. PLoS pathogens, 2009. **5**(2): p. e1000318.
322. Day, P.M., et al., *Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(39): p. 14252-14257.
323. Nelson, L.M., R.C. Rose, and J. Moroianu, *Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(26): p. 23958-23964.
324. Zhou, J., et al., *Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein*. Virology, 1991. **185**(2): p. 625-632.
325. Bird, G., et al., *Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly*. Journal of virology, 2008. **82**(20): p. 9848-9857.
326. Schäfer, F., L. Florin, and M. Sapp, *DNA binding of L1 is required for human papillomavirus morphogenesis in vivo*. Virology, 2002. **295**(1): p. 172-181.
327. Hagensee, M.E., N. Yaegashi, and D. Galloway, *Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins*. Journal of virology, 1993. **67**(1): p. 315-322.
328. Zhao, K.-N., et al., *DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1*. Virology, 1998. **243**(2): p. 482-491.
329. Finnen, R.L., et al., *Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins*. Journal of virology, 2003. **77**(8): p. 4818-4826.
330. Münger, K., et al., *Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product*. The EMBO journal, 1989. **8**(13): p. 4099-4105.
331. Lichtig, H., et al., *HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6*. Virology, 2006. **350**(1): p. 216-227.
332. Pim, D., et al., *HPV E6 targeted degradation of the discs large protein: evidence for the involvement of a novel ubiquitin ligase*. Oncogene, 2000. **19**(6): p. 719-725.
333. Storey, A., et al., *Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types*. The EMBO journal, 1988. **7**(6): p. 1815-1820.
334. Lee, S.S., R.S. Weiss, and R.T. Javier, *Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(13): p. 6670-6675.
335. Gonzalez, S.L., et al., *Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7*. Journal of virology, 2001. **75**(16): p. 7583-7591.

336. Xi, L.F., et al., *Lineages of oncogenic human papillomavirus types other than type 16 and 18 and risk for cervical intraepithelial neoplasia*. Journal of the National Cancer Institute, 2014. **106**(10): p. dju270.
337. von Knebel Doeberitz, M., *HPV 16 and its variants: minor genome variations make a big difference*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2016. **108**(9): p. djw123.
338. Yamada, T., et al., *Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective*. Journal of virology, 1997. **71**(3): p. 2463-2472.
339. Escobar-Escamilla, N., et al., *Mutational landscape and intra-host diversity of human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants in cervical samples*. Archives of virology, 2019. **164**(12): p. 2953-2961.
340. Schiffman, M., et al., *A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia*. Cancer research, 2010. **70**(8): p. 3159-3169.
341. Bernard, H.U., I.E. Calleja-Macias, and S.T. Dunn, *Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications*. International journal of cancer, 2006. **118**(5): p. 1071-1076.
342. Pientong, C., et al., *Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer*. Virology journal, 2013. **10**(1): p. 1-9.
343. Gokhale, P.S., et al., *HPV16 E6 variants: frequency, association with HPV types and in silico analysis of the identified novel variants*. Journal of medical virology, 2014. **86**(6): p. 968-974.
344. Beachler, D.C., et al., *High oral human papillomavirus type 16 load predicts long-term persistence in individuals with or at risk for HIV infection*. The Journal of infectious diseases, 2015. **212**(10): p. 1588-1591.
345. D'Souza, G., et al., *Long-term persistence of Oral HPV Over 7 years of follow-up*. JNCI cancer spectrum, 2020. **4**(5): p. pkaa047.
346. Tang, K.D., et al., *Unlocking the potential of saliva-based test to detect HPV-16-driven oropharyngeal cancer*. Cancers, 2019. **11**(4): p. 473.
347. Klusmann, J.P., et al., *Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2001. **92**(11): p. 2875-2884.
348. Deng, Z., et al., *Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma*. Head & neck, 2013. **35**(6): p. 800-808.
349. Faust, H., et al., *Prevalence of human papillomavirus types, viral load and physical status of HPV16 in head and neck squamous cell carcinoma from the South Swedish Health Care Region*. Journal of General Virology, 2016. **97**(11): p. 2949-2956.
350. Mellin, H., et al., *Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer*. International journal of cancer, 2002. **102**(2): p. 152-158.
351. The Global Cancer Observatory. *Cervix uteri*. 2019 [cited 2020 Mayo].
352. The Global Cancer Observatory, *World fact sheets*. 2019, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>.
353. James, C.D., I.M. Morgan, and M.L. Bristol, *The relationship between estrogen-related signaling and human papillomavirus positive cancers*. Pathogens, 2020. **9**(5): p. 403.
354. Chung, S.-H., S. Franceschi, and P.F. Lambert, *Estrogen and ER α : Culprits in cervical cancer?* Trends in Endocrinology & Metabolism, 2010. **21**(8): p. 504-511.
355. Auborn, K.J., et al., *The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis*. International journal of cancer, 1991. **49**(6): p. 867-869.
356. Ruutu, M., et al., *Effects of 17 β -estradiol and progesterone on transcription of human papillomavirus 16 E6/E7 oncogenes in CaSki and SiHa cell lines*. International Journal of Gynecologic Cancer, 2006. **16**(3).
357. Kano, M., et al., *Expression of estrogen receptor alpha is associated with pathogenesis and prognosis of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer*. International journal of cancer, 2019. **145**(6): p. 1547-1557.
358. Stenglein, M.D., et al., *APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(2): p. 222-229.

359. Refsland, E.W., et al., *Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction*. *Nucleic acids research*, 2010. **38**(13): p. 4274-4284.
360. Kondo, S., et al., *APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers*. *Oncogene*, 2017. **36**(12): p. 1687-1697.
361. Mussil, B., et al., *Human APOBEC3A isoforms translocate to the nucleus and induce DNA double strand breaks leading to cell stress and death*. *PloS one*, 2013. **8**(8): p. e73641.
362. Chen, S., et al., *APOBEC3A possesses anticancer and antiviral effects by differential inhibition of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer*. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2015. **8**(7): p. 10548.
363. Burns, M.B., et al., *APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer*. *Nature*, 2013. **494**(7437): p. 366-370.
364. Glaser, A.P., et al., *APOBEC-mediated mutagenesis in urothelial carcinoma is associated with improved survival, mutations in DNA damage response genes, and immune response*. *Oncotarget*, 2018. **9**(4): p. 4537.
365. Koenigs, M.B., et al., *Association of estrogen receptor alpha expression with survival in oropharyngeal cancer following chemoradiation therapy*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2019. **111**(9): p. 933-942.
366. Guidozzi, F., *Estrogen therapy in gynecological cancer survivors*. *Climacteric*, 2013. **16**(6): p. 611-617.
367. Rhodes, H.E., L. Chenevert, and M. Munsell, *Vaginal intraepithelial neoplasia (VaIN 2/3): comparing clinical outcomes of treatment with intravaginal estrogen*. *Journal of lower genital tract disease*, 2014. **18**(2): p. 115-121.
368. Schön, H., et al., *A new mode of treatment of human papilloma virus associated anogenital lesions using a nonsteroid estrogen analogue*. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1996. **108**(2): p. 45-47.
369. Zhou, C., Z.K. Tuong, and I.H. Frazer, *Papillomavirus immune evasion strategies target the infected cell and the local immune system*. *Frontiers in oncology*, 2019. **9**: p. 682.
370. Fontaine, J., et al., *Human papillomavirus type 16 (HPV-16) viral load and persistence of HPV-16 infection in women infected or at risk for HIV*. *Journal of clinical virology*, 2008. **43**(3): p. 307-312.
371. Moscicki, A.-B., et al., *Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and-uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type*. *The Journal of infectious diseases*, 2004. **190**(1): p. 37-45.
372. Denny, L., et al., *Human papillomavirus infection and cervical disease in Human Immunodeficiency Virus-1-infected women*. *Obstetrics & Gynecology*, 2008. **111**(6): p. 1380-1387.
373. Rowhani-Rahbar, A., et al., *The impact of HIV status and type on the clearance of human papillomavirus infection among Senegalese women*. *Journal of Infectious Diseases*, 2007. **196**(6): p. 887-894.
374. Ahdieh, L., et al., *Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women*. *The Journal of infectious diseases*, 2001. **184**(6): p. 682-690.
375. Wang, C. and J. Palefsky, *Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer in the HIV-infected population*. *Oral diseases*, 2016. **22**: p. 98-106.
376. Fakhry, C., et al., *Two-week versus six-month sampling interval in a short-term natural history study of oral HPV infection in an HIV-positive cohort*. *PloS one*, 2010. **5**(7): p. e11918.
377. Moscicki, A.-B., et al., *Prevalence of and risks for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls: impact of infection with human immunodeficiency virus*. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 2000. **154**(2): p. 127-134.
378. Sun, X.-W., et al., *Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus—seropositive women*. *Obstetrics & Gynecology*, 1995. **85**(5): p. 680-686.
379. Schlecht, N.F., et al., *Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia*. *Jama*, 2001. **286**(24): p. 3106-3114.

380. Palefsky, J.M., *Anogenital squamous cell cancer and its precursors*, in *Infectious Causes of Cancer*. 2000, Springer. p. 263-287.
381. Lesueur, C., et al., *Genome-wide association analyses identify new susceptibility loci for oral cavity and pharyngeal cancer*. *Nature genetics*, 2016. **48**(12): p. 1544-1550.
382. Chen, D., et al., *Genome-wide association study of susceptibility loci for cervical cancer*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2013. **105**(9): p. 624-633.
383. Storey, A., et al., *Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer*. *Nature*, 1998. **393**(6682): p. 229-234.
384. Ji, X., et al., *p53 codon 72 polymorphism associated with risk of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never-smokers*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(4): p. 875-879.
385. Minaguchi, T., et al., *No evidence of correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infection*. *Cancer Research*, 1998. **58**(20): p. 4585-4586.
386. Ngan, H., V. Liu, and S. Liu, *Risk of cervical cancer is not increased in Chinese carrying homozygous arginine at codon 72 of p53*. *British journal of cancer*, 1999. **80**(11): p. 1828-1829.
387. Münger, K., et al., *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*. *Journal of virology*, 2004. **78**(21): p. 11451-11460.
388. Matlashewski, G., *Chapter 11: Papillomaviruses*. *Fundamentals of Molecular Virology*, 2006: p. 114-122.
389. Nulton, T.J., et al., *Analysis of The Cancer Genome Atlas sequencing data reveals novel properties of the human papillomavirus 16 genome in head and neck squamous cell carcinoma*. *Oncotarget*, 2017. **8**(11): p. 17684.
390. Anayannis, N.V., et al., *Association of an intact E2 gene with higher HPV viral load, higher viral oncogene expression, and improved clinical outcome in HPV16 positive head and neck squamous cell carcinoma*. *PLoS one*, 2018. **13**(2): p. e0191581.
391. Koskinen, W.J., et al., *Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *International journal of cancer*, 2003. **107**(3): p. 401-406.
392. Durzynska, J., K. Lesniewicz, and E. Poreba, *Human papillomaviruses in epigenetic regulations*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2017. **772**: p. 36-50.
393. Faraji, F., et al., *Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer*. *Microbes and infection*, 2017. **19**(9-10): p. 464-475.
394. Shanmugasundaram, S. and J. You, *Targeting persistent human papillomavirus infection*. *Viruses*, 2017. **9**(8): p. 229.
395. D'Souza, G., et al., *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2007. **356**(19): p. 1944-1956.
396. Taylor, E.R., et al., *The fidelity of HPV16 E1/E2-mediated DNA replication*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(52): p. 52223-52230.
397. De Marco, L., et al., *Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing*. *Journal of clinical virology*, 2007. **38**(1): p. 7-13.
398. Thorland, E.C., et al., *Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites*. *Cancer research*, 2000. **60**(21): p. 5916-5921.
399. Mammas, I.N., et al., *Human papilloma virus (HPV) and host cellular interactions*. *Pathology & Oncology Research*, 2008. **14**(4): p. 345-354.
400. Lee, D., et al., *cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(10): p. 7045-7051.
401. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2004. **68**(2): p. 362-372.
402. Hadaschik, D., et al., *The papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation*. *Journal of virology*, 2003. **77**(9): p. 5253-5265.
403. Jeon, S. and P.F. Lambert, *Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical*

- carcinogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(5): p. 1654-1658.
404. Sastre-Garau, X., et al., *Distinct patterns of alteration of myc genes associated with integration of human papillomavirus type 16 or type 45 DNA in two genital tumours*. Journal of General Virology, 2000. **81**(8): p. 1983-1993.
405. Shin, K.H., et al., *Combined effects of human papillomavirus-18 and n-methyl-n-nitro-n-nitrosoguanidine on the transformation of normal human oral keratinocytes*. Molecular carcinogenesis, 1994. **9**(2): p. 76-86.
406. Wentzensen, N., S. Vinokurova, and M. von Knebel Doeberitz, *Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract*. Cancer research, 2004. **64**(11): p. 3878-3884.
407. Heselmeyer-Haddad, K., et al., *Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer*. The American journal of pathology, 2005. **166**(4): p. 1229-1238.
408. Qian, J. and P.P. Massion, *Role of chromosome 3q amplification in lung cancer*. Journal of thoracic oncology, 2008. **3**(3): p. 212-215.
409. Steenbergen, R.D., et al., *Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line*. Cancer research, 1995. **55**(22): p. 5465-5471.
410. Choi, Y.-W., et al., *Gene expression profiles in squamous cell cervical carcinoma using array-based comparative genomic hybridization analysis*. International Journal of Gynecologic Cancer, 2007. **17**(3).
411. Smith, D.I., et al. *Large common fragile site genes and cancer*. in *Seminars in cancer biology*. 2007. Elsevier.
412. Bednarek, A.K., et al., *WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth*. Cancer research, 2001. **61**(22): p. 8068-8073.
413. Egawa, N., et al., *Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia*. Viruses, 2015. **7**(7): p. 3863-3890.
414. Leptak, C., et al., *Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16*. Journal of virology, 1991. **65**(12): p. 7078-7083.
415. Maufort, J.P., et al., *Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis*. Cancer research, 2007. **67**(13): p. 6106-6112.
416. Stöppler, M.C., et al., *The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA*. Virology, 1996. **223**(1): p. 251-254.
417. Kivi, N., et al., *Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression*. Oncogene, 2008. **27**(18): p. 2532-2541.
418. Schwarz, E., et al., *Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells*. Nature, 1985. **314**(6006): p. 111-114.
419. Lewis, C., et al., *The first hydrophobic region of the HPV16 E5 protein determines protein cellular location and facilitates anchorage-independent growth*. Virology journal, 2008. **5**(1): p. 1-10.
420. Hu, L., et al., *Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion*. Virology, 2009. **384**(1): p. 125-134.
421. Hu, L., et al., *Expression of HPV16 E5 produces enlarged nuclei and polyploidy through endoreplication*. Virology, 2010. **405**(2): p. 342-351.
422. Gao, P. and J. Zheng, *High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer*. Virology journal, 2010. **7**(1): p. 1-3.
423. Oh, J.-M., et al., *Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells*. Carcinogenesis, 2009. **30**(1): p. 141-149.
424. Münger, K., et al., *The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes*. Journal of virology, 1989. **63**(10): p. 4417-4421.
425. McDougall, J., *Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus*. Human Pathogenic Papillomaviruses, 1994: p. 101-119.

426. Münger, K. and W.C. Phelps, *The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1993. **1155**(1): p. 111-123.
427. Strati, K. and P.F. Lambert, *Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer*. Cancer research, 2007. **67**(24): p. 11585-11593.
428. Iftner, T., et al., *Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1*. The EMBO journal, 2002. **21**(17): p. 4741-4748.
429. Srivenugopal, K.S. and F. Ali-Osman, *The DNA repair protein, O 6-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein*. Oncogene, 2002. **21**(38): p. 5940-5945.
430. Malanchi, I., et al., *Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in deregulating the G1/S transition*. Oncogene, 2002. **21**(37): p. 5665-5672.
431. Thomas, M., D. Pim, and L. Banks, *The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV*. Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7690-7700.
432. Meyer, N. and L.Z. Penn, *Reflecting on 25 years with MYC*. Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(12): p. 976-990.
433. Gewin, L. and D.A. Galloway, *E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc*. Journal of virology, 2001. **75**(15): p. 7198-7201.
434. Katzenellenbogen, R.A., et al., *NFX1-123 increases hTERT expression and telomerase activity posttranscriptionally in human papillomavirus type 16 E6 keratinocytes*. Journal of virology, 2009. **83**(13): p. 6446-6456.
435. Saretzki, G., *Telomerase, mitochondria and oxidative stress*. Experimental gerontology, 2009. **44**(8): p. 485-492.
436. Van Doorslaer, K. and R.D. Burk, *Association between hTERT activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk*. Virology, 2012. **433**(1): p. 216-219.
437. Lopez-Ocejo, O., et al., *Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner*. Oncogene, 2000. **19**(40): p. 4611-4620.
438. Santer, F.R., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits apoptosis mediated by nuclear insulin-like growth factor-binding protein-3 by enhancing its ubiquitin/proteasome-dependent degradation*. Carcinogenesis, 2007. **28**(12): p. 2511-2520.
439. Nguyen, C.L. and K. Münger, *Human papillomavirus E7 protein deregulates mitosis via an association with nuclear mitotic apparatus protein 1*. Journal of virology, 2009. **83**(4): p. 1700-1707.
440. Song, S., et al., *Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis*. Virology, 2000. **267**(2): p. 141-150.
441. Oda, D., et al., *HPV immortalization of human oral epithelial cells: a model for carcinogenesis*. Experimental cell research, 1996. **226**(1): p. 164-169.
442. DiPaolo, J., et al., *Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras*. Oncogene, 1989. **4**(4): p. 395-399.
443. Park, N.-H., et al., *Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus*. Carcinogenesis, 1991. **12**(9): p. 1627-1631.
444. Moscicki, A.-B., et al., *Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers*. Vaccine, 2012. **30**: p. F24-F33.
445. Kumar, M. and V. FRCPath, *Cervix: premalignant and malignant neoplasias*. Saunders (Elsevier). Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 2009.
446. Agorastos, T., et al., *Detection and typing of human papillomavirus DNA in uterine cervixes with coexistent grade I and grade III intraepithelial neoplasia: biologic progression or independent lesions?* European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2005. **121**(1): p. 99-103.
447. Shiraz, A. and T. Majmudar, *Colposcopy and cervical intraepithelial neoplasia*. Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine, 2017. **27**(6): p. 177-183.

448. Andersen, A.S., et al., *The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma*. International journal of cancer, 2014. **134**(12): p. 2755-2763.
449. Van Kempen, M., G. Rijkers, and P. Van Cauwenberge, *The immune response in adenoids and tonsils*. International archives of allergy and immunology, 2000. **122**(1): p. 8-19.
450. Economopoulou, P., et al., *The emerging role of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): anti-tumor immunity and clinical applications*. Annals of translational medicine, 2016. **4**(9).
451. Routes, J.M., et al., *Macrophages kill human papillomavirus type 16 E6-expressing tumor cells by tumor necrosis factor alpha-and nitric oxide-dependent mechanisms*. Journal of virology, 2005. **79**(1): p. 116-123.
452. Mittal, D., S.R. Mattarollo, and I.H. Frazer, *Interleukin-17A promotes arginase-1 production and 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced acute hyperinflammation in human papillomavirus E7 oncoprotein-expressing skin*. Journal of innate immunity, 2015. **7**(4): p. 392-404.
453. Gutierrez-Xicotencatl, L., et al., *Serological biomarkers for the prediction and detection of human papillomavirus associated cancers*. Immunoregulatory Aspects of Immunotherapy, 2018.
454. Lang Kuhs, K.A., et al., *Human papillomavirus 16 E 6 antibodies are sensitive for human papillomavirus-driven oropharyngeal cancer and are associated with recurrence*. Cancer, 2017. **123**(22): p. 4382-4390.
455. Karim, R., et al., *Human papillomavirus deregulates the response of a cellular network comprising of chemotactic and proinflammatory genes*. PloS one, 2011. **6**(3): p. e17848.
456. Grabowska, A.K. and A.B. Riemer, *Suppl 2: the invisible enemy—how human papillomaviruses avoid recognition and clearance by the host immune system*. The open virology journal, 2012. **6**: p. 249.
457. Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses*. Annual review of immunology, 2014. **32**: p. 513-545.
458. Bedoui, S., et al., *Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells*. Nature immunology, 2009. **10**(5): p. 488-495.
459. Hasseus, B., et al., *Langerhans cells from human oral epithelium are more effective at stimulating allogeneic T cells in vitro than Langerhans cells from skin*. Clinical & Experimental Immunology, 2004. **136**(3): p. 483-489.
460. Matthews, K., et al., *Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin*. Journal of virology, 2003. **77**(15): p. 8378-8385.
461. Caberg, J.-H.D., et al., *Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes*. Carcinogenesis, 2008. **29**(7): p. 1441-1447.
462. Boston University. *NF-kB Transcription Factors: NF-kB Target Genes*. 2020 [cited 2020 Mayo].
463. Wiczorek, M., et al., *Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation*. Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 292.
464. Venuti, A., et al., *Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions*. Molecular cancer, 2011. **10**(1): p. 1-18.
465. Nakayama, M., *Antigen presentation by MHC-dressed cells*. Frontiers in immunology, 2015. **5**: p. 672.
466. Garcia-Iglesias, T., et al., *Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions*. BMC cancer, 2009. **9**(1): p. 1-8.
467. Marchal-Bras-Goncalves, R., et al. *A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity*. in *Transplantation proceedings*. 2001.
468. Chen, X., et al., *Distinct endosomal trafficking requirements for presentation of autoantigens and exogenous lipids by human CD1d molecules*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(10): p. 6181-6190.
469. Bhatt, K.H., et al., *Profiling HPV-16-specific T cell responses reveals broad antigen reactivities in oropharyngeal cancer patients*. Journal of Experimental Medicine, 2020. **217**(10).

470. Bermudez-Morales, V.H., et al., *Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape*. *Cancer investigation*, 2008. **26**(10): p. 1037-1043.
471. De Gruijl, T.D., et al., *Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. I. Differential T-helper and IgG responses in relation to HPV infection and disease outcome*. *Journal of General Virology*, 1999. **80**(2): p. 399-408.
472. Williams, O.M., et al., *Analysis of CD4+ T-cell responses to human papillomavirus (HPV) type 11 L1 in healthy adults reveals a high degree of responsiveness and cross-reactivity with other HPV types*. *Journal of virology*, 2002. **76**(15): p. 7418-7429.
473. White, W.I., et al., *In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16*. *Journal of virology*, 1998. **72**(2): p. 959-964.
474. Griffin, H., et al., *E4 antibodies facilitate detection and type-assignment of active HPV infection in cervical disease*. *PloS one*, 2012. **7**(12): p. e49974.
475. Salazar-Piña, D.A., et al., *Validation of serological antibody profiles against human papillomavirus type 16 antigens as markers for early detection of cervical cancer*. *Medicine*, 2016. **95**(6).
476. Kuhs, K.A.L., et al., *Human papillomavirus 16 E6 antibodies in individuals without diagnosed cancer: a pooled analysis*. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2015. **24**(4): p. 683-689.
477. van Lunzen, J. and M. Altfeld, *Sex differences in infectious diseases—common but neglected*. *The Journal of infectious diseases*, 2014. **209**(suppl_3): p. S79-S80.
478. Fish, E.N., *The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses*. *Nature Reviews Immunology*, 2008. **8**(9): p. 737-744.
479. Gal-Oz, S.T., et al., *ImmGen report: sexual dimorphism in the immune system transcriptome*. *Nature communications*, 2019. **10**(1): p. 1-14.
480. Klein, S.L. and K.L. Flanagan, *Sex differences in immune responses*. *Nature Reviews Immunology*, 2016. **16**(10): p. 626-638.
481. Moulton, V.R., *Sex hormones in acquired immunity and autoimmune disease*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 2279.
482. Carè, A., et al., *Sex disparity in cancer: roles of microRNAs and related functional players*. *Cell Death & Differentiation*, 2018. **25**(3): p. 477-485.
483. Taneja, V., *Sex hormones determine immune response*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 1931.
484. Marais, D.J., et al., *More men than women make mucosal IgA antibodies to Human papillomavirus type 16 (HPV-16) and HPV-18: a study of oral HPV and oral HPV antibodies in a normal healthy population*. *BMC infectious diseases*, 2006. **6**(1): p. 1-10.
485. Smith, E.M., et al., *Risk factors and survival by HPV-16 E6 and E7 antibody status in human papillomavirus positive head and neck cancer*. *International journal of cancer*, 2010. **127**(1): p. 111-117.
486. Raval, R.R., et al., *Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer*. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2014. **2**(1): p. 1-11.
487. Mendes, F., et al., *The role of immune system exhaustion on cancer cell escape and anti-tumor immune induction after irradiation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2016. **1865**(2): p. 168-175.
488. Jiang, B. and M. Xue, *Correlation of E6 and E7 levels in high-risk HPV16 type cervical lesions with CCL20 and Langerhans cells*. *Genet Mol Res*, 2015. **14**(3): p. 10473-10481.
489. Albers, A., et al., *Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Cancer research*, 2005. **65**(23): p. 11146-11155.
490. Eckert, A.W., et al., *Clinical relevance of the tumor microenvironment and immune escape of oral squamous cell carcinoma*. *Journal of translational medicine*, 2016. **14**(1): p. 1-13.
491. Scott, M., M. Nakagawa, and A.-B. Moscicki, *Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 2001. **8**(2): p. 209-220.
492. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. *Nature Reviews Immunology*, 2012. **12**(4): p. 253-268.

493. Umansky, V., et al., *The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression*. Vaccines, 2016. **4**(4): p. 36.
494. Neeve, S.C., B.W. Robinson, and V.S. Fear, *The role and therapeutic implications of T cells in cancer of the lung*. Clinical & translational immunology, 2019. **8**(8): p. e1076.
495. Yong, X., et al., *Strategies for enhancing vaccine-induced CTL antitumor immune responses*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012. **2012**.
496. Näsman, A., et al., *Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer*. PloS one, 2012. **7**(6): p. e38711.
497. Kusmartsev, S., et al., *Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(2): p. 989-999.
498. Fakhry, C., et al., *Associations between oral HPV16 infection and cytopathology: evaluation of an oropharyngeal "pap-test equivalent" in high-risk populations*. Cancer prevention research, 2011. **4**(9): p. 1378-1384.
499. Holzinger, D., et al., *O199. Molecular characterization of HPV16-associated squamous cell carcinomas of the oropharynx and larynx*. Oral Oncology Supplement, 2009. **1**(3): p. 122.
500. Hoffmann, M., et al., *HPV DNA, E6* I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer—How valid is p16INK4A as surrogate marker?* Cancer letters, 2012. **323**(1): p. 88-96.
501. Kreimer, A.R., et al., *Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer*. Journal of clinical oncology, 2013. **31**(21): p. 2708.
502. Kreimer, A.R., et al., *Summary from an international cancer seminar focused on human papillomavirus (HPV)-positive oropharynx cancer, convened by scientists at IARC and NCI*. Oral oncology, 2020. **108**: p. 104736.
503. Kreimer, A.R., et al., *Reply to PE castle*. Journal of Clinical Oncology, 2014. **32**(4): p. 361-362.
504. Ndiaye, C., et al., *HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet Oncology, 2014. **15**(12): p. 1319-1331.
505. Klingenberg, B., et al., *p16INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV*. Histopathology, 2010. **56**(7): p. 957-967.
506. Lydiatt, W.M., et al., *Head and neck cancers—major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual*. CA: a cancer journal for clinicians, 2017. **67**(2): p. 122-137.
507. Machczyński, P., et al., *A review of the 8th edition of the AJCC staging system for oropharyngeal cancer according to HPV status*. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2020: p. 1-6.
508. Lewis Jr, J.S., et al., *Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: guideline from the College of American Pathologists*. Archives of pathology & laboratory medicine, 2018. **142**(5): p. 559-597.
509. Lewis, J.S., *p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma*. Head and neck pathology, 2012. **6**(1): p. 75-82.
510. O'Sullivan, B., S. Huang, and J. Su, *A proposal for UICC/AJCC pre-treatment TNM staging for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal Cancer Network for Staging (ICON-S): A comparative multi-centre cohort study*. Lancet Oncol, 2016. **17**: p. 440-451.
511. Keller, L.M., et al., *p16 status, pathologic and clinical characteristics, biomolecular signature, and long-term outcomes in head and neck squamous cell carcinomas of unknown primary*. Head & neck, 2014. **36**(12): p. 1677-1684.
512. Motz, K., et al., *Changes in unknown primary squamous cell carcinoma of the head and neck at initial presentation in the era of human papillomavirus*. JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery, 2016. **142**(3): p. 223-228.
513. Lydiatt, W., B. O'Sullivan, and S. Patel, *Major changes in head and neck staging for 2018*. American Society of Clinical Oncology Educational Book, 2018. **38**: p. 505-514.

514. You, E., M. Henry, and A. Zeitouni, *Human papillomavirus–associated oropharyngeal cancer: review of current evidence and management*. *Current Oncology*, 2019. **26**(2): p. 119-123.
515. Rischin, D., et al., *Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial*. *Journal of clinical oncology*, 2010. **28**(27): p. 4142.
516. Posner, M., et al., *Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial*. *Annals of oncology*, 2011. **22**(5): p. 1071-1077.
517. Fakhry, C., et al., *Improved survival of patients with human papillomavirus–positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2008. **100**(4): p. 261-269.
518. Amini, A., et al., *Predictors of overall survival in human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer using the National Cancer Data Base*. *Oral oncology*, 2016. **56**: p. 1-7.
519. Ragin, C.C. and E. Taioli, *Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis*. *International journal of cancer*, 2007. **121**(8): p. 1813-1820.
520. Zelkowitz, R., *HPV casts a wider shadow*. *Science*, 2009. **323**(5914): p. 580-581.
521. Sedghizadeh, P.P., et al., *Is p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma associated with favorable prognosis? A systematic review and meta-analysis*. *Oral oncology*, 2016. **54**: p. 15-27.
522. Huang, S.H., et al., *Natural course of distant metastases following radiotherapy or chemoradiotherapy in HPV-related oropharyngeal cancer*. *Oral oncology*, 2013. **49**(1): p. 79-85.
523. Ang, K.K., et al., *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2010. **363**(1): p. 24-35.
524. Nichols, A.C., et al., *A pilot study comparing HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas by whole exome sequencing*. *International Scholarly Research Notices*, 2012. **2012**.
525. Stransky, N., et al., *The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma*. *Science*, 2011. **333**(6046): p. 1157-1160.
526. da Silva Deboni, A.L., et al., *Long-term oral effects in patients treated with radiochemotherapy for head and neck cancer*. *Supportive Care in Cancer*, 2012. **20**(11): p. 2903-2911.
527. Misiukiewicz, K., et al., *The role of HPV status in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2014. **12**(12): p. 812-819.
528. Gilbert, J., et al., *Phase 2 trial of oxaliplatin and pemetrexed as an induction regimen in locally advanced head and neck cancer*. *Cancer*, 2012. **118**(4): p. 1007-1013.
529. Rapidis, A.D. and G.T. Wolf, *Immunotherapy of head and neck cancer: current and future considerations*. *Journal of oncology*, 2009. **2009**.
530. European Medicines Agency. *Cervarix*. 2016 [cited 2020 Mayo].
531. European Medicines Agency. *Gardasil*. 2014 [cited 2020 Mayo].
532. European Medicines Agency. *Gardasil 9*. 2016 [cited 2020 Mayo].
533. Ferris, R.L., *Immunology and immunotherapy of head and neck cancer*. *Journal of clinical oncology*, 2015. **33**(29): p. 3293.
534. Dunne, E.F., et al., *CDC grand rounds: reducing the burden of HPV-associated cancer and disease*. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 2014. **63**(4): p. 69.
535. Stanley, M., L.A. Pinto, and C. Trimble, *Human papillomavirus vaccines—immune responses*. *Vaccine*, 2012. **30**: p. F83-F87.
536. Taberna, M., et al., *Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer*. *Annals of Oncology*, 2017. **28**(10): p. 2386-2398.
537. Stanley, M., *HPV-immune response to infection and vaccination*. *Infectious agents and cancer*, 2010. **5**(1): p. 1-6.
538. Fausch, S.C., et al., *Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses*. *The Journal of Immunology*, 2002. **169**(6): p. 3242-3249.

539. Chow, E.P., et al., *Human papillomavirus in young women with Chlamydia trachomatis infection 7 years after the Australian human papillomavirus vaccination programme: a cross-sectional study*. The Lancet Infectious Diseases, 2015. **15**(11): p. 1314-1323.
540. Söderlund-Strand, A., I. Uhnoo, and J. Dillner, *Change in population prevalences of human papillomavirus after initiation of vaccination: the high-throughput HPV monitoring study*. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 2014. **23**(12): p. 2757-2764.
541. Centers for Disease Control and Prevention. *Data from Clinical Trials*. 2019 [cited 2020 Mayo].
542. Gargano, J.W., et al., *Prevalence of genital human papillomavirus in males, United States, 2013–2014*. The Journal of infectious diseases, 2017. **215**(7): p. 1070-1079.
543. Kjaer, S.K., et al., *A 12-year follow-up on the long-term effectiveness of the quadrivalent human papillomavirus vaccine in 4 Nordic countries*. Clinical Infectious Diseases, 2018. **66**(3): p. 339-345.
544. Naud, P.S., et al., *Sustained efficacy, immunogenicity, and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: final analysis of a long-term follow-up study up to 9.4 years post-vaccination*. Human vaccines & immunotherapeutics, 2014. **10**(8): p. 2147-2162.
545. Huh, W.K., et al., *Final efficacy, immunogenicity, and safety analyses of a nine-valent human papillomavirus vaccine in women aged 16–26 years: a randomised, double-blind trial*. The Lancet, 2017. **390**(10108): p. 2143-2159.
546. Arbyn, M., et al., *Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors*. Cochrane database of systematic reviews, 2018(5).
547. Chaturvedi, A.K., et al., *Effect of prophylactic human papillomavirus (HPV) vaccination on oral HPV infections among young adults in the United States*. Journal of Clinical Oncology, 2018. **36**(3): p. 262.
548. International Agency for Research on Cancer. *IARC Working Group Reports: Primary end-points for prophylactic HPV vaccine trials*. 2014 [cited 2020 Mayo].
549. Food and Drug Administration. *Gardasil 9*. 2020 [cited 2020 Octubre].
550. Herrero, R., et al., *Reduced prevalence of oral human papillomavirus (HPV) 4 years after bivalent HPV vaccination in a randomized clinical trial in Costa Rica*. PloS one, 2013. **8**(7): p. e68329.
551. Garbuglia, A.R., et al., *The use of both therapeutic and prophylactic vaccines in the therapy of papillomavirus disease*. Frontiers in immunology, 2020. **11**: p. 188.
552. World Health Organization. *Major milestone reached as 100 countries have introduced HPV vaccine into national schedule*. 2019 [cited 2020 Mayo].
553. Sciences Avenir. *Faut-il vacciner les garçons contre le papillomavirus?* 2019 [cited 2020 Mayo].
554. Zimet, G.D., et al., *Reasons for non-vaccination against HPV and future vaccination intentions among 19-26 year-old women*. BMC women's health, 2010. **10**(1): p. 1-6.
555. Zimet, G.D., et al., *Beliefs, behaviors and HPV vaccine: correcting the myths and the misinformation*. Preventive medicine, 2013. **57**(5): p. 414-418.
556. Perkins, R.B. and J.A. Clark, *What affects human papillomavirus vaccination rates? A qualitative analysis of providers' perceptions*. Women's Health Issues, 2012. **22**(4): p. e379-e386.
557. Dirección General de Epidemiología. *Compendio del Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas en México 1993-2002*. 2002 [cited 2020 Octubre].
558. Castillejos-García, I., et al., *Type-specific persistence and clearance rates of HPV genotypes in the oral and oropharyngeal mucosa in an HIV/AIDS cohort*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2018. **47**(4): p. 396-402.
559. Méndez-Martínez, R., et al., *High prevalent human papillomavirus infections of the oral cavity of asymptomatic HIV-positive men*. BMC infectious diseases, 2020. **20**(1): p. 1-9.
560. International Agency for Research on Cancer. *GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020*. 2020 [cited 2020 Mayo].
561. Piñeros, M., et al., *Progress, challenges and ways forward supporting cancer surveillance in Latin America*. International Journal of Cancer, 2021. **149**(1): p. 12-20.

562. Martínez, O.L.R. and J.L.C. Caballero, *El inicio de la vida sexual en México: Un análisis de los cambios en el tiempo y las diferencias sociales*. Revista Latinoamericana de Población, 2020. **14**(27): p. 77-114.
563. Instituto Mexicano del Seguro Social. *Guía de Práctica Clínica GPC: Diagnóstico y Tratamiento del Carcinoma Epidermoide de Laringe*. Catálogo maestro de guías de práctica clínica 2011 [cited 2020 Octubre].
564. Instituto Mexicano del Seguro Social. *Guía de Práctica Clínica GPC: Diagnóstico y Tratamiento del Carcinoma Epidermoide de Cavidad Oral en pacientes Mayores de 18 años*. Catálogo maestro de guías de práctica clínica 2010 [cited 2020 Octubre].
565. Secretaría de Salud. *Programa de Vacunación universal y jornadas nacionales de salud pública. Lineamientos Generales 2020*. 2020 [cited 2020 Octubre].
566. Instituto Mexicano del Seguro Social. *Realiza IMSS vacunación permanente en Unidades de Medicina Familiar*. 2020 [cited 2020 Octubre].
567. Bahena, M., et al., *The influence of medical providers on HPV vaccination among children of Mexican mothers: a comparison between Mexico and the Midwest region of the United States*. BMC public health, 2019. **19**(1): p. 1-8.
568. Secretaría de Salud. *Cáncer de Cuello Uterino. Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013-2018*. 2015 [cited 2020 Octubre].
569. Gobierno de la Ciudad de México. *Decreto por el que se reforman diversas disposiciones de la Ley de Salud del Distrito Federal y de la Ley de los Derechos de Niñas, Niños y Adolescentes de la Ciudad de México*. 2017 [cited 2020 Octubre].
570. Portillo-Romero, A.J., et al., *HPV vaccine acceptance is high among adults in Mexico, particularly in people living with HIV*. salud pública de México, 2019. **60**: p. 658-665.
571. León-Maldonado, L., et al., *Feasibility of a combined strategy of HPV vaccination and screening in Mexico: the FASTER-Tlalpan study experience*. Human vaccines & immunotherapeutics, 2019. **15**(7-8): p. 1986-1994.
572. Flores, Y.N., et al., *Clinician offering is a key factor associated with HPV vaccine uptake among Mexican mothers in the USA and Mexico: a cross-sectional study*. International journal of public health, 2019. **64**(3): p. 323-332.
573. Lazcano-Ponce, E., et al., *Acceptability of a human papillomavirus (HPV) trial vaccine among mothers of adolescents in Cuernavaca, Mexico*. Archives of medical research, 2001. **32**(3): p. 243-247.