

Virus y cáncer: el ejemplo de los papilomavirus humanos

José Andrés Mendoza, Maritza Muñoz, Luis E. Téllez, Silvana Vielma,
Noraida Mosqueda, Saberio Pérez, Beatriz Quintero

Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas,
Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Recibido Septiembre 20, 2007. Aceptado Octubre 8, 2007

VIRUS AND CANCER: THE EXAMPLE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUSES

Resumen

La infección por ciertos virus esta relacionada con la generación de cáncer. Los papiloma virus humanos (VPH) causan gran variedad de lesiones benignas, pre-malignas y malignas en mujeres y en hombres. Los VPH oncogénicos son responsables de cánceres ano-genitales (VPH16, 18) en la población general y carcinomas cutáneos en pacientes con epidermodisplasia verruciforme (VPH5, 8). El cáncer cervical por VPH representa la primera causa de muerte por cáncer en mujeres de países subdesarrollados; alrededor de 500.000 mujeres desarrollan cáncer cervical y unas 250.000 mueren cada año por esta enfermedad. Las proteínas E6 y E7 son dos oncoproteínas codificadas por estos virus, reconocidas por ser dos potentes oncogenes íntimamente asociados con los eventos de la transformación maligna de las células infectadas por VPH. Para entender los mecanismos de como E6 y E7 contribuyen con el desarrollo de malignidad en el humano, muchos laboratorios se han avocado a la tarea de identificar sus proteínas celulares "blanco". Recientemente hemos reportado que la vía de señalización celular del TGF- β es inhibida por la oncoproteína E6 del VPH5 mediante su interacción directa con el factor de transcripción Smad3. El TGF- β es crucial para el control de la detención del ciclo celular y en la apoptosis. El estudio de las interacciones virus-célula podría abrir nuevas perspectivas en la comprensión de los mecanismos de la transformación maligna inducida por VPH y de manera general, en la comprensión de los mecanismos del cáncer en humanos.

PALABRAS CLAVE: VPH5; VPH16; cáncer; Smad3; E6/ E7

Abstract

Some viruses are directly related to human cancer. The human papillomavirus (HPV) cause a variety of benign, premalignant and malignant lesions in men and women. Oncogenic HPVs are responsible for ano-genital cancers (HPV16, 18) in the general population and cutaneous carcinoma in patients with the inherited disorder epidermodysplasia verruciformis (HPV5, 8). Cervical cancer caused by HPV is the leading cause of death from cancer in women in developing countries; approximately 500.000 women develop cervical cancer and about 250.000 die every year from this disease. E6 and E7 proteins are two oncoproteins encoded by the virus. They have been recognized as two potent oncogenes that are intimately associated with the events that result in the malignant conversion of virally infected cells. In order to understand the mechanisms by which E6 and E7 contribute to the development of human malignancy, many laboratories have focused their attention in identifying the cellular proteins with which E6 and E7 interact. We have recently reported that TGF- β signaling pathway is targeted by oncoprotein E6 from HPV5 through direct interaction with transcription factor Smad3. This interaction leads to an E6-mediated inhibition of TGF- β signaling, which is crucial for controlling cell cycle arrest and apoptosis. The study of virus-cell interactions will open new avenues in the understanding of their respective contributions to the malignant progression of HPV transformed cells, and in general, to the understanding of human cancer.

KEYWORDS: HPV5; HPV16; cancer; Smad3; E6/ E7

Introducción

El cáncer en el ser humano está relacionado en algunos casos con una infección viral previa. Los virus implicados en la transformación maligna son responsables del 10 al 20% de casos de cáncer en el mundo y cerca del 15% de la mortalidad por esta

enfermedad (1). La primera evidencia concerniente a la relación entre algunos virus y el cáncer sobrevino en 1911 cuando Francis Peyton Rous fue capaz de demostrar la transmisión entre aves de corral de un sarcoma cutáneo inducido por un virus (2-4). Peyton Rous fue entonces el primer científico en demostrar que ciertos tumores pueden ser

causados por virus y por el aporte de sus trabajos recibió en 1966 el premio Nobel en Fisiología y Medicina, entre otros trabajos, por el descubrimiento del primer virus oncogénico: el virus del sarcoma de los pollos o de Rous (3, 4).

Más tarde, el otro ejemplo de virus oncogénicos en animales fue aportado en los años 1930 por un colaborador de Peyton Rous, Richard Shope (5). Sus investigaciones permitieron demostrar la transmisión de verrugas de conejos enfermos por inoculación directa de sus extractos celulares filtrados en porcelana, a conejos sanos que a continuación desarrollaron verrugas de gran tamaño que se transformaron en cáncer. Años más tarde, logró demostrarse que el filtrado celular contenía partículas virales que posteriormente se clasificaron dentro del grupo de los papilomavirus.

En el hombre, los tipos de cáncer más frecuentemente asociados con una infección viral previa, son el cáncer hepatocelular originado por la infección por los virus de las hepatitis B (VHB) (6) y C (HCV) (7) y el cáncer ano-genital, inducido fundamentalmente por los virus del papiloma o papilomavirus humanos (VPH), genotipos 16 y 18 (8).

A pesar de estas y otras importantes evidencias, el campo de la virología tumoral ha tenido un desarrollo lento y relativamente reciente. De hecho, sólo han pasado algo más de 50 años desde que el diagnóstico de cáncer de cuello uterino, realizado en una joven mujer llamada **Henrietta Lacks**, y los estudios realizados a partir del tumor maligno, demostraron que sus células poseían un potencial excepcional para la proliferación in vitro, en el laboratorio dirigido por George O. Gey en la Universidad Johns Hopkins. Desde entonces, estas células han sido capaces de proliferar hasta nuestros días y son utilizadas en laboratorios de todo el mundo con el nombre de células "HeLa" (9), con múltiples aplicaciones en investigación (vacuna contra el virus de la polio, terapias contra las leucemias, estudios sobre la relación cáncer y virus, estudios sobre la síntesis de proteínas, medición de compuestos tóxicos, drogas, radiaciones, etc.). Las células HeLa se han convertido en un estándar mundial en materia de cultivo in vitro de células humanas. Debemos resaltar que estas células son efectivamente una línea celular tumoral producto de un carcinoma de cuello uterino inducido por el VPH de tipo 18 (9,

10). Los VPH representan entonces uno de los mejores ejemplos para comprender cómo algunos virus pueden inducir la formación de tumores.

Potencial oncogénico de los VPH

El cáncer de cuello uterino representa la segunda causa de cáncer en la mujer a nivel mundial. Algunos genotipos de VPH están asociados con más del 95% de los casos de cáncer cervical y cerca del 20% de los casos de cáncer de cabeza y cuello. Se ha estimado que la incidencia mundial anual de cáncer cérvico-uterino alcanza a 500.000 casos nuevos y cerca de 250.000 muertes (1). La infección por estos virus representa un verdadero problema de salud pública como agente de transmisión sexual, y en algunos casos, como agente carcinogénico. De hecho, los VPH se asemejan a otros virus con potencial oncogénico, como los virus Epstein-Barr (VEB) y VHB, para quienes la infección es frecuente, pero la progresión hacia un carcinoma invasivo se produce solamente en una minoría de casos. Esto sugiere que otros factores intervienen en la progresión de una célula infectada hasta su transformación maligna. El estudio de pacientes inmunosuprimidos y de modelos animales de experimentación, indican que una respuesta inmunitaria defectuosa es uno de los cofactores claves en la progresión maligna de las enfermedades asociadas con la infección por VPH (11, 12).

Pero, ¿qué son los papilomavirus?

Los virus del papiloma o simplemente, papilomavirus, pertenecen a una familia compleja y variada de virus (*Papillomaviridae*) encontrados en diferentes especies animales como los reptiles, aves y marsupiales, así como en más de veinte especies de mamíferos (13, 14). Por razones médicas, los VPH han sido extensivamente estudiados y hoy en día se han caracterizado más de 150 genotipos diferentes (15). Los VPH son pequeños virus de ADN bicatenario no envueltos, de 55 nm de diámetro. Su ADN circular superenrollado está compuesto por cerca de 8000 pares de bases (pb) y está asociado a histonas celulares (13, 16, 17). La cápside icosaédrica está conformada por 72 capsómeros, cada uno constituido por cinco moléculas de una proteína principal o L1 de

aproximadamente 56 kDa (principal determinante antigénico específico de género), que representa el 90% de la constitución de la partícula viral. La cápside contiene igualmente de 12 a 36 moléculas de una proteína secundaria ó L2 de alrededor de 76 kDa (18-20). Estos virus tienen la particularidad, en su gran mayoría, de ser agentes epiteliotropos estrictos que infectan casi con exclusividad la piel y/o las mucosas del epitelio poliestratificado plano de revestimiento, y es esta característica lo que por ende dificulta el desarrollo de métodos de cultivo celular para papilomavirus y su estudio en el laboratorio.

El otro aspecto importante y que será desarrollado con mayor profundidad en este artículo, es que la infección por un grupo de genotipos de papilomavirus esta asociada con la generación de cáncer (carcinomas epidermoides y adenocarcinomas), tanto en diversas especies de animales que van desde pequeños reptiles, pasando por aves y grandes mamíferos como delfines y cetáceos, hasta el hombre (los VPH, propiamente dichos).

Organización genética y replicación de los papilomavirus

Los papilomavirus tienen una organización genómica común (13, 21-23). Una sola de las dos cadenas de ADN es capaz de codificar para la producción de proteínas virales, sin embargo, los

tres marcos abiertos de lectura (MAL u ORF, del inglés *Open Reading Frame*) son utilizados por el virus para la síntesis proteica, frecuentemente con cabalgamiento de los diferentes MAL. El genoma viral está conformado por siete a nueve MAL y puede ser separado en tres regiones: 1) una región reguladora no codificante o larga región de regulación (LRR) o URR (por *Upstream Regulatory Region*); 2) una región precoz o "E" (del inglés *Early*), y 3) una región tardía o "L" (por *Late*). La LRR tiene un tamaño variable según el tipo de VPH y contiene el origen de replicación viral y lo esencial en cuanto a señales de regulación de la expresión de su propio genoma (promotores, activadores, supresores, etc.) (Fig. 1). La región E representa cerca del 50% del genoma y contiene de cinco a siete MAL (E1 a E8), que codifica proteínas implicadas en la estimulación de la proliferación celular (E5, E6 y E7), la replicación del propio ADN viral (E1 y E2) (24) o la regulación de la transcripción del genoma viral (E2), así como otra proteína, E4, expresada a todo lo largo de la fase tardía del ciclo viral y que interviene en la maduración de la partícula viral (25) (Fig. 1). Sólo 5 de estos MAL (E1, E2, E4, E6, y E7) se encuentran en todos los papilomavirus. Finalmente y como ya se había evocado previamente, la región L comprende dos genes presentes en la totalidad de los papilomavirus que codifican las proteínas estructurales o de la cápside L1 y L2, respectivamente.

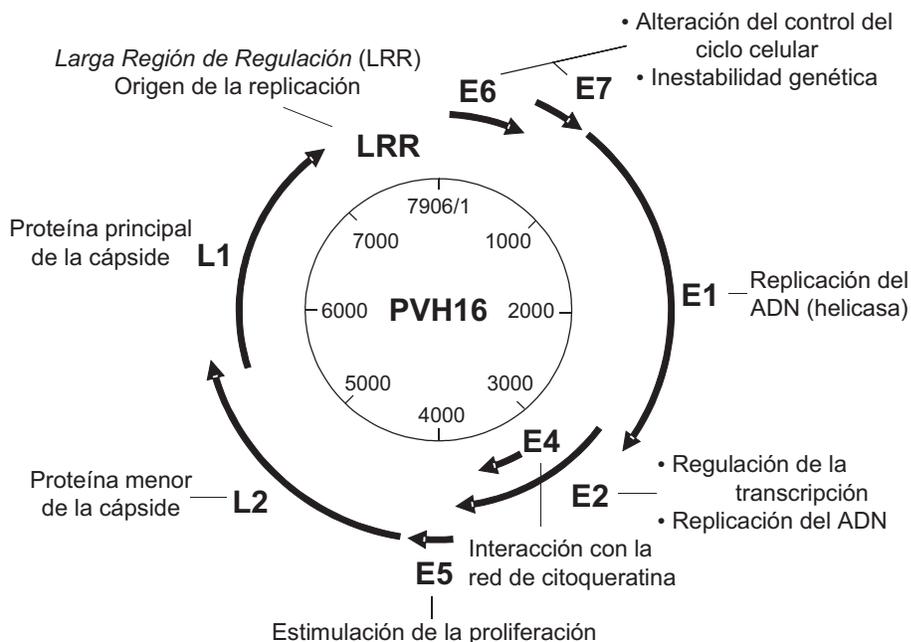


Figura 1. Organización del genoma del VPH16. Se observan la región precoz ó "E", compuesta por seis MAL que codifican para proteínas no estructurales; la región tardía ó "L" que codifica para las proteínas L1 y L2 de la cápside y, entre estas dos regiones E y L, una región que no codifica o larga región de regulación (LRR).

La imposibilidad de cultivar de rutina estos virus *in vitro* ha frenado por mucho tiempo el estudio de su ciclo viral. Esto está ligado al sistema de replicación de los VPH que no se lleva a cabo sino en queratinocitos en vías de diferenciación terminal en epitelios estratificados de revestimiento como la piel y algunas mucosas (oral, genital, etc.). Sin embargo, el aislamiento de dos líneas de células que contienen secuencias de los VPH16 y 31 en forma de episomas, ha permitido estudiar el ciclo de replicación de estos dos genotipos de VPH (26, 27).

Hoy en día se admite que los virus penetran por una pequeña brecha o microtraumatismo en el revestimiento cutáneo o mucoso, e infecta las células pluripotenciales o células basales del epitelio (28). En la piel, por ejemplo, las células pluripotenciales se encuentran situadas en la capa de células basales de los folículos pilosos y en las crestas de la epidermis. Estas células pluripotenciales o células madre, cuya tasa de multiplicación es muy baja, dan origen a células basales en fase de multiplicación transitoria. Luego de un cierto número de ciclos de multiplicación, estas células basales detienen su proliferación y migran hacia la superficie del epitelio para dar curso entonces a las etapas de diferenciación epitelial terminal. En las células basales, el ADN viral persiste en forma de episomas libres y en bajo número (20 a 100 copias por célula). Sólo las células de las capas más superficiales aseguran una abundante producción de partículas virales. La expresión de los genes virales precoces en las capas basales y suprabasales del epitelio, es responsable de la acantosis y la hiperplasia del tejido al inicio de la formación de tumores. En el caso de infecciones por VPH de alto riesgo como el VPH16, la formación de lesiones cervicales pudiera ser facilitada por una infección de las células pluripotenciales presentes en la zona de transformación del cuello uterino (14).

La naturaleza del o los receptores para VPH en las células susceptibles a la infección, permanece hasta la fecha en controversia. Según algunos estudios, se trata de moléculas del tipo heparán sulfatos (29-31). Sin embargo, McMillan et al. en 1999 (32), demostraron que la alfa 6 integrina puede ser utilizada por el VPH6 como receptor celular. Estudios recientes han demostrado que la internalización de partículas virales que se adosan a la membrana de la célula susceptible,

puede tener lugar por endocitosis y la formación de vesículas recubiertas de clatrina (33, 34), o por vía caveolar (35).

La descapsidación se lleva a cabo en los endosomas por la destrucción de los puentes disulfuro intracapsómicos lo cual permite el transporte del ADN viral hacia los poros nucleares de la célula recién infectada (36). En el núcleo se produce la expresión de los genes precoces E1, E2, E6, y E7. La replicación vegetativa del genoma viral (de 1.000 a 10.000 copias por célula) toma lugar en las capas superiores de la epidermis, donde se produce igualmente la síntesis de las proteínas L1 y L2 de la cápside y la maduración de los viriones, momentos antes de la descamación del epitelio y la liberación de las nuevas partículas virales hacia el medio exterior (37). El ciclo de replicación viral está por ende estrechamente ligado a la diferenciación terminal de los queratinocitos.

VPH y cáncer de cuello uterino

En las mujeres que no son capaces de eliminar o limitar su infección producida por algún VPH oncogénico con tropismo genital, como los VPH16 y 18, las lesiones cervicales pueden progresar de una lesión de bajo grado, como la neoplasia intraepitelial cervical de grado I ó II (NICI ó II) a una lesión de alto grado (NICIII y carcinoma *in situ*) y hasta la generación de un cáncer invasivo (38, 39) (Fig. 2). Las células de lesiones de bajo grado permiten la producción de grandes cantidades de virus (lesiones altamente "productivas"). No obstante, las lesiones de alto grado tienen una pobre capacidad para producir partículas virales (40) (Fig. 2). El evento crucial en la progresión de una lesión productiva hacia la neoplasia de alto grado es, en la mayoría de los casos, la integración de secuencias del ADN viral al genoma celular, lo que conduce a la pérdida de la expresión de la proteína viral E2 (encargada de controlar la expresión de las otras proteínas virales), a una falla en la regulación negativa de la síntesis de las oncoproteínas virales E6 y E7, a la proliferación de las células basales y parabasales y a la incapacidad para la reparación de mutaciones que pueden tener lugar en el ADN celular (41). Se ha demostrado que la integración del ADN viral de VPH oncogénicos siempre se acompaña de la delección del gen viral E2 (Fig. 2). Un defecto en la

expresión de las proteínas E1 y/o E2 del VPH31 conduce por ejemplo, a la integración del genoma viral en el ADN celular. Se conoce que E2 es un importante represor transcripcional del promotor precoz viral y su pérdida facilitarían la conversión maligna de las células infectadas por un aumento en

la expresión de la actividad transformante de las proteínas virales precoces E6 y E7. Además, experimentos *ex vivo* han demostrado que la proteína viral E2 es capaz de inducir la detención del ciclo celular en la fase G1, la apoptosis y la senescencia (42-44).

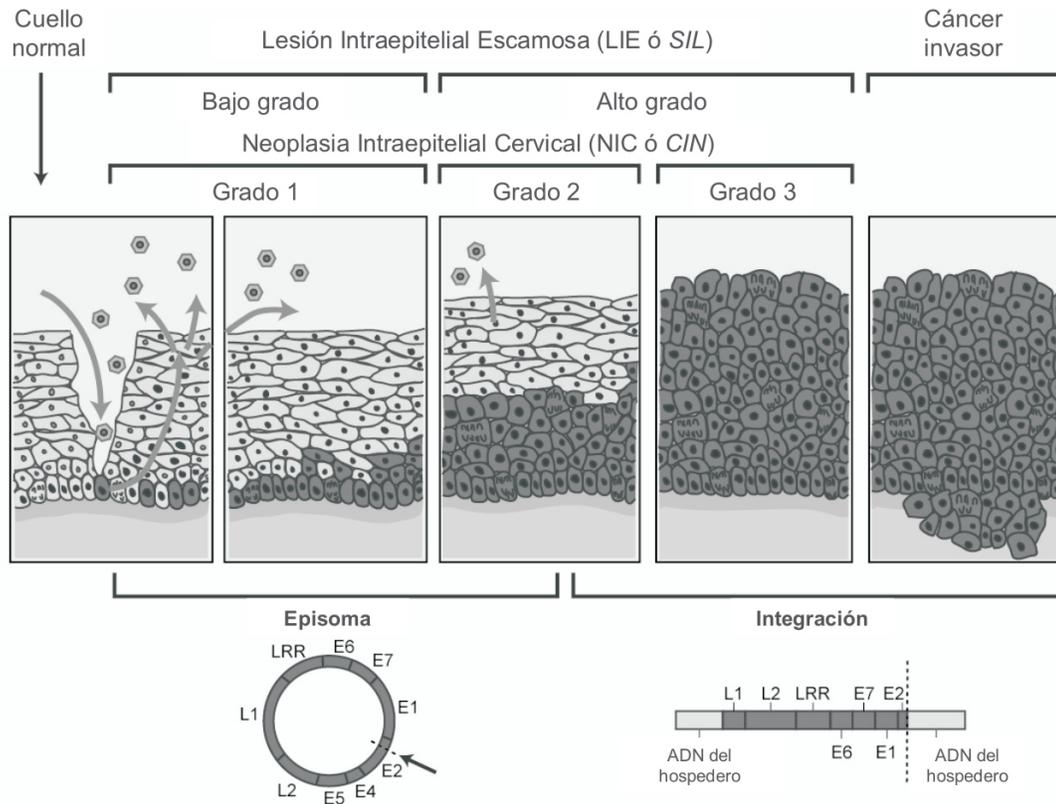


Figura 2. Infección por VPH y desarrollo de cáncer de cuello uterino. En un primer término, el VPH penetra en las células de la capa basal del epitelio a través de una brecha o microtraumatismo. En la mayoría de los casos, la infección es controlada por acción de las respuestas innata y adquirida o adaptativa. En otros casos, puede causar lesiones intraepiteliales de diferente grado con la producción de nuevas partículas virales. Cuando se trata de una infección por VPH de alto riesgo, puede ocurrir la integración del ADN viral al ADN celular, evento que cursa con la pérdida de la expresión de la proteína viral E2 y un aumento en la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 lo cual impulsa entonces la evolución hacia lesiones de alto grado y el carcinoma invasor.

Las oncoproteínas de los papilomavirus

Proteína E5

En realidad, se trata de un pequeño péptido de 42 a 83 aminoácidos de largo (de acuerdo al genotipo de VPH). De manera interesante, los VPH con tropismo cutáneo y asociados con la epidermodisplasia verruciforme, no poseen el gen que codifica para la proteína E5. Esta proteína se localiza en los compartimientos endomembranales

de la célula, principalmente en el aparato de Golgi (papilomavirus bovino o VPB) y en el retículo endoplasmático (VPH16). E5 es capaz de interactuar con la proteína celular de 16k (ductina/sub-unidad C). Se cree que esta interacción es responsable de la disregulación de canales de tipo *gap* o *gap-junction*, claves para la alcalinización del Golgi y de los endolisosomas. E5 de VPB1 activa también el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF; por *Platelet-Derived Growth Factor*), mientras que E5

del VPH16 aumenta la respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor de la endotelina y sus ligandos respectivos. Estas asociaciones han demostrado por lo menos in vitro, una relación de E5 con los procesos involucrados en el desarrollo de metástasis. Sin embargo E5 se produce regularmente durante los estadios precoces de la infección viral, mientras que el gen E5 se encuentra eliminado en la mayoría de los cánceres, lo que luce contradictorio con el posible rol de esta proteína en las etapas tardías de la carcinogénesis asociadas con VPH (para mayores detalles, sugerimos leer la revisión sobre E5 de Venuti y Campo) (45).

Oncoproteínas E6 y E7

Los dos genes precoces E6 y E7 de los VPH de alto riesgo juegan un papel crucial en la replicación vegetativa viral y eventualmente en la formación de tumores. Por el contrario, las proteínas E6 y E7 de los VPH de bajo riesgo, poseen un poder de transformación celular menos acentuado (46). Se ha sugerido que, de acuerdo a datos de estructura proteica, estas dos principales oncoproteínas tienen un ancestro común (47, 48). Una de las evidencias que muestra la participación de las proteínas precoces E6 y E7 en los procesos de transformación y malignidad proviene de análisis bioquímicos, sin embargo, la prueba última que ha demostrado su papel transformante está dada mediante la utilización de siARN (silenciamiento post-transcripcional de un gen por inhibición con secuencias cortas de ARN), el cual puede aparearse con el ARN mensajero de E6 y E7 y conducir a su degradación para restablecer un fenotipo normal a líneas celulares previamente transformadas por la expresión de estas dos oncoproteínas (49, 50). Se ha demostrado que E6 y E7 son igualmente capaces de alterar varias vías o cascadas de señalización celular puestas en juego en el control del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis, fundamentalmente mediante la interacción y neutralización de la función reguladora de dos factores centrales de supresión de tumores, p53 y Rb (51), como se revisará más adelante.

La función inicial de las proteínas E6 y E7 es la de permitir a los queratinocitos en vías de diferenciación terminal, de reiniciar muchas veces el ciclo de multiplicación celular, permitiendo el paso constante de la fase G1 a la fase S para que el

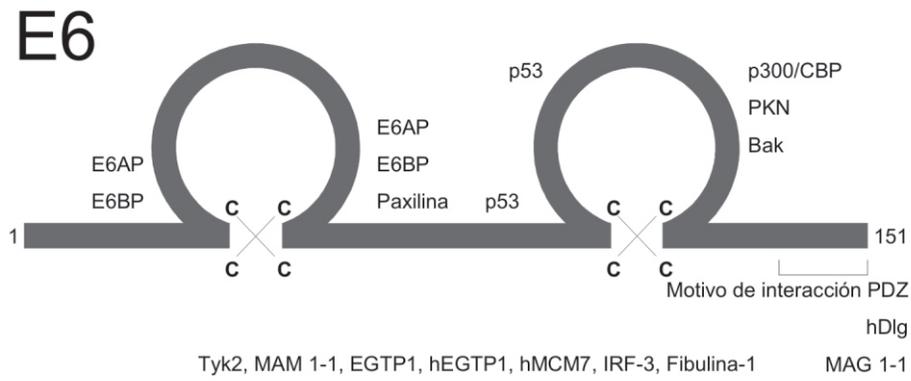
VPH pueda así usurpar la maquinaria celular necesaria para la replicación viral. El problema es que las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo de cáncer, poseen propiedades biológicas particulares que juegan un papel protagónico en la transformación maligna de las células infectadas por estos virus. A continuación se describen de forma más o menos detallada, las características y funciones de estas dos oncoproteínas virales.

Proteína E6

E6 está compuesta por ~150 aminoácidos de acuerdo al genotipo de VPH y de dos (2) estructuras en dedos de zinc, que representan motivos bioquímicos esenciales para la función de la proteína (Fig. 3). E6 es capaz de immortalizar células epiteliales humanas primarias y junto con el factor Ras activado, transformar células primarias de roedores de experimentación. E6 interactúa con numerosas proteínas celulares, incluyendo supresores tumorales, factores de transcripción y coactivadores, transductores de señalización celular, reguladores de la polaridad y crecimiento celulares e incluso las proteínas llamadas "ubiquitin ligasas" implicadas en la degradación de otras proteínas por vía del proteasoma. Sin embargo, el primer "blanco" celular de E6 y muy probablemente el más importante en haber sido identificado hasta la actualidad, es el supresor de tumores p53 (Fig. 3). La interacción con E6 conduce a la degradación de p53, a través de la unión simultánea con una ubiquitin ligasa (E6-AP) permitiendo la immortalización y la transformación celular luego de la acumulación de mutaciones en el genoma de la célula infectada. E6 también es un factor de transcripción, capaz de estimular la producción y activación de la telomerasa (hTERT), del factor estimulador del endotelio vascular (VEGF), la fibronectina y del oncogen c-Myc (Fig. 3). La expresión continua de E6 es necesaria y suficiente para el mantenimiento del estado transformado de células transfectadas por esta oncoproteína viral (52).

Proteína E7

La proteína E7 del VPH de tipo 16 es una proteína de expresión nuclear, de 98 aminoácidos con sitios de fosforilación por parte de la caseína quinasa II, en las serinas de posición 31 y 32 para su activación.



Objetivos transcripcionales: hTERT, VEGF, fibronectina, protimosina- α , c-Myc

Figura 3. La proteína E6 del VPH16. Los dos dedos de zinc son mostrados, así como las principales asociaciones celulares agrupadas de acuerdo al sitio de interacción con E6 y los genes activados por esta oncoproteína.

E7 se divide en tres dominios: region conservada (CR por *Conserved Region*) 1 (aminoácidos 1-20), CR2 (21-39) y CR3 (40-98), correspondiendo a dominios conservados y similares a la proteína E1A de los adenovirus y al antígeno mayor T del virus SV40 (53). E7 es capaz de formar dímeros gracias a la presencia de un motivo en dedo de zinc presente en el dominio CR3. Este motivo es esencial para el repliegue y viabilidad de la proteína (Fig. 4).

E7 interactúa con varias proteínas celulares relacionadas con la regulación de la proliferación celular, en particular, de la etapa de transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. De hecho, estudios bioquímicos han demostrado que E7 se asocia e inactiva a miembros de la familia de supresores de tumores del retinoblastoma (Rb, p107, p130). De igual forma, E7 es capaz de asociarse con las desacetilasas de histonas (HDAC), factores de transcripción del tipo AP1, la proteína de interacción con la TATA box (TBP), diferentes ciclinas, con cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y algunos de sus inhibidores (Fig.

4). Estas interacciones son los medios por los cuales E7 genera la disregulación del ciclo celular y así conduce a un aumento de la tasa de proliferación celular, a la inmortalización y finalmente, a la transformación. E7 es considerada entonces como la oncoproteína principal en los VPH genitales de alto riesgo de cáncer (VPH16, 18, 31, 33, 39, 54, etc.). La proteína E7, de la misma manera que la proteína E6, se expresa continuamente a lo largo del proceso de transformación maligna (54).

En conclusión, las proteínas E6 y E7 juegan un papel preponderante durante el ciclo de replicación viral, permitiendo la reentrada constante en el ciclo celular. Sin embargo, el aumento en la expresión de estas proteínas, en el caso de los VPH genitales de alto riesgo, conduce a la inmortalización de los queratinocitos del cuello uterino y favorece la ocurrencia de mutaciones en el genoma celular y a la inestabilidad genética, procesos claves asociados con la transformación maligna.

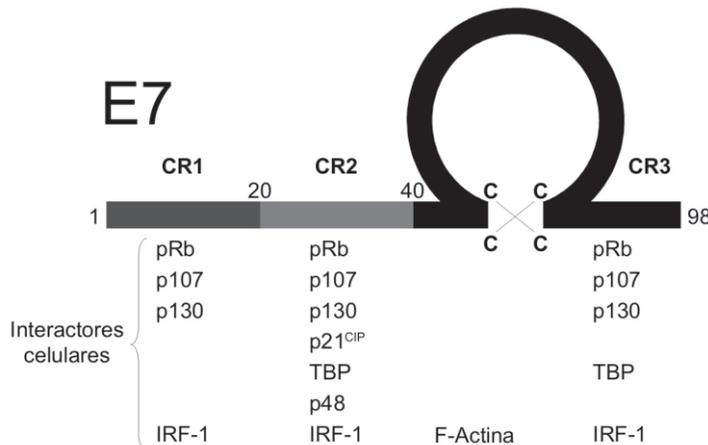


Figura 4. Esquema de la proteína E7 del VPH16. Se muestran los tres dominios CR1, CR2 y CR3, así como el motivo en dedo de zinc en el dominio CR3 y los principales “socios” o interactores celulares agrupados de acuerdo al sitio de interacción con E7.

VPH y cáncer de piel

Se cree que los VPH juegan un papel importante en la carcinogénesis cutánea en la población general, aunque esto aún no ha podido demostrarse con claridad. En efecto, métodos muy sensibles basados en PCR han permitido detectar secuencias de ADN de VPH de la epidermodisplasia verruciforme (EV) en carcinomas espinocelulares en cerca del 40% de pacientes inmunocompetentes y 80% de transplantados renales (23, 55-57). Además, algunos VPH cutáneos son responsables de carcinomas de piel (VPH5 y 8) en pacientes que padecen la EV. Esta genodermatosis autosómica recesiva rara constituye un modelo de estudio de predisposición genética a la infección por VPH oncogénicos. En el caso de los VPH de la EV asociados al cáncer de piel de tipo no mélanico (carcinomas cutáneos baso y espinocelulares), se ponen en juego mecanismos distintos a los observados en los casos de cáncer genital asociado a VPH. Estudios recientes han permitido demostrar que: 1) transcritos específicos de VPH de la EV pueden evidenciarse en cánceres cutáneos; 2) la transcripción de algunos VPH de la EV es activada por los rayos UV, y 3) el ADN de algunos VPH es más frecuentemente detectado en los precursores de epitelomas espinocelulares (queratomas actínicos) que en el propio cáncer. El conjunto de estos datos podría indicarnos un papel posible de los VPH de la EV en la iniciación o la promoción de tumores por un mecanismo de *hit and run* (58-60).

Estado físico y transcripción del genoma viral en los casos de cáncer cutáneo en la EV

Los genomas virales se mantienen en estado de episomas múltiples en los casos de cáncer de la EV (en el cáncer de cuello uterino, el genoma viral está frecuentemente integrado al genoma celular). Se ha determinado que puede haber de 100 a 500 copias de ADN viral por célula (13, 61, 62) y en algunas lesiones cancerosas, se observan también deleciones en la región tardía del genoma viral y en otras, en la región 5' de la LRR de los VPH5 y 8 (22, 63). Sin embargo, no ha podido demostrarse mutación puntual alguna en los genes virales durante la progresión tumoral. Por otro lado, se ha demostrado que en los carcinomas cutáneos existe una abundante tasa de transcripción de dos ARN mensajeros que corresponden a la expresión de

genes E6 y E7 de los VPH5 y 8 (63). Los transcritos de esta región E6/E7 se detectan durante todo lo largo del proceso de transformación maligna (64, 65), lo cual puede sugerir que las oncoproteínas E6 y E7 desempeñan un papel importante en la progresión tumoral (66, 67). A diferencia de los VPH genitales en quienes un solo promotor localizado en la LRR permite la expresión de E6 y E7 en forma de un ARNm policistrónico, dos promotores permiten la expresión de los oncogenes E6 y E7 de los VPH5 y 8 localizados respectivamente en la LRR (E6) y en la fase abierta de lectura de E6 (E7).

Las proteínas precoces E6 y E7 de los VPH de la EV

La transfección de líneas de fibroblastos de ratones (C127) o de ratas (Rat1) con un vector retroviral que contiene diferentes secuencias de la región precoz del VPH8 ha permitido observar que la expresión del gen E6 es suficiente para conferir un fenotipo maligno a las células (68). La capacidad transformante de la proteína E6 ha sido observada igualmente en otros VPH relacionados con la EV (VPH5, 14, 21 y 25), sin embargo, su eficacia para la transformación es menor (69, 70). Recientemente se ha puesto en evidencia que un aumento en la expresión de la proteína E6 estimula la actividad del principal regulador de la transcripción viral, la proteína E2 y del co-activador celular p300, quien coopera en la activación de la expresión genética del VPH8 (71). Cabe destacar que la oncoproteína E6 de los VPH de la EV, no inhibe la actividad transcripcional de p53 y no se asocia a esta proteína para inducir su degradación, como en el caso de los VPH genitales de alto riesgo (72-74). Sin embargo, se ha observado que la oncoproteína E6 de VPH5 inhibe la apoptosis inducida por los rayos UV (75), reduciendo la actividad de la proteína pro-apoptótica Bak (76).

Por otro lado, el producto del gen E7 de los VPH de la EV no tiene ninguna actividad transformante en células inmortalizadas de roedores en cultivo (68, 70); aunque E7 de VPH8 posee una cierta actividad transformante en una línea de fibroblastos de rata que expresa el gen H-ras (77). La proteína E7 de los VPH5 y 8 es capaz de asociarse con la proteína celular pRb, pero no induce su degradación como sucede con la proteína

E7 de los VPH genitales oncogénicos (78, 79). Además, la proteína E7 de VPH47 induce la transactivación de promotores dependientes del factor E2F (80). De manera interesante, se ha observado que E7 parece estimular la capacidad de migración de células transformadas a través de la membrana basal que separa la epidermis de la dermis (81).

Nosotros hemos podido recientemente identificar la asociación de la oncoproteína E6 de VPH5 y el factor de transcripción celular Smad3 (82), cuyo rol en la cascada de señalización celular iniciada por el factor transformador del crecimiento beta (TGF- β), es fundamental para la detención del ciclo celular en la fase G1, permitiendo la diferenciación terminal de células como los queratinocitos de piel (83). La asociación entre E6 y Smad3 genera la represión de la vía del TGF- β (82), lo que pudiera ocasionar una liberación de los mecanismos de control para la progresión del ciclo celular, permitiendo así la presencia y plena disponibilidad del conjunto de polimerasas de ADN y de ARN que serán usufructuadas por el VPH para permitir su propia replicación vegetativa.

Estos hallazgos nos condujeron a realizar experimentos que nos permitieran identificar si esta asociación era exclusiva de genotipos de VPH con potencial oncogénico y con tropismo cutáneo como el VPH5, o si se trataba de una asociación que podía encontrarse con otros genotipos. La respuesta a esta interrogante ha sido contundente y gracias a experimentos de dos híbridos en levaduras y de co-inmunoprecipitación en queratinocitos humanos (la línea celular HaCaT), sólo las proteínas E6 de los VPH5 y 8 (VPH cutáneos con potencial oncogénico) son capaces de interactuar y reprimir la actividad de la proteína celular Smad3; mientras que no existe ninguna asociación entre la proteína E6 de los VPH1, 3 y 9 (VPH cutáneos no oncogénicos), VPH6 y 11 (VPH con tropismo genital con bajo riesgo de producir cáncer), o los VPH16, 18, 33 y 39 (VPH genitales de alto riesgo de cáncer) (resultados aún no publicados). Esto último indica que, muy probablemente, la asociación exclusiva de E6 de VPH cutáneos con potencial oncogénico (genotipos 5 y 8) con Smad3 tenga un significado particularmente importante en la pérdida de la actividad ejercida por el TGF- β para el control del ciclo celular y la apoptosis, funciones claves en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células, cuya alteración

podiera explicar en parte la relación entre la infección por VPH5 y/u 8 y la generación de cáncer de piel.

Conclusiones

La relación entre la infección por algunos virus y la generación de cáncer, particularmente los virus ADN (virus de la hepatitis B, algunos virus herpes y adenovirus), ha sido establecida de manera más o menos clara. Sin embargo, quizás no exista mejor ejemplo de la relación directa entre virus y cáncer que la infección por algunos genotipos de VPH y el cáncer de cuello uterino. Durante la infección por VPH, las oncoproteínas E6 y E7 juegan múltiples roles, fundamentalmente en la interferencia de algunas vías de señalización celular a los fines de crear un microambiente favorable para la replicación viral, y en la neutralización de algunos mecanismos de control celular claves, que son “encendidos” para forzar a la célula a recomenzar el ciclo de multiplicación del ADN celular. De esta manera, E6 y E7 son capaces de bloquear la apoptosis interfiriendo con la actividad de p53 y pRb, respectivamente, conduciendo a la degradación de estos dos importantes genes supresores de tumores, permitiendo así la ocurrencia de errores (mutaciones) durante el proceso de multiplicación del ADN celular. Además, E6 y E7 inhiben la diferenciación terminal y la senescencia de las células infectadas, resultando en la inmortalización de las mismas. Finalmente, las dos oncoproteínas virales son capaces de interferir con los procesos que controlan el contacto intercelular, la polarización y los mecanismos de defensa innata de las células, facilitando los procesos de invasión y metástasis de las células transformadas.

Debería quedar claro sin embargo, que el panorama descrito en este texto, está lejos de ser la evolución “fisiológica” que ocurre generalmente después de una infección por VPH; sino más bien representa el resultado o evolución más grave que sólo ocurre en una minoría de los casos y que involucra la conjunción de procesos multifactoriales y progresivos. No obstante, el cáncer cervical continúa siendo un problema de salud pública extremadamente serio, representando una de las primeras causas de mortalidad por cáncer en mujeres en todo el mundo (84); así que el estudio de la biología de los VPH y en particular, de las

oncoproteínas E6 y E7 y sus “blancos” celulares, debe constituir la piedra angular en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Correspondencia: Dr. José Andrés Mendoza: Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela. 00 58 274 2403544. E-mail: joseandres@ula.ve

Referencias

- Vaccarella, S., Herrero, R., Dai, M., et al. 2006. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15:2148-2153.
- Andrewes, C.H. 1971. Francis Peyton Rous 1879-1970. *Biogr. Mem. Fellows R. Soc.* 17:643-662.
- Dulbecco, R. 1976. Francis Peyton Rous. *Biogr. Mem. Natl. Acad. Sci.* 48:275-306.
- Raju, T.N. 1999. The Nobel chronicles. 1966: Francis Peyton Rous (1879-1970) and Charles Brenton Huggins (1901-97). *Lancet* 354:520. Erratum En: *Lancet.* 1999. 354:1038.
- MacLeod, C.M. 1971. Richard Edwin Shope, 1901-1966. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 84:36-38.
- Kremsdorf, D., Soussan, P., Paterlini-Brechot, P., Brechot, C. 2006. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* 25:3823-3833.
- Wong, S.N., Lok, A.S. 2006. Update on viral hepatitis: 2005. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 22:241-247.
- zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2:342-350.
- Jones, H.W. Jr. 1997. Record of the first physician to see Henrietta Lacks at the Johns Hopkins Hospital: history of the beginning of the HeLa cell line. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176:S227-228.
- Hsu, S.H., Schacter, B.Z., Delaney, N.L., et al. 1976. Genetic characteristics of the HeLa cell. *Science* 191:392-394.
- Bonnez, W. 2005. The HPV xenograft severe combined immunodeficiency mouse model. *Meth. Mol. Med.* 119:203-216.
- Laffort, C., Le Deist, F., Favre, M., et al. 2004. Severe cutaneous papillomavirus disease after haemopoietic stem-cell transplantation in patients with severe combined immune deficiency caused by common gamma cytokine receptor subunit or JAK-3 deficiency. *Lancet* 363:2051-2054.
- Orth, G. 1987. Epidermodysplasia verruciformis. *En The Papillomaviruses.* P.M. Howley, N.P. Salzman, eds. Plenum Press, NY.
- Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.* 32 Suppl. 1:S7-15.
- Bernard, H.-U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* 32 Suppl. 1:S1-6.
- Favre, M., Orth, G., Croissant, O., Yaniv, M. 1977. Human papillomavirus DNA: physical mapping of the cleavage sites of *Bacillus amyloliquefaciens* (BamI) and *Haemophilus parainfluenzae* (HpaII) endonucleases and evidence for partial heterogeneity. *J. Virol.* 21:1210-1214.
- Howley, P.M., Lowy, D.R. 2001. Papillomaviruses and their replication. *En, Fields Virology,* D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Straus, eds. Vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. 2197-2330.
- Favre, M. 1975. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J. Virol.* 15:1239-1247.
- Zhou, W., Tying, S.K., Brysk, M., Chan, T.S. 1996. Immortalization of differentiated human keratinocytes by human papillomavirus (HPV) 16 DNA. *J. Dermatol. Sci.* 13:140-152.
- Zhao, C., Sokolowski, M., Tan, W., Schwartz, S. 1998. Characterisation and partial purification of cellular factors interacting with a negative element on human papillomavirus type 1 late mRNAs. *Virus Res.* 55:1-13.
- Kremsdorf, D., Favre, M., Jablonska, S., et al. 1984. Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papillomavirus types associated with epidermodysplasia verruciformis. *J. Virol.* 52:1013-1018.
- Deau, M.C., Favre, M., Orth, G. 1991. Genetic heterogeneity among human papillomaviruses (HPV) associated with epidermodysplasia verruciformis: evidence for multiple allelic forms of HPV5 and HPV8 E6 genes. *Virology* 184:492-503.
- de Villiers, E.M. Papillomavirus and HPV typing. 1997. *Clin. Dermatol.* 15:199-206.
- Ustav, M., Stenlund, A. 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* 10:449-457.
- Doorbar, J., Campbell, D., Grand, R.J., Gallimore, P.H. 1986. Identification of the human papilloma virus-1^a E4 gene products. *EMBO J.* 5:355-362.
- Hubert, W.G., Laimins, L.A. 2002. Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. *J. Virol.* 76:2263-2273.
- Hebner, C.M., Laimins, L.A. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.* 16:83-97.
- Egawa, K. 2003. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 207:251-254.
- Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., et al. 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274:5810-5822.
- Combata, A.L., Touze, A., Bousarghin, L., et al. 2001. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol. Lett.* 204:183-188.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., et al. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75:1565-1570.
- McMillan, N.A., Payne, E., Frazer, I.H., Evander, M. 1999. Expression of alpha 6 integrin confers papillomavirus

- binding upon receptor-negative B-cell. *Virology* 261:271-274.
33. Day, P.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T. 2003. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307:1-11.
34. Culp, T.D., Christensen, N.D. 2004. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 319:152-161.
35. Bousarghin, L., Touze, A., Sizaret, P.Y., Coursaget, P. 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J. Virol.* 77:3846-3850.
36. Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K., Garcea, R.L. 1998. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.* 72:2160-2167.
37. Ozburn, M.A., Meyers, C. 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J. Virol.* 72:2715-2722.
38. Peto, J., Gilham, C., Deacon, J., et al. 2004. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. *Br. J. Cancer* 91:942-953.
39. Steenbergen, R.D., de Wilde, J., Wilting, S.M., et al. 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J. Clin. Virol.* 32 Suppl 1:S25-33.
40. Middleton, K., Peh, W., Southern, S., et al. 2003. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* 77:10186-10201.
41. von Knebel-Doeberitz, M. 2002. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur. J. Cancer* 38:2229-2242.
42. Desaintes, C., Demeret, C. 1996. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin. Cancer Biol.* 7:339-347.
43. Desaintes, C., Goyat, S., Garbay, S., Yaniv, M., Thierry, F. 1999. Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene* 18:4538-4545.
44. Wells, S.I., Francis, D.A., Karpova, A.Y., et al. 2000. Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways. *EMBO J.* 19:5762-5771.
45. Venuti, A., Campo, M.S. 2002. The E5 protein of papillomaviruses. *En, Human Papillomaviruses.* D.J. McCance, ed. Elsevier Science.
46. Farr, A., Wang, H., Kasher, M.S., Roman, A. 1991. Relative enhancer activity and transforming potential of authentic human papillomavirus type 6 genomes from benign and malignant lesions. *Gen Virol.* 72 (Pt 3):519-526.
47. Herber, R., Liem, A., Pitot, H., Lambert, P.F. 1996. Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J. Virol.* 70:1873-1881.
48. Song, S., Pitot, H.C., Lambert, P.F. 1999. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J. Virol.* 73:5887-5893.
49. Shillitoe, E.J. 2006. Papillomaviruses as targets for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 13:445-450.
50. Yamato, K., Fen, J., Kobuchi, et al. 2006. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Cancer Gene Ther.* 13:234-241.
51. Vousden, K.H., Vojtesek, B., Fisher, C., Lane, D. 1993. HPV-16 E7 or adenovirus E1A can overcome the growth arrest of cells immortalized with a temperature-sensitive p53. *Oncogene* 8:1697-1702.
52. Mantovani, F., Banks, L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20:7874-7887.
53. Clemens, K.E., Brent, R., Gyuris, J., Münger, K. 1995. Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein *in vivo*. *Virology* 214:289-293.
54. Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., et al. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* 78:11451-11460.
55. de Jong-Tieben, L.M., Berkhout, R.J.M., Smits, H.L., et al. 1995. High frequency of detection of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in biopsies from malignant and premalignant skin lesions from renal transplant recipients. *J. Invest. Dermatol.* 105:367-371.
56. Pfister, H., ter Schegget, J. 1997. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin. Dermatol.* 15:335-347.
57. Berkhout, R.J., Bouwes Bavinck, J.N., ter Schegget, J. 2000. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 38:2087-2096.
58. Purdie, K.J., Suretheran, T., Sterling, J.C., et al. 2005. Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J. Invest. Dermatol.* 125:98-107.
59. Orth, G. 2005. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis in nonmelanoma skin cancers: guilty or innocent? *J. Invest. Dermatol.* 125:xii-xiii.
60. Weissenborn, S.J., Nindlm I., Purdiem K., et al. 2005. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J. Invest. Dermatol.* 125:93-97.
61. Jablonska, S., Majewski, S. 1994. Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 186:157-175.
62. Harwood, C.A., Suretheran, T., Sasieni, P., et al. 2004. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br. J. Dermatol.* 150:949-957.
63. Deau, M.C., Favre, M., Jablonska, S., Rueda, L.A., Orth, G. 1993. Genetic heterogeneity of oncogenic human papillomavirus type 5 (HPV5) and phylogeny of HPV5 variants associated with epidermodysplasia verruciformis. *J. Clin. Microbiol.* 31:2918-2926.
64. Yutsudo, M., Hakura, A. 1987. Human papillomavirus type 17 transcripts expressed in skin carcinoma tissue of a patient with epidermodysplasia verruciformis. *Int. J. Cancer* 39:586-589.
65. Yutsudo, M., Tanigaki, T., Kanda, R., et al. 1994. Involvement of human papillomavirus type 20 in epidermodysplasia verruciformis skin carcinogenesis. *J. Clin. Microbiol.* 32:1076-1078.
66. Stubenrauch, F., Malejczyk, J., Fuchs, P.G., Pfister, H. 1992. Late promoter of human papillomavirus type 8 and its regulation. *J. Virol.* 66:3485-3493.

67. Adachi, A., Kimono, T., Hayashi, Y., Ohashi, M., Ishibashi, M. 1996. Detection of human papillomavirus (HPV) type 47 DNA in malignant lesions from epidermodysplasia verruciformis by protocols for precise typing of related HPV DNAs. *J. Clin. Microbiol.* 34:369-375.
68. Iftner, T., Bierfelder, S., Csapo, Z., Pfister, H. 1988. Involvement of human papillomavirus type 8 genes E6 and E7 in transformation and replication. *J. Virol.* 62:3655-3661.
69. Kimono, T., Hiraiwa, A., Ishibashi, M. 1992. Differences in transforming activity and coded amino acid sequence among E6 genes of several papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. *Virology* 186:628-639.
70. Hiraiwa, A., Kimono, T., Segawa, K., et al. 1993. Comparative study on E6 and E7 genes of some cutaneous and genital papillomaviruses of human origin for their ability to transform 3Y1 cells. *Virology* 192:102-111.
71. Muller-Schiffmann, A., Beckmann, J., Steger, G. 2006. The E6 protein of the cutaneous human papillomavirus type 8 can stimulate the viral early and late promoters by distinct mechanisms. *J. Virol.* 80:8718-8728.
72. Steger, G., Pfister, H. 1992. *In vitro* expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. *Arch. Virol.* 125:355-360.
73. Kimono, T., Hiraiwa, A., Ishii, S., Takahashi, T., Ishibashi, M. 1994. Inhibition of p53-mediated transactivation by E6 of type 1, but not type 5, 8, or 47, human papillomavirus of cutaneous origin. *J. Virol.* 68:4656-4661.
74. Elbel, M., Carl, S., Spaderna, S., Iftner, T. 1997. A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology* 239:132-149.
75. Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., Storey, A. 2000. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* 14:3065-3073.
76. Jackson, S., Ghali, L., Harwood, C., Storey, A. 2002. Reduced apoptotic levels in squamous but not basal cell carcinomas correlates with detection of cutaneous human papillomavirus. *Br. J. Cancer* 87:319-323.
77. Nishikawa, T., Yamashita, T., Yamada, T., et al. 1991. Tumorigenic transformation of primary rat embryonal fibroblasts by human papillomavirus type 8 E7 gene in collaboration with the activated H-ras gene. *Jpn. J. Cancer Res.* 82:1340-1343.
78. Yamashita, T., Segawa, K., Fujinaga, Y., Nishikawa, T., Fujinaga, K. 1993. Biological and biochemical activity of E7 genes of the cutaneous human papillomavirus type 5 and 8. *Oncogene* 8:2433-2441.
79. Schmitt, A., Harry, J.B., Rapp, B., Wettstein, F.O., Iftner, T. 1994. Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J. Virol.* 68:7051-7059.
80. Hiraiwa, A., Kimono, T., Suzuki, S., Ohashi, M., Ishibashi, M. 1996. E7 proteins of four groups of human papillomaviruses, irrespective of their tissue tropism or cancer association, possess the ability to transactivate transcriptional promoters E2F site dependently. *Virus Genes* 12:27-35.
81. Akgul, B., Garcia-Escudero, R., Ghali, L., et al. 2005. The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res.* 65:2216-2223.
82. Mendoza, J.A., Jacob, Y., Cassonnet, P., Favre, M. 2006. Human papillomavirus type 5 E6 oncoprotein represses the transforming growth factor beta signaling pathway by binding to SMAD3. *J. Virol.* 80:12420-12424.
83. Massagué, J., Seoane, J., Wotton, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19:2783-2810.
84. Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. 1999. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 80:827-841.