

II. Mecanismos moleculares en cáncer cérvico-uterino. Influencia de oncogenes virales, celulares y anti-oncogenes

Patricio Gariglio

CISEI-INSP, Departamento de Genética Microbiana, Cuernavaca, Mor.

(Recibido, diciembre 15, 1992; aceptado, febrero 2, 1993)

Resumen

El cáncer cérvico-uterino constituye un serio problema de salud pública. La transformación maligna es consecuencia de la expresión anormal de genes dañados a nivel de DNA. Elementos genéticos, tales como oncogenes, anti-oncogenes y virus oncogénicos, están involucrados en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino y su estudio puede contribuir al diagnóstico, pronóstico y terapia del cáncer.

Palabras clave: Cáncer-Oncogenes-Anti-oncogenes-Papilomavirus

Summary

Uterine-cervix carcinoma represents a serious public health problem. Malignant transformation is consequence of the abnormal expression of genes that have been damaged at the DNA level. Genetic elements such as oncogenes, anti-oncogenes, and viruses are central to the development of uterine-cervix carcinomas and their study might contribute to diagnosis, prognosis, and therapy of cancer.

Key words: Cancer-Oncogenes-Anti-oncogenes-HPV

El cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte entre la población mexicana. El carcinoma cérvico-uterino (CaCU) es la causa más frecuente de mortalidad por cáncer en los países en desarrollo. En México, aproximadamente el 30% de los tumores malignos de la mujer son CaCU, por lo que éste representa un serio problema de salud pública. Por razones obvias, representa además un problema socioeconómico. En la mayoría de los cánceres humanos intervienen distintos factores, muchos de ellos medioambientales, que contribuyen al desarrollo de las neoplasias. Estos factores causan alteraciones de los proto-oncogenes y de los anti-oncogenes celulares. En algunos cánceres humanos intervienen además virus oncogénicos¹.

Genes celulares y cáncer humano. La familia de los proto-oncogenes está formada por unos 60 genes, altamente conservados en la evolución. Estos genes desempeñan funciones muy importantes en el crecimiento y proliferación de las células^{2,3}. Las proteínas codificadas por estos genes realizan

funciones específicas. Algunas actúan como factores de crecimiento (por ejemplo el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, o PDGF) y otras como receptores a factores de crecimiento (como el receptor al factor de crecimiento epidérmico o EGFr). La mayoría de los receptores a factores de crecimiento y hormonas actúan en la superficie celular, pero algunos son receptores intracelulares, como el receptor a la hormona tiroidea. Este receptor al unirse a la hormona actúa dentro del núcleo celular como factor de transcripción; es decir, activa ciertos genes y posiblemente reprime otros. Un tercer grupo de proteínas tiene actividad de cinasa y, de acuerdo al aminoácido que fosforilan en distintas proteínas, se les clasifica como tirosina cinasas (src, yes, fes, abl, met) o como serina/treonina cinasas (mos, raf). Además, en este grupo encontramos a los miembros de la familia ras (Ha-ras, N-ras). Estas proteínas se unen a GTP al activarse; luego, en presencia de la proteína GAP (proteína activadora de GTPasa), hidrolizan al GTP y regresan al estado inactivo. Finalmente, existen proteínas proto-oncogénicas (myc, myb, fos, jun) que

actúan como factores de transcripción dentro del núcleo de la célula. El aumento en la expresión de estos protooncogenes puede favorecer la activación de una serie de genes que participan en el crecimiento y la proliferación de las células. Por ejemplo, las proteínas *jun* y *fos* se asocian y forman un complejo conocido como AP1, el cual se une a una secuencia específica (TGAGTCA) en la región promotora de muchos genes, activándolos.

Los oncogenes celulares son proto-oncogenes alterados. Una gran variedad de productos medioambientales, con los cuales estamos en contacto diariamente (asfalto, tabaco, radiaciones, etcétera), son carcinogénicos. Estos productos alteran molecularmente el DNA, lo cual puede llevar a una activación de los proto-oncogenes, transformándolos en oncogenes. Entre las alteraciones importantes de los proto-oncogenes podemos citar: mutación, amplificación y rearrreglo génico. La amplificación génica es muy común en células tumorales; así, el gen *myc* está amplificado en muchos tumores y líneas tumorales humanas, incluyendo leucemias, cáncer mamario y CaCu⁴⁻⁶. También existen líneas celulares que llevan múltiples copias del proto-oncogén *abl* o de *ras*, y se ha determinado que tanto *myc* como *ras* pueden estar amplificados en una misma línea tumoral. En estos casos el aumento en la concentración celular de ARNm de los oncogenes se debe, probablemente, a que aumenta el número de genes que pueden ser transcritos en cierto tejido neoplásico. El resultado final de este mecanismo es un aumento en la cantidad tanto de ARNm como de la proteína oncogénica. En muchos casos, las células cancerosas presentan un rearrreglo molecular de los oncogenes acompañado de una translocación cromosómica; es decir, un segmento de DNA cercano a la punta de un cromosoma pasa a formar parte de otro cromosoma. Por ejemplo, en el linfoma de Burkitt, que es un cáncer humano del tejido linfoide, encontramos el fenómeno de transformación maligna asociado a dichas translocaciones cromosómicas. En este caso, es el gen *myc* el que se encuentra translocado en forma recíproca (8:14) con el gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. La expresión del gen *myc* aumenta como resultado del rearrreglo génico, probablemente a causa de que está controlado por nuevos elementos regulatorios de la transcripción en el cromosoma al cual se transfirió⁷. Es importante mencionar que el gen *c-myc* se puede translocar intacto (con sus tres exones) o, bien, parcialmente (con sus exones 2 y 3). Además, es fácil imaginar que *c-myc* puede sufrir rearrreglos moleculares sin necesidad de translocación

cromosómica. Al igual que en el caso anterior (amplificación génica), un rearrreglo del gen *c-myc* puede llevar a un aumento en el número de transcritos del oncogén; esto se puede lograr como resultado de una falla en la regulación de la transcripción o de una estabilidad aumentada de los ARNm⁸. En algunos casos, los proto-oncogenes sufren mutaciones puntuales, la cantidad de proteína es normal pero con algún aminoácido diferente; por ejemplo, varios laboratorios han encontrado en el oncogén *ras*, aislado de tumores humanos, una diferencia de sólo un nucleótido; generalmente en el codón número 12, comparado con la secuencia del proto-oncogén correspondiente⁹. Esta alteración en el aminoácido 12 reduce fuertemente la actividad GTPásica de la proteína celular GAP ("GTPase activating protein"), que normalmente promueve la hidrólisis de *ras*-GTP a *ras*-GDP¹⁰, y así el complejo *ras*-GTP permanece activado enviando señales para que la célula continúe creciendo.

Comparativamente con genes *Ha-ras* transformantes, el oncogén *Ki-ras* ha sido detectado en un número mucho más alto de neoplasias humanas. Por ejemplo, el grupo de M. Barbacid¹¹ ha probado la capacidad del DNA de 96 tumores humanos para transformar células en cultivo y sólo el carcinoma de vejiga T24 presentó una mutación en el locus *Ha-ras*, en tanto que el gen *Ki-ras* estaba alterado en 8 carcinomas diferentes. En estos estudios se ha visto que en el 90% de los tumores malignos de páncreas *ras* se encuentra mutado; en todos estos carcinomas se encontró que mutaciones puntuales en el codón 12 del locus de *Ki-ras* crean polimorfismo a enzimas de restricción¹², lo cual puede tener implicaciones importantes en el diagnóstico y pronóstico de algunas neoplasias.

Para generar un tumor, debe activarse más de un oncogén¹³. El grupo de Weinberg ha encontrado que ciertos oncogenes pueden complementar a otros cuando se usan pruebas de transfección de cultivos primarios de células. Asimismo, la cooperación entre oncogenes ha sido demostrada en animales transgénicos¹⁴. Ya mencionamos que algunos tumores humanos tienen amplificados los oncogenes *myc* y *ras* pertenecientes a dos familias diferentes de complementación. Este tipo de estudios confirman, a un nivel molecular, la evidencia clínica y los estudios de células y tejidos tumorales que indican que la carcinogénesis es un proceso de etapas múltiples. Esto podría explicar también el hecho de que, en general, un tumor tarda años en desarrollarse y que los cánceres más comunes tienen lugar en tejidos de

rápida proliferación como paredes intestinales, tejido pulmonar, cutáneo o cérvico uterino. En cáncer de colon se ha observado que al menos 5 genes deben estar mutados (oncogenes y anti-oncogenes) para que se desarrolle un tumor maligno¹⁵. Además de los oncogenes celulares, existen oncogenes en el genoma de algunos virus que se han asociado con cáncer en humanos; en particular algunos tipos de papilomavirus humanos (PVHs) (ver más adelante).

Es evidente que en la década pasada los oncogenes celulares han atraído la atención de los biólogos que intentan entender el funcionamiento de una célula y los orígenes moleculares del cáncer. En la década presente, un segundo grupo de genes, los anti-oncogenes (o genes supresores de tumores), están también enseñándonos aspectos de gran importancia acerca de los mecanismos moleculares del cáncer humano.

Un tipo frecuente de alteración genética que ocurre durante el desarrollo de un tumor es la inactivación o pérdida de función de uno o más anti-oncogenes. Se piensa que estos genes juegan un papel regulatorio negativo en el control de la proliferación celular. Entre los anti-oncogenes más estudiados podemos citar a los que codifican las proteínas pRB (retinoblastoma) y p53. El gen RB, localizado en el cromosoma 13q14, codifica una fosfoproteína nuclear de 105 kd. Al parecer, la forma fosforilada de pRB es inactiva y la forma desfosforilada inhibe la transcripción de genes importantes en crecimiento celular, tales como myc y fos¹⁶. Se ha demostrado que el gen RB suprime el fenotipo transformado en células derivadas de varios cánceres (osteosarcoma, retinoblastoma y carcinoma de próstata) que presentan genes RB inactivados. El gen p53 está localizado en la posición p12-p13 del cromosoma 17. La proteína p53 silvestre es anti-oncogénica, en tanto que la proteína p53 mutada favorece el crecimiento celular, aún en presencia de la proteína silvestre. Esto se explica porque la forma mutada es bastante más estable que la forma silvestre y se acumula en la célula; además, ambas formas se combinan formando hetero-oligómeros posiblemente inactivos. Se pueden heredar alelos mutados de p53, los cuales confieren predisposición a cáncer entre los descendientes. Los integrantes de familias afectadas por el síndrome de Li-Fraumeni muestran tumores mamarios, de cerebro, pulmón, laringe, colon, melanomas y leucemias. Las mutaciones somáticas de p53 están involucradas en la mayoría de los cánceres humanos y el gen que se encuentra más frecuentemente mutado en dichos cánceres es p53. Existen al menos 30 codones diferentes que pueden

ser mutados en p53 para favorecer el desarrollo de un carcinoma. Al igual que pRB, la proteína p53 puede intervenir en la regulación de la transcripción de muchos genes ya que tiene un dominio de activación transcripcional y otro que reconoce preferencialmente a ciertas secuencias de DNA¹⁶. Es posible que tanto p53 como pRB sean proteínas involucradas en la replicación y que además regulen la transcripción de una serie de genes relacionados con división celular o diferenciación. Una disminución en la síntesis o en la actividad de estas proteínas anti-oncogénicas podría facilitar el desarrollo de CaCU (ver más adelante).

Participación de PVH en cáncer cérvico-uterino. Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que un agente transmitido sexualmente está involucrado en CaCU y que este agente posee un largo período de latencia (20-25 años). Inicialmente se pensó que este agente podría ser el virus herpes simplex tipo 2 pero posteriormente esta hipótesis fue descartada¹⁷. Una de las primeras evidencias que sugirieron que la infección por PVH juega un papel en el CaCU fue el reconocimiento de que las anomalías morfológicas encontradas en la displasia cervical (llamada también neoplasia intraepitelial cervical) se deben al efecto citopático causado por infección con PVH¹⁸. En aproximadamente 50% de las displasias cervicales examinadas se han encontrado proteínas de cápside de PVH en el núcleo de algunas células, indicando nuevamente al PVH como agente etiológico de dichas lesiones. Un tercer tipo de evidencia que implica al PVH como uno de los agentes causales de CaCU se obtuvo cuando se clonó el DNA del PVH-16 y del PVH-18 a partir de carcinomas cervicales^{19,20}. Posteriormente, usando estos dos tipos de DNA viral, se demostró que, en algunos países, aproximadamente el 70% de los CaCU contienen estos genomas. Es de gran interés remarcar que la incidencia de cada tipo de PVH en CaCU varía en distintos países, encontrándose para PVH-16 y PVH-18 porcentajes que varían entre el 5 y el 67% de los tumores analizados²¹.

Se han descrito 65 tipos diferentes de PVH; unos 20 de estos PVHs se asocian con lesiones anogenitales. Con base en la frecuencia con que una lesión genital progresa a carcinoma maligno, los PVHs presentes en estas lesiones se han clasificado como de bajo o alto riesgo. Aquellos de bajo riesgo, como el PVH-6 y PVH-11, son frecuentes en verrugas genitales o condiloma acuminata, que muy rara vez progresan a neoplasia. Por el contrario, los PVHs de alto riesgo, tales como PVH-16 y PVH-18, se asocian con

neoplasia intraepitelial cervical, que puede progresar a malignidad. En este momento podemos clasificar a los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 y 56 de PVHs como de alto riesgo. En un estudio reciente se determinó que el 84% de los carcinomas cervicales poseen DNA de los PVHs de alto riesgo²². Generalmente, el DNA viral se encuentra integrado al DNA celular en CaCU y en líneas celulares derivadas de CaCU; hay algunos reportes que indican que el DNA de PVH puede también existir en estado episomal (extracromosomal) en CaCU. El DNA de PVH se encuentra en estado episomal en lesiones premalignas. Es necesario mencionar que, en aquellos casos en que el DNA viral se encuentra integrado, el patrón de integración es clonal, indicando que la asociación del PVH precede el crecimiento clonal del tumor. Al parecer la integración ocurre al azar en los cromosomas de la célula huésped, ya que el genoma viral puede encontrarse en distintos sitios cuando se estudian diferentes carcinomas y líneas celulares derivadas de CaCU. Sin embargo, en algunas líneas celulares la integración del DNA viral ocurre cerca de protooncogenes. Por ejemplo, en la línea celular HeLa, la integración del genoma del PVH-18 tiene lugar a 50 kilobases del proto-oncogén *c-myc* en el cromosoma 8²³. En México, se ha observado que, en algunos tumores, el genoma del PVH-16 está integrado muy cerca o dentro del oncogén *c-myc*, el cual está frecuentemente alterado en CaCU^{5,21}. Esto puede dar una ventaja selectiva en la progresión de una lesión preneoplásica a CaCU.

En cuanto al sitio en que se rompe el DNA de PVH durante la integración, podemos decir que el rompimiento ocurre, en general, en la región E1/E2 del genoma viral (Fig. 1), bloqueando la expresión de la proteína viral transregulatoria E2. La proteína E2 se une al DNA de la región regulatoria de PVH (región RLC en la Fig. 1) en la secuencia ACCG(4N)CGGT y actúa regulando positiva o negativamente la expresión del genoma viral. En el caso del PVH-16 y del PVH-18, E2 actúa fundamentalmente como represor de la región promotora que controla la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7^{24,25}. En CaCU, y en líneas celulares derivadas de CaCU, se expresan los oncogenes virales E6 y E7²⁶⁻²⁸; esto es debido posiblemente a la ausencia del represor E2 por ruptura de dicho gen durante la integración del genoma viral. Es decir, la integración del DNA de PVH en CaCU proporciona una ventaja selectiva que lleva a la proliferación descontrolada de las células debido a la expresión desregulada de los genes E6 y E7.

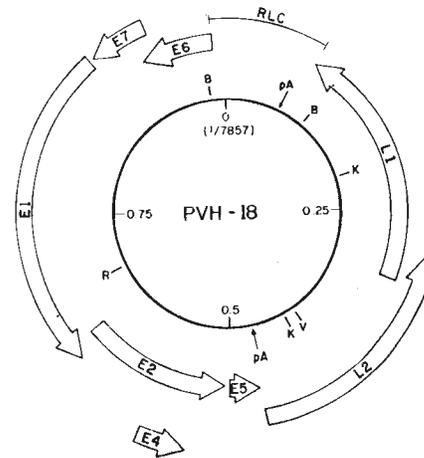


Fig. 1. Mapa genético del papilomavirus humano tipo 18 (PVH 18). El genoma circular de DNA de doble cadena contiene 7857 pb. La localización de los marcos abiertos de lectura se obtuvo de la secuencia completa del genoma. RLC, región larga de control; pA, señal de poliadenilación. Se ilustran algunos sitios de restricción relevantes; B, BamHI; R, EcoRI; K, KpnI; V, EcoRV.

En cuanto al mecanismo de represión causado por E2 en la región promotora de E6 y E7, nuestro grupo reportó recientemente²⁹ que la distancia entre el sitio de unión a E2 y el sitio de unión al factor transcripcional TFIID (caja TATA) juega un papel muy importante en dicha represión. Además, observamos una clara diferencia en la posición de los sitios E2 en PVHs cutáneos y genitales, que podría explicar parcialmente la presión selectiva para que se integre el genoma de los PVH genitales en CaCU.

La expresión de E6 y E7 contribuye al fenotipo de crecimiento proliferativo de las células de CaCU; el bloqueo en la expresión de E6 y E7 por oligonucleótidos antisentido inhibe la proliferación de las células C4-1, una línea de CaCU positiva para el PVH-18³⁰. Los genes E6 y E7 de los PVHs de alto riesgo son transformantes, contrario a lo observado para los PVH de bajo riesgo. Estos genes, cuando provienen de PVH de alto riesgo y se expresan juntos, pueden inmortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos³¹⁻³³.

La proteína E7 del PVH-16 posee solamente 98 aminoácidos; es una fosfoproteína que se une a zinc y que puede ser fosforilada por cascina cinasa II en serinas. Se expresa en displasias cervicales benignas, en CaCU y en líneas celulares derivadas de CaCU. Al igual que la oncoproteína E1A de adenovirus, E7 es capaz de transactivar el promotor E2 de adenovirus³⁴. La oncoproteína E7 puede transformar células de roedores establecidas tales como NIH 3T3. Además, coopera con el oncogén *ras* activado para transformar

completamente a células de riñón de rata o a fibroblastos de rata.

Las oncoproteínas codificadas por virus tumorales, cuyo genoma es de DNA (E7 de los PVHs oncogénicos genitales, E1A de adenovirus, antígeno T grande de SV40) se localizan en el núcleo celular, aumentan la expectativa de vida de células primarias, cooperan con ras, inducen síntesis de DNA en células en reposo, transforman células de roedores ya establecidas y modulan la transcripción de ciertos promotores³⁵. Además, estas proteínas comparten regiones conservadas de aminoácidos que interactúan con proteínas celulares importantes, tales como las proteínas anti-oncogénicas pRB (retinoblastoma)³⁶ y p53 (Cuadro 1). Es interesante señalar que las proteínas E7 de los PVHs de bajo riesgo se asocian con pRB pero su afinidad es 10 veces menor que la que presentan las proteínas E7 de los PVHs de alto riesgo.

CUADRO 1. Interacción de las proteínas pRB y p53 con las oncoproteínas de los virus tumorales que contienen DNA como genoma.

Oncoproteína	Función	Unión al producto del anti-oncogén
Antígeno T grande de SV40 (aa 1-120)	Inmortaliza células REF, transforma células de murino 10T, actividad trans activadora	RB
Antígeno T grande de SV40 (aa 272-625)	Transforma células REF-52, ATPasa, helicasa, une DNA polimerasa α	p53
Proteína Adeno-5 E1A de	Inmortaliza células en cultivo, actividad transactivadora	RB
Proteína Adeno-5 E1B de	Transforma células	p53
Proteína PVH-16 E7 del	Transforma células con E6, actividad transactivadora	RB
Proteína PVH-16 E6 del	Transforma células con E7	p53

SV40: virus de simio 40

REF: fibroblastos de embrión de ratón

RB: retinoblastoma

La proteína E6 de los PVHs de alto riesgo también tiene propiedades transformantes. La asociación de la proteína E6 de los PVHs de alto riesgo (pero no de los de bajo riesgo) con p53 se demostró usando E6 y p53 humana sintetizada *in vitro* en extractos de reticulocitos de conejo³⁷. Posteriormente se descubrió que la proteína E6 codificada por PVHs oncogénicos estimula la degradación de p53 en dichos extractos³⁸. Este hallazgo explicaría la observación que indica que en CaCU positivos para PVH y en células transformadas por PVH existe un nivel muy bajo de p53. Por ejemplo, en células HeLa no se detecta p53 a pesar de que poseen mRNA adecuado para traducción³⁹. Por el contrario, en células transformadas por SV40 o por adenovirus, el nivel de p53 aumenta debido a una mayor vida media de la proteína⁴⁰. En este caso, es posible que la función supresora de p53 esté bloqueada. Por lo tanto, la función del antígeno T grande de SV40 y de la proteína E1B de adenovirus es semejante a la de las proteínas p53 mutadas transdominantes, ya que todas ellas forman un complejo con la proteína p53 silvestre, inactivando su función supresora de tumor. Es decir, el blanco de acción de las proteínas oncogénicas virales es el mismo (p53) y las consecuencias de la interacción proteína-proteína son similares, a pesar de que en un caso aumente y en otro disminuya la vida media de p53. Es posible que, además de p53 y RB, otros anti-oncogenes jueguen un papel importante en CaCU. Algunos estudios citogenéticos sugieren que las alteraciones en el brazo corto del cromosoma 3 están asociadas con progresión neoplásica en CaCU positivos para PVH⁴¹.

Por otro lado, es importante mencionar que los cánceres cervicales más agresivos son aquellos que no contienen DNA de PVH⁴² y que dichos carcinomas presentan alteraciones en anti-oncogenes. Recientemente se reportó que en tumores de CaCU que llevan PVH oncogénico el gen para p53 está normal, en tanto que en aquellos que no tienen secuencias de PVH de alto riesgo se presentan mutaciones en regiones altamente conservadas de p53^{43,44}.

Nuestro grupo de trabajo hizo resaltar hace algún tiempo la importancia de alteraciones en genes celulares en CaCU, específicamente en el oncogén c-myc(5). Además, nos ha llamado la atención que en México se encuentran secuencias de los PVH de alto riesgo (tipo 16 y 18) en sólo el 50% de los tumores de CaCU^{21,45}. Con fundamento en estos resultados, y en otros de nuestro laboratorio^{29,46}, seguiremos estudiando los factores virales (regulación de la

expresión de E6 y E7) y celulares (expresión de oncogenes y anti-oncogenes) implicados en el desarrollo del CaCU.

Evidentemente, los PVHs juegan un papel importante en el desarrollo de gran cantidad de casos de cáncer genital humano. La progresión de las lesiones tempranas hacia carcinomas depende, probablemente, de factores adicionales tales como hormonas, carcinógenos químicos y físicos, dieta, estadio de diferenciación de los epitelios y sistema inmune. Respecto a esto último, es importante tomar en cuenta que sólo un cierto porcentaje de las lesiones que contienen PVH de alto riesgo progresan a CaCU, siendo muchas de ellas reversibles, y que los períodos de latencia son extremadamente largos. Dichas lesiones avanzan o revierten de acuerdo con el estado del sistema inmune del paciente.

Referencias

- 1.- Gariglio P, Rangel LM. Virus y cáncer. *Salud Pública de México* 1992;34:308-17.
- 2.- Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987;235:305-11.
- 3.- Hunter T. The proteins of oncogenes. *Scientific American* 1984;251:70-9.
- 4.- Nowell PC, Finan J, Dalla-Favera R, et al. Association of amplified oncogene c-myc with abnormally banded chromosome 8 in a human leukemia cell line. *Nature* 1983;306:494-8.
- 5.- Ocadiz R, Saucedo R, Cruz M, Graef AM, Gariglio P. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and uterine cervix carcinoma. *Cancer Res* 1987;47:4173-7.
- 6.- Bonilla M, Ramírez M, López J, Gariglio P. In vivo amplification and rearrangement of the c-myc oncogene in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:665-71.
- 7.- Hayday A, Gillies S, Saito H, et al. Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy chain-locus. *Nature* 1984;307:334-7.
- 8.- Gariglio P, del Angel R, Herrera A, Bonilla M. Theoretical model for the post-transcriptional regulation of the human c-myc gene expression, involving double-stranded RNA processing. *J Theoret Biology* 1986;125:83-92.
- 9.- Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982;300:149-51.
- 10.- Trahey M, McCormick F. A cytoplasmic protein regulates GTPase of normal N-ras p21, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 1987;238:542-5.
- 11.- Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long ID, Aaronson SA, Barbacid M. Oncogenes in solid human tumors. *Nature* 1982;300:539-41.
- 12.- Santos F, Martin Zanca EP, Pierotti MA, Della-Porta G, Barbacid M. Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* 1984;223:661-5.
- 13.- Land H, Parada LF, Weinberg RA. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 1983;222:771-3.
- 14.- Sinn E, Muller W, Pattengale P, Tepler I, Wallace R, Leder P. Coexpression of MMIV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 1987;49:465-75.
- 15.- Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
- 16.- Weinberg R. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254:1138-46.
- 17.- Vonka V, Kanda J, Hirsch I, et al. Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type-2 virus. II. Herpes simplex type-2 antibody presence in sera taken at enrollment. *Int J Cancer* 1984;33:61-6.
- 18.- Meisels A, Fortin R. Condilomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976;20:505-9.
- 19.- Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3812-5.

- 20.- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984;3:1151-7.
- 21.- Gariglio P, Ocádiz R, Saucedo R. Human papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. En: Steinberg B, Brandsma J and Taichman L. eds. Papillomaviruses 5. Cancer Cells. CSH New York, 1987 43-7.
- 22.- Riou G, Favre AM, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet* 1990;1171-4.
- 23.- Durst M, Croce C, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1070-4.
- 24.- Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J* 1987;6:3391-7.
- 25.- Bernard B, Bailly C, Lenoir M, Darmon M, Thierry F, Yaniv M. the human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989;62:2994-3002.
- 26.- Baker C, Phelps W, Lindgren V, Braun M, Gonda M, Howley P. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987;61:962-71.
- 27.- Schneider A, Schwartz E. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription pattern of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* 1986;5:2285-92.
- 28.- Smotkin D, Wettstein F. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and cancer-derived cell lines and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4680-4.
- 29.- Gido M, Zamorano R, Garrido E, Gariglio P, Garcia A. Early promoters of genital and cutaneous HPVs are differentially regulated by the BPV-1 E2 gene product. *J General Virol* 1992;73:1395-400
- 30.- Von Knevel M, Oltersdorf T, Schwarz E, Gissmann L. Correlation to modified human papillomavirus early gene expression with altered growth properties in C4-I cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 1988;48:3780-6.
- 31.- Munger K, Phelps W, Bubb V, Howley P, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989;63:4417-21.
- 32.- Howley P, Vousden K, Hubbert N, Lowry D, Schiller J. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989;8:3905-14.
- 33.- Barbosa M, Vass W, Lowy D, Schiller J. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among HPVs of different oncogenic potential. *J Virol* 1991;65:292-8.
- 34.- Phelps W, Yee C, Munger K, Howley P. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to adenovirus E1a. *Cell* 1988;53:539-47.
- 35.- Ruley H. Transforming collaborations between ras and nuclear oncogenes. *Cancer Cells* 1990;2:258-68.
- 36.- Munger K, Werness B, Dyson N, Phelps W, Howley P. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989;8:4099-108.
- 37.- Werness B, Levine A, Howley P. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-9.
- 38.- Scheffner M, Werness B, Huibregtse J, Levine A, Howley P. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63:1129-36.
- 39.- Matlashewski G, Banks L, Pim D, Crawford L. Analysis of human p53 proteins and mRNA levels in normal and transformed cells. *Eur J Biochem* 1986;154:665-72.
- 40.- Reich N, Oren M, Levine A. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen. *Mol Cell Biol* 1983;3:2143-50.
- 41.- Yokota J, Tsukada y Najajima T, et al. Loss of the heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1989;49:3598-601.
- 42.- Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Doussal V, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive carcinomas and non-detection of HPV DNA. *The Lancet* 1990;1171-4.
- 43.- Scheffner M, Munger K, Birner J, Howley P. The state of the p53 and Retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5523-7.
- 44.- Crook T, Wrede D, Vousden K. p53 point mutations in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* 1991;6:873-5.
- 45.- Gonzalez M, Barrera H, Aviles L, Alvarez L, Gariglio P. A comparative study of the prevalence of human papillomavirus DNA sequences in cervical cancer from two mexican populations. *Revista de Investigación Clínica I.N.N. En prensa, septiembre 1992.*
- 46.- García A, Alvarez L, Bravo C, Yaniv M, Gariglio P. A nuclear factor from epithelial cells binds to a conserved TTGGCTT motifs on the long control region of HPV18. P. Howley, ed. *Papillomaviruses*. Wiley-Liss, Inc. 1990;445-54.