

ROL DE LOS VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN LA CARCINOGENESIS

Raffaella Ghittoni¹, Rosita Accardi², Susanna Chiocca³, Massimo Tommasino²

¹ Departamento de Ciencias Biológicas, Biología Molecular y Computacional, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, USA.

² Grupo de Infecciones y Biología del Cáncer, Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, 150 cours Albert Thomas, 69008 Lyon, Francia.

³ IFOM-IEO Campus, Via Adamello 16, 20139 Milán, Italia.

Dirigir correspondencia a: Massimo Tommasino. Email: tommasino@iarc.fr. Tel: +33

472 738 190

Resumen:

La familia del virus del papiloma humano (VPH) comprende más de 170 tipos distintos que infectan preferentemente la mucosa del tracto genital o las vías aéreas superiores o la piel. El "tipo VPH de alto riesgo", un sub-grupo de VPH mucosales, es la causa de aproximadamente 5% de todos los cánceres humanos, lo que corresponde a un tercio de todos los tumores inducidos por virus. Dentro del grupo de alto riesgo, VPH 16 es el tipo más oncogénico, siendo responsable de aproximadamente 50% de todos los cánceres cervicales en el mundo. Muchos estudios sugieren que, además de los tipos VPH mucosales de alto riesgo, ciertos VPH cutáneos también juegan un rol en el desarrollo del cáncer de piel no-melanoma (NMSC).

Estudios funcionales sobre los productos genéticos tempranos del VPH mostraron que las E6 y E7 juegan un rol en la carcinogénesis. Estas dos proteínas utilizan múltiples mecanismos para evadir la vigilancia inmunológica del anfitrión, permitiendo la persistencia del virus, y la desregulación del ciclo celular y control de la apoptosis, facilitando así la acumulación de daño del ADN y finalmente la transformación celular.

La demostración de que los tipos de VPH de alto riesgo son agentes etiológicos del cáncer cervical permitió la implementación en la rutina clínica de nuevas estrategias de detección para las lesiones cervicales, y el desarrollo de una vacuna profiláctica altamente efectiva. Debido a estos logros extraordinarios, no existen dudas de que en las próximas décadas seremos testigos de una dramática reducción en la incidencia del cáncer a nivel mundial.

Palabras clave: virus del papiloma, carcinogénesis, vacunas contra el VPH

1. Miembros de la familia del virus del papiloma humano y sus implicancias clínicas

Los virus del papiloma humano (VPH) consisten de un grupo heterogéneo de virus con ADN de doble cadena envueltos en su cápside de la familia Papillomaviridae que despliegan un tropismo marcado por el epitelio escamoso de la mucosa o piel. Hasta ahora, se han aislado y caracterizado más de 170 tipos de VPH [1].

Basado en la secuencia de nucleósidos homólogos de la proteína cápside mayor L1, el árbol filogenético del VPH ha sido generado que existen distintos tipos de VPH en general [1,2]. El género alfa consiste de aproximadamente 30 tipos de VPH que infectan la mucosa del tracto genital y varios tipos de VPH cutáneos, como el VPH2, responsable por las verrugas comunes de piel. Existen dos grupos de tipos de VPH mucosal: VPH de bajo riesgo (por ejemplo los tipos 6 y 11), que están principalmente asociados a las verrugas genitales benignas, y los VPH de alto riesgo, que son los agentes etiológicos del cáncer cervical y un subgrupo de otros cánceres en humanos (ver a continuación) [3]. Un grupo grande de tipos de VPH cutáneos constituye el género beta y se sospecha que están involucrados, junto con la radiación UV, en el desarrollo del cáncer de piel no-melanoma (NMSC) [4,6]. Los otros géneros, gama, mu y nu comprenden los tipos de VPH cutáneos que normalmente se relacionan con el desarrollo de los papilomas y verrugas cutáneos.

Si bien la participación del VPH en la producción de verrugas benignas ya se conocía, la primera evidencia de asociación entre el cáncer humano y ciertos tipos de VPH fue propuesta hace treinta años por zur Hausen y colegas [7]. Estudios biológicos y epidemiológicos posteriores confirmaron el rol directo de varios tipos de VPH

mucosales en el desarrollo de cáncer cervical y otros tumores epiteliales [8-10]. Estudios epidemiológicos a nivel mundial indican que los 18 tipos distintos de VPH de alto riesgo, a saber 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82, se asocian con el cáncer cervical [9;11]. Dentro de este grupo los tipos VPH 16 y VPH 18 son los más carcinogénicos, siendo responsables de aproximadamente 50% y 20% del cáncer cervical, respectivamente [9;12]. Un subgrupo de cánceres anal, de pene, vulvar, vaginal y de orofaringe ha sido atribuido a infección por virus de VPH de alto riesgo [13;14]. En particular, estos cánceres, en contraste con el cáncer cervical, parecen estar principalmente asociados con el VPH 16, por ejemplo más del 90% de los cánceres de orofaringe VPH positivos [15-17]. (Tabla 1.)

La primera indicación del potencial oncogénico de los tipos de VPH beta surgió de su aislamiento en la piel de pacientes que sufrían de un raro desorden genético denominado *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) [18;19]. Los pacientes con EV tienen un déficit en su sistema inmune y alta susceptibilidad a infecciones cutáneas por VPH diseminadas y persistentes. Como consecuencia, desarrollan extensas verrucosis de varias verrugas confluentes, que en aproximadamente 30-60% de los casos progresa a un carcinoma de células escamosas (CCE) multifocal en las regiones con exposición al sol. Por consiguiente, los receptores de trasplantes de órganos bajo tratamiento inmunosupresor corren 50-100 veces más riesgo de desarrollar cáncer de piel no-melanoma y si piel es altamente positiva para los tipos beta de VPH [20]. Mediante el uso de ensayos diagnósticos más sensibles, en la actualidad está claro que la infección por VPH tipo beta es muy frecuente en la piel de individuos saludables

[21]. Sin embargo, su participación en el desarrollo de NMSC en la población general todavía no ha sido completamente demostrado.

La determinación de la carga viral de VPH beta por CRP cuantitativo reveló que solo una minoría de las células cancerígenas en la piel contenían el ADN viral [21;22]. Una hipótesis plausible es que los tipos VPH juegan un papel en la fase inicial de la carcinogénesis y que no son requeridos en etapas posteriores para el mantenimiento del fenotipo neoplásico. La situación difiere de aquella establecida para los VPH mucosales de alto riesgo en el cáncer cervical, donde la expresión de oncogenes virales se requiere de manera constante durante todo el proceso carcinogénico [7]. Esto puede implicar la necesidad de considerar un nuevo escenario para el rol de los VPH beta en la patogénesis del NMSC, como un mecanismo "atropello con fuga", aunque esto puede hasta cierto punto ser considerado controversial. Se sabe bien que la luz UV es un factor de riesgo para el cáncer de piel [23-25], induciendo un daño irreversible del ADN. Por lo tanto, es probable que los tipos de VPH beta actúen como facilitadores de la acumulación de mutaciones de ADN inducidas por los rayos UV, pero que no son requeridos para el mantenimiento del cáncer.

2. Estrategias de detección para las enfermedades cervicales asociadas al VPH

En las tres últimas décadas, la incidencia del cáncer cervical ha estado disminuyendo constantemente en los países de altos recursos, debido a la introducción de programas nacionales de detección de cáncer cervical. En contraste, en los países de bajos recursos, debido a una falta de programas de detección, el cáncer cervical

continúa siendo un serio problema de salud constituyendo el primer o segundo cáncer en las mujeres [26]. La prueba del Papanicolaou convencional o la citología líquida son los métodos más frecuentemente utilizados en los abordajes de la detección del cáncer cervical y se basan en un análisis morfológico de las células cervicales exfoliadas. El desempeño de estos métodos de detección depende considerablemente del entrenamiento del personal. De hecho, en los países donde la prueba del Papanicolaou no se ha implementado adecuadamente, dicho método de detección puede a menudo llevar a falsos diagnósticos [27;28]. Estudios independientes han indicado que la detección del ADN del VPH, cuando se usa como método de detección primario, tiene mayor sensibilidad y valor predictivo negativo que la prueba convencional del Papanicolaou o los métodos de citología líquida [29-32]. Las pruebas de VPH puede detectar aproximadamente 50% más neoplasia intraepitelial cervical (NIC) que la prueba del Papanicolaou [33]. Además, un estudio reciente en India demostró que el uso de la prueba del ADN del VPH una vez en la vida reduce la mortalidad de cáncer cervical invasivo en aproximadamente el 50% [34]. El valor predictivo negativo para la prueba combinada de VPH y citología es muy alto, lo que es de particular interés para reducir los costos de las pruebas de detección de cáncer cervical [31;35;36]. Un método de tipificación de VPH ampliamente utilizado en estudios clínicos y epidemiológicos es un ensayo comercial de hibridación líquida que no se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el Hybrid Capture 2 (HC2) (Digene) que puede detectar 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 68) y 5 tipos de VPH de bajo riesgo (tipos 6, 11, 42, 43 y 44) [37].

Sin embargo, este método solo puede detectar la presencia de infección por VPH sin revelar el tipo de VPH. Se han desarrollado y comercializado ensayos adicionales para identificar los tipos de VPH presentes en los especímenes cervicales, por ejemplo LINEAR ARRAY HPV Genotyping (Roche Molecular Diagnostics) y INNO-LIPA HPV genotyping (Innogenetics). Una limitación de todos los métodos de detección de VPH es su bajo valor predictivo positivo, no pudiendo discriminar entre infecciones VPH positivas con alteraciones morfológicas de las sin [38]. En efecto, las infecciones por VPH pueden a menudo encontrarse, especialmente en mujeres jóvenes, sin embargo en la mayoría de los casos dichas infecciones no son persistentes y serán disipadas naturalmente por el sistema inmunitario sin inducir lesiones cervicales [39].

Debido a esta limitación de los ensayos de detección del VPH, la interpretación de datos de positividad para el VPH requiere de especial atención y un análisis más extensivo. Ahora está claro que necesitamos considerar marcadores adicionales para mejorar el valor predictivo positivo de los ensayos de detección del VPH. Muchos estudios sugieren que el análisis de la carga viral [40;41], las transcripciones de VPH [42] y/o expresión de genes anfitriones específicos [43] facilitarán la identificación de infecciones por VPH asociadas con lesiones cervicales. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales para corroborar los hallazgos iniciales y desarrollar estrategias que puedan ser adoptadas en los procedimientos clínicos de rutina.

Recientemente, la sobreexpresión de p16^{INK4a} (p16) ha sido descrita como un biomarcador sustituto de la transformación celular inducida por VPH [44]. En este número se reporta otro ejemplo de presunto biomarcador. Específicamente, en las

lesiones de cáncer cervical VPH positivas existe un aumento significativo de la enzima conjugadora de SUMO Ubc9 en biopsias cervicales de NIC2/3 en comparación con la NIC1 y tejidos no infectados (Mattoscio, Casadio et al., en este número).

Notablemente, más temprano este año un panorama de alteraciones genómicas en carcinomas cervicales reveló mutaciones somáticas previamente desconocidas, sugiriendo que próximamente pueden llegar a considerarse nuevas estrategias terapéuticas y/o biomarcadores para la patogénesis y/o tratamiento de esta enfermedad [45].

3. Mecanismos moleculares de la carcinogénesis mediada por VPH

El genoma de todos los tipos de VPH consiste de un filamento de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8kb, y codifica aproximadamente 8 genes. De acuerdo a la expresión de la proteína durante el ciclo viral se han identificado dos regiones de genoma funcional: (i) una región de codificación que contiene los genes tempranos, E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y (ii) una región que contiene dos genes tardíos, las proteínas cápside mayor (L1) y menor (L2). Además, el genoma del VPH tiene una región sin codificación, denominada región de control largo (LCR) que incluye la mayoría de los elementos reguladores involucrados en la replicación y transcripción del ADN viral [46]. Los genes E6 y E7 del VPH están altamente conservados en la mayoría de los tipos VPH identificados hasta ahora, y en el caso de los tipos de VPH asociados con el cáncer, codifican las proteínas transformadoras más importantes. Hasta ahora, la mayoría de los estudios biológicos se han centrado en las E6 y E7 de

los VPH 16 y VPH 18, ya que son los tipos más frecuentemente detectados en los cánceres cervicales en todo el mundo.

La mayoría de las mujeres sexualmente activas son infectadas por tipos de VPH mucosal alguna vez en sus vidas. La mayoría de estas infecciones permanece asintomática y son eliminadas por el sistema inmune en 6 a 18 meses. Sólo en una minoría de mujeres, la infección por VPH persiste y luego de un período de latencia progresa hacia una NIC de bajo y/o alto grado, que todavía puede revertirse o progresar a un carcinoma cervical invasivo [47]. Una expresión notablemente alta del nivel de las oncoproteínas E6 y E7 es un elemento biológico distintivo de los cánceres asociados a VPH. Otro evento recurrente que ocurre durante la progresión hacia el cáncer cervical es la transición del episoma a un genoma integrado, a pesar de que un subgrupo de carcinoma cervicales invasivos VPH16 positivos conserva ADN viral sólo como episomas [48;49]. En varios estudios epidemiológicos, el fumar, los comportamientos sexuales, los anticonceptivos orales y la predisposición genética han sido señalados como factores de riesgo adicional en la progresión de la enfermedad mediada por VPH [10;50-53]. Lo que es más, la deficiencia de la vigilancia inmunitaria parece facilitar el establecimiento de una infección persistente y el desarrollo de una lesión maligna. Las personas trasplantadas o VIH positivas con un estado inmunosuprimido tiene una prevalencia mucho mayor de infecciones por VPH simples o múltiples y lesiones asociadas que las personas saludables [54;55].

Los estudios biológicos se han centrado en los VPH 16 y VPH 18, ya que son los tipos más frecuentemente detectados en los cánceres cervicales en todo el mundo. Estos

estudios han demostrado claramente que las E5, E6 y E7 están directamente involucradas en la promoción de la transformación celular y en la alteración de vías relacionadas con la respuesta inmune, así como la transformación celular [3;56] al atacar varias proteínas celulares. Un ejemplo importante de la interacción de las proteínas virales/celulares es la formación de complejo entre E7 y las proteínas celulares pRb, p107 y p130, conocidas como proteínas bolsillo. Estas proteínas juegan un papel fundamental en la regulación de la división del ciclo celular. En las células inactivas, directamente combinan varios factores de transcripción, incluyendo miembros de la familia E2F (E2F1-5), inhibiendo su actividad. En las células proliferantes, las quinasas dependientes de ciclina (CDK) pasan a estar activas llevando a una fosforilación de la pRb y a la liberación de las formas activas de E2Fs. La proteína E7 del VPH 16 combina la forma hipofosforilada de la pRb promoviendo su degradación vía el sistema ubiquitina-proteasoma y la progresión de las células a la fase S. Por lo tanto la interacción E7 VPH 16/pRb copia la fosforilación mediada por CDK, haciendo que la célula sea independiente de cualquier tipo de control. Recientemente se ha definido este mecanismo de manera más extensa [57].

La actividad más caracterizada de la E6 VPH 16 es su habilidad para degradar la proteína supresora tumoral p53 vía el sistema proteasoma. La p53 es un factor de transcripción que se activa en respuesta a estrés o daño del ADN y positivamente regular la expresión de los genes involucrados en el control de la detención del ciclo celular o apoptosis. La E6 interactúa con una proteína celular 100kFA, E6AP (proteína asociada a la E6), que funciona como una proteína ubiquitina ligasa (E3). El complejo

E6/E6AP luego se combina con la p53, que rápidamente se ubiquitina y, como resultado, se dirige a los proteasomas para su degradación. Debido a que el papel más importante de la p53 es el de proteger la integridad del genoma mediante la inducción de la detención del ciclo celular o apoptosis, las células que expresan la E6 VPH 16 muestran inestabilidad cromosomal, lo que aumenta enormemente la posibilidad de que las células infectadas por VPH progresen hacia la malignidad. Hasta ahora se ha identificado un gran número de blancos celulares de E6 y E7 [57;58]. Muchas de estas proteínas celulares están involucradas en el control de eventos fundamentales, como la proliferación, senescencia, apoptosis, diferenciación y respuesta inmune. De manera similar a la p53 y la pRb, la mayoría de las interacciones de las E6 y E7 con los blancos celulares resultan en la degradación de estos últimos, por ejemplo, la proteína Bak pro-apoptosis y NFX1-91, el regulador transcripcional negativo de hTERT (telomerasa transcriptasa inversa humana). De manera interesante, los análisis comparativos entre los distintos tipos de VPH han llevado a la identificación de propiedades de las E6 y E7 que son específicas para los VPH de alto riesgo [3]. Debido a la complejidad y la amplitud del tema, la biología de las proteínas VPH no será descrita en profundidad en este artículo. Instamos a los lectores a que consulten los más recientes y excelentes análisis sobre los mecanismos moleculares de las proteínas VPH [59;60]. Sin embargo, en la Tabla 2 presentamos un resumen sintético de algunas de las propiedades biológicas de la proteína temprana del VPH.

4. Vacunas contra el virus del papiloma humano

Desde el año 2006 están disponibles comercialmente dos vacunas profilácticas contra el VPH, Gardasil y Cervarix. Se basan en partículas similares a virus (VLPs) ensambladas de la principal proteína cápside recombinante L1 producida en sistemas eucarióticos (Tabla 3). Ambas vacunas contienen VLPs de VPH 16 y VPH 18, que, como se describe anteriormente, son responsables de aproximadamente el 70% de los cánceres cervicales en todo el mundo. Además, Gardasil incluye VLPs de VPH 6 y 11 de bajo riesgo, que está asociado con aproximadamente el 90% de las verrugas genitales. Las dos vacunas también difieren en la composición adyuvante. Gardasil está formulada con aluminio como adyuvante, mientras que Cervarix contiene además el monofosforil lípido A (MPL) (Tabla 3).

Varios ensayos clínicos han evaluado la seguridad y efectividad de estos dos productos durante un período de seguimiento de 7-8 años. Un estudio clínico reciente dirigido a comparar las dos vacunas ha demostrado claramente que hasta ahora los dos productos han mostrado una alta eficacia en la prevención del desarrollo de lesiones cervicales pre-malignas, induciendo una respuesta robusta en individuos inmunizados y proporcionando protección por lo menos por 5 años [54;61;62].

A pesar de que la introducción al mercado de esta primera generación de vacunas contra VPH representa un objetivo clínico importante en la prevención del cáncer, varios aspectos adicionales necesitan resolverse o mejorarse para optimizar la eficacia de la vacuna.

La especificidad de los tipos de VPH representa una de las mayores limitaciones. En efecto, la eficacia de la vacuna se aborda sólo en los tipos de VPH seleccionados sin

una protección cruzada significativa contra los tipos adicionales de VPH oncogénicos. Por lo tanto ambas, Gardasil y Cervarix no cubre 20-30% de los cánceres asociados a VPH. Otro aspecto importante es el costo elevado de estas vacunas, que previene su aplicación extendida en la mayoría de la población humana de bajos a medianos recursos donde el cáncer cervical es altamente predominante. Las modificaciones de la cadena de ensamblaje de las VKLPs basada en protocolos menos costosos están siendo evaluada para reducir los costos de producción. Además, estudios en curso están enfocados en el mejoramiento de la inmunogenicidad de la vacuna evaluando componentes antigénicos nuevos, como adyuvantes y amplificadores del sistema inmune. Esto contribuirá a obtener una protección más prolongada de la infección viral y a reducir la cantidad de vacunas necesarias para una protección completa [63]. Ninguna de las vacunas L1 tiene efecto terapéutico en mujeres ya infectadas. Debido a que en la mayoría de las lesiones cervicales pre-malignas y malignas, las E6 y E7 son sólo genes expresados de VPH, la mayoría de las vacunas se enfocan en la estimulación de una respuesta inmune contra estas dos proteínas virales [64]. Recientemente, se obtuvieron resultados muy alentadores, mediante el uso de un solapamiento de un grupo de péptidos que cubren la totalidad de las secuencias de E6 y E7 VPH 16 en pacientes con neoplasia intraepitelial vulvar de alto grado [65]. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales para evaluar de manera completa la eficacia de las vacunas terapéuticas contra el VPH.

5. Conclusiones

La demostración de estudios biológicos y epidemiológicos de que la infección por VPH de alto riesgo está asociada a la carcinogénesis humana representa un hito muy importante en la investigación del cáncer. El establecimiento de dicha asociación ha llevado al desarrollo de estrategias preventivas eficientes que han tenido y seguirán teniendo un impacto profundo en la salud pública y en el bienestar general al disminuir la incidencia de lesiones cervicales pre-malignas y malignas. Además, los estudios biológicos sobre las proteínas del VPH no sólo aclararon los mecanismos moleculares de las proteínas del VPH, sino que también contribuyeron a nuestro entendimiento de los sistemas celulares fundamentales involucrados en la vida de la célula normal.

Reconocimientos

Deseamos agradecer a nuestro increíble amigo y colega, el Dr Mario Sideri. Fue un excelente médico y científico, querido por sus pacientes y colegas. Tenía una visión verdaderamente equilibrada y amplia y fue un precursor en este campo de la ciencia. Constantemente inspiró a sus pares y siempre tenía una cálida sonrisa para todos. Ciao Mario!

Este trabajo ha sido subvencionado parcialmente por la Comisión Europea, subsidio HPV-AHEAD (FP7-HEALTH-2011-282562)

Reference List

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. (2004) **Classification of papillomaviruses.** *Virology*, **324**, 17-27

2. Bernard HU, Calleja-Macias IE and Dunn ST. (2006) **Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications.** *Int J Cancer*, **118**, 1071-6
3. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, et al. (2010) **The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses.** *Virus Genes*, **40**, 1-13
4. Accardi R, Gheit T. (2014) **Cutaneous HPV and skin cancer.** *Press Med*,
5. Haedicke J, Iftner T. (2013) **Human papillomaviruses and cancer.** *Radiother Oncol*, **108**, 397-402
6. Smola S. (2014) **Human papillomaviruses and skin cancer.** *Adv Exp Med Biol*, **810**, 192-207
7. zur Hausen H. (2002) **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** *Nat Rev Cancer*, **2**, 342-50
8. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. (1995) **Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group [see comments].** *J Natl Cancer Inst*, **87**, 796-802
9. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. (2003) **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.** *N Engl J Med*, **348**, 518-27
10. Schiffman MH, Haley NJ, Felton JS, et al. (1987) **Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: measuring cigarette smoke constituents in the cervix.** *Cancer Res*, **47**, 3886-8
11. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. (2010) **Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study.** *Lancet Oncol*, **11**, 1048-56
12. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. (2007) **Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update.** *Int J Cancer*, **121**, 621-32
13. Tommasino M. (2014) **The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis.** *Semin Cancer Biol*, **26**, 13-21
14. **Human papillomaviruses.** (2007) *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, **90**, 1-636
15. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, et al. (2005) **Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**, 467-75
16. Anantharaman D, Gheit T, Waterboer T, et al. (2013) **Human papillomavirus infections and upper aero-digestive tract cancers: the ARCAGE study.** *J Natl Cancer Inst*, **105**, 536-45

17. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. (2003) **Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study.** *J Natl Cancer Inst*, **95**, 1772-83
18. Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. (1972) **Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis.** *Cancer Res*, **32**, 583-99
19. Lutzner MA. (1978) **Epidermodysplasia verruciformis. An autosomal recessive disease characterized by viral warts and skin cancer. A model for viral oncogenesis.** *Bull Cancer*, **65**, 169-82
20. Euvrard S, Kanitakis J, Faure M, et al. (2001) **Human papillomavirus and skin carcinoma in organ transplants. Recent studies.** *Ann Dermatol Venereol*, **128**, 1252-5
21. Pfister H. (2003) **Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer.** *J Natl Cancer Inst Monogr*, 52-6
22. de Koning MN, Weissenborn SJ, Abeni D, et al. (2009) **Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma.** *J Gen Virol*, **90**, 1611-21
23. Ananthaswamy HN, Loughlin SM, Cox P, et al. (1997) **Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens.** *Nat Med*, **3**, 510-4
24. Armstrong DJ, Roman A. (1992) **Mutagenesis of human papillomavirus types 6 and 16 E7 open reading frames alters the electrophoretic mobility of the expressed proteins.** *J Gen Virol*, **73**, 1275-9
25. Preston DS, Stern RS. (1992) **Nonmelanoma cancers of the skin.** *N Engl J Med*, **327**, 1649-62
26. Parkin DM. (2006) **The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002.** *Int J Cancer*, **118**, 3030-44
27. Cuzick J, Beverley E, Ho L, et al. (1999) **HPV testing in primary screening of older women.** *Br J Cancer*, **81**, 554-8
28. Schneider A, Zahm DM, Kirchmayr R, et al. (1996) **Screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: validity of cytologic study, cervicography, and human papillomavirus detection.** *Am J Obstet Gynecol*, **174**, 1534-41
29. Clavel C, Masure M, Bory JP, et al. (2001) **Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women.** *Br J Cancer*, **84**, 1616-23
30. Cuzick J, Mayrand MH, Ronco G, et al. (2006) **Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening.** *Vaccine*, **24**, S3-90-S3/97

31. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, et al. (2008) **Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study.** *Br Med J*, **337**, 1754
32. Sasieni P, Cuzick J. (2002) **Could HPV testing become the sole primary cervical screening test?** *J Med Screen*, **9**, 49-51
33. Grce M, Davies P. (2008) **Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening.** *Expert Rev Mol Diagn*, **8**, 599-605
34. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, et al. (2009) **HPV screening for cervical cancer in rural India.** *N Engl J Med*, **360**, 1385-94
35. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, et al. (2003) **Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis.** *J Natl Cancer Inst*, **95**, 46-52
36. Hoyer H, Scheungraber C, Kuehne-Heid R, et al. (2005) **Cumulative 5-year diagnoses of CIN2, CIN3 or cervical cancer after concurrent high-risk HPV and cytology testing in a primary screening setting.** *Int J Cancer*, **116**, 136-43
37. Lorincz AT. (1996) **Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening.** *J Obstet Gynaecol Res*, **22**, 629-36
38. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al. (2006) **Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controlled trial.** *Lancet Oncol*, **7**, 547-55
39. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, et al. (2006) **Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening.** *Int J Cancer*, **119**, 1095-101
40. Briolat J, Dalstein V, Saunier M, et al. (2007) **HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN.** *Int J Cancer*, **121**, 2198-204
41. Hesselink AT, Berkhof J, Heideman DA, et al. (2009) **High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer.** *Int J Cancer*, **124**, 381-6
42. Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, et al. (2010) **Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns.** *Cancer Res*, **70**, 249-56
43. Cuschieri K, Wentzensen N. (2008) **Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **17**, 2536-45

44. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, et al. (2010) **The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results.** *Am J Clin Pathol*, **134**, 12-21
45. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, et al. (2014) **Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas.** *Nature*, **506**, 371-5
46. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, et al. (1991) **Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction.** *Biophys J*, **60**, 1445-56
47. Ostör AG. (1993) **Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review.** *Int J Gynecol Pathol*, **12**, 186-92
48. Pett M, Coleman N. (2007) **Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?** *J Pathol*, **212**, 356-67
49. Gray E, Pett MR, Ward D, et al. (2010) **In vitro progression of human papillomavirus 16 episome-associated cervical neoplasia displays fundamental similarities to integrant-associated carcinogenesis.** *Cancer Res*, **70**, 4081-91
50. Moreno V, Munoz N, Bosch FX, et al. (1995) **Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **4**, 459-67
51. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, et al. (2002) **Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study.** *Lancet*, **359**, 1085-92
52. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al. (2002) **Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study.** *Lancet*, **359**, 1093-101
53. Plummer M, Peto J, Franceschi S. (2012) **Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer.** *Int J Cancer*, **130**, 2638-44
54. Einstein MH, Schiller JT, Viscidi RP, et al. (2009) **Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns.** *Lancet Infect Dis*, **9**, 347-56
55. Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, et al. (2008) **Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections.** *J Natl Cancer Inst*, **100**, 513-7
56. O'Brien PM, Campo MS. (2003) **Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenicity?** *Trends Microbiol*, **11**, 300-5
57. White EA, Sowa ME, Tan MJ, et al. (2012) **Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, E260-E267

58. White EA, Kramer RE, Tan MJ, et al. (2012) **Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity.** *J Virol*, **86**, 13174-86
59. Howie HL, Katzenellenbogen RA and Galloway DA. (2009) **Papillomavirus E6 proteins.** *Virology*, **384**, 324-34
60. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. (2009) **The human papillomavirus E7 oncoprotein.** *Virology*, **384**, 335-44
61. Romanowski B, de Borja PC, Naud PS, et al. (2009) **Sustained efficacy and immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: analysis of a randomised placebo-controlled trial up to 6.4 years.** *Lancet*, **374**, 1975-85
62. Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. (2006) **High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up.** *Br J Cancer*, **95**, 1459-66
63. Albers AE, Kaufmann AM. (2009) **Therapeutic human papillomavirus vaccination.** *Public Health Genomics*, **12**, 331-42
64. Kanodia S, Da Silva DM and Kast WM. (2008) **Recent advances in strategies for immunotherapy of human papillomavirus-induced lesions.** *Int J Cancer*, **122**, 247-59
65. Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, et al. (2009) **Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia.** *N Engl J Med*, **361**, 1838-47