

Resúmenes de la Jornada de Investigación

6. Mecanismos moleculares y celulares del cáncer

Análisis de los genes EGFR, PI3K y AKT en gliomas de población colombiana

Autores: Tupaz A., Penagos P.J., Zubietta C., Ortiz P., Velandia F., Yunis J., Arboleda H., Arboleda G.

Grupo o dependencia: Muerte Celular y Neurociencias, de la Universidad Nacional de Colombia

Correo electrónico: gharboledab@unal.edu.co

Introducción: Los gliomas (tumores derivados de la glia) representan el 70% de los tumores del SNC, se caracterizan por su alta tasa de mortalidad y, según su grado de malignidad, se clasifican en *bajo* (I y II) y *alto* (III y IV o glioblastoma multiforme [GBM]). Las opciones de tratamiento para este tipo de cáncer son limitadas. Tanto en gliomas de alto como de bajo grado se observan alteraciones en el ciclo celular, apoptosis, diferenciación y proliferación. Estas características son reguladas principalmente por la vía de supervivencia celular, mediada por receptores de crecimiento, como el del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por medio de la vía PI3K/AKT. En este sentido, se ha reportado la amplificación de los genes del EGFR, el PI3K y el AKT en tumores gliales.

Objetivo: Analizar la amplificación de los genes EGFR, PI3K y AKT en gliomas de población colombiana.

Métodos: La amplificación de los genes se evaluó por medio de PCR en tiempo real, utilizando sondas Taqman, en 30 muestras de gliomas (13 GBM, 2 astrocitomas difusos, 3 astrocitomas anaplásicos, 2 oligoastrocitomas, 3 oligoastrocitomas anaplásicos, 2 ependimomas, 2 ependimomas anaplásicos, 1 oligodendrogioma, 2 oligodendrogiomas anaplásicos), provenientes de cirugías realizadas por el grupo de

Neurooncología del Instituto Nacional de Cancerología, Colombia. Se realizó un análisis semicuantitativo del nivel de amplificación al compararlo con aquella de una muestra control normal, y se normalizó para la expresión del gen casero actina.

Resultados: Encontramos que los tres genes analizados se encuentran amplificados.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que la alteración de las vías de supervivencia celular mediadas por EGFR-PI3K-AKT están alteradas frecuentemente en gliomas de la población colombiana, y constituye un blanco terapéutico factible para su tratamiento.

Tipo, número y localización de células inmunes en el pronóstico clínico de cáncer cervical

Autores: Bedoya A., Sánchez G., Baena A., Jaramillo R., Olaya N., Scarpeta V.

Grupo o dependencia: Infección y Cáncer, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia

Correo electrónico: astridbedoya@hotmail.com

Introducción: La respuesta inmune cumple un papel importante en la eliminación de la infección por el virus del papiloma humano y previene la progresión a cáncer. En cáncer de cuello uterino, una baja densidad de células T está asociada con un incremento en el riesgo de recaídas. Por lo tanto, la caracterización de células infiltrantes en cáncer cervical, puede ser útil para el diseño de inmunoterapias.

Objetivo: Describir el tipo, localización y número de células CD4+, CD8+ y CD25+ Foxp3+ (Tregs) en lesiones precursoras y cáncer cervical.

Métodos: Se obtuvieron 102 bloques de parafina de casos de NIC I (30), NIC II (21), NIC III (24) y cáncer escamocelular (CEC), (27), de los cuales se obtuvieron secciones de 4 μ m y fueron empleadas en una inmunohistoquímica de doble tinción para células CD4+, CD8+, CD25+ y Foxp3+. El número de células/mm² fue obtenido independientemente por dos patólogos, a partir de 10 áreas con mayor infiltración (5 en epitelio y 5 en estroma), utilizando una graticula en una magnificación de 400X. La media de los recuentos obtenidos por los patólogos y la media de los recuentos obtenidos tanto en epitelio como en estroma fueron utilizadas en los análisis estadísticos. La prueba de Kruskal-Wallis fue aplicada en los análisis de las diferencias en el número de células entre los diferentes grados histológicos, y la prueba de Mann-Whitney, para las diferencias del número de células entre las localizaciones.

Resultados: El promedio de células CD8+ y CD4+ es mayor en CEC que en NIC I ($p=0,023$) y NIC II ($p=0,01$), respectivamente. El promedio de células Foxp3+ es mayor en NIC II que en NIC I ($p=0,0030$), y menor en CEC que en NIC III. En CEC el número promedio de células CD4+CD8+ (doblemente positivas) es menor que en NIC III ($p=0,0017$), y está asociado a un menor riesgo de invasión.

Conclusiones: El análisis descriptivo de las poblaciones celulares que infiltran las lesiones preneoplásicas y cáncer de cuello uterino muestran una respuesta inmune heterogénea en cuanto al número y su relación con los diferentes grados histológicos.

Restauración del ADN de muestras de plasma sanguíneo y láminas de citología cérvico-uterinas de pacientes de diferentes hospitales de Bogotá, como una herramienta para la detección del virus del papiloma humano (VPH)

Autores: Márquez P. K., García D. A., Aristizábal F. A.

Grupo o dependencia: Farmacogénetica del Cáncer, de la Universidad Nacional

Correo electrónico: catamarquez@gmail.com

Introducción: El método de tamizaje en cáncer de cuello uterino ha sido la citología, pero su sensibilidad es aún muy baja en nuestro país. Para incrementar esta sensibilidad, la citología se puede apoyar con métodos de biología molecular que permitan la detección certera del virus. Como muestras importantes en estudios retrospectivos podemos obtener láminas citológicas y plasma sanguíneo, de los cuales podemos obtener ADN; para mejorar la calidad de este ADN ensayamos dos métodos distintos de restauración.

Objetivo: Evaluar el proceso de restauración del ADN de plasma y lámina de citología de pacientes de diferentes hospitales de Bogotá, como una herramienta de apoyo para la detección del VPH en estos dos tipos de muestra.

Métodos: El estudio incluyó 250 muestras de plasma, láminas citológicas y cepillados cervicales (control) de mujeres que asistieron a la toma de la citología. Se hizo un análisis comparativo con la prueba de Wilcoxon para valores continuos, y con χ^2 para las proporciones. La detección del VPH se hizo por PCR convencional con primers GP5+/GP6+, y tipificadas por medio de la técnica *reverse line blot* en ADN de cepillados cervicales. A 20 muestras de plasma y láminas citológicas se les realizaron dos tratamientos distintos pre-PCR (restauración); su calidad se evaluó por PCR en tiempo real, con un fragmento de 115pb para el gen ALU, tanto para las muestras restauradas como para las no restauradas.

Resultados: La detección por PCR tiene una sensibilidad del 75% y una especificidad del 99,6%. El método de restauración muestra una diferencia significativa entre los dos métodos, y es posible obtener mayor calidad de ADN de las muestras al ser sometidas a un proceso de restauración.

Conclusiones: La restauración mejora la calidad del ADN de las muestras de plasma y lámina citológica.

La actividad de telomerasa y la infección por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo incrementan el riesgo para el desarrollo de lesiones cervicales de alto grado

Autores: Martín D. C., Hernández G., Buitrago O. L, Huertas A., Murillo R., Arias S., Bravo M. M., Moreno P., Muñoz N., Molano M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología

Correo electrónico: dmartin@cancer.gov.co, dcmartinga@unal.edu.co

Introducción: La actividad de telomerasa no ha sido estudiada como factor de riesgo para el desarrollo de lesiones de cuello uterino, aunque su actividad es mayor a medida que aumenta el grado de lesión.

Objetivo: Evaluar la actividad de telomerasa como factor de riesgo para el desarrollo de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG).

Método: Estudio de casos y controles anidado en la cohorte de Bogotá. Se analizó a 129 mujeres: 25 con LEIAG y 104 con citología normal. La detección y tipificación de VPH se realizó mediante PCR-EIA y RLB, y la actividad de telomerasa, mediante TRAP-ELISA.

Resultados: La actividad de telomerasa se detectó en el 76% de los casos y en el 22,1% de los controles ($p=0,000$). Las infecciones por VPH se detectaron en el 84% de los casos y en el 21% de los controles ($p=0,000$). De los casos, el 68% tenían actividad de telomerasa e infección con VPH al mismo tiempo, el 16% tenían sólo infección por VPH, el 8% tenían sólo actividad de telomerasa y el 8% fueron negativos para ambas. De los controles, el 7,7% tenían al mismo tiempo actividad de telomerasa e infección por VPH, el 13,46% sólo tenían infección por VPH, el 14,42% sólo tenían actividad de telomerasa y el 64,42% fueron negativos para ambas. Todos los casos con actividad de telomerasa tenían infecciones con VPH

de alto riesgo (AR); principalmente, tipos de la especie Alfa-9. El análisis multivariado mostró un incremento en el riesgo de LEIAG en mujeres con actividad de telomerasa ($OR=5,52$ CI 1,43–21,30), infección con VPH-AR ($OR=18,26$ CI 4,43–76,92) y de 2 a 3 partos ($OR=3,88$ CI 1,06–14,18). Un análisis similar, el cual incluyó sólo a las mujeres infectadas por VPH-AR, mostró que la actividad de telomerasa incrementa el riesgo de LEIAG ($OR=37,94$ CI 1,64–876,1). Ninguna otra característica reproductiva o relacionada con el estilo de vida se asoció a la enfermedad.

Conclusiones: La actividad de telomerasa está muy relacionada con los VPH-AR; especialmente, con tipos de la especie alfa-9. La actividad de telomerasa podría usarse como herramienta adjunta a la citología cérvico-uterina o a la prueba de VPH, para identificar a las pacientes con un mayor riesgo de LEI-AG o cáncer cervical.

Detección mediante q-PCR, del estado de amplificación de genes en fibroblastos normales y fibroblastos aislados a partir de biopsias de pacientes colombianos con cáncer de pulmón

Autores: Morantes J., Perdomo S., Carrillo F., Aristizábal F.

Grupo o dependencia: Grupo de Farmacogenética del Cáncer, de la Universidad Nacional de Colombia

Correo electrónico: sjmorantesm@unal.edu.co, faaristizabal@bt.unal.edu.co

Introducción: Se ha descrito que los fibroblastos del estroma asociados a tumores sólidos pueden sufrir alteraciones moleculares similares a las que muestran las células tumorales durante su crecimiento y propagación. Así mismo, se han identificado alteraciones en diferentes genes, en especial aquellos que codifican para proteínas de matriz extracelular. También se ha demostrado que estas células pueden secretar citoquinas y factores de crecimiento que pueden ser necesarios para el crecimiento del tumor. Es probable que

otros cambios moleculares también influyan en el proceso tumoral; por esta razón es importante realizar aproximaciones genéticas y moleculares que permitan identificar dichos cambios en estas células.

Objetivo: Caracterizar y comparar el estado de amplificación de los genes PI3K, EGFR, ERBB₂, MYC, MYCN, MYCL, REL y AKT en fibroblastos normales y en los aislados a partir de biopsias de pacientes colombianos con cáncer de pulmón.

Métodos: Empleando procedimientos estándar, se procesaron piezas quirúrgicas que provinieron de pacientes con un diagnóstico confirmado para adenocarcinoma y carcinoma escamocelular. Los fibroblastos aislados se propagaron hasta confluencia, se tripsinaron y se emplearon para extraer ADN. Las muestras de ADN obtenidas se emplearon para evaluar el estado de amplificación de los genes PI3K, EGFR, ERBB₂, MYC, MYCN, MYCL, REL y AKT, usando PCR cuantitativa en tiempo real con sondas TaqMan®. Para validar el análisis y determinar el grado de amplificación de cada gen, los resultados se normalizaron y compararon con los obtenidos para el gen control (actina). El estado de amplificación calculado para todos los genes fue comparado entre fibroblastos pulmonares normales (MRC-5) y los de origen tumoral. Análisis similares fueron realizados para las líneas celulares A549 (adenocarcinoma) y NCI-H520 (carcina escamocelular).

Resultados: Al comparar la dosis génica para MRC-5 y los fibroblastos FIBSPG2 (adenocarcinoma) y FIBSPG3 (escamocelular) se determinó que ninguno de los genes se encuentra amplificado en FIBSPG3; por el contrario, los genes PI3KCA, MYCN, MYCL1, AKT y EGFR están amplificados en FIBSPG2. En A549 se encuentra amplificado PI3KCA, y en NCI-H520 están amplificados REL, HER2 y AKT.

Conclusiones: No es claro aún el porqué de las diferencias entre el estado de amplificación de los genes en FIBSPG2 y FIBSPG3. Es probable que los tipos histológicos de los cuales provienen estén determinando dicho resultado. Otros estudios podrían complementar y dar mayor claridad a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Diferencias en la señalización por IGF-I e IGF-II en la línea celular HeLa derivada de cáncer de cuello uterino

Autores: Novoa S. S., Alarcón J. C., Umaña A., Sánchez de Gómez M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Hormonas, de la Universidad Nacional de Colombia

Correo electrónico: jcalarconb@unal.edu.co

Introducción: Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) cumplen un papel fundamental en el crecimiento, supervivencia e invasión en células tanto normales como tumorales. La HeLa es una línea de adenocarcinoma de cuello uterino que contiene el virus del papiloma humano 18 y fue originada a partir de células de cáncer de cuello uterino. Las vías de señalización celular PI3K/Akt y ERK/MAPK cumplen un papel crítico en el crecimiento celular y en la supervivencia en muchos tejidos y tipos celulares. En una variedad de células cancerosas se ha encontrado desregulación en estas vías.

Objetivo: Establecer las vías de señalización celular activadas por el sistema IGF en procesos de proliferación celular en la línea celular derivada de cáncer de cuello uterino, HeLa.

Métodos: Con el fin de determinar la posible vía de señalización responsable de mediar la respuesta a los IGFs, las células se estimularon con IGF-I (10nM), IGF-II (10nM) o SFB al 10%, en combinación con los inhibidores específicos de las vías PI3K y MAPK, LY 294002 y PD 98059, respectivamente. La activación de las vías de señalización se estableció mediante los cambios en fosforilación de las proteínas Akt (PI3K) y ERK ½ (MAPK), evaluados por *western blot*.

Resultados: Se observó un aumento de la fosforilación de la proteína Akt, como resultado del estímulo con los dos IGFs, pero la cinética de activación de Akt por IGF-II fue mayor que la observada por IGF-I. Por otro lado, IGF-II estimuló la fosforilación de ERK, mientras que IGF-I parece provocar un descenso en la fosforilación, probablemente, por la activación de fosfatases, lo que podría indicar la activación de vías de señalización diferentes.

Conclusiones: Las vías PI3K y MAPK son activadas de manera diferencial por IGF-I e IGF-II, y pueden estar implicadas en el desarrollo y progresión del fenotipo tumoral de células de cuello uterino.

Mecanismos moleculares de las estatinas sobre el cáncer

Autores: Sandoval M. C., Ordóñez N., Umaña A., García J. M., Fernández L., Sánchez de Gómez M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Hormonas, de la Universidad Nacional de Colombia

Correo electrónico: mcsandovalu@gmail.com

Introducción: Las estatinas son inhibidores de la HMGCoA involucrada en la síntesis de colesterol y en intermediarios de la farnesilación de proteínas vinculadas a proliferación, crecimiento, invasión y migración. Recientemente se han comenzado a investigar los efectos de estos medicamentos sobre el cáncer, y se ha encontrado que las estatinas inducen apoptosis en las células, además de disminuir su proliferación e invasión. Estudios en células de osteosarcoma han permitido establecer el efecto proapoptótico de la simvastatina, además de la inhibición de la actividad transcripcional de la proteína STAT1. Por otra parte, las proteínas STAT hacen parte de la vía de señalización JAK/STAT, activada por la hormona de crecimiento (GH), y regulan el crecimiento, la diferenciación y la proliferación de muchos tipos celulares. No se conoce el efecto de las estatinas en la vía de señalización activada por GH.

Objetivo: Evaluar el efecto de la simvastatina sobre la activación de la vía de señalización JAK/STAT activada por GH, y sus implicaciones funcionales en una línea celular de osteosarcoma.

Métodos: La línea celular de osteosarcoma de rata, UMR-106, se cultivó en DMEM. Los cultivos se estimularon con dosis de bGH (10,50 100 nM), simvastatina (0,1, 1,0, 10 μM), o combinación de los dos a diferentes tiempos. El efecto sobre la proliferación celular se midió por MTT y los niveles de expresión de los genes SOCS-3, y CIS se realizó por PCR en tiempo real. La activación de la proteína STAT 5 se evaluó por *western blot*.

Resultados: Se observó una disminución en la proliferación de las células por tratamiento con simvastatina en las dosis empleadas, efecto apreciable aun en presencia de GH. Adicionalmente, la expresión de SOCS-3 y CIS aumentó dependiendo del tiempo, con la adición de simvastatina al medio, así como también disminuyó la fosforilación de STAT5 estimulada por GH.

Conclusiones: La simvastatina estimula la expresión de genes supresores de la activación de JAK/STAT y disminuye la fosforilación STAT5, lo que evidencia el efecto inhibidor del crecimiento en células de osteosarcoma.

Efecto de dos péptidos sintéticos sobre la función del PDGF en la vía de señalización PI3K/AKT en células tumorales humanas HT1080

Autores: Contreras M. J., Arboleda G., Morales L.

Grupo o dependencia: Muerte Celular y Neuroquímica, de la Universidad Nacional, y Universidad Javeriana

Correo electrónico: gharboledab@unal.edu.co

Introducción: La sobreactividad del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y sus receptores (PDGFR) cumple un papel en la patogénesis, invasión y metástasis de muchos tumores sólidos. La reciente introducción clínica de inhibidores de PDGFR ha sido validada en los últimos años en células cancerígenas, y su eficacia clínica ha sido ampliamente demostrada. Es de gran interés biológico y farmacológico conocer los efectos que sobre la función del PDGF en células de fibrosarcoma humano HT1080 tienen dos péptidos lineales, los cuales mostraron previamente una alta afinidad a PDGFR.

Objetivo: Determinar el efecto de dos péptidos sintéticos sobre la función del PDGF en la vía de señalización PI3K/Akt en células tumorales humanas HT1080.

Métodos: Se repurificaron por RP-HPLC dos péptidos lineales sintetizados por el grupo de

Neurobioquímica de la PUJ; su efecto sobre la viabilidad celular se evaluó mediante MTT. El efecto de estos sobre la vía PI3K/Akt se evaluó mediante el estado de fosforilación de Akt por *western blot*. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t* de Student, teniendo en cuenta nueve observaciones, procedentes de tres cultivos independientes en los ensayos de viabilidad celular y tres observaciones de tres cultivos independientes en los ensayos de *western blot*.

Resultados: PDGF a concentración de 500pM genera mejor respuesta positiva sobre la viabilidad celular y estimulación de la fosforilación de AKT, aunque esta última es sólo temporal. Se definió que ambos péptidos a una concentración de 100pM ejercieron un efecto final negativo sobre la proliferación celular. Sin embargo, el péptido 2 mostró una mayor capacidad de inhibición de la fosforilación de Akt dependiente de PDGF. Los péptidos no influyen sobre la activación endógena de Akt, lo cual indica que estos péptidos parecen ser moduladores específicos de la respuesta biológica iniciada por PDGF, y ello señala una alta especificidad de estos por el PDGFR.

Conclusiones: Los péptidos 1 y 2 inhiben la viabilidad y fosforilación de Akt dependiente de PDGF en células HT1080, donde el péptido 2 es mucho más efectivo. Estos péptidos se convierten en posibles moduladores terapéuticos de la vía PDGF-PI3K-AKT en cáncer.

Polimorfismos en la proteína CagA y su asociación a enfermedad gastroduodenal

Autores: Acosta P. N., Quiroga A. J., Delgado M. del P., Jaramillo C. A., Bravo M. M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología de la Universidad de los Andes

Correo electrónico: mbravo@cancer.gov.co

Introducción: La infección con *Helicobacter pylori* afecta a más del 50% de la población mundial. En los individuos infectados la bacteria causa gastritis

crónica activa, que en 10% a 20% de los casos progres a gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico. La infección con cepas que portan el gen cagA se asocia con mayor riesgo de úlcera duodenal y cáncer gástrico; sin embargo, en individuos con gastritis superficial hasta un 50% de las cepas porta el gen cagA. La proteína CagA es translocada al interior de la célula epitelial y fosforilada en los residuos de tirosina presentes en una secuencia EPIYA. En la proteína CagA de aislamientos de *H. pylori* del hemisferio occidental existen tres clases de sitios EPIYA (A,B,C), que son ensamblados de manera variable en número y orden.

Objetivo: Caracterizar la región variable del extremo 3' del gen cagA que contiene los motivos EPIYA, y evaluar si existe asociación entre los polimorfismos en el gen cagA y la severidad de la enfermedad gastroduodenal.

Métodos: Se obtuvo la secuencia del extremo 3' del gen cagA de 106 aislamientos de *H. pylori*; de ellos, 19 provenían de pacientes con diagnóstico de gastritis no atrófica; 21, de pacientes con gastritis atrófica; 26, de pacientes con metaplasia intestinal; 22, de pacientes con úlcera duodenal, y 18, de pacientes con cáncer gástrico. ADN genómico de 122 aislamientos de pacientes con diferentes enfermedades gastroduodenales.

Resultados: La mayoría de las cepas analizadas presentaron la combinación ABC de motivos EPIYA: 66 (62,3%); el 31,1% de la cepas (33 de ellas) presentó la combinación ABCC, y sólo una cepa (0,9%) presentó la combinación ABCCC; por otra parte, 6 aislamientos (5,7%) presentaron otras combinaciones. No se observó asociación entre el número de motivos EPIYA y la severidad de la enfermedad gastroduodenal; sin embargo, se observó una diferencia significativa en la frecuencia de la combinación ABCC en aislamientos colombianos en comparación con las frecuencias reportadas para cepas occidentales en GeneBank ($p<0,002$).

Conclusiones: Se caracterizó exitosamente la región 3' del gen cagA en un conjunto de cepas colombianas; no se encontró asociación entre un número mayor de motivos EPIYA y mayor riesgo de cáncer gástrico.

Papel de los genotipos de *Helicobacter pylori* y de los polimorfismos de genes de citocinas proinflamatorias en el riesgo de lesiones premalignas y cáncer gástrico en una población colombiana (Tunja)

Autores: Trujillo E., Quiroga A., Martínez T., Serrano M., Hernández G., Murillo R., Bravo M. M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología

Correo electrónico: mbravo@cancer.gov.co

Introducción: La infección con *Helicobacter pylori* afecta al 50% de la población mundial. En una proporción de individuos la infección se asocia con el desarrollo de úlcera péptica, lesiones preneoplásicas y carcinoma gástrico. Las causas de los diferentes resultados clínicos de la infección incluyen factores genéticos tanto de la bacteria como del hospedero.

Objetivo: Determinar las frecuencias de los genes bacterianos *cagA* y *vacA* y los polimorfismos en genes de citocinas *IL-1β-511*, *IL-1RN*, *IL-10-819*, *IL-10-1082* y *TNFA-308* en una población con alta incidencia de cáncer gástrico y evaluar su asociación con enfermedad gastroduodenal.

Métodos: Se analizaron 289 biopsias, obtenidas de pacientes del Hospital San Rafael de Tunja: 58 con diagnóstico de gastritis superficial, 44 con gastritis atrófica, 69 con metaplasia intestinal, 20 con displasia gástrica, 28 con cáncer gástrico y 70 con úlcera duodenal. Los polimorfismos se evaluaron por discriminación alélica usando PCR en tiempo real. La genotipificación de *H. pylori* se realizó mediante PCR.

Resultados: La presencia de *H. pylori vacAs1*, *vacAm1*, *cagA* positivo se asoció a mayor riesgo de metaplasia intestinal [OR18,7 IC95%(6-58,3); 8,35 IC95%(3,2-21,6) y 25,41 IC95%(6,9-93,9)], cáncer gástrico [OR:5,44 IC95%(1,40-21,11); 3,73 IC95%(1,23-12,39)] y úlcera duodenal [OR:3,4 IC95%(1,5-7,9); 2,42 IC95% (1,02-5,7); 2,7 IC95%(1,2-5,7)]. No se observó asociación entre los polimorfismos evaluados

y riesgo de enfermedad gastroduodenal. Sin embargo, dentro de los individuos infectados con *H. pylori vacA s1*, *vacA m1* o *cagA* positivo el riesgo de desarrollar metaplasia intestinal se incrementó en los portadores de los polimorfismos proinflamatorios *IL-1B-511T* [OR: 20,2 IC95% (2,2-186,1); 15,0 IC95% (1,6-142,7); y 7,33 IC95% (1,3-41,9)], *IL-1-RN-2**/*2** [OR: 43,7 IC95% (4,2-456,9; 16,0 IC95% (1,68-152,02); 80,5 IC95% (6,32-1026,0)], *TNF-A-308A* [OR: 32,5 IC95% (2,9-355,1); 17,3 IC95% (1,8-164,2); y 52 IC95%: (6,3-430,7)], *IL-10-819T* [OR: 23,8 IC 95% (4,1-136-9); 11,5 IC95% (2,5-52,0) y 17,14 IC95% (2,0-99,0)] y en individuos homocigotos para el alelo *IL10-1082A* [OR: 34 IC95%(6,1-189,2); 10,5 IC95%(2,9-38,3) y 57,36 IC95%(6,58-500)].

Conclusiones: Estos resultados sugieren que en individuos portadores de polimorfismos proinflamatorios infectados con *H. pylori vacAs1*, *vacAm1* o *cagA* positivo se favorece la aparición de metaplasia intestinal. La determinación de los genotipos de la bacteria y de los polimorfismos en los genes de citocinas proinflamatorias podría ser útil para la identificación de individuos en riesgo de desarrollar metaplasia intestinal dentro de una población colombiana con alta incidencia de cáncer gástrico.

Interacción entre los factores de crecimiento similares a la insulina y el motivo RGD de adhesión celular en la línea celular de cáncer de próstata PC3

Autores: Losada M., Vallejo A. F., Sánchez de Gómez M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Hormonas, de la Universidad Nacional de Colombia

Correo electrónico: mlosadab@unal.edu.co

Introducción: El cáncer de próstata es uno de los principales responsables de la mortalidad en hombres por cáncer en Colombia debido a su alto potencial metastásico. Los factores de crecimiento similares a la insulina tipo I y II (IGF-I y II) están involucrados en la proliferación, migración e invasión de varias neoplasias comunes, y la sobreexpresión de sus

receptores se ha asociado con un pronóstico negativo. Adicionalmente, dentro del proceso invasivo las integrinas desarrollan un papel fundamental en la adhesión y en eventos de señalización que conducen a migración, principalmente a través del motivo RGD(Arg-Gly-Asp).

Objetivo: Estudiar la posible interacción entre el péptido RGD y algunos efectos biológicos mediados por IGF-II en células de cáncer de próstata.

Métodos: Se cultivó la línea celular de cáncer de próstata PC-3 en medio RPMI suplementado con 10% de SFB, en atmósfera húmeda; se realizaron diferentes estímulos con los ligandos IGF-I, IGF-II e insulina. De la misma forma, se inhibió la activación de la integrina aVb3 y la unión del ligando al receptor de IGF-IR. Se realizaron ensayos de migración, adhesión y proliferación (MTT) con los tratamientos antes descritos.

Resultados: Se determinó que el IGF-II estimula la proliferación celular, y que su efecto es potenciado por la integrina aVb3. El receptor del sistema IGF, por el cual se media este efecto, es, probablemente, el IGF-IR, y no el receptor de insulina (IR). Por otra parte, en ensayos de adhesión se encontró un efecto inductor importante por parte del IGF-I y del péptido RGD, los cuales al combinarse aumentaron la adhesión celular, efecto que también es mediado por la integrina aVb3. Adicionalmente, se encontró que la estimulación conjunta del IGF-II y el péptido RGD aumenta significativamente la migración celular, lo cual señala la estrecha relación existente entre la señalización mediada por los IGFs y el receptor de integrina aVb3.

Conclusiones: Los resultados muestran una interacción significativa entre los ligandos IGF-I e IGF-II y el péptido RGD, mediada, principalmente, por el receptor de IGF-I (IGF-IR) en la proliferación, adhesión y migración de la línea de cáncer de próstata PC-3.

Polimorfismos de genes asociados al metabolismo de xenobióticos, y su relación con el desarrollo de cáncer de mama familiar en una población colombiana

Autores: Rangel N., Escobar S., Ramírez S.

Grupo o dependencia: Grupo de Ciencias Básicas Médicas, de la Universidad del Rosario

Correo electrónico: rjnelsone@gmail.com

Introducción: En Colombia, el cáncer de mama es la tercera causa de muerte por cáncer. Del total de casos de cáncer de mama, del 10% al 15% son de origen familiar, y de éstos, 5% se pueden asociar con mutaciones en genes de alta penetrancia, como BRCA1 y BRCA2. El riesgo de los casos restantes puede llegar a ser explicado por variantes genéticas de baja penetrancia asociadas al desarrollo de la enfermedad.

Objetivo: Describir la frecuencia de los polimorfismos de los genes p53(Arg72Pro, Duplicación 16pb intrón 3 y MspI intrón 6), CYP1B1(Val432Leu, Asn453Ser), CYP1A1(T6235C, Thr461Asn, Ile462Val), GSTP1(Ile105Val), GSTM1 y GSTT1 en una población colombiana con cáncer de mama familiar, con respecto a un grupo control de individuos sin antecedentes de cáncer.

Métodos: Estudio analítico de casos (120) y controles (240). La evaluación de los polimorfismos se llevó a cabo mediante PCR-RFLPs, y la evaluación de los factores asociados a cáncer de mama heredofamiliar se hizo mediante análisis multivariado. Se midió la fuerza de asociación mediante la razón de disparidad (OR) y se evaluó la significancia de la asociación utilizando el intervalo de confianza del 95%.

Resultados: En la regresión logística del análisis multivariado se encontraron asociaciones significativas con el desarrollo de cáncer de seno para los polimorfismos: p53 exon 4-Arg/Arg (OR 1,923 IC 1,117–3,309); p53 intron 3-w/m (OR 30,887 IC 3,709–257,209); p53 intron 6-w/m (OR 2,061 IC 1,059–4,013); CYP1B1 Val432Leu–Val/Val (OR 2,273 IC 1,084–4,855); CYP1B1 Asn453Ser-Asp/Ser (OR 1,987 IC 1,076–3,670). La presencia del gen GSTM1 reporta un OR 0,366 IC 0,219–0,613) el cual se considera como protector para cáncer de seno. En el análisis de asociación entre hábitos y características demográficas se encontraron como factores de riesgo la edad de la menarquía entre los 8 y los 11 años (OR 3,076 IC 1,371–6,902) y entre los 12 y los 13 años (OR 3,472 IC 1,584–7,610);

las alergias (OR 2,095 IC 1,172–3,746); la terapia hormonal (OR 1,985 IC 1,006–3,811) y el consumo de embutidos (OR 2,041 IC 1,167–3,569).

Conclusiones: Nuestros resultados soportan la importante asociación entre polimorfismos de los genes p53, CYP1B1 y GSTM1 con el riesgo de cáncer de mama familiar.

Evaluación de la expresión del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) en sangre periférica de individuos con y sin melanoma maligno, y en líneas celulares

Autores: Rangel N., Rondón M., Ramírez S.

Grupo o dependencia: Grupo de Ciencias Básicas Médicas, de la Universidad del Rosario

Correo electrónico: rjnelsone@gmail.com

Introducción: La incidencia de melanoma maligno se ha incrementado más rápido que cualquier otro tipo de cáncer, lo cual ha llevado a intensificar la búsqueda de herramientas que faciliten la identificación temprana del melanoma. El factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) es conocido como el regulador maestro de melanocitos. Desregulaciones del MITF se han relacionado al desarrollo de melanoma maligno.

Objetivo: Analizar la expresión del gen MITF en sangre periférica de un grupo de individuos con melanoma, y compararla con la expresión de éste en un grupo de personas sin cáncer, así como también en algunas líneas celulares.

Métodos: Se extrajo ARN de 31 muestras de sangre periférica: 19 de pacientes con melanoma y 12 de personas sin ningún tipo de cáncer. Se cuantificaron niveles de expresión tanto para el gen MITF como para genes de expresión constitutiva (β 2M y GAPDH), mediante PCR tiempo real. Así mismo, se evaluó la expresión de dichos genes en cinco líneas celulares.

Resultados: En todos los individuos se observó expresión del gen MITF. El análisis de cuantificación relativa mostró que la diferencia en el nivel de expresión del gen MITF fue de sólo 1,34 veces más en el grupo de casos con respecto al grupo control, mientras que el análisis de cuantificación absoluta no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión en los grupos de estudio ($P=0,09$). Sin embargo, la expresión de MITF en el grupo de pacientes con melanoma fue más variable que la observada en el grupo de personas sin cáncer. Así mismo, en la línea celular de adenocarcinoma gástrico se detectó expresión, no descrita hasta el momento, del gen MITF.

Conclusiones: Se encontraron niveles de expresión del gen MITF en sangre periférica tanto de personas con melanoma como en personas sin cáncer. Sin embargo, la variabilidad en los niveles de expresión del gen MITF observados en personas con melanoma sugiere la posible presencia de células tumorales en circulación.

Desarrollo de la técnica de *reverse line blot* para la detección de variantes de E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH) 58

Autores: Buitrago O. L., Morales M. N., Martín D. C., Huertas A., Moreno P., Hernández G., Martínez T., Molano M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología

Correo electrónico: obuitrago@cancer.gov.co, olbuitragou@unal.edu.co

Introducción: En el mundo se usan diferentes técnicas para la identificación de variantes moleculares del virus del papiloma humano (VPH). Para realizar de estudios epidemiológicos es necesario desarrollar nuevos ensayos con alta sensibilidad y especificidad y de fácil uso.

Objetivo: Desarrollar la técnica de *reverse line blot* (RLB) para analizar la presencia de variantes en el ORF E6 y E7 de muestras positivas para VPH58.

Métodos: Se desarrollaron 2 PCRs hacia la región E6 y E7 del VPH58, y un RLB para la detección de 22 variaciones nucleotídicas en estas regiones. El método RLB permite la hibridación de 42 muestras diferentes con 42 sondas de oligonucleótidos en un solo ensayo. Las oligosondas contienen un grupo 5-amino que se une de forma covalente a una membrana cargada negativamente utilizando un *miniblitter*. Posteriormente, la membrana es removida y girada 90°; los 42 productos de PCR biotinilados son hibridados en la membrana y visualizados utilizando un conjugado de streptavidina-peroxidasa y un sustrato quimioluminiscente (ELC), para un revelado final por autorradiografía.

Resultados: Se diseñaron iniciadores que amplifican un fragmento de 521pb para el ORF E6, y de 335pb para el ORF E7 de VPH58. El nivel de sensibilidad en gel fue de 100fg para ambos genes. Para el RLB se diseñaron 14 oligosondas hacia E6, que hibridan tanto la posición de referencia como para el cambio en esa posición, y para E7 se diseñaron 24 sondas (9 sondas de referencia y 15 para cambios). Las sondas fueron diseñadas con temperaturas de fusión similares, y se estandarizó el ensayo para evitar uniones inespecíficas. El nivel de sensibilidad del RLB fue diez veces mayor que el del gel. Las posiciones de nucleótidos seleccionados fueron: 169, 187, 203, 307, 367, 388, 538, 599, 632, 694, 726, 744, 756, 760, 761, 763, 793, 798, 801, 803, 840 y 852. El ensayo permitió identificar las variantes presentes en las muestras y los cambios producidos en el ámbito de los aminoácidos.

Conclusiones: El desarrollo de una técnica rápida altamente sensible y específica como el RLB para la detección de variantes de E6, E7/VPH58 facilita el análisis de variantes de VPH en estudios epidemiológicos.

Prevalencia de variantes moleculares del ORF E6 y E7 del virus de papiloma humano (VPH) tipo 58 en mujeres con citología normal de la cohorte de Bogotá, Colombia

Autores: Buitrago O. L., Morales N. M., Martín D. C., Huertas A., Moreno P., Hernández G., Martínez T., Molano M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología

Correo electrónico: obuitrago@cancer.gov.co, obuitragou@unal.edu.co

Introducción: El virus de papiloma humano 58 es el segundo tipo viral de mayor incidencia en el ámbito suramericano y nacional en mujeres con citología normal y se encuentra dentro de los más prevalentes en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y cáncer de cuello uterino invasivo. En el mundo hay pocos estudios de variantes sobre los ORF E6 y E7 del VPH58; algunos de ellos han mostrado que la presencia de ciertas variantes moleculares se asocia a la severidad de la neoplasia de cuello uterino y al riesgo de cáncer de cuello uterino. En Colombia no existe información acerca de la prevalencia de variantes de E6 y E7 de VPH58 en mujeres con citología normal.

Objetivo: Analizar la presencia de variantes moleculares en el ORF E6 y E7 en muestras de mujeres positivas para VPH58 en la línea de base de la cohorte de Bogotá, Colombia.

Métodos: Se amplificó el ORF E6 y E7 del VPH58 en 34 muestras de mujeres positivas para la infección por VPH58, utilizando los iniciadores E6F1/E7R1 para el ORF E6, que amplifican un fragmento de 521 pb, y los iniciadores E7P1/E7P2 para el ORF E7, que amplifican un fragmento de 335 pb. Para el análisis de las variantes se utilizó la técnica de secuencia automática directa. La secuencia referencia del VPH58 se utilizó para comparar las secuencias obtenidas.

Resultados: 26 muestras (76,4%) amplificaron para el ORF E6 y E7. De estas muestras, 20 (76,92%) presentaron la variante T307/A694/G744/A761, tres muestras (11,54%) presentaron la variante T307/T632/G744/A760, una (3,85%) presentó la variante A169/T307/A599/A694/G744/A761, otra (3,85%) presentó la variante T307/A694/G744/A761/G763, y, finalmente, una muestra (3,85%) presentó la variante T307/G744. Ninguna de las muestras presentó la secuencia referencia del VPH58.

Conclusiones: En la población analizada se encontraron cinco diferentes variantes; tres, previamente reportadas en la población asiática, y 2, nuevas variantes nunca antes reportadas (la variante A169/T307/A599/A694/G744/A761 y la variante T307/A694/G744/A761/G763). El análisis de las variantes de VPH58 durante el seguimiento de la cohorte arrojará información valiosa acerca de su rol en la persistencia de la infección y en el desarrollo de lesiones cervicales.

Gonadotropina coriónica e IGF-II: vías de señalización compartidas en la enfermedad trofoblástica gestacional

Autores: Cabezas R. J., Vallejo A. F., Umaña A., Sánchez de Gómez M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Hormonas, del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

Correo electrónico: ricardocabe@gmail.com, rjcabezas@unal.edu.co

Introducción: La enfermedad trofoblástica gestacional (ETG) comprende un conjunto de patologías interrelacionadas debidas a un desarrollo anormal del tejido trofoblástico. Esta enfermedad varía de relativamente benigna, como la mola hidatidiforme (completa y parcial), hasta maligna, como la mola invasiva y el coriocarcinoma. La incidencia de la enfermedad en Colombia es de 1 en 300 partos, superior al promedio mundial (1 en 1.000) y alrededor del 10% al 20% de las pacientes con mola desarrollan coriocarcinoma, un cáncer que progresa muy rápidamente y con consecuencias fatales. Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado la sobreexpresión del IGF-II y del receptor IGF-IR en mola hidatidiforme, al igual que una correlación entre niveles circulantes elevados de IGF-II y de la hormona gonadotropina coriónica (HCG) en esta patología.

Objetivo: Evaluar la posible interacción entre las vías de señalización activadas por la HCG y el IGF-II, y sus efectos funcionales en una línea celular de trofoblasto premaligno.

Métodos: Se empleó la línea celular de trofoblasto premaligno HTR8, estimulada con IGF-II (10 nM), HCG (5000 mU/ml), y combinaciones de ambas. Se evaluaron los efectos sobre migración y adhesión en cámaras de Boyden y la proliferación celular, por medio del ensayo MTT. Se determinó la expresión de genes del sistema IGF por medio de PCR convencional y se evaluaron las vías de señalización activadas por *western blot*.

Resultados: Nuestros resultados mostraron la expresión de los ligandos y los receptores del sistema IGF en la línea celular HTR8. Tratamientos con HCG, pero no con IGF-II, estimulan la adhesión celular. El IGF-I en combinación con la HCG posee efectos aditivos en la proliferación celular, dependiendo de la dosis. IGF-I, IGF-II y HCG incrementan la migración celular respecto a controles no estimulados. Dichos efectos están mediados, en parte, por la activación del receptor IGF-IR y la vía de señalización PI3K/AKT.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que los efectos biológicos mediados por los IGFS y la HCG podrían compartir mecanismos de señalización en la línea celular HTR8, con implicaciones en propiedades metastásicas y progresión de la enfermedad trofoblástica gestacional.

Efecto de IGF-II en la secreción de hCG, y su posible papel en el desarrollo de la enfermedad trofoblástica gestacional

Autores: Freyre S. I., Vallejo A. F., Umaña A., Sánchez de Gómez M.

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Hormonas, de la Universidad Nacional de Colombia

Correo electrónico: sifreyreb@unal.edu.co, sifreyre@gmail.com

Introducción: El trofoblasto comparte muchas características con células malignas, como el alto nivel de proliferación celular, la falta de inhibición por contacto celular, las propiedades de migración e invasión, el perfil de proteasas, las moléculas de adhesión y la capacidad para evadir

efectores del sistema inmune, por lo cual se le denomina "pseudomalígno" o "fisiológicamente metastático". El sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) ha sido involucrado en el desarrollo adecuado de la placenta y del feto. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han evidenciado alteraciones del sistema IGF en la enfermedad trofoblástica gestacional (ETG), corrientemente diagnosticada por los elevados niveles circulantes de la hormona gonadotropina coriónica (hCG).

Objetivo: Establecer si alteraciones en el sistema IGF tienen implicaciones en la patogénesis de la enfermedad examinando la posible relación entre IGF-II y la expresión de hCG en células de trofoblasto humano.

Métodos: Se utilizó la línea celular de trofoblasto HTR-8, que conserva muchas de las características del trofoblasto extravelloso. Se indujo diferenciación por tratamiento con forskolina ($1\mu M$, $10\mu M$ y $20\mu M$), sola o en combinación con IGF-I, e IGF-II ($10 nM$). Los cambios en la expresión de hCG

se evaluaron a través de qPCR e inmunoensayo (IRMA). La proliferación celular se estableció mediante ensayos de MTT.

Resultados: Los resultados mostraron que IGF-II estimula la proliferación celular y la producción de la hormona hCG (400 veces), en comparación con el control. El tratamiento con el inductor de diferenciación, forskolina ($10 \mu M$) en combinación con IGF-II, incrementó aún más (700 veces) los niveles de hCG con respecto al resultado observado con IGF-II. Este efecto es específico para IGF-II, y no se observó con IGF-I. Estos incrementos se correlacionaron con los resultados de expresión medidos por qPCR, donde los mayores niveles de transcritos se encontraron en células tratadas con forskolina e IGF-II.

Conclusiones: Estos hallazgos demuestran que IGF-II induce específicamente la secreción de hCG; probablemente, de forma similar a lo que ocurre en la ETG. Esto nos lleva a proponer que el aumento en los niveles de IGF-II puede estar relacionado con el desarrollo de la enfermedad, por lo cual podría ser usado como un marcador pronóstico.