

# Actividad de la telomerasa e infección por VPH en raspados cervicales de mujeres que desarrollaron lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado. Un estudio de seguimiento

## Telomerase Activity and HPV Infection in Cervical Smears of Women With High Grade Squamous Intraepithelial Lesions. A Follow-up study

Carolina Martín<sup>1</sup>, Gustavo Hernández<sup>2</sup>, Óscar Gamboa<sup>2</sup>, Óscar Buitrago<sup>1</sup>, Mauricio González<sup>3</sup>, Nubia Muñoz<sup>2</sup>, Mónica Molano<sup>1</sup>, Grupo de Estudio VPH<sup>4</sup>

1. Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D. C., Colombia
2. Grupo de Investigación Epidemiológica, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D. C., Colombia
3. Grupo de Ginecología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D. C., Colombia
4. Grupo de estudio VPH: Héctor Posso, Margarita Ronderos, Raúl Murillo, Joaquín Luna, Natasha Ortiz, Gilberto Martínez, Edmundo Mora, Gonzalo Pérez, José M. Fuentes, Constanza Gómez, Eva Klaus, Constanza Camargo, Cecilia Tabón, Teodolinda Palacio, Carolina Suárez, Claudia Molina

## Resumen

**Objetivo:** Describir la AT y la infección por VPH en el seguimiento de mujeres que pertenecen a la cohorte de Bogotá. **Métodos:** Se analizaron 79 muestras del seguimiento de 25 mujeres que desarrollaron LEI-AG y 149 muestras del seguimiento de 34 mujeres con citología normal. La detección del VPH se realizó usando PCR-EIA GP5+/GP6+ y RLB. La AT se midió mediante TRAP-ELISA. **Resultados:** El análisis mostró que de los 25 casos, 8 fueron casos prevalentes (ingresaron al estudio con la LEI-AG) y los 17 casos restantes fueron incidentes (la lesión se detectó durante el seguimiento). De estas 17 mujeres, 12 (70,5%) presentaron AT y VPH al momento del diagnóstico o en una visita previa, con VPH de alto riesgo (VPH-AR), principalmente de la especie  $\alpha$ -9. Tres mujeres (17,7%) mostraron infecciones transitorias por VPH y 2 (11,8%) no tuvieron VPH o AT al diagnóstico. El seguimiento de la mujeres con citología normal mostró que solo ocho mujeres tuvieron VPH y AT al mismo tiempo (23,5%), 21/34 mujeres (61,8%) tuvieron eventos transitorios de VPH durante el seguimiento y 5 (14,7%) no tuvieron VPH durante todo el seguimiento. **Conclusiones:** Detectar AT e infección por VPH-AR al mismo tiempo parecen predecir el riesgo de LEI-AG.

**Palabras clave:** virus del papiloma humano, telomerasa, cáncer de cuello uterino, estudios de seguimiento

### Correspondencia

Mónica Molano, Instituto Nacional de Cancerología, Avenida 1ª No. 9-85, Bogotá, Colombia. Teléfono: (571) 3341111 ext. 4205.  
Correo electrónico: mmolano@cancer.gov.co.

Fecha de recepción: 10 de octubre de 2011. Fecha de aprobación: 13 de diciembre de 2011

## Abstract

**Objective:** To describe telomerase activity (TA) and HPV infection in follow up of women in the Bogotá cohort. **Methods:** Analysis was carried out on 79 follow up samples from 25 women who developed LEI-AG, and 149 follow up samples from 34 women with normal cytology. HPV detection was made with PCR-EIA GP5+/GP6+ and RLB. TA was measured with TRAP-ELISA. **Results:** Analysis revealed that out of the 25 cases, 8 were prevalent (enrolled in the study with LEI-AG), and the remaining 17 incidental (lesion was detected during follow up). Among these 17 women, 12 (70.5%) had, at diagnosis or during a previous checkup, TA and high-risk HPV (HPV-AR), primarily type α-9. Three women (17.7%) had transitory HPV infections, and 2 (11.8%) had neither HPV nor TA at diagnosis. Follow up on women with normal cytology revealed that only eight women (23.5%) had HPV and TA at the same time, 21/34 women (61.8%) had transitory HPV event during follow up, and 5 (14.7%) had no HPV during entirety of follow up. **Conclusions:** Detection of TA and simultaneous HPV-AR infection apparently predicts LEI-AR risk.

**Key words:** Human papillomavirus, telomerase, cervical cancer, follow-up studies

## Introducción

El cáncer cervical es el tercer cáncer más común en mujeres a escala mundial, con una estimación de 529.000 casos nuevos, de los cuales más del 85% ocurren en países en vías de desarrollo, y con 275.000 muertes reportadas en el 2008 (1). Varios estudios epidemiológicos han mostrado la fuerte relación que existe entre la infección con el virus del papiloma humano (VPH), en especial los VPH de alto riesgo, y el desarrollo de cáncer cervical y de sus lesiones precursoras. Sin embargo, aún no se conocen totalmente los mecanismos, ni los factores de riesgo que hacen que una lesión regrese, persista o progrese hacia cáncer cervical. La telomerasa es una enzima que ha sido asociada con procesos de inmortalización celular, y algunos estudios han mostrado niveles de su actividad elevados en diferentes tipos de cánceres (pulmón, páncreas, hepatocelular, próstata, piel y ciertos tumores gastrointestinales), mientras que en tejidos sanos sus niveles de actividad son muy bajos, casi ausentes, por lo cual algunos investigadores la han propuesto como un marcador de progresión (2-7).

Sin embargo, muy pocos estudios han analizado la actividad de telomerasa (AT) en pacientes con lesiones cervicales, y no hay ningún estudio de seguimiento a escala mundial en el cual se haya evaluado su actividad a lo largo del tiempo, con el fin de entender temporalmente y de manera más exacta su papel en la progresión tumoral. Adicionalmente, son muy pocos y contradictorios los

estudios que se han realizado sobre la asociación entre el VPH, la carga viral y la activación de la enzima, lo cual puede ser muy relevante en el proceso carcinogénico.

En Colombia, donde las tasas de incidencia en cáncer de cuello uterino son altas, en 1994 se inició un estudio de seguimiento de 2.200 mujeres de la población general, a las cuales se les hizo un análisis sobre el papel de la infección por VPH y de otros factores de riesgo en el desarrollo de lesiones cervicales, por un periodo de diez años (Cohorte de Bogotá, Colombia). Tener una cohorte con un seguimiento tan largo ofrece la gran oportunidad de analizar a lo largo del tiempo factores biológicos como la AT, que ha sido asociada con procesos de inmortalización celular y con progresión tumoral en algunos tipos de cánceres. Una investigación que contribuya al conocimiento de marcadores de progresión o regresión beneficiará no solo a la población infectada y a los pacientes con lesiones de bajo y alto grados, sino que brindará estrategias para desarrollar programas de prevención más eficientes, que ayuden a disminuir el número de casos y los costos de los tratamientos, principalmente para países en vías de desarrollo.

En este trabajo se reportan resultados de un análisis descriptivo de la AT y de la infección por VPH en el seguimiento de las mujeres que desarrollaron LEI-AG durante los seis primeros años del estudio y en un grupo de mujeres que durante el seguimiento siempre obtuvieron en sus citologías un resultado normal en la cohorte de Bogotá.

## Métodos

A finales de 1993, el Instituto Nacional de Cancerología comenzó un estudio de seguimiento sobre la historia natural del virus del papiloma humano, su papel y el de otros cofactores en el desarrollo de cáncer de cuello uterino. La forma como se realizó el reclutamiento y la colección de los datos es descrito por Molano y colaboradores (8). Brevemente, entre noviembre de 1993 y 1995 se realizó un censo en cuatro diferentes centros de salud en Bogotá, Colombia. Dos mil mujeres entre 18-85 años fueron identificadas al azar e invitadas a participar. Adicionalmente, 200 mujeres entre los 13-17 años que asistían a Profamilia fueron incluidas en el estudio.

Al comienzo del estudio, todas las mujeres respondieron a un cuestionario detallado y asistieron a una consulta ginecológica, en la cual se les realizó un cepillado cervical para hacer un análisis citológico y para detectar principalmente infecciones por VPH y otros agentes de transmisión sexual. También, se les tomó una alícuota de 10 ml de sangre para hacer análisis de anticuerpos. Se obtuvo consentimiento escrito de todas las participantes; el comité ético y de investigaciones del Instituto Nacional de Cancerología y la International Agency for Research on Cancer (IARC) aprobaron el protocolo del estudio. De las 2.200 mujeres invitadas a participar, 53 se rehusaron en participar y 8 fueron consideradas no elegibles (enfermedad mental, histerectomía, historia de lesión uterina); así, quedaron 2.139 mujeres.

El seguimiento consistió en una visita cada seis a nueve meses en promedio, hasta marzo del 2004, o cuando se obtuvo un diagnóstico de NIC III por biopsia. En cada visita se realizó un cuestionario corto y se obtuvo un raspado cervical para realizar análisis citológico y detección de VPH de manera similar a como se hizo en la primera visita. Los resultados sobre VPH no se conocieron durante el seguimiento y no influyeron en el manejo clínico. Se realizó colposcopia en todas las mujeres que tuvieron un diagnóstico citológico repetido de LEI-BG o una evidencia citológica de LEI-AG. Se realizaron biopsias cervicales dirigidas por colposcopia a aquellas mujeres con evidencia de LEI-AG. Las mujeres con diagnóstico confirmado de NIC III debieron recibir el tratamiento adecuado.

Para este estudio se seleccionaron todos los casos observados durante los primeros seis años de seguimiento. Se escogieron como casos las mujeres que tuvieron un diagnóstico citológico de LEI-AG en su citología o una biopsia confirmada de CIN2/ CIN3. De 38 casos que fueron identificados, solo 25 tuvieron suficiente muestra para analizar la actividad de la telomerasa. Adicionalmente, se analizaron las muestras del seguimiento de 34 mujeres, que obtuvieron siempre citología normal durante el seguimiento, apareadas por edad con los casos y con o sin infección por VPH.

### *Detección de VPH por PCR y tipificación (PCR-EIA)*

El análisis de VPH se realizó usando los iniciadores GP5+/GP6+bio específicos para el gen L1 del VPH. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 140 pares de bases. La detección tipo específica se basó en el ensayo de Enzyme Immune Assay (EIA), desarrollado por Jacobs y colaboradores en 1997, y en el ensayo de Reverse Line Blot (RLB), desarrollado por Van Den Brule y colaboradores en 2002 (9,10).

En breve, las muestras positivas para VPH están sujetas a un análisis específico de grupo, usando un coctel de sondas para VPH de alto riesgo y otro coctel de sondas para VPH de bajo riesgo, mediante un EIA. Las muestras positivas para cada uno de los grupos son analizadas mediante un RLB para la tipificación de 37 tipos de VPH. Los datos de los resultados de la detección y tipificación de VPH se almacenaron en una base de datos exclusiva del estudio.

### *Procesamiento de la muestra para la medición de AT*

Para obtener las células exfoliadas del raspado cervical se utilizó la metodología usada por Ault K. A. y colaboradores en 2005 (11). Inicialmente, se realizó una alícuota de 300 µl del cepillado cervical que se encontraba en el banco de muestras, y se centrifugó a 4 °C. Posteriormente, se adicionó tripsina para la disociación de las células con una incubación a 37 °C por 5 minutos, se realizaron dos lavados con PBS 1X + SFB 2% para inactivar la tripsina, después

se centrifugó la alícuota a 4 °C por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet a -70 °C, hasta su uso en el desarrollo del ensayo TRAP (telomeric repeat amplification protocol). El conteo de células se realizó con una cámara de Neubauer.

El análisis de la AT se realizó mediante el ensayo TRAP, con el uso de una prueba comercial: Telo TAGGG Telomerasa PCR ELISA, desarrollado por Roche Applied Science (12). El ensayo se basa en tres pasos principales: elongación, amplificación y detección por ELISA, y se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Las placas fueron leídas a una longitud de onda de 450 nm con una referencia de longitud de onda de 690 nm. El valor de la absorbancia final fue obtenido por la sustracción de los datos de la medición de 690 nm a los de 450 nm, considerando una muestra positiva cuando la densidad óptica fue superior o igual a 0,20.

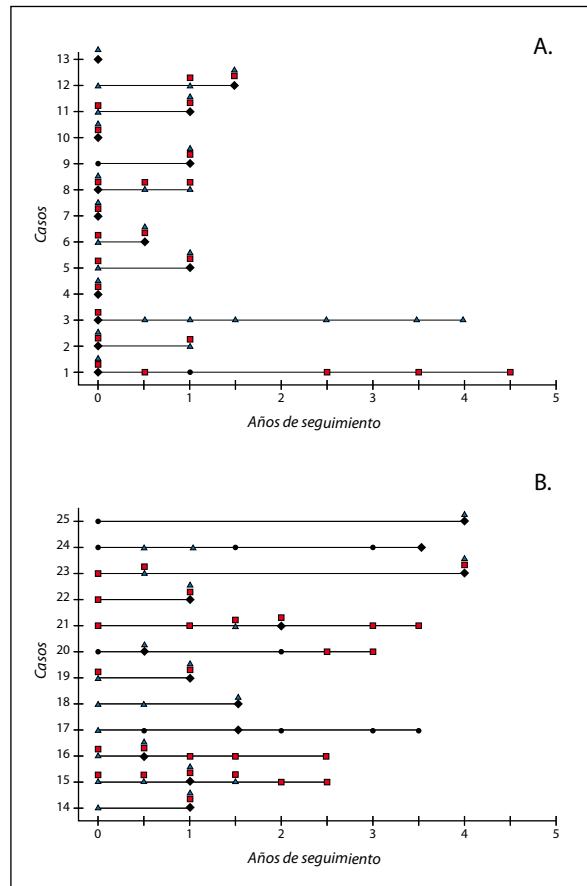
Se analizaron 79 muestras del seguimiento de 25 mujeres que desarrollaron LEI-AG y 149 muestras del seguimiento de 34 mujeres con citología normal. Se realizó una descripción en el tiempo de la AT y su relación con la infección con VPH y el diagnóstico citológico a partir del desarrollo de figuras, en las que se describen estas variables a lo largo del tiempo para cada mujer. Estas figuras no han sido descritas en ninguna parte y específicamente consisten en la descripción en el eje de las Y, de cada uno de los casos encontrados en el estudio, y en el eje de las X del seguimiento de estos casos a lo largo del tiempo. Se desarrollan líneas rectas horizontales para cada caso, que abarcan el tiempo en que fue seguida cada mujer y sobre esta línea se ubica la información de la infección por VPH, la actividad de la telomerasa y el diagnóstico citológico que fue obtenida en cada visita. Esto permite realizar la descripción de diferentes casos en una misma gráfica, así como la comparación de diferentes variables intra- e intercasos a lo largo del tiempo de seguimiento.

Adicionalmente, se realizaron tablas que permitieron describir frecuencias y porcentajes del comportamiento de la AT, el tipo de infección por VPH y la carga viral a lo largo del tiempo.

## Resultados

### *Seguimiento de las mujeres que desarrollaron LEI-AG ("Casos")*

Para el análisis descriptivo de la AT y la infección por VPH en el tiempo se analizaron todas las muestras tomadas durante el seguimiento de cada una de las 25 mujeres que desarrollaron LEI-AG y que fueron denominadas como casos. De las 25 mujeres, 8 fueron consideradas como casos prevalentes, es decir, ingresaron al estudio con la LEI-AG; de estas, 4 no tuvieron seguimiento (casos 4, 7, 10 y 13) y solo se tienen los datos de la visita en la que se diagnosticó la LEI-AG, y 4 tenían seguimiento



**Figura 1.** Esquema del seguimiento de los casos

(A) Seguimiento de los casos 1 al 13. (B) Seguimiento de los casos 14 al 25. El tiempo cero es considerado el momento en que fue tomada la muestra al ingresar al estudio. En promedio, las visitas fueron realizadas cada nueve meses. Resultado ● Citología normal, ◆ LEI-AG, ■ Actividad de telomerasa (+), ▲ Infección con VPH (+). La línea recta abarca el tiempo en que fue seguida cada mujer, y sobre ella se ubican las convenciones en el momento en que se tomó la muestra en cada visita.

posterior a la detección de la lesión (1, 2, 3, 8). Las 17 mujeres restantes fueron consideradas como casos incidentes, ya que la detección de la lesión se presentó durante el seguimiento. Un resumen de lo observado en el seguimiento de los casos se consignó de modo esquemático en la figura 1, teniendo en cuenta adicionalmente el tiempo que transcurrió entre cada una de las visitas.

Como se comentó anteriormente, ocho de los casos (1, 2, 3, 4, 7, 8, 10 y 13) fueron muestras que ingresaron al estudio con la LEI-AG; por lo tanto, no es posible describir eventos anteriores a la aparición de la lesión. En estas mujeres se puede observar que seis de ellas (75%) tuvieron infección por VPH y AT al mismo tiempo en que se detectó la lesión, una tuvo infección solo por VPH (12,5%) y otra solo AT (12,5%). En los 17 casos restantes con lesiones incidentes se puede observar que doce (70,5%) tuvieron la infección por VPH-AR y la AT al mismo tiempo en que se detectó la lesión o en una visita anterior (5, 6, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 19, 21, 22 y 23); tres (17,7%) mostraron solo infección por VPH (18, 20, y 25) y dos (11,8%) no tuvieron presencia de VPH ni AT al momento en que se detectó la lesión (17 y 24).

En la tabla 1 se encuentran consignados los datos obtenidos en cuanto a AT en densidades ópticas (OD) y el tipo de infección por VPH en las muestras analizadas. De manera global, se puede observar que de los casos prevalentes con seguimiento (1, 2, 3 y 8), los casos 1, 2 y 8 tenían infección por VPH y AT al inicio; esta última se mantuvo positiva en el tiempo, a pesar de que en un caso hubo eliminación de la infección (caso 1). El caso 3 fue positivo solamente para AT en la lesión, pero en citologías posteriores esa característica desapareció y se detectó una infección por VPH-16 que fue persistente hasta la última visita analizada. De los 17 casos incidentes, 9 (53%) ya presentaban AT e infección por VPH en la visita inmediatamente anterior a que se presentara la lesión (casos 5, 6, 11, 12, 15, 16, 19, 21 y 23). En todos estos casos se observó persistencia de las infecciones y/o positividad de la AT en dos o más visitas consecutivas. En los casos 21 y 23 fue evidente la AT desde la primera visita del estudio, sin que la infección por VPH fuera detectada, y en el caso

21 fue posible evidenciar la infección transitoria por VPH-35 una visita antes de que se presentara la lesión y el resultado positivo constante de AT en todas las visitas.

En los casos 9, 14 y 22 se detectó la LEI-AG en la segunda y última visita, en la que se presentó tanto la infección por VPH como la AT; sin embargo, en la visita previa de cada caso no hubo un patrón definido de detección de AT y de infección por VPH.

Cuando se presentó la LEI-AG en los casos 18, 20 y 25 se detectó la infección por VPH y no la AT; sin embargo, solo en el caso 18 fue evidente la infección desde antes de presentarse la lesión. En los casos 17 y 24 cuando se presentó la LEI-AG no hubo evidencia ni de VPH, ni de telomerasa, aunque en visitas previas, en ambos casos se reportó infección por VPH-55 y VPH-70, respectivamente.

En general, es importante notar en este grupo de muestras que cuando se presentó la infección por VPH, se evidenció la presencia de tipos virales que pertenecen al grupo de alto riesgo (92%), en su mayoría a la especie -9 (80%), y persistencia de las infecciones. Como se mencionó anteriormente, en los casos 17 y 24 se presentaron infecciones simples por VPH-BR (caso 17, visita 1; caso 24, visitas 2 y 3) y dos mujeres presentaron infecciones múltiples combinadas por VPH-BR y VPH-AR (caso 16, visita 2, y caso 20, visita 2).

Es relevante anotar que las mediciones de AT en densidades ópticas varían notoriamente entre casos, incluso cuando se valoran muestras de una misma mujer con rangos en las positivas desde 0,205 hasta 1,494. Así mismo, es importante mencionar que de las 79 muestras analizadas, 50 (63,3%) tuvieron AT. En cuanto a las mujeres positivas para VPH, se observan valores de densidades ópticas que van desde 0,201 hasta 2,552, aunque la mayoría de las muestras del seguimiento de los casos presentaron infecciones con carga viral alta (72,3% de las muestras positivas). Sin embargo, en este trabajo no se observó una relación clara del resultado positivo para AT con la presencia de algún virus de VPH específico, ni con la carga viral.

**Tabla 1.** Actividad de telomerasa e infección por VPH en el seguimiento de los casos

En la primera columna se enumera cada caso, en la segunda se encuentran en número y la cantidad de visitas analizadas por cada caso, en la tercera se encuentran los datos obtenidos de la ELISA para actividad de telomerasa y en la cuarta se encuentra la tipificación de VPH en cada muestra con la carga viral medida por ELISA. La actividad de telomerasa es positiva si la OD es  $\geq 0,20$ .

Caso	Visita	Telomerasa (OD)	Infección por tipo VPH (OD Carga Viral)	Caso	Visita	Telomerasa (OD)	Infección por tipo VPH (OD Carga Viral)
1	1	0,384	31 (2,221)	16	1	0,209	81 (2,470)
	2	0,253	-		2	1,364	58-81 (2,460-0,730)
	3	0,056	-		3	0,211	-
	4	0,217	-		4	0,602	-
	5	0,212	-		5	0,220	-
	6	0,224	-	17	1	0,057	55 (0,280)
2	1	0,564	AR (1,200)		2	0,108	-
	2	0,205	31 (0,740)		3	0,047	-
3	1	0,254	-		4	0,100	-
	2	0,086	16 (2,340)		5	0,155	-
	3	0,115	16 (1,880)		6	0,122	-
	4	0,064	16 (2,100)	18	1	0,103	33-58 (2,430-1,250)
	5	0,055	16 (2,210)		2	0,057	33-58 (2,360-1,850)
	6	0,060	16 (1,890)		3	0,051	33-58 (2,410-2,420)
4	1	0,266	16-26 (0,201-1,750)	19	1	0,490	33 (1,970)
5	1	0,251	16 (1,871)		2	1,494	31-33-58 (0,310-2,150-1,220)
	2	0,261	16 (0,470)	20	1	0,082	-
6	1	0,214	33 (2,199)		2	0,146	39-11 (2,470-2,400)
	2	0,265	31-33-58 (0,620-2,460-2,270)		3	0,066	-
7	1	0,256	31-33-58 (0,330-2,430-2,400)		4	0,457	-
8	1	0,530	51 (0,783)		5	0,284	-
	2	0,252	58-51 (0,490-0,450)	21	1	0,288	-
	3	0,725	51 (1,010)		2	0,225	-
9	1	0,053	-		3	0,211	35 (0,450)
	2	0,605	52 (2,480)		4	0,320	-
10	1	1,199	33 (2,552)		5	0,241	-
11	1	0,253	58 (2,398)		6	0,224	-
	2	0,449	58 (2,480)	22	1	0,206	-
12	1	0,054	51 (2,350)		2	0,790	31 (2,010)
	2	0,206	51 (0,420)	23	1	0,212	-
	3	0,284	51 (2,430)		2	0,215	33 (0,700)
13	1	0,035	16 (2,504)		3	0,597	33 (2,400)
14	1	0,077	31-33 (0,247-2,240)	24	1	0,056	-
	2	0,286	31-33 (1,190-2,470)		2	0,086	70 (0,600)
15	1	0,205	52 (0,794)		3	0,054	70 (0,820)
	2	0,404	52 (2,350)		4	0,097	-
	3	0,266	52 (1,960)		5	0,060	-
	4	0,372	52 (2,400)		1	0,122	-
	5	0,333	-		2	0,096	45 (2,470)
	6	0,218	-				

OD: Densidad óptica. -: Negativo para infección.



### *Seguimiento de las muestras de mujeres con citología normal ("controles")*

Para el seguimiento de las mujeres con citología normal se analizaron muestras de 34 mujeres que durante todo el seguimiento tuvieron citología normal con o sin infección por VPH. En total, se analizaron 149. En la tabla 2 se encuentran consignados los datos obtenidos sobre AT y la infección de VPH de las muestras analizadas.

El seguimiento de las mujeres con citología normal mostró que solo 8/34 mujeres tuvieron infección por VPH y AT al mismo tiempo (23,5%); 21/34 mujeres (61,8%) tuvieron eventos transitorios de infección durante el seguimiento por VPH-AR simples o múltiples en combinación con VPH-BR; solamente 12 (35,2%) de estas mujeres (controles 3, 4, 7, 8, 9, 17, 19, 21, 26, 28, 31 y 33) fueron positivas para la AT independiente de la presencia de la infección en alguna visita durante el seguimiento, y 5/34 mujeres (14,7%) no tuvieron infección VPH durante el seguimiento.

Es interesante mostrar que ocho controles nunca fueron positivos para actividad de telomerasa durante el seguimiento, a pesar de tener infecciones por VPH-AR (controles 10, 11, 13, 14, 15, 25, 27 y 30).

Como casos particulares, se describirá el seguimiento de los controles 19, 21 y 33, ya que se observan características específicas de ellos. El control 19 presenta el seguimiento más largo de todos los controles analizados, que cuenta con trece visitas. Durante el tiempo del seguimiento en este control se presentaron diferentes tipos de infecciones; predominaron infecciones simples de VPH-BR. Debe notarse un lapso intermedio del seguimiento en el que cuatro visitas fueron positivas para la AT (visitas 6, 7, 8 y 9). En visitas posteriores, cuando se detectó la infección por un tipo viral de alto riesgo, la actividad enzimática cesó y se mantuvo en esa condición hasta el final del seguimiento.

El control 21 presentó AT desde dos visitas previas a la detección del VPH-16, posteriormente se eliminó esta infección y no hubo actividad enzimática. Durante las últimas visitas (6-9) hubo una nueva infección, pero esta vez de un

tipo de VPH-BR; la AT nuevamente se aumentó hacia la visita 8 y permaneció activa hasta el final del seguimiento. El control 33 presentó un comportamiento más uniforme, tanto en AT como en infección por VPH. La infección se detectó una visita antes de que se evidenciara la AT, y en visitas posteriores permanecieron tanto la infección como la AT. El tipo que estaba infectando esta muestra era el VPH-58, el cual se eliminó después de la quinta visita. De manera interesante, en los nueve controles (1, 5, 6, 12, 16, 20, 29, 32 y 34) que tuvieron en alguna de las visitas infección simple con VPH-BR, ni antes, ni después de presentarse este evento se observó AT. Los controles 2, 18, 22, 23 y 24 fueron negativos durante todo el seguimiento para la infección con VPH; de estos tres permanecieron negativos para AT durante todo el seguimiento (controles 22, 23 y 24) y dos tuvieron alguna visita positiva.

Las mediciones de AT en densidades ópticas en este grupo de mujeres muestran rangos en las positivas desde 0,221 hasta 0,827. Es importante mencionar que de las 149 muestras analizadas solamente 28 (18,8%) tuvieron AT. En cuanto a las mujeres positivas para VPH se observan valores de densidades ópticas que van desde 0,120 hasta 3,29. De estas infecciones, el 50% tuvieron una carga viral alta.

### **Discusión**

Un estudio que mide la AT en el tiempo, teniendo en cuenta muestras de una misma mujer, no ha sido publicado. Este es el primer estudio de seguimiento en el que se hace una descripción en el tiempo sobre la AT y la infección con el VPH en mujeres que desarrollaron LEI-AG y en mujeres que durante todo el seguimiento tuvieron citología normal. De manera general, se observa una diferencia notoria en el seguimiento de las muestras tomadas como casos y las muestras de los controles en cuanto a la detección de la AT y a la infección por VPH. Los tipos de VPH que se encontraron infectando las muestras del seguimiento de los casos fueron predominantemente de VPH-AR de la especie -9, mientras que en las muestras del seguimiento de los controles se presentaron infecciones con tipos variados de alto y de bajo riesgo. Así mismo, las

**Tabla 2.** Actividad de telomerasa e infección por VPH en el seguimiento de los controles

En la primera columna se enumera cada control, en la segunda se encuentran en número y la cantidad de visitas analizadas por cada control, en la tercera se encuentran los datos obtenidos de la ELISA para actividad de telomerasa y en la cuarta se encuentra la tipificación de VPH en cada muestra con la carga viral medida por ELISA. La actividad de telomerasa es positiva si la OD es  $\geq 0,20$ .

Control	Visita	Telomerasa (OD)	Infección por tipo VPH (OD Carga Viral)	Control	Visita	Telomerasa (OD)	Infección por tipo VPH (OD Carga Viral)
1	1	0,061	-	11	1	0,157	-
	2	0,051	40 (0,360)		2	0,048	42 (0,650)
2	1	0,235	-		3	0,054	-
	2	0,387	-		4	0,090	-
	3	0,113	-		5	0,058	18-26 (2,950-1,680)
3	1	0,331	-		6	0,064	18-26 (2,400-0,180)
	2	0,060	66 (2,030)		7	0,092	-
	3	0,115	66 (2,280)	12	1	0,047	-
	4	0,092	-		2	0,168	-
4	1	0,288	-		3	0,054	-
	2	0,223	16-26 (2,440-2,400)		4	0,059	-
	3	0,133	-		5	0,076	42 (1,190)
5	1	0,051	-		6	0,053	-
	2	0,119	54 (1,100)	13	1	0,075	-
	3	0,059	-		2	0,067	51 (0,250)
6	1	0,046	-		3	0,051	-
	2	0,064	CP6108 (0,380)	14	1	0,064	-
	3	0,166	-		2	0,047	58 (2,320)
7	1	0,072	-		3	0,124	-
	2	0,275	-	15	1	0,047	-
	3	0,102	-		2	0,048	42-18 (0,740-0,670)
	4	0,056	-		3	0,098	-
	5	0,050	-		4	0,050	-
	6	0,281	16 (0,250)		5	0,047	-
	7	0,142	-	16	1	0,464	-
8	1	0,175	-		2	0,065	-
	2	0,050	18-84-CP6108 (0,710-0,440-1,240)		3	0,153	82 (0,260)
	3	0,046	44-83-84 (0,470-1,500-2,930)		4	0,151	-
	4	0,422	-	17	1	0,158	-
9	1	0,090	-		2	0,053	-
	2	0,827	45-52-40 (0,110-0,120-2,930)		3	0,107	-
	3	0,123	-		4	0,054	-
10	1	0,047	-		5	0,322	56 (3,000)
	2	0,048	18-58 (2,120-2,330)		6	0,093	56 (2,260)
	3	0,058	-		7	0,316	-
18	1	0,052	-	18	1	0,052	-
	2	0,068	-		2	0,068	-
	3	0,278	-		3	0,278	-
	4	0,058	-		4	0,058	-
	5	0,051	-		5	0,051	-

OD: Densidad Óptica. -: Negativo para infección.

(Continúa en la pág. 35)



(Viene de la pág. 34)

Control	Visita	Telomerasa (OD)	Infección por tipo VPH (OD Carga Viral)
19	1	0,055	-
	2	0,159	-
	3	0,081	81 (2,290)
	4	0,052	45-43-81 (2,270-0,710-2,260)
	5	0,054	-
	6	0,467	-
	7	0,639	43 (3,290)
	8	0,561	43 (2,750)
	9	0,389	43 (0,590)
	10	0,110	-
	11	0,184	45-43 (0,380-3,190)
	12	0,106	43 (2,830)
	13	0,074	AR-43 (0,240-2,62)
20	1	0,055	-
	2	0,059	-
	3	0,140	81 (2,450)
	4	0,192	81 (1,320)
	5	0,144	81 (2,290)
	6	0,142	81 (2,260)
	7	0,159	-
21	1	0,063	-
	2	0,047	-
	3	0,228	-
	4	0,310	-
	5	0,260	16 (0,290)
	6	0,074	72 (0,760)
	7	0,157	72 (0,270)
	8	0,283	72 (0,480)
	9	0,468	-
22	1	0,049	-
	2	0,052	-
	3	0,054	-
23	1	0,050	-
	2	0,069	-
	3	0,130	-
	4	0,100	-
24	1	0,071	-
	2	0,162	-
	3	0,083	-

Control	Visita	Telomerasa (OD)	Infección por tipo VPH (OD Carga Viral)
25	1	0,083	-
	2	0,074	52 (2,910)
	3	0,086	52 (0,540)
26	1	0,475	-
	2	0,194	66 (0,610)
	3	0,046	-
27	1	0,188	-
	2	0,130	45-40 (0,420-0,110)
	3	0,046	-
28	1	0,088	-
	2	0,163	-
	3	0,077	-
	4	0,080	31 (0,640)
	5	0,221	-
29	1	0,067	-
	2	0,053	42 (0,540)
	3	0,047	-
30	1	0,067	-
	2	0,097	16 (1,360)
	3	0,124	-
31	1	0,553	-
	2	0,268	18-26 (0,380-2,170)
	3	0,049	-
32	1	0,086	-
	2	0,064	42 (0,720)
	3	0,063	-
33	1	0,064	-
	2	0,059	58 (2,350)
	3	0,310	58 (2,430)
	4	0,387	58 (2,240)
	5	0,161	58 (2,280)
	6	0,498	-
34	1	0,093	-
	2	0,166	54 (2,440)
	3	0,049	-

mujeres que desarrollaron las LEI-AG tuvieron un mayor número de infecciones persistentes por algunos tipos de VPH-AR que las mujeres con citología normal.

Estos resultados son comparables a otros reportes de la misma cohorte y estudios de seguimiento en los que se observa que la persistencia de infecciones por algunos tipos específicos de alto riesgo pueden aumentar el riesgo de desarrollar LEI-AG y cáncer cervical (13-15). Así mismo, en los casos se observó un mayor porcentaje de muestras con cargas virales altas que en las muestras del seguimiento de las mujeres con citología normal, resultados que apoyan el posible papel que pueda desempeñar la carga viral en la persistencia de las infecciones y en el riesgo de desarrollar LEI-AG (15-18).

Adicionalmente, la positividad hacia la AT fue mucho mayor en las muestras del seguimiento de las mujeres que desarrollaron LEI-AG (63,3%) que en el seguimiento de las mujeres control (18,8%). Resultados que están de acuerdo con los pocos estudios transversales en los que se ha medido la AT en muestras de mujeres con citología normal y/o con diferentes grados de lesiones cervicales en los que se observa que la AT está muy aumentada en mujeres con LEI-AG o muestras de cáncer, en comparación con las mujeres con citologías normales (11,19,20).

Es importante mencionar que 12 de los 17 casos incidentes tuvieron la infección con VPH-AR y AT al mismo tiempo o antes de presentarse la lesión (70,5%), y en 9 de estos casos se observó persistencia de las infecciones y positividad de la AT a lo largo del tiempo. Al contrario, en las mujeres con citología normal solo un 23,5% tuvieron infección por VPH y AT al mismo tiempo, y solo en una de estas mujeres se observó persistencia de la infección por un VPH-AR con eventos transitorios de positividad de la AT. Estas observaciones son de gran relevancia, ya que detectar la presencia de VPH y la AT al mismo tiempo parece predecir un mayor riesgo de desarrollar una LEI-AG que el riesgo que se tiene al detectar solo la infección por VPH o la AT, y este riesgo se aumenta al detectar a lo largo del tiempo la persistencia de la infección y una positividad constante de AT.

En la actualidad se está proponiendo usar la prueba de VPH en la tamización, ya que ha mostrado una alta sensibilidad para la detección de lesiones cervicales; sin embargo, hay resultados controversiales en cuanto a la especificidad, por lo que se propone que el uso adjunto de la técnica para medición de AT podría aumentar la especificidad en la detección de lesiones, sin verse afectada la sensibilidad en gran medida. Sin embargo, es necesario realizar un mayor número de estudios en los que se evalúen las características operativas de la técnica para medir la AT, la sensibilidad, la especificidad, como el valor predictivo positivo y negativo, para que pueda ser usada como prueba diagnóstica adjunta o no a la prueba de detección de VPH.

Las investigaciones realizadas hasta el momento que han tratado de encontrar una asociación entre la infección con VPH y la AT son muy pocas, y las que se han realizado han analizado asociaciones entre la activación de la enzima y los tipos VPH-16 y 18. Con este trabajo se evidencia que otros tipos relacionados filogenéticamente con el tipo 16 pueden activar la enzima; sin embargo, se necesitan ensayos funcionales para respaldar estos resultados. La activación de la enzima por el VPH ha sido atribuida específicamente a la oncoproteína E6 de los VPH AR, debido a que esta oncoproteína puede actuar como un factor de transcripción y unirse a sitios específicos en la región reguladora del promotor de hTERT, concretamente a las cajas E, a las cuales se une también el factor *cmyc* para aumentar la expresión génica (21).

Si bien aún no es muy clara la participación de la oncoproteína E7 en la activación de la telomerasa, esta parece actuar de manera sinérgica con E6. Otros factores virales pueden influir en que haya o no AT, un ejemplo claro es el estado de integración del virus. Cuando el genoma viral es mantenido en forma de episoma, la proteína E2 es expresada de manera constante y puede funcionar como un inhibidor de la transcripción de hTERT. De manera contraria, cuando el VPH es integrado en el genoma del hospedero hay un aumento notorio en la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (22), y como se mencionó anteriormente, estas oncoproteínas son potentes inductores de la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa. También, la regulación

epigenética de genes virales y del gen hTERT es importante de evaluar.

Estudios recientes han mostrado que la metilación del genoma viral puede afectar las características que regulan el control de la transcripción y la replicación (23-26). En la mayoría de los estudios se ha observado que el grado de metilación del genoma viral es más alto en la mayoría de sus regiones en carcinomas que en lesiones cervicales precancerosas (23-25). Aunque no se ha analizado en detalle, el patrón incrementado de metilación en algunos de esos estudios podría ser explicado por la integración del genoma viral en el huésped celular, ya que dicho estado ha sido asociado en repetidas ocasiones con la hipermetilación del genoma viral (24,25). Por otro lado, estudios sobre la regulación epigenética del gen hTERT han mostrado que el centro regulador del promotor de hTERT y su región exónica proximal pueden ser metilados, lo cual impide la unión de factores inhibidores de la transcripción como CTCF (27). Adicionalmente, De Wilde y colaboradores, en otro reporte en el 2010, observaron hipermetilación en estas dos regiones y las correlacionaron con un aumento en la transcripción de hTERT en células inmortalizadas por el virus del papiloma humano y con el estadio de la enfermedad (28).

En nuestro estudio fue evidente que la infección con VPH-BR no promueve la activación de la enzima, ya que nueve de los controles tuvieron infecciones simples con alguno de los tipos de este grupo, y ni antes ni después de la infección se evidenció AT, lo cual concuerda con estudios funcionales que han usado la proteína E6 de VPH-6 como factores de transcripción para hTERT y han concluido que las proteínas de VPH-BR no son capaces de activar el promotor de este gen (29).

Algunos estudios han reportado previamente que los niveles de AT pueden aumentar a medida que progresa la lesión cuando se analizan muestras de mujeres con diferentes diagnósticos (11). Sin embargo, en nuestro estudio se observaron patrones variables, y no fue posible ver un patrón definido en los niveles de AT (medida en OD) entre los casos evaluados ni entre las muestras de una misma paciente. Probablemente el aumento en el nivel de

AT en una misma mujer a medida que progresa en el estado de su enfermedad no sea fácilmente evidenciable y dependa de un método cuantitativo para poder observar este efecto.

Debe notarse que en el seguimiento de los controles, aunque se presentaron mujeres con infecciones de VPH-AR, estas nunca presentaron AT (controles 10, 11, 13, 14, 15, 25, 27 y 30), y de igual forma se observaron mujeres con actividad de telomerasa en alguna de las visitas, sin que necesariamente coincidieran con la infección (controles 3, 4, 7, 8, 9, 17, 18, 19, 21, 26, 28, 31 y 33). Durante los siete años de seguimiento ninguna de estas mujeres desarrolló lesiones cervicales, lo que concuerda con el hecho de que el porcentaje de muestras positivas para AT y VPH al mismo tiempo, así como su persistencia en el tiempo, sea mucho menor en este grupo.

En este trabajo se encontraron muestras que eran negativas para la infección con VPH y negativas para el diagnóstico de algún tipo de lesión; sin embargo, se mostraron positivas para la AT. Este fenómeno se evidenció en otros estudios en los que se evaluó tejido de pacientes sanos para comparar los resultados con biopsias de pacientes con cáncer (30), lo que muestra que un número muy bajo de mujeres sin ningún tipo de lesión o de infección pueden tener un nivel de AT basal.

Estudios recientemente publicados han reportado que aspectos en el estilo de vida de las personas, como la alimentación, el estado, la exposición a estrés emocional y el nivel de actividad física pueden producir cambios en la AT (31,32); estos factores no fueron valorados en el estudio y pueden estar involucrados como factores propios de cada paciente con capacidad moduladora de la actividad enzimática y otros aspectos metabólicos.

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad no hay trabajos de seguimiento con los que sea posible comparar los resultados observados en nuestro estudio, aunque hay un trabajo que trató de evaluar la amplificación génica de hTR (TERC) como un marcador de progresión, evaluando muestras provenientes de una misma mujer; la investigación en mención fue la realizada por Heselmeyer H. y colaboradores (33).

En este estudio de tipo retrospectivo se tenía por objetivo evaluar si la detección de copias adicionales de TERC en NIC I y NIC II podía ser utilizada como una herramienta para distinguir entre las lesiones que progresan de las que no. Se estudió el número de copias presentes del gen TERC en tres grupos de muestras mediante hibridación *in situ* fluorescente; el primer grupo se denominó de “progresoras”, es decir, muestras que tenían un diagnóstico de NIC III y que en citologías anteriores eran NIC I o II; el segundo, “regresoras”, es decir, muestras que tenían un diagnóstico de NIC I o II y en citologías posteriores fueron normales; y el grupo de “progresoras negativas”, es decir, muestras de mujeres con citología normal, pero que en un transcurso de menos de tres años desarrollaron cáncer.

Ellos observaron que las “progresoras” y las “progresoras negativas” mostraron ganancias en TERC (3q26), mientras que en las “regresoras” no fue evidente esta anomalía genética. Nuevamente de manera indirecta estos resultados pueden indicar que hay activación de la telomerasa en aquellas mujeres que son susceptibles al desarrollo de LEI-AG. Ellos concluyeron que cuantificar el número de copias de 3q26 podría servir como un marcador de progresión de lesiones cervicales, aunque no evaluaron la infección por VPH.

Nuestro estudio tuvo la ventaja de tener mediciones de AT y de VPH por un largo tiempo de seguimiento, y mostró que detectar la AT y la infección por VPH al mismo tiempo y con persistencia en su detección fue un evento más frecuente en el grupo de los casos que en el grupo de mujeres con citología normal. Estos resultados apoyan la propuesta de que detectar AT y VPH-AR simultáneamente y a lo largo del tiempo podría ayudar a identificar mujeres con LEI-AG o aquellas que están en riesgo de desarrollar una LEI-AG.

## Agradecimientos

Agradecimientos especiales a las participantes del estudio, ginecólogos, enfermeras y trabajadores sociales que colaboraron en el trabajo de campo. A Álvaro Muñoz, del Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health en Estados

Unidos, por la novedosa idea dada para realizar el análisis descriptivo de los datos a partir del desarrollo de “*case plot follow up figures*”. Este trabajo fue financiado por Colciencias Grant 331/2007 y fondos del Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia.

## Financiación

Este trabajo fue financiado por Colciencias Grant 331/2007 y fondos del Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia.

## Referencias

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-917.
2. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, et al. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res*. 1997;57:326-31.
3. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:895-902.
4. Kawai J, Koda Y, Fujiwara M, et al. Telomerase activity as prognostic factor in gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:959-64.
5. Nouse K, Urabe Y, Higashi T, et al. Telomerase as a tool for the differential diagnosis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1996;78:232-6.
6. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, et al. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res*. 1996;56:218-22.
7. Taylor RS, Ramírez RD, Ogoshi M, et al. Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. *J Invest Dermatol*. 1996;106:759-65.
8. Molano M, Posso H, Weiderpass E, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*. 2002;87:324-33.
9. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, et al. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol*. 1997;35:791-5.
10. van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, et al. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*. 2002;40:779-87.

11. Ault KA, Allen HK, Phillips SL, et al. Telomerase activity as a potential diagnostic marker for triage of abnormal Pap smears. *J Low Genit Tract Dis.* 2005;9:93-9.
12. ROCHE, Applied Science. Instruction Manual: Telo TA-GGG Telomerase PCR ELISA Cat. No. 11854666910. 1-21. 1-11-2004. Ref Type: Generic
13. Kjær SK, Frederiksen K, Munk C, et al. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:1478-88.
14. Sundström K, Eloranta S, Sparén P, et al. Prospective study of human papillomavirus (HPV) types, HPV persistence, and risk of squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:2469-78.
15. Muñoz N, Hernández-Suárez G, Méndez F, et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer.* 2009;100:1184-90.
16. Mesher D, Szarewski A, Cadman L, et al. Long-term follow-up of cervical disease in women screened by cytology and HPV testing: results from the HART study. *Br J Cancer.* 2010;102:1405-10.
17. Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, et al. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J Clin Virol.* 2006;35:270-7.
18. Snijders PJ, Hogewoning CJ, Hesselink AT, et al. Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology. *Int J Cancer.* 2006;119:1102-7.
19. Sharma A, Rajappa M, Saxena A, et al. Telomerase activity as a tumour marker in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Mol Diagn Ther.* 2007;11:193-201.
20. Skvortsov DA, Gasparian NM, Rubtsova MP, et al. Telomerase as a potential marker for early diagnosing cervical carcinoma. *Dokl Biochem Biophys.* 2006;408:158-60.
21. Katzenellenbogen RA, Egelkrout EM, Vliet Gregg P, et al. NFX1 123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol.* 2007;81:3786-96.
22. Lee D, Kim HZ, Jeong KW, et al. Human papillomavirus E2 down regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter. *J Biol Chem.* 2002;277:27748-56.
23. Ding DC, Chiang MH, Lai HC, et al. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;147:215-20.
24. Fernández AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, et al. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res.* 2009;19:438-51.
25. Kalantari M, Villa LL, Calleja-Macias IE, et al. Human papillomavirus-16 and -18 in penile carcinomas: DNA methylation, chromosomal recombination and genomic variation. *Int J Cancer.* 2008;123:1832-40.
26. Viokurova S, von Knebel DM. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation 2011. *PLoS ONE.* 2011;6:e24451.
27. Renaud S, Loukinov D, Bosman FT, et al. CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:6850-60.
28. de Wilde J, Kooter JM, Overmeer RM, et al. hTERT promoter activity and CpG methylation in HPV-induced carcinogenesis. *BMC Cancer.* 2010;10:271.
29. Veldman T, Liu X, Yuan H, et al. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8211-6.
30. Riethdorf S, Riethdorf L, Schulz G, et al. Relationship between telomerase activation and HPV 16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 2001;20:177-85.
31. Ornish D, Lin J, Daubenmier J, et al. Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol.* 2008;9:1048-57.
32. Mead MN. Molecular biology: telomerase tells on lifestyle. *Environ Health Perspect* 2008;116:A521.
33. Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM, et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer. *Am J Pathol.* 2005;166:1229-38.