

3. Biología del cáncer en la población colombiana (mecanismos moleculares y celulares)

Presencia y persistencia de variantes de E6/E7 VPH 58 en mujeres de la cohorte de Bogotá

Autores: Mónica Molano, Óscar Buitrago, Nicolás Morales, Carolina Martín, Antonio Huertas, Pablo Moreno, Teresa Martínez

Grupo o dependencia: Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D.C., Colombia

Correo electrónico: mmolano@cancer.gov.co

Introducción: Ciertas variantes del VPH 58 han sido asociadas a un mayor riesgo para el desarrollo de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HGSIL) y cáncer de cuello uterino; sin embargo, no hay estudios acerca de su papel en la persistencia de la infección.

Objetivo: Describir la presencia y la persistencia de variantes E6/E7VPH 58 en 71 mujeres con infecciones incidentes por VPH 58 con citología normal, pertenecientes a la cohorte de Bogotá y que fueron seguidas durante 7 años.

Métodos: La detección y la tipificación del VPH se realizaron mediante un ensayo GP5+/GP6+ PCR-RLB. Posteriormente las regiones de E6 y E7 de muestras positivas para VPH 58 se amplificaron usando los *primers* E6 F1- E6 R1 y E7P1-E7P2, que amplifican un fragmento de 521 y 335bp, respectivamente. Por último, las variantes de E6/E7/VPH 58 se detectaron mediante el uso de un ensayo RLB y mediante secuencia automática.

Resultados: En total se analizaron 639 muestras. De estas 117 fueron VPH 58 positivas (18,39%). En el 85,5% de las muestras fue posible identificar variantes de E6/E7VPH58. El 88% de las mues-

tras presentaron la variante T307/A694/G744/A761; el 9%, la variante T307/G744; y el 3%, la variante T187/T307/A367/G744/G793/T798/A801/T840/C852. Globalmente, el 20% de las infecciones estaban presentes a los 2 años de seguimiento, y el 2%, a los 5 años. Durante el seguimiento a las mujeres que tuvieron su primera relación sexual a los 15 años o más se las asoció a una menor persistencia de la infección que en aquellas mujeres menores de 15 años (RR=0,29; IC95% 0,09-0,92). Así mismo, se observó cómo a aquellas mujeres que tuvieron partos se las asoció a una mayor persistencia de la infección, en comparación con las mujeres nulíparas (RR=3,43, IC95%1,23-9,60).

Conclusiones: Después de 5 años de seguimiento solamente el 2% de las infecciones por VPH 58 persisten. No hay una asociación clara entre la presencia de variantes del VPH 58 con la persistencia de la infección.

Actividad de la telomerasa en un estudio de seguimiento en Colombia

Autores: Mónica Molano, Diana Martín, Oscar Gamboa, Gustavo Hernández, Oscar Buitrago, Raúl Murillo, Nubia Muñoz, Mariano González

Grupo o dependencia: Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D.C., Colombia. Subdirección de investigación Clínica y Epidemiológica, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D.C., Colombia

Correo electrónico: mmolano@cancer.gov.co

Introducción: La actividad de la telomerasa (AT)

es detectada en altos niveles en líneas celulares inmortalizadas y muestras de cáncer, mientras que en tejido somático normal es indetectable o ausente. En el mundo no hay ningún estudio de seguimiento en el que se haya evaluado la actividad de la telomerasa a lo largo del tiempo.

Objetivo: Describir la actividad de la telomerasa y la infección por VPH en el seguimiento de mujeres que desarrollaron una lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEI-AG) en 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-GP5+/GP6+bio y un ensayo en línea reversa (RLB). La actividad de la telomerasa se midió mediante un TRAP-ELISA.

Resultados: El análisis mostró que de los 25 casos, 8 fueron casos prevalentes (es decir; ingresaron al estudio con la LEI-AG) y los 17 casos restantes fueron incidentes (en los que la lesión se detectó durante el seguimiento). De estos 17 casos, 12 (70,5%) tuvieron actividad de telomerasa e infección por VPH al momento del diagnóstico o en una visita previa, con VPH de alto riesgo; principalmente, de la especie alpha 9 (a la vez, 9 de estas mujeres tuvieron persistencia de la infección y fueron positivas para la actividad de la telomerasa a lo largo del tiempo). Otras 3 mujeres (17,7%) mostraron solamente eventos transitorios de infección por VPH, y 2 (11,8%) no tuvieron VPH o actividad de telomerasa. El seguimiento de las mujeres con citología normal mostró que solo 8/34 (23,5%) tuvieron VPH y actividad de la telomerasa al mismo tiempo, y en solo una de estas se observó persistencia de la infección con eventos transitorios de actividad de telomerasa. Por otra parte, 21/34 mujeres (61,8%) tuvieron eventos transitorios de infección por VPH durante el seguimiento, y solo 12 de ellas (35,2%) fueron positivas para la AT independientemente de la infección, y 5 mujeres (14,7%) no tuvieron VPH durante todo el seguimiento.

Conclusiones: Detectar AT e infección por VPH-AR al mismo tiempo parece predecir el riesgo de LEI-AG.

Las variaciones en los motivos EPIYA de CagA en aislamientos de *Helicobacter pylori* de Colombia no influyen en los efectos biológicos de la proteína CagA en células epiteliales gástricas

Autores: María Bravo, Andrés J. Quiroga, Carlos Fajardo, Andrea Coronado, Karen Labrador

Grupo o dependencia: Grupo de Investigación en Cáncer y Agentes Infecciosos. Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D.C., Colombia

Correo electrónico: mbravo@cancer.gov.co

Introducción: La infección con *Helicobacter pylori* CagA-positivo se asocia a gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico. *Helicobacter pylori* transloca la proteína CagA a la célula epitelial mediante un sistema de secreción tipo IV codificado en un conjunto de genes, denominado, a su vez, cagPAI. CagA translocada es fosforilada en motivos EPIYA y activa diferentes vías de señalización, lo cual induce expresión de interleucina 8 (IL-8) y elongación celular.

Objetivo: Evaluar en aislamientos de *Helicobacter pylori* si CagA es expresada y translocada al interior de la célula epitelial y la posible asociación entre variaciones en los motivos EPIYA de CagA y expresión de IL-8, elongación celular y enfermedad gastroduodenal, mediante cocultivos con células epiteliales.

Métodos: Se incluyeron 84 cepas de *H. pylori*-CagA-positivo provenientes de pacientes con gastritis, úlcera duodenal, y cáncer gástrico, con diferentes combinaciones de motivos EPIYA. La integridad del cagPAI se evaluó mediante PCR de los genes cagT, cagE, y cagI0. Células AGS fueron infectadas con cada cepa y se midieron niveles de fosforilación de CagA, inducción de IL-8 y elongación celular.

Resultados: En el 26% de los aislamientos se observaron defectos en el cagPAI. Los niveles de fosforilación fueron significativamente mayores en aislamientos que provenían de pacientes con úlcera duodenal. Se observó gran variabilidad en la expresión de IL-8 a las 6 y a las 24 horas postinfección en aislamientos con cagPAI funcional; a 24 horas se observó incremento en la expresión. Aislamientos con cagPAI defectuoso no indujeron expresión de

IL-8 a las 6 horas postinfección; a 30 horas indujeron IL-8 en niveles muy bajos. No se observaron diferencias entre expresión de IL-8 y número de motivos EPIYA o patología. No se encontraron diferencias en los niveles de elongación celular entre aislamientos con cagPAI defectuoso y cagPAI funcional a las 6 horas postinfección; a las 24 horas los aislamientos con cagPAI funcional indujeron niveles de elongación significativamente más altos que los aislamientos con cagPAI defectuoso. Tampoco se observaron asociaciones entre niveles de inducción de elongación celular y número de motivos EPIYA o patología.

Conclusiones: Los polimorfismos en CagA no se asocian de manera significativa a los efectos biológicos de la translocación de CagA a la célula epitelial ni con la gravedad de la enfermedad gastroduodenal. Otros factores (genéticos, ambientales) pueden desempeñar un rol más importante en la carcinogénesis gástrica en Colombia.

Altos niveles de IL-10 son observados en mujeres con cáncer de cuello uterino

Autores: Astrid Bedoya, Deiby J. Tate, Carlos M. Córdoba, Mauricio Borrero, René Pareja, Giovanni Zabaleta, Fredy Rojas, Rolando Herrera, Arnol H. Zea, Gloria I. Sánchez

Grupo o dependencia: Grupo Infección y Cáncer, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Correo electrónico: astridbedoya@hotmail.com

Introducción: La respuesta inmune celular es esencial en el control de la infección por el virus del papiloma humano (VPH), y, por tanto, puede prevenir la progresión a cáncer. Por otro lado, las citoquinas juegan un papel importante en los efectos inmunorregulatorios e inmunoestimuladores de la respuesta inmune.

Objetivo: Comparar los niveles sistémicos de citoquinas en mujeres con y sin cáncer de cuello uterino y determinar la expresión de los genes de citoquinas en tejidos de cáncer de cuello uterino.

Métodos: Estudio descriptivo en el cual se incluyó a mujeres sin cáncer de cuello uterino (n=86), NIC3 (n=41) y cáncer invasivo (n=79) de Mede-

llín. Los niveles de GM-CSF, IFN- α , IL-1B, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, MCP-1, Factor de Necrosis Tumoral- α (FNT- α), VEGF y TGF-B fueron determinados en suero utilizando el estuche comercial Milliplex de Millipore. Para la expresión de los genes de citoquinas se empleó ARN de 42 biopsias de mujeres con cáncer de cuello uterino en la técnica qRT-PCR. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar la significancia entre grupos.

Resultados: El análisis del perfil de citoquinas sistémicas reveló una disminución estadísticamente significativa en los niveles de IFN- γ , FNT- α e IL-12p70 entre las mujeres sin y con cáncer de cuello uterino (invasivo y NIC3; $p < 0,0001$), niveles similares de IL-2 entre los 3 grupos y un incremento estadísticamente significativo entre los niveles de IL-10 entre las mujeres sin cáncer (mediana 0,0 pg/mL) vs. aquellas con cáncer (mediana 0,17 pg/mL) ($p < 0,001$) y NIC3 (mediana 0,0 pg/mL) vs. los casos invasivos (mediana 0,17 pg/mL) ($p < 0,001$). En los tejidos de las mujeres con cáncer invasivo los niveles de expresión de los genes de IL-12, IL-2, IFN- γ , IL-1B, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 y TGF-B fueron muy bajos.

Conclusiones: Un perfil de citoquinas Th2/Tc2 es observado en cáncer de cuello uterino debido a los altos niveles de IL-10 y a los bajos niveles de IFN- γ , FNT- α e IL-12p70. La fuente de estas citoquinas no es el tejido tumoral.

Asociación de alelos de HLA-I A y B con cáncer cervical

Autores: Gloria I. Sánchez, Jeidy Montiel, Victor Florez, Diego Chavez, Armando Baena, Cristian M. Álvarez, Astrid M. Bedoya, Fredy Rojas, René Pareja, Mauricio Borrero

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

Clínica Vida, Congregación Mariana, Hospital Universitario San Vicente de Paul, Medellín Colombia. Clínica Las Américas, Medellín, Colombia. Dinámica IPS, Medellín, Colombia. Hospital La María, Medellín, Colombia

Correo electrónico: sanchezg@une.net.co

Introducción: Polimorfismos de los genes del locus HLA pueden influenciar la respuesta inmune. Ciertos alelos de HLA han sido reportados como factores de riesgo para cáncer de cerviz.

Objetivo: Estimar el riesgo de cáncer cervical asociado a alelos de HLA-A y B.

Métodos: Estudio caso-control, 145 casos (diagnóstico histológico de NIC3/SCC) y 135 controles (citología normal o de bajo grado), emparejados por edad y lugar de nacimiento con los casos fueron reclutados en centros clínicos de Medellín. ADN de células de sangre periférica se obtuvo para la genotipificación de HLA-A y B por Inno-Lipa de Innogenetics®. Información sobre variables socio-demográficas, el comportamiento sexual, la paridad y el uso del cigarrillo se obtuvieron mediante un cuestionario estandarizado. Las frecuencias de alelos y el genotipo y el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus se determinaron utilizando el software GENEPOP. Las frecuencias de haplotipos se calcularon utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud (software Arlequin 3.5). Modelos de regresión logística se utilizaron para estimar la *odds ratio* (OR) con intervalos de confianza, utilizando como referencia, la población negativa para el alelo correspondiente.

Resultados: Las frecuencias genotípicas observadas en ambos casos y los controles no fueron estadísticamente distintas de las frecuencias de genotipo esperadas, por lo tanto, las dos poblaciones (de ambos locus) se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Un mayor riesgo asociado a HLA-I B44 (OR: 2.65, IC95%: 1,37-5,09) y un menor riesgo asociado al HLA-I B18 (OR: 0.42, IC95%: 0,18-0,99) fueron observados después de ajustar por posibles variables de confusión.

Conclusiones: Los alelos HLA-B44 y B18 se asocian con el cáncer de cuello uterino en Colombia.

Rol de la variabilidad molecular de la proteína E6 de VPH 16 en el desarrollo del cáncer de cuello uterino en Colombia

Autores: Esteban Lopera, Patricia Acosta, Mary Uribe, Víctor Flórez, Armando Baena, Santiago

Martínez, Carlos Córdoba, Mauricio Borrero, Piedad Acosta, Katherine Quintero, Hernán Sierra, Astrid Bedoya, Gloria Sánchez

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

Correo electrónico: ealopera@gmail.com

Introducción: El genotipo 16 del virus del papiloma humano (VPH) es el más comúnmente asociado al cáncer de cuello uterino. Al día de hoy se han identificado aproximadamente 240 variantes moleculares de este genotipo. Muchos estudios epidemiológicos sugieren que la infección con variantes no europeas confiere un mayor riesgo de cáncer de cuello uterino. Se han realizado pocos estudios que usen poblaciones con alto nivel de mixtura étnica.

Objetivo: Observar la distribución de las mutaciones de la proteína E6 del VPH 16 en mujeres infectadas con diferentes variantes del VPH 16 en la población colombiana.

Métodos: Se hizo un estudio de casos y controles con 104 mujeres con diagnóstico histológico de carcinoma escamocelular positivas para infección con el genotipo 16 del VPH, y 43 mujeres control infectadas con el mismo genotipo que no presentan la enfermedad. Se extrajo ADN y se verificó su calidad con la amplificación del gen de β -globina. La presencia del ADN viral se determinó por medio de reacción en cadena de la polimerasa GP5+/GP6+, seguida de hibridación reversa. Se amplificó el gen E6 y se detectaron sus mutaciones mediante hibridación reversa con sondas específicas para cada variante molecular. Se reportaron comparaciones de frecuencias de cada mutación entre casos y controles usando la prueba exacta de Fisher.

Resultados: De las mutaciones usadas para denotar variantes no europeas, 4 mostraron una distribución estadísticamente diferente entre casos y controles. En los controles solo se encontraron infecciones con variantes europeas. La mutación T350G mostró distribución similar entre casos y controles.

Conclusiones: Las variantes no europeas del VPH 16 se encontraron más a menudo en los casos de cáncer escamocelular de la población estudiada.

Integración del ADN de virus del papiloma humano (VPH) en carcinoma de tractos respiratorio y digestivo superior en pacientes de Colombia

Autores: Lida Mancilla, Edwin Carrascal, Tarik Gheit, Óscar Tamayo, Felipe García, Massimo Tommasino

Grupo o dependencia: Grupo Genética, Fisiología y Metabolismo, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia. Universidad del Valle, Cali, Colombia. Agencia Internacional de Investigación en cáncer- IARC

Correo electrónico: limancilla_44@hotmail.com; limancilla@usc.edu.co

Introducción: La presencia del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo ha sido reportada en carcinoma escamocelular de tracto aerodigestivo superior y sistema respiratorio. La prevalencia de VPH 16, el tipo más comúnmente encontrado, varía entre regiones geográficas de este tipo de carcinomas. Se requieren estudios que aporten al conocimiento del papel en la etiología de VPH 16 en este subgrupo de carcinomas.

Objetivo: Determinar la frecuencia del VPH 16 en carcinoma epidermoide de sistema respiratorio y tracto aerodigestivo, y evaluar la posible asociación de su estado físico a la expresión de proteínas oncogénicas y las características patológicas de los tumores.

Métodos: Se detectó la presencia de VPH 16 en 105 tumores de cavidad oral, esófago, laringe y pulmón, mediante amplificación enzimática (PCR) de fragmentos de los genes E7 y E2, confirmando por hibridización y secuenciación. Se determinó la expresión de los genes virales E6 y E7 por amplificación desde ADNc (RT-PCR). La asociación entre los distintos parámetros se determinó por análisis estadístico empleando χ^2 con α de 0,05.

Resultados: El 30,5% de los tumores presentaron VPH 16 más a menudo en carcinomas de cavidad oral (48%). El 48% de los carcinomas presentaron ADN viral integrado exclusivamente, y el 13%, en forma mixta. La frecuencia de ADN viral integrado fue significativamente mayor en hombres. Se detectó expresión de los oncogenes en el 52% de tumo-

res con ADN viral. La expresión de oncoproteínas virales fue determinada en el 46% de los tumores con ADN viral integrado exclusivamente, mientras solo el 17% de los casos con la forma viral episomal expresaron las oncoproteínas. La expresión de oncoproteínas fue mayor en tumores de mujeres con ADN viral integrado.

Conclusiones: La frecuencia de VPH 16 fue mayor en hombres y ligeramente superior en tumores de laringe y pulmón de pacientes menores a 50 años, aunque no se relacionó eso con el grado de diferenciación del tumor. Ni la integración del ADN viral ni la expresión de las oncoproteínas estuvieron asociadas al grado de diferenciación del tumor, la edad o el sexo de los pacientes. Se presentan evidencias de la presencia de VPH integrado y la expresión de las oncoproteínas virales. Se requieren más estudios en el caso del esófago.

Análisis molecular de biopsias de próstata para la búsqueda de nuevos biomarcadores del cáncer de próstata

Autores: Niradiz Reyes, Alfonso Bettin Martínez, Ismael Reyes, Jan Geliebter, Juan Rebollo, Ceyla Causil

Grupo o dependencia: Grupo de Genética y Biología Molecular, , Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia

Correo electrónico: nreyesr@unicartagena.edu.co

Introducción: El grupo a cargo de la presente investigación se encuentra validando un grupo de genes candidatos a biomarcadores en líneas celulares y muestras clínicas de cáncer de próstata. Entre los genes validados está fibromodulin (FMOD), un miembro de la familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs), el cual es normalmente producido dentro de tejidos ricos en colágeno, pero que recientemente ha sido detectado en varios carcinomas humanos.

Objetivo: Validar la expresión de mRNA de fibromodulin en líneas celulares humanas de cáncer de próstata y en muestras clínicas de pacientes, y compararlo con los niveles de PSA tanto en el plano de mRNA como en el de proteína en sangre.

Métodos: Las líneas celulares PWR-1E, LNCaP y PC3 fueron cultivadas según indicaciones de ATCC. Las muestras clínicas obtenidas de pacientes sometidos a biopsia transrectal fueron preservadas en RNAlater (n=21). Un panel de cDNAs derivados de muestras clínicas caracterizadas de pacientes fue obtenido comercialmente (n=48). El ARN total de líneas celulares y tejido prostático se extrajo con trizol, usando 1 ug para sintetizar los respectivos cDNAs. Mediante PCR cuantitativo en tiempo real se determinaron los niveles de fibromodulin y PSA, y sus valores de expresión se calcularon por el método $\Delta\Delta CT$, previa normalización a β -actina e hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HPRT). Las diferencias de expresión de fibromodulin y PSA entre las diferentes etapas del cáncer se determinaron por ANOVA usando $P < 0,05$ como significativo. El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de la Universidad de Car-

tagena y del Hospital Universitario del Caribe, y los pacientes firmaron un consentimiento informado.

Resultados: En las líneas celulares se encontró correlación inversa entre fibromodulin y el potencial metastásico de las líneas celulares (LNCaP>PC3, $P < 0,05$). En el panel comercial de cDNAs se encontró también una correlación inversa de PSA entre tejido normal y la etapa T2 ($P = 0,03$). La expresión de fibromodulin discriminó la hiperplasia de la etapa T2 ($P = 0,002$). En las muestras clínicas de biopsias no se encontró correlación significativa entre el grado Gleason, los valores de PSA en sangre y el nivel de expresión de fibromodulin.

Conclusiones: Se necesitan estudios con mayor número de muestras y la validación en cuanto a proteína en sangre u orina para definir la utilidad de fibromodulin como biomarcador de diagnóstico temprano del CaP.