

Efecto de la integración del ADN de papilomavirus humano en carcinoma tracto respiratorio y digestivo superiores

Impact of integration of Human papillomavirus DNA in carcinoma from digestive tract and respiratory system

Efeito da integração do DNA do vírus do papiloma humano em carcinoma do trato respiratório e digestivo acima

COLCIENCIAS TIPO 1. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

RECIBIDO: ABRIL 10; ACEPTADO: MAYO 15, 2012

Lida Inés Mancilla, Ph.D¹

limancilla@usc.edu.co

Tarik Gheith, Ph.D³

gheit@iarc.fr

Felipe García, Ph.D²

labiomol@gmail.com.co

Edwin Carrascal, Ph.D²

care@univalle.deu.co

Oscar Mario Tamayo, M.Sc¹

omtamayo00@usc.edu.co

Massimo Tommasino, Ph.D³

tommasino@iarc.fr

Universidad Santiago de Cali, Colombia (1)

Universidad del Valle, Cali - Colombia (2)

International Agency for Research of Cancer [IARC], Lyon - Francia (3)

Resumen

Se determinó la asociación de la integración de papilomavirus humano (HPV16) con el proceso de carcinogénesis en carcinoma epidermoide de 84 tumores de varias regiones de tracto digestivo superior y sistema respiratorio. El ADN de HPV16 y la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 se determinaron con PCR y RT-PCR. Las mutaciones en el gen TP53, utilizando dHPLC y secuenciación. El 27% de los carcinomas evaluados presentó ADN de HPV16. El 37% de los carcinomas presentó el ADN viral integrado al genoma celular y 43% de 54 tumores evaluados expresó ARN de los oncogenes E6 y E7. El gen TP53 presentó mutaciones en el 80% de los tumores evaluados (25). La mayor frecuencia de mutación se observó en el exon 8 de tumores de pulmón y cavidad oral. Se propone la importancia de la integración del ADN de HPV16 en la etiología del carcinoma epidermoide en estas regiones anatómicas.

Palabras clave

HPV16 Integración, carcinoma epidermoide, cáncer tracto digestivo, cáncer sistema respiratorio.

Abstract

The association of DNA integration of Human papillomavirus (HPV16) with carcinogenesis process in squamous cell carcinoma from digestive tract and respiratory system was determined. DNA of HPV16 and E6 and E7 viral genes expression were determined through PCR and RT-PCR. TP53 gene mutations were evaluated with by dHPLC and sequencing. The 37% of the carcinomas had viral DNA integrated into the cell genome and 43% of 54 evaluated tumours were expressed RNA of E6 and E7 oncogenes. TP53 gene showed mutations in 80% of tumors. Exon 8 had the higher mutation rate in tumors from lung and oral cavity. The important role of DNA of HPV16 integration into the etiology of squamous cell carcinoma of these regions is proposed.

Key words

HPV16 Integration, squamous cell carcinoma, aerodigestive and respiratory cancer.

Resumo

A associação da integração do vírus do papiloma humano (HPV 16) é determinada com o processo de carcinogénesis em carcinoma escamoso de 84 tumores de várias regiões do trato digestivo superior e sistema respiratório. O ADN de HPV16 e a expressão de oncoproteínas de E6 e E7 identificado com PCR e RT-PCR. As mutações no gene TP53, usando dHPLC e sequenciamento. O 27% dos carcinomas avaliado apresentou DNA de HPV16. O 37% de carcinomas apresentou o DNA viral integrado no genoma da célula e 43% de 54 tumores avaliados expressou ARN dos oncogenes E6 e E7. O gene TP53 apresentam mutações em 80% dos tumores avaliados (25). Maior frequência de mutação observada no Exon 8 de tumores de pulmão e cavidade oral. Propõe-se a importância da integração do DNA de HPV16 na etiologia do carcinoma epidermoide destas regiões anatómicas.

Palavras chave

HPV16 integração, carcinoma escamoso, câncer digestivo, câncer do aparelho respiratório.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la más frecuente causa de muerte de cáncer en los países desarrollados y es el segundo tipo de cáncer en prevalencia en el mundo entero entre hombres y mujeres. Los valores reportados para cáncer de pulmón, de esófago y cavidad oral agregados, representan un 29% aproximadamente de muertes por cáncer en hombres y mujeres en el mundo. Entre 25 y 30% de los casos de cáncer de pulmón corresponde a cáncer de células pequeñas, el cual incluye el grupo de células escamosas (o epidermoides)¹. Además del hábito de fumar, considerado como el principal factor de riesgo para este tipo de cáncer, se consideran como factores de riesgo importantes la exposición ambiental a humo de tabaco, asbesto, radón, carcinógenos ocupacionales y enfermedades pulmonares no malignas pre-existentes y recurrentes. Desde hace dos décadas, la infección por papilomavirus humano (HPV) ha sido fuertemente asociada a algunos tipos de cáncer de estas regiones^{1,2,3}.

Los Papilomavirus Humano (HPV), son virus pequeños epiteliotróficos, con ADN de doble cadena. Se han descrito más de 200 tipos, que han sido clasificados en dos grandes grupos: mucosos y cutáneos. Dentro de cada grupo se han descrito unos tipos denominados de alto, mediano y bajo riesgo de acuerdo a la posibilidad de la progresión a tumores malignos de las lesiones que ellos generan^{4,5}. Los tipos de alto riesgo HPV16 y HPV18, además de otros, han sido asociados con la carcinogénesis cervical desde hace varias décadas, en varios países, apareciendo relacionados con más del 80% de las lesiones malignas cervicales en todo el mundo⁶. Desde la década anterior estos virus han sido también asociados con el proceso de transformación de las células del epitelio de la cavidad oral, tracto respiratorio y sistema digestivo superior (carcinoma escamoso de cabeza y cuello, siglas en inglés: HNSCC)^{7,8}. Frecuentemente se ha establecido a la integración del ADN viral en el genoma celular, como un proceso previo a la transformación maligna de las células del epitelio de cérvix uterino. Esta induce cambios en el genoma de los dos organismos, que conllevan a la pérdida de la estabilidad genómica celular y a la sobreproducción de oncogenes virales que modifican las proteínas p53 y pRB, principales supresoras de tumores celulares^{9,10}. La integración del genoma viral en el ADN celular, se ha correlacionado con un aumento en la velocidad de crecimiento del tumor, elevación de la posibilidad de iniciar metástasis y la resistencia a tratamientos clínicos y

farmacológicos de las células cancerosas. A pesar de los avances en la patogénesis de cáncer de cuello uterino, los estudios en cáncer de tejido epitelial de esófago, laringe, pulmón y cavidad oral son incipientes y solo se limitan a la detección del ADN viral y a la determinación de su estado de integración en el genoma celular¹¹.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Población

A partir de los registros existentes en la base de datos del Registro Poblacional de Cáncer del Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia, desde el año 1996 hasta los datos ya ingresados del año 2004, se colectaron 230 bloques que contenían biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina con diagnóstico de carcinoma epidermoide, procedentes de cualquier región del tracto respiratorio (esófago, laringe, pulmón y cavidad oral.) Las placas con tinción representativas de cada bloque fueron revisadas nuevamente para confirmar el tipo de carcinoma y la presencia de adecuada cantidad de células tumorales. Se realizaron entre cinco y seis cortes de 10 μm de cada bloque y se almacenaron en tubos de crío-preservación a temperatura ambiente hasta su utilización.

B. Extracción de DNA

Se realizó la extracción de ADN de 149 muestras de tumores, empleando el método de desparafinación con xileno, de acuerdo al método descrito por Chang, 2001 con las modificaciones realizadas de acuerdo a Gheit, 2005^{12,13}. Para la extracción del ADN celular, las biopsias de tumores de carcinoma epidermoide embebidos en parafina, procedentes de la región orofaríngea y de pulmón, fueron desparafinadas por lavado en 1 mL de xileno durante 5 minutos con agitación constante por inversión suave del tubo a temperatura ambiente. El xileno fue retirado después de centrifugación a 14.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de un segundo lavado con xileno, a iguales condiciones, las biopsias fueron mezcladas con igual volumen de etanol absoluto. El etanol fue retirado totalmente previa centrifugación a 14.000 rpm por 2 minutos. El exceso de etanol se retiró por decantación en papel toalla y la muestra fue secada totalmente en horno a 55 °C durante 20-30 minutos. El tejido completamente seco fue diluido en 250 μl de solución de digestión (0.1 M Tris-HCL pH 7.4, 0,5% Tween 20, 10 mM EDTA) para la enzima proteinasa K. El tejido tumoral desparafinado fue sometido a digestión con

la enzima proteinasa K a una concentración de 0,5 mg/mL en el *buffer* descrito anteriormente.

La reacción de digestión se llevó a cabo a 65°C durante 18-20 horas con agitación constante. La actividad de la proteinasa fue eliminada por calentamiento de las mezclas de digestión a 94°C por 10 minutos. El ADN extraído fue

almacenado a 4°C hasta su utilización.

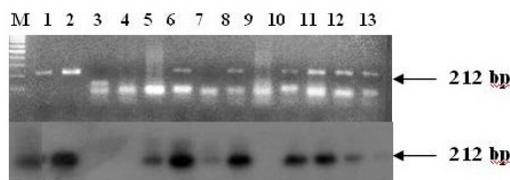
La calidad de la extracción fue determinada por la amplificación por PCR de un fragmento de 268 pares de base (pb) del gen β -globina. Esta amplificación se llevó a cabo utilizando como cebadores los oligonucleótidos GH20 y PC04 (ver secuencia en la Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos empleados como cebadores para la amplificación de los fragmentos del gen de β -globina humano y los genes E7 y E2 de HPV16

GENE	Fragment size (bp)	Primer sequence Forward, Reverse	Primer Name	Primers Position
β - GLOBIN	268	5'-GAAGAGCCAAGGACAGCAGGTAC-3' 5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3'	GH20 PC04	
HPV16E7	212	5'-CATGGAGATACACCTACATTG-3' 5'-CAGATGGGGCACACAATTCC-3'	HPV16FN1 HPV16RN1.2	565-585 842-823
HPV16E2	179	5'-AACGAAGTATCCTCTCTGAAATTATTAG-3' 5'-CCACTGAGTCTCTGTGCAACAAC-3'	16E2F 16E2R	3362-3390 3519-3541

La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 50 μ L y contenía los siguientes componentes: of 1,5 μ M MgCl₂ 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM KCl, 200 nM de cada dNTP, 200 nM de cada oligonucleótido cebador y 0,5 unidades de la enzima Taq DNA polimerasa (Hot FIREPol Taq Solis bioDyne™). Aproximadamente 5-10 μ L de ADN de los tumores fue adicionado a la mezcla de reacción. La amplificación fue llevada a cabo empleando el siguiente programa automático en un equipo termociclador Perkin Elmer: un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto. Para finalizar la amplificación se realizó un paso final de extensión a 72°C por 10 minutos. Para cada reacción de amplificación se evaluó simultáneamente una reacción con ADN humano no tumoral como control positivo y un control negativo que no contenía ADN. Los productos de la reacción de amplificación se analizaron posteriormente por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Figura 1. Determinación de la presencia de ADN de HPV 16 en células de carcinoma epidermoide de región orofaríngea y pulmón de pacientes Colombianos. A: PCR de un fragmento de 212 pares de base del gen E/7 viral. B: Patrón de hibridación de los amplificados con AND viral radiomarcado.



Las muestras que presentaron un producto de amplificación de 268 pb fueron consideradas de calidad adecuada para el estudio (Figura 1).

III. DETECCIÓN DEL ADN DE HPV16

Las extracciones de DNA positivas para el fragmento de β -globina fueron evaluadas para determinar la presencia de HPV, empleando los cebadores E6F y E6R. Estos oligonucleótidos permiten la amplificación de un fragmento de 590 pb. La mezcla de reacción presentó la siguiente composición: 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200mM de cada dNTP, 1.25 mM de cada primer y 1.2 U de Taq Polimerasa Hot Star. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C por 15 minutos. 35 ciclos con el siguiente programa: 1 minuto a 94 °C/ 1 minuto a 55 °C/ 1 minuto a 72 °C. Extensión final a 72 °C por 10 minutos. Almacenamiento a 4 °C en tiempo indefinido. El producto de la amplificación se determinó mediante la visualización bajo luz ultravioleta de 12 μ L de cada amplificado en un gel de agarosa al 2% preparado en *buffer* TAE (Trisma base, EDTA, Acetato) teñido con bromuro de etidio.

IV. DETERMINACIÓN DEL ESTADO FÍSICO DEL ADN VIRAL

De acuerdo con el protocolo reportado por Park¹⁴, la determinación del estado físico del virus se realizó a través de la prueba de amplificación del Gen E2 de HPV-16.

Una pequeña cantidad de ADN se empleó para determinar la integridad del Gen viral E2 dentro de las células tumorales. Se emplearon como cebadores para la reacción de amplificación los oligonucleótidos E2HPV16F y E2HPV16R, las secuencias de los oligonucleótidos se registran en la Tabla 1.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 20 μ litros de solución conteniendo 10 pmoles de cebadores, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 200 mM de dNTPS y 0.05 unidades de enzima Taq polimerasa. La amplificación fue realizada con un primer paso de activación de la enzima a 95°C por 15 minutos, seguida de 40 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización a 95°C por 1 minutos, un paso de apareamiento con los oligonucleótidos a 58°C por 1 minuto y un paso de extensión a 72°C por 30 segundos. Los productos de la reacción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y observados bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio.

V. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES VIRALES E7 Y E2

A. Obtención de ARN celular para el ensayo de RT-PCR

El ARN de las células tumorales fue extraído mediante la técnica descrita en el manual del Kit Absolutely RNA RT-PCR Miniprep de Stratagene™ con algunas modificaciones realizadas para el tejido fijado en formalina y embebido en parafina de acuerdo con Korbler et al (2003)¹⁵. El tejido presente en aproximadamente 5 o 6 secciones de tejido parafinado fue cuidadosamente separado y colocado en tubos preparados para aislamiento de ARN. Las células fueron digeridas en 850 μ l una solución que contenía *buffer* de lisis, β -mercaptoetanol y proteinasa K a concentración final de 5 mg por ml. Las muestras fueron incubadas a 55°C durante toda la noche con agitación fuerte y constante. El ARN fue extraído de acuerdo al protocolo descrito por el manual y tratado con DNAsa libre de RNAsa durante 30 minutos a 37°C, antes de terminar el proceso de extracción. El ARN fue almacenado a -20°C hasta su utilización. Se evaluó igualmente la obtención de ARN utilizando el procedimiento de maceramiento del tejido con nitrógeno líquido reemplazando la proteinasa K.

B. Síntesis de la Primera cadena de ADN

El ARN aislado fue utilizado para la síntesis de la

primera cadena de ADN; empleando el *kit* RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Syntesis. En resumen, 10 μ l de la solución de ARN extraído fue incubado con el oligonucleotido poliA a 70°C durante 5 min, seguidamente enfriado para adicionar el inhibidor de ARNasas y la mezcla de dNTPs. Esta solución se incubó a 37°C por 5 min y posteriormente se adicionaron 200 unidades de enzima RevertAid H Minus M-MuV RT. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 60 min y se detuvo por calentamiento a 70°C durante 10 minutos, seguido de enfriamiento en hielo. El ADNc se almacenó a -20°C hasta su utilización. Para determinar la calidad del ADNc elaborado, se realizó un ensayo de amplificación de un fragmento de B-globin a humano de 218 pb.

C. Amplificación del gen E7 HPV 16 por PCR

La expresión del gen E7 de HPV16 se determinó utilizando el protocolo descrito por Klaes y col (1999) (16), partiendo de los fragmentos de ADNc elaborados a partir de los ARN aislados de los tejidos tumorales. El gen E7 de HPV 16 fue amplificado empleando los *primers* específicos, HPV2 y TagP3 en un primer ciclo y los *primers* HPV7 y oligo dT17 en un segundo ciclo. La reacción de amplificación fue llevada a cabo en un volumen de 25 μ l con 200nM de *primers*, 1.5 mM de MgCl2 durante 30 ciclos. El programa de PCR consistió en un primer paso de desnaturalización a 95°C por 15 minutos, 40 ciclos consistentes en 1 min a 95°C, 2 min a 50°C y 3 min a 72°C y un paso final a 72°C por 10 min. Dos μ l del producto de amplificación fueron utilizados en el segundo ciclo de amplificación, la temperatura de apareamiento de los *primers* fue elevada a 60°C durante 1 minuto. El producto de la segunda reacción de amplificación fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta.

VI. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE LOS EXONES 5-9 DE P53

A. Amplificación de los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53 de las células tumorales.

Los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53 de las células con el virus HPV-16, fueron amplificados mediante la técnica de PCR, empleando juegos de pares de oligonucleótidos específicos para cada exon como cebadores. Las condiciones para la amplificación fueron 2mM de *primers*, 2.5 mM de cloruro de magnesio, 200 μ M de mezcla de dNTPs y 0.25 U de enzima Taq polimerasa Hot FirePol.

La reacción fue llevada a cabo en un volumen de 25 μ l y el programa empleado para la amplificación fue el siguiente: 95°C por 15 minutos una vez y 40 ciclos de reacción con 95°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1.5 min.

Los productos de amplificación de los exones 5-9 de p53 fueron separados por HPLC a temperaturas de 60 y 65°C y los patrones de elución fueron comparados con amplificados de los mismos exones procedentes de líneas celulares normales y algunas líneas con mutaciones más comunes para cada exón en cáncer de seno y esófago^{17,18}. Las muestras con patrones de elución diferentes al patrón normal similares con alguna de las mutaciones fueron secuenciadas empleando el método de terminación de dideoxinucleótidos y análisis por fluorescencia.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el presente estudio se realizó la extracción de ADN de 149 muestras de tumores de la región orofaríngea (cavidad oral, laringe y esófago) y pulmón, fijados en formalina y embebidos en parafina con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pacientes colombianos.

Solo 84 carcinomas presentaron ADN de calidad y cantidad adecuadas para la amplificación de un fragmento del gen de β -globina. La edad promedio de la población fue de 64 años con una relación entre hombres y mujeres de 1,4. Las características de la población de estudio se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características demográficas de los pacientes del estudio con SCC de Cali, Colombia

Variable	Total n= 84 (%)
Edad (Media \pm SEM)	64,2 \pm 1.22
Edad (años)	
<50	12
51-65	31
>66	41
Sexo	
Femenino	34
Masculino	50
Sitio del Tumor	
Cavidad Oral	23
Laringe	39
Esófago	5
Pulmón	16
Grado de diferenciación del tumor	
Bueno	55
Moderado	12
Pobre	7

A. Detección de HPV-16

La presencia de HPV-16 en las muestras positivas para

β -globina, se llevo a cabo mediante la amplificación de un fragmento de 212 pb del gen E7. El 27.4% (23/84) de las muestras analizadas presentó amplificación del fragmento de 212 pb del gen E7 esperado (Figura 1)

De acuerdo a la región anatómica de procedencia del tumor, el mayor porcentaje de infección con HPV-16 fue encontrado en las muestras procedentes de laringe, 32.4%(12 de 39), seguidas por los carcinomas de pulmón y lengua con un 31.3% y 27.8% respectivamente (Tabla 3).

Esto presenta a Colombia con una prevalencia de HPV similar a los valores reportados en otras regiones del mundo y a estudios previos realizados por otros autores en muestras colombianas^{19,20}.

Tabla 3: Incidencia del HPV 16 en los tumores positivos para β -globina de acuerdo a la región de procedencia del tumor

Sitio de localización del tumor	Muestras β -globina positivas (#)	Muestras E7 HPV-16 positivas (#)	%
Lengua	18	5	27.8
Pulmón	16	5	31.3
Laringe	39	12	32.4
Tráquea	1	0	0
Esófago	5	1	20
Cavidad Oral	5	0	0
Total	84	23	100

B. Integración de HPV16 en el genoma celular

En aproximadamente el 47% de las células tumorales no fue posible la amplificación del fragmento central de E2HPV16, aún en los ensayos realizados para una segunda amplificación del gen E2.

Debido a que el gen E2 es fragmentado durante el proceso de integración, la imposibilidad de la amplificación de la región central de este es un apropiado indicador de la integración del DNA viral en el genoma celular²¹.

La integración fue detectada en tumores procedentes de todos los sitios evaluados. Los tumores originarios de laringe y cavidad oral mostraron el más alto porcentaje de integración viral (ver Tabla 4).

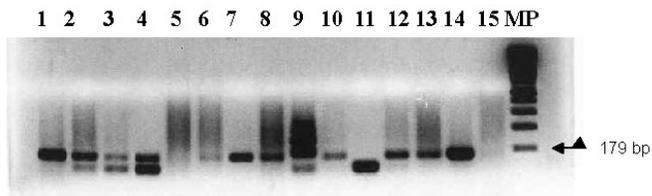
El patrón de amplificación del gen E2 de HPV16 en los carcinomas evaluados se muestra en la Figura 2.

Tabla 4. Integración de DNA de HPV16 en genoma celular de acuerdo a la región de procedencia del tumor

Región de Procedencia de los Tumores	HPV16 DNA integrado	
	Muestras (#)	%

Pulmón	11	39.3
Laringe	16	51.6
Tráquea	1	100.0
Cavidad Oral	12	46.2
Esófago	2	66.6
Total	41	47.1

Figura 2. Análisis del estado físico del ADN de HPV16 en tumores de la región orofaríngea y pulmón de pacientes colombianos. Amplificado de la región central del gen E2 HPV16



C. Expresión de E7HPV16

Para evaluar la expresión de los genes de HPV16 en las células tumorales, cDNA fue sintetizado a partir de RNA obtenido de biopsias embebidas en parafina. La calidad de cDNA obtenido fue evaluada por amplificación de un fragmento de 290 bp del gen de β-globina. La presencia de DNA genómico fue impedida por digestión del RNA con la enzima DNasa I antes de la síntesis del cDNA. Se obtuvo un fragmento de 450-500 bp del gen E7HPV16 empleando como reverso un primer específico que reconocía una secuencia específica introducida al extremo del poli-A durante la síntesis del cDNA y como primer delantero una secuencia específica del gen E7HPV16 ubicada entre los nucleótidos 839 y 863 del gen. El porcentaje de carcinomas que expresaron los oncogenes virales se muestra en la Tabla 5. La expresión del gen E7 HPV16 fue detectada en el 43.4% (23/53) de los tumores evaluados. Mientras la expresión de E2 de HPV16 solo fue determinada en el 24% de los tumores evaluados (Tabla 5)

Tabla 5. Expresión de los genes E7 y E2 de HPV16 en las células tumorales, de acuerdo a la región de procedencia del tumor

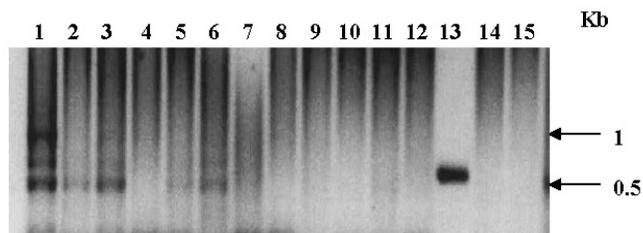
Procedencia del Tumor	Total muestras	No E7 Expresión	%
Pulmón	20	9	45
Laringe	17	7	41
Tráquea	1	0	0
Cavidad Oral	12	5	42
Esófago	3	2	66.7
Total	53	23	43.4

Procedencia del Tumor	Total muestras	No E2 Expresión	%
Pulmón	14	1	7.1
Laringe	4	1	25.0
Tráquea	1	0	0.0

Cavidad Oral	4	3	75.0
Esófago	2	1	50.0
Total	25	6	24.0

Cuando se comparó la capacidad de expresión del gen E7 de HPV16 de acuerdo al estado físico DNA viral (integrado o no-integrado) se observó mayor porcentaje de expresión del gen viral en las muestras con DNA HPV16 integrado, aunque no hubo diferencia significativa entre los dos grupos. La expresión de los genes virales E6 y E7 de HPV16 se muestra en la Figura 3.

Figura 3. RT-PCR del gen E7 de HPV 16 en carcinoma escamoso de región orofaríngea de pacientes colombianos



D. Análisis de la tasa de mutaciones del Gen Supresor de Tumores (TP53) en Carcinoma de Células Escamosas

El análisis de la tasa de mutación de los exones de 5 al 8 del gen TP53 mostró una alta frecuencia de mutaciones en tumores procedentes de todas las regiones analizadas. El 83% de los tumores evaluados presentó mutaciones en uno o más codones del gen TP53. Sin embargo las células tumorales procedentes de pulmón y cavidad oral presentaron el mayor índice de mutación (66.7%). El exón 8 presentó mayor frecuencia de mutaciones en tumores de todas las regiones evaluadas y el codón 280 fue el de mayor frecuencia de mutación en todas las muestras. La Tabla 6 resume los resultados obtenidos en el análisis de la mutación de TP53.

Tabla 6. Muestras positivas para PCR de los exones del Gen p53

EXON	% de Positivos para PCR de p53	% de Positivos para PCR de p53
5	20.8 (5/24)	34.6 (9/26)
6	50 (12/24)	34.6 (9/26)
Exon 7 (Fragmento I)	45.8 (11/24)	NR
Exon 7 (Fragmento II)	33.3 (8/24)	NR
Exon 8	4/10 (40%)	NR

VIII. CONCLUSIONES

La frecuencia de HPV16 encontrada en los carcinomas epidermoides procedentes de la región orofaríngea y

pulmón en pacientes de Cali, Colombia, están muy cercanos a los reportados para otras regiones del mundo, incluidos países de Latinoamérica y Europa^{19,20}. Las tasas de integración del ADN viral y expresión de los oncogenes virales en el tejido tumoral, presentaron una fuerte asociación, lo que plantea un papel importante de la integración en el desarrollo de este tipo de carcinomas. En pulmón, el papel de la infección de HPV16 en la transformación celular ha sido bastante discutido, debido a las notables diferencias entre los distintos estudios, este trabajo presenta evidencias de la actividad de los oncogenes de HPV16 a través de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales se ha demostrado tienen un papel fundamental en la carcinogénesis de cáncer de cérvix, fuertemente asociado con HPV de alto riesgo. La tasa de mutación de TP53 en carcinomas de las regiones evaluadas en este estudio, especialmente pulmón y cavidad oral, es bastante elevada comparada con la reportada previamente en cabeza y cuello²² o en cáncer de cérvix²³, lo que sugiere un posible efecto de otros factores mutagénicos, tales como tabaco o alcohol. Los resultados encontrados en este trabajo aportan bases para determinar la importancia de la integración de HPV en el proceso de carcinogénesis, dando bases para estudios posteriores. Se requieren estudios con mayor número de muestras, que permitan establecer en forma definitiva la asociación la integración viral con el mecanismo de carcinogénesis en este tipo de carcinomas.

IX. REFERENCIAS

1. Francheschi S, Muñoz N, Boach XF, SnijdersPJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 567-75
2. Syrjanen KJ. HPV infections and lung cancer. *J. Clin. Pathol.* 2002; 55: 885-891
3. Niv A, Sion-Vardi N, Gatot A, Nash MM, Fliss DM. Identification and typing of human papillomavirus (HPV) in squamous cell carcinoma in oral cavity and oropharynx. *J. Laryngol Otol* 2000, 114(1):41-6.
4. Mynger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K.W. Minireview Mechanism of Human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. of Virol.* 2004; 78(21): 11451-11460
5. Jo H, Kim JW. Implications of HPV infection in uterine cervical. *Review Article. Cancer Therapy*, 2005; 3: 419-434.
6. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, ET AL. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189: 12-19.
7. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human Papillomavirus types in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Worldwide: A systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(2):467-475
8. Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human Papillomavirus Type 16 and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin. Cancer Res.* 2002. Res. 8: 3187-3192
9. Hudelistud G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. Physical state and expression of HPV DNA in

- benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gyn Oncol.* 2004. 92(3):873-80.
10. Schmidt MT, Olejnik AK, Gozdzicka-Jozefiak A. The HPV16 E2 transcriptional regulator mode of action depends on the physical state of the viral genome. *Acta Biochemica Polonica.* 2005; 52(4):823-883
 11. Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol.* 2002, 67(4):574-82.
 12. Chan PKS, Chan DPC, To K-F, Cheung JLK, Cheng AF. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral ADN. *J Clin Pathol* 2001; 54:401-403.
 13. Gheit T, Tommassino M. Extraction of ADN from paraffin embedded tissue and HPV-16 detection by E6, E7 PCR. Comunicación personal. 2005. IARC Infection and Cancer Biology Group.
 14. Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, Kim SJ. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol. Oncol.* 1997; 65:121-129
 15. Korbler T, Grskovic M, Dominis M, Antica M. A simple method for RNA isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded lymphatic tissues. *Exp Mol Pathol* 2003, 74:336-340
 16. Klaes R, Woerner S, Ridder R, Wentzetzen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melscheimer P, Von Knebel, Doeberitz, M. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Research* 1999, 59:6132—6136
 17. Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni JR, Herrero R, Bratti MC, Schwartz P, Mortel R, Barnes W, Greenberg M, McGowan L, Scott DR, Martin, M, Herrera, JE, Carrington, M. p53 polymorphism and risk cervical cancer. *Nature* 1998; 396(6711):531-2
 18. Kuklin A, Munson K, Gjerde D, Haefele R, Taylor P. Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms with the WAVE™ DNA Fragment Analysis System. *Genetic Testing* 1997/98; 1(3): 201- 206
 19. Castillo A, Aguayo F, Kriyama C, Torres M, Carrascal E, Corvalan A, Roblero JP, Naquira C, Palma M, Backhouse C, Argandona J, Itoh T, Shuyama K, Izuru Y, Akiba S. Human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in Colombia and Chile. *World Gastroenterol.* 2006 12(38):6188-92
 20. Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Pichi B, Giannarelli D, Rahimi SS, Vigli MG, Venuta A. Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. *Oncol Rep.* 2007; 17(4):931-939
 21. Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR, Vecchione A, Giordano A. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J. Clin Patol.* 2003; 56: 532-536
 22. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis *Clin Otolaryngol.* 2006 31(4):259-266
 23. Mitra S, Banerjee S, Misra C, Singh RK, Roy A, Sengupta A, Panda CK, Roychoudhury S. Interplay between human papilloma virus infection and p53 gene alterations in head and neck squamous cell carcinoma of an Indian patient population. *J Clin Pathol.* 2007; 60(9):1040-1047

X. CURRÍCULOS

Lida Inés Mancilla, M.Sc. Bióloga, Magíster en Bioquímica, Ph.D en Ciencias Biomédicas, docente investigadora de dedicación exclusiva de la USC. Dicta las cátedras Bioquímica y Biología Celular y Molecular en el Programa de Medicina y en la Especialización de Biomateriales. Coordina el Grupo de Investigación Genética, Fisiología y Metabolismo. Sus áreas de investigación son: biología molecular de cáncer, infección y cáncer —específicamente HPV y cáncer de tracto aerodigestivo—. Sus áreas de interés incluyen: riesgo genético para enfermedades

metabólicas, neurodegenerativas y crónicas no transmisibles.

Edwin Carrascal. Médico Patólogo, Ph.D. Profesor titular de la Universidad del Valle. Dicta las cátedras de Patología en el Programa de Medicina y en la Especialización de Patología. Es investigador, integrante del Grupo Registro Poblacional de Cáncer, en las áreas de Patología y epidemiología de cáncer de cérvix, estómago y cavidad oral.

Tarik Gheith. Biólogo, Ph.D. International Agency for Research of cancer France (IARC). Investigador Postdoctorado del Grupo Biología de Infección y Cáncer. Sus áreas de investigación son: mecanismos moleculares de transformación celular de HPV y epidemiología molecular de HPV.

Oscar Mario Tamayo, M.Sc. Licenciado en Biología y Química, Magíster en Morfología. Docente hora cátedra del programa de Medicina de la Facultad de Salud de la

USC. Dicta las cátedras de Anatomía e Histología. Es integrante del grupo Genética, Fisiología y Metabolismo de la USC. Sus áreas de investigación son: marcadores histológicos e inmunológicos y biología molecular de cáncer de estómago, cervical y cavidad oral.

Felipe García. Biólogo, Ph.D. Profesor Titular de la Universidad del Valle. Docente de las cátedras de Virología Molecular y Biología Molecular del Programa de Medicina, la Maestría y el Doctorado en Ciencias Biomédicas. Coordina el grupo de Investigación Patogénesis Molecular. Sus áreas de investigación son la epidemiología molecular y los mecanismos de oncogénesis del Virus HTLV.

Massimo Tommasino, Ph.D. Químico-Farmacéutico. Ph.D. International Agency for Research of Cancer France (IARC). Investigador titular, director del grupo Biología de Infección y Cáncer. Área de investigación: mecanismos moleculares de transformación celular y epidemiología molecular de HPV.