Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
Universidad Nacional de La Plata

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales

Evaluación del rol del virus del papiloma humano (VPH) en el carcinoma esporádico del colon y recto: Tipos virales, integración genómica y carga viral en relación a la actividad oncogénica

Luis Orlando Pérez

Director: Carlos Daniel Golijow

IGEVET-CONICET
(Instituto de Genética Veterinaria "Ingeniero Fernando Noel Dulout"- Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

-2010-

A Dios por darme fortaleza para obtener mis logros.

A mis padres, por su apoyo y amor incondicional

A mis hermanos, que desde lejos me apoyan

A Yanina, el amor de mi vida

Agradecimientos:

Me gustaría expresar mi sincera gratitud a las personas que me han brindado apoyo y colaboración a lo largo de la realización de este trabajo:

Al Dr. Carlos Golijow, por haberme guiado y compartido sus conocimientos e invaluable experiencia en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Fernando Dulout, quien no está más con nosotros, por inestimables comentarios y colaboración.

A los médicos patólogos que dispusieron su tiempo y esfuerzo, la Dra. Anabel Ottino, el Dr. Horacio Pianzola, y al Dr. Rubén Laguens.

Mis más sinceros agradecimientos a todos los integrantes del IGEVET, con quienes compartí añoranzas y anécdotas, y han creado un ambiente estimulante para la investigación científica. Al Dr. Guillermo Giovambattista y el Dr. Diego Posik, por la asistencia otorgada en aspectos técnicos. Al Dr. Pedro Lirón, por las edificantes conversaciones sobre genética. A la directora del IGEVET Dra. Pilar Garcia, por su cordialidad y consejos académicos. A la Dra. Silvina Diaz, por las enseñanzas sobre clonación bacteriana y microbiología en general.

A mi compañera de laboratorio Gisela Barbisan, por permitir que el trabajo cotidiano sea más llevadero, y todos los que pasaron por el grupo, Anahi Contreras, Leo Difranza, Cintia Fernandez.

A los organismos que proporcionaron los fondos: el CONICET, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y el Laboratorio de Diagnóstico Molecular.

A Dios, por darme fortaleza para obtener mis logros; a mis padres y hermanos, que con su amor incondicional desde lejos me apoyan, y a Yanina, el amor de mi vida.

ÍNDICE

1 Introducción 1

1.2 Cáncer colorrectal 2

1.2.1 Epidemiología 3

1.2.2 Síndromes hereditarios 4

1.2.3 Vías putativas de la carcinogénesis colorrectal 5

1.2.3.1 Vía de la inestabilidad cromosómica 5

1.2.3.2 Vía del fenotipo mutador 6

1.2.4 Vías alternativas 7

1.2.5 Factores de riesgo 7

1.2.6 Historia natural y estatificación del cáncer colorrectal 9

1.3 Oncogenes 13

1.3.1 C-myc 13

1.3.2 La Superfamilia ras 14

1.3.2.1. K-ras 14

1.4 Genes supresores de tumores 15

1.4.1 Proteína p53, el guardián del genoma 16

1.4.1.1 Polimorfismo del codon 72 del gen *p53* 16

1.4.2 El gen *RNASEL* 17

1.4.2.1 Polimorfismo del codón 462 de *RNASEL* 19

1.5 Infección y carcinogénesis 20

1.6 Virus del papiloma humano 21

1.6.1 Clasificación y estructura 21

1.6.2 Genoma del virus del papiloma humano 22

1.6.3 Diversidad genética del VPH 23

1.6.4 El ciclo biológico del VPH 24
1.6.5 Productos virales que contribuyen a la patogénesis 25
1.6.6 Factores directamente relacionados con la patogenicidad del VPH 26
1.6.6.3 Integración Viral 27
1.6.7 Epidemiología del VPH. 28
1.6.7.1 VPH y cánceres anogenitales 28
1.6.7.2 VPH y cánceres extragenitales 30
1.7 Evidencia de la acción de los patógenos con el cáncer colorrectal 31
1.7.1 El virus del papiloma humano y el cáncer colorrectal 31
1.8 Objetivos 37
1.9 Hipótesis 38

2 Materiales y Métodos 40
2.1 Muestra en estudio 43
2.2 Procesamiento de las muestras 43
2.3 Detección de ADN-VPH mediante PCR anidada 43
2.3.1. Precauciones para evitar la contaminación de la PCR 44
2.4 Tipificación del ADN-VPH por LIS-SSCP 45
2.4.1 LIS-SSCP 45
2.4.2 PCR enzimo-inmunoensayo 46
2.4.2.1 Protocolo de PCR-EIA 46
2.4.3 Clonación de los genomas virales 49
2.5 Integración 51
2.6 Detección de la amplificación génica del proto-oncogén *c-myc* 54
2.7 Mutación de *K-ras* 12 y 13 55
2.8 Inestabilidad de Microsatélites 56

2.9 Determinación de los polimorfismos del codón 72 del gen *p53* y del codón 462 del gen *RNASEL* 58

2.9.1 Amplificación de *p53* 58

2.9.2 Amplificación de *RNASEL* 59

2.9.3 Protocolo de pirosecuenciación 59

2.10 Análisis estadístico de los resultados 62

2.11 Modelos matemáticos y/o estadísticos 63

2.11.1 Frecuencias génicas y genotípicas 63

2.11.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg 63

2.11.3 Prueba de Chi-cuadrado de Pearson 64

2.11.5 Estimación del riesgo relativo 64

2.11.6 Coeficiente de correlación de Kendall 65

2.11.7 Curva Kaplan-Meier 66

2.11.8 Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial o MDR 66

3 Resultados 68

3.1 Detección del ADN del virus del Papiloma humano 69

3.2 Prevalencia del Papilomavirus Humano 70

3.2.1 Tipos virales 73

3.3 VPH y otras características histopatológicas 75

3.2 Integración de VPH 16 y 18 80

3.3 Amplificación del proto-oncogén *c-myc* 82

3.4 Mutaciones de los codones 12 y 13 del proto-oncogén *K-ras* 87

3.5 Coexistencia de mutaciones de *K-ras* y amplificación de *c-myc* 89

3.6 Inestabilidad de Microsatélites 90

3.7 Polimorfismo del codón 72 del gen oncosupresor *p53* 97

3.8 Polimorfismo del codón 462 del gen *RNASEL* 101

3.9 Interacciones inter-alélicas entre *p53* y *RNASEL* 104

4 Discusión y Conclusiones 105

4.1 Cáncer colorrectal 107

4.2 Detección del ADN del VPH en las muestras de colon y recto 109

4.3 Diferencias en los estudios 113

4.4 VPH en controles 116

4.5 Distribución de los tipos virales 118

4.6 Adenomas y pólipos hiperplásicos 119

4.7 Asociación con otras características histo-patológicas 120

4.8 Entrada del virus 121

4.9 Integración del VPH 125

4.10 Carcinomas de células escamosas del recto y otros 127

4.11 Alteraciones genéticas en el cáncer colorrectal 129

4.11.1 Inestabilidad de Microsatélites 129

4.11.2 Amplificación génica de *c-myc* y cáncer colorrectal 132

4.11.3 Cáncer colorrectal y mutaciones del codón 12 y 13 de *k-ras* 137

4.12 Pólipos hiperplásicos 139

4.13 Cáncer colorrectal y polimorfismo del codón 72 del gen *p53* 140

4. 14 Cáncer colorrectal y polimorfismo del codón 462 del gen *RNASEL* 144

4.15 Valoración del VPH en el carcinoma colorrectal 147

4.16 Comentarios finales y conclusiones 152

4.17 Perspectivas futuras 154

5 Referencias 156

Resumen:

El cáncer colorrectal es la afección gastrointestinal más prevalente y una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo. En el contexto de la biología molecular, este se desarrolla como un proceso de múltiples pasos, caracterizados por un orden secuencial de alteraciones genéticas que ocurren paralelamente al progreso de adenoma-cáncer. Se han propuesto numerosas hipótesis respecto a la etiología del cáncer de colon, pero las causas y los mecanismos genuinos no han sido enteramente dilucidados. Dado el creciente interés que han tomado las infecciones y el cáncer, muchas investigaciones han analizado la relación entre los diferentes microorganismos y la neoplasia colorrectal. En este sentido, algunos trabajos han reportado la presencia del virus del Papiloma humano (VPH) en la mucosa normal y tumores colorrectales. Sin embargo, la mera presencia del VPH en la mucosa del colon es altamente controversial, principalmente por el tropismo de este virus al epitelio estratificado. El objetivo de este trabajo es investigar la presencia del Papilomavirus humano en carcinomas colorrectales y valorar su rol de acuerdo a la asociación con características histopatológicas conocidas.

Se han examinado 291 muestras obtenidas de 274 pacientes que concurrieron a hospitales públicos de la ciudad de La Plata. Estas se dividieron en 94 controles, 86 adenomas, 87 adenocarcinomas colorrectales (una a cinco biopsias por tumor) y 24 pólipos hiperplásicos típicos. La presencia de ADN del VPH fue examinada mediante PCR anidada GP+/My en condiciones de baja estringencia, y se utilizó la amplificación anidada de E2 como marcador de integración viral. Por otro lado, se estudió el grado de amplificación de *c-myc* mediante ensayo de co-amplificación con locus de referencia, el estado mutacional de los codones 12 y 13 del gen *k-ras* mediante RFLP, y el estado de inestabilidad de microsatélites mediante los marcadores BAT26 y BAT40 para las muestras sin tejido normal, y D2S123 y D17S250 para las muestras apareadas. En segundo lugar, se estudió la distribución de los polimorfismos del codón 72 de *p53* y del codón 462 de *RNASEL* mediante pirosecuenciación.

La prevalencia del ADN del VPH fue del 29% para el conjunto global. Aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos, la distribución del virus fue variable (20%-38%). Los tipos VPH 16 y 18 fueron los más comúnmente detectados, y el 25-50% de los casos analizados para integración presentaron interrupción en el gen E2. La infección por VPH no estuvo asociada con la edad, tamaño del tumor, grado de diferenciación, estadío colorrectal o ubicación de los carcinomas colorrectales, pero si hubo una tendencia a una mayor prevalencia en mujeres. Respecto a los oncogenes, los grados más elevados de amplificación de *c-myc* estuvieron asociados a la invasión de los nódulos linfáticos (estadío III), a un menor tamaño de los tumores y a una pobre diferenciación histológica. Las mutaciones de *k-ras* fueron homogéneas en los estadíos del cáncer colorrectal, pero significativamente asociadas a los adenomas con displasia de alto grado. La incidencia de inestabilidad de microsatélites comprendió el 9% de los tumores colorrectales. Cuando se compararon los grupos, la infección por VPH no estuvo asociada a la alteración de *c-myc*, mutaciones de *k-ras* o inestabilidad de microsatélites. En otro análisis, los polimorfismos del codón 72 del gen *p53* y del codón 462 del gen *RNASEL* no presentaron diferencias entre casos y controles, o en la edad de diagnóstico del cáncer colorrectal. De manera similar, no hubo asociación entre dichos polimorfismos y la presencia del ADN del VPH.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el ADN del VPH puede detectarse de manera frecuente en la mucosa del colon, pero la necesidad de realizar amplificaciones anidadas indica que este se encuentra en un muy bajo número de copias y probablemente no realiza infecciones productivas. La distribución relativamente uniforme del virus en los diferentes grupos, así como la falta de asociación con los factores histo-patológicos, alteraciones genéticas y/o polimorfismos génicos, apuntan a que el VPH no posee un papel significativo en las neoplasias colorrectales. Es probable que el Papilomavirus surja como un pasajero circunstancial del tránsito gastrointestinal, y sea detectado en prevalencias variables debido a varios factores, los cuales son discutidos extensamente en el trabajo. La relación esquiva entre el cáncer colorrectal y otros agentes infecciosos también es analizada. Finalmente, los resultados de las alteraciones genéticas de acuerdo al grado de inestabilidad de microsatélites y a otras características histo-patológicas apuntan a que el cáncer colorrectal es una enfermedad muy heterogénea, no fácilmente separable en fenotipos moleculares, y de naturaleza claramente multifactorial.

Abstract

Colorectal cancer is the most prevalent affection of the gastrointestinal system and one of the main causes of cancer deaths in the World. In the molecular context, it develops as a multistep process; characterized by a sequential order of genetic alterations that takes place at the same time as the adenoma- carcinoma sequence progresses. Several hypotheses have been postulated on colorectal cancer etiology, but the real causes and genuine mechanisms have not been entirely elucidated. Due to the growing interest vert into the relationship between infections and cancer, various researchers have considered the implication of different microorganisms in colorectal cancer. In this way, some studies have reported the presence of Human Papillomavirus (HPV) in the normal mucosa and colorectal tumors. However, the mere presence of HPV in colon mucosa is a highly controversial issue. That is mainly because it is known that HPV has a strong tropism for stratified epithelium. The objective of this study is to examine the presence of human Papillomavirus in colorectal cancers and to assess its role based on the potential association with known histo-pathological features.

Two hundred and ninety one samples obtained from 274 patients attending public Hospitals of the city of La Plata, were analyzed. Samples were divided in 94 controls, 86 adenomas, 87 colorectal adenocarcinomas (one to five samples per tumor), and 24 hyperplastic polyps. The presence of HPV DNA was assessed by nested PCR with GP+/My primers in low stringency conditions, and nested PCR for E2 gene as indirect marker of viral integration. In addition, *c-myc* amplification level was studied by a reference locus co-amplification assay, the mutational status of codon 12 and 13 of *k-ras* gene by RFLP, and microsatellite instability by amplification of markers BAT26 and BAT40 for samples without control DNA, and additional markers D2123 and D17S250 for samples with control DNA. In second place, the genotype distributions of *p53* codon 72 and *RNASEL* codon 462 polymorphisms were studied by pyrosequencing technology.

Global HPV DNA prevalence was 29%. Although there was no significant difference among groups, viral distribution was variable (20%-38%). HPV 16 and 18 were the most commonly detected types, and approximately 25%-50% of the analyzed cases showed E2

gene interruption. HPV infection was not associated with age, tumor size, differentiation grade, colorectal cancer stage, although there was a trend of increasing infection in women. Regarding oncogenes, highest grades of *c-myc* amplification were related to lymphatic nodes involvement (Stage III), a lesser tumor size, and poor histological differentiation. *K-ras* mutations were homogeneously distributed in colorectal stages, although they were significantly associated with high grade dysplasia in adenomas. The incidence of microsatellite instability accounted for 9% of colorectal tumors. When groups were compared, HPV infection was not associated with *c-myc* alterations, *k-ras* mutations or microsatellite instability. In other analyses, *p53* codon 72 and *RNASEL* codon 462 polymorphisms did not show differences between controls and cases, or the age of diagnostic for different genotypes. Similarly, there was no association between such polymorphisms and HPV DNA. According to the obtained results, HPV DNA can be detected frequently in colon mucosa, although the requirement of nested amplifications indicates that the virus is in low copy numbers and probably not originating productive infections. The relatively uniform distribution of the virus among different groups, as well as the lack of association with histo-pathological features, genetic alterations or polymorphisms supports the idea that HPV does not have a significant role in colorectal neoplasias. It is probably that Papillomavirus emerges as a transient passenger, and be detected in variable proportions due to several factors, many of which are extensively discussed in this thesis. The elusive relationship between colorectal cancer and other infectious agents is analyzed. Finally, the results obtained from genetic alterations according to instability of microsatellite data, and other histopathological features, indicate that colorectal cancer is an heterogeneous disease, not easily classified in well established molecular phenotypes, and clearly of multifactorial nature.

INTRODUCCIÓN

1.2 Cáncer colorrectal

Los agentes capaces de inducir neoplasias incluyen una serie variada de carcinógenos, dentro de los que se pueden encontrar sustancias químicas, radiaciones ionizantes y virus oncogénicos. En el contexto de la biología molecular, la carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos, caracterizados por la acumulación de alteraciones en los genes que gobiernan la proliferación, anclaje y migración celular.

El cáncer colorrectal es la afección gastrointestinal más prevalente y una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo. Estudios epidemiológicos de poblaciones migrantes revelan que los factores ambientales y de estilo de vida juegan un papel importante en el desarrollo de este tipo de cáncer. En este sentido, los países con hábitos occidentalizados, como la Argentina, presentan las mayores tasas de incidencia. A pesar de los grandes avances en el entendimiento de la biología molecular del cáncer colorrectal, las causas primeras no han sido determinadas, en parte por la falta de claridad de los conceptos existentes sobre su etiología.

Estudios recientes han reportado la presencia del ADN del virus del papiloma humano (VPH) en la mucosa normal y tumores del colon. Debido a su conocida asociación con las neoplasias de otros tejidos, se ha sugerido un posible papel del VPH en la carcinogénesis colorrectal. Sin embargo, hasta la fecha se han publicado escasos trabajos sobre el tema y la real incidencia del virus en este sitio anatómico todavía es desconocida.

1.2.1 Epidemiología

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias que se diagnostican con más frecuencia en el mundo occidental. Globalmente, constituye la segunda causa de muerte por cáncer, ubicándose detrás del cáncer de pulmón en hombres y el cáncer de mama en mujeres (Shibuya *et al.*, 2002). Se estima que existen 783.000 nuevos casos por año, de los cuales la mitad desarrollan metástasis o formas recurrentes. La supervivencia a los 5 años es del 62% y está relacionada con el estadío tumoral y la edad del paciente (Bruckner *et al.*, 2000). La máxima incidencia de esta enfermedad se encuentra en la séptima década, representada igualitariamente entre hombres y mujeres. La mayoría de los casos de cáncer colorrectal son esporádicos (85-95%), es decir, sin historia familiar prominente, mientras que los síndromes hereditarios constituyen el 5-15% de los restantes. Además, hay un número de casos en donde la enfermedad no sigue una herencia mendeliana clásica, presumiblemente por efecto de la penetrancia o por causas multifactoriales (Brose *et al.*, 2000).

Existe un marcado contraste en la incidencia del cáncer colorrectal a lo largo del mundo. Las naciones industrializadas, con estilos de vida occidentalizados, poseen una mayor incidencia que los países en vías de desarrollo. Además, las poblaciones inmigrantes tienden a adoptar los riesgos de las regiones a las que migran. Esto sugiere que los factores ambientales poseen un rol fundamental en el desarrollo del cáncer colorrectal (Janout y Kollávorá, 2001).

Argentina presenta una mortalidad elevada en relación a otros países de América Latina. Las cifras publicadas por Matos y col. (2003) revelan una tasa de 14,5 muertes cada 100.000 habitantes para el sexo masculino y de 9/100.000 para el sexo femenino (período 1997-2001). La tasa de incidencia registrada para el Partido de La Plata (Región XI, 10.037.000 habitantes), para el período 1996-2000, fue de 29 casos cada 100.000 habitantes para el sexo masculino y de 24,67/100.000 para el sexo femenino (FUNDONAR).

1.2.2 Síndromes hereditarios

Se reconoce que entre el 5 y el 15% de los casos de cáncer colorrectal son ocasionados por formas hereditarias de la enfermedad. Estas incluyen un número apreciable de síndromes, los cuales se subdividen en tipos poliposos y no poliposos, según se formen o no proliferaciones colónicas (adenomas o pólipos adenomatosos) en gran cantidad (Burt *et al.,* 1988; Brose *et al.*, 2000).

Los síndromes hereditarios poliposos se manifiestan a una edad temprana, e incluyen la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP), el síndrome de Gardner, el síndrome de Peutz-Jeghers, el síndrome de Turcot y la poliposis juvenil (Bruckner *et al.,* 2000). El síndrome de FAP posee herencia autosómica dominante y representa menos del 1% de los casos. Los individuos afectados poseen múltiples pólipos que aparecen en la adolescencia y, si no son tratados, progresan inevitablemente a carcinomas. Las manifestaciones extracolónicas son muy variadas, e incluyen lesiones retinales, osteomas, tumores cerebrales, etc. La causa principal de este síndrome sería la transmisión de padres a hijos de un alelo mutado del gen oncosupresor *APC* (Burt *et al.*, 1988; Laken *et al.*, 1997; Brose *et al.,* 2000).

Lynch y col. (1988) han identificado múltiples síndromes hereditarios no poliposos de cáncer colorrectal (HNPCC). Estos constituyen el 5-15% de todos los casos y se heredan de forma autosómica dominante (Lynch *et al.*, 1996; Aaltonen *et al.,* 1998). Algunas características de los síndromes HNPCC son un comienzo temprano de la enfermedad (antes de los 50 años), predominancia de tumores en el lado derecho del colon y desarrollo de proliferaciones malignas en otros sitios del cuerpo. La causa principal de esta patología sería la herencia de un alelo mutado de un gen de reparación del ADN, como *hMLH1* (>90% de los casos) (Peltomäki y Vasen, 1997).

1.2.3 Vías putativas de la carcinogénesis colorrectal

1.2.3.1 Vía de la inestabilidad cromosómica

A lo largo de los últimos 20 años se han propuesto varios modelos sobre la carcinogénesis del cáncer colorrectal. Dos vías son ampliamente aceptadas, la primera es el llamado modelo supresor o de pérdida de la heterocigocidad (LOH), cuyas bases genéticas fueron propuestas por Fearon y Vogelstein (1990). Este modelo explica aproximadamente el 85% de los casos esporádicos y se caracteriza por una acumulación progresiva de alteraciones genéticas que acompañan la evolución histológica de los pólipos adenomatosos al carcinoma invasor (Figura 1.1). En dicha secuencia ocurre la mutación ordenada de los genes oncosupresores *APC, p53 y DCC,* así como la activación de los oncogenes *k-ras* y *c-myc*. Los tumores generados por esta vía demuestran una marcada inestabilidad cromosómica, siendo común las deleciones en los cromosomas 5q (*FAP*), 17p (*p53*) y 18q (*SMAD4*) (Vogelstein *et al.*, 1988; Konishi *et al.*, 1996).

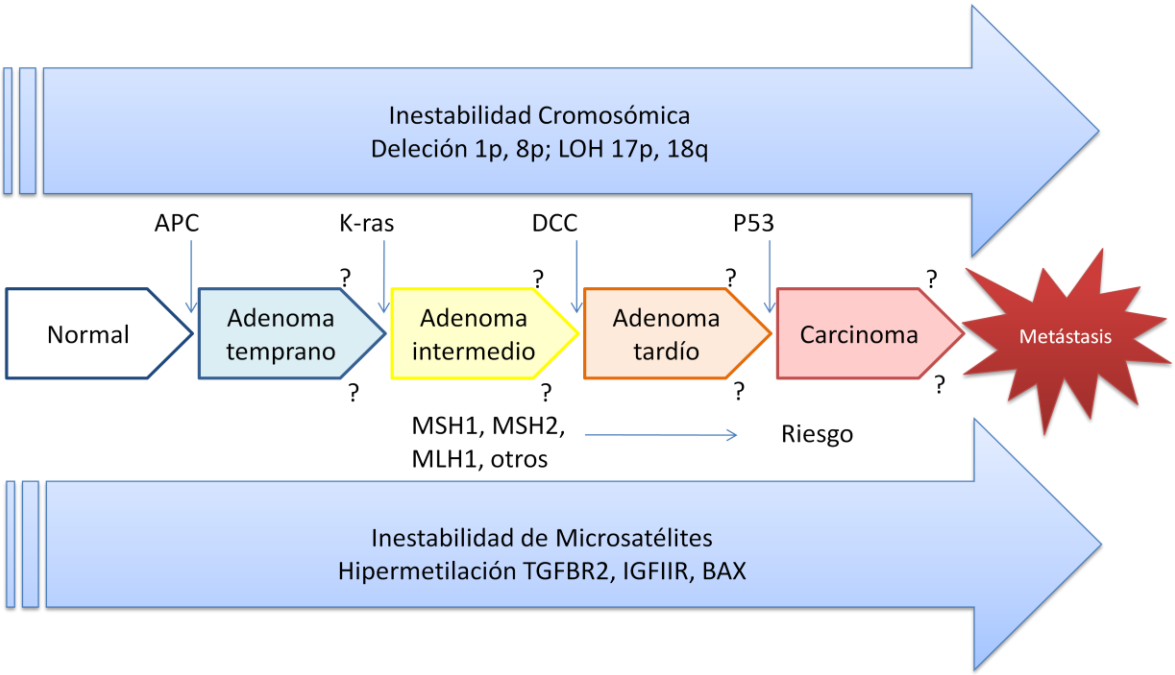


Figura 1.1 Modelo molecular del desarrollo del cáncer colorrectal (Basado en Söreide *et al.*, 2006). LOH es pérdida de la heterocigosidad (*Loss of Heterocigosity*). DCC (*Deleted in colorectal cancer*). BAX (*Bcl 2 Associated X protein*).

1.2.3.2 Vía del fenotipo mutador

La vía alternativa a este esquema se denomina modelo mutador o RER, y se caracteriza por la aparición de mutaciones diseminadas por todo el genoma, fenómeno que es observado en el 15% de los cánceres colorrectales esporádicos y en el 90% de los casos de HNPCC (Peltomäki y Vase, 1997). Una característica común en estos tumores es la inestabilidad de pequeñas secuencias repetidas de ADN, denominados microsatélites (Cuadro 1). El modelo se basa en que, eventualmente, algunas de las mutaciones diseminadas ocurrirán en genes implicados en el control del ciclo celular, promoviendo la transformación maligna (Ilyas y Tomlinson, 1996).

Cuadro 1. Microsatélites

Los microsatélites son repeticiones en tándem de secuencias repetidas que ocurren abundantemente y están dispersas aleatoriamente a través del genoma humano. Típicamente consisten en 10 a 50 copias de 1 – 6 motivos, y están caracterizados por un alto nivel de polimorfismos. A pesar de la variabilidad observada entre individuos, los microsatélites son replicados fielmente en cada división celular en las células germinales y somáticas (Weber y Wong, 1993).

En 1993, tres grupos de investigación describieron un nuevo tipo de inestabilidad genómica, que ha sido llamada inestabilidad de microsatélites (microsatellite instability o MSI) o fenotipo de error de la replicación (replication error o RER), que como fue expuesto anteriormente, se presenta en la mayoría de los individuos con HNPCC o en un subgrupo de individuos con cáncer colorrectal esporádico (Thibodeau *et al*., 1993).

En cáncer colorrectal, se han descripto tres fenotipos diferentes de MSI: el fenotipo MSI-H que es caracterizado por MSI en >30-40% de los loci examinados, el fenotipo MSI-L que es caracterizado por < 30-40% de los loci examinados y el fenotipo MSS que se caracteriza por una ausencia de MSI en cualquier loci (Thibodeau *et al*., 1998). En CRC esporádico el MSI-H está relacionado con una histopatología diferente a MSS y MSI-L (Thibodeau *et al*., 1998; Lengauer *et al*., 1997).

El fenotipo de MSI-H resulta de la acción de maquinaria de reparación de ADN defectuosa. Las mutaciones inactivantes en al menos cinco genes de reparación de ADN (hMLH1, hMLH2, PMS1, PMS2, y hMSH6/GTPBP) son la causa del genotipo MSI-H en tumores HNPCC (Bronner *et al*., 1994). La hipermetilación del promotor hMLH1 sería la etiología del fenotipo MSI-H en el 90% de los carcinomas colorrectales esporádicos (Herman *et al*., 1998).

La inestabilidad de microsatélites ha sido reportado en una variedad de enfermedades malignas, aunque entre tumores esporádicos, el fenotipo MSI-H parece ser más común en tumores de estómago, endometrio y el tracto urinario superior (Revisado en Parc y Halling, 2001).

1.2.4 Vías alternativas

Existen vías alternativas propuestas, que intentan explicar un número menor de casos poco frecuentes de carcinomas colorrectales, como el carcinoma metaplásico escamoso colorrectal, o la secuencia de adenomas serratos a carcinomas. Una revisión detallada de estas vias fue expuesta por Ilyas y colaboradores (1999).

1.2.5 Factores de riesgo

Se han identificado un número apreciable de factores de riesgo para el desarrollo del cáncer colorrectal. Sin embargo, el 75% de las neoplasias del colon ocurren en pacientes sin factores predisponentes conocidos (Winawer *et al.,* 1997). Esto ha llevado a considerar a la población general como un grupo de riesgo intermedio, y a los grupos de individuos con una exposición específica a algun factor como de riesgo intermedio o alto (Gazelle *et al.*, 2000). Se detallan a continuación los factores de riesgo más importantes:

Historia familiar, síndromes hereditarios y enfermedades inflamatorias del colon- Los individuos con riesgo extremo de desarrollar cáncer de colon padecen algún síndrome hereditario, como FAP o HNPCC, o alguna enfermedad inflamatoria del colon (IBD) (Gazelle *et al.,* 2000). El cáncer se desarrolla generalmente luego de 8 años de colitis

ulcerosa o enfermedad de Crohn (Ekbom *et al,* 1990). Por otro lado, una historia familiar de cáncer de colon en uno o más parientes cercanos incrementa las chances de un individuo, en especial cuando es más cercano el parentesco, más familiares se encuentran afectados y más precoz es la edad del inicio (Fuchs *et al.*, 1994).

La Dieta- La dieta posee un rol fundamental en el desarrollo del cáncer colorrectal. Estudios epidemiológicos sugieren que una dieta rica en vegetales actúa como un factor protector de la mucosa del colon, mientras que la ingesta de carnes rojas y grasas se asocia a un incremento del riesgo oncogénico (WCRF, 1997; CMAF, 1998). Sin embargo, una buena parte de los trabajos entran en contradicción con estos resultados, en especial cuando se trata del efecto de las carnes rojas (Key *et al.,* 1998). Se detallan a continuación algunas de las hipótesis de dicha asociación: i) Los mutágenos aparecen naturalmente en las comidas como resultado de la cocción de las carnes (Sinha y Rothman*,* 1999). ii) Las bacterias colónicas normales promueven la conversión de los ácidos biliares a químicos promotores de tumores en un ambiente rico en grasas (Bingham, 2000).

Edad- Las personas por encima de 50 años de la población general asintomática constituyen un grupo de riesgo incrementado para el desarrollo de cáncer colorrectal. Se ha calculado que el 93% de los casos ocurren en esta fracción etaria de la población (Gazelle *et al.*, 2000). Se recomienda que el *screening* deba comenzar a esta edad, o anteriormente si hay historia familiar de cáncer de colon. Las técnicas disponibles actualmente son: test de sangre oculta en las heces, tacto rectal, sigmoidoscopía, colonoscopía y enema de bario (Winawer *et al.*, 1997).

Historia personal de cáncer colorrectal y otros cánceres.- Individuos con una historia personal de pólipos adenomatosos en el colon o cáncer colorrectal están en alto riesgo. De manera similar, una historia previa de otros cánceres, tales como cáncer de vejiga, de ovario, de mama y de endometrio también aumentan el riesgo relativo (Viñez et al., 2003).

Factores de estilo de vida- Se ha reportado que los siguientes hábitos son factores de riesgo leves para el desarrollo del cáncer colorrectal: consumo de alcohol, tabaco, dieta rica en azúcar, falta de actividad física o sedentarismo, obesidad y la vida en ambientes urbanizados (Baron *et al.,* 1998; Muñoz *et al.,* 1998; Baron *et al.,* 1999).

Factores protectores- Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de aspirina, la suplementación con calcio, selenio, NSAIDS, estrógeno, folatos/ metionina, fibras, la actividad física importante y la terapia hormonal postmenopáusica disminuirían el riesgo de desarrollo del cáncer colorrectal (Marcus, 1995; Matzakos *et al.,* 2002; Viñez *et al*., 2003).

1.2.6 Historia natural y estatificación del cáncer colorrectal

El intestino grueso constituye el segmento terminal del tubo digestivo, comunica con el intestino delgado por la válvula ileocecal y con el exterior a través del orificio anal. Su longitud es de 1,8 metros y está dividido en el ciego, colon y recto. La superficie exterior del intestino grueso cuenta con un conjunto de elevaciones y surcos. Interiormente presenta epitelio cilíndrico, sin vellosidades, y musculatura lisa dispuesta en dos estratos. El intestino grueso está revestido de peritoneo, excepto en la mitad inferior de la porción rectal, y se une a la pared abdominal posterior mediante un pliegue (mesocolon) (Figura 1.2).

El colon es la porción media del intestino grueso. Se extiende desde el ciego al recto. La parte ascendente enlaza con el ciego y llega hasta el nivel del hígado en el llamado *ángulo hepático del colon*. El colon transverso, en su continuidad con el descendente, constituye el llamado *ángulo esplénico*, por su proximidad al bazo. El llamado colon sigmoide es la prolongación del colon descendente. El recto tiene unos 5 cm de longitud y presenta una porción perineal o anal, que se abre al exterior por el ano.

La historia natural del cáncer colorrectal está bien descripta, aunque no bien entendida. Está generalmente aceptado que la mayoría de estos cánceres comienzan como pólipos adenomatosos (tumores benignos de origen glandular), teoría conocida como la secuencia adenoma-carcinoma (Muto *et al.,* 1975). El primer paso en el desarrollo del tumor es el inicio de la displasia: se piensa que las criptas (glándulas) displásicas son la primera manifestación histológica (adenomas unicriptales). Los pólipos crecen gradualmente en tamaño y cambian su arquitectura glandular a una vellosa. Los pólipos vellosos poseen un riesgo 10 veces mayor de transformación maligna en comparación con otros tipos (Atkin *et al.,* 1992). Aunque no se conoce la tasa, sólo un pequeño porcentaje de estos pólipos progresan a cáncer. Las células de los adenomas presentan una displasia leve, que pasa a ser moderada, y luego a severa seguida por un cambio maligno, resultando en invasión local con eventual metástasis en sitios distantes (Muto *et al.,* 1997). El progreso de adenoma a carcinoma puede tomar de 7 a 20 años, y probablemente muchos pacientes mueran antes de que se manifieste la enfermedad (Ransohoff y Lang, 1991).

Aunque los tumores pueden ser encontrados en cualquier sitio del colon, la mayoría se presenta en el colon izquierdo (distales al ángulo esplénico) (51 al 61%), el restante se distribuye equitativamente en otros segmentos (Dayal y DeLellis, 1989; Donald y Burhenne, 1993). Datos epidemiológicos sugieren que los tumores distales y proximales constituyen diferentes formas o subtipos de cáncer colorrectal, tal vez influenciados por diferentes factores ambientales y genéticos (Iacopetta, 2002).

Muchas organizaciones y grupos de especialistas han recomendado la gradación TNM para el cáncer colorrectal, aunque el sistema Duke sigue siendo muy popular (figura 1.3), modificación Astler / Coller (AJCC, 2002). En la tabla 1.1 y 1.2 se comparan los sistemas de clasificación.

Es importante mencionar que no se ha encontrado una herramienta de *screening* o un marcador genético temprano confiable que se pueda utilizar con alto valor pronóstico (Diez Alonso *et al.*, 2001). En este sentido, el estadío tumoral sigue siendo el marcador más útil de supervivencia: Un paciente en Duke A tiene una probabilidad de sobrevida a 5 años del 70%; en B, del 45%; en C, del 20%; y en D, practicamente nula (Bosman, 1995).

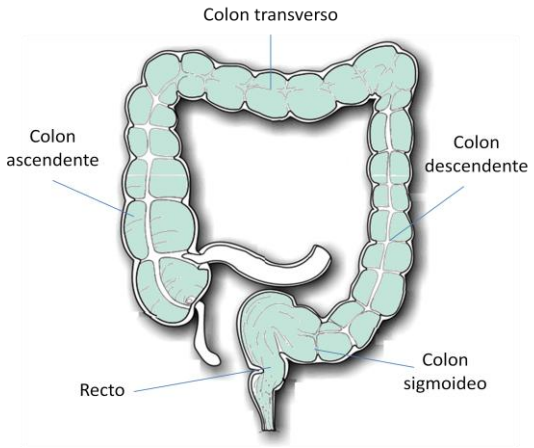


Figura 1.2 El colon se puede dividir en varias partes: colon derecho o ascendente, colon transverso, colon izquierdo o descendente y sigma o sigmoideo. El recto se subdivide en tercio superior, medio e inferior.

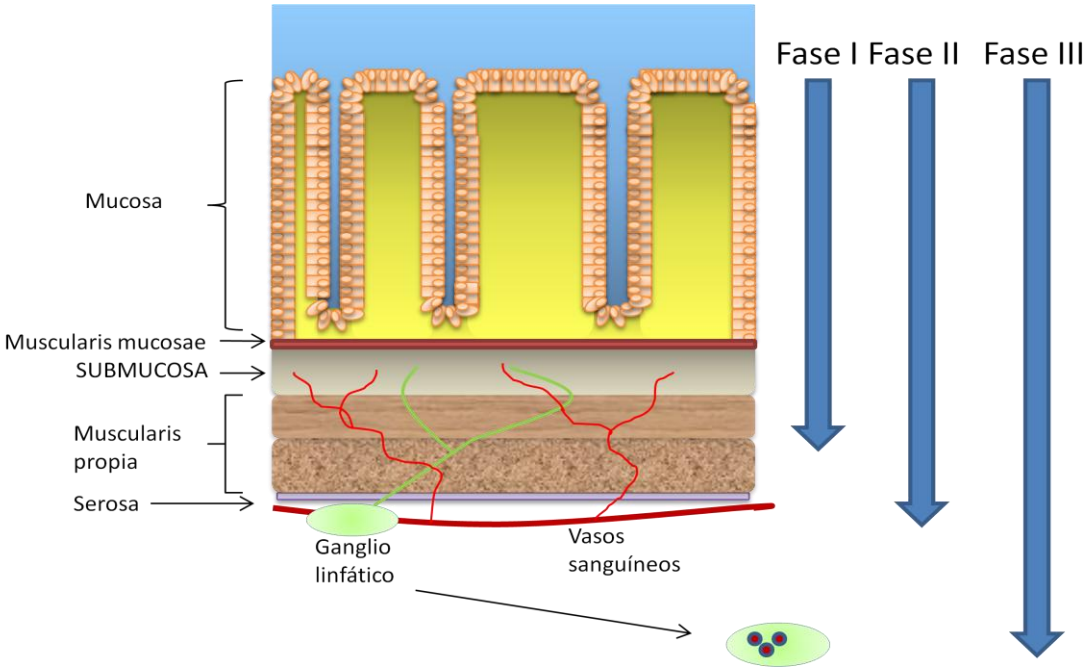


Figura 1.3. Representación histológica de los estadíos del cáncer colorrectal. La fase IV pertenece al estadío metastásico.

Tabla 1.1 Comparación de los sistemas de clasificación del cáncer colorrectal.

Fase (TNM)	Tumor	Nód. linfáticos regionales	Metástasis distantes	Sistema Duke y modificación Astler- Coller
0	Tis	N0	M0	--
I	T1	N0	M0	Dukes A o Astler-Coller A y B1
	T2	N0	M0	
IIA	T3	N0	M0	Dukes B o Astler-Coller B2
IIB	T4	N0	M0	Dukes B o Astler- Coller B3
IIIA	T1-T2	N1	M0	Dukes C o Astler-Coller C1
IIIB	T3-T4	N1	M0	Dukes C or Astler-Coller C2-C3
IIIC	Cualquier T	N2	M0	Dukes C o Astler-Coller C1-C3
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	Dukes -- o Astler-Coller D

Tabla 1.2 Nomenclatura de la clasificación del cáncer colorrectal.

Tumor primario	**Metástasis en nódulos linfáticos**	**Metástasis distantes**
To no puede valorarse. **Tis** cáncer in situ. **T1** invade submucosa. **T2** invade muscular propia. **T3** invade la subserosa o grasa perirrectal. **T4** invade serosa o estructuras vecinas.	**N0** no adenopatías afectas. **N1** de 1 a 3 adenopatías afectas. **N2** cuatro o más adenopatías afectas. **N3** adenopatías afectas en el curso de los vasos principales.	**M0** ausencia de metástasis. **M1** metástasis a distancia,

1.3 Oncogenes

Los proto-oncogenes codifican proteínas relacionadas a la regulación del ciclo celular, se pueden encontrar en varios compartimentos sub-celulares y generalmente son componentes de las cascadas de señalización intracelular. En ciertos casos, la mutación de un proto-oncogén altera su estructura o patrón de expresión, y se generan variantes con función alterada. Estas variantes se denominan oncogenes si actúan promoviendo la tumorigénesis. Según su función, los proto-oncogenes se dividen en: factores de crecimiento, receptores de membrana, proteínas de transducción de señales, quinasas intracelulares de tirosina o treonina/serina y factores de transcripción.

1.3.1 C-*myc*

La familia multigénica *Myc* se encuentra compuesta por seis loci relacionados en términos de estructura y función: *C-myc, N-myc, L-myc, P-myc, R-myc,* y *B-myc*. Se localizan en diferentes cromosomas y su alteración genética ha sido asociada a un gran número de neoplasias, tanto en humanos como en animales (Weinberg, 1989). El gen *c-myc*, ubicado en el cromosoma 8q24, está constituido por tres exones y posee dos sitios de iniciación. Codifica para un factor de transcripción de 62 kD y está involucrado en la regulación del ciclo celular, diferenciación y apoptosis (Sears, 1999).

La proteína c-myc regula la transcripción de un gran número de genes involucrados en la progresión celular, como la *Ciclina D* o *hTERT* (Wu *et al.,* 1999; Bouchard *et al.,* 1999). Además, es uno de los elementos cruciales en el equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, y su expresión inapropiada puede llevar este balance a la dirección equivocada (Lüscher, 2001).

El mecanismo más frecuente de activación de *c-myc* es la amplificación génica y posterior desregulación de la expresión. Dicho evento es característico de varias formaciones malignas humanas y está comúnmente asociado a tumores agresivos y pobremente diferenciados (Pelengaris y Khan, 2003). Sin embargo, como la mayoría de los tumores humanos están muy avanzados en el momento de su detección, es difícil valorar en qué estadío ocurre la activación de este proto-oncogén (Spencer y Groudine, 1991).

El primer reporte sobre la activación de *c-myc* en cáncer de colon fue en ratones, donde se detectó su sobreexpresión y amplificación génica (Yander *et al.,* 1985). En los humanos, la activación de este proto oncogén es un evento común en el desarrollo del cáncer colorrectal y parece estar relacionado con el inicio y la progresión tumoral, detectándose en aproximadamente el 70% de los casos (Diez Alonso *et al.*, 2001). Estudios experimentales indican que la activación de *c-myc* sería causada, al menos en parte, por las mutaciones del gen *APC*, que estimulan la expresión de *c-myc* vía acumulación de la proteína β-catenina (Fearon y Dang, 1999). Por otra parte, los mecanismos que subyacen a la amplificación génica en los carcinomas del colon todavía permanecen sin explicación. En este sentido, existe suma controversia en cuanto a la frecuencia y momento de detección. En general se acepta que la tercera parte de los carcinomas del colon presentan un incremento en las copias de *c-myc*, y que mayores niveles de amplificación están asociados a fenotipos celulares más agresivos, aunque más susceptibles a los tratamientos con sustancias quimioterapéuticas (Augenlicht *et al.*, 1997; Arango *et al.,* 2001).

1.3.2 La Superfamilia *ras*

La familia *ras* codifica para proteínas que funcionan en la célula como interruptores de las grandes vías de señalización intracelular, controlando principalmente la diferenciación y proliferación celular. Las mutaciones en estos genes se han identificado en gran parte de los carcinomas humanos (Bos, 1989).

Las proteínas clásicas Ras, codifican para cuatro proteínas altamente relacionadas: H-ras, N-ras y K-ras, esta última con dos variantes alternativas K-ras4A y K-ras4B (Barbacid, 1987).

1.3.2.1. *K-ras*

El gen *k-ras* codifica para una proteína de 21 kDa, que se encuentra en la membrana celular, posee actividad GTPasa y está involucrado en la transducción de señales,

proliferación y diferenciación celular (Bos, 1989). Este proto-oncogén se encuentra ubicado en el cromosoma 12 y un único evento de mutación lo puede activar. Las mutaciones en los codones 12 y 13, y menos frecuentemente en el codón 61, son alteraciones comunes del cáncer colorrectal y otros cánceres (Andreyev *et al*., 1997), conduciendo las células a la proliferación descontrolada como a la transformación maligna. Las mutaciones en los genes *H-ras* y *N-ras*, por otro lado, son menos frecuentes (Glarakis *et al*., 1998). De acuerdo a los datos publicados, las mutaciones de *k-ras* delimitan la transición desde adenoma tardío a carcinoma temprano, mutados en 10-20% de los casos al 30-50%, respectivamente (Vogelstein *et al.,* 1988; Andreyev *et al*., 1997; Andreyev *et al.,* 1998).

Se han realizado numerosos estudios con el fin de establecer la asociación de *k-ras* e infección por VPH. En este sentido, se sabe que el virus coopera en la inactivación de controles importantes en la preservación de la integridad genómica, promoviendo la aparición de mutaciones activadores. Hasta ahora, se ha encontrado que las mutaciones del codón 12 y 13 se encuentran asociadas con la infección por el VPH en el cáncer cervical (Golijow *et al*., 1999). Por otro lado, solamente un trabajo se ha publicado con mutaciones de *k-ras* e infecciones de VPH en el colon, donde se encontró que ambos eventos son independientes unos de otros (Buyru *et al*., 2006).

1.4 Genes supresores de tumores

En contraste con las mutaciones activadoras que generan alelos oncogénicos de los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores pierden su habilidad para regular el crecimiento celular cuando están mutados. En este caso, la pérdida de función es la que contribuye al desarrollo del tumor. Estos genes son recesivos y por lo tanto ambos alelos deben ser defectuosos para contribuir en el proceso de la transformación celular. Al igual que los proto-oncogenes, las funciones normales de los genes supresores de tumores son diversas, y sus productos se localizan en distintos compartimentos sub-celulares. Se conocen hasta el momento al menos 10 genes supresores de tumores, dentro de los cuales podemos mencionar a los genes *Rb*, *p53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *DCC*, *APC*, *WWOX* y *p16*.

1.4.1 Proteína p53, el guardián del genoma

El gen *p53* está localizado en el cromosoma 17 y codifica para una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos. Esta forma un complejo tetramérico que reconoce una secuencia de ADN, regulando la expresión de varios genes (Soussi y May, 1996). La activación de p53 resulta en la transcripción de numerosos genes que regulan directamente la proliferación celular, la apoptosis, la estabilidad genómica y la diferenciación celular. Estos genes incluyen a $p21^{WAF1/CIP1}$, *GADD45, MDM2, 14–3–3-s, BAX, B99, TSP1*, etc. (Nakamura, 2003).

Una de las funciones más importantes de p53 es el arresto del ciclo celular. Cuando se produce una alteración en la secuencia normal del ADN, p53 activa la síntesis de p21. Esta se une al complejo CDK/ciclina D, impidiendo la progresión del ciclo celular a través de G1. Simultáneamente, se activa la vía de reparación y síntesis del ADN, mediante la expresión de los genes *PCNA* y *GADD45*. Si el daño del ADN es severo, p53 activa genes relacionados a la inducción de la apoptosis, tales como *BAX* o *KILLER/DR5* (Woods y Vousden, 2001).

El gen *p53* se encuentra mutado en el 50% de todos los tipos de cáncer humanos, constituyendo el blanco génico más alterado (Hollstein *et al.,* 1991). La función normal de *p53* puede perderse de numerosas formas, la más común es la deleción de una región del cromosoma 17p y mutación sutil en el otro alelo. Esto ha sido documentado en un gran número de neoplasias, incluyendo las de cerebro, pulmón, hígado, vejiga y colon (Nigro *et al.,* 1989; Harris, 1993).

1.4.1.1 Polimorfismo del codon 72 del gen *p53*

Se han descripto dos variantes del gen *p53*, en relación a un sitio polimórfico en el codón 72, la variante arginina (p53Arg) y prolina (p53Pro). Estas dos isoformas despliegan diferencias funcionales en sus actividades bioquímicas y biológicas (Beckman *et al.,* 1994; Thomas *et al.,* 1996). Este polimorfismo ha sido extensamente estudiado en el cáncer

cervical, debido a que se ha demostrado que la variante *p53*Arg es hasta siete veces más susceptible a la degradación dirigida por la proteína viral E6 del VPH que la variante *p53*Pro. Por lo tanto, se ha especulado que el genotipo homocigota p53Arg/Arg tendría una mayor susceptibilidad de desarrollo de neoplasias asociadas al VPH (Storey *et al.,* 1998). En lo concerniente al cáncer cervical, los resultados delatan un riesgo mayor para adenocarcinomas (OR=1,7) en comparación con carcinomas de células escamosas (OR= 1,5) (Koushik *et al.,* 2004).

Independientemente de la interacción con el VPH, se ha demostrado que las variantes del codón 72 de *p53* son funcionalmente diferentes *in vitro,* y que además el alelo p53Arg induce la apoptosis al menos cinco veces más eficientemente que la variante prolina (Dumont *et al*., 2003). Hasta la fecha, las investigaciones se han extendido hacia todos los tipos de carcinomas, inclusive el cáncer colorrectal (Murata *et al.,* 1996; Sayhan *et al.,* 2001; Pérez *et al*, 2006; Krüger *et al*., 2005; Krüger *et al*., 2007), y en especial en aquellos cuyo desarrollo se sospecha estar involucrado el Papilomavirus humano.

Los resultados obtenidos en grupos de pacientes con cáncer colorrectal son contradictorios. Mientras que estudios realizados en poblaciones en Turquía y Japón (Kawajiri *et al*., 1993, Murata *et al*., 1996) no mostraron correlación entre el polimorfismo de *p53* y neoplasias de colon, un trabajo preliminar a la presente tesis conducido en 53 carcinomas obtuvo una leve pero significativa diferencia en la distribución de los genotipos respecto a una población normal (Pérez *et al*., 2005).

1.4.2 El gen *RNASEL*

El gen *RNASEL* codifica para una proteína quinasa de 740 aminoácidos, denominada RNase L, que posee tres dominios y capacidad de dimerizarse, y se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (1q25.3) (Smith *et al*., 1996). RNase L tiene actividad endorribonucleasa y actúa como mediador en la vía del sistema oligoadenilato ligado a 2’-5’ (2-5A) regulado por interferón, el cual está asociado a actividades antivirales y pro apoptóticas. A través del sistema de transducción de JAK-STAT, el interferón induce a la familia de oligosintetasas 2’-5’ OAS, que a su vez son activadas por ARN doble cadena.

Las OAS convierten el ATP en pirofosfato y en una serie de pequeños oligoadenilatos ligados a 2'-5' conocidos como 2-5ª (Zhou *et al*., 1993). La única función bien conocida de esta vía es la activación de Rnase L, que posee un dominio de unión y de represión en el extremo N terminal, y un dominio similar al de una quinasa y ribonucleasa en el extremo C terminal (Silverman, 2003).

Existe evidencia que indica que Rnase L está asociado a la inducción y regulación de la apoptosis en respuesta a infección virales o a otros estímulos externos (Xiang *et al*., 2003). Es más, los estudios de cáncer de próstata hereditario han demostrado que Rnase L posee una función supresora de tumores. El gen se encuentra en un locus de susceptibilidad para el cáncer de próstata hereditario denominado HPC1 ("H*ereditary Prostate Cancer on Chromosome 1q24-25"*), donde las alteraciones cromosómicas son frecuentes en familias que sufren esta enfermedad (Silverman, 2003). En este sentido, los niveles de la proteína RNase L se encuentran sobre expresados en tumores colorrectales, lo que parece ser un evento temprano en la carcinogénesis colorrectal (Wang *et al*., 1995). En la línea celular derivada de carcinoma de colon HT-29 el efecto coloidal del tratamiento con interferón gamma (IFNγ) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNFα) fue relacionado a la incapacidad de procesar rRNA, al incremento en la actividad de la sintetasa 2-5, y posiblemente a la activación de RNase L dependiente de 2-5ª (Chapekar y Glazer, 1988). Estudios más recientes sugieren que la activación de RNse L responde a un espectro más amplio de factores: Shock osmótico y de membrana causado por Cloruro de Calcio, estrés oxidativo ocasionado por H_2O_2, inflamación estimulada por TNF alfa y quimioterapia. Solamente dos mutaciones de la línea germinal han sido firmemente asociadas con el cáncer de próstata familiar, estas son Glu265X y Met1Ile, que según los estudios en niveles de expresión génica son cambios que inactivan la función de la proteína (Carpten *et al*., 2002). Con respecto a otros tipos de cánceres, se ha encontrado que la alteración de este gen también podría estar asociada a un riesgo incrementado en cáncer de cérvix, de cabeza y cuello y de cáncer de mama (Madsen *et al*., 2008). Aún más, algunos polimorfismos relevantes han sido identificados para Rnase L, dentro de éstos se destaca el cambio Arg462Gln en cáncer de próstata esporádico y hereditario (Rökman *et al*., 2002).

1.4.2.1 Polimorfismo del codón 462 de *Rnase L*

El codón 462 codifica para un polimorfismo G/A (Arg462Gln) en el nucleótido 1385 que se encuentra dentro de la región quinasa. Este cambio ha suscitado mucho interés porque la variante glutamina ha sido asociada con el cáncer de próstata hereditario (HPC) y el esporádico (Rökman *et al*., 2002).

El polimorfismo posee dos variantes que están directamente asociadas a la capacidad de la enzima de dimerizarse: Se ha demostrado experimentalmente que la variante glutamina posee tres veces disminuida su capacidad enzimática respecto a la variante arginina, y posee menos capacidad para causar apoptosis en respuesta a moléculas 2-5A en ensayos *in vitro* (Xiang *et al*., 2003).

Se ha estudiado este polimorfismo en diversos tipos de cánceres, incluyendo el cáncer colorrectal. Un grupo de investigación liderado por Krüger y col. encontró una asociación significativa entre este polimorfismo y la edad de aparición del cáncer colorrectal no-polipósico hereditario. En el estudio, aquellos individuos cuya enfermedad se manifestaba en promedio a los 40 años poseían el genotipo Arg/Arg, mientras que en pacientes Gln/Gln la edad de aparición era significativamente menor, con un promedio de 34 años (Krüger *et al*[B]., 2005). Las razones porque esto sucede se deconocen, pero el grupo de pacientes asociado presentaba mutaciones de la línea germinal en los genes de reparación del ADN MSH2 o MLH1. Hasta ahora, no se ha relacionado el polimorfismo de *RNASEL* con el carcinoma colorrectal esporádico. En un trabajo posterior, el mismo grupo encontró que el codón 72 del gen *p53* y el codón 462 del gen *RNASEL* presentaban un efecto combinado del tipo aditivo respecto de la edad de inicio del cáncer colorrectal hereditario.

1.5 Infección y carcinogénesis

Se estima que entre el 15-18% de la incidencia mundial de cáncer está asociada a la inflamación causada por agentes infecciosos (zur Hausen, 2002). Sin embargo, este valor ha sido estimado sobre la información disponible de cánceres de etiología infecciosa conocida, tales como cáncer de cérvix, gástrico y de hígado. A medida que la tecnología para detectar agentes biológicos avanza y se acumula un número mayor de estudios, la proporción de cánceres asociados a microorganismos podría elevarse. El hallazgo de un vínculo entre cáncer y un agente infeccioso específico abre nuevas oportunidades, tanto para la prevención del cáncer como para el entendimiento de la historia natural de la enfermedad y el tratamiento de la misma.

Entre las bacterias vinculadas al cáncer, la infección crónica por *Helicobacter pylori* ocasiona inflamación, úlceras y cáncer gástrico. Su potencial maligno se debe a la acción de su factor patogénico Cag A (*citotoxin associated gene A*), que interactúa con proteínas del ciclo celular resultando en crecimiento celular y movilidad (Lochhead y El-Omar, 2007). También se ha sugerido una asociación entre la infección por *H. pylori* y el adenocarcinoma colorrectal, pero los riesgos relativos obtenidos han sido no significativos (Burnett-Hartman *et al*., 2008). Otro caso concreto lo presenta la endocarditis infecciosa de *Streptococcus bovis,* un estreptococo del grupo D, no enterococal, y que es encontrado en la flora normal del tracto gastrointestinal entre el 6-15% de los individuos adultos. En ocasiones pasa a la sangre y puede ocasionar bacteriemia y endocarditis, condición que se asocia con neoplasias colónicas prevalentes (Waisberg *et al.,* 2002; Gold *et al.,* 2004). Otra infección bacteriana sospechada de relacionarse con cánceres humanos es producida por *Chlamydia trachomattis.* Se ha demostrado que esta bacteria posee varios mecanismos potencialmente oncogénicos, entre los que se destaca la actividad mitogénica y la linfo-proliferación policlonal (Lehtinen *et al*., 1986; Räsänen *et al*., 1986; Fan *et al*., 1998).

También las parasitosis han sido asociadas con cánceres humanos. Los helmintos (Schistosoma, Opistorchis, Clonorchis) inducen infección crónica en la vejiga, el colon y en el recto, incrementando así el riesgo de transformación neoplásica. De las cinco especies de Schistosoma que infectan los humanos, *S. haematobium* y *S. japonicum*

presentan evidencia considerable sobre una asociación con el cáncer urinario y colorrectal, respectivamente (Rosin y Hofseth, 1999; Qiu *et al.,* 2005).

La evidencia experimental y epidemiológica indica un papel preponderante de los virus en el proceso de transformación y malignidad celular. Los mecanismos por los cuales estos promueven transformación son diversos. De manera indirecta pueden inducir inmuno-supresión o modificar el genoma del hospedador. Directamente pueden codificar oncogenes específicos o alterar la expresión de proteínas celulares en el sitio de la integración viral (Anttila, 2000). Los Papilomavirus humanos (VPH), virus de la hepatitis B (HBV), virus Epstein-Barr (EBV) y virus de la leucemia humana de células T (HTLV) son ejemplos claros de cómo las infecciones virales explican cerca del 15% de la incidencia de cáncer mundial.

El Virus del Papiloma Humano (VPH) causa proliferación benigna epitelial, pero también ha sido asociado a cánceres animales y humanos. Infecciones específicas de tipos de VPH anogenitales conducen a un riesgo incrementado de conversión maligna, mientras que tipos de bajo riesgo causan tumores invasivos cuando se suman condiciones determinadas en el hospedador. De esta manera, el VPH es el agente causal del cáncer de cérvix, y ha sido implicado en carcinomas anogenitales y en otros sitios anatómicos (zur Hausen, 1999).

1.6 Virus del papiloma humano

1.6.1 Clasificación y estructura

El virus del papiloma humano (VPH) es un agente epiteliotrópico miembro de la familia *Papillomaviridae,* género *Papillomavirus* (van Regenmortel *et al.,* 2000). Debido a su estructura semejante a los poliomavirus, fue anteriormente clasificado dentro de la familia *Papovaviridae* (Raj, 1994). Hasta el momento se han identificado más de 120 genotipos virales distintos y se han obtenido secuencias parciales de más de 80 genomas (Cox *et al.,* 2001).

El virión del VPH posee una nucleocápside icosaédrica de 72 capsómeros, desnuda, de 55nm de diámetro. Está constituido por ADN de doble cadena circular, de unos 8 kb de longitud, que se replica en el núcleo celular (Shah y Howley, 1990). Los genomas de los diversos tipos tienen la misma organización general, pero pueden diferir considerablemente en longitud y secuencias. La estructura no envuelta del virus le otorga una resistencia relativa al calor y a los solventes orgánicos (Roden *et al.,* 1997; Stoler, 2000).

1.6.2 Genoma del virus del papiloma humano

El genoma del Papilomavirus humano consiste en ADN de doble cadena circular, de 7200-8000 pb., super-enrollado y condensado por su asociación a proteínas de tipo histónicas, en una estructura que se asemeja a la cromatina celular (Shah y Howley, 1990). Contiene más de diez marcos abiertos de lectura, que revelan ser altamente conservados entre los miembros de este grupo. La transcripción del ADN es unidireccional y de regulación compleja (Turek, 1994).

El genoma del VPH puede ser dividido en tres regiones: 1)- La región de control larga (**LCR**) o región regulatoria río arriba (**URR**), que posee las secuencias de regulación para la replicación y la expresión génica. Este segmento varía substancialmente entre los tipos de VPH individuales y posee aproximadamente 1000 pb. 2)- La región temprana (**E**), que comprende los genes *E1-E8,* involucrados en la persistencia del genoma, replicación del ADN y activación del ciclo lítico. Esta región abarca del 50 al 70% del genoma viral. 3)- La región tardía (**L**), que contiene los genes que codifican los componentes de la cápside, *L1* y *L2*. Una de las proteínas de la cápside, L1, tiene un peso molecular de 55.000 dalton y su marco abierto de lectura (ORF) está altamente conservado entre los distintos tipos de Papilomavirus.

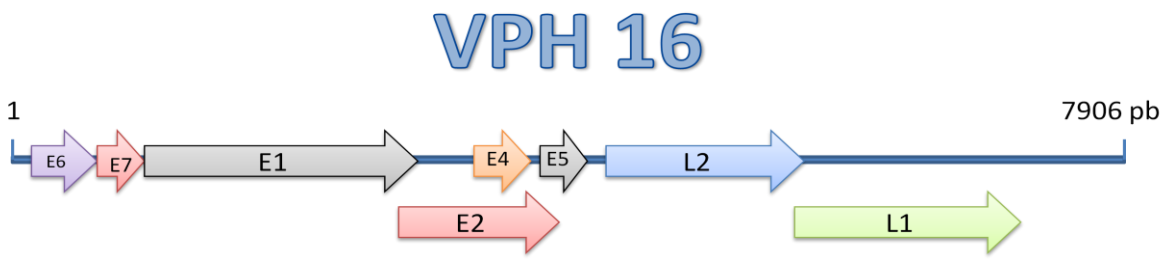


Figura 1.4. Mapa genómico del VPH 16 donde se delimitan los marcos de lectura abierta.

1.6.3 Diversidad genética del VPH

Existen más de 120 tipos de VPH, los cuales se clasifican según el grado de homología de las secuencias de ADN. Se considera un nuevo tipo de VPH cuando el marco abierto de lectura *L1* presenta más del 10% de diferencia respecto de prototipos establecidos (Delius *et al.,* 1998). La gran diversidad genética resultante se explica por una dilatada co-evolución con los humanos y los mamíferos en general (Bernard, 1994). Basado en la composición de los ácidos nucleicos se han definido numerosos subgrupos, los cuales se corresponden en buena manera con los agrupamientos clínicos (Lörincz *et al.,* 1992).

Los Papilomavirus pueden ser agrupados en tipos cutáneos y mucosos según infecten células basales de la piel o las mucosas. El primer grupo consiste en tipos comunes a la población general, como son los agentes etiológicos de las verrugas plantares (VPH-1), verrugas comunes (VPH-2, -4), y de la condición *epidermodysplasia verruciformis* (VPH -5, -8). El segundo grupo está constituido por miembros que causan infecciones en el epitelio anogenital u orofaríngeo: los tipos VPH-6, 11, 34, 40, 42, 44, 53, 55, 59, 61, etc., se denominan tipos virales de bajo riesgo por hallarse asociados a una variedad de proliferaciones benignas: neoplasias intraepiteliales, papilomas faríngeos, orofaríngeos y anogenitales, queratocantomas, verrugas anogenitales y displasias leves. Los tipos VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, etc., son considerados de alto riesgo porque están comúnmente asociados a lesiones displásicas moderadas o severas y al cáncer cervical

invasor, cáncer de vulva, de vagina, pene y ano (zur Hausen, 1996; Bonnez y Reichman, 2000; Stoler, 2000).

1.6.4 El ciclo biológico del VPH

El ciclo biológico del Papilomavirus está estrechamente ligado al grado de diferenciación de la piel o mucosas (Figura 1.5). Para poder establecerse en el epitelio, el virus debe ganar acceso a las células basales. Una vía común de infección es a través de micro-traumas, los que se forman en gran número en las abrasiones menores y en el acto sexual.

Una vez que el VPH ha ingresado a las células epiteliales basales, el genoma se localiza en el núcleo de forma episomal, y la replicación viral queda limitada al ciclo celular. En esta fase, la producción de las proteínas virales es mínima, expresándose los genes *E6* y *E7*, y en una menor cantidad otros genes tempranos. Los mismos estimulan la proliferación y expansión lateral de las células basales, creando un ambiente propicio para la subsecuente replicación a medida que las células suprabasales se van diferenciando (zur Hausen, 2002).

Cuando la infección ha sido firmemente establecida, el VPH debe migrar a las capas superiores y producir los componentes estructurales. Esto es logrado mediante la supresión de los genes *E6* y *E7* por parte de las proteínas regulatorias virales E1 y E2, que permiten que las células basales infectadas dejen de proliferar y se diferencien a queratinocitos. Al mismo tiempo, el ADN del VPH inicia su replicación como círculo rodante utilizando las enzimas del hospedador (Dowhanick *et al.,* 1995; Frattini *et al.,* 1997). Cuando los queratinocitos alcanzan las capas superficiales, se promueve la expresión de los genes tardíos, permitiendo el ensamblaje de las partículas virales y su subsecuente liberación.

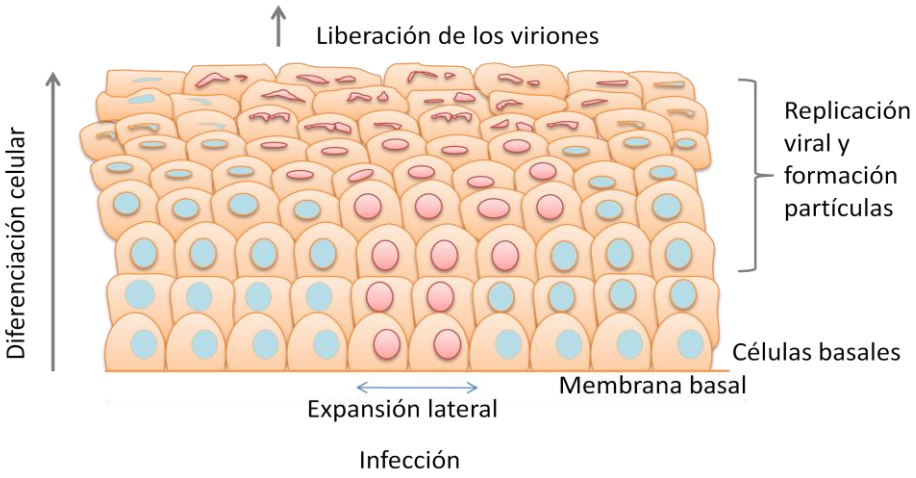


Figura 1.5. Ciclo biológico del virus del Papiloma humano.

1.6.5 Productos virales que contribuyen a la patogénesis

Los Papilomavirus de alto riesgo son potentes inductores de la proliferación celular y pueden inmortalizar un gran número de tipos celulares humanos. El potencial maligno de los diferentes tipos virales se basa en la interacción de las oncoproteinas E6 y E7 con diversos factores celulares, siendo los más importantes pRb y p53.

El gen *E6* del VPH 16 codifica para una proteína de 151 aminoácidos que presenta dos motivos dedos de zinc. Presenta varias propiedades biológicas, como la formación de un complejo con la proteína celular E6-AP (*E6-associated protein*) y el estímulo de la degradación de p53 por el sistema proteasa dependiente de la ubiquitina (Werness *et al.,* 1990; Scheffner *et al.,* 1993). La proteína p53 tiene un papel crucial en el mantenimiento de la integridad del genoma celular y su inactivación por E6 resulta en la inhibición de la apoptosis e inestabilidad genómica (Klingelhutz *et al.,* 1996; Veldman *et al.*, 2003). Otras actividades asignadas a E6 son la activación de la subunidad catalítica de la telomerasa y el incremento en la vida media de las quinasas de la familia SRC (Oda *et al.,* 1999; Veldman *et al.*, 2001).

El gen *E7* del VPH 16 codifica para una fosfoproteína de 98 aminoácidos con dos motivos Cys-X-X-Cys. Una característica de la proteína E7 es su afinidad por pRb, la proteína

retinoblastoma (Dyson *et al.,* 1989). La formación del complejo E7/Rb libera el factor de transcripción E2F, que permite la expresión de genes que regulan el ciclo celular, como las ciclinas E y A (Zerfass *et al.,* 1995). Además, se ha postulado que E7 bloquea la función de los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina p21 y KIP1 (Zerfass-Thome *et al.,* 1996*;* Jones *et al.,* 1997).

Mediante el bloqueo de dos genes oncosupresores cruciales, las proteínas E6 y E7 contribuyen significativamente al potencial de transformación celular, promoviendo fenotipos sensibles a la acumulación de mutaciones y refractantes a los estímulos anti-proliferativos. Hasta el momento, otras proteínas del VPH no han demostrado poseer un rol significativo en los procesos de transformación maligna. La proteína E5 parece ser importante en la estimulación del ciclo celular y en la inhibición de la apoptosis (zur Hausen, 2000). Sin embargo, el marco abierto de lectura de E5 es frecuentemente interrumpido en las células de carcinoma, indicando la ausencia de un papel esencial en el mantenimiento del fenotipo maligno (Schwarz *et al.,* 1985).

1.6.6 Factores directamente relacionados con la patogenicidad del VPH

La importancia de VPH de alto riesgo en el desarrollo de cáncer en regiones ano-genitales está fuertemente establecida. Sin embargo, la mera presencia del virus no implica que una lesión terminará en cáncer. Por lo tanto, el análisis del rol del VPH en otros sitios anatómicos deben incluir los factores directamente relacionados con la patogenicidad del virus.

Persistencia

La persistencia de la infección del VPH es uno de los factores muy asociados al riesgo de la incidencia de estadíos pre-malignos de carcinoma cervical (IARC, 2007). Parece ser que aquellos individuos que no pueden resolver la infección del VPH son más predispuestos a la enfermedad. El factor determinante de la patogenicidad que subyace la persistencia no se encuentra bien establecido, pero existen varios factores contribuyentes que se explican en las siguientes secciones:

Variantes

Aunque el tema es de alguna manera controversial, se ha propuesto que ciertas subvariantes de los tipos de VPH son más agresivas que otras. En un artículo reciente se ha encontrado que las variantes no europeas de los tipos de alto riesgo VPH 16 y 18 se encuentran asociadas con displasia severa y poseen una prevalencia más alta en cánceres invasivos que en estadíos pre-malignos de carcinoma cervical cuando fueron comparados con las variantes europeas (Calleja-Macias *et al*, 2004).

Carga viral

Como regla general a otras enfermedades ocasionadas por microorganismos, la persistencia de la infección se encuentra muy asociada a la carga viral. Es uno de los marcadores de riesgo del cáncer cervical más utilizados, y el que posee mejor capacidad predictora (Bosch *et al*., 2002). Sin embargo, el optimismo inicial relacionado al valor clínico fue atemperado por las inconsistencias entre la asociación de la persistencia y duración de la infección, y subsecuente riesgo de adquisición o progresión de enfermedad cervical (Ho *et al*., 1998; Josefsson *et al*., 2000; Dalstein *et al*., 2003; Moberg *et al*., 2005; Boulet *et al*., 2008).

En general, las metodologías de detección de carga viral en tejido cervical poseen un solapamiento substancial entre mujeres con y sin CIN de alto grado, limitando la aplicabilidad clínica del análisis. Parece ser que la carga viral del VPH se encuentra asociado a precursores de cáncer cervical para la mayoría de los tipos de Papilomavirus de alto riesgo, pero solamente la carga viral del VPH 16 predice el desarrollo de la enfermedad incidente (Gravitt *et al*., 2007; Boulet *et al*., 2008).

1.6.6.3 Integración Viral

El estado físico del ADN del VPH parece jugar un rol muy importante en la transformación maligna. De hecho, la integración viral ha sido indicada como una de las alteraciones genéticas más frecuentes en los tumores genitales avanzados (zur Hausen, 1996). El mecanismo por el cual la integración del ADN promueve la transformación maligna se

explica fundamentalmente por la interrupción del gen viral E2 en el proceso de inserción viral. Este gen es un regulador negativo de los oncogenes E6 y E7, ocasionando la expresión continua de éstos así como la estimulación de la proliferación celular (Chakrabarti y Krishna, 2003).

Varios estudios han demostrado que el ADN del VPH se encuentra integrado en el 50-90% de los carcinomas asociados a VPH (Badaracco *et al*., 2002; Guo *et al*., 2007). De acuerdo al grado de integración, el genoma del VPH puede hallarse de tres maneras: totalmente integrado, es decir, acoplado al cromosoma humano (denominado *integrant*); en forma episomal, o una mezcla de ambos tipos. Inicialmente se pensaba que el ADN en forma totalmente integrada era una forma exclusiva de los carcinomas o estadíos avanzados del cáncer cervical, aunque trabajos recientes sostienen que niveles apreciables de integración se detectan en los inicios de la progresión maligna, incrementándose con el progreso de las lesiones (Peitsaro *et al*., 2002; Badaracco *et al*., 2002; De Marcoa *et al*., 2007; Guo *et al*., 2007). La proporción de tumores genitales con formas exclusivamente episomales indican que la integración es importante, aunque no esencial. Existe evidencia que indica que el comportamiento de los tipos virales de alto riesgo difiere respecto a su capacidad de integración, mientras que VPH 16 se encuentra en formas mixtas en carcinomas, VPH 18 se encuentra mayoritariamente integrado (Klaes *et al*., 1999; Badaracco *et al*., 2002; Andersson *et al*., 2005).

1.6.7 Epidemiología del VPH.

1.6.7.1 VPH y cánceres anogenitales

La evidencia sobre el papel etiológico del VPH en el desarrollo del cáncer cervical ha sido consistente, detectándose el ADN del virus en más del 95% de los cánceres cervicales de todo el mundo. Aunque la presencia del ADN viral no prueba rol etiológico, la base mecanística para esta relación fue suministrada por numerosos estudios experimentales *in vitro* y en animales (Stoler, 2000). Los factores de riesgo más importantes para la infección viral en el cuello uterino son el número de compañeros sexuales y la edad del individuo. Las asociaciones con otras variables de riesgo, tales como factores

demográficos, características reproductivas, uso de contraconceptivos, cigarrillo y factores dietarios, han sido menos consistentes (Brisson *et al,* 1994; Adam *et al.,* 2000). El VPH confiere un incremento en el riesgo de carcinogénesis cervical de 10-100, al menos un orden de magnitud superior que cualquier otro factor de riesgo estudiado. Sin embargo, la infección viral constituye un factor necesario, pero no suficiente, para la carcinogénesis cervical, como lo demuestra la incidencia incrementada de cáncer en individuos trasplantados e inmunosuprimidos (zur Hausen, 1996).

El cáncer anal es considerado como una enfermedad sexual transmisible, clínicamente relacionada al desarrollo de verrugas anales e infección por tipos oncogénicos del VPH. Esta localización anatómica incluye una región de transición epitelial semejante a la observada en el cuello uterino. Trabajos recientes revelan prevalencias del ADN viral por encima del 85% en carcinomas anales. Los factores de riesgo más importantes son el número de compañeros sexuales, historia de verrugas e intercurso anal. La incidencia en varones homosexuales es muy alta e individuos HIV positivos están en mayor riesgo de desarrollar infecciones persistentes del VPH (Gervaz *et al.,* 2003).

El cáncer de vulva de la mujer menor de 50 años estaría etiológicamente ligado al VPH, cursaría con lesiones coexistentes de neoplasia vulvar de alto grado y presentaría los factores de riesgo característicos del cáncer cervical. Las estimaciones de prevalencia del VPH en carcinomas vulvares condilomatosos y basaloides son mayores al 55% (Joura *et al.,* 2002). El cáncer de pene presenta prevalencias variables de acuerdo al tipo histológico, partiendo desde aproximadamente el 20% en el carcinoma verrugoso escamoide (SCC) hasta el 67% en carcinomas basaloides/condilomatosos. Se estima que la mitad de todos los tipos de carcinomas de pene están asociados a la infección por VPH (Backes *et al.,* 2009). Una mayor detección del ADN Papilomavirus de alto riesgo se ha reportado en cáncer de vagina. La positividad global para este sitio se ubicó entre 65-100% (Daling *et al.,* 2002).

1.6.7.2 VPH y cánceres extragenitales

Los Papilomavirus de tropismo cutáneo, que mayoritariamente se clasifican dentro del género beta de la familia, están implicados en algunos tipos de cáncer de piel no no melánico (no melanótico) y en pacientes con *epidermodysplasia verruciformis* (EV), una rara enfermedad hereditaria y cosmopolita (Lutzner y Blanchet-Bardon, 1985). Aproximadamente el 50% de los pacientes con lesiones progresan a cáncer, en general en sitios expuestos al sol. Se han identificado tipos virales específicos en las proliferaciones benignas de esta enfermedad. Por otra parte, los pacientes que han sido trasplantados y que reciben tratamiento inmunosupresor también desarrollan verrugas y cánceres de piel, en los que se aíslan genotipos virales comunes a la *epydermodysplasia verruciformis* (Beutner *et al.,* 1991; Harwood *et al.,* 2000).

El Papilomavirus humano ha sido asociado a los tumores de la cavidad orofaríngea, del esófago y del tracto respiratorio. La evidencia se basa en comparaciones morfológicas con lesiones genitales y estudios epidemiológicos. Los carcinomas de la cavidad oral (incluyendo los de la lengua y otros sitios de la boca) se encuentran fuertemente asociados con el consumo de tabaco y la ingestión de bebidas. Sin embargo, se sabe que el virus infecta la cavidad oral de individuos sanos y que muchas lesiones relacionadas al VPH han sido caracterizadas. Las estimaciones reportadas poseen rangos entre 0-100% (revisado por Franceschi *et al.,* 1996; Gillison y Shah, 2001). La orofaringe, y en especial las amígdalas, son los sitios anatómicos extragenitales donde el papel del VPH ha sido más claramente establecido. Se sospecha que puede haber dos entidades diferentes de tumores orofaríngeos, uno asociado con el consumo de tabaco y otro tipo de histología basaloide relacionado a la infección viral. Los carcinomas del esófago, por otra parte, revelan marcadores virales en el 0-60% de los casos. A pesar de los intentos por clarificar el rol del VPH en el esófago, los datos disponibles no permiten obtener conclusiones firmes (Syrjänen, 2002; Syrjänen, 2003).

1.7 Evidencia de la acción de los patógenos con el cáncer colorrectal

1.7.1 El virus del papiloma humano y el cáncer colorrectal

Los avances en el seguimiento y tratamiento del cáncer colorrectal han llevado a una disminución de la mortalidad global del 6-8% en las décadas pasadas. La incidencia de la enfermedad, por otra parte, se ha mantenido virtualmente estática, y los progresos han sido obstaculizados por los conceptos contradictorios respecto de su etiología. Estudios epidemiológicos indican que los factores dietarios y de estilo de vida poseen un rol fundamental en el inicio de la enfermedad. Sin embargo, existe una considerable controversia en la determinación de los factores nutricionales que representarían riesgo para el cáncer colorrectal.

La relación que existe entre el VPH y los cánceres de colon y recto no ha sido aún establecida. Con la objeto de verificar dicha hipótesis, varios autores trataron de detectar el ADN del Papilomavirus en la mucosa normal y tumores del colon, con resultados contradictorios. Un resumen comprensivo de la literatura presentada hasta el momento se presenta en la Tabla 1.3. La tabla también incluye trabajos importantes en el área de carcinomas de células escamosas de recto, colon y carcinomas anales si también se encontraban en el grupo de estudio. La prevalencia de los controles o tejidos no neoplásicos no está incluida.

Los primeros estudios que analizaron la presencia del virus en tejidos colorrectales se remontan a dos décadas atrás. Ostrow y col. (1987) fueron los primeros en hibridar ácidos nucleicos del Papilomavirus humano en carcinomas orales y ciego colónico. En 1988 un grupo liderado por el Dr. Boguszakova examinó 13 adenocarcinomas y 10 adenomas en busca de ADN de VPH mediante hibridación por Southern Blot, sin resultados positivos (Boguszakova *et al*., 1988). De manera similar, Palmer y col. (1989) no encontraron evidencia del VPH en la mucosa rectal maligna de individuos que padecieron cáncer anal utilizando análisis de Southern Blot y Dot Blot para los tipos VPH 6, 11, 16 y 18. En 1992, Shroyer y col. analizaron 22 adenocarcinomas y 5 carcinomas de células escamosas rectales mediante hibridación *in situ* para los tipos VPH -6/11, 16/18 y 31/33, y reacción en cadena de la polimerasa para los tipos VPH 6, 11, 16, 18 y 33. Mientras que las muestras anales fueron positivas para el ADN del VPH, las biopsias colónicas negativas.

Resultados similares fueron publicados por Shah y col. (1992), quienes no detectaron el ADN del virus en 19 tumores primarios del colon mediante tecnología del PCR.

En contraposición, en 1990 Kirgan y col. reportaron la presencia del antígeno de VPH en 29 de 30 (97%) carcinomas invasivos, en 18 de 30 (60%) adenomas y 7 de 30 (24%) biopsias normales. El mismo grupo reportó, tres años más tarde, que 13 de 38 (32%) carcinomas, 8 de 21 (38%) adenomas y 2 de 24 (8%) biopsias normales presentaron ADN de VPH mediante amplificación de la región L1 (McGregor *et al*., 1993). En un trabajo realizado en China, se demostró la presencia de VPH 16 y 18 en líneas celulares derivadas de tres pacientes con adenocarcinoma colorrectal (Cheng *et al.,* 1991); seguidamente, los mismos investigadores transformaron células de ratón NIH3T3 con ADN de alto peso molecular derivado de cáncer de colon, detectando secuencias de VPH 16 mediante Southern Blot (Cheng *et al.,* 1993). Otros estudios de Taiwan reportaron una prevalencia del ADN de VPH en el 21% (8/38) de adenomas tubulares y cerca del 32% (23/71) de los adenomas vellosos y mixtos analizados (Cheng *et al*.[A], 1995); también se detectó ADN de VPH 16 en 37 de 70 adenocarcinomas del colon (Cheng *et al*.[B], 1995).

A pesar de los resultados discrepantes, el número muestral de los primeros trabajos publicados fue relativamente bajo, entre 10 a 50 casos. Estudios más recientes del tipo caso-control encontraron diferencias significativas cuando compararon las prevalencias de ADN de VPH entre adenocarcinomas colorrectales y biopsias normales de tejido colónico (Zhu *et al*., 1999; Lee *et al*., 2001; Pérez *et al.,* 2005; Bodaghi *et al*[A]*.,* 2005). Otro trabajo realizado en el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos sobre 55 adenocarcinomas colorrectales y sus tejidos adyacentes no neoplásicos detectó la presencia conjunta de varias secuencias del genoma del VPH mediante PCR anidada, secuenciación y dot blot. Los resultados revelaron la presencia de secuencias virales en 51% de los pacientes con cáncer colorrectal, aunque en muy baja carga viral. Diez individuos eran VPH positivos para tumores y tejido colónico normal, 13 solamente para el tumor, y 5 para los tejidos normales (Bodaghi *et al*[A]., 2005).

Más recientemente, dos trabajos conducidos en Italia (Giuliani *et al*., 2008; Militello *et al.,* 2009), analizaron carcinomas colorrectales en búsqueda de secuencias de numerosos tipos de virus (JCV, SV40, EBV, etc.), detectando VPH en un rango de 5,6%-30% de los

casos. Otros trabajos conducidos en Polonia (Młynarczyk *et al.,* 2009), y otro en Turquía (Salepci *et al.,* 2009) reportaron prevalencias mayores. Dos de los estudios más extensos sobre el tema fueron publicados este año, uno conducido en Bélgica, donde se reportó que el 15% de 232 pacientes con cáncer colorrectales portaban secuencias del VPH, y otro donde no se ha detectado ADN del Papilomavirus cuando se analizaron 214 adenocarcinomas colónicos y 60 carcinomas rectales provenientes de Israel, España y Estados Unidos. Los autores de los estudios mencionados utilizaron PCR directa con los cebadores Gp+ y/o SPF10.

No solamente fueron analizados los adenocarcinomas colorrectales, que representan el 95% de los casos de cáncer, sino también los carcinomas de células escamosas, adenoescamosos, y adenocarcinomas con metaplasia escamosa, cuya histología es más cercana a la del carcinoma cervical. Dos ensayos fueron negativos para el ADN del VPH (Frizelle *et al.,* 2001; Audeau *et al*., 2001) en los carcinomas escamosos del recto. En contraposición, otras investigaciones que usaron metodologías que incluían PCR directa, inmunohistoquímica y Southern Blot demostraron la presencia de VPH en este tipo de tumores (Sotlar *et al.,* 2001; Kong *et al*., 2007; Bognár *et al*., 2008; Matsuda *et al*., 2009). Aunque la muestra en estudio fue pequeña, parecería poco probable llevar a cabo trabajos más extensos sobre los carcinomas colorrectales escamosos, dada la rareza de esta enfermedad.

El Papilomavirus humano produce infecciones anogenitales, y esta implicado en algunos tipos de cánceres cutáneos y oro-faríngeos. La demostración del VPH en el epitelio glandular constituye una observación relativamente reciente y sumamente interesante. Sin embargo, la presencia del Papilomavirus en las neoplasias del colon y recto es un tema de suma controversia. De acuerdo a los datos de la bibliografía actual, los adenocarcinomas colorrectales presentan marcadores virales en un rango de 0-100% de los casos, con un promedio de aproximadamente el 30% de los mismos. Se ha especulado que las diferencias podrían ser explicadas por los procedimientos de detección utilizados, la elección de los especímenes, el efecto del número muestral o por diferencias geográficas en la frecuencia de los tipos virales. En este sentido, varios trabajos indican que la mucosa del recto y colon parece ser un sitio común de tránsito de

partículas virales (zur Hausen *et al*., 2001). Si este fuera el caso, la posibilidad de asociación con los tumores de colon, aún sin referencia causal, representaría un hallazgo de importancia para el entendimiento general de la enfermedad y la biología del virus.

Tabla 1.3 Historia de la detección de VPH en proliferaciones benignas y carcinomas colorrectales.

Metodología	Tipo de lesión		VPH						Primer autor y año
		N	16	18	31	33	Otro /NI	Prev (%)	
Hibridación en filtro	Adenocarc. Colon	40					1	2,5	Ostrow *et al.*, 1987
Southern blot	Adenocarc. CR	13						0	Boguszakova *et al.*, 1988
	Adenomas	10						0	
Southern blot; Dot blot	SCC Anal	41	23	2				61	Palmer *et al.*, 1988
	Malign. Rectal	1						0	
Hib.IS	Adenomas	30					18	60	Kirgan *et al.*[A], 1990, Estados Unidos
	Adenocarc. CR	30					29	97	
Hib.IS	Adenomas	30					5	16,7	Kirgan *et al.*[B], 1990, Estados Unidos
	Adenocarc. CR	60					18	60	
PCR	Adenomas	3						0	Koulos *et al.*, 1991
	Adenocarc. Anal	6		2				25	
	SCC Anal	2				2		100	
	Adenocarc. CR	7						0	
Southern blot	Líneas celulares del colon	3					3	100	Cheng *et al.*, 1991
PCR; Hib.IS	SCC anal	5					5	100	Shroyer *et al.*, 1992
	Adenocarc. CR	22						0	
PCR	Adenocarc. CR	19						0	Shah *et al.*, 1992
	Xenoinjerto CRC	15						0	
	Líneas cel. CRC	16						0	

PCR; Southern Blot	Adenomas Adenocarc. CR	21 38					8 13	38 34,2	McGregor *et al.*, 1993
PCR; Sothern Blot	Adenoma tubular	38					8	21	Cheng *et al.*[A],1995
	Adenoma mixto	40					13	33,5	
	Adenoma velloso	31	8				2	32	
PCR; Southern blot	Adenomas	37	4				7	29,7	Cheng *et al.*[B],1995
	Adenocarc. CR	70	26	11			6	52,9	
PCR; Southern blot	Adenocarc. CR	56		40			16	82,4	Salepci *et al.*,1999
PCR;	Adenocarc. CR	46		6		11	3	44	Zhu *et al.*, 1999
PCR; Dot blot	Adenomas	56					48	86	*Picconi *et al.*, 2001
PCR, Hib.IS	Adenocarc. Recto	4						0	Sotlar *et al.*, 2001
	SCC recto	1	1					100	
PCR; Southern blot	Adenocarc. CR	51		39		30		76,4	Sayhan *et al.*, 2001
Hib.IS	SCC colon	6						0	Frizelle *et al.*, 2001
PCR; Southern blot	Adenocarc. CR	19		16				84	Lee *et al.*, 2001
PCR,; Secuen.	Adenocarc. CR	32	7					21,9	Yu *et al.*, 2002
Inmqa.	SCC colon	20						0	Audeau *et al.*, 2002
	Adenocarc. Colon	20						0	
PCR; Inmqa.; Mic.Elec	Adenocarc. CR C.Epiderm. Colon	8 1					3 1	37,5 100	Mandado *et al.*, 2004
PCR	Adenocarc. CR	56	22	13		3	3	74	Pérez *et al.*,2005
PCR; PCR IS; Secuen, Dot blot	Adenocarc. CR	55	31	5			2	51	Bodaghi *et al*[A]., 2005

PCR	Adenocarc. CR	53	5	22		15		81	Buyru *et al*., 2006
PCR	Adenocarc. CR	72	41	30				83	Damin *et al*., 2007
PCR, Inmga, Hib.IS	SCC colon	3	3					100	Kong *et al*., 2007
PCR; Southern blot	SCC colon	1	1					100	Bognár *et al*., 2008
PCR; Secuenc.	Adenocarc. colon	66	4	11	4	2	16	34	Giuliani *et al.,* 2008
PCR	Adenocarc. Colon	24						0	Yantiss *et al.,* 2009
PCR	Adenocarc. Colon	56		40		32		82	Salepci *et al*., 2009
PCR	SCC rectal	1					1	100	Matsuda *et al*., 2009
Hib.IS	Ad-SCC	5						0	Dong *et al.,* 2009
PCR	Adenocarc. Colon	37					13	35	Erol *et al.,* 2009
RT-PCR	Adenomas Adenocarc. Colon	22 28	1 2					4,5 7,1	Militello *et al.,* 2009
PCR	Adenomas Adenocarc. Colon	- -						56 67	Młynarczyk *et al.,* 2009
PCR	Adenocarc. Colon	214						0	Gornick *et al.,* 2010
	Adenocarc. Recto	60						0	
PCR; Inmga	Adenocarc. Colon y Recto	232	19	15	5		15	15	Deschoolmeester *et al.,* 2010
PCR	Adenomas Adenocarc. Colon	62 106						0 0	Yavuzer *et al.,* 2010

*Presentaciones a Congresos. Nota: En ocasiones el número de infecciones individuales sobrepasa el porcentaje total debido a la ocurrencia de infecciones múltiples.

Metodologías: Inmunohistoquímica (Inmga); Hibridización *in situ* (Hib.IS); Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); Secuenciación (Secuen.); Microscopía electrónica (ME); RealTime PCR (RT-PCR) Lesión: Adenocarcinomas (Adenocarc.), Carcinomas de células escamosas (SCC), Carcinoma adenoescamoso (Ad-SCC), Carcinoma no especificado (Malign), Carcinoma epidermoide (C. Epiderm.). Ubicación: Colorrectal (CR).

1.8 Objetivos

1.8 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos generales

El objetivo del presente trabajo pretende aportar evidencias sobre las causas y mecanismos de la carcinogénesis colorrectal. A su vez, también apunta a contribuir al conocimiento de la distribución del Virus del Papiloma Humano (VPH) en carcinomas colorrectales humanos. Esto se logrará mediante el análisis de marcadores virales y su asociación con características patológicas de importancia en el cáncer colorrectal.

Objetivos específicos

-Investigar la presencia del ADN del VPH en el tejido colónico control y neoplásico de una muestra de la población de La Plata, Argentina.

-Estimar el riesgo que puede aportar la infección por el Papilomavirus en el desarrollo y progresión del cáncer colorrectal esporádico.

-Analizar el estado físico del genoma del VPH en muestras provenientes de controles y diferentes estadíos del cáncer colorrectal esporádico.

-Determinar el fenotipo de error de replicación (RER) de los tumores colorrectales mediante análisis de microsatélites, y asociarlo con los marcadores virales.

-Establecer la frecuencia y momento de activación de los oncogenes *k-ras* (mutaciones del codón 12 y 13) y *c-myc* (amplificación de distintos grados) en la progresión de la neoplasia colorrectal y en zonas de transición tisular.

-Determinar el estado de los polimorfismos del codon 72 del gen *p53* y del codon 462 del gen *RNASEL*, comúnmente asociados con infecciones virales y desarrollo de cáncer a menor edad, y calcular su riesgo relativo.

-Realizar una revisión bibliográfica sobre la presencia del VPH con el cáncer colorrectal y discutir su papel en esta mucosa.

Las hipótesis del presente trabajo son:

1. El VPH es un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo de carcinomas cervicales, y podría estar involucrado en la progresión de algunos tipos de carcinomas colorrectales.

2. La infección por tipos de VPH de alto riesgo se detecta con mayor frecuencia en tumores que en muestras provenientes de controles sanos y es un indicativo del papel carcinógeno del virus.

3. La integración y/o alta carga viral es una característica distintiva de los carcinomas asociados a la infección por VPH, aunque no exclusiva.

4. El intervalo de tiempo que transcurre entre el suceso de la infección viral y el desarrollo de las lesiones invasoras es un continuo progresivo de alteraciones displásicas.

5. En las personas inmunodeficientes infectadas con VPH, la progresión de lesiones adenomatosas y cáncer de colon ocurre con una frecuencia mayor que en personas inmunocompetentes.

6. Las oncoproteínas virales facilitan la transformación maligna predisponiendo a las células a adquirir alteraciones genéticas mediante interacción con genes celulares relevantes, como por ejemplo la supresión de genes supresores de tumores y la activación de proto-oncogenes (Bosch *et al*., 2002).

7. La frecuencia de activación de los oncogenes c-*myc* y k-*ras* es mayor en adenomas y adenocarcinomas respecto de las muestras provenientes de controles normales (Fearon y Vogelstein, 1990; Calvert y Frucht, 2002).

8. La activación de *k-ras* se encuentra asociada a fenotipos tumorales menos diferenciados, se detecta en adenomas tardíos y no presenta diferencias significativas en su distribución a lo largo de los estadíos de la neoplasia colorrectal.

9. La activación del oncogén k-*ras* se encuentra asociada a muestras VPH positivas infectadas con tipos virales de alto riesgo. Esta relación es complementaria y ha sido demostrada en carcinomas glandulares y escamosos estrechamente ligados al VPH (Golijow *et al*., 1999; Prokopakis *et al*., 2002).

10. La amplificación de c-*myc* aumenta de acuerdo al estadío del cáncer colorrectal y los niveles más altos se relacionan a la invasión de nódulos linfáticos.

11. La activación de c-*myc* en adenomas o carcinomas colorrectales aparece asociada a la integración del ADN del VPH de alto riesgo. Este fenómeno podría deberse a que el genoma viral se integra en sitios frágiles cercanos al locus del gen c-*myc* e interfiere en su nivel de expresión y/o estabilidad cromosómica (Wu *et al*., 1999; Ferber *et al*., 2003).

12. El polimorfismo del codón 72 del gen *p53* y del codón 462 del gen *RNASEL* está asociado a una edad más temprana de diagnóstico de cáncer colorrectal en carcinomas colorrectales (Krüger *et al*., 2007).

13. El polimorfismo del codón 72 del gen *p53* y del codón 462 del gen *RNASEL* se relaciona con carcinomas asociados a infecciones virales (Storey *et al.,* 1998; Urisman *et al.,* 2006).

14. Las enfermedades malignas causadas por el Papilomavirus humano cumplen con los requisitos de causalidad propuestos por Hill (Hill, 1965).

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestra en estudio

Se analizaron 291 muestras provenientes 274 de pacientes con patologías colorrectales, que asistieron a diferentes hospitales públicos y privados de la ciudad de La Plata (Partido de La Plata, 1037000 habitantes), durante el período 2004-2006.

Las muestras normales correspondieron a 94 especímenes provenientes de la mucosa del colon de individuos con alteraciones gastro-intestinales no neoplásicas, elegidos al azar de una nómina de pacientes con alteraciones del colon como colitis crónicas, inflamación, etc.

El número de casos incluyó 87 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma del colon o recto, sin reportar parientes cercanos con la enfermedad (casos esporádicos). Se remitieron entre una a cinco biopsias por cada tumor. Las muestras correspondieron a piezas quirúrgicas y en cinco casos se sumaron piezas adicionales de otras regiones del colon. El grupo fue dividido según el grado de invasión de la pared del intestino grueso y compromiso de estructuras cercanas.

El grupo de adenomas estuvo conformado por 74 pacientes, de los que se obtuvieron 86 adenomas y biopsias de áreas circundantes en 13 casos. Los subgrupos fueron divididos de acuerdo al grado de displasia (leve, moderada y severa).

Un cuarto grupo de estudio fue formado por 24 biopsias de pólipos hiperplásicos, derivadas de 19 pacientes.

El promedio de edad de los pacientes con carcinomas colorrectales fue de 60 años, mientras que para el grupo normal la media fue levemente superior a los 56 años. El grupo de adenomas tuvo el promedio de edad superior, reportando 62 años. La relación entre mujeres y hombres fue cercana a la unidad (mujeres/hombres=44/43) en los casos y de 0,77 para los controles (41/53)

En las tablas 2.1 y 2.2 se describen las características más importantes de los adenocarcinomas y adenomas analizados en este trabajo

Tabla 2.1 Descripción de las características histopatológicas de los adenocarcinomas

Característica	Cantidad
Clasificación TNM*:	
0-I	27
II	21
III	26
IV	12
Localización anatómica	
Región proximal	52
Región rectosigmoidea	31
No informado	4
Grado de diferenciación	
Diferenciado	34
Semidiferenciado	28
Indiferenciado	18
No informado	7
Tamaño tumoral	
Media (Rango)	46mm (15-120mm)
Desvío	21

***** 1 dato perdido

Tabla 2.2 Descripción de las características histopatológicas de los tumores adenomatosos.

Característica	Grado de displasia		
Estructura histológica	Bajo grado (n=38)	Moderado grado (n=16)	Alto grado (n=32)*
Tubular (n=34)	20	1	13
Velloso (n=39)	12	12	15
Tubulovelloso (n=11)	6	3	2

* 2 datos perdidos

2.2 Procesamiento de las muestras

Se utilizaron entre una y tres secciones de 10 µm de biopsias de tejido colorrectal incluido en parafina. La desparafinización fue realizada mediante dos lavados con 1 ml de xilol durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados con 500 µl de etanol absoluto y, finalmente el tejido se dejó secar al aire (Jakson *et al.*, 1993). Las muestras se re-suspendieron y lavaron con 1 ml de PBS. El sedimento celular fue incubado durante 24 hs a 56ºC en 400 µl de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 mM, EDTA, 1% Triton X-100 y 0.5% Tween 20) y 250 µg/ml de proteinasa K. La proteasa fue inactivada por incubación a 100°C durante 10 minutos.

Para comprobar la calidad del ADN extraído se amplificó un fragmento del gen β-globina y de la Tirosina Quinasa (Tk). Aquellas muestras que fueron negativas para la amplificación de dichos genes estructurales fueron purificadas por medio de extracciones orgánicas con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y/o mediante la precipitación directa de las proteínas por la metodología de "s*alting out*" (Jakson *et al.*, 1993).

Para realizar las reacciones de amplificación se utilizaron 5 µl del ADN purificado.

2.3 Detección de ADN-VPH mediante PCR anidada

La detección del genoma del VPH se realizó por reacción en cadena de la polimerasa con protocolo anidado, utilizando los oligonucleótidos My 09/11 (Ting y Manos, 1990) como cebadores externos en la primera ronda de amplificación y Gp 05+/06+ (Evander *et al.*, 1992; de Roda Husman *et al*., 1995) como cebadores internos en la segunda ronda. Estos cebadores definen fragmentos de ~ 450 pb y 145 pb correspondientes a la región L1 del genoma viral, respectivamente (Tabla 2.8).

Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando 3µl (1ng/µl) de los controles positivos o 5µl del ADN extraído de las muestras. La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación se hicieron de acuerdo a lo descripto por Evander y col. (1992) con modificaciones. La primer reacción fue realizada en un volumen final de 25 µL: 4,4 pmol de cada cebador My; 200 µM de cada dNTP, 3 mM de Cl_2Mg, 1X de buffer comercial (20

mM de Tris-HCl, pH 8,4 y 50 mM de ClK), 0,6 U de polimerasa Taq (Invitrogen, EEUU), y los 5 µL de ADN de las muestras. El programa de ciclado fue el siguiente: un primer ciclo de desnaturalización inicial de 3 min. a 92°C, seguido de 20 ciclos de 30 seg. a 92°C, 1:30 min. a 50°C, 1 min. a 72°C, y un paso de extensión final de 5 min. a 72°C.

Cinco µL de la primer reacción fueron trasvasados a los tubos de la segunda, realizada en un volumen final de 25 µL, conteniendo 18,75 pmlos de cada cebador Gp+; 200 µM de dNTP, 3 mM de Cl_2Mg, 1X de buffer comercial (20 mM de Tris-HCl, pH 8,4 y 50 mM de ClK), y 1,25 U de polimerasa Taq (Invitrogen, EEUU). El programa de ciclado fue el siguiente: un primer ciclo de desnaturalización inicial de 3 min. a 92°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg. a 92°C, 1 min. a 40°C, 1 min. a 72°C, y un paso de extensión final de 5 min. a 72°C.

La detección de los productos de amplificación se efectuó por corrida electroforética en geles de agarosa al 2%, coloreados con SYBR-Safe™ (Invitrogen, EEUU), excitado con transiluminador de luz azul Safe-Imager™ (Invitrogen, EEUU).

2.3.1. Precauciones para evitar la contaminación de la PCR

-En todos los casos fueron utilizados guantes, escalpelos y contenedores especiales. Las precauciones a tener en cuenta dentro del laboratorio incluyeron el lavado repetido de las superficies con hipoclorito de sodio, antes y después de la PCR, cambio de guantes, y la separación física y espacial de reactivos e instrumental en diferentes cuartos. En este caso, se utilizó un guardapolvo especial para entrar realizar la mezcla de reacción. Se tuvo especial atención a otros elementos que pudieran ser fuentes de contaminación, como por ejemplo los fibrones, cuadernos, etc.

-Se utilizó una cámara de flujo laminar tipo 2, con luz UV para alicuotar los reactivos en mezclas de PCR para experimentos individuales.

-La amplificación de las muestras comprendía normalmente entre 10-12 muestras por vez, con un intervalo de al menos un día entre reacciones de amplificación.

-En cada reacción de amplificación se incorporaron controles negativos (1 control con agua destilada y otro con el buffer de resuspensión de muestras) por cada seis muestras

estudiadas. En el caso de que se usó controles positivos, estos se trataban de muestras cervicales positivas, o en algunos casos plásmidos diluidos.

-En el caso de transferir 5 uL del amplificado My a los tubos de GP, se utilizó una cabina irradiada previa y posteriormente con luz ultravioleta, con equipamiento separados de insumos, reactivos y pipetas automáticas con puntas con filtros resistentes a los aerosoles.

-El procesamiento post- PCR, así como el pasaje de los amplificados entre rondas de reacción, estuvieron separados temporal y espacialmente en el laboratorio.

2.4 Tipificación del ADN-VPH por LIS-SSCP

La tipificación del genoma del VPH se efectuó mediante tres metodologías, el análisis del polimorfismo en la conformación de cadenas simples, protocolo denominado LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single Strand Conformational Polymorphisms), PCR Enzimo-inmunoensayo (PCR-EIA) y secuenciación de ADN para el caso de no poder resolver el tipo por ninguna de las técnicas anteriores.

2.4.1 LIS-SSCP

El principio de esta técnica involucra la desnaturalización del ADN de los productos de amplificación y posterior electroforesis en soluciones de baja fuerza iónica y en condiciones no desnaturalizantes. Esto permite que se formen estructuras secundarias o variantes conformacionales que, de acuerdo a su movilidad electroforética, producirán patrones diferenciales y repetibles de bandas (Maruya *et al.,* 1996).

Para esta técnica se diluyeron 3 µl de cada producto de amplificación en 10 µl de la solución de siembra LIS (Low Ionic Strength) (10% sacarosa; 0,01% azul de bromofenol y 0,01% xilen cianol FF). Posteriormente, las muestras fueron desnaturalizadas durante 6 minutos a 94°C e inmediatamente colocadas en hielo. Se sembraron y corrieron en minigeles de poliacrilamida al 10% (acrilamida: bisacrilamida relación 39:1), bajo una diferencia de potencial de 100 voltios y temperatura constante de 4°C, durante 4:30 horas.

En cada corrida electroforética se sembraron, simultáneamente con las muestras en estudio, los productos amplificados de los patrones virales obtenidos a partir de los clones

plasmídicos de los genomas del VPH -6, -11, -16, -18 y -33. Para detectar el patrón de bandas del SSCP en los minigeles se utilizó la técnica rápida de tinción con plata.

2.4.2 PCR enzimo-inmunoensayo

Conjuntamente a la genotipificación por SSCP, se ha empleado la técnica de PCR enzimo-inmunoensayo (PCR-EIA), basado en el protocolo de Jacobs y col., (1995), con algunas modificaciones. La amplificación se realiza utilizando el protocolo anidado descripto previamente, reemplazando el GP6+ por el GP6+-Bio: El GP6+-Bio posee la misma secuencia que el GP6+ pero se encuentra biotinilado en su extremo 5', lo que permite su posterior estudio. Para el análisis, los productos de PCR biotinilados son capturados en microplacas Nunc Maxisorp (Nunc, USA) recubiertos con estreptavidina, desnaturalizados por tratamiento alcalino con hidróxido de sodio y posteriormente hibridados con cócteles de sondas de oligonucleótidos específicos para VPH marcados con fluoresceína en su extremo 5'. Los híbridos resultantes pueden ser detectados por anticuerpos anti-fluoresceína conjugados con alguna enzima y adición de substrato. El cambio de color se evalúa a través de la densidad óptica utilizando un lector de microplacas ELISA.

2.4.2.1 Protocolo de PCR-EIA

Captura de los productos biotinilados

-Se tapizaron microplacas Nunc™ con estreptavidina a una concentración de 5 mg/ml.

-Se agregaron 5 µL de los productos de PCR biotinilados en 100 µL de solución SSC 5X + 0,5% Tween 20.

-La placa fue cubierta con un film adherente e incubada a 37°C por 1 hora.

Desnaturalización del ADN

-Se lavó tres veces la placa con solución SSC 0,5X + 0,5% Tween 20.

-El sobrante de líquido fue retirado mediante inversión de la placa en un papel absorbente, y se agregó 100 µL de NA(OH) a 0,2N.

- Se cubrió la placa y deja reposar durante 15' a temperatura ambiente.

Hibridación de las sondas

Las sondas utilizadas para la hibridación correspondieron a regiones específicas del amplificado GP para cada tipo viral. Se utilizaron cuatro pocillos por muestra, con sondas que correspondieron a: A) VPH 6 y 11; B) VPH 16; C) VPH 18; y D) VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58. En cada placa se incorporaron los controles positivos y negativos correspondientes. La tabla 2.3 expone el orden de las sondas en la microplaca. Las muestras que fueron positivas para el grupo de alto riesgo fueron sometidas a una segunda placa de PCR-EIA, esta vez con los tipos virales de alto riesgo discriminados individualmente. Para cada celda se agregaron tres picomoles de cada sonda en solución 5x SSC + Tween 20 al 0,5%. Las secuencias de los oligonucleótidos usados se encuentran detallados en la tabla 2.4.

-La microplaca es lavada tres veces con 400 µL de 0,5X SSC + 0,5% Tween 20%. El exceso de líquido fue removido por inversión de la placa en papel absorbente.

-Se agregaron 100 µL de la solución de sondas con 5x SSC, Tween 20 0,5%.

-La placa fue sellada y la incubación se realizó entre 15 y 30 min a 55°C.

Tabla 2.3 Representación de la microplaca cubierta con estreptavidina para PCR EIA.

Sondas	Producto de PCR biotinilado				Control negativo
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra n	Con. positivo	
VPH 6/11	Xi	Xi	Xn	C+ 6/11	Sin sonda
VPH 16	Xi	Xi	Xn	C+ 16	Sin ADN
VPH 18	Xi	Xi	Xn	C+ 18	Sin Biot.
Grupo alto riesgo$^{\alpha}$	Xi	Xi	Xn	C+ α	Sin revel

α VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58.

Detección de los híbridos

- La placa fue lavada tres veces con solución SSC a 0,5X; 0,5% Tween 20, el exceso de solución fue removido mediante inversión de la placa en papel absorbente.

- Se agregaron los anticuerpos anti-fluoresceína a una concentración de 1/1000, e incubados por 30 min a temperatura ambiente.

-Se agregó revelador TMB™ (solución de anticuerpo marcado con enzima y substrato) e incubó por 15' a temperatura ambiente.

-La reacción fue bloqueada con 100 µL de H_2SO_4 a 1M y el cambio de color fue medido con lector de ELISA a OD_{450nm} utilizando un filtro de interferencia de 600 nm (BioRad Microplate Reader 550).

Interpretación de los resultados y cálculo de valor de corte (Cut-off)

El valor de *cut-off* fue calculado como tres veces el desvío estándar del OD obtenido a partir de cuatro controles negativos, que bajo las condiciones presentes fue de OD_{450nm} 0,1. Las muestras que presentaron OD_{450nm} > 0,1 fueron consideradas VPH positivas.

Tabla 2.4 Oligonucleótidos utilizados para genotipificación de VPH por PCR EIA

VPH	Secuencias
6	ATCCGTAACTACATCTTCCACATACACCAA
11	ATCTGTGTCTAAATCTGCTACATACACTAA
16	GTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGA
18	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA
31	TGTTTGTGCTGCAATTGCAAACAGTGATAC
33	TTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTAC
35	GTCTGTGTGTTCTGCTGTGTCTTCTAGTGA
39	TCTACCTCTATAGAGTCTTCCATACCTTCT
45	ACACAAAATCCTGTGCCAAGTACAT
51	AGCACTGCCACTGCTGCGGTTTCCCCAACA
52	TGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAA
56	GTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATG
58	ATTATGCACTGAAGTAACTAAGGAAGGTAC

Los genomas plasmídicos utilizados como controles de la técnica de PCR enzimoinmunoensayo y los patrones de las muestras en los geles de SSCP han sido

generosamente donados por la Dra. De Villers (Deutsches Krebsfor-schungszentrum, Alemania, tipos VPH-6, -11, -16, -18, -33) y el Dr. Ort (Instituto Pasteur, Paris, Francia, VPH-11 y -34). Para el resto de los controles positivos de VPH se utilizó ADN de muestras cervicales positivas en donde los tipos virales se determinaron por secuenciación.

2.4.3 Clonación de los genomas virales

Los plásmidos VPH 6, 11, 16, 18, 31 y 33 fueron clonados mediante el siguiente protocolo:

Inducción de las células a la competencia.

El protocolo está basado en la técnica de Cohen y col. (1972), con modificaciones.

1- A partir de una sola colonia de 2-3 mm de una placa de cultivo de células DH5α o TOP10 incubadas por 16 hs a 37°C se obtuvieron 5 ml de cultivo líquido en medio SOB.
2- Se transfirieron 100 µL del cultivo líquido a un erlenmeyer de 1 litro con 50 ml de medio SOB.
3- Se incubaron las células a 37°C por 2:30 horas en agitación, momento en que la curva de crecimiento bacteriano todavía se encuentra en fase exponencial. Para obtener este valor el OD_{600} fue medido con espectrofotómetro previamente cada 15', y se detuvo el crecimiento a OD_{600} ~ 0,35, valor que no excede las 1.10^8 células/ml (OD_{600} ~ 0,4).
4- Las células se transfirieron a tubos de propileno enfriados, estériles. Se dejaron reposar los tubos en hielo para llevar los cultivos a 0°C durante 10 minutos.
5- Se resuspendieron las células en 50 ml de solución de Cl_2Ca-Cl_2Mg (80 mM de Cl_2Mg y 20 mM de Cl_2Ca) previamente enfriada, y se centrifugaron los tubos a 4000 rpm durante 10 minutos (Beckham rotor).
6- Se decantaron los tubos mediante inversión en un papel absorvente para permitir que las últimas trazas de medio se eluyan.
7- Se repitieron los pasos 5 y 6, y finalmente se resuspendieron los cultivos en 3 ml de solución de cloruro de calcio por cada 50 ml de resuspensión inicial.
8- A partir de aquí las células se utilizaron directamente para la transformación, aunque también se hicieron alícuotas de células competentes y se conservaron a -90°C (con glicerol al 15%) y otras guardadas en heladera hasta 24 hs sin perder su estado de competencia.

Inserción del genoma viral/amplificado de PCR en el vector de clonación:

1- La reacción de inserción fue realizada mediante el kit comercial TOPO TA Cloning™ (Invitrogen, EEUU), bajo las recomendaciones del proveedor. El protocolo fue el siguiente:

	Vector + ADN blanco	Solamente el vector
PCR/templado de ADN	1	--
Solución de sales	1	1
H_2O estéril	3	4
TOPO™ vector	1	1

Reacción de Transformación:

1- Se transfirieron cantidades incrementales de los plásmidos a un tubo pre-enfriado. Todo el procedimiento se realizó en hielo.
2- Se agregaron 150-200 µl de las células competentes químicamente.
3- Se homogenizaron las bacterias con los plásmidos mediante inversión, gentilmente, y se las deja reposar en hielo por 20'.
4- Se colocaron las células en baño María a 42º C exactos durante 50 segundos para permeabilizar las bacterias
5- Se retornaron los tubos al hielo por 2 minutos.
6- Se agregó medio SOC líquido hasta volumen final 1 ml.
7- Se mezclaron los tubos suavemente y se incubaron por 1 hora a 37ºC, para permitir el crecimiento de las bacterias transformadas, homogenizando cada 15-20'.
8- Previamente se prepararon cinco placas de cultivo por cada tubo de Top10 transformadas. Todas con medio SOB, más el antibiótico ampicilina (100 µg/ml), IPTG y X-Gal. Las placas se sembraron a temperatura ambiente. Por cada tubo se siembra una placa sin antibiótico, como control de la viabilidad.
9- Se sembraron 100 µl de cada tubo de transformación, primero se volcó el cultivo en el centro de la placa usando una micropipeta especial para cultivo con tips estériles y luego se extendió la siembra sobre toda la superficie con una varilla torneada.
10- Se incubaron las placas de Petri a 37º C durante toda la noche.
11- Las colonias aisladas blancas (transformadas) fueron levantadas con escarbadiente estéril y transferidas a un frasco con 5 ml de medio SOB líquido más antibiótico, con el objeto de obtener ADN plasmídico en cantidad.
12- Posteriormente a la purificación del ADN, se comprueba la presencia del plásmido mediante corrida electroforética en geles de agarosa al 1% donde se pueden observar una banda proveniente al ADN bacteriano y otra banda más liviana de los plásmidos.
13- La confirmación se obtiene mediante amplificación por PCR y cortes con enzimas de restricción. Las reacciones de amplificación comprendieron cebadores

específicos de los genomas del VPH o bien por cebadores específicos de los plásmidos.

2.5 Integración

Luego de la detección y genotipificación del VPH se procedió al examen del estado físico de VPH 16 y 18 mediante PCR con protocolo anidado. Las secuencias de los primers están detalladas en la Tabla 2.5. Se utilizaron dos conjuntos de cebadores para cada secuencia específica de E2. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados sobre el genoma completo del VPH 18 (Accession X05015), y el genoma completo del VPH 16 (Accession AY686584), utilizando el software FastPCR™ (Universidad de Helsinsky, Finlandia).

Se probaron varias combinaciones de primers de E2 para los genomas de VPH 16 y 18. Los que se detallan en la tabla 2.5 y las figuras 2.1 y 2.2 son los que han otorgado mejores resultados de sensibilidad y especificidad:

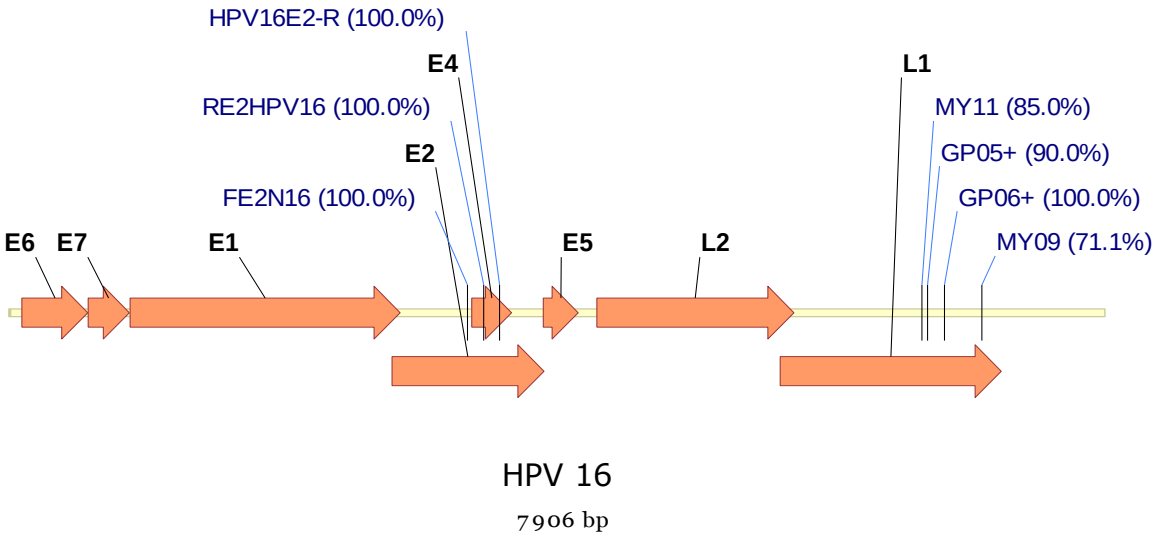


Figura 2.1 Representación del genoma del VPH 16 y ubicación de los cebadores específicos.

Tabla 2.5 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificación de secuencias específicas de E2 de VPH 16 y 18.

Gen	Cebadores	Posición en el genoma	TM (°C)	Producto
E2 de VPH 16	Externo Izquierdo **FE2N16** 5'-agtatgggaagttcatgcgggtg-3'	3300-3322	60	253
	Externo Derecho **HPV16E2-R** 5'-tggagcactgtccactgagtc-3'	3532-3552	60	
	Externo Izquierdo **FE2N16** 5'-agtatgggaagttcatgcgggtg-3'	3300-3322	60	141 pb
	Semi-nested Derecho **RE2HPV16** 5'-Aaggcgacggctttggtatgggtc-3'	3417-3440	60	
E2 de VPH 18	Externo Izquierdo **HPV 18-E2F2** 5'-ctacctgtgtaagtcacaggggga-3'	3277-3300	58	347 pb
	Externo Derecho **RE2N18** 5'-tgcaccgagaagtgggttgacag-'3	3601-3623	62	
	Semi-nested Izquierdo **FE2N18** 5'-tctatgtgcagtaccagtgacg-3'	3423-3444	57	201 pb
	Externo Derecho **RE2N18** 5'-tgcaccgagaagtgggttgacag-'3	3601-3623	62	

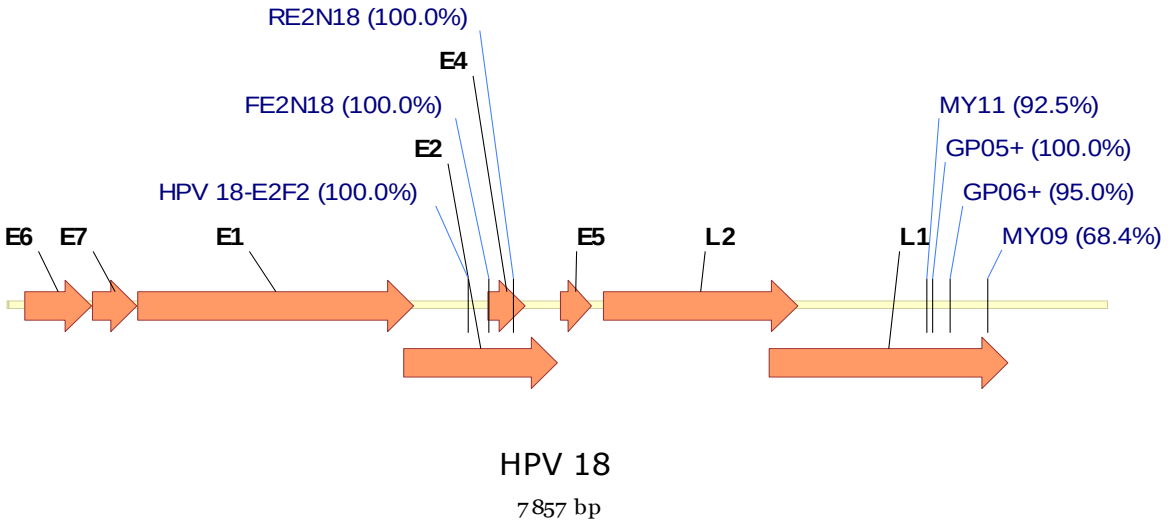


Figura 2.2 Representación del genoma del VPH 18 y ubicación de los cebadores específicos.

La primera ronda de amplificación del gen E2 para VPH 16 y 18 fueron realizadas en 25 µl finales, conteniendo 1X de buffer comercial (50 mM Tris-ClH pH 8,5; 1 mM EDTA; 1% Tritón X100 y 0,5% Tween 20), 3,125 picomoles de cada cebador externo, 200µM de cada dNTP, 3 mM de Cl_2Mg, 0,75 unidades de Taq polimerasa de ADN (Invitrogen, USA) y 5 µl de solución de ADN de cada muestra. El ciclado del programa consistió en una etapa de desnaturalización inicial de 3 minutos a 92°C, seguido de 25 ciclos de 1 min a 92°C, 1min 30'' seg a 58°C y 1 min a 72°C, y 5 min de extensión final a 72°C.

Se transfirieron 5 µL del primer producto de PCR a la mezcla de reacción de la segunda ronda. Para la reacción interna de E2, la concentración de los reactivos fueron similares, excepto para los cebadores, que fueron ajustados a 18,75 picomoles cada uno y la concentración de Taq polimerasa a 1,5 unidades. El programa de ciclado consistió en una etapa de desnaturalización inicial de 3 minutos a 92°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 57°C y 1 min a 72°C, y 5 min de extensión final a 72°C.

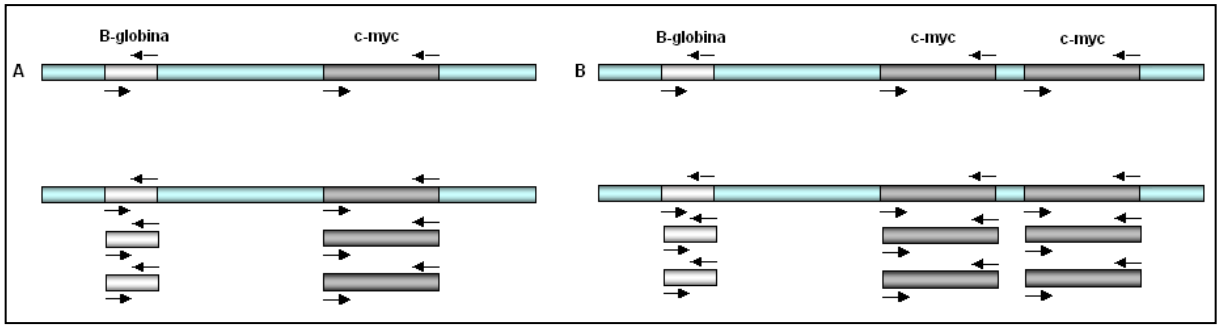
La línea celular Hela (20-40 copias de VPH 18 por célula) y plásmidos purificados y diluidos conteniendo los genomas virales fueron utilizados como controles positivos y negativos para la integración viral.

2.6 Detección de la amplificación génica del proto-oncogén c-*myc*

El análisis de la amplificación génica del proto-oncogén *c-myc* se realizó utilizando la técnica de co-amplificación con locus de referencia como gen control (RG-PCR) (Lönn *et al.*, 1993; Golijow *et al.,* 2001). En la misma se amplificó de manera simultánea un fragmento de 139 pb correspondiente a *c-myc* y otro fragmento de 110 pb correspondiente al locus de referencia β-*globina* según lo descripto por Kallio y col. (1991) (Figura 2.3).

La reacción de amplificación fue realizada utilizando 5 µl de las muestras purificadas, 2,5 mM Cl_2Mg, 200 µM de cada uno de los dNTPs, 25 pmol de cada cebador (Kallio *et al.*, 1991) y 1,25 U de Taq DNA polimerasa en buffer de PCR (20 mM Tris-HCl; pH 8,4 y 50 mM ClK), en un volumen final de 50 µl. Los ciclos de amplificación fueron: 1 ciclo a 94ºC durante 4 min y 25 ciclos de 1 min a 92ºC, 1 min a 56ºC y 1 min a 72ºC, permitiendo la realización de la comparación de los productos co-amplificados en la fase exponencial de la reacción de PCR.

La detección de los productos de la PCR fue realizada por corrida electroforética en geles de poliacrilamida al 10% y posterior tinción con plata. El evento de amplificación génica fue estimado mediante la relación de intensidades entre las bandas *c-myc* y β-*globina*. Para la digitalización de las imágenes se utilizó el programa *Kodak Digital Science* 1D Image Analysis. Todas las muestras se corrieron y analizaron por duplicado para confirmar los valores obtenidos.



.

Figura 2.3 Principio de la metodología RG-PCR. A) La secuencia diana (*c-myc*) es co-amplificada simultáneamente con un gen de referencia de copia única (*ß-globina*) dispuesto sobre el mismo cromosoma. B) Cuando la secuencia diana se encuentra amplificada habrá una cantidad proporcionalmente mayor de este amplicón en comparación con la del gen de referencia.

2.7 Mutación de los codones 12 y 13 de k-*ras*

Las mutaciones en los codones 12 y 13 de k-*ras* fueron detectadas por una metodología de PCR mutagénica, basada en el protocolo previamente descripto por Hatzaki y col. (2001), aunque con modificaciones menores. De acuerdo a este método, la reacción de polimerasa es diseñada con cebadores con bases desapareadas ("*mismatches*") con el objeto de insertar un sitio de restricción para cortes con enzimas. Como lo indica la figura 2.4, los ensayos del codón 12 tuvieron el cebador izquierdo con el *mismatch*, y la digestión con la enzima BSTNI produjo dos bandas de 160 y 192 pb para el alelo mutante, mientras que el alelo salvaje permaneció sin digerirse (192 pb). Por otro lado, el alelo salvaje del codón 13 originó bandas de 85 pb, 48 y 26 pares de bases luego de la digestión con la enzima Hae III, mientras que el alelo mutante solo produjo bandas de 85 y 74 pares de bases.

La mezcla para la reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 ul, el cual estaba formado por 19 picomoles de los cebadores de Fkras12 y Rkras12 y 22,5 picomoles para Fkras13 y Rkras13 (Tabla 2.8); 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de Cl_2Mg, 1X de buffer comercial, 0,75 unidades de Taq Polimerasa (Invitrogen, USA) y 5 ul de ADN de muestra purificada.

Posteriormente se utilizaron 7 ul de cada producto de reacción para la digestión enzimática. La mezcla de reacción consistió en: 5 unidades de las enzimas BSTNI para el codón 12 y HAEIII para el codón 13 (NewEngland Biolabs, United Kingdom), buffer comercial 1X, 7 ul de amplificado y agua destilada. Las muestras se incubaron 5 horas a 37°C bajo una pequeña capa de aceite mineral.

Los cortes se corrieron en geles de acrilamida al 10%, se revelaron con SyberSafe™ y visualizaron en transiluminador de luz azul (Invitrogen, USA).

Forward del cebador K-ras 12

5'ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGA**C**CT
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
5'ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGA**G**CTG**G**TG**G**C**G**TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATAC-3'
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
G**G**ATCCGTTCTCACGGAACTGCTATG-5'

Reverse del cebador K-ras 13

Figura 2.4 Cebadores utilizados para la detección de *K-ras* 12 y 13 y en el centro la secuencia del gen donde está marcado: *hot spot* del codón 12 (Amarillo); *hot spot* del codón 13 (Verde); y en celeste los *mismatches* introducidos por los cebadores utilizados en ambas reacciones de polimerización.

2.8 Inestabilidad de Microsatélites

Todas las muestras de ADN fueron utilizadas como molde para la amplificación por PCR del panel de microsatélites recomendados por el taller del Instituto Nacional del Cancer de EEUU en 1997 (1997 *National Cancer Institute*), donde también se establecieron las guías para su clasificación.

Estos cinco microsatélites recomendados son una combinación del denominado "Panel de Bethesda" (BAT-26, D2S123, D17S250), y dos loci alternativos recomendados en el mismo taller (BAT-40 y BAT34C4) (Boland *et al*., 1998). El panel de Bethesda consiste en dos loci mononucleótidos (*Big Adenine Tract* BAT-25 y BAT-26), y tres loci dinucleotídicos (D2S123, D5S346, y D17S250). De acuerdo a las recomendaciones brindadas en el taller,

los carcinomas con inestabilidad en dos o más loci son interpretados como MSI alto, y carcinomas con inestabilidad en solo un marcador se interpretan como MSI bajo.

La amplificación fue realizada en un termociclador, en reacciones monoplex (se amplifica un solo marcador por reacción), con las condiciones explicadas en la tabla 2.6 y las secuencias descriptas en la tabla 2.7. Posteriormente cada muestra fue genotipificada en un secuenciador automático MegaBACE1000™ (GE Healthcare) utilizando ET550-R como el estándar de peso molecular (GE Healthcare). El análisis de la asignación del genotipo fue conducida mediante el software Genetic profiler Software Suit version 2.2 (GE Healthcare)

Tabla 2.6 Condiciones de ciclado de las reacciones de amplificación de los microsatélites.

Marcador	Programa
BAT25	28 cycles of 95°C for 1 min, 56°C for 45 s, 72°C for 45 s
BAT26	32 cycles of 95°C for 45 s, 55°C for 1 min, 72°C for 30 s
BAT40	35 cycles of 95°C for 45 s, 55°C for 45 s, 72°C for 45 s
BAT34C4	30 cycles of 95°C for 1 min, 57°C for 45 s, 72°C for 45 s
D17S250	35 cycles of 95°C for 45 s, 55°C for 45 s, 72°C for 45 s

Tabla 2.7 Panel de cebadores para la detección de inestabilidad de microsatélites (MSI).

Nombre y microsatélite	*Posición crom.*	*Repetición*	*Secuencia*	*Amplicón*
BAT 26 (mono)	*2p*	*(t)5……(a)26*	*tcg cct cca aga atg taa gt tct gga ttt taa cta tgg ctc*	*80-100 pb*
BAT 40 (mono)	*1p13.1*	*tttt.tt…(t)2……tttt.(t)40*	*att aac ttc cta cac cac aac gta gag caa gac cac ctt g*	*80-100 pb*
D217S250 (din)	*17q11.2 -q12*	*(ta)7……..(ca)24*	*gga aga atc aaa tag aca at gct ggt cat ata tat att taa acc*	*150*
D2S123 (din)	*2p16*	*(ca)13ta(ca)15(t/g a)7*	*aaa cag gat gcc tgc ctt ta gga ctt tcc acc tat ggg ac*	*197-227*
BAT 34C4 (mono)	*17p.13*	*repeticiones de a*	*accctggaggatttcatctc aacaaagcgagacccagtct*	*131 pb*

Nota: Los marcadores BAT26 y BAT34C4 son prácticamente monomórficos, siendo las variaciones de tamaño entre individuos menores de dos nucleótidos. Para el marcador BAT40, las variaciones de tamaño grande (6 a 16 nucleótidos desde el alelo más frecuente) son extremadamente raras. Por esta razón, estos tres marcadores pueden ser utilizados confiablemente aún en ausencia de tejido control (Plank *et al*., 2003). Los resultados obtenidos en los marcadores D217S250 y el D2S123 deben ser comparados con el obtenido en muestra control.

2.9 Determinación de los polimorfismos del codón 72 del gen *p53* y del codón 462 del gen *RNASEL*

Para la caracterización de los polimorfismos de los genes *p53* y *RNASEL* se empleó la técnica de PCR seguida de pirosecuenciación. Esta técnica se basa en la detección de la formación de pirofosfatos durante la reacción de polimerización del ADN. El pirofosfato producido durante dicha reacción es convertido en ATP, el cual es utilizado por una luciferasa para convertir la luciferina en oxiluciferina. Por cada adición de un nucleótido en el proceso de extensión de la polimerización de ADN, se genera emisión de luz (Nordström *et al*., 2000). El dispositivo puede observarse en la figura 2.5 y la reacción está detallada en la figura 2.6.

Para la genotipificación se amplificaron fragmentos del gen *p53* y *RNASEL* de 166 pares de bases, cuyo cebador derecho e izquierdo poseen una marca de biotina en el extremo 5', respectivamente (Tabla 2.8). Posteriormente se prepararon las muestras según las indicaciones recomendadas por el fabricante (Pyrosequencing, Uppsala, Suecia).

2.9.1 Amplificación de *p53*

La reacción de amplificación fue efectuada en un volumen final de 50 microlitros. La mezcla contenía 31,25 picomoles de los cebadores p53pf y p53prB (Tabla 2.8); 0,2 mM de cada dNTP; 1X de buffer de reacción (20 mM Tris-HCl; pH 8,4 y 50 mM ClK), 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa; 1,25 mM de Cl_2Mg; 5 uL de ADN de cada muestra y H_20 destilada.

El ciclado del programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 3 minutos a 92°C; 35 ciclos de 30'' a 92°C, 50'' a 61°C, 45'' a 72°C; y extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de la PCR fueron corridos en geles de poliacrilamida al 10% durante 30 minutos y visualizados en transiluminador de luz (SyberImage®) azul teñido con SyberSafe®.

2.9.2 Amplificación de *RNASEL*

Para el gen *RNASEL* la mezcla de amplificación consistió en 30 picomoles de los cebadores rnpfb y rnpr (Tabla 2.8); 0,2 mM de cada dNTP; 1,3 mM de Cl_2Mg; 1X de buffer de reacción (20 mM Tris-HCl; pH 8,4 y 50 mM ClK), 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa, 5 uL de ADN de las muestras y H_20 destilada hasta 50 uL.

El programa de ciclado constó de 1 ciclo de desnaturalización inicial de 3 minutos a 92°C; 35 ciclos de 30'' a 92°C, 45'' a 61°C, 35'' a 72°C, y extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de la PCR fueron corridos en geles de poliacrilamida al 10% durante 30 minutos y visualizados en transiluminador de luz (SyberImage®) azul teñido con SyberSafe®.

2.9.3 Protocolo de pirosecuenciación

Unión de los productos de PCR biotinilados a las perlas de cefarosa.

Se transfirieron 20 µL de producto de PCR por microwell, a los que se agregaron: 17 µL de agua destilada, 3 µL de perlas Dynabeads™ cubiertas con estreptavidina (Dynal, Oslo, Noruega) y 40 µL de buffer de unión (10 mmol/L Trizma base, 2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, y Tween 20 0,1%, pH 7.6).

-Se sellaron las placas de PCR y se agitaron con vortex por 10 minutos a temperatura ambiente.

Desnaturalización del ADN y preparación de la cadena biotinilada

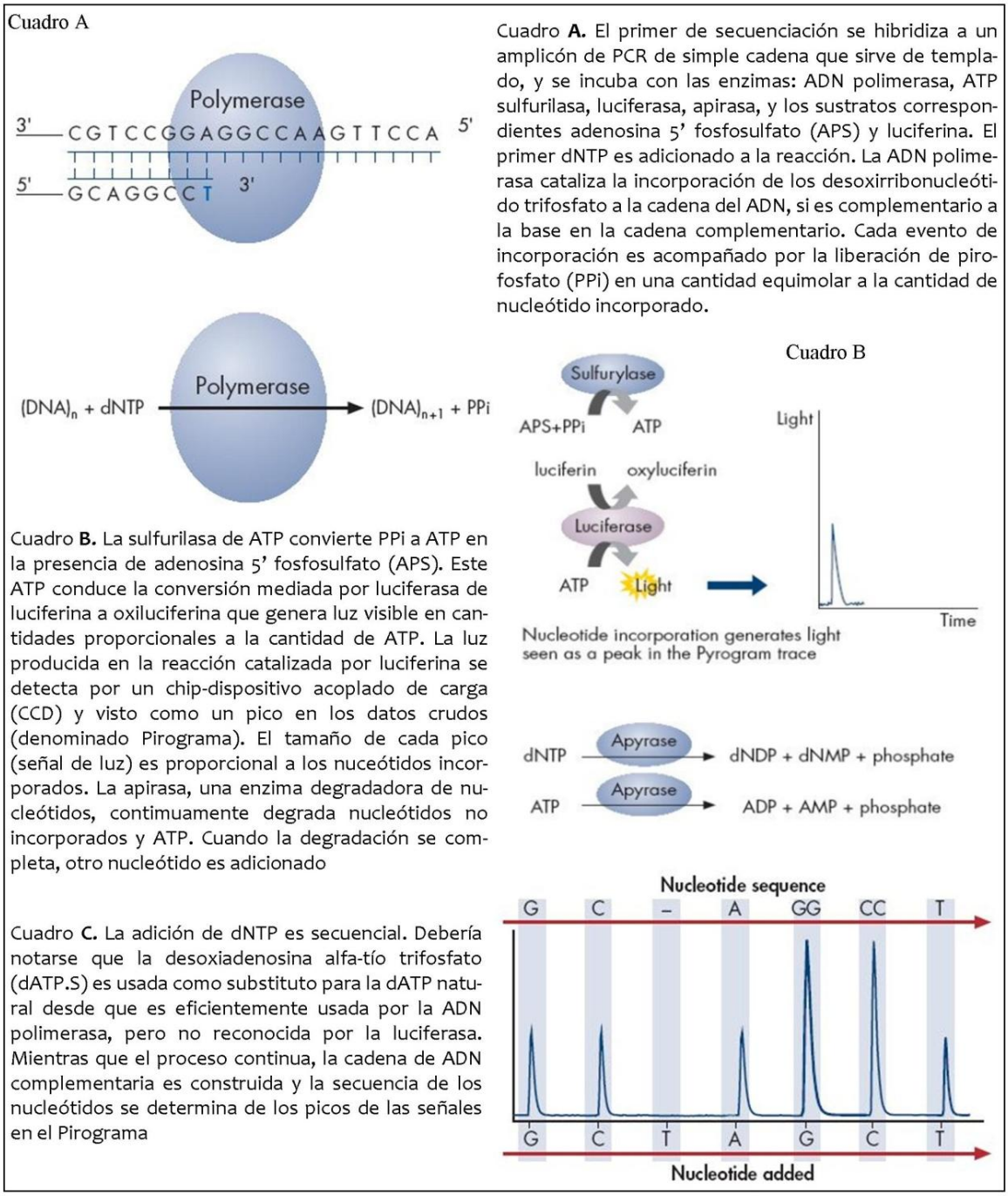
Para separar las cadenas biotiniladas del ADN complementario no marcado se utilizó un dispositivo denominado Workstation (Uppsala, Suecia) que atrapa los complejos de perla:

estreptavidina: biotina: ADN blanco. Las partículas se mantienen pegadas a microfiltros por un sistema de trampa de vacío, de esta manera las muestras son transferidas a diferentes soluciones consecutivamente: Agua destilada por 10 segundos para lavar los complejos, NaOH 0,2 M por 10 segundos para desnaturalizar el ADN y etanol 10% por 10 segundos para descartar el ADN que fue desnaturalizado. Las perlas son entonces transportadas a una placa con buffer de *annealing* (20 mmol/L Acetato de trizma y 5 mmol/L de acetato de magnesio, pH 7.6) que contiene el cebador de secuenciación. Seguido de esto, las muestras se calientan a 80°C por dos minutos y se enfrían por 5 minutos.

Pirosecuenciación e interpretación de los resultados

Las muestras fueron genotipificadas en el pirosecuenciador automático PSQ® 96 MA (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia) y la lectura automática se realizó por el programa PSQ®96SNP.

Figura 2.5 Aparato de purificación y separación de cadenas de los amplificados de ADN (izquierda), y pirosecuenciador PSQ96MA (Derecha).



Cuadro **A.** El primer de secuenciación se hibridiza a un amplicón de PCR de simple cadena que sirve de templado, y se incuba con las enzimas: ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa, apirasa, y los sustratos correspondientes adenosina 5' fosfosulfato (APS) y luciferina. El primer dNTP es adicionado a la reacción. La ADN polimerasa cataliza la incorporación de los desoxirribonucleótido trifosfato a la cadena del ADN, si es complementario a la base en la cadena complementario. Cada evento de incorporación es acompañado por la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado.

Cuadro **B.** La sulfurilasa de ATP convierte PPi a ATP en la presencia de adenosina 5' fosfosulfato (APS). Este ATP conduce la conversión mediada por luciferasa de luciferina a oxiluciferina que genera luz visible en cantidades proporcionales a la cantidad de ATP. La luz producida en la reacción catalizada por luciferina se detecta por un chip-dispositivo acoplado de carga (CCD) y visto como un pico en los datos crudos (denominado Pirograma). El tamaño de cada pico (señal de luz) es proporcional a los nuceótidos incorporados. La apirasa, una enzima degradadora de nucleótidos, contimuamente degrada nucleótidos no incorporados y ATP. Cuando la degradación se completa, otro nucleótido es adicionado

Cuadro **C.** La adición de dNTP es secuencial. Debería notarse que la desoxiadenosina alfa-tío trifosfato (dATP.S) es usada como substituto para la dATP natural desde que es eficientemente usada por la ADN polimerasa, pero no reconocida por la luciferasa. Mientras que el proceso continua, la cadena de ADN complementaria es construida y la secuencia de los nucleótidos se determina de los picos de las señales en el Pirograma

Figura 2.6 Principio de la reacción de pirosecuenciación (Qiagen Corporation, Germany).

Tabla 2.8 Descripción de las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas en las reacciones de PCR.

Nombre	***Secuencia***	***Amplicón***
c-myc	***cmyca*** *5´- aggaactatgacctcgacta-3'* ***cmycb*** *5'-agcagctcgaatttcttcc -3´*	*139 pb*
β-globina	***bgloba*** *5´-acacaactgtgttcactagc-3´* ***bglobb*** *5´-caacttcatccacgttcacc-3´*	*110 pb*
p53	***p53pf*** 5'-*tccccccttgccgtcccaa-3'* ***p53pr[b]-*** *5'-ctggtgcaggggccgtcggtgtag*-3' ***p53int*** 5'-*cagaggc tgctcccc*-3'	*166 pb*
RNasel	***rnpf[b]-****5'-gtgtcaccctctgtgagcagac-3'* ***rnpr*** *5'-gcagatcctggtgggtgtatcc-3'* ***rnint*** *5'-gatgacaggacattt-3'*	*166 pb*
Gp	***gp5+*** *5´-tttgttactgtggtagatac-3´* ***gp6+[b]*** *5´-gaaaaataaactgtaaatca-3´*	*145 pb*
My	***gp9+*** *5´-cgtcc(a/c)a(a/g)(a/g)gga(a/t)actatc-3´* ***gp11+*** *5´-gc(a/c)caggg(a/t)cataa(c/t)aatgg-3´*	*450 pb*
K-ras 12	***fkras12*** *5'-actgaatataaacttgtggtagttggacct-3'* ***rkras12*** *5´-actcatgaaaatggtcagagaaacctttat-3'*	*192 pb*
K-ras 13	***fkras13*** *5'-gtactggtggagtatttgatagtgtattaa-3'* ***rkras13*** *5'-gtatcgtcaaggcactcttgcctagg-3'*	*159 pb*

[B] cebadores biotinilados

2.10 Análisis estadístico de los resultados:

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando los programas *SPSS*® y el programa *EPI INFO* obtenido del CDC (Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, EEUU). La estadística descriptiva de los datos se efectuó mediante el empleo de tablas de tabulación cruzada y representación gráfica en histogramas de frecuencias.

El estudio de las asociaciones entre los marcadores moleculares en función a los factores de clasificación fue ensayado de acuerdo a sus distribuciones por medio de la prueba de chi-cuadrado. En las tablas 2x2 y con casillas de valores menores a 5 observaciones se utilizó la corrección de continuidad de Yates. Para cada factor estudiado se obtuvo el *odds ratio* con intervalos de confianza del 95%. El grado de correlación entre las variables fue estimado mediante el *tau-c* de Kendall.

2.11 Modelos matemáticos y/o estadísticos

2.11.1 Frecuencias génicas y genotípicas:

El polimorfismo en el codón 72 del gen oncosupresor *p53* presenta herencia del tipo co-dominante. Por esta razón, las frecuencias genotípicas (*Xii, Xij, Xjj*) se estimaron por recuento directo de cada uno de los genotipos observados sobre el total de pacientes estudiados. Las frecuencias génicas se obtuvieron según la siguiente fórmula (Nei, 1987).

$$xi = (2\, n_{ii} + n_{ij}) / 2\, n$$

Donde: n_{ii} indica el número de individuos homocigotas para el alelo *i* y n_{ij} indica el número de individuos donde *j* es cualquier alelo distinto de *i*.

2.11.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Según el principio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987), las frecuencias genotípicas esperadas en el equilibrio pueden ser estimadas en base de las frecuencias génicas a partir de la expansión del siguiente binomio:

$$(xi + xj)^2 = xi^2 + 2\, xi.xj + xj^2$$

Donde: x_i^2 es la frecuencia genotípica esperada en los individuos homocigotos para el alelo *i*, 2 $x_i.x_j$ es la frecuencia esperada de los heterocigotas *ij* y x_j^2 es la frecuencia esperada de los homocigotas para el alelo *j*.

Para verificar que la población se encuentre en equilibrio se comparan los valores genotípicos observados y los valores teóricos esperados según el equilibrio de Hardy-Weinberg, mediante el empleo de la prueba de Chi-cuadrado de Bondad de ajuste.

2.11.3 Prueba de Chi-cuadrado de Pearson:

La distribución de chi-cuadrado (χ^2), o de Pearson, se refiere a las probabilidades que tienen las sumas de los quebrados $(O-C)^2 / C$ formados por "n" número de clases. En ellos "O" es la frecuencia absoluta de una clase de una muestra real que responde a una ley, una hipótesis, una razón, una proporción o un porcentaje, y "C" es la frecuencia absoluta de la clase correspondiente de una clase teórica, calculada sobre la base de los parámetros de la muestra real y teniendo en cuenta el grado de libertad (v), o se clases menos el número de condiciones impuestas a esta muestra. La amplitud de la distribución va de cero a infinito.

Función: la función de la densidad de la probabilidad de la frecuencia se expresa:

$$X^2 = \sum_1^n \frac{(O-C)^2}{C}$$

Para la estimación de la asociación entre dos o más variables del tipo cualitativo se empleó la prueba de chi-cuadrado con la corrección de Yates para las casillas con valores menores de 5 observaciones (Greenberg *et al.*, 2001). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a los valores de $p < 0{,}05$.

$$X^2 Yates = \sum_1^n \frac{(O-C+0{,}5)^2}{C}$$

2.11.5 Estimación del riesgo relativo

El *odds ratio* es una estimación del Riesgo Relativo asociado a la exposición a un factor (Greenberg *et al.,* 2001). Se calcula mediante la razón de los productos cruzados de enfermos por sanos entre los individuos que presentan el factor de riesgo en consideración y los que no lo hacen (OR). Valores mayores a 1 indican que la enfermedad es más común entre los individuos que están expuestos al factor bajo estudio. La situación opuesta ocurre cuando los valores son menores a 1.

La información de la población en estudio se tabula de la siguiente manera:

	Enfermedad	
	Si	***No***
Exposición	*a*	*b*
No exposición	*c*	*a*

La fórmula del *odds ratio* (OR) es:

$$OR = \frac{(a \bullet d)}{(c \bullet b)}$$

La estimación del intervalo de confianza del 95% del OR se obtiene de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$L_n(OR) + 1{,}96 \bullet S_{Ln(OR)}$$

Donde $S_{Ln(OR)}$ es el error estándar del logaritmo del *OR:*

$$S_{Ln(OR)} = (1/a+1/b+1/c+1/d)^{1/2}$$

2.11.6 Coeficiente de correlación de Kendall

La medida *tau-c* de Kendall estima el grado y tipo de asociación entre dos variables cualitativas con distinto número de categorías en escala ordinal. El signo del coeficiente indica la dirección de la relación, y su valor absoluto indica su fuerza. Valores próximos a 1 o –1 se deben a una fuerte asociación positiva o negativa, respectivamente. Valores próximos a 0 representan ausencia de asociación.

$$\tau_c = \frac{(D - I)}{(D + I)}$$

Donde: D es el número total de situaciones directas, e I es el número total de situaciones inversas (Greenberg *et al*., 2001).

2.11.7 Curva de Kaplan-Meier

Es muy común que la variable que se quiera estudiar sea el tiempo en que tarda en ocurrir un suceso, ya sea este beneficioso o perjudicial. El conjunto de técnicas estadísticas que se emplean para analizar este tipo de datos se conoce en medicina como "análisis de la supervivencia". El procedimiento de Kaplan-Meier es un método de estimación de modelos hasta el evento en presencia de casos censurados (aquellos individuos que no presentaron el suceso a estudiar hasta el momento en que fueron medidos). El modelo de Kaplan-Meier se basa en la estimación de las probabilidades condicionales en cada punto temporal cuando tiene lugar un evento y en tomar el límite del producto de esas probabilidades para estimar la tasa de supervivencia en cada punto temporal.

La supervivencia (o en el caso del presente estudio el tiempo de aparición de la enfermedad) se calcula de la siguiente forma:

$$S(ti) = \frac{ri - mi}{ri} \bullet S(ti - 1)$$

El test de Log-rank (o Log-rango) fue utilizado para comparar el inicio de la enfermedad entre los grupos de genotipos. Este estadístico contrasta la igualdad de las distribuciones para los diferentes niveles del factor. En esta prueba, todos los puntos del tiempo son ponderados por igual.

2.11.8 Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial o MDR

La Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial (MDR) es un modelo genético no paramétrico que es alternativo a la regresión logística para la detección y la caracterización de interacciones no lineales entre atributos genéticos y ambientales

discretos. Este método sirve para detectar y caracterizar las combinaciones de variables predictoras (atributos) o variables independientes que interactúan para influenciar las variables de clase o dependientes. MDR fue diseñado específicamente para identificar interacciones entre variables discretas que influencian una respuesta binaria, y es considerada una alternativa no paramétrica a los métodos estadísticos tradicionales.

La base del método de MDR es la construcción de un algoritmo que convierte dos o más variables (polimorfismos) en una sola. En lugar de comparar todas las combinaciones de genotipos entre casos y controles, la nueva única variable es asociada con la variable de clase (sano-enfermo). De manera que un análisis multivariado pasa a ser uno bivariado, el cual puede ser abordado con cualquier técnica conocida de asociación no paramétrica. El objetivo final es crear un modelo simple que facilite la detección de interacciones no aditivas o no lineales entre los atributos, tal que la predicción de la variable de clase sea mejorada más que en la representación original de los datos. El software utilizado en este trabajo fue MDR-Permutation Testing Software Overview™ (Dartmouth Medical School, USA).

Resultados

3.1 Detección del ADN del virus del Papiloma humano.

El ADN fue extraído exitosamente de las 291 biopsias analizadas. Aquellas biopsias que no fueron positivas para la el gen control de la beta globina fueron cortadas nuevamente de los tacos de parafina y su ADN re-extraído.

Todas las muestras fueron analizadas mediante la técnica de PCR. Una biopsia se consideró negativa luego de obtener tres resultados negativos para el protocolo anidado MY/GP+. Estos cebadores delimitan un segmento de la región *L1* del genoma viral conservado entre los tipos virales (cebadores MY09/11 y GP05+/06+). La figura 3.1 presenta los productos de amplificación de la segunda ronda (GP+).

La genotipificación fue realizada mediante el procedimiento PCR enzimo-inmunoensayo para sondas específicas como está descripto en Materiales y Métodos. En la figura 3.2 (A) se observa una fotografía mostrando los resultados obtenidos en una de las micro-placas. Además, para la tipificación viral también se utilizó la técnica de polimorfismos en la Conformación de Cadenas Simples (SSCP) (figura 3.2 B). Aquellas muestras positivas que no hibridaban con alguna de las sondas oligonucleotídicas para la técnica de enzimo-inmunoensayo, y que cuyos patrones de SSCP no correspondían a ninguno de los controles utilizados, fueron secuenciadas con un sistema MegaBase®, perteneciente al servicio de secuenciación del IGEVET-CONICET. Los primers utilizados para la secuenciación han sido los cebadores Gp5+ y GP6+.

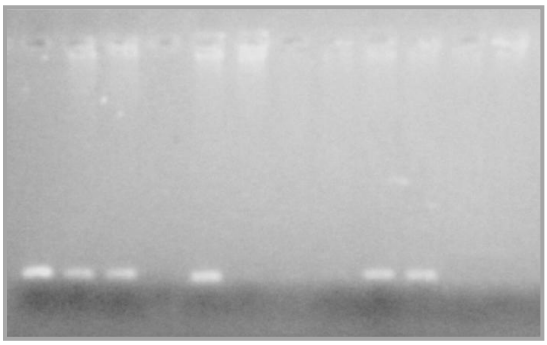


Figura 3.1. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Calle 1: control positivo (Caski); calles de 2 a 5: muestras de colon y recto; calle 6: control negativo; calles 7 a 11: muestras de colon y recto; calle 12: control negativo.

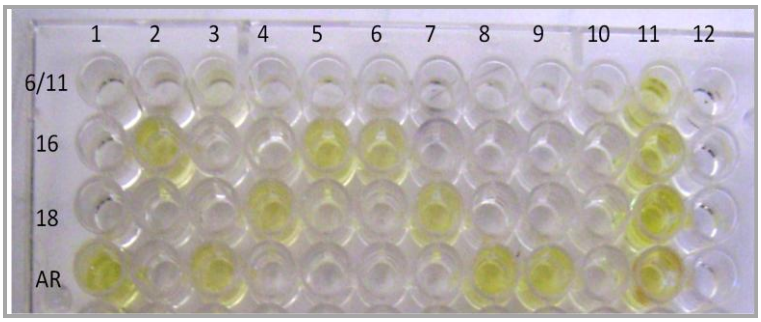
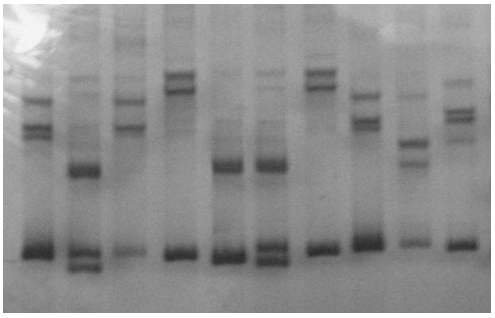


Figura 3.2 (A) Microplaca de PCR enzimo-inmunoensayo de las muestras positivas para los tipos virales. Calle 1, 3 y 8: VPH 31; calle 2, 5 y 6: VPH 16; calle 4 y 7: VPH 18; calle 9: VPH 51; calle 10: VPH 66; calle 11: controles positivos; calle 12: controles negativos.



(B) Electroforesis (SSCP) en gel de poliacrilamida (8%), bajo condiciones desnaturalizantes para los diferentes tipos virales detectados en este trabajo. Calle 1, 3 y 8: VPH 31; calle 2, 5 y 6: VPH 16; calle 4 y 7: VPH 18; calle 9: VPH 66; calle 10: VPH 51.

3.2 Prevalencia del Papilomavirus Humano:

La prevalencia del VPH fue de 29% en las muestras de colon y recto tomadas en conjunto. Cuando se dispuso de más de una biopsia por individuo, se consideró positivo al mismo si en al menos uno de los tejidos era detectado ADN viral. Para los adenocarcinomas, se examinó ADN de varios cortes del tumor si más de una muestra era remitida, y para el caso de 12 individuos en el grupo de adenomas y de cuatro pacientes en el grupo de pólipos hiperplásicos, también se analizaron biopsias de otros sitios del intestino.

El grupo control reveló que el 26,5% (25 de 94) de los tejidos eran positivos para el VPH, mientras que para el grupo de adenocarcinomas fue el 38% (33/87). En base a la

presencia del ADN viral, la diferencia entre casos y controles no fue significativa (OR=1,6; $IC_{95\%}$=0,9-3,1; *p*>0,05). Al ajustar los datos por la edad, mediante regresión logística, la diferencia entre casos y controles fue aún menor (OR_{edad}=1,07 $IC_{95\%}$=0,4-2,4; p>0,05).

Como puede observarse en la tabla 3.1, los adenomas tampoco presentaron diferencias significativas para la detección del ADN viral (OR=1,2; p>0,5). Por otra parte, los pólipos hiperplásicos presentaron la prevalencia más baja de biopsias con ADN del VPH, aunque también fue el grupo con menor número de muestras.

La relación entre la presencia del VPH y la severidad de los carcinomas está descrita en la tabla 3.2 y el gráfico 3.1. Al separar los tumores por estadío, no se observó correlación entre el porcentaje de VPH y el grado de invasión del tumor. El subgrupo con mayor prevalencia fue el estadío III, con 42% de los tumores positivos, seguidos del estadío IV (41%), y el estadío I (37%). Proporcionalmente, el estadío con menor prevalencia de VPH fue el II.

Tabla 3.1 Prevalencia de la infección por el Papilomavirus humano en la población en estudio, los valores de Odds Ratio y *P* fueron calculados mediante chi-cuadrado por comparación con los controles.

Grupos	**ADN VPH +**	**ADN VPH -**	***Odds Ratio* ($IC_{95\%}$)**
Normales (n=94)	25 (26,6%)	69 (73,4%)	0
Adenomas (n=74)	17 (23%)	57 (77%)	1,2 NS
Carcinomas (n=87)	33 (38%)	54 (62%)	1,6 (0,9-3,1) NS
Pol. Hiperplásicos (n=19)	4 (21%)	15 (79%)	0,7 NS
Total (n=274)	79 (28,8%)	195 (71,2%)	-

NS No significativo

Tabla 3.2 Correlación entre presencia del virus del Papiloma humano y el estadío colorrectal.

Estadío colorrectal	Estado VPH		Valor p[A]
	ADN VPH+	ADN VPH-	
Estadío I	10 (37%)	17 (63%)	0,41
Estadío II	7 (33,3%)	14 (66,7%)	0,71
Estadío III	11 (42,3%)	15 (57,7%)	0,19
Estadío IV	5 (41%)	7 (59%)	0,45
Datos perdidos	-	1	-
Total	33 (38%)	54 (62%)	-

[A]Prueba de χ^2 de los estadíos comparados con el grupo control.

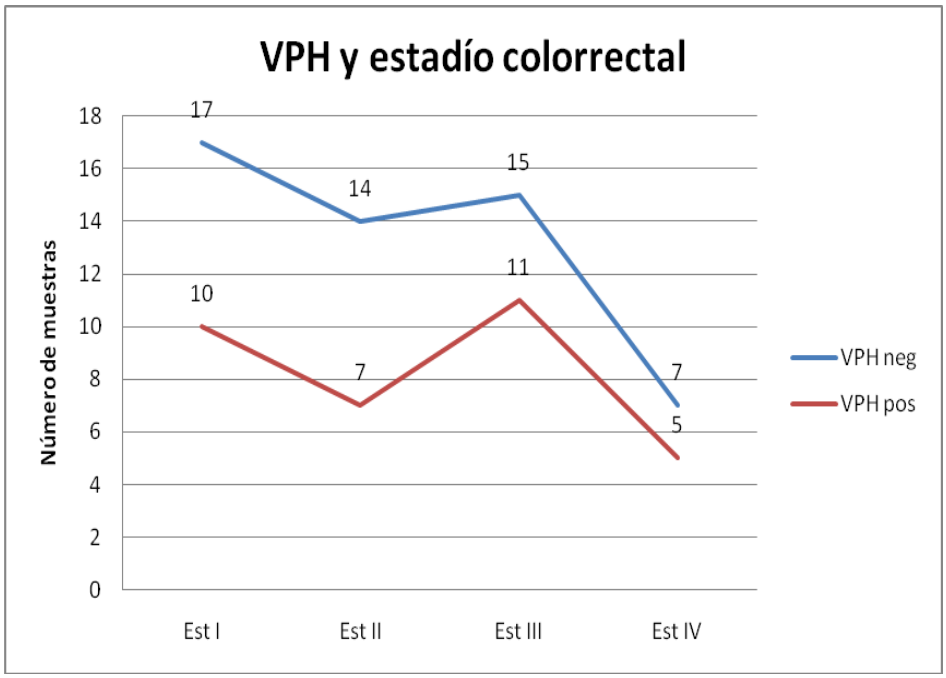


Gráfico 3.1. Prevalencias de VPH de acuerdo al estadío del cáncer colorrectal, graficado en porcentajes.

No se observo relación entre la infección por VPH y el grado de displasia de los adenomas. El 29% (11/38) de los adenomas de displasia de bajo grado, el 12% (2/16) de

los de moderado grado, y el 16% (5/32) de los de alto grado presentaron ADN del VPH. Con respecto al tipo de estructura histológica, se sabe que los adenomas vellosos tienen un potencial oncogénico hasta diez veces mayor respecto a los pólipos adenomatosos de histología tubular. Sin embargo, la proporción de adenomas positivos para VPH fue similar en adenomas vellosos (21%) y tubulares (24%) (Gráfico 3.2). Los adenomas mixtos (regiones tubulares y vellosas) tuvieron la menor prevalencia del virus, con el 18% de positividad.

Tipos virales.

Los tipos virales de alto riesgo VPH 16 y 18 sumaron la mayoría de los casos positivos, en todos los grupos. En mucha menor proporción se encontraron los tipos virales 31, 33, 51 y 66. En este grupo de muestras no se detectaron los tipos VPH 6 y 11. Por otra parte, en dos muestras no se pudo establecer el tipo viral debido a que se obtuvieron positivos que denotaban un muy bajo número de copias, impidiendo su tipificación posterior. Un resúmen de los tipos virales encontrados se detalla en las tablas 3.3 y 3.4.

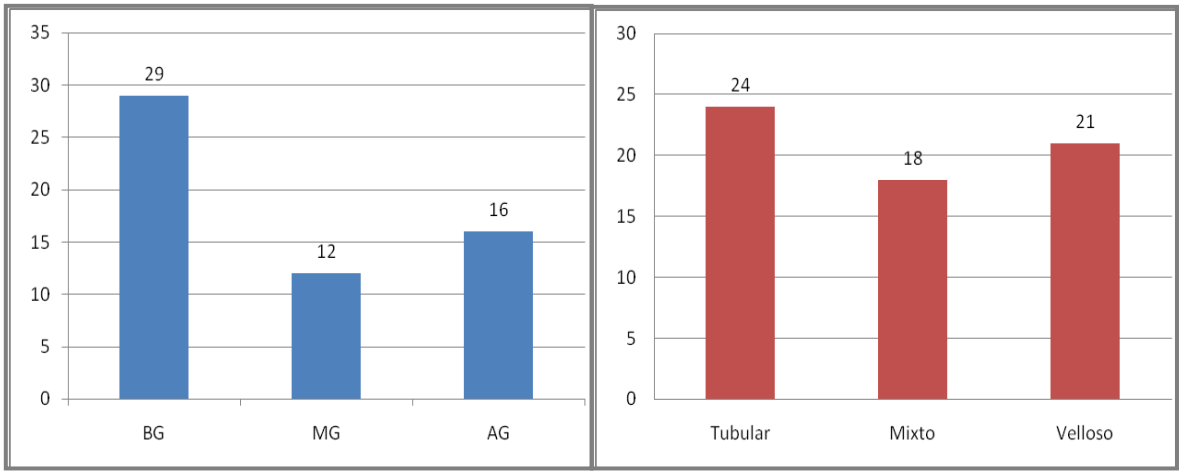


Gráfico 3.2. En los dos cuadros se observan los porcentajes de muestras VPH positivas en el grupo de adenomas. A la izquierda, BG: adenomas con displasia de bajo grado; MG: adenomas con displasia de grado moderado; AG: adenomas con displasia alto grado. A la derecha las barras representan el número de adenomas según la estructura histológica: Tubular, Mixto (tubulo-velloso), y Vellosos.

Tomando todos los grupos histológicos en conjunto, el VPH 16 constituyó el tipo viral más frecuente, con el 13% de muestras positivas (36/274). A éste le siguió el VPH 18 con el 10% de las muestras (27/274). Todos los tipos restantes en conjunto (31, 33, 51, 66, otros) acumularon menos del 6% de las muestras (16/274). En la tabla 3.3 se describen las prevalencias tipo-específicas de acuerdo a los grupos. En todos los grupos la distribución de frecuencias tipo específicas tuvo una tendencia similar con respecto al VPH 16 y 18 (Gráfico 3.3). Tanto controles como carcinomas presentaron prevalencias del VPH 16 de 12,7% y 18,4%, respectivamente. Un poco por debajo se encontraron los adenomas, con 9,3%. El Papilomavirus tipo 18 estuvo en segundo lugar en todos los grupos, y el VPH 31 también fue detectado en mucosa normal (3,2%), adenomas (1%) y tumores colorrectales (2,3%). Además, se han detectado muestras con VPH 33, y otras con VPH 51 y 66.

Tabla 3.3 Distribución de los subtipos de VPH en controles normales, adenomas y pólipos hiperplásicos.

	Tipos VPH						Total
	16	18	31	33	66	Otros	
Controles	12	9	3	-	-	1	25
Adenomas	8	6	1	-	-	2	17
Pól. Hiper	2	1	-	1	-	-	4
Carcinomas	16	12	2	2	1	-	33

En la tabla 3.4 se puede observar la distribución de prevalencias tipo específicas del VPH de acuerdo al estadío del cáncer colorrectal. En general, se pudieron detectar los tipos virales VPH 16 y 18 en casi todos los estadíos, salvo la fase metastásica. El estadío IV fue positivo para ADN de VPH 18 en 4 muestras.

Tabla 3.4 Tipos virales del virus del Papiloma humano según el estadío de cáncer colorrectal.

Estadío	Tipo de VPH							Total
	Neg.	16	18	31	33	66	Otros	
I	17	5	3	-	1	1	-	27
II	14	4	2	-	1	-	-	21
III	15	7	3	1	-	-	-	26
IV	7	-	4	1	-	-	-	12
Sin esp.	1	-	-	-	-	-	-	1
Total	54	16	12	2	2	1	-	87

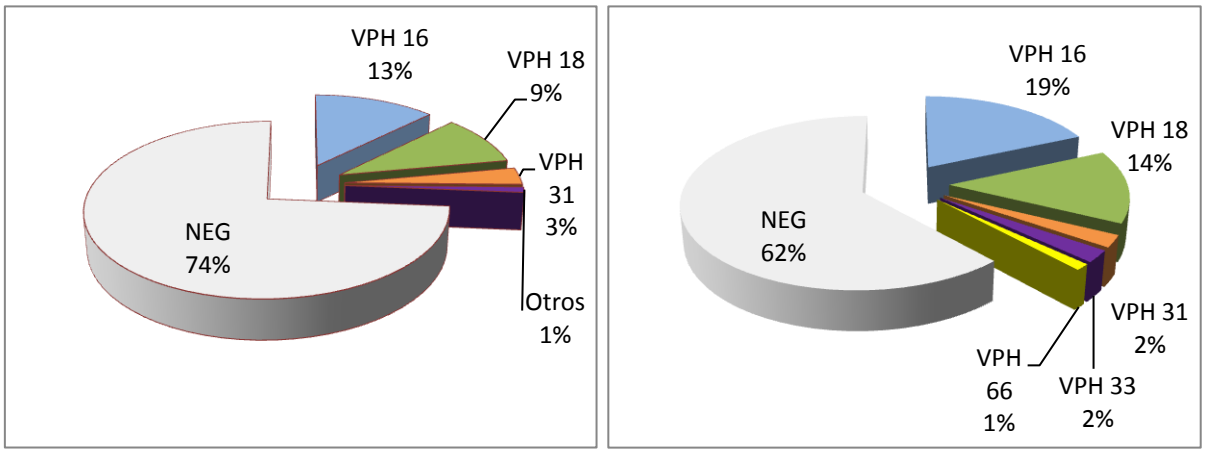


Gráfico 3.3 Prevalencia tipo específica del Papilomavirus humano en controles y carcinomas.

VPH y otras características histopatológicas

Además de analizar la relación entre la infección por VPH y la estratificación colorrectal, en este trabajo se ha examinado la distribución viral con otras características importantes de los carcinomas colorrectales, como la edad de diagnóstico, género del paciente, localización anatómica del tumor, grado de diferenciación y tamaño de tumor.

En el caso de los adenomas, se ha incluido el grado de displasia, que puede variar entre bajo, moderado y alto. Si los adenomas son de estructura histológica vellosa, tubular o tubulo vellosa, y el sitio o sitios anatómicos del tracto de donde fue extraído.

Sexo

La relación entre la positividad por el ADN del VPH y el género está resumida en la tabla 3.5 para controles, adenomas y carcinomas. De acuerdo a los resultados, la detección del VPH fue similar en hombres y mujeres tanto en controles como en adenomas. Sin embargo, existió una tendencia estadísticamente significativa de detección de VPH en mujeres en el grupo de los carcinomas (OR=2,9; IC_{95}=1,17-7,19; p=0,03). Esto se debió a que un poco más del 40% de todos los carcinomas obtenidos de pacientes mujeres eran positivos para VPH, en comparación con solamente el 34% en hombres. Estos datos no se vieron reflejados en los otros grupos: Solamente el 16% de los adenomas provenientes de mujeres tuvieron ADN del VPH, y 24% de los controles VPH positivos eran mujeres. Tomados todos los grupos en conjunto, la distribución del VPH de acuerdo al género fue uniforme (OR=1,13; p>0,05).

En la tabla 3.6 se compara el grado de severidad que tienen los carcinomas positivos para VPH en hombres y mujeres.

Edad

Para comparar la media de edad entre individuos infectados y no infectados dentro de un grupo se utilizó el test *t* de Student. Para tres o más grupos, el Análisis de la Variancia (ANOVA) fue la metodología seleccionada.

Ninguno de los grupos presentó diferencias significativas en la edad respecto a la infección por VPH. La diferencia de la media de edad entre individuos infectados y no infectados fue de 2,5 años (*t*=0,4; p=0,6) para el grupo control; de 3,4 años para el grupo de adenomas; y 2,5 años en carcinomas (t=-0,5; p=0,56). Es interesante resaltar que las

muestras VPH positivas tuvieron mayor promedio de edad que las negativas en los carcinomas, en menor grado en los controles y en los adenomas.

El promedio de edad de los carcinomas de este trabajo fue un poco más bajo a aquel reportado por el Registro de cáncer de la Provincia de Buenos Aires, que publicó una edad promedio de incidencia de cáncer de colon y recto de 65 años, para el período 1996-2000.

Tabla 3.5 Relación entre la detección del ADN del Papilomavirus humano, el sexo y la edad.

	Estado VPH	Sexo		X^2 Valor P	Edad Años (DS)	*t Stud.* Valor P
		Femenino	Masculino			
Carcinomas	VPH (+)	22 (66,7%)	11 (33,3%)		63 (19)	
	VPH (-)	22 (40,7%)	32 (59,3%)	**<0.05**	61 (13)	NS
Adenomas*	VPH (+)	6 (35,3%)	11 (64,7%)		59,4 (13)	
	VPH (-)	32 (57,1%)	24 (42,9%)	NS	62,8 (13)	0,59
Normales	VPH (+)	10 (40%)	15 (60%)		53,5 (15)	
	VPH (-)	31 (45%)	38 (55%)	NS	56 (18)	0,6

*Un dato perdido de sexo; DS desvío estándar.

Tabla 3.6 Distribución de género según el estadío colorrectal en pacientes positivos para VPH.

	Estadío TNM				
Sexo	I	II	III	IV	Total
F	4	5	9	4	22
M	6	2	2	1	11
Total	10	7	11	5	33

Ubicación anatómica

Las muestras fueron divididas en dos grupos: proximal, que incluían biopsias desde el ciego hasta colon descendente; y distal, que comprendían muestras del colon sigmoide al recto. El grupo de adenomas tuvo una relación proximal:distal cercana a la unidad (40/42,

con 4 adenomas sin especificar), mientras que el grupo de los carcinomas tuvo un mayor número de muestras proximales que distales (1,7=52/31; con 4 tumores sin especificar).

La relación entre la infección por VPH y la ubicación dentro del colon se puede observar en la tabla 3.7. Los tumores positivos no estuvieron asociados con la localización anatómica en los adenomas ni en los carcinomas. La relación entre tumores positivos y negativos para el ADN del VPH indicó que existe un mayor porcentaje de muestras infectadas en colon proximal (colon descendente hasta el ciego) que el colon más distal (colon sigmoideo y rectal) en los adenomas. En los carcinomas la diferencia fue muy pequeña y no sginificativa (44,2% versus 32,3%, respectivamente).

A pesar de esto, si se dividen las muestras de acuerdo al sitio anatómico específico, el recto posee la mayor prevalencia en todos los grupos, con 36% en controles versus 24% en otros sitios (p=0,71); 25% en adenomas versus 21% en otros sitios (p=0,71); y 41% en carcinomas versus 39% en otros sitios (p=0,88).

La tabla 3.8 revela las prevalencias tipo específicas de los tipos virales más frecuentes de acuerdo a la localización anatómica. No parece haber una distribución preferencial según el tipo viral. Existe una mayor prevalencia de VPH 16 en carcinomas del colon, pero esta diferencia no resultó significativa (X^2=0,82; p=0,3).

Tabla 3.7 Localización anatómica del VPH en carcinomas colorrectales.

Adenomas[A]	Ubicación anatómica		X^2 (valor P)
	Proximal	Distal	
ADN VPH +	12 (28,6%)	6 (15,0%)	p>0,05 NS
ADN VPH-	34 (85,0%)	30 (71,4%)	
Carcinomas[A]			
ADN VPH +	23 (44,2%)	10 (32,3%)	p>0,05 NS
ADN VPH-	29 (55,8%)	21 (67,7%)	

[A]En ambos grupos 4 casos sin especificar ubicación.

Tabla 3.8 Distribución de los tipos virales más frecuentes de acuerdo a la ubicación anatómica.

Adenomas	Ubicación anatómica		valor p
	Proximal	Distal	
VPH 16	5	2	0,82
VPH 18	3	3	
Carcinomas			
VPH 16	13	3	0,30
VPH 18	7	5	

Grado de diferenciación y tamaño tumoral

La infección por VPH fue homogénea entre los grupos divididos de acuerdo al grado de diferenciación (Gráfico 3.4). El tamaño de los tumores colorrectales presentó una gran amplitud en los valores. La media correspondió a 4,6 centímetros, con un rango entre 1,5 y 12 cm, con un desvío estándar de 2,1 cm. Se compararon los promedios de los diámetros reportados entre los tumores ADN-VPH positivos y negativos. Solamente hubo una diferencia de 0,3 cm entre tumores infectados y no infectados ($t=0,58$; $p>0,05$) (Tabla 3.9).

Tabla 3.9 Relación entre el diámetro de los tumores colorrectales y la positividad para el ADN del VPH.

	Media	Dif. de las medias	*t (valor P)*
VPH -	4,69 cm	0,3 cm	0,58 (0,9)
VPH +	4,66 cm		

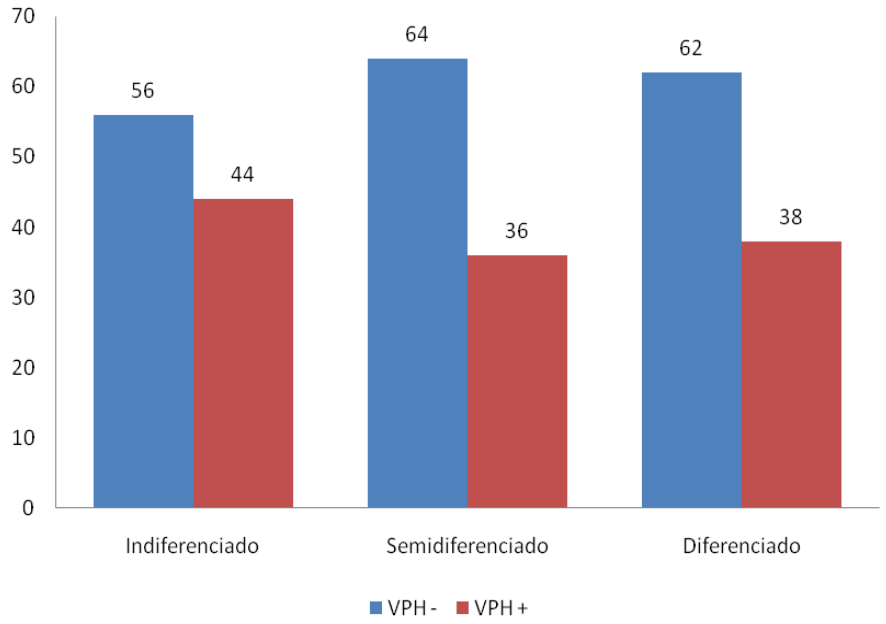
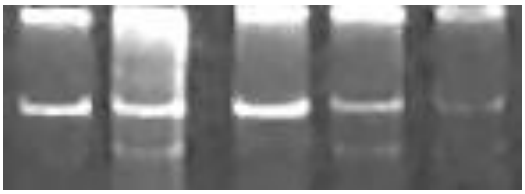


Gráfico 3.4 Gráfico de barras donde se puede apreciar la prevalencia del Papilomavirus humano de acuerdo al grado de diferenciación de los tumores colorrectales

3.2 Integración de VPH 16 y 18

El estado físico del Papilomavirus humano de alto riesgo fue analizado mediante el análisis de la integridad de E2 en el cáncer colorrectal. En la figura 3.3 se pueden observar las corridas electroforéticas con las bandas de los amplificados para el gen E2 del VPH 16. La ausencia de la señal de PCR se interpretó como interrupción de la secuencia de E2 y evidencia indirecta de la integración dentro del genoma (Badaracco, 2002). Se examinaron dieciséis carcinomas colorrectales que fueron positivos para VPH 16 y doce para VPH 18. En el grupo normal se hizo PCR a doce de las biopsias positivas para VPH 16 y nueve para VPH 18. La Tabla 3.10 muestra los resultados para la amplificación tipo específica de E2.

(A)



(B)

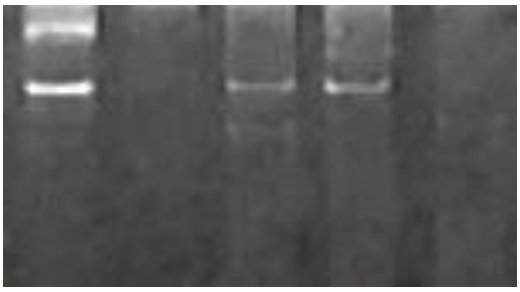


Figura 3.3. Geles de poliacrilamida al 10% donde se observa el amplicón de E2 de VPH 16 (~140pbs). (A) diluciones seriadas del plásmido de VPH 16 en 100 ng de fondo de ADN. Calle 1 a 5: 1.10^{-2} OD a 1.10^{-6} OD. (B) Calle 1: Control positivo, Calle 2: control negativo, Calle 3 y 4: muestras colorrectales positivas, calle 5: muestra colorrectal negativa.

Tabla 3.10 Prevalencia de detección de E2 de VPH 16 y VPH 18 en muestras positivas para el Papilomavirus humano.

		E216		E218	
		POS	NEG	POS	NEG
Controles		8	4	6	3
Carcinomas	Estadío I	3	2	2	1
	Estadío II	2	2	2	-
	Estadío III	2	5	2	1
	Estadío IV	-	-	3	1

Como se puede observar en la tabla, en una proporción de los tumores positivos para VPH no pudo detectarse E2. La frecuencia de integración de VPH 16 fue mayor (56%) que para VPH 18 (25%) en carcinomas. En el grupo de controles la prevalencia de integración para ambos tipos se ubicó en el 34%. El bajo número de muestras positivas impidió realizar comparaciones estadísticas entre ambos grupos.

3.3 Amplificación del proto-oncogén c-myc

Se analizó el estado de amplificación del gen *c-myc* en los tejidos colorrectales, excepto en tres muestras (2 carcinomas y 1 adenoma) que fueron negativas para el gen, mediante la técnica de amplificación con gen de referencia (Lönn *et al.*, 1993). En la figura 3.4 se exhibe un gel con las bandas correspondientes a los productos de amplificación de *c-myc* y en la figura 3.5 la representación de los electroferogramas obtenidos con el programa Image-Pro Plus.

La línea de corte o "*cut off*" fue establecida como la relación de los productos de amplificación de los productos *c-myc*/β-globina mayor a dos desvíos estándar respecto de aquella presentada por el grupo normal. El valor obtenido para la población de muestras normales fue de 2 (media=1,2; DS=0,4). Aquellas muestras que presentaron valores entre ubicados entre 2 y 3 se clasificaron como amplificación leve, mientras que las muestras que presentaron valores por encima de 3 fueron consideradas como amplificación de alto grado.

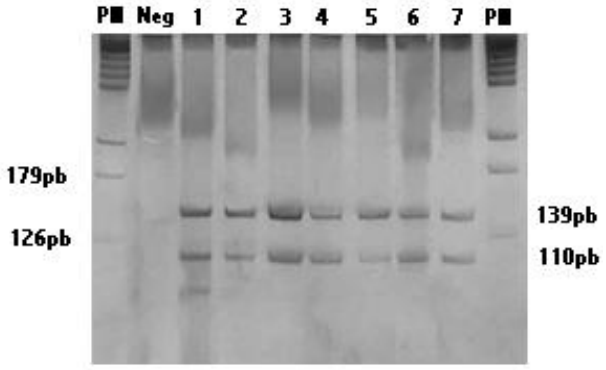


Figura 3.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Se observan los productos de la co-amplificación *c-myc* β-globina. PM: Marcador molecular pGem® (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU). Neg: Control Negativo. Calles 1 a 7: muestras colorrectales.

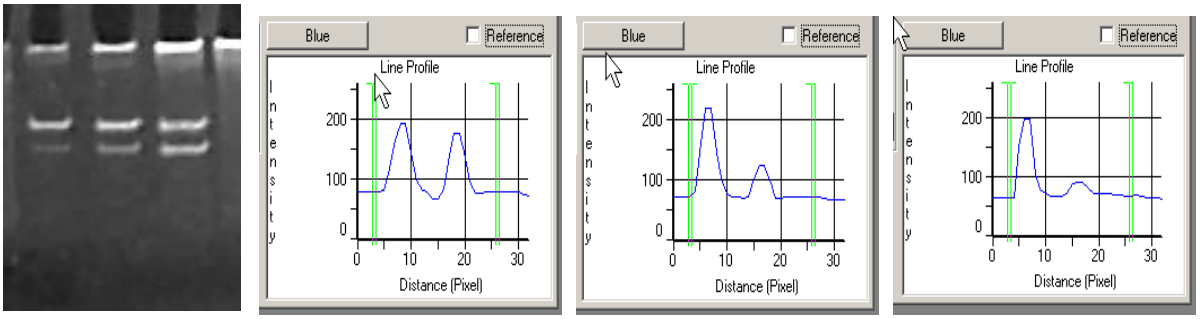


Figura 3.5. Análisis de la intensidad de bandas con el software Image-Pro Plus. A la izquierda se observa un gel de poliacrilamida al 10% y a la derecha los diagramas de intensidades de las bandas *c-myc* y β-globina para las calles 1, 2 y 3. Calle 1: 190/92=2,06 (amplificado); calle 2: 220/127=1,73 (no amplificado); calle 3: 176/176=1 (no amplificado).

La prevalencia de amplificación de *c-myc* en la totalidad de los carcinomas fue del 27,1% (23/85). La proporción de muestras con número aumentado de copias se incrementó de acuerdo a la severidad de la lesión, disminuyendo levemente en el último estadío; 3 de 27 en estadío I; 4 de 21 en estadío II; 12 de 25 en estadío III, y 4 de 12 en estadío IV (Gráfico 3.5). En el grupo de los adenomas el porcentaje de muestras con *c-myc* amplificado resultó en 19,8% (17/86).

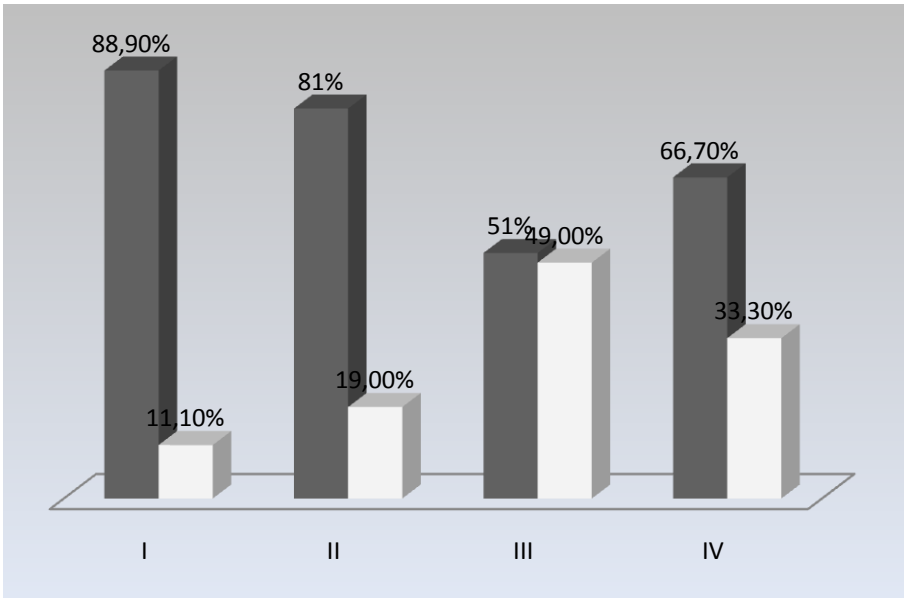


Gráfico 3.5 Histograma de la prevalencia de la amplificación de *c-myc* en estadíos del cáncer colorrectal. Las barras oscuras representan el porcentaje de muestras normales, las barras claras el de c-*myc* amplificado.

Al dividir los datos en amplificaciones de alto y bajo grado, los pólipos adenomatosos tuvieron amplificaciones leves (relación c-*myc*/β-*globina* de 2 a 3) (tabla 3.11). Los carcinomas, en cambio, presentaron amplificación génica de alto grado en la mayoría de los tumores con *c-myc* activado, como lo describe la tabla 3.12. La diferenciación del grado de activación de *c-myc* respecto a los estadíos de la enfermedad demostró que mientras que la proporción de tumores con amplificación leve fue homogénea a través de todos los estadíos, la prevalencia de tumores con amplificación génica alta fue incrementándose del estadío I al estadío III, presentando una disminución en el estadío IV (Gráfico 3.6).

Tabla 3.11 Prevalencia del grado de amplificación de *c-myc* en los grupos de adenomas y carcinomas.

	Estatus de *c-myc*			
	Normal	Amplificación leve	Amplificación alta	Total
Adenomas	68 (80)	17 (20)	-	85
Carcinomas	62 (72,9%)	10 (11,8%)	13 (15,3%)	85

Tabla 3.12 Prevalencia del grado de amplificación de *c-myc* en los estadíos del cáncer colorrectal.

		Grado *c-myc*			Total
		Normal	Leve	Alto	
TNM	I	24 (38,7%)	2 (20,0%)	1(7,7%)	27 (31,8%)
	II	17(27,4%)	2(20,0%)	2(15,4%)	21 (24,7%)
	III	13(21,0%)	3(30,0%)	9(69,2%)	25 (29,4%)
	IV	8(12,9%)	3(30,0%)	1(7,7%)	12 (14,1%)

Cuando se analizó el estado de amplificación de *c-myc* respecto del grado de diferenciación histológica se observó que los tumores con incremento de copias génicas estuvieron representados de manera heterogénea en las diferentes categorías, y se

asociaron estadísticamente con las formaciones indiferenciadas (55,6% en comparación con el 11,1% en las semi-diferenciadas y el 26,5% en las diferenciadas). También se determinó si la amplificación de *c-myc* se encontraba relacionada con el tamaño del tumor. Llamativamente, los tumores con *c-myc* amplificado tenían, en promedio, menor tamaño que las muestras con un número normal de copias de *c-myc*. Estos resultados se encontraron en el límite de la significancia estadística (p=0,05).

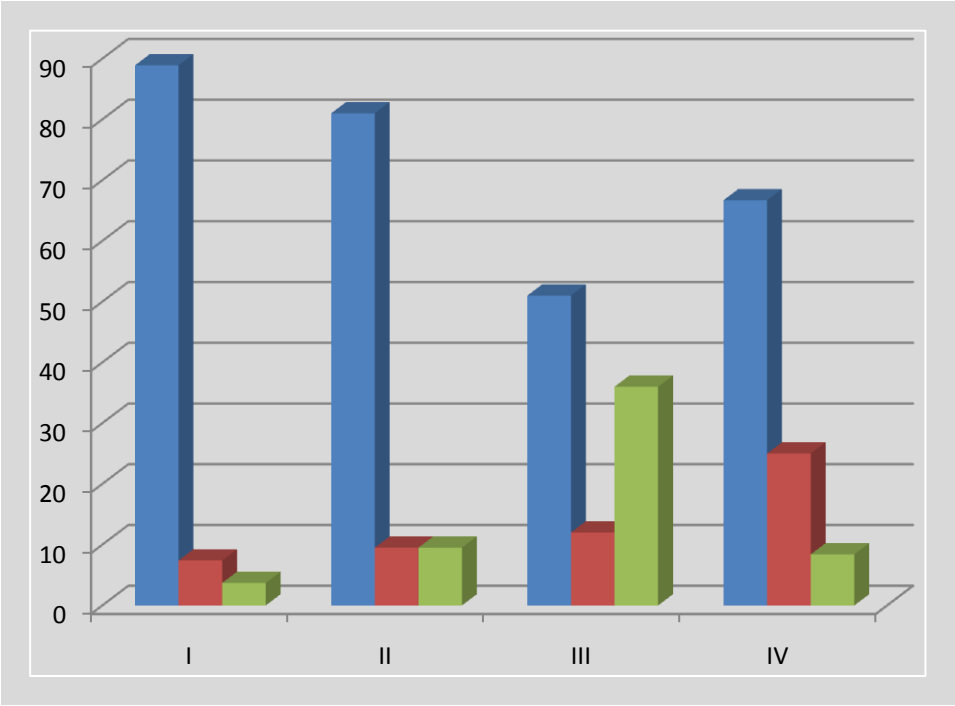


Gráfico 3.6. Histograma que representa la prevalencia de amplificación de *c-myc* en los diferentes estadíos del cáncer colorrectal. Las barras de color azul indican el porcentaje de muestras normales, las de color castaño la amplificación de bajo grado, y las verdes de alto grado.

Finalmente se comparó el estado de activación de *c-myc* con el sitio anatómico de la lesión. El 38% de los tumores de la región proximal presentaron *c-myc* amplificado, en comparación con el 10% de la región distal (p>0,05). Un resúmen comprensivo de todas las relaciones estudiadas con la amplificación del gen *c-myc* y valores estadísticos se pueden apreciar en la tabla 3.13.

Respecto al Papilomavirus, se detectó que el 47,8% de las muestras con *c-myc* amplificado portaban ADN del VPH, y los tumores sin amplificación tuvieron el 66%. Para

verificar si existía asociación con la infección viral, las muestras fueron agrupadas según los tipos VPH 16 y 18.

La tabla 3.13 describe la prevalencia de infección de acuerdo al grado de amplificación de *c-myc*. Los tumores positivos para el VPH 16 y 18 presentaron una frecuencia comparable en comparación al grupo VPH negativo. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa con todo el grupo VPH positivo o con los tipos virales por separado (p>0,05).

Tabla 3.13 Características histopatológicas de los tumores e infección por VPH de acuerdo al grado de amplificación de *c-myc* en adenomas y adenocarcinomas colorrectales.

		C-myc		Valor P
		Amplificado	Normal	
Adenomas				
Displasia	BG	6 (15,8%)	32(84,2%)	
	MG	4 (26,7%)	11(73,3%)	
	AG	7(21,9%)	25(78,1%)	0,63
Histología	Tubular	5(14,7%)	29(85,3%)	
	Mixto	4(36,4%)	7(63,6%)	
	Velloso	7 (18,5%)	31(81,5%)	0,28
ADN VPH	VPH +	1 (5,6%)	17 (9,4%)	
	VPH -	16 (23,8%)	51 (76,2%)	0,16
Adenocarcinomas				
Diferenciación	Diferenciado	9 (26,5%)	25 (73,5%)	
	Semidiferenciado	3 (11,2%)	24 (88,8%)	**0,004**
	Indiferenciado	10 (55,6%)	8 (44,4%)	
Diámetro (Media)		3,8 cm	5,0 cm	**0,05**
Ubicación	Proximal	20 (38,5%)	32(61,5%)	
	Distal	3 (10%)	27(90%)	**0,01**

Tabla 3.13 *continuación…*

AND VPH	ADN VPH (-)	11(21,2%)	41(78,8%)	0,2
	AND VPH (+)	12(36,4%)	21(63,6%)	
	VPH 16	5	11	0,8
	VPH 18	5	7	

3.4 Mutaciones de los codones 12 y 13 del proto-oncogén k-*ras*.

La prevalencia de mutaciones en los codones 12 y 13 fue analizada en casos y controles mediante la metodología de RFLP. En la figura 3.6 se observan los amplificados y cortes respectivos.

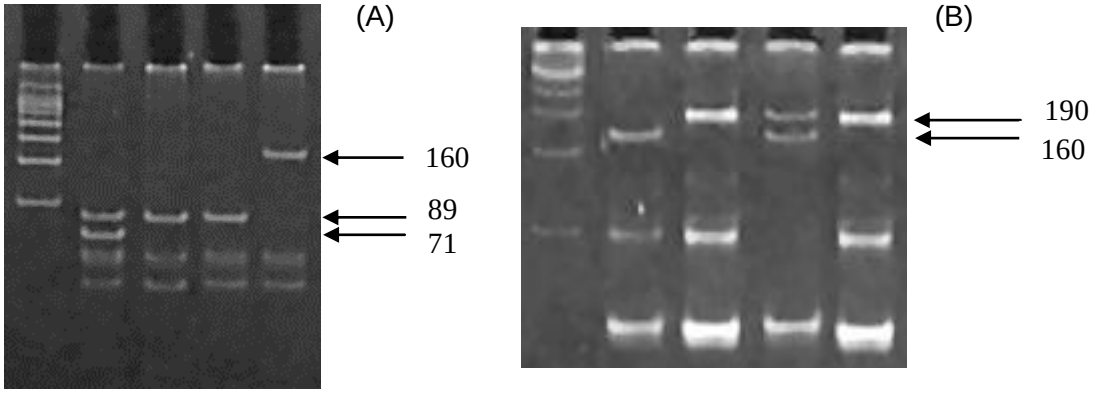


Figura 3.6 Cortes por enzima de restricción de los amplificados para los codones 12 y 13 del gen *k-ras*. (A) Codón 13; Calle 1: Marcador de peso molecular pGem; calle 2: muestra mutada; calle 3 y 4: normal; calle 5: muestra no digerida. (B) Codón 12; calle 1: Marcador de peso molecular pGem; calle 2: muestra normal; calle 3: muestra no digerida; calle 4: mutación en un alelo; calle 5: muestra con ambos alelos mutados.

El grupo de controles no presentó alteraciones en los codones 12 y 13 del gen *k-ras*. Las mutaciones en el grupo de adenomas fueron bajas: el 5,8% de los pólipos portaban mutaciones en el codón 12 y 3,5% en el codón 13. La relación con otras características patológicas se puede observar en la tabla 3.14. Las mutaciones en *k-ras* no estuvieron asociadas con la ubicación del adenoma o su histología. Sin embargo, las formaciones de histología vellosa tuvieron mayor número de mutaciones de *k-ras* que las tubulares, pero

esta correlación no se vio reflejada en los adenomas tubulo-vellosos, que no presentaron mutaciones (p=0,43). Una asociación positiva fue encontrada al estudiar el grado de displasia: mientras que el 100% de los pólipos mutados exhibieron displasias de moderado o alto grado, ninguno de los 38 adenomas con bajo grado de displasia tuvo mutaciones en *k-ras* (p=0,029). Es interesante resaltar que el ADN del Papilomavirus fue detectado solamente en los adenomas que presentaban *k-ras* normal para los codones 12 y 13, aunque esta diferencia no fue significativa (p=0,28).

Por otra parte, el grupo de los carcinomas presentaron mutaciones de k-*ras* en el 24% de los casos (18 mutados para el codón 12 y 3 para el codón 13, ninguna de las mutaciones estuvieron solapadas). De acuerdo a los resultados, no se registró asociación entre la activación de *k-ras* y características como ubicación, tamaño del tumor o diferenciación. La prevalencia específica por estadío se puede observar en la tabla 3.15. La relación entre las mutaciones en *k-ras* y la presencia de ADN del VPH no describe algún patrón diferencial (p=0,42).

Tabla 3.14 Distribución de las mutaciones de *k-ras* en adenomas colorrectales y presencia del ADN del VPH.

Adenomas		*K-ras*		Valor P
		Normal	Mutado	
Ubicación	Proximal	51 (87,9%)	7 (12,1%)	0,49
	Distal	23 (95,8%)	1 (4,2%)	
Displasia	Bajo	38 (100,0%)	-	**0,029**
	Moderado	13 (81,3%)	3 (18,8%)	
	Alto	27 (84,4%)	5 (15,6%)	
Histología	Tubular	31 (91,2%)	3 (8,8%)	0,43
	Mixto	11 (100,0%)	-	
	Velloso	34 (87,2%)	5 (12,8%)	
AND del VPH	VPH +	18 (100,0%)	-	0,28
	VPH -	60 (88,2%)	8 (11,8%)	

Coexistencia de mutaciones de K-ras y amplificación de c-myc.

También se realizó el análisis cruzado de las mutaciones de *k-ras* con la amplificación génica de *c-myc*. En este sentido, se detectaron mutaciones de *k-ras* en el 26% (6/23) de los tumores con *c-myc* amplificado y en el 24% (15/62) de las muestras no amplificadas. Estas diferencias no fueron significativas (p=0,8). Al separar el estado de c-*myc* en grupos de amplificación de alto y bajo grado tampoco existió una concordancia entre ambas alteraciones génicas. Al parecer, los dos eventos génicos se comportan independientemente en el presente grupo de adenocarcinomas colorrectales. En la tabla 3.16 se describen los resultados.

Tabla 3.15 Mutaciones en el oncogén *K-ras* en los diferentes estadíos del cáncer colorrectal.

Carcinomas		*K-ras*		Valor p
		Normal	Mutado	
TNM	I	22 (81,5%)	5 (18,5%)	0,38
	II	15 (71,4%)	6 (28,6%)	
	III	21 (80,8%)	5 (19,2%)	
	IV	7 (58,3%)	5 (41,7%)	
Ubicación	Proximal	39 (75,0%)	13 (25,0%)	0,80
	Distal	24 (77,4%)	7 (22,6%)	
Tamaño	Diámetro	4,69 cm	4,64 cm	0,43
Diferenciación	Indiferenciado	12 (66,7%)	6 (33,3%)	0,48
	Semidiferenciado	23 (82,1%)	5 (17,9%)	
	Diferenciado	26 (76,5%)	8 (23,5%)	
AND del VPH	VPH +	23 (69,7%)	10 (30,3%)	0,42
	VPH -	43 (79,6%)	11 (20,4%)	

Tabla 3.16 Relación entre alteraciones de *K-ras* y *c-myc* en los carcinomas estudiados.

		C-myc			Valor p
		Alto	Leve	Normal	
Adenomas					
K-ras	Normal	-	16 (20,5%)	62 (79,5%)	
	Mutado	-	1 (14,3%)	6 (85,7%)	0,69
Carcinomas					
K-ras	Normal	10 (15,6%)	7 (11%)	47 (73,4%)	
	Mutado	3 (14,3%)	3 (14,3%)	15 (71,4%)	0,91

3.8 Inestabilidad de Microsatélites (MSI)

Las 87 muestras provenientes de carcinomas colorrectales fueron amplificadas para los marcadores de inestabilidad de microsatélites, usando cebadores con marca fluorescente en el extremo 5'. Los amplificados se corrieron en el sistema MegaBace® (Amersham Biosciences, USA). Se utilizó el programa MegaBACE Fragment Profiler 2.1 para el procesamiento de datos. En la figura 3.7 se copiaron los picos de fluorescencia de los marcadores bajo estudio tomados de muestras normales.

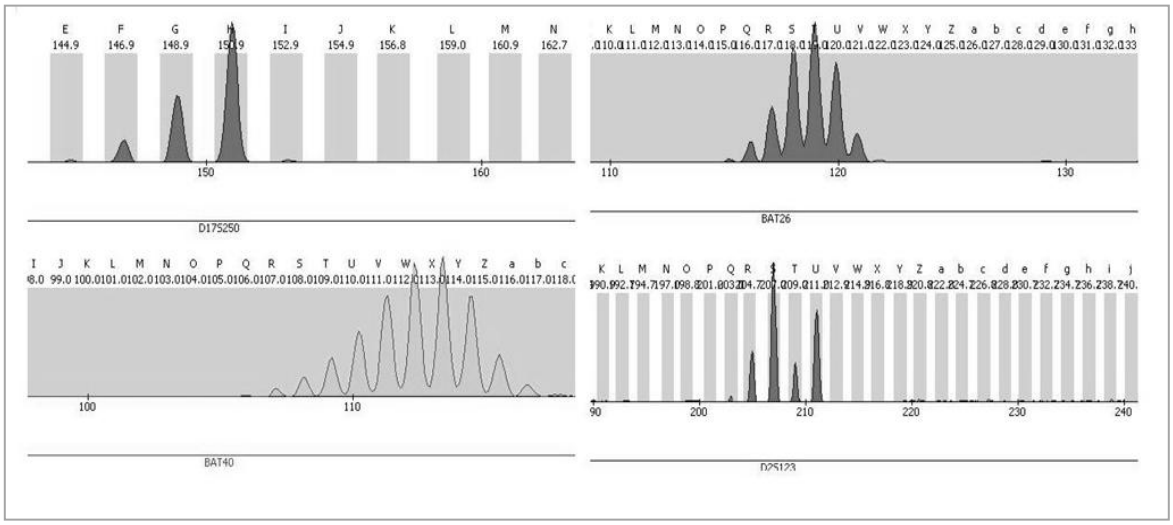


Figura 3.7 Electroferogramas de alelos normales de los marcadores D17S250 (arriba a la izquierda), BAT26 (arriba a la derecha), BAT40 (abajo a la izquierda), y D2S123 (abajo a la derecha.

Todos los marcadores fueron exitosamente amplificados, excepto los cebadores de BAT 34C4, que tuvieron una efectividad muy baja (<10% de las muestras), por lo tanto no pudieron incluirse en los resultados.

Bat26 es un marcador muy confiable de inestabilidad genómica, tanto en especificidad como en sensibilidad. De acuerdo a la literatura, BAT26 es cuasi-monomórfico, es decir, sin variación dentro de la población. La variación inter-individual reportada es de no más de 1 o 2 bases alrededor del alelo más frecuente (120 pb). En poblaciones caucásicas se ha determinado que 1 en 10.000 individuos poseen algún polimorfismo en la línea germinal que difiere de este patrón, por lo que se deduce que puede utilizarse confiablemente sin la presencia de tejido control (Planck *et al*., 2003). Asimismo, las variaciones de amplia longitud de los alelos del marcador BAT40 (de 6 a 16 nucleótidos del alelo más frecuente) son raras, y también pueden utilizarse como marcador de MSI. En ambos casos, se clasifica al tumor como inestable si uno de los dos marcadores presenta más de dos alelos.

Las frecuencias de los dos marcadores mononucleotídicos analizados se encuentran detalladas en la tabla 3.17, donde se exponen los resultados de BAT26 y BAT40, por separado y conjuntamente. Se encontraron 8 tumores que presentaron inestabilidad solamente para el marcador BAT26 y 9 para el marcador BAT40. El 9% del total de la población (n=8) de casos fue inestable para ambos marcadores.

Tabla 3.17 Resultados del análisis de inestabilidad de microsatélites (MSI) de los marcadores BAT26 y BAT40 en los 87 carcinomas.

Característica	BAT26	BAT40	BAT26 y BAT40
Estables	71 (82%)	70 (81%)	79 (91%)
Inestables	16 (18%)	17 (19%)	8 (9%)

La frecuencia relativa de los alelos de BAT26 y BAT40 pueden observarse en los diagramas de barras de los gráficos 3.7 y 3.8, respectivamente. Por otra parte, en la figura 3.8 se exhibe un ejemplo de inestabilidad de microsatélites para ambos marcadores, tomado de un tumor (cód. 2997) MSI+.

Para los cinco tumores en que se disponían de muestras control no-neoplásicas se realizó el análisis de MSI para todos los marcadores (BAT26, BAT40, D17S250 y D2S123). Sin embargo, no existieron diferencias entre los alelos de los tumores y muestras normales correspondientes. La tabla 3.18 describe los alelos encontrados en dichas muestras.

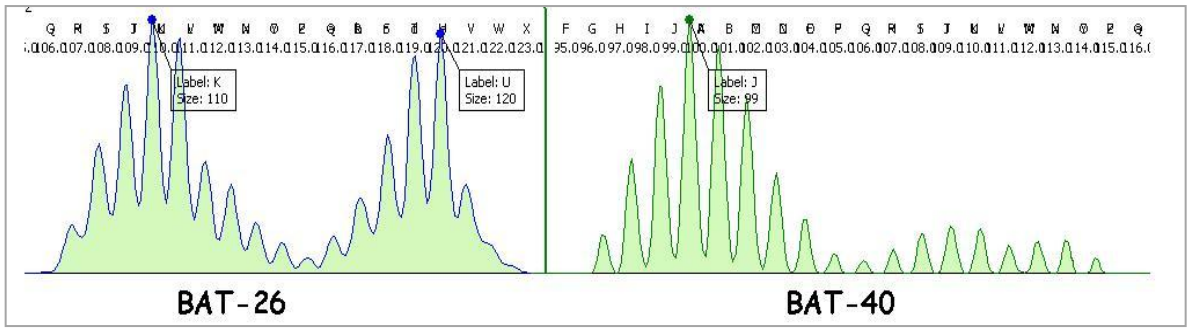


Figura 3.8 Análisis de Inestabilidad de Microsatélites (MSI) de un adenocarcinoma (código 2997), mostrando inestabilidad en los marcadores BAT26 y BAT40; en el recuadro, "Size" describe los tamaños en pares de bases.

Tabla 3.18 Alelos de los marcadores BAT26, BAT40, D17S250 y D2S123 en los cinco carcinomas pareados con tejidos controles. No hubo diferencias en los alelos.

	BAT26 tam. (n)	BAT40 tam. (n)	D17S250 tam. (n)	D2S123 tam. (n)
Tumores con muestras normales pareadas (n=5)	120pb (10)	109pb (6) 108pb (1) 107pb (3)	157pb (1) 155pb (5) 153pb (1) 150pb (1) 143pb (1) 141pb (1)	227pb (4) 209pb (1) 213pb (1) 211pb (4)

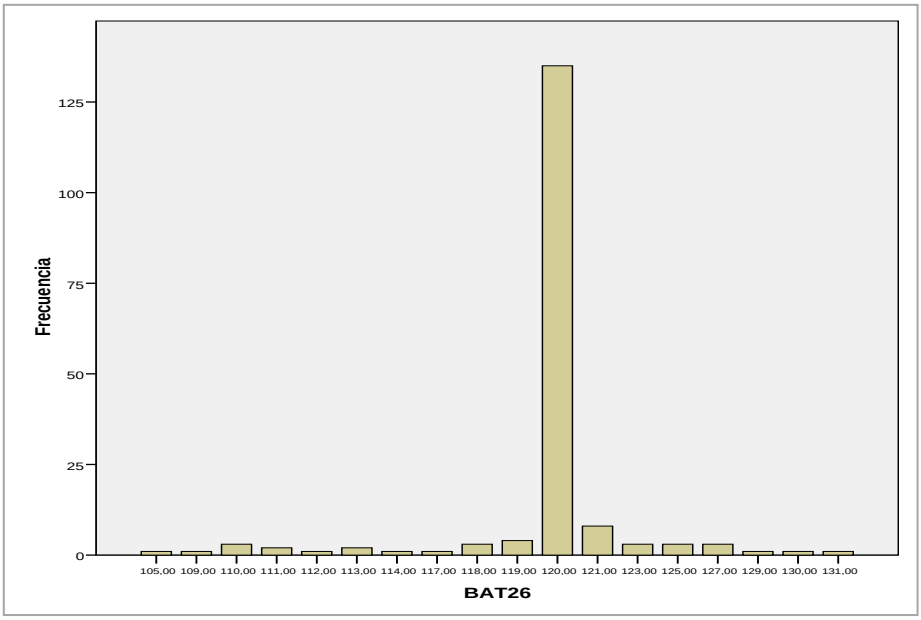


Gráfico 3.7 Distribución de los alelos del marcador BAT26 en el grupo de carcinomas.

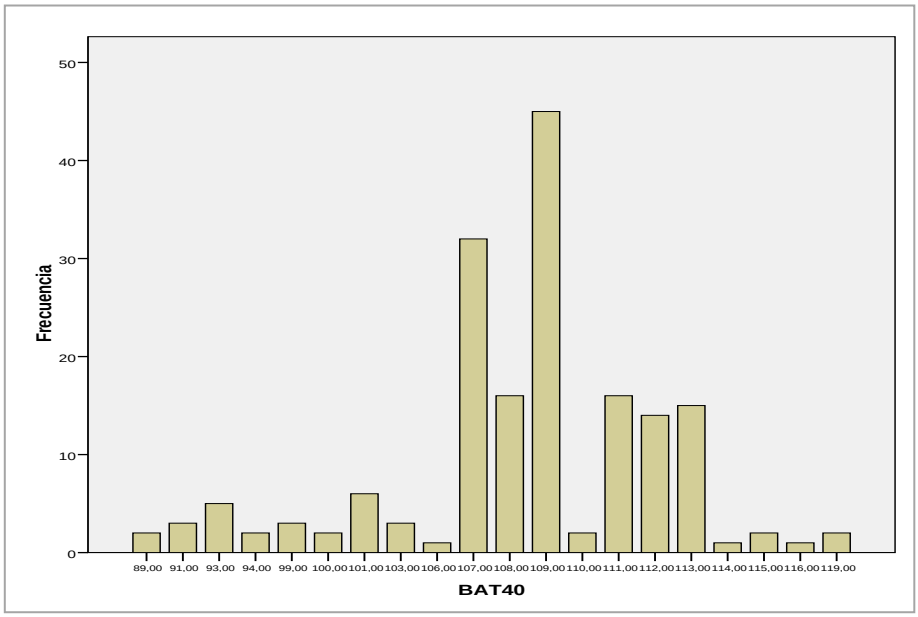


Gráfico 3.8 Distribución de los alelos del marcador BAT40 en el grupo de carcinomas.

Se ha reportado que los tumores colorrectales esporádicos que poseen inestabilidad de microsatélites presentan diferencias con los carcinomas sin MSI, y que se asemejan a los de los pacientes con HNPCC. Entre las características distintivas se destacan: Mayor prevalencia de MSI en tumores del colon derecho, metafases frecuentemente diploides, histología mucoso secretante y pobremente diferenciados. También se caracterizan por tener infiltrados linfocíticos comparables a los de la colitis ulcerosa de Crohn, y respecto al estadío del cáncer colorrectal son en general tumores grandes, por ejemplo en T3, pero menos agresivos, ya que tienen menos involucramiento de los nódulos linfáticos (N0) y recurrencia reducida de metástasis (M0) (Söreide *et al*., 2006; Ilyas *et al*., 1999).

La relación entre las características clínico-patológicas y el estatus de MSI se resumen en la tabla 3.19. De acuerdo a lo reportado, la mayoría de los tumores con inestabilidad fueron de estadío I (n=4), donde no hay infiltración en los nódulos o metástasis, 2 casos en estadío II, y uno en estadío III y IV. Sin embargo, no hubo una distribución preferencial en la región proximal, detectándose mayor frecuencia relativa en el colon distal. Las mujeres fueron más afectadas con los tumores RER+ que los hombres (11,4% versus 7%). También hubo una pequeña tendencia de inestabilidad en tumores indiferenciados o semi-diferenciados.

Es interesante resaltar que de los 8 tumores que presentaron inestabilidad de microsatélites solamente 1 presentó mutación en el gen *k-ras* y 1 amplificación génica de *c-myc de alto grado*. Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, la ausencia de solapamiento entre alteraciones genéticas e inestabilidad se hizo más evidente cuando se comparó la inestabilidad de los marcadores BAT26 y BAT40 por separado, como se exhibe en la tabla 3.20. Se observan mayores prevalencias de inestabilidad en tumores sin alteraciones genéticas. La excepción la constituyó la amplificación de alto grado de c-*myc* con BAT26. Una descripción de estos resultados también puede observarse en el gráfico 3.9.

Finalmente, la relación de los tumores MSI+ de acuerdo a la infección por VPH no demostró una tendencia significativa. Las prevalencias fueron aproximadamente iguales en ambos grupos, detectándose 4 tumores RER+ en el grupo VPH positivo y 4 en el negativo (Tabla 3.19).

Tabla 3.19 Resultados del análisis de inestabilidad de microsatélites de acuerdo a las características clínico-patológicas de los tumores y presencia de ADN del VPH.

		Análisis de inestabilidad de microsatélites		
		Estables	Inestables	
Sexo	Femenino	39 (88,6%)	5 (11,4%)	0,70
	Masculino	40 (93%)	3 (7%)	
TNM	I	23 (85,2%)	4 (14,8%)	
	II	19 (90,5%)	2 (9,5%)	
	III	25 (96,2%)	1 (3,8%)	
	IV	11 (91,7%)	1 (8,3%)	
	Sin especificar	1 (100%)	-	
Ubicación anatómica	Colon proximal	48 (92,3%)	4 (7,7%)	0,68
	Colon distal	27 (87,1%)	4 (12,9%)	
Grado de diferenciación	Diferenciado	31 (91,2%)	3 (8,8%)	0,89
	Semidiferenciado	16 (88,9%)	2 (11,1%)	
	Indiferenciado	26 (92,9%)	2 (7,1%)	
Estatus de *K-ras*	Normal	59 (89,4%)	7 (10,6%)	0,70
	Mutado	20 (95,2%)	1 (4,8%)	
Estatus de *c-myc*	Normal	57 (91,9%)	5 (8,1%)	0,60
	Amplificación baja	8 (80,0%)	2 (20,0%)	
	Amplificación alta	12 (92,3%)	1 (7,7%)	
ADN del VPH	VPH+	29 (87,9%)	4 (12,1%)	0,71
	VPH-	50 (92,6%)	4 (7,4%)	

Tabla 3.20 Relación entre inestabilidad de los marcadores individuales BAT26 y BAT40 y activación de los oncogenes *c-myc* y *k-ras*.

		BAT26			BAT40		
		Estable	Inestable	Valor P	Estable	Inestable	Valor P
c-*myc*	Norm	59 (81,9%)	13 (18,1%)		56 (77,8%)	16 (22,2%)	
	amp	10 (76,9%)	3 (23,1%)	0,6	12 (92,3%)	1 (7,7%)	0,2
k-*ras*	Norm	51 (77,3%)	15 (22,7%)		52 (78,8%)	14 (21,2%)	
	Mut	20 (95,2%)	1 (4,8%)	0,06	18 85,7%	3 (14,3%)	0,4

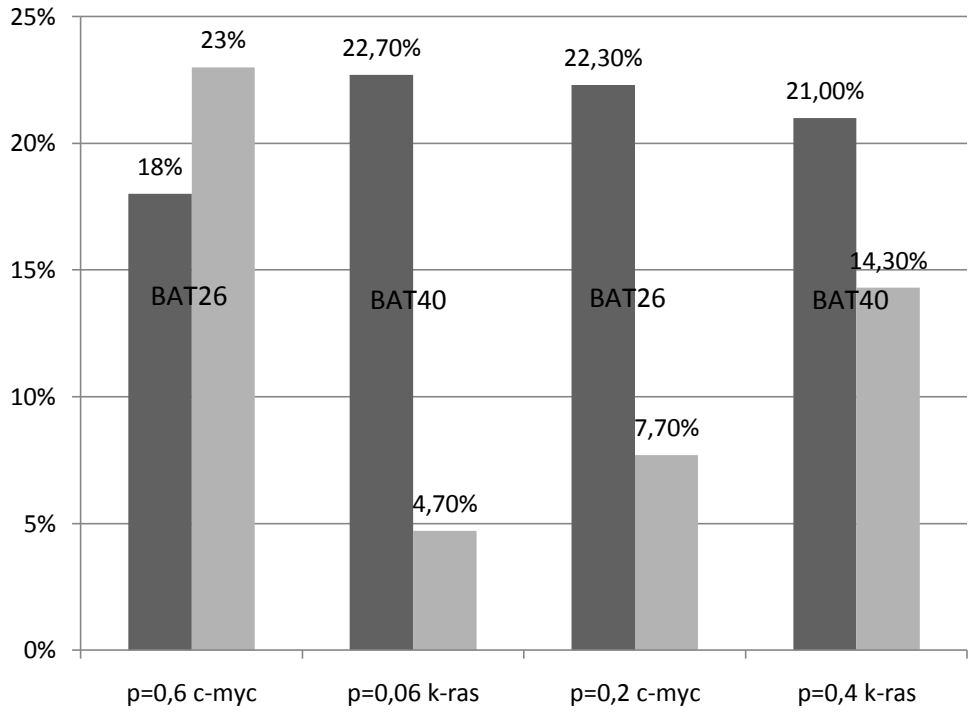


Gráfico 3.9. Frecuencias de inestabilidad de los marcadores BAT26 y BAT40 de acuerdo al estado de los oncogenes k-*ras* y c-*myc*. Las barras representan los porcentajes de muestras con inestabilidad tanto para el marcador específico en grupos normales (barras oscuras), como en mutados o amplificados (barras claras).

3.7 Polimorfismo del codón 72 del gen oncosupresor *p53*

La genotipificación de *p53* se realizó mediante tecnología de pirosecuenciación. Los diagramas de los picos de luminiscencia obtenidos a partir de los tres genotipos se pueden observar en la figura 3.9. El dispositivo secuencia un tramo corto de ADN siguiente al polimorfismo para verificar la secuencia y utilizarla como control.

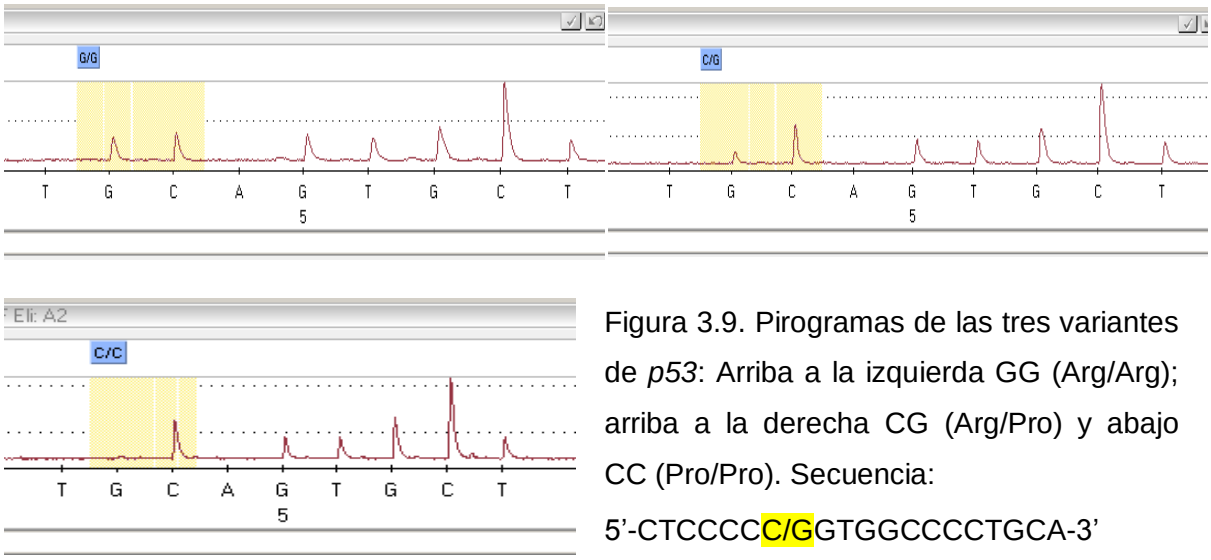


Figura 3.9. Pirogramas de las tres variantes de *p53*: Arriba a la izquierda GG (Arg/Arg); arriba a la derecha CG (Arg/Pro) y abajo CC (Pro/Pro). Secuencia: 5'-CTCCCCC/GGTGGCCCCTGCA-3'

En el grupo normal 52,1% de los individuos fueron homocigotas para el alelo Arginina del codón 72 de *p53* (p53Arg/Arg); el 42,6% heterocigotas p53Arg/Pro y el 5,3% homocigotas p53Pro/Pro. Las frecuencias alélicas resultantes fueron de: 0,74 para la variante arginina y 0,26 para la prolina. Las frecuencias génicas y genotípicas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (χ^2<0,01; P=0,99).

Las frecuencias genotípicas observadas en los pacientes fueron de 51,3% para el genotipo p53Arg/Arg, 44% para p53Arg/Pro y 4,7% para p53Pro/Pro. Las frecuencias alélicas fueron muy similares al grupo de controles, con 0,7 para el alelo arginina y 0,3

para la prolina. En este grupo, se encontraron tres muestras que fueron negativas para la amplificación de *p53*. El grupo de adenomas tuvo las prevalencias más alejadas del grupo control, con 44,4% para p53Arg/Arg, 51,4% para p53Arg/Pro y 4,2% para p53Pro/Pro. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (p=0,5).

Tabla 3.21 Distribución de los genotipos de *p53* en casos y controles y prueba estadística de χ^2 para el efecto combinado de p53Arg/Arg+p53Arg/Pro versus p53Pro/Pro.

	P53			Valor p
	Pro/Pro	Arg/Pro	Arg/Arg	
Controles	5 (5,3%)	40 (42,6%)	49 (52,1%)	-
Carcinomas*	4 (4,7%)	37 (44%)	43 (51,3%)	p=0,7
Adenomas	3 (4,2%)	37 (51,4%)	32 (44,4%)	p=0,6

* 3 datos perdidos

En la tabla 3.21 se observan las prevalencias de los genotipos de *p53* en los tres grupos analizados. El riesgo relativo otorgado por los genotipos con algún alelo de p53Arg (p53Arg/Arg y p53Arg/Pro) respecto a p53Pro/Pro no fue significativo para los casos (1,12; IC=0,29-4,3; p>0,05) o los adenomas (1,29; IC= 0,29-5,5; p>0,05). Los riesgos para cada genotipo en particular se exhiben en la tabla 3.22.

Tabla 3.22 Riesgos relativos otorgados por los genotipos de *p53* para el desarrollo de cáncer colorrectal.

	Controles	Carcinomas	OR ($IC_{95\%}$); valor p	Adenomas	OR ($IC_{95\%}$); valor p
Pro/Pro	5	4	1 (ref)	3	1(ref)
Arg/Pro	40	37	1,156 (0,288-4,636) p=0,83	37	1,542 (0,344-6,906) p=0,5
Arg/Arg	49	43	1,097 (0,277-4,348) p=0,89	32	1,088 (0,243-4,874) p=0,9
Arg/Pro + Arg/Arg	89	80	1,12 (0,29-4,339) p=0,73	69	1,29 (0,29-5,5) p=0,73

Posteriormente se comparó la prevalencia relativa de los tipos virales del VPH según los genotipos del individuo. Los tumores con el genotipo p53Arg/Arg no tuvieron una diferencia significativa en la frecuencia de ADN del VPH en controles, carcinomas o adenomas (p>0,05). La distribución de los genotipos en las muestras VPH positivas se describe en el gráfico 3.10.

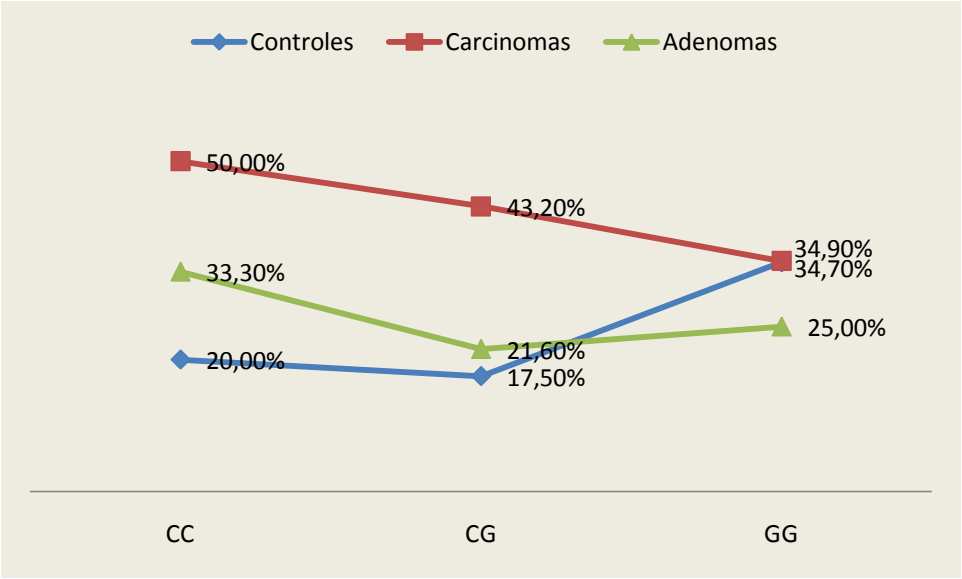


Gráfico 3.10 Porcentaje de los genotipos del polimorfismo del codón 72 del gen *p53* en las muestras VPH positivas de controles (azul), adenomas (verde) y Carcinomas (rojo).

La edad de diagnóstico de la enfermedad en el grupo de los carcinomas fue de 61 años. Al separar *p53* según genotipos, la edad promedio fue de 62,9 años para el alelo p53Arg/Arg; 60,5 años para p53Arg/Pro y 66 años para p53Pro/Pro. Se realizó un análisis de Kaplan-Meyer para comprobar si la edad de diagnóstico fue estadísticamente diferente entre estos tres genotipos.

La prueba de igualdad de distribuciones de inicio de enfermedad para los diferentes genotipos de *p53* no fue significativo en la comparación global (log rank p=0,57). El análisis está representado en el gráfico 3.11. Además, se analizó si una determinada

combinación de genotipos difería significativamente en la edad de diagnóstico de cáncer colorrectal, pero la comparación por pares tampoco resultó significativa (Tabla 3.23).

Tabla 3.23- Análisis de Mantel-Cox de a pares de genotipos para el inicio de cáncer colorrectal. El nucleótido G corresponde al alelo arginina, y C al alelo prolina.

	P53	*CC*		*CG*		*GG*	
		X^2	*Valor P*	*X^2*	*Valor P*	*X^2*	*Valor P*
Log Rank (Mantel-Cox)	*CC*	-	-	,154	,695	,015	,903
	CG	,154	,695	-	-	1,048	,306
	GG	,015	,903	1,048	,306	-	-

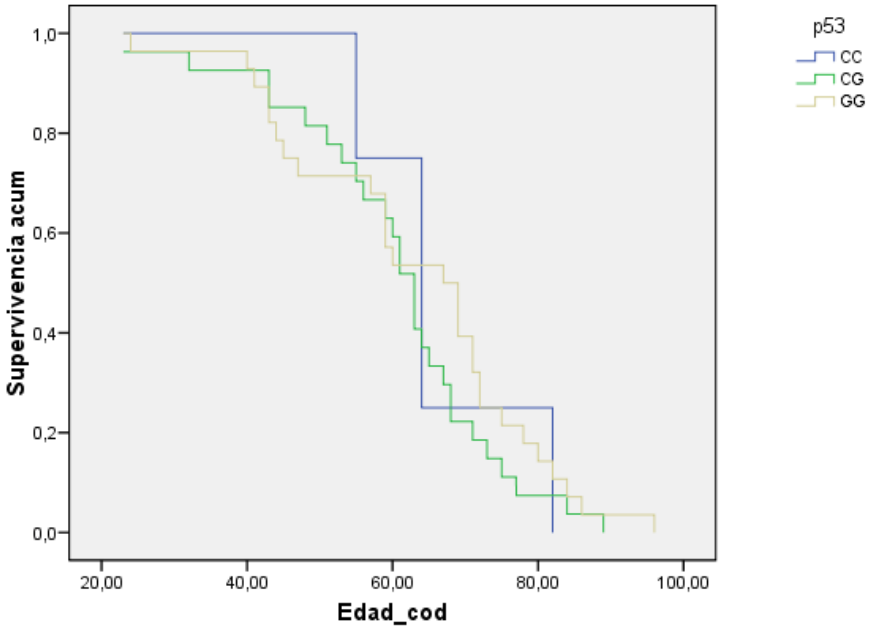


Gráfico 3.11 Análisis de supervivencia de Kaplan Meyer de los genotipos de *p53* de acuerdo a la edad de diagnóstico de cáncer colorrectal (χ^2=1,1; gl=2; p=0,57). El nucleótido G corresponde al alelo arginina, y C al alelo prolina.

3.8 Polimorfismo del codón 462 del gen *RNASEL*

La genotipificación del codón 462 del gen *RNASEL* también fue realizada con tecnología de pirosecuenciación. El perfil de picos de luminiscencia para cada genotipo individual obtenidos en el dispositivo se encuentra graficado en la figura 3.10. El genotipo C/C corresponde a la variante RnArg/Arg, el genotipo T/C a RnArg/Gln y T/T a RnGln/Gln.

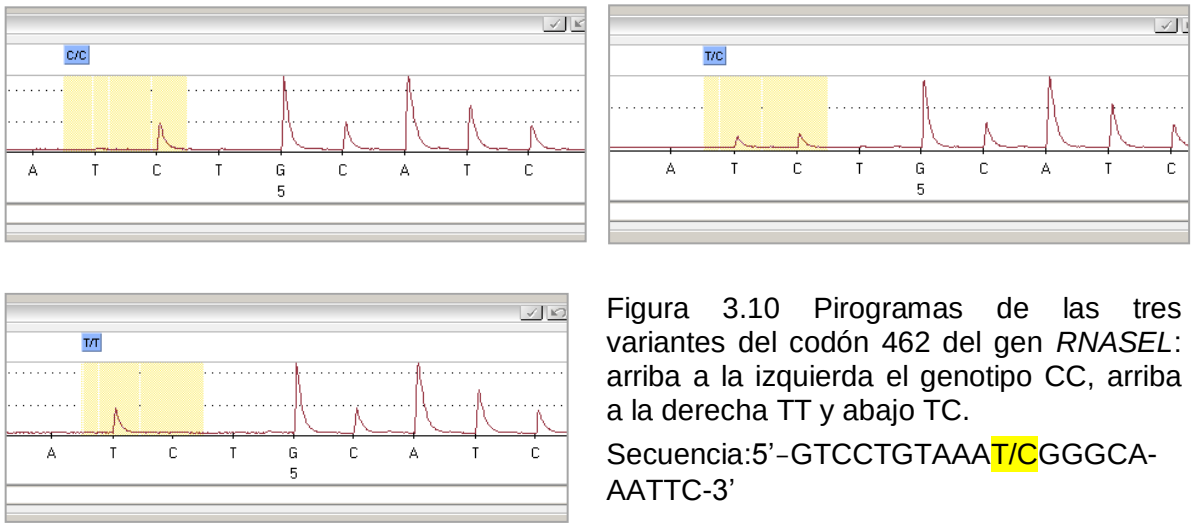


Figura 3.10 Pirogramas de las tres variantes del codón 462 del gen *RNASEL*: arriba a la izquierda el genotipo CC, arriba a la derecha TT y abajo TC.

Secuencia:5'-GTCCTGTAAAT/CGGGCA-AATTC-3'

En el grupo normal 40,4% de los individuos resultaron homocigotas para el genotipo RnArg/Arg; el 42,6% heterocigotos RnArg/Gln y el 17% restante homocigotas RnGln/Gln. Las frecuencias alélicas fueron de 0,62 para la variante arginina y de 0,38 para glutamina. De acuerdo a los genotipos observados, los controles estaban en el equilibrio de Hardy Weinberg.

Las frecuencias genotípicas observadas en los pacientes con carcinoma colorrectal fueron de 46% para RnArg/Arg, 38,8% para RnArg/Gln y 15,3% para RnGln/Gln. Estas valores determinaron unas frecuencias alélicas de 0,65 para el alelo arginina y 0,35 para el alelo glutamina. Las frecuencias genotípicas de los adenomas, al igual que en el caso de *p53*, presentaron una leve diferencia, aunque esta no fue significativa. En la tabla 3.24 se describe la distribución de este polimorfismo en los diferentes grupos.

Tabla 3.24 Distribución del polimorfismo 462 del gen *RNASEL* en casos y controles.

	Polimorfismo de *RNASEL*			X^2 (valor P)
	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	
Controles	38 (40,4%)	40 (42,6%)	16 (17,0%)	
Carcinomas[A]	39 (45,9%)	33 (38,8%)	13 (15,3%)	0,96 (0,6)
Adenomas[B]	27 (38,0%)	35 (49,3%)	9 (12,7%)	0,97(0,6)

[A] 2 casos perdidos; [B] 3 casos perdidos

Para comparar el riesgo relativo otorgado por cada genotipo se compararon las frecuencias de los genotipos por separado y en conjunto contra el genotipo de mayor frecuencia, en este caso el genotipo CC (RnArg/Arg). Los resultados para los adenocarcinomas colorrectales como para el grupo de adenomas del colon pueden observarse en la tabla 3.25. No hubo evidencia de riesgo incrementado de cancer colorrectal en relación al polimorfismo 462 de *RNASEL*, cuando se compararon casos y controles.

El siguiente paso fue analizar la relación entre infección por VPH y los genotipos de *RNASEL*. La distribución relativa de los genotipos se observan en el gráfico 3.12. No hubieron diferencias significativas entre los grupos bajo estudio en relación a la infección por VPH y genotipos de *RNASEL* (p>0,05).

Tabla 3.25 Cuadro de riesgos relativos otorgados por los diferentes genotipos del polimorfismo del codon 462 del gen *RNASEL* en las neoplasias colorrectales.

RNASEL	Controles	Carcinomas	OR ($IC_{95\%}$); valor p	Adenomas	OR ($IC_{95\%}$); valor p
Arg/Arg	38	39	1(referencia)	27	1(referencia)
Arg/Gln	40	33	0,804 (0,423-1,527) p=0,5	35	1,231 (0,630-2,407) p=0,5
Gln/Gln	16	13	0,792 (0,336-1,866) p=0,5	9	0,792 (0,305-2,055) p=0,6
Arg/Gln + Gln/Gln	56	46	0,8 (0,44-1,44) P=0,4	44	1,106 (0,588-2,080) p=0,7

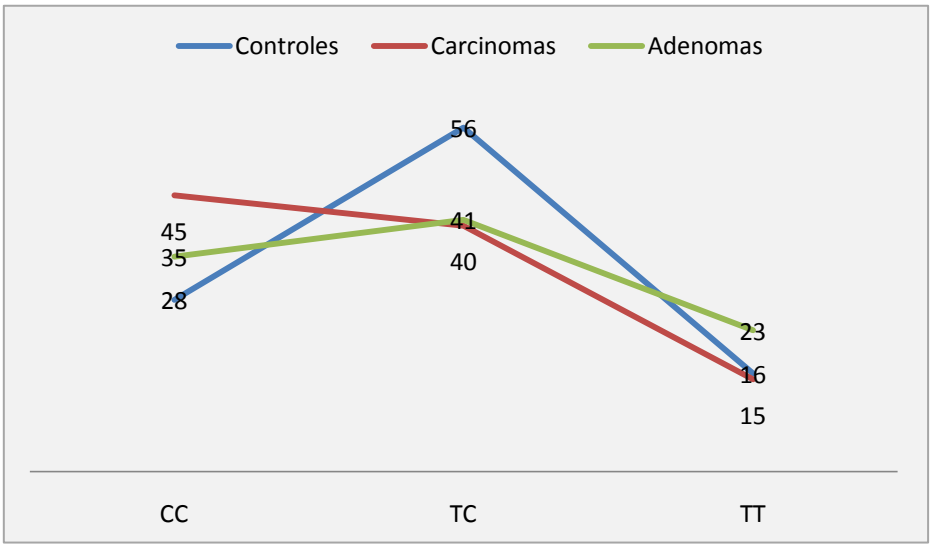


Gráfico 3.12 Distribución de los genotipos de *RNASEL* en las muestras positivas para ADN del VPH en controles, adenomas y carcinomas.

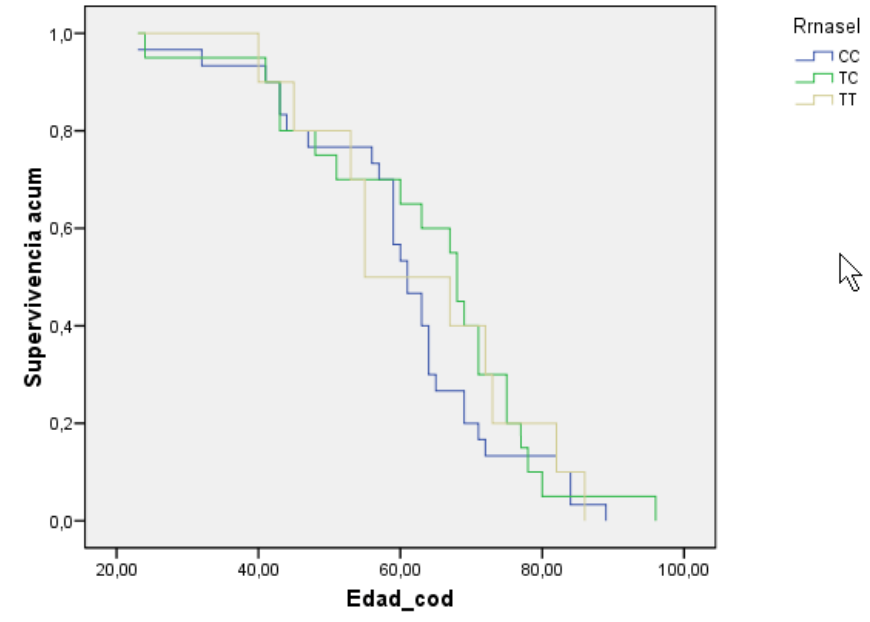


Gráfico 3.13 Análisis de Kaplan-Meyer de los genotipos de *RNASEL* para la edad de diagnóstico de cáncer colorrectal. El genotipo CC corresponde a Arg/Arg, TC a Arg/Gln, TT a Gln/Gln.

Para el polimorfismo del codón 462 del gen *RNASEL*, la edad de inicio de la enfermedad fue más homogénea en promedio que la otorgada por el polimorfismo de *p53*: 60,2 años para RnC/C, 63,4 años para RnTC/CC, y 62,8 años para RnT/T. La comparación global de la probabilidad de inicio de enfermedad por cada genotipo arrojó que no existen diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo al test de Mantel-Cox (χ^2=0,8; p=0,64). El análisis de Kaplan-Meyer se encuentra graficado en 3.13.

Además de comparar las medias de las edades de los grupos, se compararon los grupos de genotipos de a pares para comprobar si una determinada combinación de genotipos difería significativamente en la edad de inicio del cáncer colorrectal. Los resultados no fueron significativos para ninguno de los subgrupos analizados y se encuentran detallados en la tabla 3.26.

Tabla 3.26. Análisis de Mantel-Cox de a pares de genotipos para el inicio de cáncer colorrectal.

	RNASEL	*CC*		*CG*		*GG*	
		X^2	*Valor P*	*X^2*	*Valor P*	*X^2*	*Valor P*
Log Rank (Mantel-Cox)	*CC*	-	-	,907	,341	,158	,691
	TC	,907	,341	-	-	,000	,997
	TT	,158	,691	,000	,997	-	-

3.9 Interacciones inter-alélicas entre *p53* y *RNASEL*

El Consorcio Alemán de HNPCC ha reportado que en el cáncer colorrectal hereditario la combinación de determinados genotipos de *p53* (codón 72) y *RNASEL* (codón 462) estarían asociados con una edad de inicio de la enfermedad más temprana. Es por esta razón que se ha estudiado la posible interacción entre ambos genes.

Para este análisis se recurrió a la metodología de Reducción de la Dimensionalidad Factorial, o MDR (del inglés *Multifactor Dimensionality Reduction*), que permite analizar dichas interacciones de una manera no-paramétrica.

Para este tipo de estudio se ingresan todas las combinaciones de genotipos de *p53* y *RNASEL* y se calcula la relación entre controles y casos. Si no existe interacción entre los dos genes las combinaciones se distribuyen independientemente, y la probabilidad de encontrar un casillero con mayor número de casos que controles es igual a la probabilidad de que salga cara o cruz al tirar una moneda (TA=0,5). Para este conjunto de datos, el estadístico de la interacción de los genotipos *p53* y *RNASEL* fue no significativo (TA=0,45; p=0,1). La consistencia del análisis fue óptima (Consistencia de validación cruzada= 10/10). Las estadísticas descriptivas de la población se pueden apreciar en el gráfico 3.14.

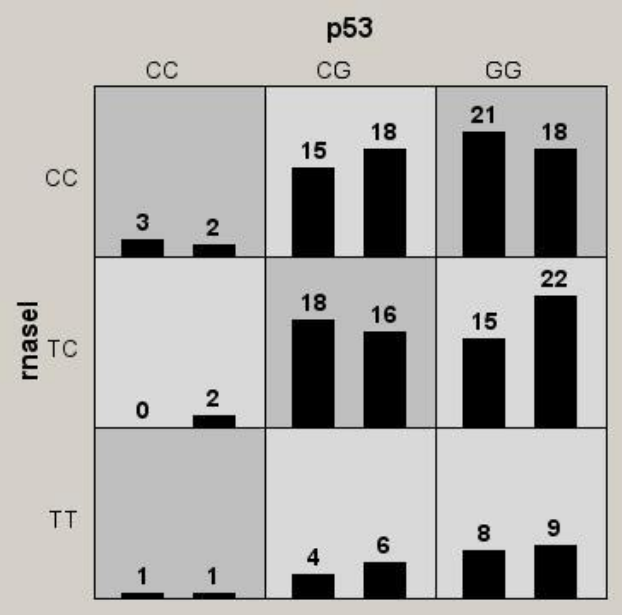


Gráfico 3.14 Resultados del análisis de MDR para las interacciones alélicas de *p53* y *RNASEL* en el cáncer colorrectal. Dentro de cada cuadro las barras izquierdas son los casos y las derechas son controles. El valor sobre las barras describen el número de individuos. Los cuadros grises oscuros son considerados combinaciones genotípicas de "alto riesgo", los cuadros de gris claro como de "bajo riesgo".

Discusión y Conclusiones

4.1 Cáncer colorrectal

Anualmente se diagnostican aproximadamente 1 millón de casos de cáncer colorrectal en todo el mundo, abarcando cerca del 10% de todos los tipos de cáncer (Ferlay *et al*., 2004). La tumorigénesis colorrectal se desarrolla como un proceso de múltiples pasos, caracterizados por un orden secuencial de alteraciones genéticas; paralelamente, tiene lugar la evolución de la alteración histológica adenoma-cáncer. Se han propuesto numerosas hipótesis respecto a la etiología del cáncer de colon, pero las causas y los mecanismos genuinos no han sido enteramente dilucidados. Se ha establecido que ciertas formas de cáncer colorrectal se encuentran fuertemente asociadas a la herencia de mutaciones génicas simples, aunque explican solamente entre el 3 y el 10% de los casos (Kaz y Brentnall, 2006).

Desde mediados del siglo pasado los estudios ecológicos y de asociación han reportado la relación entre la variación de las tasas de incidencia del cáncer colorrectal y la distribución geográfica. Los estudios de migración han sido particularmente útiles en resaltar que las diferencias observadas estarían muy infuenciadas por componentes ambientales. En este sentido, las poblaciones que migran desde países de bajo riesgo de cáncer de colon a otros de alto riesgo adquieren las tasas de enfermedad del país receptor en un lapso no mayor a dos o tres generaciones, o aún en la misma generación (Haenszel, 1961; Wei *et al*., 2004). Como ejemplo, la adición del estilo de vida occidentalizado en Japón ha conducido a un aumento en la incidencia del cáncer de colon en un 44% en hombres y 40% en mujeres. Desafortunadamente, los mismos trabajos respaldan que en regiones de alta y baja incidencia estarían actuando factores adicionales desconocidos (Yiu *et al.,* 2004; Sung *et al*., 2005).

Histológicamente, el cáncer colorrectal se origina en las células epiteliales que tapizan internamente el colon y recto. Estas poseen una tasa de replicación relativamente alta, con un reemplazo estimado en 10^{10} células/día. Inicialmente se pensó que la alta tasa de reemplazo celular sería un contribuyente primordial a la vulnerabilidad del epitelio del

colon y recto, estimulando la mutación y consecuente carcinogénesis. Sin embargo, otras regiones del tracto gastrointestinal poseen tasas de recambio muy altas, como el intestino delgado, pero la formación de carcinomas en este sitio es infrecuente. El reemplazo epitelial, tomado como factor único, tampoco explica el efecto variable que tienen las tasas de cáncer de colon en poblaciones migrantes.

Una vez que las mutaciones se acumulan, la morfología de las células cambia, pudiendo ocasionar hiper-proliferación de las células anormales. El crecimiento celular resulta en una protuberancia de la mucosa, denominada pólipo. De acuerdo a su histología los pólipos pueden ser adenomatosos o hiperplásicos. La evidencia sostiene que la mayoría de los casos de cáncer colorrectal siguen la vía histológica adenoma-carcinoma. En esta teoría, el grado de displasia del adenoma aumenta lentamente, pudiendo desarrollar zonas puntuales de carcinoma *in situ* y posteriormente carcinoma invasor (Muto *et al.,* 1975). Sin embargo, solamente un porcentaje pequeño de adenomas progresan a cáncer (debido a la dificultad de acceso al colon, conocer el riesgo relativo que poseen los adenomas en la población general es dificultoso) (Ilyas *et al.,* 1999). También se ha postulado que los carcinomas pueden surgir de los denominados pólipos hiperplásicos (Jeevaratnam *et al*., 1996), surgir *de novo* de la mucosa plana sin pólipos (Kuramoto *et al*., 1988; Yokota *et al*., 1995), o bien luego de varios años de alguna enfermedad ulcerosa de colon (como la enfermedad de Crohn), o enfermedades inflamatorias crónicas (Gazelle *et al.,* 2000).

El intestino humano contiene en su interior un medio muy rico en nutrientes, el cual es especialmente conveniente para el crecimiento microbiano. En el colon conviven más de 500 especies de bacterias diferentes, contando solamente las cultivables, siendo el sitio anatómico con mayor concentración de microorganismos. Además de las bacterias, el colon humano está expuesto a virus patogénicos y no patogénicos. Normalmente, las bacterias que se encuentran en el colon tienen una relación simbiótica con su huésped y pueden actuar como una barrera protectora frente a los patógenos. Sin embargo, algunos microbios que son encontrados normalmente, o incidentalmente, son patogénicos o potencialmente agresivos si atraviesan la barrera de la mucosa.

Dado el creciente interés que se está dando a la infección y al cáncer, muchas investigaciones han comenzado a considerar la importancia de diferentes agentes infecciosos en el cáncer colorrectal. En este sentido, algunos trabajos han reportado la presencia del virus del Papiloma humano en la mucosa normal y tumores colorrectales. Sin embargo, la presencia del VPH en la mucosa del colon es controversial, principalmente por el tropismo de este virus al epitelio estratificado. Otros agentes infecciosos a los que comúnmente se les asocia con el cáncer colorrectal incluyen a *Helicobacter pylori* (revisado en Burnett-Hartman *et al.,* 2008), *Straptococcus bovis* (Waisberg *et al.,* 2002; Gold *et al.,* 2004) y los tipos del virus JCV (Theodoropoulos *et al.,* 2005; Goel *et al.,* 2006). Entre estos últimos, se ha sugerido un papel en cáncer colorrectal para los virus BK (BKV), virus SV40, Washington University polyomavirus (WUV), Karolinska Institute polyomavirus (KIV) y Merkel cell carcinoma polyomavirus (MCV), el citomegalovirus humano (HCMV) y el Epstein-Barr virus (EBV) (Laghi *et al.,* 1999*;* Harkins *et al*., 2002; Liu *et al.,* 2003; Millitelo *et al.,* 2009).

4.2 Detección del ADN del VPH en las muestras de colon y recto

En este estudio, la prevalencia total de la infección por el Papilomavirus humano fue del 29% de las muestras, de las cuales la mayoría correspondieron a tipos virales de alto riesgo oncogénico. El grupo de pacientes con adenocarcinomas colorrectales presentaron el 38% de infección y los controles el 26,6%. Los resultados indican que la presencia de VPH es un hecho frecuente en la mucosa del colon, aunque no se sabe si funcionalmente poseen un papel en el fenotipo maligno de los tumores colorrectales. La necesidad de realizar PCR anidada en condiciones de baja estringencia para obtener los positivos indicaría que la infección cursaría con una baja carga viral. El virus también se halla presente en las lesiones pre-malignas colónicas, los adenomas o pólipos, que dieron una prevalencia cercana al 20% (Tabla 3.1).

El porcentaje de muestras positivas para el VPH tuvo una distribución homogénea en los diferentes grupos, y no aumentó de acuerdo a la severidad de los tumores: controles

26,6%; estadío TNM I 37%, estadío II 34%, estadío III 42% y estadío IV 41%. Se puede observar que la mayor frecuencia de infección correspondió a los estadíos colorrectales avanzados y el más bajo a los pólipos hiperplásicos, aunque el tamaño muestral también fue el más bajo en ese grupo (n=19).

La estimación del riesgo de cáncer colorrectal según la exposición al agente viral no fue significativa (p>0,05). Sin embargo, la detección del ADN del VPH fue superior en los adenocarcinomas que en los controles. El *odds ratio* crudo para dicha asociación fue de 1,6; y ajustado por edad fue igual a la unidad (OR_{EDAD}=1,05). Es necesario mencionar que el *odds ratio* o razón de ventajas es una medida de asociación, siendo incapaz de predecir si la infección viral antecede o no a las neoplasias. La validez de la medida depende, en buena parte, de la selección de controles y el ajuste para los factores de confusión. En este trabajo se utilizaron muestras independientes, originarias del mismo centro de salud (ver más abajo). No obstante, el tamaño muestral fue modesto y la estadística fue solamente ajustada por la edad.

Uno de los primeros trabajos realizados sobre los ácidos nucleicos del VPH en tumores extragenitales fue realizado por el grupo del Dr. Faras de la Universidad de Minnesota, donde se analizaron más de 200 tumores de 34 tipos de cánceres mediante hibridación de ácidos nucleicos en filtro. Los autores detectaron ADN del VPH en dos carcinomas epidermoides de la lengua, un carcinoma del pulmón izquierdo, y en un carcinoma del ciego colónico (Ostrow *et al*., 1987). Otros trabajo iniciales no detectaron ADN del VPH en adenocarcinomas de colon mediante hibridación de ácidos nucleicos (Boguszaková *et al*., 1988), y algunos casos de mucosa rectal normal (Palmer *et al*., 1989). Kirgan y col., por otra parte, reportaron la detección del VPH mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en controles, adenomas y adenocarcinomas (Kirgan *et al*.[A], 1990; Kirgan *et al*.[B]; 1990).

Los trabajos posteriores han sido contrastantes y controversiales. Koulos y col. (1991), Shroyer y col. (1992) y Shah y col. (1992) no detectaron ADN del VPH mediante PCR en grupos de 7, 22 y 20 adenocarcinomas colorrectales primarios, respectivamente. Sin embargo, estudios posteriores han reportado la presencia de este virus en la mucosa del

colon. De acuerdo a diferentes estudios, la presencia del VPH en los adenocarcinomas de colon es reportada con un rango variable, con un promedio del 20-30% de positividad en los tumores. Los trabajos provenientes de China y Turquía registran las prevalencias más altas, arrojando el 29-84% de infección en los pacientes (Cheng *et al*[B]*.,* 1995; Salepci *et al.,* 1999; Sayhan *et al.,* 2001; Lee *et al.,* 2001; Salepci *et al.,* 2009). Frecuencias más bajas han sido reportadas en EEUU, con un rango de detección del 0-60% de los casos, los que fueron estudiados mediante PCR e hibridación *in situ* (Kirgan *et al.*[B]*,* 1990; McGregor *et al.,* 1993; Bodaghi *et al*[A]., 2005).

Solamente dos trabajos se han llevado a cabo en Argentina, donde se ha analizado la presencia del VPH en adenomas colónicos con diferentes grados de displasia (leve, moderada y severa) y adenocarcinomas colorrectales. Uno ha sido presentado en la Conferencia Internacional de Papilomavirus del 2001, donde se reportó que una prevalencia alta de los adenomas estudiados poseían evidencia de ADN del Papilomavirus (Picconi *et al.,* 2001). El segundo estudio fue realizado por el presente grupo, publicado en el 2005, sobre un grupo modesto de adenocarcinomas esporádicos, diferentes a lo presentados en esta tesis (Pérez *et al*., 2005); la prevalencia detectada fue de 38/54. En otro trabajo, en prensa, reportamos una prevalencia cercana al 40% sobre 77 adenocarcinomas esporádicos estudiados.

Un estudio realizado por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos reportó ADN del VPH en 55% de adenocarcinomas colorrectales utilizando un protocolo de PCR anidada similar al usado en este trabajo y PCR *in situ*. Los autores examinaron 105 muestras de 55 carcinomas colorrectales obtenidos de pacientes que provenían de poblaciones de las ciudades de Baltimore y Maryland, y confirmaron los resultados con investigadores independientes (Bodaghi *et al*[A]., 2005). Prevalencias más altas se reportaron en Brasil, donde se examinaron 60 adenocarcinomas colorrectales detectando ADN del VPH en el 83% de los especímenes pero en ninguna de las biopsias que fueron tomadas en áreas contiguas no neoplásicas (Damin *et al*., 2007).

Los estudios más extensos sobre este tema han sido publicados en los dos últimos años, aunque los resultados son contradictorios. Gornick y col. (2010) no pudieron detectar ADN

del VPH en 214 carcinomas de colon y 60 carcinomas rectales de pacientes provenientes de Israel (n=106), España (n=100) y Estados Unidos (n=73). Los autores utilizaron como metodología de detección una PCR directa, usando los cebadores GP5+/6+ y el sistema SPF. De acuerdo a los resultados obtenidos en el trabajo concluyen que no hay contribución significativa del VPH a la carcinogénesis colorrectal. En contraposición, otro estudio realizado en Bélgica sobre 232 carcinomas colorrectales, reportó que el 15% de los tumores portaban ADN de tipos oncogénicos del VPH. Curiosamente, la metodología de genotipificación fue similar al trabajo presentado por Gornick y col., que constaba de amplificación con cebadores SPF y tipificación por ensayo de hibridación lineal reversa (INNO-LiPA) (Deschoolmeester *et al.,* 2010).

En un trabajo liderado por el Dr. Ciotti, en Italia, se examinaron 71 pacientes con adenocarcinomas colorrectales mediante amplificación con cebadores My09/011 más los cebadores SPF, y la genotipificación se realizó mediante secuenciación de ADN e hibridación reversa (INNO-LiPA). Los autores detectaron marcadores del VPH en el 30% de los casos (Giuliani *et al*., 2008). Los resultados obtenidos en Turquía también son contradictorios, Salepci y col. (2009) detectaron prevalencias elevadas de ADN de VPH de alto riesgo en 56 carcinomas colorrectales de pacientes de Estambul, pero otro estudio conducido en la misma ciudad arrojó resultados negativos sobre 106 carcinomas (Yavuzer *et al.,* 2010). Sin embargo, los autores utilizaron como grupo control positivo a 49 carcinomas cervicales invasores, de los cuales detectaron ADN del VPH en el 69% de los casos, hecho que podría estar revelando una sensibilidad de la técnica considerablemente menor.

Un estudio muy interesante fue conducido en la Universidad de Padova, Italia, inicialmente concebido para determinar la prevalencia de la infección de diferentes tipos de poliomavirus JC (BKV, SV40, KIV, WUV, WUV y MCV). La población bajo estudio constó de dos grupos: el primer grupo estuvo compuesto por biopsias parafinadas de adenocarcinomas colorrectales y mucosa adyacente (36 eran < 45 años, y 36 eran >75 años); el segundo grupo constaba de muestras frescas congeladas de 22 adenomas y 28 carcinomas colorrectales. Los autores, utilizando Real-Time PCR, no pudieron detectar

ADN del JCV en ninguno de los grupos, pero si detectaron el virus Epstein-Barr, HCMV y VPH. El 7,1% de los carcinomas colorrectales y el 4,5% de los adenomas del grupo 2 presentaron ADN de VPH 16, al igual que el 5,6% de los carcinomas de pacientes del grupo 1 menores a 36 años. Los tumores positivos también presentaron Papilomavirus en la mucosa adyacente, pero no en biopsias a 3 o 10 cm de la lesión (Militello *et al.,* 2009).

4.3 Diferencias en los estudios

Las amplias discrepancias observadas en los diferentes estudios pueden haber surgido por varias razones. En primer lugar, la variación en la sensibilidad de los métodos utilizados. Inicialmente, no se detectó ADN del Papilomavirus en carcinomas de colon mediante hibridación *in situ* o Southern Blot (Palmer *et al.,* 1989*;* Beckmann *et al.,* 1989). Sin embargo, otros autores tuvieron éxito con dichas técnicas e inmunohistoquímica (Kirgan *et al.,* 1987; Kirgan *et al.*[A]*,* 1990; Kirgan *et al.*[B]*,* 1990; Manalo *et al.,* 1991). Mediante el procedimiento de PCR los resultados tampoco han sido concluyentes, presentando rangos de detección variables que oscilan entre 0% a prevalencias relativamente altas. Sotlar y col. (2001) también han demostrado actividad transcripcional de VPH de alto riesgo en mucosa normal rectal, aunque no en adenocarcinomas rectales.

De acuerdo a la experiencia de este trabajo, si se amplifica el ADN de las muestras colorrectales con PCR simple los resultados que se obtienen son pobres, y la prevalencia obtenida es menor. En general, la mayoría de los investigadores que no han podido detectar ADN del VPH en carcinomas colorrectales han utilizado PCR simple (Shah *et al.,* 1992; Shroyer *et al*., 1992; Gornick *et al*., 2010). Una técnica más sensible es la PCR de dos pasos o anidada (nested), en condiciones de baja estringencia. Como fue expuesto anteriormente, la necesidad de este procedimiento demuestra que el Papilomavirus se encuentra en un muy bajo número de copias en el el colon**.** La gran sensibilidad de la PCR anidada también es su mayor limitación: es una técnica propensa a la contaminación y deben tomarse cuidados extremos.

Para la realización del presente trabajo, un control negativo de agua fue añadido cada seis muestras para confirmar que la reacción de PCR no esté contaminada, además de las condiciones rigurosas que fueron mencionadas en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos. No solamente la PCR es propensa a contaminarse, la misma puede partir del laboratorio o de los tejidos cercanos infectados en el momento de la extracción de la muestra (ver más abajo). Usando cebadores de PCR de amplio espectro y amplificación anidada, una simple copia del genoma del virus puede ser detectada entre más de 10000 células (Brewster *et al.,* 1999), por lo que no se debe excluir a la contaminación como una fuente parcial de variación entre éste y otros estudios.

En este trabajo, una técnica de la Cátedra de Patología de la Facultad de Medicina realizó los cortes de 5 a 10 micrómetros de los tacos de parafina. Hay que mencionar que aunque se lavó rigurosamente la cuchilla entre corte y corte, no se utilizaron cuchillas nuevas por muestra. Además de las consideraciones que se deben tener en cuenta en el momento de la colección, aislamiento y preparación de la mezcla del PCR, una limitación de este trabajo es que, aunque se amplificaron varias regiones del genoma del VPH por PCR, el laboratorio no dispone del equipamiento para realizar hibridación *in situ*, técnica apropiada para contrastar los resultados.

Por otra parte, los experimentos deben realizarse sobre varios cortes del tumor, acción que fue efectuada. Esto es porque los adenocarcinomas colorrectales pueden presentar zonas muy necróticas y/o con mucha infiltración, como fuera sugerido por Mandado y colaboradores (2004), que presentaron evidencia del VPH en carcinomas colorrectales mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica (Mandado *et al*., 2004). Además, el tamaño que adquieren los tumores colónicos puede ser importante debido a su diagnóstico tardío (a veces más de 12 cm de largo). No es sorprendente que varios autores hayan fallado en detectar ADN del VPH en tumores colorrectales, dada la relativa facilidad con que se lo detecta en zonas ano-genitales. En carcinomas como el de mama, por ejemplo, algunos autores han propuesto agregar Syber Green™ a la mezcla de reacción con el objeto de aumentar la sensibilidad de la PCR (Kan *et al,.* 2005). En el caso del Poliomavirus, la presencia de ADN vírico en cáncer de colon puede detectarse

luego de tratamiento con Topoisomerasa I, debido a la estructura super-enrollada que adopta el virus al infectar este tejido. Esta sugerencia fue realizada en 1999 aumentando la prevalencia en la detección del JCV de 0-20% a cerca del 80% en carcinomas colorrectales (Laghi *et al*., 1999; Casini *et al.,* 2005).

La detección del las secuencias de ADN del VPH en biopsias incluidas en parafina puede presentar dificultades cuando se utilizan métodos de PCR. Aún utilizando la misma metodología de amplificación, la prevalencia de detección del ADN viral será diferente debido a variaciones en especificidad y sensibilidad por cambios en las técnicas de fijación, inclusión y/o conservación del tejido. Esto se hace más evidente si se computa el tiempo que pueden archivarse los tacos de parafina. En este trabajo no ha pasado un período mayor de dos años desde la toma de la muestra hasta su procesamiento y análisis. Otros estudios, con resultados variables en la detección del ADN del VPH, han sido realizados sobre muestras que tenían más de siete años de archivo.

Otra fuente de variación que hay que considerar es el tamaño muestral. Generalmente, la mayoría de los estudios poseen un bajo número de pacientes, por debajo de las 30 muestras. Una situación derivada del bajo número muestral sería el sesgo en la colección de especímenes. En algunos casos se toma un exceso de adenocarcinomas de una sola ubicación anatómica, hecho que podría subestimar la prevalencia si el VPH se encontrara asociado a otro sitio en el colon (Shah *et al.,* 1992; Yu *et al.,* 2002). Hasta la fecha, la presente tesis posee la cohorte de biopsias colorrectales más extensa analizada, acumulando 291 muestras de 274 pacientes.

Por otra parte, es sabido que la frecuencia de los tipos virales difiere según la composición de las poblaciones en estudio, hábitos culturales y localización geográfica (Bosch, 2003). Esta situación podría ser extrapolada a la detección variable del virus en la mucosa del colon (Janout y Kóllavorá, 2001). Se sospecha que las variaciones del microambiente generado en lal luz intestinal, modificado de acuerdo a la dieta y hábitos, tienen gran repercusión en la viabilidad diferencial hacia otros patógenos. Al igual que la piel, la cavidad oral, y el tracto genital femenino, la fisiología del tracto colorrectal está muy ligado a la co-existencia de comunidades bacterianas comensales.

Un descubrimiento de la última década es que la microflora del colon no está conformada por una cantidad repetida de bacterias de pocos géneros, sino por centenares de especies (incluidos protozoos, hongos y virus). Se estima que en el colon de un individuo adulto conviven más de 500 especies bacterianas (sin contar las no cultivables), cada una en número bajo, pero con algunas especies dominantes (99% corresponden a unas 40 especies) (Mai y Morris *et al.,* 2004). Cada sujeto posee un patrón de bacterias exclusivo, y los grupos de regiones geográficas diferentes también poseen patrones de especies predominantes o exclusivas (Moore y Moore, 1995). La generación de un micro ambiente por parte de las bacterias es un tema intrincado y complejo, ligado al desarrollo del individuo y su ambiente. Se ha demostrado que la composición de la comunidad en el lumen del colon puede regular el sistema inmune, funcionar como barrera de entrada selectiva de virus y bacterias, así como producir una amplia gama de productos fermentativos (butirato, acetaldehído, etc.), cambiando el pH y el potencial rédox, facilitar el metabolismo e importación de nutrientes (fitoestrógenos, vitaminas), transformación o excreción de toxinas (nitrosaminas, aminas heterocíclicas, ácidos biliares), y generar masa que reduce el tránsito fecal (Macfarlane y Macfarlane, 1997; Tannock, 1999; Mai y Morris *et al.,* 2003; McGarr *et al.,* 2005; Vannucci *et al.,* 2009). En este sentido, se puede especular que la formación de un determinado microambiente influencia la entrada/permanencia del VPH y otros patógenos en el tejido colorrectal, y explicar, por lo menos parcialmente, las variaciones observadas (Burnett-Hartman *et al.,* 2008).

4.4 VPH en controles

Obtener muestras normales del tejido colónico es complejo para este tipo de estudios porque las técnicas de obtención son invasivas y no son indicadas para individuos sanos. Es por eso que la mayoría de los trabajos toman como controles a biopsias de enfermedades no neoplásicas, como colitis crónicas o enfermedades inflamatorias del colon. Sin embargo, estas condiciones, aunque no son malignas, son factores de riesgo para la transformación neoplásica si persisten durante varios años (Gazelle *et al*., 2000). Además, recientemente se ha propuesto que las condiciones crónicas del colon y recto

pueden llevar a la desregulación del sistema inmune, ingreso del VPH en las células epiteliales de la mucosa dañada, integración genómica y riesgo de metaplasia escamosa (Kong *et al*. 2007; Cheng *et al.,* 2007).

Dada la ubiquidad del VPH en la población general en conjunto con el creciente número de pacientes que eligen terapias inmunosupresoras (prednisona, ciclosporina, azatriopina, etc.), es posible que haya un incremento en la susceptibilidad de infección por patógenos pasajeros. Alternativamente, se sabe que la inmunosupresión puede llevar a la reactivación de infecciones anogenitales latentes que de otra manera son posiblemente indetectables (IARC, 2007). Este fenómeno también puede explicar la alta prevalencia del VPH en infecciones anales observada en individuos inmunosuprimidos que no tienen historia de acto sexual anal o vías de contagio aparente (Piketti *et al.,* 2003). En este estudio la mayoría de los controles correspondieron a biopsias colectadas de pacientes con colitis crónicas y condiciones inflamatorias del colon.

Solamente un trabajo presentó muestras de tejidos normales de individuos que no sufrían alguna anomalía del colon declarada, y estuvo conformado por tejidos resecados de individuos que habían muerto por accidentes de tránsito. La prevalencia del VPH en la mucosa normal del colon fue de 0% (Bodaghi *et al*[A]., 2005). En cambio, aquellos estudios que tomaron como controles a pacientes con enfermedades no neoplásicas del colon reportaron prevalencias de 0-29% (Kirgan *et al*., 1990; McGregor *et al*., 1993; Zu *et al*., 1999; Pérez *et al*., 2005; Damin *et al*,. 2007).

En otro tipo de comparaciones se tomaron especímenes de tejido normal a una distancia pre-establecida de las neoplasias colorrectales. Estos grupos resultaron en prevalencias del VPH del 18% (10/55) de las biopsias tomadas a 20 cm de los carcinomas colorrectales (Bodaghi *et al*[A]., 2005); en 53% (10/19) de las biopsias tomadas a 6 cm del borde de los tumores (Lee *et al*., 2001),); en 50% (36/72) de los tejidos circundantes de 72 carcinomas colorrectales tomados a 15 cm del borde del tumor (Damin *et al.,* 2007), y en 32% de las muestras tomadas alrededor de 56 carcinomas colorrectales (Saleci *et al*., 2009). Como fue mencionado, Militello y col (2009) detectaron ADN del VPH 16 en el tejido adyacente de los adenocarcinomas positivos, pero no en las biopsias situadas a 3 o 10 cm de la

lesión. Otras prevalencias cuya distancia no fue reportada fueron de 10% (1/10) de positividad para VPH en tejidos circundantes al tumor (Zhu *et al*., 1999); 3,1% (1/32) (Yu *et al*., 2002); y 32% (17/53) (Buyru *et al*., 2006).

4.5 Distribución de los tipos virales

Cuando se analizaron los tipos virales del grupo control, la prevalencia de VPH 16 fue del 13%, el 9% correspondió al VPH 18, y el 4% correspondió a otros tipos virales. Estos datos son comparables a ensayos previos, donde se han reportado rangos bajos de infección en la mucosa normal del colon. A diferencia de otros estudios, no se han detectado los tipos virales de bajo riesgo VPH 6 y 11.

En el grupo de adenocarcinomas los tipos virales más comunes fueron VPH 16 y 18, los cuales fueron detectados en casi todos los estadíos. No se detectaron los tipos de bajo riesgo VPH 6 y 11 en este grupo, pero si los de alto riesgo VPH 33, 31, 51 y 66 en baja frecuencia. No se detectaron co-infecciones. Otros trabajos señalan al VPH 16 como el tipo viral más frecuente en adenomas y carcinomas colorrectales (Cheng *et al*[A]*.,* 1995; Yu *et al.,* 2002; Pérez *et al*., 2005; Bodaghi *et al*[A]*.,* 2005; Militello *et al.,* 2009). Por otra parte, se ha reportado una mayor prevalencia de VPH 18 en pacientes de Turquía, China, Taiwan e Italia (Salepci *et al.,* 1999; Zhu *et al.,* 1999; Lee *et al.,* 2001; Sayhan *et al.,* 2001; Buyru *et al.,* 2003; Giuliani *et al.,* 2008; *Erol et al.* 2009; Salepci *et al.,* 2009).

En contraposición, los trabajos de Brasil, Argentina, Bélgica y Polonia han identificado a ambos tipos virales como infecciones frecuentes en adenocarcinomas de colon (Pérez *et al.,* 2005*;* Damin *et al*., 2007; Młynarczyk *et al*, 2009; Deschoolmester *et al.,* 2010). Un trabajo reciente realizado en Italia reporta al VPH 18 como el tipo más frecuente (22%), seguido de una variedad de infecciones múltiples (Giuliani *et al*., 2008). Tomando en consideración la bibliografía sobre el tema, parece ser que los tipos virales VPH 16, 18 y 33 son los más prevalentes en los adenocarcinomas colorrectales, aunque también se detectan VPH 6, 11, 31, 51, 58 y 66 en menores cantidades. Esta situación no es

comparable con aquella observada en los adenocarcinomas del cuello uterino, donde se ha reportado al VPH 18 como el tipo viral predominante (Bosch *et al.,* 1995).

4.6 Adenomas y pólipos hiperplásicos

Se ha estimado que los adenomas colorrectales vellosos poseen hasta diez veces más riesgo de transformación neoplásica que los tubulares del mismo tamaño (Gazelle *et al.,* 2000). Si el VPH tuviese algún papel en la oncogenicidad de la mucosa rectal, cabría esperar una mayor prevalencia en las formaciones premalignas de mayor riesgo oncogénico. En la literatura existen muy pocos trabajos que reportan la presencia de VPH en adenomas de colon, y el presente trabajo es la primera examinación que se hace al ADN del VPH en los pólipos hiperplásicos. En la tabla 3.1 de la sección Resultados se observa la prevalencia de los distintos tipos virales en este grupo.

Los adenomas tuvieron la segunda prevalencia del VPH más baja (23%), un poco por detrás de los pólipos hiperplásicos. No hubo diferencias significativas con el grupo control, implicando que la infección por VPH no otorga algún riesgo para la formación de los adenomas clásicos o los pólipos hiperplásicos. Al dividir el análisis de acuerdo al grado de displasia o histología, la presencia del ADN del VPH no se relacionó con su histología. Dado que los adenomas vellosos son las formas que preceden al cáncer, es intrigante que el VPH fuera detectado con menor prevalencia en este grupo (21%), en comparación con los adenomas tubulares (24%) ($p>0,05$). Esto se podría interpretar como evidencia en contra del VPH en el inicio de los eventos oncogénicos a través de la típica secuencia adenoma-carcinoma. En oposición a estos resultados, Cheng y colaboradores reportaron que el ADN del VPH 16 estaba más representado en adenomas vellosos y tubulo-vellosos, y además había una asociación significativa entre la infección global y el grado de displasia epitelial.

Cuando se separaron los adenomas estudiados de acuerdo al grado de displasia, el 29% de los adenomas de bajo grado presentaron ADN del VPH, el 12% de los de moderado

grado y el 16% de alto grado. Nuevamente se observó una prevalencia mayor en el grupo de menor riesgo oncogénico, aunque las diferencias no fueron significativas. Respecto a los tipos virales en este grupo son comparables con los obtenidos en los casos de cáncer colorrectal, con excepción de dos muestras positivas que no pudieron ser genotipificadas por los tipos virales de control disponibles.

A diferencia de este estudio, otros autores reportan una correlación positiva entre la severidad de las lesiones y la presencia del VPH (Kirgan *et al*[B]., 1990, Cheng *et al.*[A], 1995; Picconi *et al.,* 2001). Otros autores, en cambio, no detectaron ADN del VPH en adenomas del colon mediante hibridación *in situ* y PCR anidada (Koulos *et al.,* 1991; Yavuzer *et al.,* 2010). Otros estudios que han investigado la presecia de ADN del VPH en grupos de adenomas colorrectales reportaron prevalencias de 5,6% en pacientes de Italia (Militello *et al.,* 2009) a más del 50% en Polonia (Młynarczyk *et al.,* 2009).

4.7 Asociación con otras características anatomopatológicas.

La presencia del Papilomavirus no estuvo correlacionada con ciertas características histopatológicas examinadas en este trabajo: el tamaño del tumor, estadío colorrectal, ubicación anatómica y grado de diferenciación. De acuerdo a estos datos, la presencia del ADN del VPH parece distribuirse azarosamente respecto a factores de importancia pronóstica. La mayoría de los estudios que detectaron ADN del VPH en adenocarcinomas colorrectales llegaron a conclusiones similares (McGregor *et al.,* 1993; Cheng *et al*[B]*.,* 1995; Manalo *et al.,* 2004; Giuliani *et al.,* 2008; Deschoolmeester *et al*., 2010). La única asociación estadísticamente significativa que reportaron Giuliani y col. (2008), examinando 66 adenocarcinomas colorrectales, fue que ante la detección conjunta del VPH con los virus BKV, JCV, o SV40, raramente los poliomavirus se presentan concomitantemente en las mismas muestras. Interesantemente, los autores identificaron una mayor prevalencia del VPH en mujeres (39,4%) que en hombres (23,7%), pero la diferencia no fue significativa. En otro estudio, las características histopatológicas de un grupo extenso de adenocarcinomas colorrectales (n=232) no pudieron ser correlacionadas

con la presencia del VPH, aunque reportaron una tendencia significativa del virus a aparecer en pacientes de menor edad (Deschoolmeester *et al.,* 2010). Esta observación fue realizada anteriormente por Militello y col. (2009), cuando reportaron una baja prevalencia de adenocarcinomas colorrectales positivos en el grupo menor de 36 años, pero ninguno en aquellos carcinomas de pacientes entre 75 y 90 años.

Similar a la tendencia reportada por Giuliani y col. (2008), en este trabajo se observó que la mayoría de los carcinomas positivos para el Papilomavirus provenían de muestras de mujeres. Los diferencia fue estadísticamente significativa (OR=2,9; $p<0,05$). Sin embargo, estos resultados no se vieron reflejados en el grupo de adenomas o controles. Tomadas todas las muestras en conjunto, las prevalencia de infección fue levemente mayor en mujeres que en hombres (OR=1,13).

En otro análisis, no pareció haber un gradiente de infección incremental del VPH de un extremo a otro del colon, sino que los porcentajes de detección se mantuvieron variables en diferentes sitios. Sin embargo, cabe destacar que tanto en controles, adenomas y carcinomas, los porcentajes más altos de detección siempre correspondieron a la región rectal. Esta observación es acorde a un posible ingreso del virus por la zona anal.

4.8 Entrada del virus

Yu y col. (2002) observaron mayores detecciones de VPH en regiones distales del colon y propusieron que las infecciones productivas del canal anal o perineo podrían ser fuentes de diseminación viral para regiones rectales. También las únicas muestras de adenocarcinomas colorrectales con ADN VPH 16 que obtuvieron Millitello y col. (2009) en las dos cohortes bajo estudio provenían del cáncer sigmoideo y rectal. Otro estudio que avala esta observación fue llevado a cabo en EEUU y reportó un gradiente de distribución distal-proximal del VPH (Weinberger *et al.,* 2004). Dejando de lado los trabajos sobre carcinomas escamosos colorrectales, todavía no se ha asociado la actividad sexual de un individuo en relación con la presencia de VPH en el colon. Un estudio proveniente de

EEUU reportó una distribución homogénea del Papilomavirus a lo largo del colon, situación más característica de una diseminación hematógena (McGregor *et al.,* 1993).

Cómo el virus ingresa a regiones internas del cuerpo es aún desconocido. Los carcinomas rectales VPH positivos que han sido presentados por este y otros estudios podrían explicarse por la cercanía que tiene esta región a la zona de transición ano-rectal. Infecciones del cérvix, perineo o anales serían fuentes probables de entrada del virus al recto o a zonas distales del colon, pero otros sitios como el ciego o colon ascendente son de más difícil acceso. Se ha propuesto que la zona ano-genital sea fuente de infección productiva y el virus entre retrógradamente al tracto gastrointestinal (Yu *et al.,* 2002).

La naturaleza retrospectiva de ese estudio, sumado a los inconvenientes que se presentaron en el Hospital público donde se obtenían las muestras, impidió que se pueda recolectar información adicional sobre condiciones preexistentes asociadas a la infección por VPH. Esto permitiría correlacionar los resultados de las muestras colorrectales con la concomitancia de verrugas anogenitales, presencia de lesiones intraepiteliales, u otros datos que indiquen infecciones ano-genitales. De acuerdo a estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, la prevalencia de VPH en hisopados cervicales de mujeres de la población general de La Plata es relativamente alta (45%) (Abba *et al*., 2003). Sin embargo, no hay estudios regionales de prevalencia de VPH en el canal anal y perineo de la población general asintomática, y los trabajos a nivel global son escasos. Sí está disponible gran cantidad de literatura sobre la prevalencia del VPH en los grupos de riesgo. En hombres que tienen sexo con hombres, individuos con HIV y/o inmunosuprimidos las frecuencias de VPH en el canal anal son muy elevadas (van der Snoek *et al.,* 2003). Estudios epidemiológicos recientes analizaron la presencia del VPH de múltiples sitios anogenitales en hombres heterosexuales asintomáticos. Las prevalencias reportadas por Giuliano y col. (2007) y Nielson y col. (2007) son muy similares para dos poblaciones de EEUU, superiores al 57% cuando se valora la positividad en cualquier sitio anogenital, abarcando una gran cantidad de tipos virales. Las prevalencias de las infecciones asintomáticas del canal anal y perineo rondaron el 17 % a 23%, individualmente. En qué proporción ocurren conjuntamente, o por separados, no fue

reportado. Otro estudio epidemiológico conducido en Canadá en hombres heterosexuales asintomáticos arrojó prevalencias similares (Nyitray, 2008).

Otra posibilidad, más remota, es la transmisión hematógena del virus, que podría explicar su presencia en cánceres de pulmón, mama, tejido prostático o colorrectal. Se sabe que el virus del Papiloma humano no produce viremia, es decir, no se transmite como agente aislado a través de la sangre. Sin embargo, estudios tempranos sugirieron la dispersión del virus dentro de células metastásicas de pacientes con cáncer cervical (Pao *et al.,* 1991; Tseng *et al.,* 1999; Dong *et al.,* 2002). Además, se ha demostrado que el ADN del VPH puede detectarse en las células mononucleadas de la sangre periférica (PBMC) de individuos con condilomas y en sus parejas asintomáticas, pero no en controles normales que no están en contacto con individuos sintomáticos o pacientes con verrugas de piel simples (Karas y Poreba, 1998).

Un trabajo reciente y mucho más extenso fue realizado en un banco de sangre de Queensland, Australia, donde se examinaron las fracciones de sangre de más de 180 hombres sanos en búsqueda de tipos alfa y gamma del VPH. Los resultados fueron positivos para 15 individuos, portando la mitad de ellos secuencias que correspondían a tipos de VPH cutáneos comúnmente encontrados en infecciones asintomáticas de la piel, y el resto correspondían a tipos virales de alto riesgo. De acuerdo a ensayos hechos con fracciones celulares de donantes de sangre, los datos apuntaron a que el VPH puede ser transportado por la sangre en células mononucleadas de la sangre periférica (PBMC) mediante la unión a la superficie celular por una proteína de superficie desconocida, pero los viriones se perderían si las células son tratadas con tripsina (Chen *et al*., 2009). En otro estudio tipo encuesta realizado por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, se estudiaron 57 pacientes pediátricos HIV positivos. Diez de 57 individuos fueron positivos para ADN del VPH 16 en las células periféricas de sangre. Como ninguno había iniciado la actividad sexual, se hipotetizó que la transfusión de sangre puede ser un vehículo de transporte de PBMC con VPH. De manera interesante, de 19 dadores de sangre sanos asintomáticos, el 15% eran positivos para ADN de VPH 16 en PBMC, y uno era positivo en varias muestras a lo largo del tiempo (Bodaghi *et al*[B]., 2005).

Si la zona anorrectal es la entrada del virus al lumen colónico podría esperarse un gradiente o una diferencia en la prevalencia del VPH entre tumores colorrectales distales y proximales. Aunque no se encontró dicho gradiente en el presente estudio, las prevalencias más altas correspondieron a muestras rectales. Un dato interesante fue que se detectó más ADN del VPH 16 en colon proximal y VPH 18 en colon distal. Aunque la diferencia no fue significativa, podría tratarse de una susceptibilidad variable del tejido colorrectal a los tipos del VPH. En este sentido, las regiones proximales y distales del colon y recto son embriológicamente y funcionalmente diferentes. El colon proximal proviene del intestino medio y el colon distal del intestino posterior, están expuestos a la materia fecal en diferentes duraciones y en distintos grados de procesamiento.

Otra diferencia en las regiones proximal y distal es la distribución de polisacáridos. Cuando el material en digestión viaja por el colon es cubierto con mucus alcalino, mientras que en el colon descendente predominan los mucopolisacáridos neutros y en el recto las mucinas ácidas (Shamsuddin *et al*., 1982). Aparte, la proporción de células caliciformes es mucho mayor en la región distal que la proximal, lo que puede ser una barrera de defensa ante los mayores estímulos físicos o químicos de la región recto-sigmoidea (Arai y Kino, 1989). El recto también presenta una alta concentración de células endócrinas, y el colon proximal está más adaptado a la absorción de agua y actividades de transporte electrolítico (Shamsuddin *et al*., 1982). Ya fue mencionado que la diferencia en el pH en regiones proximales y distales puede influenciar la susceptibilidad a los factores externos (Macfarlane y Macfarlane, 1997; Tannock, 2002).

Los productos fermentativos bacterianos también difieren de acuerdo al sitio anatómico: el colon proximal es abundante en ácidos grasos de cadena corta y etanol, mientras que los productos de la fermentación de proteínas predominan en el colon distal (Li y Lai, 2009). También se ha encontrado que la distribución de alteraciones genéticas e histológicas de cánceres colorrectales varía de acuerdo a la ubicación. Sin embargo, no hay diferencias tajantes entre tumores distales y proximales que permitan considerarlos como entidades diferentes (Ilyas *et al.,* 1999; Li y Lai, 2009).

Otra explicación sobre la entrada del virus y su detección en la mucosa colorrectal puede ser más simple y relacionada a las técnicas exploratorias. Antes de obtener las muestras o procedimientos quirúrgicos se deben realizar colonoscopías o polipectomías endoscópicas, las cuales pueden trasladar material infectado o lesiones del canal anal o perianal en el momento de la toma de la muestra, o bien provocar infecciones temporarias. Esta recomendación fue publicada por la revista *AIDS Patient Care* (2003), que sostuvo que la misma vía podría ser una fuente de diseminación de HCV y VPH en pacientes con SIDA.

Otra observación fue realizada por el eminente profesor zur Hausen en su libro *Infections Causing Human Cancers*, donde comenta que salvo algunos pocos estudios convincentes que detectaron ADN de VPH oncogénico en mucosa colorrectal y en muy bajo número de copias, gran cantidad de trabajos no lo detectan y la evidencia del Papilomavirus en el colon está muy lejos de ser concluyente (zur Hausen, 2006). Reconoce, por otra parte, que el tracto gastrointestinal sería un lugar frecuente de tránsito de partículas virales de Papilomavirus, principalmente por ingestión de material contaminado (zur Hausen, 2000).

4.9 Integración del VPH

Si el cáncer colorrectal, o un subgrupo de éste, estuviese relacionado a la infección viral, se esperaría que el genoma viral esté insertado en los cromosomas del huésped. La integración de secuencias del VPH en el genoma de carcinomas genitales se ha asociado a inestabilidad cromosómica, rearreglos génicos y carcinogénesis (Wilke *et al.,* 1996; Solinas-Toldo *et al.,* 1997; Heselmeyer *et al.,* 1997; Klaes *et al*., 1999; zur Hausen, 2002; Pett *et al.,* 2004; Herrick *et al.,* 2005). En este sentido, se ha demostrado que durante el proceso de transformación maligna genital, el genoma viral se integra en el ADN celular perdiéndose por deleción algunas porciones de su genoma, tales como los marcos de lectura *L1, L2, E1* y *E2*, mientras que los oncogenes *E6* y *E7* siempre se conservan (Lörincz *et al.,* 1992; Lazo, 1999).

En este trabajo se ha examinado el estado físico del genoma viral mediante la amplificación tipo específica de E2. El análisis reveló que el 56% de los tumores positivos para VPH 16 y el 25% de los tumores positivos para VPH 18 poseen evidencia de genoma viral integrado. Este es el segundo trabajo en carcinomas colorrectales que examina el estado físico del genoma viral en carcinomas colorrectales. Una investigación realizada en Estados Unidos reportó una proporción de VPH16 integrada mucho más alta. Sin embrago, los autores no amplificaron secuencias de las muestras VPH 18 (Bodaghi *et al*[A]., 2005).

Con respecto a la metodología, se ha evaluado la presencia/ ausencia de E2 porque se ha demostrado que este es el sitio preferencial de interrupción del virus, según ha sido reportado (Kalantari *et al.,* 1998). La región que fue amplificada para el gen E2 del VPH 16 codifica para la región bisagra de la proteína (*hinge*), que es vital para su función (Gauthier *et al.,* 1991). Otros sitios que se interrumpen en la integración del genoma corresponden a los genes E1 y L1, aunque en menor frecuencia (Kalantari *et al.,* 1998; Lukaszuk *et al*., 2003). En el caso del VPH 18, la deleción de fragmentos parecen ser más notable, con pérdidas conjunta de fragmentos E2 y E1 en gran parte de los carcinomas genitales (Badaracco *et al.,* 2002). Aunque no se ha encontrado un sitio preferencial cromosómico de unión, se ha demostrado una relación entre la integración del VPH y la posición de los sitios frágiles comunes (CFS) a nivel citogenético (Wilke *et al.,* 1996), y posteriormente a nivel molecular (Thorland *et al.,* 2000). Se ha propuesto que es probable que la integración por el VPH no solamente esté asociada a la inducción de rearreglos cromosómicos, sino que alternativamente las células con inestabilidad cromosómica puedan ser más susceptibles a la integración viral.

Para este trabajo se ha elegido una metodología que amplifica E2 mediante una PCR anidada. Este es un método sensible y confiable para detectar secuencias de ADN que se encuentran presentes en muy bajo número de copias, como es el caso del Papilomavirus humano en el cáncer colorrectal. Sin embargo, es necesario comentar las limitaciones de esta técnica: primero no se discriminan entre formas puramente episomales y mixtas; y segundo, los fenómenos de integración viral sin pérdida de la continuidad del gen E2

pueden subestimar la prevalencia de integración, al igual que un muy bajo número de copias virales o falsos negativos.

Los resultados obtenidos en esta tesis sobre los eventos de integración son coherentes con los de la carga viral. Una posible explicación estaría dada por la dificultad que tiene el VPH en realizar una infección productiva en el epitelio columnar. Aquellos virus que ingresen a la mucosa o a las células tumorales mediante microtraumas serán eliminados o permanecerán en la célula por una pronta integración de su genoma viral. En carcinomas del tracto genital superior que han sido positivos para la detección del ADN del Papilomavirus (cáncer de ovario y endometrio), se ha demostrado que la integración viral completa es frecuente tanto para el VPH16 y 18 (Badaracco *et al.,* 2002). Los carcinomas de cérvix, por otro lado, presentan formas mixtas (integrado más episomal) del VPH 16 y completamente integradas del VPH 18 (Cullen *et al.,* 1991; Das *et al.,* 1992; Daniel *et al.,* 1997; Park *et al.,* 1997; Graham *et al.,* 2000). Se ha propuesto el estado de integración del VPH 16 como marcador pronóstico en cánceres cervicales, pero la presencia de formas episomales en estadíos avanzados confirman que la integración no siempre está involucrada en la malignidad. En los adenocarcinomas cervicales, que representan el 20% de los carcinomas del cérvix uterino, la integración del VPH 16, y en especial la del VPH 18, se piensa que actúa como un iniciador potente de la carcinogénesis (Cooper *et al.,* 1992; Park *et al.,* 1997; Cheung *et al.,* 2009).

4.10 Carcinomas de células escamosas del recto y otros

Un caso diferente lo representan los carcinomas de células escamosas del recto y colon. En este trabajo no se incluyeron tumores con características escamosas o adenoescamosas, dada la muy baja prevalencia que presentan. Un estudio reciente publicado en Estados Unidos reportó tres casos de carcinoma escamosos rectales donde se detecta la presencia ubicua de VPH 16 mediante análisis de inmunohistoquímica de p16, inmunohistoquímica de VPH, hibridación *in situ* y reacción en cadena de la polimerasa. También reportaron los cambios citológicos propios de lesiones asociadas al

VPH (Kong *et al*., 2007). Otra investigación llevada a cabo en Hungría detectó ADN del VPH 16 en tumores colorrectales sincrónicos y nódulos linfáticos infiltrados de una paciente de 94 años, analizados mediante PCR y Southern Blot (Bognár *et al*., 2007). Más recientemente, ha sido reportado en Japón un hombre HIV positivo con carcinoma primario de células escamosas de recto, al que se le detectó ADN del VPH a partir de biopsias no fijadas (Matsuda *et al.,* 2009).

No de manera infrecuente puede detectarse mucosa escamosa en el recto, generalmente de 2 a 4 cm como una expresión continua de la línea dentada. Menos frecuentemente, puede extenderse hasta los 10 cm y de manera irregular, y también puede variar con el tiempo. En la literatura, se han reportado un poco más que 50 casos de carcinomas de células escamosas colorrectales, la mayoría de ellos de la región rectal (origen diferente al epitelio anal), y otros repartidos en diferentes regiones del colon. Salvo unos pocos casos, no fueron examinados para la presencia del ADN del Papilomavirus. Una de las primeras investigaciones sobre el tema la realizó el grupo liderado por el Dr. Frizelle, de Nueva Zelanda, en el que examinaron 20 carcinomas colorrectales con características escamosas (carcinoma de células escamosa, carcinoma adenoescamoso y adenocarcinoma con metaplasia escamosa) mediante inmunohistoquímica para la cápside viral del VPH, pero no encontraron evidencia de infección. Sin embargo, los autores comentaron que la técnica que utilizaron tenía una gran especificidad pero baja sensibilidad (Audeau *et al.,* 2002). Otro ensayo negativo para el ADN del Papilomavirus fue conducido en cinco carcinomas adenoescamosos mediante hibridación *in situ* para los tipos VPH 6/11 y 16/18 (Dong *et al.,* 2009).

Se ha publicado que cerca de la mitad de los carcinomas de células escamosas colorrectales informados han surgido luego de varios años de enfermedades inflamatorias del colon. En uno de estos casos se realizó un seguimiento por dos décadas a una paciente con colitis ulcerosa que portaba evidencia compatible con una infección de VPH. Al negarse al tratamiento quirúrgico, la lesión procedió a carcinoma de células escamosas rectal (Cheng *et al.,* 2007). Los autores de ese estudio concluyeron que la inflamación crónica del sistema gastrointestinal podría llevar a zonas ulcerosas o dañadas que

permitan el ingreso del VPH al epitelio y promoción de metaplasia escamosa, eventualmente promoviendo carcinogénesis. Una hipótesis similar fue propuesta independientemente por Kong y col. (2007), quienes a su vez demostraron expresión de $p16^{INK4A}$ concomitante con la infección del VPH. Experimentos in vitro comprobaron que la transfección de ADN de Papilomavirus de alto riesgo puede inducir metaplasia escamosa en células de adenocarcinoma colónico (Kinjo *et al.,* 2003). Sin embargo, no existe evidencia directa que indique que esto suceda *in vivo*.

4.11 Alteraciones genéticas en el cáncer colorrectal

Los virus carcinogénicos son conocidos por su acción en la activación de proto-oncogenes y supresión de genes supresores de tumores. Un estudio reciente encontró que entre 56 adenocarcinomas colorrectales VPH positivos, solamente el 3,6% tenían mutaciones de *p53*. Este hallazgo contrasta con el hecho de que aproximadamente el 50% de los carcinomas colorrectales contienen mutaciones en este gen supresor de tumores. Con el objeto de determinar si un subconjunto de tumores está asociado con el VPH, se examinaron alteraciones genéticas comunes del cáncer colorrectal. Varios autores han sugerido una colaboración entre *ras* y los oncogenes E6/E7 para inducir transformación completa a partir de células normales y la activación de c-*myc* (Mouron *et al.,* 2000; Dokianakis *et al.,* 1999; Buyru *et al*., 2006). Adicionalmente, se determinó el estado de inestabilidad de microsatélites y también se examinaron las prevalencias de dos polimorfismos que han sido asociados a un mayor riesgo de inicio del cáncer colorrectal (Krüger *et al.,* 2007), y a las infecciones virales independientemente.

4.11.1 Inestabilidad de Microsatélites

La discriminación entre las clases de carcinomas colorrectales con y sin inestabilidad de microsatélites es necesaria, ya que se ha demostrado que la etiología de éstos podría ser diferente. Se ha establecido, mediante estudios de ligamiento familiar, que los síndromes no polipósicos familiares (HNPCC) son ocasionados por mutaciones en la línea germinal de algunos de los genes de reparación (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* y *hPMS2*), de los cuales

la mayoría responden a mutaciones en los genes hMSH2 y hMLH1 (Herman *et al*., 1998). Como fue mencionado en la introducción, se demostró que el carcinoma HNPCC presenta inestabilidad de microsatélites (MSI) porque las secuencias repetitivas son más susceptibles a acumular errores de replicación cuando el sistema de reparación es deficiente. Sin embargo, también se ha postulado que las mutaciones en la línea germinal de los genes de reparación no son la causa principal de las adenocarcinomas en sentido estricto, sino que probablemente son aceleradores de los procesos malignos (Ilyas *et al.,* 1999). El incremento en la tasa de mutaciones permite la entrada de errores de replicación aleatorios, ocasionando la inestabilidad de microsatélites y la mutación aleatoria de genes, entre ellos oncogenes y genes supresores de tumores.

Las características cromosómicas de los tumores HNPCC son diferentes a la mayoría de los carcinomas colorrectales esporádicos. Sin embargo, existe un pequeño porcentaje de formas esporádicas (5-15%) que presenta el fenotipo de inestabilidad de microsatélites, el cual es característico de los tumores HNPCC (Cunningham *et al*., 1998). En este trabajo el 9% de los tumores colorrectales presentaron inestabilidad de microsatélites para los marcadores analizados, frecuencia que cae dentro del rango esperado para los carcinomas colorrectales esporádicos.

Es recomendable utilizar el panel de los cinco marcadores de Bethesda para la determinación de inestabilidad de microsatélites (Boland *et al.,* 1998). Sin embargo, ante la falta de tejido normal para la mayoría de los carcinomas, se utilizaron dos marcadores cuasi-monomórficos que presentan alta capacidad de predicción (Planck *et al.,* 2003). El marcador BAT 26 es reconocido por ser el marcador de inestabilidad más predictivo, con una especificidad entre el 93-100% (Hoang *et al.*, 1997; Dietmaier *et al*., 1997; Brennetot *et al.,* 2005). Examinado junto a BAT 40 conforman dos marcadores muy específicos de inestabilidad de alto grado (Dietmaier *et al*., 1997). Su fiabilidad radica en que los cambios de los alelos son más fáciles de reconocer a partir de estas secuencias, y por otra parte, las repeticiones mononucleotídicas son las más afectadas por los errores de replicación. Lamentablemente tuvo que descartarse a BAT34C4, otro marcador mononucleotídico y además monomórfico en la población, porque su efectividad de amplificación fue muy

baja. Para las muestras pareadas se amplificaron los marcadores adicionales D2S123 y D17S250, que no mostraron diferencias en los cinco carcinomas con muestras normales, al igual que BAT26 y BAT40.

Se ha reportado que los tumores colorrectales esporádicos que poseen inestabilidad de microsatélites presentan diferencias clínico-patológicas con los carcinomas sin MSI. Entre las características distintivas se destacan: Mayor prevalencia de MSI en tumores del colon derecho, metafases frecuentemente diploides, histología mucosa secretante y pobremente diferenciada. Los tumores MSI+ también se caracterizan por tener infiltrados linfocíticos comparables a los de la colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. En cuanto a la clasificación TNM son en general tumores grandes, por ejemplo en T3, pero menos agresivos, ya que tienen menos involucramiento de los nódulos linfáticos (N0) y recurrencia reducida de metástasis (M0) (Söreide *et al.,* 2006).

Aunque el número de tumores con inestabilidad fue muy bajo, los resultados están en concordancia con las características publicadas. Hubo más mujeres con tumores MSI que hombres, y también fueron más prevalentes en estadíos tempranos del cáncer colorrectal. En este sentido, la mitad de todos los casos con MSI se reportaron en el estadío I (Tabla 3.19). En contraposición, no hubo tendencia a un fenotipo menos diferenciado o a la ubicación más proximal en carcinomas MSI.

Referente a la relación existente entre el fenotipo MSI y la activación de los oncogenes, se sabe que las mutaciones del gen k-*ras* ocurren en alrededor del 20% de las carcinomas colorrectales con inestabilidad de microsatélites (Domingo *et al.,* 2004; Oliveira *et al.,* 2003; Oliveira *et al.,* 2004) y cerca del 35% de los carcinomas estables (MSS) (Oliveira *et al.,* 2004; Oliveira *et al.,* 2007). Estos datos son acordes a los obtenidos en el presente trabajo, donde se detectó una prevalencia de mutaciones de *k-ras* en el 12,5% (1/8) de los tumores MSI y 25% en los estables (MSS). En el caso de la amplificación de c-*myc*, hubo mayor prevalencia de inestabilidad de microsatélites en tumores con bajo nivel de amplificación (25%) que aquellos sin amplificación (10%). Sin embargo, las muestras con alto grado de amplificación presentaron prevalencias similares entre los tumores MSI (12,5%) y MSS (15%). Trabajos anteriores demostraron que las ganancias cromosómicas

del brazo cromosómico 8q y 8q23-24 son alteraciones genéticas comunes de carcinomas colorrectales tanto en MSI como en MSS (Li *et al.,* 2003; Camps *et al.,* 2006).

Al analizar los marcadores de inestabilidad BAT26 y BAT40 por separado, se observó que en general los tumores mutados no presentaron altos niveles de inestabilidad (excepto para la amplificación de c-*myc* en tumores con BAT26 inestable). Aunque no se conozcan en detalle los mecanismos moleculares que subyacen la proliferación neoplásica en los tumores con inestabilidad de microsatélites, parece ser que la presencia conjunta de rearreglos cromosómicos y el fenotipo MSI conformarían un trasfondo de alteraciones genéticas muy deletéreo para que el cáncer progrese. Sin embargo, estudios descriptivos demuestran que el cáncer colorrectal es una enfermedad heterogénea con muchos fenotipos moleculares, y gran parte de los tumores con inestabilidad de microsatélites también presentan patrones variados de inestabilidad cromosómica (Camps *et al.,* 2006).

Respecto a la presencia del Papilomavirus humano, la inestabilidad de microsatélites no estuvo asociada con la presencia del ADN del VPH. Tampoco se detectó asociación cuando los marcadores fueron examinados individualmente. Estos resultados están de acuerdo con otros recientemente publicados por Deschoolmeester y col. (2010), quienes reportaron una prevalencia de tumores MSI un poco menor que la de este trabajo, de 5,6% (13/232). La metodología utilizada para estimar la inestabilidad también consistió en la amplificación de un set de marcadores cuasi-monomótficos sin ADN control. Los autores concluyeron que el VPH no estaba asociado al la inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal.

4.11.2 Amplificación génica de c-*myc* y cáncer colorrectal

El proto-oncogén *c-myc* es un factor de transcripción multifacético que regula un gran número de genes involucrados en la progresión celular. Además, es un elemento crucial en el equilibro entre la proliferación y apoptosis, y su expresión inapropiada puede llevar este balance a la dirección equivocada. Los mecanismos más comunes de activación de *c-myc* son la sobre expresión y/o amplificación génica, eventos característicos de tumores

epiteliales y asociados a fenotipos agresivos y pobremente diferenciados (Bonilla *et al.,* 1988; Sargent *et al.,* 1996; Rao *et al.,* 2000; Fearon y Gruber, 2001; Al-Kuraya *et al.,* 2007). Aunque se sabe que la activación de *c-myc* es uno de los pasos de la carcinogénesis colorrectal, el papel específico de este oncogén no ha sido clarificado. Aparentemente, mutaciones en APC y acumulación nuclear de beta-catenina pueden ocasionar la sobre expresión de *c-myc* en neoplasias colorrectales. Este descubrimiento parece explicar la expresión aumentada de *c-myc* en la carcinogénesis temprana. Por otra parte, también se ha demostrado una correlación entre anormalidades genéticas de *c-myc* a nivel del ADN y el potencial maligno. Sin embargo, los mecanismos que subyacen dicha amplificación génica permanecen ocultos (Rochlitz *et al*., 1996; Obara *et al*., 2001).

Un número creciente de trabajos han sugerido que la amplificación de *c-myc* o su segmento cromosómico (8q24) es un suceso frecuente en diferentes fenotipos moleculares del cáncer colorrectal (Li *et al*., 2003; Camps *et al*., 2006). La amplificación de *c-myc* presenta diversos grados y los niveles más bajos fueron relacionados con una mejor respuesta al tratamiento (Heerdt *et al.,* 1991; Augenlicht *et al.,* 1997). Como fue mencionado, los mecanismos que causan la amplificación génica de *c-myc* son desconocidos. Por ahora, se ha presentado evidencia que demuestra que la activación del oncogén es específica de locus y está asociada a las mutaciones en *p53* (Masramon *et al*., 1998; De Angelis *et al*., 1999). Estos datos son consistentes con la falta de amplificación de otros genes ubicados en proximidad al locus *c-myc* (*c-mos,* 8q24), como lo demuestran las comparaciones mediante análisis citogenéticos y de Southern Blot (Augenlicht *et al.,* 1997).

Las líneas celulares también han sido examinadas en búsqueda de una relación entre el grado de amplificación de c-*myc* y la tumorigenicidad (Lavialle *et al.,* 1988, Lavialle *et al.,* 1989). En ensayos con clones tumorigénicos y no tumorigénicos con múltiples copias de *c-myc* se encontró que el gen respondía promoviendo la apoptosis y proliferación ante la falta de suero, respectivamente. El rol dual del gen puede explicarse con la presencia de factores secundarios desconocidos (Donzelli *et al.,* 1999). Se ha sugerido que la activación de *c-myc* tiene un rol en la progresión tumoral, en la enfermedad recidivante y

en el proceso de metástasis. Sin embargo, su activación ha permanecido como un factor variable respecto de distintos parámetros en las neoplasias colorrectales (Diez Alonso *et al.,* 2001).

En la actualidad existen un número apreciable de trabajos que analizan el estado de *c-myc* en tumores colorrectales. En general, los valores más altos de activación son detectados en las estadíos más avanzados, y poca o ninguna amplificación en las fases iniciales (Kozma *et al*., 1994; Obara *et al*., 2001). La prevalencia de amplificación génica en tumores del colon es detectada en 0-55% de los casos, dependiendo del estadío y metodología. Además de la asociación reportada en estadíos más avanzados de la enfermedad, algunos estudios demostraron que la activación de *c-myc* se encuentra asociada a tumores del colon izquierdo, a un menor grado de diferenciación histológica y al tamaño de la formación (Burt, 1988; Heerdt *et al*., 1991; Augenlicht *et al.,* 1997; Brabletz *et al.,* 2000; Pérez Mota, 2003).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la amplificación de *c-myc* es un suceso frecuente en el colon, pudiendo detectarse en todos los estadíos tumorales y en un menor porcentaje de adenomas. Los valores de amplificación tuvieron un rango del 20% en adenomas al 27,1% en adenocarcinomas colorrectales. Sin embargo, todos los adenomas positivos portaron amplificaciones de bajo grado, mientras que la mitad de los carcinomas eran de alto grado. De acuerdo a la histología de los adenomas, se pudo detectar mayores prevalencias de activación de *c-myc* en adenomas con alto y moderado grado de displasia, aunque las diferencias no fueron significativas. Tampoco hubo una correlación con la histología de los adenomas (velloso-tubular). En este sentido, estudios de seguimiento indican que la ganancia de la porción cromosómica 8q23-telómero está fuertemente asociada a la progresión de adenoma a carcinoma, independientemente del grado de displasia (Hermsen *et al.,* 2002).

Al igual que otros trabajos, la prevalencia de amplificación de *c-myc* fue aumentando a lo largo de los estadíos de la carcinogénesis, llegando a su máximo grado en el estadío III, y cayendo en la fase metastásica. Del total de amplificaciones de alto grado, el 70% correspondió al estadío III. Estos resultados sostienen que los carcinomas con nódulos

linfáticos positivos presentan un alto nivel de inestabilidad cromosómica. Un trabajo anterior había propuesto a la amplificación de la región 8q24 como un marcador característico de la invasión de nódulos linfáticos, y predictivo de metástasis a distancia (Ghadimi *et al.,* 2003).

También se detectó una asociación significativa entre la amplificación de *c-myc* y los carcinomas colorrectales pobremente diferenciados, un valor que está de acuerdo a los hallazgos publicados anteriormente (Heerdt *et al*., 1991; Kozma *et al*., 1994). No obstante, no se pudo comparar el grado de mucosecreción de los tumores con *c-myc* porque esa información no fue registrada.

Los valores de amplificación génica obtenidos en este trabajo son comparables a los presentados por Augenlicht y col. (1997), quienes utilizaron sondas de *c-myc* y β-*globina* en blots hibridados en membranas y estimaron la cantidad relativa de estas secuencias en una cohorte de 149 pacientes con carcinoma colorrectal (Dukes B y C). El 32% de los pacientes presentaron alguna forma de amplificación de *c-myc*. Otros resultados similares fueron reportados por Heerdt y col. (1991), quienes relacionaron esta alteración con tumores pobremente diferenciados. Otros autores detectaron prevalencias más elevadas de amplificación génica (Kozma *et al.,* 1994; Rochlitz *et al.,* 1996; Masramon *et al.,* 1998; De Angelis *et al*., 1999; Knösel *et al*., 2002; He *et al*., 2003). En contraposición, prevalencias más bajas de amplificación fueron reportadas por: Obara *et al.,* 2001; Kruszewski *et al*., 2004; Al Kuraya *et al*., 2007, y en algunas series de casos de cáncer colorrectal no hubo incremento alguno en el número de copias de *c-myc* (Erisman *et al.,* 1985; Smith *et al.,* 1993; Fearon y Dang, 1999; Xie *et al.,* 2003).

De manera interesante, los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que los carcinomas más pequeños presentan una tendencia hacia la amplificación de *c-myc*. Además, cuando se analizó el grado de amplificación, los tumores menores a 4 cm constituyeron el mayor porcentaje de amplificaciones de alto grado. Aunque el significado de este hecho aún queda por resolverse, trabajos previos han reportado una correlación entre la activación de *c-myc* y el tamaño de los adenomas del colon, donde se encontró que aquellas proliferaciones mayores a 0,8 centímetros presentaban una expresión

aumentada de *c-myc* y *β-catenina*. Brabletz y col. (2000) hipotetizaron que estos genes estarían relacionados con el tamaño del tumor mediante mecanismos asociados a la vascularización. Los mismos autores sugirieron que habría que considerar otros factores genéticos o histopatológicos que acompañarían la activación de *c-myc* y que estarían relacionados a la angiogénesis.

De particular interés ha resultado la relación de *c-myc* con los carcinomas asociados a la infección por el VPH. Como se mencionó, hasta la fecha no se identificó un sitio preferencial cromosómico o motivo nucleotídico de integración, aunque la inserción de ADN del VPH en sitios circundantes a *MYC* ha sido repetidamente observada en cánceres asociados al VPH (Couturier *et al.,* 1991; Sastre-Garau *et al.,* 2000). La integración del genoma viral en sitios cercanos del locus *c-myc* podría estar relacionada con la amplificación, rearreglos génicos o desregulación de la expresión (Couturier *et al.,* 1991; Sastre-Garau *et al.,* 2001; Herrick *et al*., 2005).

Evidencia experimental indica que la integración del VPH 18 demostró ser un fenómeno no al azar en carcinomas cervicales y líneas celulares derivadas, ocurriendo preferencialmente dentro de la banda cromosómica 8q24, cercana al locus del proto oncogén *c-myc* (Dürst *et al.,* 1987; Ferber *et al.,* 2003). Una asociación entre la activación de *c-myc* y presencia de ADN del VPH fue demostrada para tres líneas celulares derivadas del cáncer de colon anteriormente (Cheng *et al.,* 1991). No obstante, ningún trabajo ha comparado esta relación en biopsias de tumores del colon y recto. Cuando se analizaron las muestras positivas para VPH, no se encontraron diferencias significativas en referencia a la activación de *c-myc,* tampoco con las muestras evidencia de VPH integrado.

De acuerdo a los resultados, la amplificación de *c-myc* es detectada de manera frecuente en adenomas y carcinomas colorrectales, aunque en diferentes grados. Esta se encuentra relacionada con la progresión tumoral, en especial a la infiltración de los nódulos linfáticos, y a un fenotipo pobremente diferenciado. Por otro lado, no se encontró correlación entre la infección por VPH y el incremento de copias génicas de *c-myc*, tanto

en adenomas como en carcinomas. Estos datos sugieren que la activación del oncogén es independiente a la presencia de genomas foráneos en tejidos colorrectales.

4.11.3 Cáncer colorrectal y mutaciones del codón 12 y 13 de k-*ras*

Se ha demostrado que las mutaciones en los genes *ras*, y en particular *k-ras*, son eventos tempranos en la carcinogénesis colorrectal (Vogelstein *et al.,* 1988). *K-ras* participa de la vía de señalización RAS-RAF-MEK-ERK-MAP, que media el comportamiento celular en respuesta a señales de crecimiento (Peyssonnaux y Eychène*,* 2001). La razón por que se eligen los codones 12 y 13 para el análisis radica en que solamente las mutaciones en estos codones (más el codón 61) modifican *k-ras* a una forma permanentemente activa (modifican la enzima y no puede liberar GTP para inactivarse) (Campbell *et al.,* 1998). Por otro lado, según los datos del *Catalogue of Somatic Mutations of Cancer* (COSMIC), se ha reportado que la mayoría de las mutaciones de *k-ras* en carcinomas colorrectales corresponden a alteraciones presentes en el codón 12 (79%), seguido del codón 13 (18%), y una frecuencia mucho menor del codón 61 (0,71%) (Futreal *et al.,* 2009).

Más de 70 grupos de investigación han examinado la importancia de las mutaciones del gen k-*ras* en el cáncer colorrectal. La evidencia indica que esta alteración genética precede a la transformación neoplásica de adenoma tardío a carcinoma *in situ* (Vogelstein *et al.,* 1988). Sin embargo, no hay un acuerdo en como las mutaciones de *k-ras* se relacionan con las características clínicas e histo-patológicas. Por ejemplo, la capacidad pronóstica que tienen las alteraciones de *k-ras* es objeto de debate, mientras que algunos autores encuentran significancia, otros no lo hacen (Benhattar *et al*., 1993, Moerkerk *et al*., 1994; Andersen *et al*., 1997; Andreyev *et al*., 2001). Aún estudios que examinan la asociación entre la presencia de las mutaciones de *k-ras* y estadíos colorrectales, histología, sitio del tumor, edad o género, no encuentran un consenso (Finkelstein *et al.,* 1993; Hayakumo *et al.,* 1995; Andreyev *et al.,* 1997; Tortola *et al.,* 1999; Andreyev *et al.,* 2001). Recientemente se ha hecho un gran estudio para determinar la relación de *k-ras* con diversas características, y los autores reportaron que las mutaciones específicas

glicina a valina en el codón 12 serían un indicador de una progresión agresiva, en especial en individuos con diagnóstico Dukes C (Andreyev *et al.,* 2001; Russo *et al.,* 2005).

La prevalencia de las mutaciones de *k-ras* en el grupo de adenomas fue menor a otros estudios publicados sobre adenomas esporádicos, aunque mayor que aquella presentada en pacientes que padecen el Síndrome de Poliposis Familiar (FAP) (Vogelstein *et al.,* 1988; Glarakis *et al.,* 1998; Yuen *et al.,* 2002; O'brien *et al.,* 2006). Se ha reportado que las mutaciones en k-*ras* se encuentran asociadas a los adenomas de mayor riesgo, como por ejemplo pólipos de histología vellosa o mixtos y aquellos con displasia alta o transformación focal a adenocarcinoma (Yuen *et al.,* 2002). En concordancia, en el presente trabajo la activación de *k-ras* estuvo relacionada significativamente con adenomas de alto y moderado grado de displasia, y totalmente ausente en adenomas con displasia leve ($p<0,05$). No se registró asociación de *k-ras* con la histología de los adenomas, su ubicación anatómica, o presencia del ADN del VPH.

Acerca de los carcinomas colorrectales, las mutaciones de *k-ras* comprendieron el 24% de los casos, una incidencia que está acorde a la literatura publicada sobre el cáncer colorrectal (Yuen *et al.,* 1997; Andreyev *et al.,* 2001). No se observaron diferencias en las frecuencias de mutaciones de acuerdo al sitio del carcinoma o a la severidad de los tumores, donde los estadíos II y IV fueron los más afectados. Resultados similares fueron reportados por el grupo RASCAL, un estudio colaborativo realizado sobre el impacto de las mutaciones de *k-ras* en pacientes con cáncer colorrectal (Andreyev *et al.,* 1998; Andreyev *et al.,* 2001). Examinando un gran número de pacientes, los autores no encontraron una correlación entre *k-ras* y el sexo, el sitio del tumor o el estadío del cáncer colorrectal (rango 33-38% para todos los estadíos), pero si reportaron una asociación fuerte entre las mutaciones de *k-ras* y los adenocarcinomas bien diferenciados o moderadamente diferenciados. En el presente estudio se encontró una relación opuesta entre las mutaciones y el grado de diferenciación, respaldando la hipótesis que sostiene a la inactivación de *k-ras* como una característica de tumores agresivos y poco

diferenciados. Al igual que los adenomas, la relación entre el ADN del VPH y la activación de *k-ras* arrojó resultados negativos.

4.12 Pólipos hiperplásicos

Es interesante mencionar que el grupo de pólipos hiperplásicos también reportó mutaciones de *k-ras* en 2 de 24 (8,3%) muestras y amplificación leve de de *c-myc* en el 10%. Esta observación está de acuerdo con trabajos recientes que sostienen que las alteraciones genéticas también suceden en pólipos hiperplásicos típicos y aquellos con algún grado de displasia, además de los adenomas típicos (Legget *et al.,* 2001; Bardi y Heim, 2003; Wynter *et al*. 2004). También se detectó ADN del VPH, aunque su presencia no estuvo relacionada con las alteraciones genéticas, y fue la más baja de todos los grupos estudiados. Hasta hace poco se pensaba que los pólipos hiperplásicos eran las expresiones más inocuas de los pólipos serratos. Sin embargo, observaciones recientes indican que algunas variantes de los pólipos serratos podrían esconder un potencial maligno. La principal evidencia de esta teoría es la existencia de los pólipos mixtos, una forma intermedia que sugiere una transición desde pólipos hiperplásicos a adenomas, o adenomas serratos (Longacre *et al.,* 1990; Iino *et al.,* 1999).

Wynter y col. (2004) han propuesto dos vías alternativas de carcinogénesis colorrectal, alternativas a la teoría de adenoma-carcinoma, y que incluyen los pólipos hiperplásicos y similares. En la primera, se propone que un subgrupo de adenomas serratos serían los precursores de algunos casos esporádicos de cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélites MSIH. Las lesiones precursoras tendrían altos grados de metilación de islas de CpG, inactivación del gen hMLH1, ausencia de mutaciones en el gen k-*ras* y displasia más severa. La segunda vía fue postulada como la precursora de al menos un subgrupo de casos esporádicos de cáncer colorrectal esporádico sin inestabilidad de microsatélites. De manera similar, las lesiones precursoras de esta vía son los adenomas serratos, pero sin altos grados de metilación y, contrariamente, con mutaciones en el gen *k-ras*.

4.13 Cáncer colorrectal y polimorfismo del codón 72 del gen *p53*

El polimorfismo de *P53* del codón 72 es un cambio de nucleótido simple que resulta en el reemplazo de una arginina por una prolina en la secuencia aminoacídica de la proteína codificada. Este pequeño cambio en la secuencia posee importante consecuencias, al menos demostradas *in vitro*, en propiedades químicas y funcionales de la proteína. Estudios tempranos revelaron que la variante prolina es menos eficiente que la arginina en algunas actividades relevantes de p53, como por ejemplo la supresión de la transformación celular y la inducción de apoptosis (Thomas *et al.,* 1996).

Evidencia adicional fue reportada por Storey y col. (1998), quienes demostraron que la variante alélica arginina del gen *p53* (codón 72) es más susceptible a la degradación por la proteína E6 del VPH que la forma prolina, y que pacientes con la primera isoforma poseen un riesgo incrementado de cáncer cervical. Sin embargo, los trabajos subsecuentes han resultado controversiales, algunos apoyando y otros refutando dicha hipótesis (Jee *et al.*, 2004; Koushik *et al.,* 2004). Estudios experimentales han demostrado que ambas variantes difieren en su funcionalidad, independientemente de la presencia o ausencia de la infección por VPH, y que el alelo p53Arg es hasta cinco veces más eficiente en activar las vías pro-apoptóticas (Dumont *et al*., 2003).

Se han expuesto varias hipótesis para explicar este comportamiento molecular. Una es que la variante arginina de *p53* posee una mayor asociación con las mitocondrias que la variante prolina, y podría interactuar más estrechamente con el inicio de la vía de muerte celular programada. Por otro lado, Marin y col. (2000) han sugerido que el polimorfismo en el codón 72 influencia la capacidad de p53 para formar complejos estables con p73 (homólogo de p53), perdiendo la capacidad de formar de complejos de unión al ADN, y alterando la entrada a apoptosis.

Prácticamente todos los tipos de carcinomas han sido estudiados en búsqueda de una posible asociación entre el polimorfismo del codón 72 del gen *p53* y susceptibilidad a la carcinogénesis. Debido a su conocida asociación con el VPH, el cáncer cervical fue el más estudiado. Un meta análisis reportó un leve aumento en el riesgo de cáncer cervical

para portadores de la variante arginina, especialmente en el grupo de adenocarcinomas (OR = 1,5) (Jee *et al.,* 2004). En otro meta análisis efectuado el mismo año también se estimó un pequeño incremento en el riesgo de cáncer cervical para la variante arginina, aunque este se perdió cuando se excluyeron aquellos estudios que no estaban en equilibrio de Hardy Weinberg en el grupo de controles (Koushik *et al.,* 2004). Resultados similares fueron presentados por Klug y col. (2009). Otros meta análisis conducidos sobre otros tipos de cánceres revelaron asociación significativa con la variante arginina de *p53* en carcinomas de cabeza y cuello (Hiyama *et al.,* 2008) y carcinomas de células escamosas de esófago (Hiyama *et al.,* 2007). En contraposición, el polimorfismo de *p53* no estuvo relacionado con los carcinomas orales (Zhuo *et al.,* 2009).

Pocos trabajos fueron presentados hasta el momento sobre el polimorfismo del codón 72 de *p53* y el cáncer colorrectal, la mayoría de estos no encuentran un efecto sobre el cáncer, aunque otros resaltan un papel significativo en los casos de HNPCC y de casos esporádicos si se ajustan los datos a variables adicionales (Murata *et al.,* 1996; Sayhan *et al.,* 2001; Jones *et al*., 2004; Krüger *et al*., 2005; Talseth *et al.,* 2006; Talseth *et al.,* 2007; Jia *et al.,* 2007). En este trabajo no se pudo demostrar una relación entre los genotipos y la neoplasia colorrectal cuando se compararon controles con adenomas o carcinomas. Aún más, las frecuencias alélicas fueron muy similares en casos y controles. Estos resultados están en contraposición con un trabajo preliminar realizado por nuestro grupo (Pérez *et al*., 2006). Es probable que la diferencia entre ambos estudios resida en la metodología y en el tamaño muestral, mientras que en primero se utilizó amplificación alelo específica, la tecnología de pirosecuenciación es el método recomendado para análisis de SNPs debido a su precisión y controles internos.

Otra posible fuente de variación es el uso de los adenocarcinomas en lugar de muestras de sangre, por la posibilidad de pérdida alélica en la tumorigénesis y subsecuente sobre estimación de los individuos homocigotas. En casi todos los casos se obtuvo más de una muestra por individuo, que fueron remitidas inicialmente junto a los tumores. De todas formas, la metodología usada para la detección de *p53* se basó en un procedimiento de genotipificación muy sensible, donde bajas copias de un alelo no serían afectadas por la

presencia de gran cantidad de copias del otro. Con respecto a este tema, parece ser que las mutaciones y re-arreglos de *p53* constituyen eventos raros en carcinomas colónicos asociados a la infección por VPH (Buyru *et al.,* 2003).

Las frecuencias alélicas del codón 72 del gen *p53* varían según las regiones geográficas, siendo la variante arginina la más frecuente, con un rango de 0,6 a 0,85 (América del Sur, EEUU, Europa) (Beckman *et al.,* 1994; Josefsson *et al.,* 1998; Helland *et al.,* 1998; Hildesheim *et al.*, 1998; Dybikowska *et al.*, 2000; Ojeda *et al.,* 2003). Aunque los resultados de este trabajo no revelaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas de *p53* de las muestras normales en comparación con los adenocarcinomas, se demostró una leve tendencia en los adenomas de colon hacia el genotipo heterocigota de p53 Arg/Pro. De manera similar, tampoco se pudo encontrar diferencias significativas en un estudio de casos y controles llevado a cabo en Irán (Mojtahedi *et al.,* 2010).

En otros estudios, Sayhan y col. (Turquía) reportaron que la frecuencia génica de p53Arg estuvo alrededor de 0,6 en el grupo de pacientes con carcinoma de colon, sin hallar diferencias significativas con el grupo control (Sayhan *et al.,* 2001). En Japón, Murata y col. (1996) no encontraron diferencias entre la población normal y 115 adenocarcinomas colorrectales (p53Arg=0,6). Resultados similares fueron presentados en Alemania por el consorcio nacional de HNPCC cuando analizaron una cohorte de carcinomas colorrectales esporádicos, aunque las frecuencias génicas fueron más cercanas a este trabajo (p53Arg=0,77) (Krüger *et al*., 2005). En Estados Unidos, por otra parte, se reportó una alta frecuencia génica (0,85) para la variante arginina en pacientes con cáncer colorrectal que provenían de familias con HNPCC (Jones *et al*., 2004).

En un estudio conducido en China, Jia y col. (2007) estudiaron un panel de polimorfismos de *p53* en un gran número de casos de cáncer colorrectal, pero no encontraron diferencias significativas cuando analizaron el polimorfismo del codón 72. Sin embargo, cuando ajustaron los datos por factores relacionados a los hábitos de vida encontraron que la variante prolina estaba asociada al cáncer colorrectal, especialmente en los consumidores de alcohol. En otro estudio, se reportó una asociación significativa para el genotipo Arg/Pro y Pro/Pro en pacientes con carcinoma colorrectal, y de manera

interesante esta aumentó cuando fue considerado el consumo de alcohol (Zhuo *et al.,* 2007). La asociación entre el alelo prolina de p53 y el riesgo de cáncer ya había sido documentada anteriormente. En meta análisis realizados recientemente se propuso a la variante prolina como un alelo de susceptibilidad de baja penetrancia para el desarrollo de cáncer de pulmón (Li *et al.,* 2009), y de ciertos tipos histológicos de cáncer gástrico en la población asiática (Zhou *et al.,* 2007).

En Alemania, Krüger y col[A]., (2005) diseñaron un estudio de corte transversal donde compararon los genotipos de *p53* en tres grupos: a)- Pacientes con diagnóstico de carcinoma esporádico colorrectal sin inestabilidad de microsatélites, b)- Pacientes con cáncer colorrectal hereditario, y c)- un grupo control. No se hallaron diferencias significativas entre estos grupos, aunque si se encontró una relación entre la variante *p53* Arg/Arg y la edad de inicio del cáncer colorrectal hereditario en los pacientes HNPCC que presentaban alteraciones en los genes de reparación MLH1 y MSH2. Para explicar estas observaciones, los autores especularon que los genotipos p53Arg/Arg modulan la agresividad del fenotipo de las neoplasias que surgen a partir de las mutaciones de la línea germinal en los genes de reparación de ADN. Esta observación ha sido anteriormente sugerida en grupos de cáncer colorrectal familiar (Jones *et al*., 2004), aunque el número de individuos donde inicialmente se planteó la hipótesis fue relativamente bajo (n=47).

Con el objeto de comprobar si dicha observación se reproduce en un grupo de pacientes con cáncer colorrectal esporádico, se ha realizado un estudio de comparación de curvas de supervivencia Kaplan-Meier entre los genotipos de *p53* y la edad al diagnóstico del cáncer colorrectal. Al igual que los trabajos de Krüger y colaboradores, no hubieron diferencias significativas en la edad de aparición del cáncer colorrectal esporádico. El inicio o diagnóstico tuvo una media de 65 años para p53Pro/Pro, 63 años para p53Arg/Pro y 58 años para p53Arg/Arg. Estos datos se encuentran en el mismo rango que los publicados hasta la fecha para el codón 72 de *p53* y el cáncer colorrectal (Krüger *et al*[A]., 2005). Una diferencia apreciable es que la variante heterocigota fue asociada a la edad de inicio de HNPCC, mientras que aquí se observó que la variante con promedio de menor

edad era p53Arg/Arg. Sin embargo, estudios más recientes indican que la relación entre el polimorfismo de *p53* y la edad de inicio del cáncer colorrectal es más compleja que lo expuesto primeramente (Talseth *et al*., 2006).

Los resultados indican que los portadores de la variante arginina de *p53* no presentan un riesgo incrementado para el desarrollo del cáncer colorrectal. A su vez, el inicio del cáncer colorrectal esporádico no parece tener una relación con el genotipo de *p53*. La posibilidad de que este polimorfismo esté asociado al cáncer colorrectal en individuos que presentan inestabilidad de microsatélites no pudo realizarse por el bajo número de tumores MSI+.

Adicionalmente, se ha investigado si existe un incremento en el riesgo de infección por VPH de acuerdo al perfil genotípico. No hubo diferencias significativas en la distribución de genotipos de *p53* de acuerdo a la infección por VPH. El análisis de los tipos virales por separado tampoco presentó asociación significativa. Estos datos están de acuerdo a los revelados por Sayhan y col (2001) en Turquía, quienes no encontraron asociación entre el polimorfismo de *p53* y la infección por VPH en un grupo de pacientes con cáncer colorrectales.

Es claro que se necesitan más estudios para establecer el papel del polimorfismo del codón 72 sobre el cáncer colorrectal esporádico. Sin embargo, los resultados no indican un aumento en el riesgo oncogénico. Como fue expuesto por Jia y col. (2007), el efecto del polimorfismo podría estar enmascarado o actuar en conjunto con otros factores de riesgo, como por ejemplo la dieta, consumo de alcohol o el cigarrillo.

4. 14 Cáncer colorrectal y polimorfismo del codón 462 del gen *RNASEL*

La proteína RNase L, codificada por *RNASEL*, es una endorribonucleasa expresada ubicuamente que actúa en la vía 2-5A regulada por interferón (Zhou *et al.,* 1993). Se trata de un intermediario de actividades antivirales y pro-apoptóticas, cuya actividad más característica que se conoce es el clivaje de del ARN ribosomal 28S y 18S (Silverman *et al.,* 2002). Varias líneas demostraron que RNase L posee un rol importante en la

inducción y regulación de la apoptosis en respuesta a infecciones virales y diversos estímulos externos. Además, se ha propuesto a *RNASEL* como un gen supresor de tumores (Diaz-Guerra *et al.,* 1997; Castelli *et al.,* 1997; Silverman *et al.,* 2003).

El polimorfismo del codón 462 de *RNASEL*, en particular, ha despertado gran interés por su frecuente asociación con el cáncer de próstata familiar y esporádico (Madsen *et al.,* 2008). Evidencia proveniente de experimentos *in vitro* ha demostrado que la variante Gln posee una actividad enzimática tres veces menor que la variante arginina, y menos eficiencia en la inducción de apoptosis en ensayos con líneas celulares, permitiendo a las células escapar de una potente vía apoptótica (Xiang *et al.,* 2003). Por su papel como gen supresor de tumores, varios autores han postulado que Rnase L podría estar asociado a otras enfermedades malignas, además del cáncer de próstata. En este sentido, los niveles de la proteína RNase L se encuentran sobre expresados en tumores colorrectales, lo que parece ser un evento temprano en la carcinogénesis colorrectal (Wang *et al*., 1995).

Hasta la fecha, pocos estudios han sido publicados con la variante Arg462Gln fuera del cáncer de próstata. En una gran serie de casos controles, no se encontró asociación entre el Arg462Gln y ocurrencia de cáncer de mama (2004). En contraposición, un ensayo llevado a cabo en Alemania sobre pacientes con carcinomas pancreáticos esporádicos y familiares reveló asociación significativa entre la prevalencia de Arg462Gln en controles (56%) y casos esporádicos, pero no en formas de cáncer con predisposición familiar (Bartsch *et al*., 2005). En dos estudios realizados sobre el cáncer colorrectal, no se ha encontrado asociación entre el polimorfismo 462 de *RNASEL* y familias con HNPCC. Sin embargo, todavía no se ha publicado ningún trabajo sobre el polimorfismo de *RNASEL* en cáncer colorrectal esporádico.

El Consorcio Alemán de HNPCC reportó una tendencia significativa en la edad de diagnóstico de acuerdo a los genotipos de *RNASEL*. Similar a lo que ocurre en el polimorfismo del codón 72 de *p53*, los portadores del alelo salvaje RnArg/Arg de *RNASEL* desarrollaron HNPCC a un edad más tardía que los otros genotipos (Krüger *et al*[B]., 2005; Krüger *et al*., 2007). Se ha postulado que este alelo mediaría la destrucción del tumor más

efectivamente que lo hace la variante polimórfica glutamina. Por lo tanto, más eventos de iniciación de tumores serían necesarios en los portadores del alelo salvaje.

En este trabajo no se han encontrado diferencias significativas en las frecuencias de los genotipos entre pacientes y controles, sugiriendo que el polimorfismo de 462 del gen *RNASEL* no posee algún rol en la iniciación de los tumores esporádicos. El cálculo de las edades promedio de diagnóstico mediante curvas de Kaplan-Meier tampoco arrojó diferencias significativas. En este sentido, el genotipo que presentó una menor edad de diagnóstico fue RnArg/Arg, en oposición a lo publicado para los casos de cáncer colorrectal hereditario no polipósico (Krüger *et al.,* 2005; Krüger *et al* 2007).

El rol de *RNASEL* en el cáncer colorrectal todavía es desconocido, y es posible que existan vía importantes que no han sido estudiadas. En la presente tesis se ha trabajado sobre pacientes con casos de cáncer colorrectal esporádico. Una pregunta intrigante es: ¿porqué el polimorfismo de Arg462Gln se encuentra asociado a casos de cáncer colorrectal familiar pero no esporádico?. Se ha postulado que las mutaciones germinales de los genes MSH2 y MLH1, comunes en HNPCC, estarían interviniendo en los eventos iniciadores de la carcinogénesis interactuando con *RNASEL*. Sin embargo, es necesaria más información experimental sobre las funciones del gen, por ejemplo, no se conoce como *RNASEL* actúa sobre el sistema inmune para contribuir al rechazo de tumores, o las vías inflamatorias en general (Silverman *et al*., 2002).

La actividad anti-viral ha llevado a estudiar a los polimorfismo de *RNASEL* en relación con carcinomas asociados a la infección por diversos virus, como el virus del Papiloma humano (Pandey *et al*., 2004). Recientemente se ha publicado una fuerte asociación entre la actividad truncada de *RNase L* y la infección por gamma retrovirus. En ese estudio, el ADN complementario de pacientes con cáncer de próstata de diferentes genotipos para *RNASEL* fue hibridado con un arreglo de oligonucleótidos conteniendo las secuencias más conservadas de todos los virus. El 40% de los pacientes homocigotas que portaban la variante 462Glutamina hibridaron secuencias pertenecientes al virus de la leucemia murina xenotrófica (XMLV), en comparación con solamente el 1,5% de los heterocigotos u homocigotas (Urisman *et al.,* 2006).

A pesar de la relación sospechada entre la función de RNase L e infecciones virales, solamente un estudio se ha realizado entre este polimorfismo y carcinomas asociados a VPH. Madsen y colaboradores (2008) han explorado varios polimorfismos de *RNASEL* en carcinomas de cabeza y cuello, de cuello uterino y de mama. En ninguno de los casos se encontró asociación con el polimorfismo Arg462Gln, pero si para otro polimorfismo de *RNASEL*, ubicado en rs3738579, cuya distribución fue asociada al cáncer de cuello uterino. En esta tesis se comparó la distribución de los genotipos de Arg462Gln de *RNASEL* respecto a los tumores positivos y negativos para el ADN del VPH. Los resultados sostienen que el riesgo de infección por VPH en los carcinomas colorrectales no se encuentra asociado al polimorfismo del codón 462 de *RNASEL*.

Finalmente, se realizó un estudio sobre las interacciones inter-alélicas entre los polimorfismos de los genes *p53* y *RNASEL* con el objeto de comprobar si ciertas combinaciones de genotipos proveían mayor riesgo para el cáncer colorrectal, para esto se utilizó el análisis de reducción de la multidimensionalidad (MDR) de las variables, que es un ensayo complementario a la regresión logística, diseñado especialmente para detectar interacciones y epistasis génicas. De acuerdo a los datos de distribución génica, ninguna de las combinaciones de ambos genotipos tuvo algún tipo de efecto en el cáncer colorrectal. Sin embargo, para comprobar la hipótesis de interacción entre ambos genes y los de reparación, sería interesante realizar un estudio sobre un gran número de tumores esporádicos con inestabilidad de microsatélites.

4.15 Valoración del VPH en el carcinoma colorrectal

La valoración de la causalidad de un agente microbiano en el desarrollo del cáncer presenta una serie de obstáculos. Las razones derivan de diversas causas, entre ellas las más importantes son: i) la mayoría de las infecciones son comunes en la población, o ubicuas, (Epstein-Barr, Virus de la Hepatitis, Papilomavirus), pero solamente un porcentaje pequeño de los individuos infectados desarrollan la forma respectiva de cáncer; ii) ningún carcinoma humano surge como un consecuencia aguda de una

infección, sino que el tiempo entre la infección primaria y el desarrollo del cáncer se encuentra en el orden de las décadas; iii) salvo raras excepciones, no hay síntesis de agentes infecciosos dentro de los carcinomas; iv) los carcinógenos químicos o físicos actúan usualmente como mutágenos, intervienen en la selección de mutaciones y frecuentemente poseen efectos sinérgicos con el agente infeccioso carcinogénico (zur Hausen, 2009). Hill (1965) ha sugerido que el criterio para valorar causalidad se base en los siguientes principios: Fuerza de la asociación, evidencia de dosis respuesta, consistencia, especificidad, relación temporal, plausibilidad biológica de la asociación y evidencia experimental.

Fuerza

El término fuerza se refiere a la magnitud de los riesgos relativos. La base teórica es que a mayores riesgos los factores de confusión ofrecerían menores sesgos y la asociación es presumiblemente más evidente. Sin embargo, en teoría una asociación débil puede ser a su vez causal. En este trabajo no hubo asociación significativa de la infección por VPH y el cáncer colorrectal, y el OR fue igual a la unidad cuando fue ajustado por edad (OR=1,6; OR_{EDAD}=1,07). Los trabajos que detectaron ADN del VPH en tumores colorrectales reportaron riesgos relativos que varían de 2 a 9. Sin embargo, los estudios que otorgan los mayores riesgos fueron realizados en poblaciones pequeñas, y la mayoría se trata de series de casos y no de casos controles.

Consistencia

Este criterio se refiere a las observaciones repetidas de una asociación, en diferentes poblaciones y bajo distintas circunstancias. Al contrario de los resultados presentados en este y otros estudios de tipo caso-control, la presencia del VPH en tejidos colorrectales es controversial, así como hay algunos grupos que no detectaron ADN del VPH en series numerosas de carcinomas colorrectales. La diferencia probable entre la disparidad en las prevalencias reportadas en diferentes poblaciones fue discutida anteriormente. Un caso similar puede describirse para otros tipos de cáncer de etiología discutida.

Especificidad

El criterio “una exposición - una enfermedad” debe expandirse en el caso del VPH ya que probablemente actúe un modelo más complejo que involucra múltiples tipos del virus en varios sitios de cáncer, cuyas frecuencias sugieren una desviación significativa del modelo de puro azar (Bosch *et al.,* 2002).

Temporalidad

No está evaluado el seguimiento de pacientes VPH positivos en adenocarcinomas colorrectales. Una respuesta a los interrogantes puede estar dada por el estudio de la persistencia de la positividad del VPH en la mucosa colónica. Debido al diseño de este estudio (casos-controles), no fue posible realizar una relación entre la positividad del ADN del VPH respecto al tiempo. El difícil acceso que se tiene a éste órgano, así como el tipo de tratamiento que se les otorga a estos pacientes hace que este tipo de estudios sean difíciles de llevar a cabo.

Coherencia y Analogía

El cáncer colorrectal ocurre en células epiteliales, pero los factores de riesgo para la infección por VPH en este epitelio no se conocen. El virus ocasiona cáncer en adenocarcinomas del cérvix y anales, por consiguiente podría ser potencialmente oncogénico. Sin embargo, la evidencia reportada sobre los carcinomas glandulares de regiones contiguas a los sitios asociados al VPH, como el endometrio uterino, no indica una asociación.

Ensayos previos han demostrado que se puede inducir metaplasia escamosa en adenocarcinomas colónicos luego de la transfección de ADN de VPH 16 en líneas celulares DLD-1 (Kinjo *et al.,* 2003), y también detectar actividad transcripcional de E7 en mucosa normal rectal y carcinomas escamosos, aunque no en un grupo de adenocarcinomas (Sotlar *et al.,* 2001); información adicional sobre la actividad de oncogenes E6/E7 de VPH de alto riesgo en la carcinogénesis colorrectal ha sido publicada recientemente (Ricciardi *et al*., 2009). Sin embargo, los ensayos fueron

realizados *in vitro* y no hay evidencia de que suceda *in vivo.* Un marcador de actividad funcional de las infecciones del Papilomavirus es la expresión de los oncogenes, que puede ser detectado comúnmente por inmunohistoquímica. La sobreexpresión de $p16^{INK4A}$ ha sido identificada como un marcador de infecciones que son relevantes biológicamente en carcinomas cervicales y de cabeza y cuello (Sano *et al.,* 1998; Wittekindt *et al.,* 2005). Sin embargo, su uso en adenocarcinomas colorrectales positivos podría resultar en confusión, principalmente porque este gen se halla frecuentemente hipermetilado en carcinomas colorrectales esporádicos (Ishiguro *et al*., 2006). En un trabajo presentado en Bélgica, los autores compararon tinción de $p16^{INK4A}$ en adenocarcinomas VPH positivos y negativos, sin encontrar relación alguna (Deschoolmester *et al*., 2010). Para evitar este inconveniente, hemos intentado detectar la expresión de E7 en adenocarcinomas colorrectales mediante inmunohistoquímica en nuestro laboratorio, pero los resultados fueron indeterminados debido a la unión inespecífica de los anticuerpos a productos de las células tumorales.

Salvando las diferencias, se puede hacer una analogía entre la detección del VPH en carcinomas rectales y adenocarcinomas del útero. Aunque se sabe que el VPH es sitio y tejido específico, puede detectarse en adenocarcinomas uterinos en un rango del 4% a más del 50% (Semczuk *et al*., 2000; Giatromanolaki *et al*., 2007). Los tipos virales VPH 16 y 18 pueden residir en este tipo de epitelio, del tipo simple o pseudo-estratificado, ciliado, y en estructuras glandulares sin provocar los cambios celulares característicos de la infección por VPH. Aún más, se ha demostrado que las lesiones glandulares del endocervix (adenocarcinoma *in situ* o invasivo) pueden portar VPH 16 y 18 sin tener la evidencia morfológica de multinucleación o atipia coilocítica, que es típica de este virus (Paquette *et al.,* 1993; Ferguson *et al*., 1998; Pirog *et al*., 2000).

Varios autores sospechan que el VPH podría originarse en el tracto genital inferior y ser meros pasajeros dentro del endometrio, aunque no se descartan zonas focales con diferenciación escamosa que los repliquen (Kealy *et al*., 1990; Giatromanolaki *et al*., 2007). De manera similar a los resultados de este trabajo, la presencia del VPH en neoplasias del endometrio no se relaciona con características clínico-patológicas como la

edad y otros factores (Semczuk *et al*., 2000; Zbroch *et al*., 2002). Además, parece que hay condiciones ambientales o geográficas que influencian la frecuencia de la detección del ADN del VPH en estos carcinomas (Semczuk *et al*., 2000), hecho que es sumamente curioso.

Desde otro punto de vista, si el VPH tuviera algún papel en el inicio del cáncer colorrectal habría que esperar también una relación entre la incidencia del cáncer colon secundario después del cáncer cervical. Hay unos pocos trabajos que tratan de la relación entre ambos tipos de cánceres. Un gran estudio de cohorte, con 21.222 pacientes no encontró un riesgo elevado de cáncer de colon luego de cáncer cervical, pero si luego de cáncer de ovario y endometrio si se toman en consideración ciertas edades de diagnóstico (Weinberg *et al*., 1999). Resultados similares fueron encontrados en un estudio de seguimiento de 101.734 pacientes estadounidenses con carcinomas ginecológicos (Rex, 2000), y en otro estudio con 1.101 pacientes que sufrían de cáncer cervical (Srinivasan *et al*., 2007).

En otro trabajo realizado en Noruega, los radios de incidencia estandarizada (SIR) de cánceres adquiridos luego del carcinoma cervical fueron de 1,22 (IC=1,16-1,3) para el cáncer de colon y de 1,84 (IC 1,72-1,98) para el cáncer anorrectal. Sin embargo, al dividir la cohorte de acuerdo al tratamiento recibido, se encontró que el riesgo incrementado para el cáncer de colon se obtenía solamente en las mujeres que habían recibido radioterapia (SIR=1,28), y no en otro tipo de tratamientos (SIR=0,99) (Chaturvedi *et al*., 2007). Estos datos revelan que el inicio del carcinoma del colon estuvo relacionado con la radioterapia y no compartiría una etiología común con el cáncer cervical.

En el mismo estudio, el cáncer anorrectal mantuvo el riesgo incrementado independientemente del tratamiento utilizado. Lamentablemente, los trabajos sobre este tema no dividen entre carcinomas de ano y recto, y por lo tanto se desconoce cuál es la contribución individual otorgada por cada sitio (Chaturvedi *et al*., 2007). En un trabajo más reciente, se encontró que el cáncer de colon presentó un radio de incidencia estandarizada de 1,2 luego del cáncer cervical de células escamosas y de 1,5 luego del

adenocarcinoma cervical, pero sin diferenciar entre mujeres tratadas con radioterapia y sin tratamiento (Chaturverdi *et al*., 2009).

Gradiente biológico

No evaluado

Datos experimentales

No evaluado, pero los resultados del impacto de la vacunación contra VPH estarán disponibles para todos los tipos de cánceres.

4.16 Comentarios finales y conclusiones

-La presencia del ADN del VPH en una proporción de muestras normales y carcinomas del colon fue demostrado en este trabajo, y se ha presentado evidencia indirecta sobre la posibilidad de integración en al menos una parte de los tumores colorrectales positivos.

-La presencia en todos los grupos analizados indica que la detección del virus es frecuente en la mucosa rectal, y elevada en comparación con otros sitios, pero de acuerdo a las diferencias no se encuentra asociada al cáncer colorrectal. Otra evidencia en contra de la asociación es que la prevalencia más baja de VPH fue detectada en los adenomas vellosos, que son los estadíos pre malignos del carcinoma colorrectal.

-Antes de realizar comparaciones con otros sitios, hay que tener en cuenta que en la mayoría de los casos se tuvo la necesidad de realizar PCR anidada en bajas condiciones de estringencia, como también de analizar varias biopsias por paciente, lo que indica que el Papilomavirus se encuentra en muy bajas copias en estos sitios. Estos datos apuntarían más a la presencia del virus en unas pocas células del tumor, y no a infecciones productivas.

-Es probable que las partículas del Papilomavirus sean pasajeros del tracto gastrointestinal, probablemente originados en el canal anal o perineo, o por ingestión de

material contaminado. Una posibilidad que fue sugerida anteriormente es que el arrastre de material infectado en el momento de la colonoscopía/endoscopía pudo haber contaminado la toma de muestras (AIDS Patient Care, 2003), o generado infecciones temporarias, persistiendo por una rápida integración viral. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la replicación del virus pude ocurrir en zonas de metaplasia escamosa focal o hiperproliferativas del colon y recto; y por otra parte, no es tan infrecuente la extensión de la zona de transición anorrectal a regiones más internas del recto, que es un sitio normalmente infectado por VPH en la población general. Tampoco hay que descartar que al menos una parte de la variación entre estudios se deba a contaminación en el proceso de amplificación, aunque se tomaron medidas rigurosas y amplificaron varias secuencias del genoma, la PCR anidada es una técnica extremadamente sensible.

- Es intrigante la inconsistencia sobre la presencia del ADN del VPH en carcinomas colorrectales, la que otorga un papel muy cuestionable del Papilomavirus en el colon. Además de las amplias variaciones técnicas inter-estudios mencionadas, creemos que su presencia se encuentra estrechamente ligada a las condiciones micro-ambientales colónicas que son propias de las poblaciones (variaciones genéticas), de los factores dietarios o de hábitos de vida (variaciones socio-geográficas), y a una interacción entre ellas.

-Si el VPH se encuentra involucrado en la carcinogénesis de al menos un grupo de carcinomas, se debería detectar una correlación entre el VPH y las alteraciones genéticas. Sin embargo, de todas las características patológicas analizadas, no se encontró asociación. Los resultados fueron negativos para edad, ubicación del tumor, tamaño, diferenciación, estadío colorrectal, grados de amplificación de *c-myc*, mutaciones de *k-ras*, inestabilidad de microsatélites, y polimorfismos de *p53*/*RNASEL*. Anteriormente había sido demostrado que no posee relación con la expresión del marcador $p16^{INK4A}$, pero si con las mutaciones de *p53*. Resultados similares fueron reportados por otros grupos que analizaron VPH en el colon.

-Las únicas cualidades que parecen tener algún grado de relación con la detección del ADN del VPH en muestras colorrectales son una menor edad y ser mujer, ambas

características estrechamente relacionadas a infecciones por VPH en otros sitios anogenitales.

-Los datos de este trabajo, sumados a la revisión de la bibliografía, indican que el cáncer colorrectal no tiene una sola causa necesaria y suficiente. A su vez, la distribución de las alteraciones genéticas de acuerdo al grado de inestabilidad de microsatélites y características histopatológicas apuntan a que el cáncer colorrectal es una enfermedad muy heterogénea, aunque pueda tener un fenotipo similar, probablemente surja de numerosas vías genéticas.

- La búsqueda de un agente infeccioso involucrado en la carcinogénesis colorrectal ha sido particularmente elusiva. Probablemente la respuesta se encuentra en el equilibrio generado por la intrincada comunidad de bacterias comensales y sus productos fermentativos. En un artículo reciente se propone que se tendría que prestar atención a miembros nuevos de la familia del poliomavirus que tengan como huéspedes naturales a bovinos y que puedan transmitirse a través de los alimentos (zur Hausen, 2009). Sin embargo, los resultados de los 6 diferentes genotipos del poliomavirus conocidos hasta ahora han dado resultados controversiales en el cáncer colorrectal, con rangos de detección de 0-95% (Laghi *et al.,* 1999; Ricciardello *et al*., 2003; Boland *et al.,* 2004; zur Hausen, 2008; Militello *et al.,* 2009).

4.17 Perspectivas futuras

-Establecer conclusivamente la presencia del VPH en mucosa normal y carcinomas colorrectales, y realizar un seguimiento a los individuos positivos.

-Determinar si existe algún aumento en la seroprevalencia de los pacientes con muestras infectadas.

-Correlacionar la presencia del VPH con condiciones asociadas al VPH extracolónicas, como verrugas o infecciones anogenitales y otros factores de riesgo que puedan estar condicionando la presencia del VPH en el tracto colorrectal.

-Asociar la presencia del VPH a más alteraciones genéticas comunes de las vías del cáncer colorrectal, en especial mutaciones del gen APC.

-Realizar estudios de expresión viral en los tumores VPH positivos en diferentes estadíos de la carcinogénesis colorrectal.

-En conclusión, para determinar el papel del VPH en la mucosa del colon serán necesarios estudios más amplios, de seguimiento de las lesiones positivas, además de la identificación conjunta de factores de riesgo conocidos y otros marcadores de actividad biológica de los que, hasta el momento, se sabe poco.

REFERENCIAS

Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomäki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. N Engl J Med 338(21): 1481-1487, 1998.

Abba MC, Gomez MA, Golijow CD. Human papillomavirus genotype distribution in cervical infections among woman in La Plata, Argentina. Rev Argent Microbiol 35(2): 74-9, 2003.

Abba MC, Villaverde LM, Gomez MA, Dulout FN, Laguens MR, Golijow CD. The p53 codon 72 genotypes in HPV infection and cervical disease. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 109(1): 63-6, 2003.

Abba MC, Laguens RM, Dulout FN, Golijow CD. The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. Mutat Res 557(2): 151-8, 2004.

Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. Am J Obstet Gynecol 182: 257-264, 2000.

Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P, Siraj AK, Uddin S, Ezzat A, Sanea NA, Al-Dayel F, Al-Mana H, Sheikh SS, Mirlacher M, Tapia C, Simon R, Sauter G, Terracciano L, Tornillo L. HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer. J Clin Pathol 60: 768-772, 2007.

American Joint Committee on Cancer (AJCC). AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. Greene FL, Page, DL, Fleming ID, et al. (eds). Springer-Verlag, New York. pp 113-119, 2002.

Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Lund E, Gaudernack G, Meling GI, Rognum TO. K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas. Scand J Gastroenterol 32:62–9, 1997.

Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllenstein U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of highrisk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). Br J Cancer 92:2195–200, 2005.

Andreyev H, Tilsed JV, Cunningham D, Norman AR, Sampson SA, Schneider HJ, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with early colorrectal cancers. Gut 41: 323-9, 1997.

Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras Mutations in Patients With Colorectal Cancer: the Multicenter ‘‘RASCAL’’ Study Journal of the National Cancer Institute. 90(9): 675-584, 1998.

Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the “RASCAL II” study. Br J Cancer 85: 692-696, 2001.

Anttila T. Serological evidence of an association between chlamydial infection and cancer. Academic dissertation. Faculty of Medicine, University of Oulu. 2000. URL: http: // herkules. oulu.fi / issn03553221.

Arai T, Kino I. Morphometrical and cell kinetic studies of normal human colorectal mucosa. Comparison between the proximal and the distal large intestine. Acta Pathol Jpn 39(11): 725-730, 1989.

Arango D, Corner GA, Wadler S, Catalano PJ, Augenlicht LH. c-myc/p53 Interaction Determines Sensitivity of Human Colon Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil in Vitro and in Vivo. Cancer Res 61: 4910-4915, 2001.

Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. New Engl Med 326(10): 658-662, 1992.

Audeau A, Han HW, Johnston MJ, Whithead MW, Frizelle FA. Does human papillomavirus have a role in squamous cell carcinoma of the colon and upper rectum?. EJSO 28: 657-660, 2002.

Augenlicht LH, Wadler S, Corner G, Richards C, Ryan L, Multani AS, Pathak S, Benson A, Haller D, Heerdt BG. Low level c-myc amplifications in human colonic carcinoma cell lines and tumors, a frequent p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. Cancer Res 57: 1769-75, 1997.

Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. Cancer Causes Control 20(4): 449-57, 2009.

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. Journal of Medical Virology 67: 574–582, 2002.

Baker CC, Calef C. Maps of papillomavirus mRNA transcripts (Part 2). En: Human Papillomaviruses 1996. Los Alamos National Laboratories, Los Alamos, NM. pp. III-3 a III-13, 1996. Enlace:http://hpv-web.lanl.gov/COMPENDIUMPDF/96PDF/3/ maps96.pdf.

Barbacid, M. ras genes. Ann Rev Biochem 56:779-827, 1987.

Bardi g, Heim s. Genome-wide search for chromosomal aberrations in colorectal cancer: implications for pathogenesis and clinical management. Annals of gastroenterology 16(3): 205-218, 2003.

Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Mandel JS, Molt JA, Greenberg ER. Folate intake, alcohol consumption, cigarette smoking and risk of colorectal adenoma. J Natl Cancer Inst 90: 57-62, 1998.

Baron JA, Beach M, Mandel JS, van Stolk RU, Haile RW, Sandler RS, Rothstein R, Summers RW, Snover DC, Beck GJ, et al. The calcium Polyp Prevention Study: Calcium suplements for the prevention of colorectal adenomas. N Engl J Med 340: 101-107, 1999.

Bartsch DK, Fendrich V, Slater EP, Sina-Frey M, Rieder H, Greenhalf W, Chaloupka B, Hahn SA, Neoptolemos JP, Kress R. RNASEL germline variants are associated with pancreatic cancer. Int J Cancer 117(5):718-22, 2005.

Beckmann AM, Daling JR, Sherman KJ, Maden C, Miller BA, Coates RJ, Kiviat NB, Myerson D, Weiss NS, Hislop TG. Human papillomavirus infection and anal cancer. Int J Cancer 43(6): 1042-1049, 1989.

Beckman G, Birgander R, Sialander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, Beckman L. Is p53 polymorphism mantained by natural salection?. Hum Hered 44(5): 266-270, 1994.

Benhattar J, Losi L, Chaubert P, Givel JC, Costa J. Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma. Gastroenterology 104: 1044-8, 1993.

Bernard HU. Coevolution of papillomaviruses with human populations. Int Journal Cancer 56: 788-796, 1994.

Beutner KR, Becker TM, Stone KM. Epidemiology of human papillomavirus infections. Dermot Clin 9(2): 211-218, 1991.

Bingham SA. Diet and colorectal cancer prevention. Biochemical Society Transactions 28(2): 12-16, 2000.

Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY (A). Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. Clin Cancer Res 11(8): 2862-7, 2005.

Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM (B). Could human papillomaviruses be spread through blood?. J Clin Microbiol 43:5428–5434, 2005.

Bognár G, István G, Bereczky B, Ondrejka P. Detection of human papillomavirus type 16 in squamous cell carcinoma of the colon and its lymph node metastases with PCS and southern blot hybridization. Pathol Oncol Res 14(1):93-6, 2008.

Boguszaková L, Hirsch I, Brichácek B, Faltýn J, Fric P, Dvoráková H, Vonka V. Absence of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and papillomavirus DNA from adenoma and adenocarcinoma of the colon. Acta Virol 32(4): 303-8, 1988.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, et al. National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res 58: 5248–5257, 1998.

BonillaM, Ramirez M, Lopez-Cueto J, Gariglio P. In vivo amplification and rearrangement of c-myc oncogene in human breast tumors. J Natl Cancer Inst 80:665-671, 1988.

Bonnez W, Reichman RC. Papillomaviruses. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). 5th ed. Churchill Livingston, Philadelphia (Pa), 1630-1640, 2000.

Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res 49(17): 4682-9, 1989.

Bosch F, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. J Natl Cancer Inst 87: 796–802, 1995.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 55: 244-265, 2002.

Bosch F. Epidemiology of human papillomavirus infections: New options for cervical cancer prevention. Salud Pública de México 45(3): S326-S339, 2003.

Bosman FT. Prognostic value of pathological characteristics of colorectal cancer. Eur J Cancer 31A: 1216-1221, 1995.

Bouchard C, Thieke K, Maier A, Sarich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J, Eilers M. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. J EMBO 18(19): 5321–5333, 1999.

Boulet GAV, Horvath CAJ, Berghmans S, Bogers J. Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17(4): 810-817, 2008.

Brabletz T, Herrmann K, Jung A, Faller G, Kirchner T. Expression of nuclear β-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferaive activity of colorectal adenomas. Am J Pathol 156(3): 865-870, 2000.

Brennetot C, Buhard O, Jourdan F, Flejou JF, Duval A, Hamelin R: Mononucleotide repeats BAT-26 and BAT-25 accurately detect MSI-H tumours and predict tumor content: implications for population screening. Int J Cancer 113: 446-450, 2005.

Brewster WR, Monk BJ, Burger RA, Berger S, Wilczynski SH. Does human papillomavirus have a role in cancers of the uterine corpus?. Gynecol Oncol 75: 51-54, 1999.

Brisson J, Morin K, Fortier M, Roy M, Bouchard C, Leclerc J, Christen A, Guimont C, Penault F, Meisels A. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: Differences between low and high-grade lesions. Am J Epidemiol 40: 700–710, 1994.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. Nature 368, 258–261, 1994.

Brose MS, Smyrk T, Weber B, Lynch HT. Genetic predisposition to cancer. En: Cancer Medicine 5º edition. Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast R , Gansler T , Holland J, Frei E (eds). BC Becker Inc, USA. 2000.

Bruckner HW, Pitrelli J, Merrick M. Adenocarcinoma of the colon and rectum. En: Cancer Medicine 5º edition. Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast R , Gansler T , Holland J, Frei E (eds). BC Becker Inc, USA, 2000.

Buechner SA. Common skin disorders of the penis. BJU Int 90(5): 498-506, 2002.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Reviews 16(1): 1-17, 2003.

Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Potter JD. Infectious agents and colorectal cancer: a review of Helicobacter pylori, Streptococcus bovis, JC virus, and human papillomavirus. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17: 2970-9, 2008.

Burt RW, Bishop DT, Lee RG, Albright LC, Skolnick MH. Inheritance of colonic adenomatous polyps and colorectal cancer. Prog Clin Biol Res 279: 189, 1988.

Buyru N, Budak M, Yazici H, Dalay N. p53 gene mutations are rare in human papillomavirus-associated colon cancer. Oncol Rep 10(6): 2089-92, 2003.

Buyru N, Tezol A, Dalay N. Coexistence of K-ras mutations and HPV infection in colon cancer. BMC Cancer 6: 115, 2006.

Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L, Bernard HU, Barrera-Saldaña HA. Genomic

diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. Virology 319(2): 315-23, 2004.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene 17(11): 1395-413, 1998.

Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano JJ, Vauhkonen H, Prat E, Egozcue J, Sumoy L, Knuutila S, Miro R. Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. Carcinogenesis 27(3): 419-428, 2006.

Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, Sood R, Robbins C, Xu J, Faruque M, Moses T, Ewing C, Gillanders E, et al. Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. Nat Genet 30: 181–84, 2002.

Casini B, Borgese L, Del Nonno F, Galati G, Izzo L, Caputo M, Perrone Donnorso R, Castelli M, Risuleo G, Visca P. Presence and incidence of DNA sequences of human polyomaviruses BKV and JCV in colorectal tumor tissues. Anticancer Res 25: 1079-85, 2005.

Castelli JC, Hassel BA, Wood KA, Li XL, Amemiya K, Dalakas MC, Torrence PF, Youle RJ. A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. J Exp Med 186(6): 967-72, 1997.

Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. J Biosci 28(3): 337-48, 2003.

Chapekar MS, Glazer RI. The synergistic cytocidal effect produced by immune interferon and tumour necrosis factor in HT-29 cells is associated with inhibition of rRNA processing and (2 ,5) oligo (A) activation of RNase L. Biochem Biophys Res Commun 151: 1180–87, 1988.

Chaturvedi AK, Engels EA, Gilbert ES, Chen BE, Storm H, Lynch CF, Hall P, Langmark F, Pukkala E, Kaijser M, et al. Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer: Evaluation of long-term risk. J Natl Cancer Inst 99:1634-1643, 2007.

Chaturvedi AK, Kleinerman RA, Hildesheim A, Gilbert ES, Storm H, Lynch CF, Hall P, Langmark F, Pukkala E, Kaijser M, et al. Second Cancers After Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Cervix. 27(6): 967-973, 2009.

Chen ACH, Keleher A, Kedda MA, Spurdle AB, McMillan NAJ, Antonsson A. Human Papillomavirus DNA Detected in Peripheral Blood Samples From Healthy Australian Male Blood Donors. Journal of Medical Virology 81:1792–-1796, 2009.

Cheng H, Sitrin MD, Satchidanand SK, Novak JM. Colonic squamous cell carcinoma in ulcerative colitis: Report of a case and review of the literature. Can J Gastroenterol 21(1): 47-50, 2007.

Cheng JY, Meng CL, Chao CF, Gau SD, Lin JC. Human papillomavirus type-related DNA and c-myc oncogene alterations in colon cancer cell lines. Dis Colon Rectum 34(6): 469-74, 1991.

Cheng JY, Meng CL, Chao CF, Gau SD, Lin JC. Human papillomavirus 16 DNA in NIH3T3 cells transformed by cancer cellular DNA. Gut 34: 1710-1713, 1993.

Cheng JY, Sheu LF, Lin JC, Meng CL (A). Detection of human papillomavirus DNA in colorectal adenomas. Arch Surg 130(1): 73-6, 1995.

Cheng JY, Sheu LF, Meng CL, Lee WH, Lin JC (B). Detection of human papillomavirus DNA in colorectal carcinomas by polymerase chain reaction. Gut 37(1): 87-90, 1995.

Cheng Wu X, Chen VW, Steele B, Ruiz B, Fulton J, Liu L, Carozza SE, Greenlee R. Subsite-specific incidence rate and stage of disease in colorectal cancer by race, gender, and age group in the United States, 1992–1997. Cancer (92)10: 2547-2549, 2001.

Cheung JL, Cheung TH, Ng CW, Yu MY, Wong MC, Siu SS, Yim SF, Chan PK. Analysis of human papillomavirus type 18 load and integration status from low-grade cervical lesion to invasive cervical cancer. J Clin Microbiol 47(2): 287-93, 2009.

Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci USA 69: 2110-4, 1972.

Colonoscopes may spread HCV and HPV. AIDS Patient Care STDS 17(5): 257-8, 2003.

Comitee on Medical Aspects of Food (CMAF). Nutritional aspects of the development of cancer. Department of Health Report on Health and Social Subjects. Department of Health, London. 1998.

Cooper K, Herrington CS, Lo ES, Evans MF, McGee JO. Integration of human Papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma. J Clin Pathol 45: 382-384, 1992.

Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib A, Orth G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. J Virology 65: 4534-4538, 1991.

Cox T, Buck HW, Kinney W, Rubin MM. Human Papilloma Virus and Cervical Cancer. Clinical Proceedings, 2001.

Cristoph F, Schmidt B, Schmidtz-Dräger BJ, Schulz WA. Over expression and amplification of the c-myc gene in human urothelial carcinoma. Int J Cancer 84: 169-173, 1999.

Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz A. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. J Virol 65: 606-612, 1991.

Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. Cancer Res 58: 3455-3460, 1998.

Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM, Shera KA, Carter JJ, McKnight B, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK, Tamimi H. A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. Gynecol Oncol 84(2): 263-70, 2002.

Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, Kantelip B, Schaal JP, Mougin C. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. Int J Cancer 106: 396-403, 2003.

Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartsmann G, Damin AS, Frazzon AP, Ruppenthal RD, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. Eur J Surg Oncol 33(5): 569-74, 2007.

Daniel B, Rangarajan A, Mukherjee G, Vallikad E, Krishna S. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. J Gen Virol 78: 1095-1101, 1997.

Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. J Gen Virol 73: 2327-36, 1992.

Dayal Y, DeLellis RA. The gastrointestinal tract. En: Pathologic Basis of Disease. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (eds). 4th ed. WB Saunders, 882–902, 1989.

De Angelis PM, Clausen OPF, Schjølberg A, Stokke T. Chromosomal gains and losses in primary colorrectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. British Journal of Cancer 80(3/4): 526-535, 1999.

De Marcoa L, Gillio-Tos A, Bonello L, Ghisetti V, Roncod G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. Journal of Clinical Virology 38: 7-13, 2007.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J Gen Virol 76: 1057-62, 1995.

De Villiers EM, Lavergne D, Mclaren K, Benton EC. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. Int J Cancer 73: 356-61, 1997.

Delius H, Saegling B, Bergmann K, Shamanin V, de Villiers EM. The genome of three of four novel HPV types, defined by differences of their L1 genes, show high conservation of the E7 gene and the URR. Virology 240: 359-365, 1998.

Deschoolmeester V, Van Marck V, Baay M, Weyn C, Vermeulen P, Van Marck E, Lardon F, Fontaine V, Vermorken JB. Detection of HPV and the role of p16INK4A overexpression as a surrogate marker for the presence of functional HPV oncoprotein E7 in colorectal cancer. BMC Cancer 10(1): 117, 2010.

Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. Cancer Res 57: 4749-4756, 1997.

Díaz-Guerra M, Esteban M, Martínez JL. Growth of Escherichia coli in acetate as a sole carbon source is inhibited by ankyrin-like repeats present in the 2',5'-linked oligoadenylate-dependent human RNase L enzyme. FEMS Microbiol Lett 149(1): 107-13, 1997.

Diez Alonso M, Pérez Piqueras J, Martin Duce A. Marcadores tumorales de valor pronóstico en adenocarcinomas de colon y recto. Gastroenterología Integregrada 2(4): 207-221, 2001.

Dokianakis DN, Papaefthimiou M, Tsiveleka A, Spandidos DA. High prevalence of HPV18 in correlation with ras gene mutations and clinicopathological parameters in cervical cancer studied from stained cytological smears. Oncol Rep 6(6): 1327-31,1999.

Domingo E, Espín E, Armengol M, Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot, C, Seruca R, Hamelin R, Yamamoto H, Schwartz SJ. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. Genes Chromosomes Cancer 39(2): 138-142, 2004.

Donald JJ, Burhenne J. Colorectal cancer: can we lower the death rate in the 1990's?. Can Fam Physician 39: 107-114, 1993.

Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, Mortel R, McGowan L, Greenberg MD, Barnes WA, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11(1): 3-6, 2002.

Dong Y, Wang J, Ma H, Zhou H, Lu G, Zhou X. Primary adenosquamous carcinoma of the colon: report of five cases. Surg Today 39(7): 619-23, 2009.

Donzelli M, Bernardi R, Negri C, Prosperi E, Padovan L, Lavialle C, Brison O, Scovassi AL. Apoptosis-prone phenotype of human colon carcinoma cells with a high level amplification of tha c-myc gene. Oncogene 18(2): 439-448, 1999.

Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. J Virol 69(12): 7791-7799, 1995.

Dürst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes some cervical carcinomas. Proc Nat Acad Sci USA 84: 1070-1074, 1987.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. Nat Genet 33(3): 357-65, 2003.

Dybikowska A, Dettlaff A, Konopa K, Podhajsa A. p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer patients and healthy women from Poland. Acta Biochim Pol 47(4): 1179-1182, 2000.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 243: 934-937, 1989.

Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. Lancet 336: 357, 1990.

Erisman MD, Rothberg PG, Diehl RE, Morse CC, Spandorfer JM, Astrin SM. Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. Mol Cell Biol 5(8): 1969–1976, 1985.

Erol D, Bulut Y, Yüce H, Ozercan IH. Investigation of the presence of human papillomavirus DNA in various gastrointestinal carcinoma samples. Mikrobiyol Bul 43(2): 259-68, 2009.

Evander M, Edlund K, Bodun E, Gustafsson A, Jonsson M. Comparison of a one-step and two-step Polimerase Chain Reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. J Clin Microbiol 30: 987-992, 1992.

Fan B, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty G, Nance D, Greenberg A, Zhong G. Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected cells: Blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. J Exp Med 187: 487-496, 1998.

Fearon ER, Volgestein B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. Cell 61: 759-767, 1990.

Fearon ER, Dang CV. Cancer genetics: Tumor suppressor meets oncogene. Current Biology 9: R62-R065, 1999.

Fearon ER, Gruber SB. Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. En: Mendelson J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA (eds). The molecular basis of cancer. WB Saunders, Philadelphia, 289-312, 2001.

Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, Gostout BS, Cheung TH, Chung TK, Fu WY, et al. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. Oncogene 22(46): 7233-42, 2003.

Ferguson AW, Svoboda-Newman SM, Frank TS. Analysis of human papillomavirus infection and molecular alterations in adenocarcinoma of the cervix. Modern Pathology 11(1): 11–18, 1998.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No. 5. version 2.0, IARCPress, Lyon, 2004.

Finbow ME, Pitts JD. Is the gap junction channel-the connexon- made of connexin or ductin?. J Cell Sci 106: 163-471, 1993.

Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. Cancer (12): 3827-38, 1993.

Franceschi S, Muñoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 5(7): 567-75, 1996.

Frattini MG, Hurst SD, Lim HB, Swaminathan S, Laiminis LA. Abrogation of mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increase turnover of the p53 tumor suppressor protein. Embo J 16(2): 318-331, 1997.

Frizelle FA, Hobday KS, Batts KP, Nelson H. Adenosquamous and squamous carcinoma of the colon and upper rectum: a clinical and histopathological study. Dis Colon Rectum 22: 341-346, 2001.

Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. N Engl J Med 331: 1669-1674, 1994.

FUNDONAR. Compendio del Registro del Cáncer de la Provincia de Buenos Aires. Período 1996-2003. Registro Provincial del Cáncer. Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos. www.fundonar.com.ar

Futreal A, Stratton M, Wooster R. Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC). Sanger Institute, 2009. Enlace: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic

Gaulthier JM, Dillner J, Yanin M. Structural analysis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivator with antipeptide antibodies reveals a high mobility region linking the transactivation and the DNA binding domains. Nucleic Acids Res 19: 7073–7079, 1991.

Gay de Pereyra EA, Tacla M. HPV na Mulher. En: I Consenso Brasileiro de HPV. Carvalho JJM, Oyakawa N (eds). 1º ed. BG Cultural, San Pablo, Brasil, 17-33, 2000.

Gazelle GS, McMahon PM, Scholz FS. Screening for colorectal cancer. Radiology 215: 327-335, 2000.

Gauthier JM, Dillner J, Yaniv M. Structural analysis of the human papillomavirus type 16-E2 transactivator with antipeptide antibodies reveals a high mobility region linking the transactivation and the DNA-binding domains. Nucleic Acids Res 19(25): 7073-9, 1991.

Gervaz P, Allal AS, Villiger P, Bühler L, Morel P. Squamous cell carcinoma of the anus: Another sexually transmitted disease. Swiss Med Wkly 133: 353-359, 2003.

Ghadimi BM, Grade M, Liersch T, Langer C, Siemer A, Füzesi L, Becker H. Gain of chromosome 8q23-24 is a predictive marker for lymph node positivity in colorectal cancer. Clin Cancer Res 9(5): 1808-14, 2003.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Papazoglou D, Koukourakis MI, Maltezos E. Human papillomavirus in endometrial adenocarcinomas: infectious agent or a mere "passenger"?. Infect Dis Obstet Gynecol 2007: 60549, 2007.

Gilbert JM, Mann CV, Scholefield J, Domizio P. The aetiology and surgery of carcinoma of the anus, rectum and sigmoid colon in Crohn´s disease. Negative correlation with human papillomavirus type 16 (HPV 16). Eur J Surg Oncol 17(5): 507-513, 1991.

Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. Curr Opin Oncol 13(3): 183-8, 2001.

Gissman L. Respostas imunológicas à infecçao pelo papilomavírus humano. En: Papilomavírus humano I. Lorincz AT, Reid R (eds). Clin Obstet Ginecol Am Norte. Rio de Janeiro, Vol 3: 607-620, 1996.

Giuliani L, Ronci C, Bonifacio D, Di Bonito L, Favalli C, Perno CF, Syrjänen K, Ciotti M. Detection of oncogenic DNA viruses in colorectal cancer. Anticancer Res (2B): 1405-10, 2008.

Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, Dunne EF, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Markowitz LE, Smith D, Harris RB. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. J Infect Dis 196(8): 1146-52, 2007.

Glarakis IS, Savva S, Spandidos DA. Activation of the ras genes in malignant and premalignant colorectal tumors. Oncol Rep 5(6): 1451-4, 1998.

Goel A, Li MS, Nagasaka T, Shin SK, Fuerst F, Ricciardiello L, Wasserman L, Boland CR. Association of JC virus T-antigen expression with the methylator phenotype in sporadic colorectal cancers. Gastroenterology 130: 1950-61, 2006.

Gold JS, Bayar S, Salem RR. Association of Streptococcus bovis bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. Arch Surg 139: 760-5, 2004.

Golijow CD, Mourón SA, Gómez MA, Dulout FN. Differences in K-ras Codon 12 Mutation Frequency between “High-Risk” and “Low-Risk” HPV-Infected Samples. Gynecologic Oncology 75: 108-112, 1999.

Golijow CD, Abba MC , Mourón SA, Güercci A, Gómez MA, Dulout FN. Detection of c-erbB-2 amplification in cervical scrapes positives for HPV. Cancer Investigation 19(7): 678-683, 2001.

Graham DA, Herrington CS. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. Mol Pathol 53: 201-206, 2000.

Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, et al. High load for most high risk human apillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. Int J Cancer 121: 2787 -93, 2007.

Greenberg R, Daniels SR, Flanders WD, Eley JW, Boring JR. Medical Epidemiology, 3rd ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill, USA, 2001.

Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, E Lin E, Luthra R, Zhang W. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. Modern Pathology 20: 256–266, 2007.

Haenszel W. Cancer mortality among the foreign born in the united States. J Natl Cancer Inst. 26: 37-132, 1961.

Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, Bland KI, Cobbs CS. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. Lancet 360: 1557–63, 2002.

Harris CC. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. Science 262(5142): 1980-1, 1993.

Harwood CA, Surentheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, Proby CM. Human papillomavirus infection and non melanoma skin cancer in immuno-suppressed and immunocompetent individuals. J Med Virol 61: 289–97, 2000.

Hayakumo T, Cho E, Nakajima M, Kato G, Kawai K, Azuma T. Point mutations in the c-K-ras 2 gene in multiple colorectal carcinomas. J Gastroenterol Hepatol 10(1): 70-5, 1995.

He QJ, Zeng WF, Sham JS, Xie D, Yang XW, Lin HL, Zhan WH, Lin F, Zeng SD, Nie D, et al. Recurrent genetic alterations in 26 colorectal carcinomas and 21 adenomas from Chinese patients. Cancer Genet Cytogenet 144(2): 112-8, 2003.

Heerdt BG, Molinas S, Deicht D, Augenlicht LH. Aggressive subtypes of human colorectal tumors frequently exhibit amplification of the c-myc gene. Oncogene 6: 125-129, 1991.

Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale AL. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature 396: 530-531, 1998.

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 95(12): 6870-6875, 1998.

Hermsen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W, et al. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. Gastroenterology 123(4): 1109-19, 2002.

Herrick J, Conti C, Teissier S, Thierry F, Couturier J, Sastre-Garau X, Favre M, Orth G, Bensimon A. Genomic Organization of Amplified MYC Genes Suggests Distinct Mechanisms of Amplification in Tumorigenesis. Cancer Res 2005; 65: (4). February 15, 2005.

Heselmeyer K, Macville M, Schrock E, Blegen H, Hellstrom AC, Shah K, Auer G, Ried T. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. Genes Chromosomes Cancer 19: 233-240, 1997.

Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, Herrero R, Bratti MC, Schwartz P, Mortel R, Barnes W, Greenberg M, et al. Carrington M. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature 396: 532, 1998.

Hill AB. The environment and disease: association or causation?. Proc R Soc Med 1965; 58:295–300, 1965.

Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and esophageal cancer risk. Int J Cancer 121(8): 1643-58, 2007.

Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). Int J Oncol 32(5): 945-73, 2008.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med 338: 423-8, 1988.

Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. Cancer Res 57: 300-303, 1997.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutation in human cancers. Science 253: 49-53, 1991.

Hwang ES, Nottoli T, Di Maio D. The VPH E6 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins COS cells. Virology 211: 227-233, 1995.

Iacopetta, B. Are there two sides to colorectal cancer?. Int J Cancer 101: 403-408, 2002.

IARC (International Agency for research on Cancer). Volume 90: Human papillomaviruses. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, 2007. Enlace: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/index.php

Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, Watanabe H. DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer?. J Clin Pathol 52: 5-9, 1999.

Ilyas M, Tomlinson IPM. Genetic Pathways in colorectal cancer. Histopathology 28: 389- 399, 1996.

Ilyas M, Straub J, Tomlinson IPM, Bodmer WF. Genetic Pathways in Colorectal and other Cancers. European Journal of Cancer 35(14): 1986-2002, 1999.

Ishiguro A, Takahata T, Saito M, Yoshiya G, Tamura Y, Sasaki M, Munakata A. Influence of methylated p15 and p16 genes on clinicopathological features in colorectal cancer. J Gastroenterol Hepatol 21(8): 1334-9, 2006.

Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. 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 35(3):791-5, 1997.

Jakson DP, Hayden JD, Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. En: PCR a practical approach. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR (eds). Oxford University Press, New York, 29-50, 1993.

Janout V, Kollárová H. Epidemiology of Colorectal Cancer. Trainig Course on Colorectal Cancer in Prague, Czech Republic, 2001.

Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive carvical cancer: a meta analysis. Int J Gynecol Obst 85: 301-308, 2004.

Jeevaratnam P, Cottier DS, Browett PJ, Van De Water NS, Pokos V, Jass JR. Familial giant hyperplastic polyposis predisposing to colorectal cancer: a new hereditary bowel cancer syndrome. J Pathol 179(1): 20-25, 1996.

Jia HR, He XL, Zhu ZZ, Jin XX, Wang AZ, Huang HY, Zhu J, Yu GB, Zhu GS. TP53 gene polymorphisms and colorectal cancer risk in Chinese population. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 87(21): 1448-51, 2007.

Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21CIP1-mediated inhibition of CDK2. Genes Dev 11: 2101–2111, 1997.

Jones JS, Chi X, Gu X, Lynch PM, Amos CI, Frazier ML. p53 polymorphism and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Caucasian population. Clin Cancer Res 10(17): 5845-9, 2004.

Josefsson AM, Magnusson PKE, Ylitalo N, Quarforth-Tubbeir P, Ponten Y, Adami HO, Gyllensten UB. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature 396: 531, discusión 532, 1998.

Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sørensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, Melbye M, Adami HO, Gyllensten UB. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ : a nested case-control study. Lancet 355: 2189-93, 2000.

Joura EA. Epidemiology, diagnosis and treatment of vulvar intraepithelial neoplasia. Curr Opin Obstet Gynecol 14(1): 39-43, 2002.

Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. Int J Gynecol Pathol 17: 146-153, 1998.

Kallio P, Syrjänen S, Tervahauta A, Syrjänen K. A simple method for isolation of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded samples for PCR. J Virol Met 35: 39-47, 1991.

Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human Papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. British Journal of Cancer 93: 946-948, 2005.

Karas Z, Poreba E. HPV sequences in Blood of Patients with condyloma acuminata. The Journal of Investigative Dermatology 110(5):843-844, 1998.

Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S. Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. Carcinogenesis 14(6): 1085-9, 1993.

Kaz AM, Brentnall TA. Genetic testing for colon cancer. Nat Clin Pract Gastroenterl Hepatol 2: 670-9, 2006.

Kealy WF, Annis PG, Barry JA, Hogan JM. Adenoacanthoma of the endometrium: morphological changes induced by human papillomavirus. Journal of Clinical Pathology 43 (7): 554–559, 1990.

Key TJ, Fraser GE, Thorogood M, Appleby PN, Beral V, Reeves G, Burr ML, Chang-Claude J, Frentzel-Beyme R, Kuzma JW, et al. Mortality in vegetarians and non-vegetarians: a collaborative analysis of 8300 deaths among 76,000 men and women in five prospective studies. Public Health Nutr 1: 33-41, 1998.

Kinjo T, Kamiyama K, Chinen K, Iwamasa T, Kurihara K, Hamada T. Squamous metaplasia induced by transfection of human papillomavirus DNA into cultured adenocarcinoma cells. Mol Pathol 56: 97-108, 2003.

Kirgan D, Manalo P, Hall M, McGregor B (A). Association of human papillomavirus and colon neoplasms. Arch Surg 125(7): 862-5, 1990.

Kirgan D, Manalo P, McGregor B (B). Immunohistochemical demostration of human papillomavirus antigen in human colon neoplasms. J Surg Res 48: 397-402, 1990.

Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer 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 Res 59: 6132–6136, 1999.

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature 380: 79–82, 1996.

Klug SJ, Ressing M, Koenig J, Abba MC, Agorastos T, Brenna SM, Ciotti M, Das BR, Del Mistro A, Dybikowska A, et al. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. Lancet Oncol 10(8): 772-84, 2009.

Knösel T, Petersen S, Schwabe H, Schlüns K, Stein U, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. Virchows Arch 440(2): 187-94, 2002.

Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. Improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. N Engl J Med 317: 985-990, 1987.

Kong CS, Welton ML, Longacre TA. MD Role of Human Papillomavirus in Squamous Cell Metaplasia-Dysplasia-Carcinoma of the Rectum. Am J Surg Pathol 31(6):919-925, 2007.

Konishi M, Kikuchi-Yanoshita, Tanaka K, Murakoka M, Onda A, Okumura Y, Kishi N, Mori T, Koike M, Ushio K, et al. Molecular natures of colon tumors in Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer, Familial Polyposis, and Sporadic Colon Cancer. Gastroenterology 111: 307-317, 1996.

Koulos J, Symmans F, Chumas J, Nuovo G. Human papillomavirus detection in adenocarcinoma of the anus. Mod Pathol 4(1): 58-61, 1991.

Koushik A, Platt RW, Franco EL. p53 Codon 72 Polymorphism and Cervical Neoplasia: A Meta-Analysis Review. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 13: 11–22, 2004.

Kozma L, Kiss I, Szakall S, Ember I. Investigation of c-myc oncogne amplification in colorectal cancer. Cancer Lett 81(2): 165-169, 1994.

Krüger S, Bier A, Engel C, Mangold E, Pagenstecher C, von Knebel Doeberitz M, Holinski-Feder E, Moeslein G, Schulmann K, Plaschke J, et al (A). The p53 codon 72 variation is associated with the age of onset of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). J Med Genet 42(10):769-73, 2005.

Krüger S, Silber AS, Engel C, Görgens H, Mangold E, Pagenstecher C, Holinski-Feder E, von Knebel Doeberitz M, Moeslein G, Dietmaier W, et al (B). Arg462Gln sequence variation in the prostate-cancer-susceptibility gene RNASEL and age of onset of hereditary non-polyposis colorectal cancer: a case-control study. Lancet Oncol 6(8): 566-72, 2005.

Krüger S, Engel C, Bier A, Silber AS, Görgens H, Mangold E, Pagenstecher C, Holinski-Feder E, von Knebel Doeberitz M, Royer-Pokora B, et al. The additive effect of p53 Arg72Pro and RNASEL Arg462Gln genotypes on age of disease onset in Lynch syndrome patients with pathogenic germline mutations in MSH2 or MLH1. Cancer Lett 252(1):55-64, 2007.

Kruszewski W, Kowara R, Rzepko R, Warezak C, Zieliński J, Gryglewski G, Kopacz A, Jastrzebski T, Pawełczyk T. K-RAS point mutation, and amplification of C-MYC and C-ERBB2 in colon adenocarcinoma. Folia Histochem Cytobiol 42(3): 173-9, 2004.

Kuramoto S, Oohara T. Minute cancers arising de-novo in the human large intestine. Cancer 61(4): 829-834, 1988.

Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, Marra G, Major EO, Neel JV, Boland CR. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. Proc Natl Acad Sci USA 96: 7484-9, 1999.

Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D, et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. Nat Genet 17: 79-83, 1997.

Lavialle C, Modjtahedi N, Cassingena R, Brison O. High c-myc amplification level contributes to the tumorigenic phenotype of the human breast carcinoma cell line SW 613-S. Oncogene (3): 335-9, 1988.

Lavialle C, Modjtahedi N, Lamonerie T, Frebourg T, Landin RM, Fossar N, Lhomond G, Cassingena R, Brison O. The human breast carcinoma cell line SW 613-S: an experimental system to study tumor heterogeneity in relation to c-myc amplification, growth factor production and other markers (review). Anticancer Res 9(5):1265-79, 1989.

Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. Br J Cancer 80(12): 2008-18, 1999.

Lee YM, Leu SY, Ciang H, Fung CP, Liu WT. Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. J Microbiol Immunol Infect 34(2): 87-91, 2001.

Leggett BA, Devereaux B, Biden K, Searle J, Young J, Jass J. Hyperplastic polyposis: association with colorectal cancer. Am J Surg Pathol 25(2): 177-84, 2001.

Lehtinen M, Rantala I, Aine R, Miettinen A, Laine S, Heinonen P, Teisala K, Punnonen R, Paavonen J. B-cell response in Chlamydia trachomatis endometritis. Eur J Clin Mirobiol 5: 596-598, 1986.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 94: 2545–2550, 1997.

Li LS, Kim NG, Kim SH, Park C, Kim H, Kang HJ, Koh KH, Kim SN, Kim WH, Kim NK, et al. Chromosomal imbalances in the colorectal carcinomas with microsatellite instability. Am J Pathol 163: 1429-1436, 2003.

Li Y, Qiu LX, Shen XK, Lv XJ, Qian XP, Song Y. A meta-analysis of TP53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk: evidence from 15,857 subjects. Lung Cancer 66(1): 15-21, 2009.

Li FY, Lai MD. Colorectal cancer, one entity or three. J Zhejiang Univ Sci B 10(3): 219-229, 2009.

Liu HX, Ding YQ, Li X, Yao KT. Investigation of Epstein-barr virus in Chinese colorectal tumors. World J Gastroenterol 9: 2464-8, 2003.

Lochhead P, El-Omar EM. Helicobacter pylori infection and gastric cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol 21: 281-97, 2007.

Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/ serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. Am J Surg Pathol 14: 524-37, 1990.

Lönn U, Lönn S, Nylén U, Friberg S, Stenkvist B. Gene amplification detected in carcinoma cells from human urinary bladder washings by the polymerase chain reaction method. Cancer 11: 3605-3610, 1993.

Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common genital types. Obstet Gynecol 79: 328-37, 1992.

Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL. Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. Mod Pathol 16(7): 692-9, 2003.

Lüscher B. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Mad/Max network. Gene 277: 1-14, 2001.

Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Emerich J, Wójcikowski C. Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. J Clin Microbiol 41(2): 608-12, 2003.

Lutzner MA, Blanchet-Bardon C. Epidermodysplasia verruciformis. Curr Probl Dermatol 13: 164-185, 1985.

Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ, Marcus J, Smyrk T, Fitzgibbons RJ Jr, Kriegler M, Lynch JF. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome I and Lynch syndrome II). Dis Colon Rectum 31: 439, 1988.

Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome). Int J Cancer 69: 38-43, 1996.

Macfarlane GT, Macfarlane S. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. Scand J Gastroenterol 222: 3-9, 1997.

Madsen BE, Ramos EM, Boulard M, Duda K, Overgaard J, Nordsmark M, Wiuf C, Hansen LL. Germline Mutation in RNASEL Predicts Increased Risk of Head and Neck, Uterine Cervix and Breast Cancer. PLoS ONE 3(6): e2492, 2008.

Mai V, Morris JG Jr. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. J Nutr 134(2): 459-64, 2004.

Manalo P, Highison G, McGregor B, Hall M. Electomicroscopic evidence of papillomavirus in human colon neoplasms. Arch Surg 125: 862-865, 1991.

Mandado S, Leonard I, Amores-Sánchez I, Domínguez C, González N, Paniagua M, Quintero S, Grá B. Infección por Papillomavirus humano (PVH) en carcinomas colorrectales. Rev Panam Infectol 6(3): 26-33, 2004.

Marcus AJ. Aspirin as prophylaxis against colorectal cancer. N Engl Med 333: 656-8, 1995.

Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, et al. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. Nat Genet. 25(1): 47-54, 2000.

Maruya E, Saji H, Yokoyama S. PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strenght Single-Stranded Conformation Polymorphism)- a single method for high resolution allele typing of HLA-DRB1, -DQB1, and -DPB1. Genome Res 6: 51-57, 1996.

Masramon L, Arribas R, Tértola S, Perucho M, Peinado M. Moderate amplifications of the c-myc gene correlate with molecular and clinico-pathological parameters in colorectal cancer. British J Cancer 99: 2349-2356, 1998.

Matos EL, Loria DI, Zengarini N, Fernandez MM, Guevel CG, Marconi E, Spitale A, Rosso S. Atlas de Mortalidad por Cáncer en Argentina 1997-2001. Ministerio de Salud de Argentina, 2003.

Matsuda A, Takahashi K, Yamaguchi T, Matsumoto H, Miyamoto H, Kawakami M, Kawachi H, Suzuki H, Furukawa K, Tajiri T, et al. HPV infection in an HIV-positive patient with primary squamous cell carcinoma of rectum. Int J Clin Oncol 14(6): 551-4, 2009.

Matzakos T, Lawrence SP, Ahnen DJ. Epidemiological and Risk factors for colorectal cancer. Up to date. http://www.uptodate.com, 2002.

McGarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: A review of the literature. J Clin Gastroenterol 39: 98-109, 2005.

McGregor B, Byrne P, Kirgan D, Albright J, Manalo P, Hall M. Confirmation of the association of human papillomavirus with human colon cancer. Am J Surg 166: 738-742, 1993.

Militello V, Trevisan M, Squarzon L, Biasolo MA, Rugge M, Militello C, Palù G, Barzon L. Investigation on the presence of polyomavirus, herpesvirus, and papillomavirus sequences in colorectal neoplasms and their association with cancer. Int J Cancer 124(10): 2501-3, 2009.

Młynarczyk B, Maleiczyk M, Muszyński J, Majewski S. The occurrence of human papillomavirus--HPV in the biopsies from colon polyps and cancer. Med Dosw Mikrobiol 61(2): 191-6, 2009.

Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. Br J Cancer 92: 891-4, 2005.

Moerkerk P, Arends JW, van Driel M, de Bruine A, de Goeij A, ten Kate J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. Cancer Res 54: 3376–8, 1994.

Mojtahedi Z, Haghshenas MR, Hosseini SV, Fattahi MJ, Ghaderi A. *p* 53 codon 72 polymorphism in stomach and colorectal adenocarcinomas in Iranian patients 47: 31-4, 2010.

Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. Appl Environ Microbiol 61: 3202-3207, 1995.

Mourón SA, Abba MC, Güerci A, Gómez MA, Dulout FN, Golijow CD. Association between activated K-ras and c-erbB-2 oncogenes with "high-risk" and "low-risk" human papilloma virus types in preinvasive cervical lesions. Mutat Res 469(1): 127-34, 2000.

Muñoz SE, Navarro A, Lantieri MJ, Fabro ME, Peyrano MG, Ferraroni M, Decarli A, La Vecchia C, Eynard AR. Alcohol, methylxanthine- containing beverages, and colorectal cancer in Córdoba, Argentina. European Journal of Cancer Prevention 7, 207-213, 1998.

Murata M, Tagawa M, Kimura M, Kimura H, Watanabe S, Saisho H. Analysis of a gremline polymorphism of the p53 gene in lung cancer patients; discrete results with smoking history. Carcinogenesis 17: 261-264, 1996.

Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer 36: 2251-2270, 1975.

Muto T, Nagawa H, Watanabe T, Masaki T, Sawada T. Colorectal carcinogenesis. Dis Colon Rectum 40(19): S80-S85, 1997.

Nakamura Y. Isolation of p53-target genes and their functional analysis. Cancer Sci vol 95, 1: 7-11, 2003.

Nei M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, USA, 1987.

Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, Markowitz LE, Giuliano AR. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(6): 1107-14, 2007.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature 342(6250): 705-8, 1989.

Nordström T, Nourizad K, Ronaghi M, Nyrén P. Method Enabling Pyrosequencing on Double-Stranded DNA. Analytical Biochemistry 282:186-193, 2000.

Nyitray A, Nielson CM, Harris RB, Flores R, Abrahamsen M, Dunne EF, Giuliano AR. Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection in heterosexual men. J Infect Dis 197(12): 1676-84, 2008.

Obara K, Yokoyama M, Asano G, Tanaka S. Evaluation of myc and chromosome 8 copy number in colorectal caner using interphase cytogenetics. Int J Oncol 18(2): 233-239, 2001.

O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amorosino M, Farraye FA. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. Am J Surg Pathol 30(12): 1491-501, 2006.

Oda H, Kumar S, Howley PM. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9557–9562, 1999.

Ojeda JM, Ampuero S, Rojas P, Prado R, Allende JE, Barton SA, Chakraborty R, Rothhammer F. p53 Codon 72 Polymorphism and Risk of Cervical Cancer. Biol Res 36(2): 279-283, 2003.

Okada MMK, Guimaraes Goncalves MA, Giraldo PC. Epidemiologia e patogenese do Papilomavírus humano (HPV). En: I Consenso Brasileiro de HPV. Carvalho JJM, Oyakawa N (eds). 1º ed. BG Cultural, San Pablo, Brasil. pp 1-6, 2000.

Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Domingo E, Espin E, Armengol M, Yamamoto H, Hamelin R, Seruca R, et al. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. Oncogene 22(57): 9192-9196, 2003.

Oliveira C, Westra J, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A, Velho S, Niessen R, Lagerstedt K, Alhopuro P, et al. Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. Hum Mol Genet 13(19): 2303-2311, 2004.

Oliveira C, Velho S, Moutinho C, Ferreira A, Preto A, Domingo E, Capelinha A, Duval A, Hamelin R, Machado J, et al. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. Oncogene 26(1): 158-163, 2007.

Oriel D. Genital human papillomavirus infection. En: Sexually Transmitted Diseases. Holmes KK, Märd PA, Sparling PF, Wieser PJ, (eds). 2º ed. McGraw-Hill, New York. pp 433-441, 1990.

Ostrow RS, Manias DA, Fong WJ, Zachow KR, Faras AJ. A survey of human cancer for human papillomavirus DNA by filter hybridization. Cancer 59: 429-434, 1987.

Palmer JG, Scholefield JH, Coates PJ, Shepherd NA, Jass JR, Crawford LV, Northover JM. Anal cancer and human papillomaviruses. Dis colon Rectum 32: 1016-1022, 1989.

Pao CC, Lin SS, Lin CY, Maa JS, Lai CH, Hsieh TT. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. Am J Clin Pathol 95: 540-546, 1991.

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. Science 263: 1625-1629, 1994.

Paquette RL, Lee YY, Wilczynski SP, Karmakar A, Kizaki M, Miller CW, Koeffler HP. Mutations of p53 and human papillomavirus infection in cervical carcinoma. Cancer 72: 1272-1280, 1993.

Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, Kim SJ, Namkoong SE. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. Gynecol Oncol 65: 121-129, 1997.

Parc YR, Halling KC. Microsatellite Instability Testing. En: Methods in Molecular Medicine, vol 50: Colorectal Cancer: Methods and Protocols. Powell SM (ed). Humana Press Inc, Totowa, NJ, 2001.

Pandey M, Bajaj GD, Rath PC. Induction of the interferon-inducible RNA-degrading enzyme, RNase L, by stress-inducing agents in the human cervical carcinoma cells. RNA Biol 1(1): 21-7, 2004.

Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found inCervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. Journal Of Clinical Microbiology 40(3): 886-891, 2002.

Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-myc. Archives of Biochemistry and Biophysics 416: 129-136, 2003.

Peltomäki P, Vasen HFA. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. Gastroenterology 113: 1146-1158, 1997.

Pérez Mota A. Cáncer colorrectal. Salud Rural 5: 1-9, 2003.

Pérez LO, Abba MC, Laguens RM, Golijow CD. Analysis of adenocarcinoma of the colon and rectum: detection of human papillomavirus (HPV) DNA by polymerase chain reaction. Colorectal Dis 7(5):492-5, 2005.

Pérez, LO, Abba MC, Dulout FN, Golijow CD. Evaluation of p53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina. World J Gastroenterol 12(9): 1426-9, 2006.

Pett MR, Alazawi WOF, Roberts I, Dowen S, Smith DI, Stanley MA, Coleman N. Acquisition of High-Level Chromosomal Instability Is Associated with Integration of Human Papillomavirus Type 16 in Cervical Keratinocytes. Cancer Research 64: 1359-1368, 2004.

Peyssonnaux C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. Biol Cell 93(1-2): 53-62, 2001.

Picconi MA, Montes JR, Alonio LV, Cabbane AM, González JV, Collia K, Bosisio OA, Graziano A, Teyssié A. Human Papillomavirus (HPV) in colorectal adenomas. Proc 19th International Papillomavirus Conference, Florianópolis, Brasil, 2001.

Piketty C, Darragh TM, Da Costa M, Bruneval P, Heard I, Kazatchkine MD, Palefsky JM. High prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. Ann Intern Med 138: 453-459, 2003.

Pirog EC, Kleter B, Olgac S, et al. Prevalence of human Papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. American Journal of Pathology 157(4): 1055–1062, 2000.

Planck M, Ericson K, Piotrowska Z, Halvarsson, Rambech E, Nilbert M. Microsatellite Instability and Expression of MLH1 and MSH2 in Carcinomas of the Small Intestine. Cancer 97(6): 51-57, 2003.

Prokopakis P, Sourvinos G, Koumantaki Y, Koumantakis E, Spandidos DA. K-ras mutations and HPV infection in cervicitis and intraepithelial neoplasias of the cervix. Oncol Rep 2002 9(1): 129-33, 2002.

Qiu DC, Hubbard AE, Zhong B, Zhang Y, Spear RC. A matched, case-control study f the association between Schistosoma japonicum and liver and colon cancers, in rural China. Ann Trop Med Parasitol 99(1): 47-52, 2005.

Raj P. Classification of medically important viruses. I. DNA Viruses. Clin Microbiol Newslett 16: 121, 1994.

Ransohoff DF, Lang CA. Screening for colorectal cancer. New Engl J Med 325(1): 37-41, 1991.

Rao JY, Apple SK, Jin YS, Lin S, Nieberg RK, Hirtschowitz SL. Comparative Polymerase Chain Reaction Analysis of c-myc Amplification on Archival Breast Fine-Needle Aspiration Materials. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 9: 175–179, 2000.

Räsänen I, Lehto M, Jokinen I, Leinikki P. Polyclonal antibody formation of human lymphocytes to bacterial components. Immunol 58: 577-581, 1986.

Rex D. Should we colonoscope women with gynecologic cancer?. Am J Gastroenterol 95(3): 812-3, 2000.

Ricciardi R, Ghabreau L, Yasmeen A, Darnel AD, Akil N, Al Moustafa AE. Role of E6/E7 onco-proteins of high-risk human papillomaviruses in human colorectal carcinogenesis. Cell Cycle 8(12): 1964-5, 2009.

Rochlitz CF, Herrmann R, de Kant E. Overexpression and amplification of c-myc during progression of human colorectal cancer. Oncology 53(6): 448-454, 1996.

Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus is resistant to desiccation. J Infect Dis 176(4): 1076-9, 1997.

Rökman A, Ikonen T, Seppälä EH, Nupponen N, Autio V, Mononen N, Bailey-Wilson J, Trent J, Carpten J, Matikainen MP, et al. Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. Am J Hum Genet 70: 1299–304, 2002.

Rosin M, Hofseth L. Schistosomiasis, bladder and colon cancer. En: Parsonnet J (ed) Microbes and malignancy. Infection as a cause of human cancers. Oxford University Press, New York, 313-345, 1999.

Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies. Ann Oncol (4): iv44-49, 2005.

Salepci T, Yazici H, Dane F, Topuz E, Dalay N, Onat H, Aykan F, Seker M, Aydiner A. Detection of human papillomavirus DNA by polymerase chain reaction and southern blot hybridization in colorectal cancer patients. J Buon 14(3): 495-9, 2009.

Salepci T, Yazici H, Topuz E, Dalay N, Onat H, Aykan F, Aydiner A. Detection of human papillomavirus DNA in human colorectal cancers by polimerase chain reaction. Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol 18: 2389, 1999.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol 153(6): 1741-8, 1998.

Sargent LM, Sanderson ND, Thorgeirsson SS. Ploidy and karyotypic alterations associated with early events in the development of hepatocarcinogenesis in transgenic mice harboring c-myc and transforming growth factor alpha transgenes. Cancer Res 56: 2137-2142, 1996.

Sastre-Garau X, Favre M, Couturier J, Orth G. Distinct patterns of alteration of myc genes associated with integration of human papillomavirus type 16 or type 45 DNA in two genital tumours. Journal of General Virology 81: 1983–1993, 2000.

Sayhan N, Yazici H, Budak M, Bitisik O, Dalay N. p53 codon 72 genotypes in colon cancer: Association with human papillomavirus infection. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 109(1-2): 25-34, 2001.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The VPH-16 E6 and E6-AP cmoplex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell 75: 495-505, 1993.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomaviruses sequences in cervical carcinoma cells. Nature 314: 111-4, 1985.

Sears R, Leone G, De Gregori J, Nevins J. Ras enhances Myc protein stability. Mollecular cell 3: 169-179, 1999.

Semczuk A, Stenzel A, Baranowski W, Rózynska K, Cybulski M, Kostuch M, Jakowicki J, Wojcierowski J. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 in human neoplastic endometrium: lack of correlation with established prognostic factors. Oncology Reports 7(4): 905-910, 2000.

Sevinç A, Yannoukakos D, Konstantopoulou I, Manguoglu E, Lüleci G, Colak T, Akyerli C, Colakoglu G, Tez M, Sayek I,et al. Lack of association between RNASEL Arg462Gln variant and the risk of breast cancer. Anticancer Res 24: 2547–49, 2004.

Shah KV, Howley PM. Papillomaviruses. En: Fields BN, Knipe DM, (eds). Fields Virology, 2nd ed. Eaven Press, New York, pp 1651-1676, 1990.

Shah KV, Daniel RW, Simons JW, Vogelstein B. Investigation of colon cancers for human papilllomavirus genomic sequences by polimerase chain reaction. J Srug Oncol 51(1): 5-7, 1992.

Shamsuddin AM, Phelps PC, Trump BF. Human large intestinal epithelium: light microscopy, histochemistry, and ultrastructure. Hum Pathol 13(9): 790-803, 1982.

Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJL. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: Results for the global burden of disease 2000. BMC Cancer 2: 37, 2002.

Shimoda T, Ikegami M, Fujisakji J, Matsui T, Aizawa S, Ishikawa E. Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. Cancer 64: 1138-1146, 1989.

Shroyer KR, Kim JG, Manos MM, Greer CE, Pearlman NW, Franklin WA. Papillomavirus found in anorectal squamous carcinoma, not in colon adenocarcinoma. Arch Surg 127(6): 741-4, 1992.

Silverman RH, Zhou A, Auerbach MB, Kish D, Gorbachev A, Fairchild RL. Skin allograft rejection is suppressed in mice lacking the antiviral enzyme, 2',5'- oligoadenylate-dependent RNase L. Viral Immunol 15: 77-83, 2002.

Silverman RH. Implications for RNase L in prostate cancer biology. Biochemistry 42: 1805-12, 2003.

Sinha R, Rothman N. Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. Cancer Lett. 143: 189-194, 1999.

Smith DR, Myint T, Goh HS. Overexpression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma. Br J Cancer 68(2): 407-413, 1993.

Smith JR, Freije D, Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome1 suggested by a genome-wide search. Science 274: 1371-4, 1996.

Solinas-Toldo S, Durst M, Lichter P. Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality. Proc Natl Acad Sci USA 94: 3854-9, 1997.

Söreide K, Janssen AM, Söiland H, Körner H, Baak JPA. Microsatellite instability in colorectal cancer. British Journal of Surgery 93: 395-406, 2006.

Sotlar K, Koveker G, Aepinus C, Selinka HC, Kandolf R, Bultmann B. Human papillomavirus type 16-associated primary squamous cell carcinoma of the rectum. Gastroenterology 120(4): 988-994, 2001.

Soussi T, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. J Mol Biol 260(5): 623-37, 1996.

Spencer CA, Groudine M. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. Adv Cancer Res 56: 1-48, 1991.

Srinivasan R, Yang YX, Rubin SC, Morgan MA, Lewis JD. Risk of colorectal cancer in women with a prior diagnosis of gynecologic malignancy. J Clin Gastroenterol 41(3): 291-6, 2007.

Stoler MK. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: A model for carcinogenesis. Int J Gynecol Pathol 19: 16-28, 2000.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. Nature 393: 229-234, 1998.

Sung JY, Lau JYW, Goh KL, Leung WK. Asia Pacific Working Group on Colorectal Cancer. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: implications for screening. The Lancet 6(11): 871-876, 2005.

Syrjänen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. J Clin Pathol 55: 721-728, 2002.

Syrjänen KJ. Human papillomavirus and oral tumors. Med Microbiol Immunol 192: 123-128, 2003.

Talseth BA, Meldrum C, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ. Age of diagnosis of colorectal cancer in HNPCC patients is more complex than that predicted by R72P polymorphism in TP53. Int J Cancer 118(10): 2479-84, 2006.

Talseth BA, Meldrum C, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ. MDM2 SNP309 T>G alone or in combination with the TP53 R72P polymorphism does not appear to influence disease expression and age of diagnosis of colorectal cancer in HNPCC patients. Int J Cancer 120(3): 563-5, 2007.

Tang CK, Shermeta DW, Wood C. Congenital condylomata acuminata. Am J Obstst Gynecol 131: 912-913, 1978.

Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. Antonie Leeuwenhoek 76: 265-278, 1999.

Theodoropoulos G, Panoussopoulos D, Papaconstantinou I, Gazouli M, Perdiki M, Bramis J, Lazaris ACh. Assessment of JC polyoma virus in colon neoplasms. Dis Colon Rectum 48: 86-91, 2005.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 260: 816-61, 1993.

Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvment of hMLH1. Cancer Res 58: 1713-1718, 1998.

Thomas L, Matlashewski G, Pim D, Banks L. Induction of apoptosis by p53 is independent of oligomeric state and can be abolished by VPH 18 E6 through ubiquitin-mediated degradation. Oncogene 13: 265-273, 1996.

Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, Smith DI. Human Papillomavirus Type 16 Integrations in Cervical Tumors Frequently Occur in Common Fragile Sites. Cancer Research 60: 5916–5921, 2000.

Ting Y, Manos MM. Detection and typing of genital human papillomavirus. En: PCR protocols. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). Academic Press, San Diego, 356, 1990.

Tortola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, Sancho FJ, Peinado MA, Capella G. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. J Clin Oncol 17(5): 1375-81, 1999.

Tsao YP, Li LY, Tsai TC, Chen SL. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21 (WAF-1/SDI 1/CIP-1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. J Virol 70: 7535-7539, 1996.

Tseng CJ, Pao CC, Lin JD, Soong YK, Hong JH, Hsueh S. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. J Clin Oncol 17: 1391-1396, 1999.

Turek LP. The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. Inf Dis Obstet Gynecol 7(5): 237-243, 1994.

Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbs RR, et al. Identification of a Novel Gammaretrovirus in Prostate Tumors of Patients Homozygous for R462Q RNASEL Variant. PLoS Pathog 2(3): e25, 2006.

van der Snoek EM, Niesters HG, Mulder PG, van Doornum GJ, Osterhaus AD, van der Meijden WI. Human papillomavirus infection in men who have sex with men participating in a Dutch gay-cohort study. Sex Transm Dis 30(8): 639-44, 2003.

van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo A, McGeoch DJ, Pringle CR, et al. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy Viruses. Academic Press, Inc, San Diego, California, 2000.

Vannucci L, Stepankova R, Grobarova V, Kozakova H, Rossmann P, Klimesova K, Benson V, Sima P, Fiserova A, Tlaskalova-Hogenova H. Colorectal carcinoma: Importance of colonic environment for anti-cancer response and systemic immunity. Journal of Immunotoxicology 6(4): 217–226, 2009.

Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. J Virol 75: 4467-4472, 2001.

Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. 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 100(4): 8211- 8216, 2003.

Viñez JJ, Ardanaz E, Arrazola A, Gaminde I. Epidemiología poblacional de cáncer colorrectal: revisión de causalidad. Anales Sis San Navarra 26(1): 1-17, 2003.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 319: 525-532, 1988.

Volker M, Morris JG. Colonic Bacterial flora: Changing understandings in the molecular age. The Journal of Nutrition 134: 459-464, 2004.

Waisberg J, Matheus Cde O, Pimenta J. Infectious endocarditis from Streptococcus bovis associated with colonic carcinoma: case report and literature review. Arq Gastroenterol 39: 177-80, 2002.

Wang L, Zhou A, Vasavada S, Dong B, Nie H, Church JM, Williams BR, Banerjee S, Silverman RH. Elevated levels of 2_,5_-linked oligoadenylate-dependent ribonuclease L occur as an early event in colorectal tumourigenesis. Clin Cancer Res 1: 1421–28, 1995.

Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. Human Mol Genet 2: 1123-1128, 1993.

Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC, Colditz GA. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. Int J Cancer 108(3): 433-42, 2004.

Weinberg R. Oncogenes and the molecular origins of cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

Weinberg DS, Newschaffer CJ, Topham A. Risk for colorectal cancer after gynecologic cancer. Ann Intern Med 131(3): 189-93, 1999.

Weinberger PM, Yu Z, Zerkowski M, Chung G, Camp RL, Rimm DL, Psyrri D. A possible association of human papilloma virus with a subset of colorectal adenocarcinomas. J Clin Oncol 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings 22(14S): 3544, 2004.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 248: 76-79, 1990.

Wilke CM, Hall BK, Hoge A, Paradee W, Smith DI, Glover TW. FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. Hum Mol Genet 5(2): 187-95, 1996.

Winawer SJ, Fletcher RH, Bond JH, Brown-Davis C, Ganiats TG, Giardello FM, Glick SN, Godlee F, Marciniak DE, Mayer RJ, et al. American Gastroenterological Association: Recommendations for colorectal cancer screening and surveilance in people at average risk and at increased risk. Gastroenterology 112(2): 596-642, 1997.

Wittekindt C, Gültekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ, Klussmann JP. Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. Adv Otorhinolaryngol 62: 72-80, 2005.

Woods DB, Vousden KH. Regulation of p53 function. Exp Cell Res 264(1): 56-66, 2001.

World Cancer Research Fund (WCRF). Food, Nutrition and Prevention of Cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research. Washington DC, 1997.

Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, Dalla-Favera, R. Direct activation of TERT transcription by c-myc. Nat Genet 21: 220–224, 1999.

Wynter CV, Walsh MD, Higuchi T, Leggett BA, Young J, Jass JR. Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. Gut 53(4): 573-80, 2004.

Xiang Y, Wang Z, Murakami J, Plummer S, Klein EA, Carpten JD, Trent JM, Isaacs WB, Casey G, Silverman RH. Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'- oligoadenylates. Cancer Res 63: 6795-801, 2003.

Xie D, Sham JST, Zeng WF, Lin HL, Che LH, Wu HX, Wen JM, Hu L, Guan XY. Heterogeneous expression and association of β-catenin, p16 and c-myc in multistage colorectal tumorigenesis and progression detected by tissue microarray. Int J Cancer 107: 896-902, 2003.

Yander G, Halsey H, Kenna M, Augenlicht LH. Amplification and elevated expression of c-myc in a chemichally induced mouse colon tumor. Cancer Res 45: 4433-4438, 1985.

Yavuzer D, Karadayi N, Salepci T, Baloglu H, Dabak R, Bayramicli OU .Investigation of human papillomavirus DNA in colorectal carcinomas and adenomas. Med Oncol, en prensa, 2010.

Yiu HY, Whittemore AS, Shibata A. Increasing colorectal cancer incidence rate in Japan. Int J Cancer 109: 777-781, 2004.

Yokota T, Sugihara K, Yokoyama T, Kondo H, Oka M, Shirao K, Saito D, Yamaguchi H, Oguro Y, Ishikawa T, et al. Small depressed cancer of the large bowel: report of three cases. Am J Gastroenterol 90(1): 134-136, 1995.

Yu HG, Shun LB, Luo HS, Huang H, Yu BP, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmitz F, et al. Deletion of the FHIT gene in human colorectal cancer is independent of high-risk HPV infection. Int J Colorectal Dis 17(6): 396-401, 2002.

Yuen ST, Chung LP, Leung SY, Luk IS, Chan SY, Ho JC, Ho JW, Wyllie AH. Colorectal carcinoma in Hong Kong: epidemiology and geneticmutations. Br J Cancer 76: 1610-1616, 1997.

Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Tsui WW, Chan AS, et al. Similarity of the Phenotypic Patterns Associated with BRAF and KRAS Mutations in Colorectal Neoplasia. Cancer Research 62: 6451-6455, 2002.

Zbroch T, Knapp P, Knapp P. Human Papillomavirus (HPV) infection in the pathology of the endometrium. Role of immunological activation in antiviral and antineoplastic defense. Medycyna Wieku Rozwojowego 6(1): 43-55, 2002.

Zerfass K, Schulze A, Spitkovski D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Durr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. J Virol 69: 6389-6399, 1995.

Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the CDK inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. Oncogene 13: 2323–2330, 1996.

Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. Expression cloning of 2–5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. Cell 72: 753–65, 1993.

Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X, Du L, Wei ML, Wu XT. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: a meta-analysis of the literature. Int J Cancer 121(7): 1481-6, 2007.

Zhu Q, Cao J, Li S. Detection of human papillomavirus gene in biopsies from colon carcinoma by PCR. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 13(4): 352-4, 1999.

Zhuo XL, Li Q, Zhou Y, Cai L, Xiang ZL, Yuan W, Zhang XY. Study on TP53 codon 72 polymorphisms with oral carcinoma susceptibility. Arch Med Res 40(7): 625-34, 2009.

zur Hausen H. Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. Biochimica et Biophysica Acta 1288: 55-78, 1996.

zur Hausen H. Viruses in Human Cancers. Eur J Cancer 33: 1174-1181, 1999.

zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Nat Cancer Inst 92(9): 690-698, 2000.

zur Hausen H. Novel human polyomaviruses: Re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. Int J Cancer 123: 247-50, 2008.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. Nature 2: 342-350, 2002.

zur Hausen H. Papillomavirus infection: A major cause of human cancers. En: “Infections Causing Human Cancers”. Zur Hausen H (Ed.). Wiley-VCH Verlag GmBH & Co KGaA, Weinheim, Alemania, 2006.

zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: Where and why. Virology 392: 1-10, 2009.