



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación de la expresión génica de *mica*,
micb, *adam10*, *adam17* y *mmp14* en lesiones
intraepiteliales cervicales en pacientes
residentes en Bogotá**

Laura Alejandra García Lesmes

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2014

Evaluación de la expresión génica de *mica*, *micb*, *adam10*, *adam17* y *mmp14* en lesiones intraepiteliales cervicales en pacientes residentes en Bogotá

Laura Alejandra García Lesmes

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Microbiología

Director (a):

Ph.D., Ciencias Biológicas, Fabio Aristizábal Gutiérrez

Codirector (a):

Ph.D., Ciencias Biológicas, Adriana García Robayo

Línea de Investigación:

Identificación de marcadores moleculares asociados a la progresión de la enfermedad
tumoral

Grupo de Investigación:

Farmacogenética del cáncer

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2014

*A mis padres, porque cada logro alcanzado
no sería posible de no ser por ellos.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por su contribución a mi formación tanto a nivel profesional como a nivel personal.

Al programa de Becas para Estudiantes Sobresalientes de Posgrado, de la Vicerrectoría Académica, por la financiación de mis estudios de posgrado a nivel de maestría.

A mi director, el Dr. Fabio Ancízar Aristizábal y a mi codirectora, la Dra. Adriana García Robayo, por su guía y apoyo durante la realización de este trabajo.

A los profesores del programa de maestría en Ciencias – Microbiología, en especial a la profesora Martha Fontanilla, por sus enseñanzas y apoyo durante este proceso de formación.

A mis compañeros de la maestría, del grupo de Farmacogenética del Cáncer y del grupo de Bioprocesos y Bioprospección por su apoyo continuo, palabras de aliento y amistad.

Por último, pero no menos importante, a mi familia, por apoyarme siempre en todos los momentos y todas mis decisiones durante cada etapa de mi vida.

Resumen

NKG2D es un receptor activador expresado en las células naturales asesinas involucrado en la eliminación de células transformadas y/o infectadas por virus. Dentro de los ligandos descritos para este receptor están MICA y MICB y la familia de las ULBPs (ULBP1-ULBP6). Por otro lado, uno de los mecanismos de evasión por parte de la célula tumoral es el clivaje de éstas proteínas por parte de metaloproteinasas como ADAM10, ADAM17 y MMP14. Por lo anterior en este estudio analizamos la expresión de los ligandos y de las metaloproteinasas mencionadas anteriormente mediante PCR en tiempo real, en diferentes estadios: muestras con resultado de histopatología negativo, muestras con lesiones intraepiteliales de bajo grado y muestras con lesiones intraepiteliales de alto grado y en las líneas celulares HeLa y C-33 A. A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los genes de estudio en los diferentes grupos si se observó una mayor expresión de las metaloproteinasas en la lesión de alto grado y en la línea celular HeLa. Para el caso de los ligandos en *mica* se observó una expresión baja en todos los grupos y en *micb* una mayor expresión en la lesión de bajo grado.

Palabras clave: Virus de Papiloma Humano; células naturales asesinas; receptor NKG2D; cáncer de cuello uterino; metaloproteinasas y desintegrinas; complejo mayor de histocompatibilidad clase I.

Abstract

NKG2D is an activating receptor expressed by natural killer cells involved in the elimination of transformed and/or infected cells. Within the ligands described for this receptor are the related MHC class I molecules, MICA and MICB, and the ULBPs family (ULBP1-ULBP6). On the other hand, one of the mechanisms of tumor evasion is the NKG2D ligands shedding by metalloproteinases like ADAM10, ADAM17 y MMP14. Thus, in this study, we analyzed the expression of NKG2D ligands and metalloproteinases by real time PCR in different stages: Negative samples, samples with low grade and high grade lesions and in the cell lines HeLa and C-33 A. Although no statistically significant differences for any of the genes studied in the different groups, a high expression of metalloproteinases expression was observed in high grade lesion samples and in HeLa cell line. Low expression for *mica* was observed in all groups studied and an increased *micb* expression in low grade lesion samples.

Keywords: Human papillomavirus; natural killer cell; NKG2D receptor; cervical cancer; metalloproteinases and desintegrins; major histocompatibility complex.

Contenido

	<u>Pág.</u>
Resumen	V
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	X
Lista de símbolos y abreviaturas	XI
1. Introducción	1
2. Formulación del problema	3
2.1 Justificación y planteamiento del problema	3
2.2 Pregunta de investigación	4
2.3 Objetivos	4
2.3.1 Objetivo general	4
2.3.2 Objetivos específicos	4
3. Marco conceptual	5
3.1 Cáncer de cuello uterino	5
3.2 Factores de riesgo	6
3.3 Virus del papiloma humano	6
3.3.1 Generalidades del virus del papiloma humano	6
3.3.2 Ciclo de vida	8
3.3.3 Respuesta inmune frente a virus de papiloma humano	9
3.4 Células asesinas naturales y el receptor NKG2D	10
3.5 Los ligandos MICA y MICB	12
3.6 <i>Shedding</i> y metaloproteinasas	13
3.6.1 Ligandos solubles en plasma	13
3.6.2 Metaloproteinasas de matriz	15
3.6.3 Desintegrinas y metaloproteinasas	16
4. Metodología	18
4.1 Población de estudio	18
4.1.1 Criterios de inclusión y exclusión	18
4.2 Muestras biológicas	19

4.3	Procesamiento de las muestras.....	19
4.3.1	Extracción de DNA.....	19
4.3.2	Extracción de RNA y síntesis de cDNA	19
4.4	Diseño de iniciadores.....	20
4.5	PCR en tiempo real y análisis de expresión	21
4.5.1	PCR en tiempo real.....	21
4.5.2	Análisis de expresión	22
4.6	Genotipificación	23
4.7	Consideraciones éticas.....	23
5.	Resultados	24
5.1	Características de la población.....	24
5.1.1	Características generales	24
5.1.2	Características de la población según grado de lesión.....	25
5.2	Prevalencia de VPH.....	26
5.3	Expresión génica por PCR en tiempo real.....	28
5.3.1	Cálculo de eficiencias	28
5.3.2	Análisis de expresión de los ligandos de NKG2D.....	29
5.3.3	Análisis de expresión de desintegrinas y metaloproteinasas de matriz.....	29
6.	Discusión.....	32
6.1	Características de la población y prevalencia de VPH	32
6.2	Análisis de expresión de los ligandos de NKG2D.....	33
6.3	Análisis de expresión de desintegrinas y metaloproteinasas de matriz.....	34
7.	Conclusiones y recomendaciones.....	37
7.1	Conclusiones	37
7.2	Recomendaciones	38
	Anexo A: Consentimiento informado para participar en el estudio.	39
	Anexo B: Aprobación por parte del Comité de ética.....	41
	Anexo C: Curvas de eficiencia obtenidas para cada set de iniciadores.	43
8.	Bibliografía	47

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1. Respuesta inmune innata en diferentes etapas de la infección por VPH	10
Figura 2. Distribución tipo-específica del virus de papiloma humano en la población por grado de lesión	25
Figura 3. Expresión de los ligandos de NKG2D en las líneas celulares HeLa y C-33 A y en los diferentes grupos de estudio: muestras con resultado histopatológico negativo, lesión de bajo grado y lesión de alto grado	30
Figura 4. Expresión de los ligandos de las metaloproteinasas en las líneas celulares HeLa y C-33 A y en los diferentes grupos de estudio: muestras con resultado histopatológico negativo, lesión de bajo grado y lesión de alto grado ...	31

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 1. Características de los iniciadores empleados.....	20
Tabla 2. Características de la población por grado de lesión	25
Tabla 3. Distribución de VPH según su clasificación por riesgo en cada tipo lesión	27
Tabla 4. Frecuencias de virus de papiloma humano de AR, pAR y BR en infecciones únicas o múltiples en los diferentes tipos de lesión	28
Tabla 5. Eficiencias obtenidas para cada set de iniciadores	28

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
n	Número

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AR	Alto Riesgo
BR	Bajo Riesgo
CCU	Cáncer de Cuello Uterino
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IL	Interleuquina
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MMPI	Inhibidores de Metaloproteinasas de matriz
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	Células Asesinas Naturales
pAR	Posible Alto Riesgo
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNA	Ácido Ribonucleico
sMICA	MICA soluble
sMICB	MICB soluble
TAE	Tasa Ajustada por Edad
VPH	Virus de Papiloma Humano

1.Introducción

El cáncer de cuello uterino es el cuarto tipo de cáncer más común en las mujeres a nivel mundial. En Colombia es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres y el segundo en incidencia después del cáncer de seno (Globocan., 2012). Se ha podido establecer a través de una serie de estudios epidemiológicos que la infección con el virus del papiloma humano (VPH) es el agente etiológico de este tipo de cáncer (Bosch *et al.*, 2002).

Tanto las células infectadas con virus como las células tumorales pueden ser lisadas por células asesinas naturales (NK) que hacen parte de la respuesta inmune innata y por lo tanto representan una primera línea de defensa (Middleton *et al.*, 2002). La actividad de las células NK está regulada por una serie de estímulos recibidos por los receptores. Los receptores de la NK pueden ser tanto inhibidores como activadores, dependiendo de las señales recibidas la célula ejerce o no su actividad citolítica. Uno de los receptores activadores de las células NK es el NKG2D que al unirse a ligandos expresados por las células infectadas o tumorales promueven la lisis de éstas (Vivier *et al.*, 2012).

Dentro de los ligandos de NKG2D se encuentran las proteínas MICA y MICB pertenecientes a la familia de las moléculas relacionadas al complejo mayor de histocompatibilidad clase I. Estos ligandos se caracterizan porque se expresan en la célula como respuesta a diversos factores como infección por virus, daño de DNA, estrés celular, transformaciones malignas entre otros, mientras que su expresión tisular en condiciones normales se restringe al epitelio gastrointestinal (Eagle and Trowsdale, 2007). Una vez estos ligandos se han unido al receptor NKG2D, su molécula adaptadora DAP-10 es fosforilada y se desencadena toda una cascada de señalización que lleva a que la célula NK active su mecanismo de citotoxicidad (Obeidy and Sharland, 2009).

Uno de los mecanismos de evasión de la célula tumoral es el clivaje de los ligandos de NKG2D de la superficie celular para evitar el reconocimiento por parte de la célula NK (Dobrovina *et al.*, 2003).

Las proteasas encargadas de la liberación de los ligandos son metaloproteinasas de matriz y desintegrinas metaloproteinasas; particularmente MMP14, ADAM 10 y ADAM17 se han relacionado con el clivaje de MICA y MICB de la superficie de células tumorales. Los ligandos liberados se pueden detectar en el suero de pacientes con diferentes tipos de cáncer donde se han encontrado grandes cantidades de MICA y MICB solubles comparado con el suero de pacientes sanos (Salih *et al.*, 2002; Boutet *et al.*, 2009).

La expresión de los ligandos MICA y MICB puede deberse a efectos de factores externos que inducen su expresión sobre la superficie celular, importante para la unión ligando-receptor y posterior activación de la célula NK. Además se ha descrito que el clivaje de estos ligandos, llevado a cabo por las metaloproteinasas, es un mecanismo de evasión al sistema inmune por parte de las células tumorales y/o infectadas por virus ya que no pueden ser reconocidas por la célula NK al no reconocer los ligandos sobre la superficie celular.

Por otro lado la unión del receptor NKG2D a estos ligandos cuando están en forma soluble causa su internalización disminuyendo así su expresión en las células NK contribuyendo a aumentar la evasión de la respuesta inmune (Dobrovina *et al.*, 2003).

Por lo anterior el objetivo de este trabajo es evaluar la expresión génica de los ligandos MICA, MICB y de las metaloproteinasas ADAM10, ADAM17 y MMP14 durante la progresión de la enfermedad. Para tal fin se recolectaron muestras de pacientes residentes en la ciudad de Bogotá con resultado de biopsia negativa, con lesiones pre-neoplásicas de bajo grado y lesiones pre-neoplásicas de alto grado, en el Hospital de Engativá, Javesalud y Ginesalud.

2. Formulación del problema

2.1 Justificación y planteamiento del problema

Según Piñeros y colaboradores (2010) el cáncer de cuello uterino en Colombia tiene una tasa ajustada por edad (TAE) de mortalidad de 10,1 por cada 100,000 mujeres; afectando sobre todo a departamentos como Arauca, Meta, Tolima y Caquetá. Por lo anterior este tipo de cáncer representa un problema de salud pública para las mujeres en nuestro país.

El agente etiológico del cáncer de cuello uterino es el VPH; dentro del proceso de carcinogénesis cervical el tejido normal al ser infectado con el virus puede promover lesiones intraepiteliales de bajo grado pueden regresar en la lesión en aproximadamente un 60% y un 40% puede progresar hacia lesiones de alto grado, sin embargo aún se desconocen las causas de ésta regresión y/o progresión, es por ello que se piensa que la respuesta inmunológica principalmente la innata como primer mecanismo de defensa puede dar una posible explicación a éste proceso. Una de las principales células capaz de eliminar tanto células tumorales como células infectadas con virus es la célula NK y uno de sus principales receptores de activación es el NKG2D, el cual detecta ligandos de la familia MHC clase I, como MICA y MICB y las ULBPs en la célula blanco (Groh *et al.*, 1999; Groh *et al.*, 2001).

Se ha visto, varios tipos de mecanismos de evasión por parte de la célula tumoral, uno de ellos es la liberación de los ligandos de NKG2D de su superficie, por acción de metaloproteinasas de matriz o desintegrinas y otro de ellos es la baja expresión de los ligandos por parte de la célula (Dobrovina *et al.*, 2003). Sin embargo se desconoce la expresión de los ligandos en pacientes con lesiones preneoplásicas de cuello uterino.

Teniendo en cuenta lo anterior es importante estudiar la expresión génica de los ligandos y de las metaloproteinasas en muestras negativas y lesiones pre-neoplásicas de bajo y alto riesgo en pacientes residentes en la ciudad de Bogotá con el fin de establecer cuál es su expresión durante el proceso de carcinogénesis y si están posiblemente involucrados en la progresión de la enfermedad.

2.2 Pregunta de investigación

¿Hay cambios en la expresión génica de *mica*, *micb*, *adam10*, *adam17* y *mmp14* en las lesiones pre-neoplásicas de pacientes residentes en la ciudad de Bogotá?

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Evaluar la expresión génica de *mica*, *micb*, *adam10*, *adam17* y *mmp14* en lesiones intraepiteliales cervicales en pacientes residentes en Bogotá.

2.3.2 Objetivos específicos

- Correlacionar la expresión de los ligandos de NKG2D con cada tipo de lesión.
- Correlacionar la expresión de las metaloproteinasas con cada tipo de lesión.

3. Marco conceptual

3.1 Cáncer de cuello uterino

3.1.1 Epidemiología

El cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más común en mujeres con 528,000 casos nuevos y un estimado de 266,000 muertes en 2012. Alrededor de nueve de cada diez muertes se producen en países menos desarrollados, siendo las regiones más afectadas África del Este y Melanesia. En Colombia ocupa el segundo lugar en mortalidad por cáncer con un 10,4% y también es segundo en incidencia con un 12,6% tras el cáncer de seno (Globocan, 2012).

El cáncer de cuello uterino es una enfermedad progresiva que se desarrolla a partir de lesiones de la cérvix, llamadas neoplasia intraepitelial cervical.

3.1.2 Carcinogénesis

Las lesiones pre-neoplásicas son cambios anormales en las células de la superficie del cuello uterino las cuales pueden progresar hasta cáncer. Estas lesiones pre-neoplásicas se denominan neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y se clasifican en diferentes grados de progresión: NIC I, NIC II y NIC III (Richart, 1973).

NIC I corresponde a una displasia cervical leve, donde un tercio del tejido se ve afectado, en un 60% de los casos hay una regresión espontánea en las pacientes a tejido normal (Moscicki *et al.*, 2004). NIC II corresponde a una displasia moderada a marcada y NIC III es una displasia grave y corresponde a un carcinoma *in situ*. Para el caso de NIC II hay una probabilidad del 40% de regresión, un 20% de progresión a NIC III y en un 5%

progresión a cáncer invasivo. Por último para NIC III la probabilidad de regresión es del 33% y de progresión a cáncer invasivo mayor al 12% (Ostör, 1993).

3.2 Factores de riesgo

Se ha podido establecer que la infección con VPH es el agente etiológico de esta clase de cáncer, siendo una causa necesaria más no suficiente para desarrollar cáncer de cuello uterino (Walboomers *et al.*, 1999).

Adicionalmente se han descrito otros factores de riesgo claves involucrados con el comportamiento sexual ya que estos se relacionan con la probabilidad de exposición e infección con VPH, como lo es el número de compañeros sexuales y la promiscuidad. Entre otros cofactores asociados a la enfermedad que se han descrito son: alta paridad, tabaquismo, uso prolongado de anticonceptivos orales y otras infecciones de transmisión sexual entre otros (Hidesheim *et al.*, 2001; Castellsagué *et al.*,2002).

3.3 Virus del papiloma humano

3.3.1 Generalidades del virus del papiloma humano.

Los VPHs se caracterizan por ser pequeños, con DNA de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases y cápside icosaédrica. El genoma del VPH tiene una región de expresión temprana, una región de expresión tardía y una región no codificante que contiene elementos reguladores de la expresión y transcripción de las proteínas virales. La región de expresión tardía codifica para las proteínas L1 y L2 que constituyen la cápside viral y la región de expresión temprana codifica para las proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (Longworth and Laimins, 2004).

Las proteínas E1, E2 son las encargadas de regular la replicación del DNA viral (Mohr *et al.*, 1990); E2 participa también en los procesos de regulación de transcripción viral (Cripe *et al.*, 1987) y E1 tiene actividad helicasa con el fin de separa la doble cadena de DNA para llevar a cabo el proceso de replicación (Hughes and Romanos, 1993). La región temprana también codifica para las proteínas E4, implicada en la reorganización del citoesqueleto; E6 y E7 son importantes en los procesos de transformación celular ya que inactivan a p53 y pRb los cuales son importantes puntos de chequeo en el ciclo celular (Münger *et al.*, 1989; Scheffner *et al.*, 1990).

Se han identificado más de 100 tipos de VPH y aproximadamente 40 tipos pueden infectar la región anogenital. Se han clasificado los tipos de VPH en tres categorías: VPH de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81), los cuales se encuentran en verrugas genitales, VPH de posible alto riesgo (26, 53 y 66) y VPH de alto riesgo los cuales se asocian a cáncer de cuello uterino invasivo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) (Muñoz *et al.*, 2003).

3.3.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida del virus comienza cuando este infecta la capa basal del epitelio escamoso del cuello uterino a través de microabrasiones o lesiones. Se ha propuesto que los proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en las células juegan un papel importante en la unión a la superficie celular, siendo un prerrequisito para la interacción y posterior infección (Giroglou *et al.*, 2001). La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina y posteriormente se da el rompimiento de los enlaces disulfuro internos de la cápside debido al ambiente reductor del citoplasma, permitiendo la liberación y transporte del DNA viral al núcleo (Day *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1998).

Una vez infecta la capa basal del epitelio el virus se mantiene en un número bajo de copias en forma episomal debido a la acción de las proteínas E1 y E2. Luego cuando las células basales pasan a la capa suprabasal inician el proceso de diferenciación terminal y en aquellas infectadas con VPH hay un incremento en el número de copias virales y se da la expresión de los genes que codifican para las proteínas E6 y E7. E7 se une con pRb lo cual activa al factor de transcripción E2F y conlleva a la expresión de proteínas necesarias para la replicación del DNA, mientras que E6 esta involucrada en la degradación de p53 la cual es importante en los procesos de apoptosis de células en fase S no programada. En las capas superiores se transcriben los genes de la región tardía para dar lugar a la formación del virión (Doorbar, 2005).

Por otro lado también se puede dar el proceso de integración viral en el genoma del huésped, en dicho proceso se presenta una disrupción en el gen que codifica para la proteína E2, lo cual aumenta la transcripción de las proteínas E6 y E7 que están relacionadas directamente en los procesos de replicación viral (Cho *et al.*, 1987).

3.3.3 Respuesta inmune frente a VPH

La persistencia viral del VPH, puede ser facilitada por múltiples estrategias virales que ocasionan una ineficiente activación tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa. El VPH, como se mencionó anteriormente, infecta las capas basales del epitelio donde se producen las proteínas tempranas, mientras que las proteínas estructurales se producen en las capas más apicales del epitelio, sin embargo esta infección no produce lisis de los queratinocitos por lo que se evita que las células presentadoras de antígenos (APCs) o las células de Langerhans engolfen los viriones y puedan presentar los antígenos al sistema inmune y así desencadenar una respuesta (Evans *et al.* 2001).

En estudios histológicos de verrugas genitales que presentaron una regresión, revelaron una alta infiltración de células T, tanto CD4⁺ como CD8⁺, y de macrófagos; además de un incremento en la producción de citoquinas como IL-12, TNF- α e IFN- γ (Coleman *et al.*, 1994). Los IFNs tienen la capacidad de activar células NK las cuales hacen parte del sistema inmune innato y pueden matar células infectadas con virus. Sin embargo se ha observado que las proteínas E6 y E7 del VPH16 pueden disminuir la transcripción de los interferones tipo 1 en las células del huésped inhibiendo por lo tanto la respuesta inmune innata (Koromilas *et al.* 2001).

Por otro lado los macrófagos, los cuales se pueden unir a componentes virales a través de receptores Toll-like, también liberan señales de tipo citoquinas, quemoquinas e interferones. La proteína MCP-1 atrae a los macrófagos al sitio de infección, uno de los mecanismos de evasión identificados es que la secreción de esta proteína está afectada por la proteína E6 del VPH16, inhibiendo así la translocación de los macrófagos al sitio de la infección (Hacke *et al.*, 2010).

Para que se lleve a cabo una respuesta adaptativa adecuada la respuesta inmune innata debe ser eficiente, las células NK hacen parte de ésta y juegan un papel importante a la hora de eliminar células infectadas con virus y células tumorales, mediante la producción de citoquinas y quemoquinas (Patel and Chiplunkar, 2009). La actividad de las células NK está regulada mediante la expresión de receptores de superficie, entre los cuales se encuentra el receptor NKG2D (Houchins *et al.*, 1991).

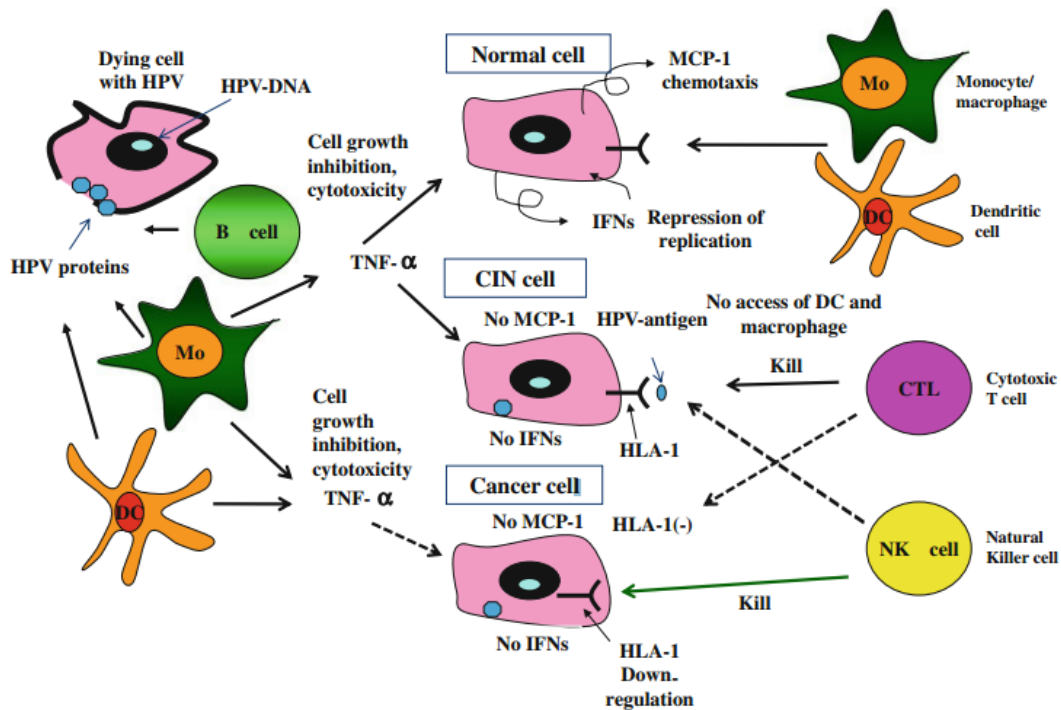


Figura 1. Respuesta inmune innata en diferentes etapas de la infección por VPH. Tomado de Sasagawa *et al.*, 2012

3.4 Células asesinas naturales y el receptor NKG2D

Las células asesinas naturales (NK) son linfocitos derivados de médula ósea y comprenden del 10% al 15% de los linfocitos que circulan en sangre periférica, se caracterizan por ser CD16⁺, CD56⁺ y CD3⁻ (Robertson and Ritz, 1990). Hacen parte del sistema de respuesta inmune innata y su blanco de acción son aquellas células que no presentan el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I), como células infectadas por virus o células tumorales las cuales pierden la expresión de éste complejo (Ljunggren and Kärre, 1990).

El mecanismo de toxicidad de las NK es mediado por la secreción de gránulos citolíticos que contienen perforinas y granzimas. Una vez los gránulos son liberados, las perforinas se insertan en la membrana plasmática de las células diana y se polimerizan induciendo la lisis osmótica de ésta, por otro lado las granzimas en presencia de la perforina contribuyen a la apoptosis de la célula diana (Liu *et al.*, 1995). Este mecanismo es activado dependiendo de una serie de señales que recibe la célula gracias a que en su superficie cuenta con una serie de receptores, tanto activadores como inhibidores, que dependiendo de la señal recibida inhiben o no la lisis celular. Por ejemplo cuando la NK entra en contacto con una célula sana reconoce el MHC I a través de sus receptores inhibidores y al no haber ligandos que se unan a los receptores activadores la señal de inhibición predomina y no habrá lisis de la célula sana. Por otro lado si una célula tumoral ha perdido el MHC I, al interactuar con la NK no habrá ninguna señal inhibitoria que impida la lisis celular. Finalmente las NK también pueden ser activadas por células que al estar bajo condiciones de estrés sobreexpresan ligandos activadores y por más que presenten MHC I esta señal inhibitoria es superada por la señal activadora de los ligandos conduciendo a lisis celular (Vivier *et al.*, 2012).

Dentro de los receptores activadores de la célula NK se encuentran NKp46, NKp44, NKp30 involucrados en la respuesta citotóxica por parte de esta célula (Pende *et al.*, 1999; Sivori *et al.*, 1999). Otro de los receptores activadores descritos para la célula NK es el receptor NKG2D, una glicoproteína transmembranal tipo II, pertenece a la familia NKG2 y es el único que no forma heterodímeros con CD94 sino que al contrario forma homodímeros (Houchins *et al.*, 1991). El gen que codifica para este receptor está localizado en el complejo NK ubicado en el cromosoma 12 en humanos (Yabe *et al.*, 1993).

De las cosas que más llama la atención acerca del receptor NKG2D es la gran cantidad de ligandos a los cuales se puede unir, éstos pertenecen a dos familias: Los ligandos de: 1) Familia de las moléculas relacionadas al MHC I, a la que pertenecen MICA y MICB, 2) Familia de proteínas de unión al citomegalovirus, ULBP 1 a 6. Se ha propuesto que la promiscuidad del receptor se debe a una batalla contra los virus a lo largo de la evolución y además una herramienta de protección contra los tipos de cáncer de rápida evolución (Eagle and Trowsdale, 2007).

Una vez el receptor se ha unido a alguno de sus ligandos se desencadena una activación de señales a través de la molécula adaptadora DAP10 en humanos y DAP10 y 12 en ratones induciendo degranulación y/o producción de citoquinas en las células citotóxicas efectoras (Wu *et al.*, 1999). La unión del receptor NKG2D a sus ligandos es suficiente para activar las NK y su actividad citotóxica además de tener una función co-estimuladora en linfocitos T citotóxicos CD8⁺. La expresión de este receptor está regulada por la expresión de citoquinas en el microambiente del tejido y por los ligandos solubles. Por otro lado se ha visto que IL-2 e IL-15 aumentan rápidamente la expresión tanto del receptor como de su molécula adaptadora mientras que la IL-21 o la IL-12 tienen un efecto contrario en la expresión del receptor NKG2D (Mincheva-Nilsson and Baranov, 2014).

En pacientes con cáncer cervical se ha encontrado una baja expresión del receptor NKG2D en células NK frente a pacientes sanos, lo que puede representar uno de los mecanismos de escape de la célula tumoral frente a la respuesta inmune asociado a la baja actividad de las células NK (García *et al.*, 2009).

3.5 Los ligandos MICA y MICB

Tanto MICA como MICB están compuestos por 3 dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$; además cuentan con un dominio transmembranal y una cola citoplasmática. Los genes que codifican para estos ligandos se encuentran en el cromosoma 6 en humanos (Eagle and Trowsdale, 2007).

La expresión de estos ligandos se ve restringida en tejidos normales, en humanos, al epitelio gastrointestinal pero se ha visto que están sobreexpresados frente a procesos como: daño del DNA, choque térmico, estrés oxidativo, infección, tumorigénesis entre otros (González *et al.*, 2008).

En 1999 Groh y colaboradores evaluaron la expresión de MICA y MICB en tumores epiteliales sólidos encontrando que aunque bajo condiciones normales su expresión se limita al epitelio intestinal, en tumores epiteliales independientemente del tipo de tumor se encuentran expresados. Más adelante en el 2002, Pende y colaboradores confirman los anteriores resultados al estudiar la expresión de MICA en un panel de líneas celulares que incluía: tres carcinomas de colon, dos carcinomas de ovario, un carcinoma hepático

y la línea celular HeLa de cáncer cervical; como resultado encontraron que todos los tumores estudiados expresaban el ligando MICA.

Recientemente Del Toro y colaboradores en el 2011 describieron que MICA y MICB exhibían un patrón de expresión diferencial entre las líneas celulares infectadas con VPH, SiHa y HeLa, y las líneas celulares no infectadas con VPH, C33-A y HaCaT (línea celular de queratinocitos inmortalizados). Observaron que la expresión celular de MICA en líneas infectadas era mayor que la expresión de MICB mientras que hubo bajos niveles de expresión de MICA en las líneas celulares no infectadas, por lo tanto se pudo evidenciar que por mayor grado de homología que compartan estos ligandos al parecer hay una regulación diferencial de su expresión en la superficie celular en el cáncer de cuello uterino y proponen que una sobreexpresión sostenida de MICA puede promover una baja modulación del receptor NKG2D en células NK de pacientes con cáncer de cuello uterino.

3.6 Shedding y metaloproteinasas

3.6.1 Ligandos solubles en plasma

Uno de los mecanismos de la célula tumoral para evadir la respuesta inmune es liberar los ligandos de los receptores de las células NK (*shedding*). En 2002 Salih y colaboradores analizaron los niveles de MICA soluble (sMICA) en suero de pacientes con diferentes tipos de cáncer frente a suero de voluntarios sanos. Todos los sueros analizados de los pacientes sanos tenían bajos niveles de sMICA (entre 0,6 -1 ng/mL), mientras que el suero de los pacientes con cáncer tenían niveles mucho mayores (cáncer de estómago y cáncer de colon $\bar{x} = 5,5$ ng/mL, cáncer rectal $\bar{x} = 6,5$ ng/mL). Por lo anterior se podía concluir que grandes cantidades de MICA eran liberadas por parte de las células tumorales *in vivo*.

Dobrovina y colaboradores en el 2003 analizaron no sólo sMICA sino también sMICB que había en circulación en el suero de pacientes con cáncer colorectal, mediante ensayos ELISA, y encontraron de dos a seis veces mayor cantidad de sMIC comparado con el suero de pacientes sanos. Además encontraron que había una correlación inversa entre la reducción en la densidad de superficie del receptor NKG2D y la cantidad de sMIC en suero. Lo anterior puede deberse a que la unión del receptor con el ligando soluble causaba una internalización del receptor, reduciendo así su expresión en la superficie de las células NK.

Sabiendo que sMICA y sMICB son importantes en la evasión de la respuesta inmune Arreygue y colaboradores en el 2008 estudiaron los niveles de estos ligandos solubles desde lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales hasta cáncer invasivo con el fin de encontrar una relación entre el nivel de sMICA y la progresión. En este estudio participaron diez pacientes sanos, diez pacientes diagnosticadas con lesión de bajo grado, siete pacientes con lesión de alto grado y diez pacientes con cáncer. Como resultado obtuvieron una altos niveles de sMICA en pacientes con cáncer cervical o lesiones precursoras comparados con voluntarios sanos (Mann-Whitney test, $p < 0,05$ en lesión de bajo grado, $p < 0,03$ en lesión de alto grado y $p < 0,01$ en el grupo de cáncer). Lo anterior sugiere que sMICA contribuye a la evasión del sistema inmune en pacientes con cáncer y el bloqueo del ligando soluble que se encuentra en circulación puede ser importante para evitar la disminución de la expresión del receptor NKG2D.

Recientemente Del Toro y colaboradores (2011) cuantificaron sMICA y sMICB en sobrenadantes de cultivo celular de HaCaT, C33-A, SiHa y HeLa encontrando que en las cuatro líneas celulares empleadas había mayor cantidad de sMICB comparado con sMICA, alcanzando su mayor concentración en la línea C33-A, línea negativa para VPH; mientras que la mayor cantidad de sMICA se encontró en la línea celular HeLa.

El *shedding* de los ligandos de NKG2D trae múltiples consecuencias en la respuesta mediada por el receptor: 1) Disminución de la densidad del ligando en la superficie de la célula tumoral 2) Disminución en la modulación de la expresión del receptor en células efectoras 3) bloqueo del sitio de unión al receptor para los ligandos expresados en superficie (Nausch and Cerwenka, 2008). Se ha visto que algunas desintegrinas y metaloproteinasas de matriz están involucradas en el proceso de *shedding* de estos ligandos.

3.6.2 Metaloproteinasas de matriz.

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son endopeptidasas dependientes de zinc; en su estructura tienen un pro-péptido, un dominio catalítico y un dominio C terminal. Las MMPs son secretadas y sintetizadas por las células tumorales y son capaces de degradar la matriz extracelular lo cual se cree contribuye a la angiogénesis del cáncer y a la capacidad de invasión (Salih *et al.*, 2002).

Otro de los roles que se les ha atribuido a las MMPs son ser las responsables del *shedding* de MICA y MICB. Salih y colaboradores cultivaron HeLa en presencia de Pefabloc, un inhibidor de serín proteasas, y en presencia de un inhibidor de metaloproteinasas de matriz (MMPI), y analizaron los niveles de sMICA en los sobrenadantes del cultivo celular. En ausencia de los inhibidores los sobrenadantes contenían un aproximado de 2,5 ng/mL de sMICA, en presencia de Pefabloc no se encontraron cambios significativos en los niveles del ligando soluble, mientras que en las células tratadas con MMPI, desde una concentración de 1uM hasta 10uM, tenían una reducción marcada de sMICA.

MMP14 es uno de los miembros de esta familia que se relaciona directamente con el *shedding* de MICA. En el estudio realizado por Liu y colaboradores (2010), al silenciar otros miembros de la familia de las MMPs no había un cambio significativo en el *shedding* de MICA al evaluar los sobrenadantes de dos líneas celulares de cáncer de próstata TRAMP-C2 y MyC-CaP; mientras que al suprimir la expresión de MMP14 en un 83% en la línea celular TRAMP-C2 el *shedding* se inhibía en un 65%. Por otro lado al sobreexpresar MMP14 aumentaba el *shedding* de MICA y se reducía la expresión de MICA en células MyC-CaP-MICA. También se ha visto que MMP14 puede activar pro-MMP2 y pro-MMP13, pero la inhibición directa de las proteínas mencionadas anteriormente no mostró un efecto significativo en el *shedding* de MICA, demostrando que MMP14 esta implicada de manera directa en el clivaje de este ligando.

3.6.3 Desintegrinas y metaloproteinasas

Las proteínas ADAM son desintegrinas y metaloproteinasas también involucradas en el *shedding* de ectodominios de proteínas, particularmente ADAM 10 y ADAM 17, las cuales se han visto sobreexpresadas en varios tipos de cáncer. El clivaje de MICA ocurre en la superficie de la célula tumoral dentro del tallo yuxtamembranoso lo que coincide con el mecanismo de acción de las ADAM. Al silenciar la expresión de ADAM10 y/o ADAM 17 en células HeLa el *shedding* de MICA se vio reducido significativamente; por ejemplo una supresión en la expresión de ADAM 10 de aproximadamente 62% conduce a reducción de sMICA entre un 31%-50%, además también se observó que el *shedding* de MICA en presencia de inhibidores específicos de ADAM se veía afectado. Por lo anterior Waldahuer y colaboradores sugieren que tanto ADAM 10 como ADAM17 juegan un papel importante en el clivaje de MICA.

En un ensayo realizado por Kohga y colaboradores (2009) evidenciaron que ADAM10 se sobreexpresaba en tejidos de carcinoma hepatocelular (HCC) mientras que en tejidos sanos no se expresaba, además el *knockdown* del gen codificante para ADAM10 conducía a un aumento de MICA unido a membrana celular y a una disminución de los niveles de sMICA. Sin embargo en este mismo estudio el *knockdown* del gen *adam17* no afectó la expresión de MICA en líneas celulares HepG2. Por otro lado también evaluaron el efecto biológico de los fármacos epirubicina y doxorubicina (1ug/mL), utilizados en quimioterapia, en las células HCC, obteniendo como resultado una disminución en la expresión de ADAM10 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína lo que conllevó a un aumento de MICA y una disminución de sMICA, revelando que estos fármacos afectan la expresión y actividad de ADAM10 y por lo tanto inhiben el clivaje de MICA.

En cuanto al *shedding* de MICB se ha visto que ADAM17 está involucrada en este proceso. Los ésteres de forbol, como el PMA, son conocidos por activar el *shedding* de proteínas mediado por ADAM17 mientras que los ionoforos Ca^{2+} , como la ionomicina, activan a el clivaje por parte de la proteína ADAM10. Se trataron líneas celulares U373 (línea celular de glioblastoma) con PMA observando que el *shedding* de MICB se aumentaba, más no en el tratamiento con ionomicina; además el *shedding* de MICB se vio inhibido cuando había un tratamiento con inhibidores de metaloproteinasas, sugiriendo que ADAM17 interviene en el clivaje de MICB mas no ADAM10. Además en células donde se había silenciado por completo el gen *adam17* disminuía el *shedding* de MICB el

cual ni siquiera se veía aumentado frente a PMA. Por último tratamiento con TIMP3, inhibidor de ADAM 10 y 17, reducía también la liberación de MICB. Por lo anterior en este estudio se sugiere que ADAM 17 es importante en el clivaje de este ligando de NKG2D (Boutet *et al.*, 2008).

4. Metodología

4.1 Población de estudio

La población de estudio está conformada por mujeres que asistían a colposcopia al Hospital Engativá, Ginesalud y Javesalud con resultados de citología alterados. Durante la consulta se tomaron biopsias para su diagnóstico histopatológico y para los ensayos correspondientes a este estudio. Dependiendo del resultado histopatológico las pacientes se dividieron en grupos con resultados de biopsia negativos, lesiones de bajo grado (NIC I) y lesiones de alto grado (NIC II y NIC III).

Las muestras fueron tomadas a conveniencia durante un período de recolección de año y medio.

4.1.1 Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión fueron: i) Mujeres de cualquier edad que presentaron lesiones pre-neoplásicas de cuello uterino confirmado por estudio histopatológico. ii) Mujeres que desearon participar en el estudio voluntariamente y firmaron el consentimiento informado (Anexo A).

Los criterios de exclusión fueron: i) Pacientes que habían recibido tratamiento para la neoplasia cervical o infección por VPH. ii) Pacientes que se encontraban en estado de embarazo. iii) Pacientes vacunadas contra VPH. iv) Pacientes que habían recibido transfusión sanguínea en los últimos tres meses.

4.2 Muestras biológicas

- I) DNA extraído a partir de cepillado cervical.
- II) RNA extraído a partir de la muestra de tejido de la biopsia del cuello uterino.
- III) DNA extraído a partir de líneas celulares tumorales.

4.3 Procesamiento de las muestras

4.3.1 Extracción de DNA

Del cepillado cervical se tomaron 200 μ L de muestra después de resuspender, se adicionó 10 μ L de proteínasa K (20 mg/mL) y se incubó durante una hora a 55°C.

Luego de la digestión se adicionaron 200 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó por vórtex y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se adicionó 0,1 volúmenes de Acetato de Sodio 3M y dos volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante, el pellet fue lavado con 500 μ L de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet obtenido a temperatura ambiente. Finalmente el pellet se resuspendió en agua y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

4.3.2 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA total fue aislado a partir de muestras de tejido de la biopsia del cuello uterino conservado en RNA later y de líneas celulares tumorales, utilizando el kit RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente se tomó 1 μ g de RNA total de cada una de las muestras y se llevó a un volumen de 8 μ L con agua libre de RNasa, se realizó un tratamiento con Baseline-Zero[™] DNase (Epicentre) adicionando 1 μ L del buffer y 1 μ L de DNasa e incubando a 37°C por 30 minutos, terminado este tiempo se adicionó 1 μ L de la solución stop y finalmente se

dejó en incubación a 65°C durante 10 minutos. Finalmente para la síntesis del cDNA se utilizó el kit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), se adicionó al RNA previamente tratado con DNasa 1 µL de oligo(dT)₂₀ de una concentración 50 µM y 1 µL de dNTP (10 mM) , se incubó a 65°C por cinco minutos e inmediatamente se colocó sobre hielo por un minuto. Luego se adicionó 2 µL de RT buffer 10X, 4 µL Cloruro de Magnesio (25 mM), 2 µL de DTT (0,1M), 1 µL de RNaseOut (40 U/µL) y 1 µL de SuperScript III RT (200 U/µL); se incubó a 50°C durante 50 minutos seguido de una temperatura de 85°C por cinco minutos e inmediatamente se colocó en hielo durante un minuto. Finalmente se adicionó 1 µL de RNase H (2 U/µL) seguido de una incubación de 20 minutos a 37°C.

El cDNA obtenido se cuantificó espectrofotométricamente usando un NanoDrop[®] y se hicieron alícuotas de trabajo de 125 ng/ µL que se almacenaron a -70°C hasta su uso.

4.4 Diseño de iniciadores

Los iniciadores utilizados fueron diseñados con el programa Beacon Designer[™], especializado en diseño de iniciadores utilizando SYBR[®] Green y sondas para PCR en tiempo real. Posteriormente se realizó un BLAST con el fin de comprobar que los iniciadores diseñados correspondían a los genes de interés.

Además se obtuvieron los valores de energía libre de Gibbs con el fin de evaluar la estabilidad termodinámica de las interacciones que se pueden dar entre los iniciadores (formación de horquillas, homodímeros y heterodímeros) mediante el programa OligoAnalyzer de Integrated DNA Technologies.

El único set de iniciadores que no fue diseñado por el anterior programa fue el correspondiente al gen de la *β-actina*, el cual ya se encontraba disponible en el grupo de investigación.

4.5 PCR en tiempo real y análisis de expresión

4.5.1 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó a un volumen final de reacción de 10 μ L el cual contenía 5 μ L de Kapa Sybr Fast qPCR, entre 0,15 y 0,2 μ M de cada uno de los iniciadores (tabla 1) dependiendo del gen y se completó a volumen final con agua libre de RNasas. El programa fue llevado a cabo en el equipo LightCycler[®] 480 de Roche, el cual comprendía los siguientes pasos: denaturación a 95°C por 4 min con rampa de 4,4 °C/seg seguido de 35 ciclos a 95°C por 10 seg con rampa de 4,4 °C/seg, 60/62°C (dependiendo del gen) por 20 seg con rampa de 2,2°C/seg y 72°C por un segundo con rampa de 4,4 °C/seg. La curva de melting se realizó mediante un ciclo de 95°C por cinco segundos con una rampa de 4,4°C/seg, 65°C por un minuto y 97°C en modo de adquisición continua. Finalmente un paso de enfriamiento a 40°C por 10 segundos con rampa de 2,2 °C/seg.

Los ensayos en las muestras provenientes de pacientes se hicieron por duplicado y en el caso de las líneas celulares por triplicado.

Para cada set de iniciadores se obtuvo la eficiencia realizando curvas estándar utilizando diluciones seriadas de DNA y aplicado la fórmula $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$.

Tabla 1 Características de los iniciador empleados.

Gen	Secuencia primer (5'-3')	Temperatura (°C)	Tamaño del amplímero (pb)
<i>β-actina</i>	F: ATTGCCGACAGGATGCAGA R: GAGTACTTGCCTCAGGAGGA	60	89
<i>mica</i>	F: GGGAACGGAAAGGACCTCAG R: GGGCATTGTCCATTCTCA	60	190
<i>micb</i>	F: GATAAGCGGTCGCTGAGCGGG R: AGCCCATGGCCCTACGTC	62	120
<i>adam17</i>	F: TTGTGTGGTTTGGCCCTTCT R: CTGCTTTTGCACCACAGGTC	60	116
<i>adam10</i>	F: CGAACTCTGCCATTTCACTC R: ACTTCCTCTACACCAGTCAT	62	140
<i>mmp14</i>	F: ACCTTAACCTCTGAACTCT R: CCTCAACAAGATTAGATTCCT	60	124

4.5.2 Análisis de expresión

Se utilizó el método de cuantificación relativa, donde cada muestra fue normalizada basada en la expresión del gen de referencia *β-actina*. La expresión relativa de los genes de interés fue calculada fundamentada en el método $2^{-\Delta CT}$ pero teniendo en cuenta las eficiencias obtenidas para cada set de iniciadores, por lo que el calculo se realizó basado en la siguiente formula: $(E_{actina})^{CP m} / (E_{gen de interés})^{CP m}$ (Pffafli., 2001 y Thomas *et al.*, 2013) .

El análisis estadístico de los datos obtenidos de tiempo real fue realizado utilizando el software GraphPad Prism 6. Los datos obtenidos fueron analizados con las pruebas estadísticas Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para determinar la significancia estadística en las muestras provenientes de pacientes y el t-test para el caso de las líneas celulares. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

4.6 Genotipificación

Para la genotipificación viral de cada una de las muestras se utilizó el kit Multiplex HPV Genotyping Kit (Multimetrix) con el fin de identificar Human Papillomavirus de tipos 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82. El procedimiento realizado se describe a continuación.

Un volumen de 10 μ L de DNA extraído a partir del cepillado cervical es amplificado por PCR utilizando dos sets de iniciadores. El primer set de iniciadores consisten en nueve iniciadores forward y tres iniciadores biotinilados reverse, necesarios para amplificar los tipos de VPH mencionados anteriormente. El segundo set de iniciadores es utilizado para amplificar el gen de la β -globina con el fin de verificar la cantidad y calidad del DNA empleado.

Los productos de PCR son adicionados a un mix de perlas las cuales contienen 26 poblaciones diferentes de perlas acopladas a 24 sondas para VPH, una sonda para β -globina y otra sonda como control de hibridización. Posterior a la desnaturalización de los productos de PCR, estos se hibridan y después de un lavado son etiquetados usando R-ficoeritrina marcada con estreptavidina, un lavado final elimina el marcador que no se unió. Finalmente las perlas son resuspendidas y leídas en el analizador Luminex.

El background se calculó la intensidad media de fluorescencia (MFI) por 1,25 y el cut-off value como el background + 15MFI.

4.7 Consideraciones éticas

Este trabajo se encuentra enmarcado en el proyecto titulado “Influencia del estado de metilación del ADN en cáncer cérvico-uterino (CCU) asociado o no al virus del papiloma humano (VPH) en la regulación de la expresión de ligandos del receptor NKG2D de células naturales asesinas (NK)” el cual cumple con los aspectos éticos básicos y por lo tanto cuenta con aprobación del comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo B).

5. Resultados

5.1 Características de la población

5.1.1 Características generales

Un total de 58 mujeres con resultados de citología alterados fueron incluidas en este estudio. Después de obtener los resultados de patología fueron agrupadas en muestras con resultado histopatológico negativo (n=20), lesión intraepitelial de bajo grado (n=20) y lesión intraepitelial de alto grado (n=18).

El rango de edad de las mujeres participantes estuvo entre los 19 y 68 años (edad promedio 31,4 años y DE= 10,62). El 58,6% de las mujeres, más de la mitad de la población, inició su vida sexual antes de los 18 años y el 34,48% tuvo entre uno y dos compañeros sexuales a la fecha de inclusión.

La mayoría de las mujeres (74%) tienen hijos, donde el primer parto en un 55,8% de los casos fue entre los 18 y los 24 años. Tan solo un 27,5% de las mujeres tuvieron entre uno y dos abortos al momento de la fecha de inclusión.

5.1.2 Características de la población según grado de lesión

La tabla 2 resume las características de la población distribuidas según el grado de lesión encontrado en el análisis histopatológico.

Tabla 2 Características de la población por grado de lesión

Características	Resultado patología		
	Negativa (n=20) n (%)	Lesión bajo grado (n=20) n (%)	Lesión alto grado (n=18) n (%)
Edad (años)			
< 25	6 (30)	8 (40)	3 (16,7)
25 – 44	9 (45)	12 (60)	14 (77,8)
45 – 64	4 (20)	0 (0)	1 (5,6)
> 65	1 (5)	0 (0)	0 (0)
Edad 1ra relación sexual			
< 18	11 (55)	9 (45)	14 (77,8)
≥18	9 (45)	9 (45)	4 (22,2)
NR	0 (0)	2 (10)	0 (0)
Compañeros sexuales			
1 a 2	9 (45)	8 (40)	3 (16,7)
3 a 4	6 (30)	7 (35)	5 (27,8)
5 a 6	3 (15)	3 (15)	7 (38,9)
> 6	2 (10)	2 (10)	2 (11,1)
NR	0 (0)	0 (0)	1 (5,5)
Embarazos			
Ninguno	6 (30)	5 (25)	2 (11,1)
1	5 (25)	6 (30)	2 (11,1)
2	1 (5)	4 (20)	1 (5,5)
3	5 (25)	4 (20)	5 (27,8)
>4	3 (15)	0 (0)	8 (44,4)
NR	0 (0)	1 (5)	0 (0)
Edad primer parto			
< 18	3 (23,1)	2 (14,3)	8 (50)
18 – 24	8 (61,5)	10 (71,4)	6 (37,5)
> 24	0 (0)	1 (7,1)	1 (6,25)
NR	2 (15,4)	1 (7,1)	1 (6,25)
Abortos			
Ninguno	14 (70)	16 (80)	11 (61,1)
1	3 (15)	2 (10)	6 (33,3)
2	3 (15)	1 (5)	1 (5,6)
NR	0 (0)	1 (5)	0 (0)

5.2 Prevalencia de VPH

De las mujeres incluidas en el estudio un 84,5% (n=49) son VPH positivas; un 8,6%(n=5) son VPH negativas y un 6,9% (n=4) no fue posible determinarlo debido a que la cantidad de DNA obtenida fue muy baja para la detección. Infecciones por un único tipo de virus fueron más frecuentes (65,3%) que las infecciones múltiples (34,7%).

Los genotipos más frecuentes, en infección única o múltiple, fueron VPH 16 (75,5%), seguido de VPH 56 (18,4%) y VPH 52 (14,3%), todos considerados como tipos de VPH de alto riesgo.

Los resultados de la distribución tipo-específica de la población en general se observan en la Figura 2

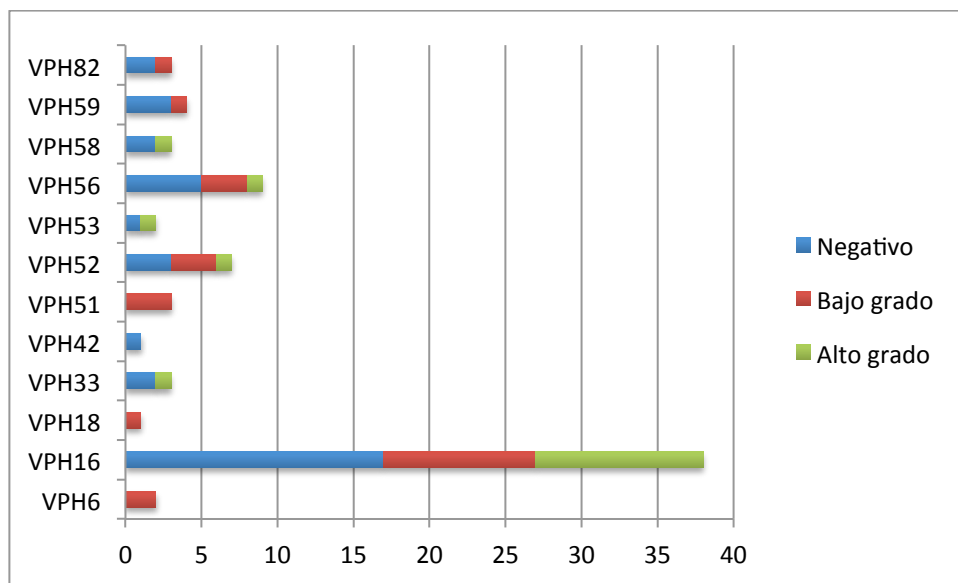


Figura 2. Distribución tipo-específica del virus de papiloma humano en la población por grado de lesión.

En la población en general fueron detectados 12 tipos de VPH, de los cuales nueve son de alto riesgo, uno de posible alto riesgo y dos de bajo riesgo. En la tabla 3 se muestran los resultados de tipos de VPH detectados según su clasificación por riesgo, ya sea en infección única o múltiple, por tipo de lesión. Se puede evidenciar que los tipos de VPH de alto riesgo son bastante frecuentes tanto en las patologías negativas como en las lesiones de bajo y alto grado, mientras que los de posible alto riesgo y los de bajo riesgo son muy poco frecuentes.

Tabla 3 Distribución de VPH según su clasificación por riesgo en cada tipo de lesión.

Tipo de VPH	Grupo por resultado histopatológico		
	Negativa (n=20) n (%)	Lesión bajo grado (n=20) n (%)	Lesión alto grado (n=18) n (%)
Alto riesgo	19 (95)	15 (75)	13 (72)
Posible alto riesgo	1 (5)	0 (0)	1 (5,6)
Bajo riesgo	1 (5)	2 (10)	0 (0)

En la tabla 4 se muestran las frecuencias de infección de los tipos de VPH de alto riesgo (AR), posible alto riesgo p(AR) y bajo riesgo (BR), encontrados en los tres grupos, discriminando si es una infección única o múltiple.

Tabla 4 Frecuencias de virus de papiloma humano de AR, pAR y BR en infecciones únicas y múltiples en los diferentes tipo de lesión.

Grupo Histopatológico	Infección única			Infección múltiple		
	Alto riesgo n (%)	Posible Alto riesgo n (%)	Bajo riesgo n (%)	AR + BR n (%)	AR + pAR n (%)	AR n (%)
Negativa (n=20)	9 (45)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (5)	9 (45)
Lesión bajo grado (n=20)	9 (45)	0 (0)	2 (10)	0 (0)	0 (0)	6 (30)
Lesión alto grado (n=18)	12 (66,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	0 (0)

5.3 Expresión génica por PCR en tiempo real

Empleando PCR en tiempo real se determinó la expresión relativa de los genes de interés en cada uno de los grupos de estudio por duplicado: muestra negativa para lesión intraepitelial cervical (n=20), lesión de bajo grado (n=20) y lesión de alto grado (n=18); y en las líneas celulares HeLa (VPH 18) y C-33 A (negativa para VPH) por triplicado.

5.3.1 Cálculo de eficiencias

Se realizaron las curvas de eficiencia para cada set de iniciadores mediante diluciones seriadas de DNA. Las eficiencias obtenidas se muestran en la tabla 5 y las curvas obtenidas se pueden consultar en el anexo C.

Tabla 5 Eficiencias obtenidas para cada set de iniciadores

Gen	Eficiencia obtenida
<i>β-actina</i>	2,031
<i>mica</i>	1,781
<i>micb</i>	1,889
<i>adam10</i>	1,891
<i>adam17</i>	1,762
<i>mmp14</i>	1,848

5.3.2 Análisis de expresión de ligandos de NKG2D.

Para el caso de las líneas celulares HeLa y C-33 A el análisis de resultados, mediante la prueba t-Student muestra que hay diferencias estadísticamente significativas para el caso de *mica*, con un valor de p de 0,0203. Sin embargo para el caso de *micb* no se encontraron diferencias entre las dos líneas celulares empleadas (Figura 3).

Por otro lado se realizó el análisis de resultados, mediante la prueba Kruskal-Wallis, entre los grupos de estudio (negativo, lesión de bajo grado y lesión de alto grado) obteniendo como resultado que no hay diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los genes de interés (Figura 3). Sin embargo para el caso de *micb*, se pudo observar un nivel de expresión relativo mayor en la lesión de bajo grado a pesar de no haber diferencias significativas.

5.3.3 Análisis de expresión de desintegrinas y metaloproteinasas de matriz.

Después de realizar la prueba t-Student para las desintegrinas y metaloproteinasas de matriz en las líneas celulares HeLa y C-33 A, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el caso de *mmp14*, con un valor de p de 0,0062. Para los genes *adam10* y *adam17* no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares empleadas (Figura 4).

Por otro lado en los diferentes grupos de estudio (negativo, lesión de bajo grado y lesión de alto grado) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los genes de interés después de realizar la prueba Kruskal-Wallis (Figura 4).

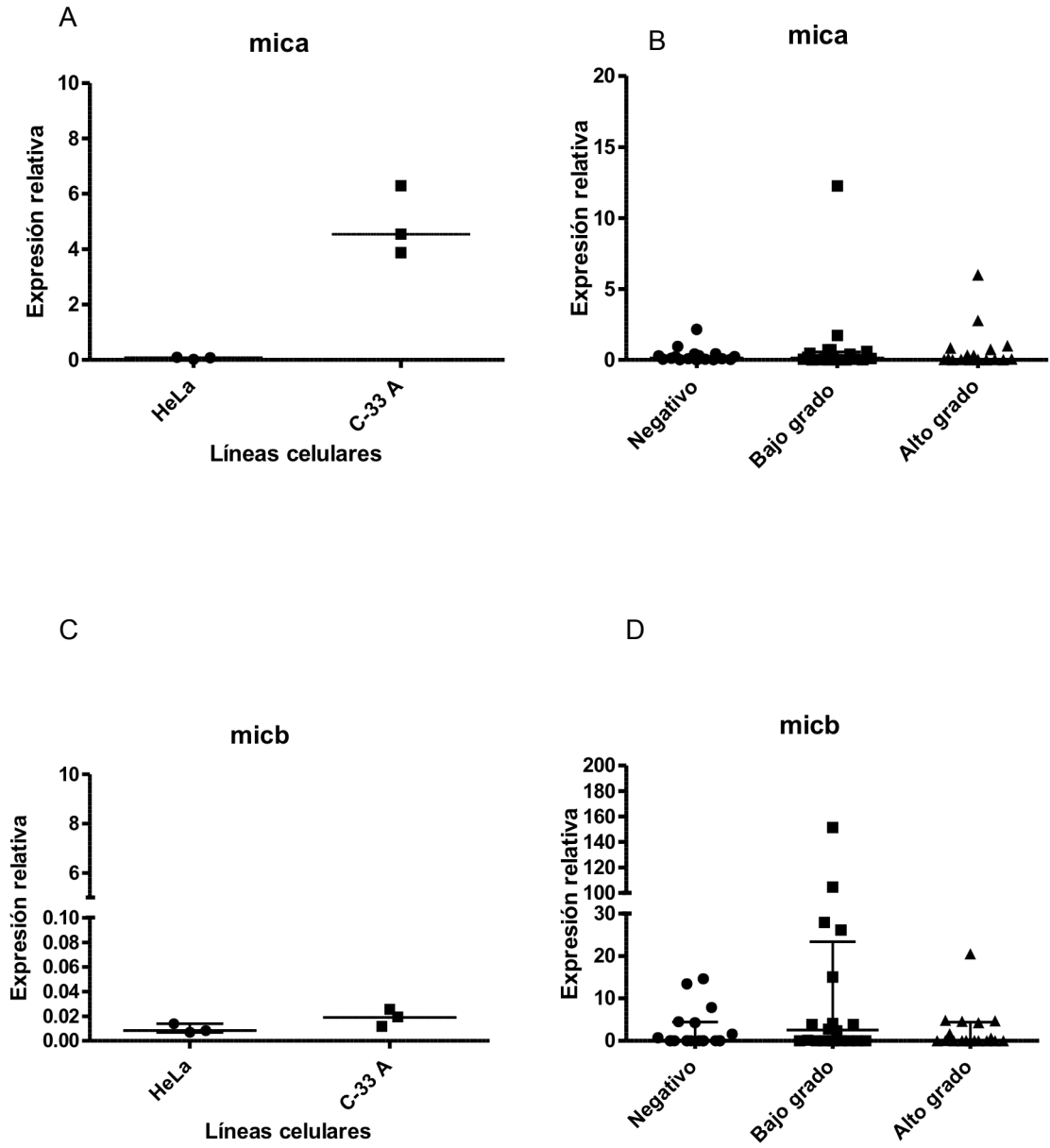


Figura 3. Expresión de los ligandos de NKG2D en las líneas celulares HeLa y C-33 A y en los diferentes grupos de estudio: muestras con resultado histopatológico negativo, lesión de bajo grado y lesión de alto grado. Los valores de p obtenidos para cada gen se muestran a continuación: A) 0,0203 B) 0,9520 C) 0,1936 y D) 0,6440.

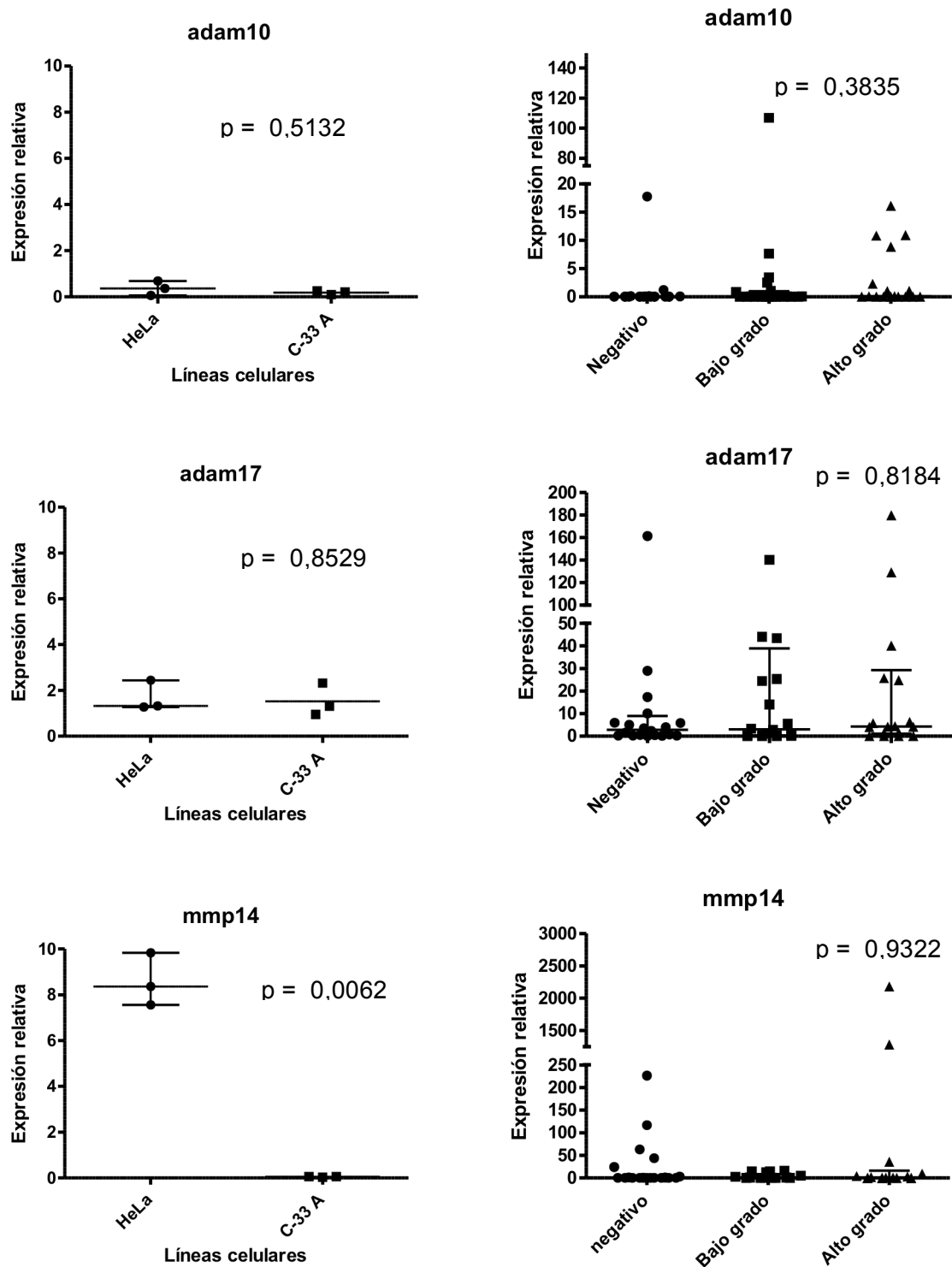


Figura 4. Expresión de las metaloproteinasas en las líneas celulares HeLa y C-33 A. y en los diferentes grupos de estudio: muestras con resultado histopatológico negativo, lesión de bajo grado y lesión de alto grado. Los valores de p obtenidos para cada gen se muestran en las gráficas.

6. Discusión

6.1 Características de la población y prevalencia de VPH

En este trabajo se encontró un alto porcentaje de mujeres positivas para VPH de alto riesgo en resultado de patología negativo (95%), en lesión de bajo grado (75%) y en la lesión de alto grado (72%), siendo entonces el AR-VPH el más frecuente en todos los grupos de estudio.

Por otro lado las infecciones múltiples fueron menos frecuentes que las infecciones únicas (34,7% vs 65,3%). Aún no se conoce la relación que tengan las infecciones múltiples con la progresión a CCU, sin embargo las interacciones de cooperación o competencia que se pueden dar entre los tipos virales que coexisten probablemente ayudan a aumentar el riesgo de progresión ya que pueden actuar de forma sinérgica para inducir el desarrollo de la lesión o la progresión, por ejemplo se ha sugerido que los tipos virales pertenecientes a la misma especie y que por lo tanto comparten propiedades biológicas pueden éstas trasladarse a llevar un curso similar en la inducción de la lesión y en la progresión de la enfermedad; además es posible que los tipos virales de la especie A9 (16 y 18 por ejemplo) ejerzan un efecto oncogénico más rápido y extenso en el epitelio infectado cervical que ya está infectado con otros tipos de VPH (Dickson *et al.*, 2013, Trottier *et al.*, 2006). Es de resaltar que la mayoría de las asociaciones en infecciones múltiples se dan entre tipos virales de alto riesgo, en resultados de patología negativos (45%) y en lesión de bajo grado (30%), por lo que se puede suponer que este grupo de pacientes se encuentra en mayor riesgo de desarrollar una lesión de alto grado. En las lesiones de alto grado no se encuentran infecciones múltiples de tipos de AR sino que predominan las infecciones únicas por AR-VPH, lo que podría dar indicios de que las interacciones que predominan son más de tipo competitivo que de cooperación.

Dado los resultados encontrados en este estudio y lo reportado en la bibliografía se ratifica que la genotipificación de VPH es una herramienta importante para la detección temprana y seguimiento a pacientes en riesgo de desarrollar lesiones de alto grado. Esta prueba está incluida en el Plan Obligatorio de Salud desde el año 2011, para mujeres entre los 30 y 65 años, pero no es ampliamente conocida por las mujeres, por lo que su divulgación es importante para la prevención del CCU.

6.2 Análisis de expresión de ligandos de NKG2D.

NKG2D es un receptor con múltiples ligandos, dentro de los cuales se encuentran MICA y MICB, miembros de la familia MHC clase I. La expresión de estos ligandos esta restringida en tejidos sanos, al epitelio gastrointestinal; pero frecuentemente se encuentran sobre expresados en células infectadas o transformadas favoreciendo la respuesta citotóxica por parte de las células NK (González et al., 2008).

Para el caso de *mica* se encontró una mayor expresión en la línea C-33 A, negativa para VPH, que en la línea HeLa; estos resultados son contrarios a los reportados por Del Toro y colaboradores en el 2011 donde reportaban una baja expresión de *mica* en la línea negativa para VPH.

Por otro lado entre las muestras con resultado histopatológico negativo, lesión de bajo grado y lesión de alto grado no hay diferencias estadísticamente significativas para *mica* y se encontró una baja expresión del gen en los tres grupos de estudio. Los resultados de expresión de *mica* coinciden con los de Textor y colaboradores, quienes en 2008 encontraron en las muestras negativas y en lesiones intraepiteliales cervicales una expresión débil o nula de *mica*.

En cuanto a *micb* no se observaron diferencias de la expresión del gen en las líneas celulares empleadas las cuales fueron menores a las reportadas Del Toro y colaboradores, quienes encontraron una mayor expresión en la línea C-33 A que en HeLa.

Los cambios que se presentan en la expresión tanto de *mica* como de *micb* frente a lo reportado puede deberse a las condiciones del cultivo, el número de pases de las líneas celulares empleadas o contaminación imperceptible por *mycoplasma*.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las muestras negativas, lesión de bajo grado y lesión de alto grado, sin embargo se puede observar una mayor expresión en la lesión de bajo grado comparada con los otros grupos lo que sugiere que los cambios en el tejido debido a la infección por VPH pueden inducir la expresión del ligando. Una expresión alta sería de esperar también en las lesiones de alto grado pero lo que se observa es de hecho una expresión parecida al grupo de muestras negativas, por lo que una pérdida de la expresión del ligando puede estar ocurriendo en este tipo de lesión por ejemplo por mecanismos epigenéticos.

Los genes *mica* y *micb* se caracterizan por ser altamente polimórficos, siendo *mica* el más polimórfico con 65 alelos identificados hasta el momento. Para el caso de *mica* los iniciadores alinean con los alelos *00801. En población euro-brasilera este alelo se ha descrito como el más común (25,3%), seguido del alelo *00201 (17,7%), y en población afro-americana los alelos *00201 y *00801 también son los más frecuentes (Ribas et al., 2008 y Zhang et al., 2002). Por otro lado en caucásicos norteamericanos el alelo más

frecuente es el *00801, mientras que en tribus indígenas suramericanas el alelo más frecuente es el *00201 (Zhang *et al.*, 2002). Se ha visto que solo algunas de las variantes se expresan en la superficie celular, lo que puede explicar la débil expresión de *mica* en las diferentes lesiones, ya que estudios de polimorfismos respecto a este gen no se han evaluado en población colombiana (Vetter *et al.*, 2004).

6.3 Análisis de expresión de desintegrinas y metaloproteinasas de matriz.

Se ha determinado que uno de los posibles mecanismos del tumor para evadir el sistema inmune es clivar los ligandos, como MICA y MICB, para evitar ser reconocido por el receptor NKG2D; algunas de las proteínas que al parecer están involucradas en este proceso hacen parte de las metaloproteinasas de matriz y desintegrinas, como es el caso de ADAM10, ADAM17 y MMP14.

Por otro lado se ha demostrado que las proteínas ADAM10 y ADAM17 están involucradas en el clivaje de los ligandos del receptor NKG2D como mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Además la unión del NKG2D a los ligandos solubles promueve su internalización y posterior degradación, como consecuencia se obtiene una disminución de la expresión del receptor y por lo tanto una menor actividad citotóxica de las células NK.

Al revisar la bibliografía, diferentes estudios se han encontrado donde se evalúan estos genes en diferentes líneas celulares tumorales. En una línea celular de carcinoma pancreático se encontró que solo la baja regulación de ambos genes inhibía el clivaje de MICA mientras que ADAM17 se identificó como el principal responsable del clivaje de esta proteína en otras líneas celulares como es el caso de la línea MDA-MB-231 (cáncer de seno). En el clivaje de MICB tanto ADAM10 como ADAM17 son igualmente efectivas en la línea PancTu-1 (cáncer de páncreas), mientras que ADAM17 fue más efectiva en otras líneas como la de cáncer de próstata PC-3. De lo anterior se podría llegar a concluir que el papel que juegan estas proteínas en el clivaje es más una cuestión selectiva por parte de la célula tumoral que una especificidad de sustrato (Chitadze *et al.*, 2013, Waldhauer *et al.*, 2008).

Para el caso de *adam17*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas C-33 A y HeLa; además se observó una expresión baja en las dos líneas celulares empleadas. Estos resultados son contrarios a lo reportado por Xu y colaboradores en el 2014, quienes encontraron altos niveles de la proteína en tejidos con CCU en comparación con tejidos adyacentes no cancerígenos y una alta expresión de ésta se ha asociado con un mal pronóstico en pacientes con CCU por lo que podría sugerirse que podría llegar a ser un buen marcador de pronóstico, por lo tanto era de esperarse que un modelo de CCU en líneas celulares se encontraría una alta expresión de *adam17*.

Al estudiar la expresión de *adam17* en los grupos negativo, bajo grado y alto grado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas pero si se puede observar un leve aumento de la expresión del gen para algunas muestras en la lesión de bajo y alto grado.

En cuanto a *adam10* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares y se reportó una baja expresión de éste en ambas. Tampoco se encontraron diferencias en los grupos de estudio donde se puede observar que la expresión de *adam10* no cambia durante el proceso de carcinogénesis de cuello uterino. Aunque se ha encontrado un aumento en la expresión de *adam10* por ejemplo en cáncer gástrico (Yoshimura *et al.*,2002), en el 2005 Lendeckel y colaboradores no encontraron diferencias a nivel de expresión de mRNA entre tejido normal y tejido tumoral para el caso de cáncer de seno.

Según nuestros resultados *mmp14* muestra diferencias de expresión entre las líneas celulares, siendo mayor expresión en la línea celular HeLa. Da Silva y colaboradores en el 2012 analizaron el efecto de VPH 16 en la expresión y actividad de MMP2 Y MMP9, metaloproteinasas de matriz asociadas a la progresión de neoplasias cervicales (Sheu *et al.*, 2003), encontrando que queratinocitos primarios humanos que expresaban las oncoproteínas virales exhibían una sobre expresión de MMP-9 asociado, probablemente, a que las proteínas E6 y E7 mediaban la baja regulación de inhibidores de MMP como RECK y TIMP-2. Además le atribuían nuevas funciones a las oncoproteínas virales que promovían el ambiente tumorigénico como contribuir directamente a la actividad de MMP-9 a través de un mecanismo de sobre regulación de los niveles y actividad de esta proteína mediante E7. Teniendo en cuenta lo anterior podría sugerirse que al bajar la regulación de inhibidores de MMP no solo se alteraría la expresión de MMP-9 sino también podría alterarse la de MMP-14 lo cual explicaría por que su expresión es mayor en la línea positiva para VPH que en la línea negativa.

Para finalizar la expresión de *mmp14* no presenta diferencias estadísticamente significativas entre las muestras negativas, lesión de bajo grado y lesión de alto grado; estos resultados coinciden con Giraudo y colaboradores quienes en 2004 analizaron por tiempo real la expresión de nueve tipo de metaloproteinasas de matriz y encontraron que solo *mmp9* estaba sobreexpresada durante la carcinogénesis, particularmente en NIC3 y carcinomas, mientras que otros tipos como *mmp14* no cambiaba su expresión en este proceso.

A través de estudios realizados se ha identificado que MICA puede ser clivada en múltiples sitios, por lo que varias clases de proteasas pueden estar involucradas en el proceso, esto puede explicar porque se encuentran expresiones mayores en todas las metaloproteinasas estudiadas ya que todas podrían llegar a estar involucradas. Además debe tenerse en cuenta que se han descrito mas de 80 variantes para *mica* y aproximadamente 30 variantes para *micb* y que estas variantes alélicas pueden influir en la susceptibilidad de cada proteína al clivaje por parte de ADAM10/17 y MMP14

(Chitadze *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2010). Por ejemplo se ha descrito que MICA* A5.1 puede ser más susceptible al clivaje por parte de metaloproteinasas y se ha asociado a cáncer de seno y cáncer oral de célula escamosa (Choy *et al.*, 2010).

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

- Los análisis de expresión mediante PCR en tiempo real realizado en las líneas celulares muestra una mayor expresión de la metaloproteinasa, MMP14, en la línea positiva para VPH que en la línea negativa, por lo que puede existir una posible relación entre la infección por VPH y la expresión de la metaloproteína.
- La expresión de *mica* es baja en los tres grupos de estudio por lo que en el presente trabajo no se encuentra una relación de la expresión de este gen con la progresión de la enfermedad.
- Aunque no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, la expresión de *micb* es alta en la lesión de bajo grado y luego cae en la lesión de alto grado por lo que una pérdida de la expresión del gen puede estar ocurriendo.
- Las metaloproteinasas *adam10* y *mmp14* no presentan cambios en su expresión en el proceso de carcinogénesis por lo que no se encuentra una relación de la expresión de estos genes con la progresión de la enfermedad.

7.2 Recomendaciones

- Determinar si hay presencia de MICB como ligando solubles en plasma con el fin de evaluar si realmente se esta llevando a cabo un clivaje de estas proteínas como mecanismo de evasión a la respuesta del sistema inmune.
- Evaluar el perfil de metilación del gen *micb* en los grupos de estudio, con el fin de establecer si es un posible mecanismo que explique la disminución de la expresión de este gen en las lesiones de alto grado.

**Anexo A: Consentimiento informado
para participar en el estudio.**

Anexos

Influencia del estado de metilación del ADN en cáncer cervico-uterino (CCU), asociado o no al virus del papiloma humano (VPH), en la regulación de la expresión de ligandos del receptor NKG2D de células naturales asesinas (NK).

CONSENTIMIENTO INFORMADO

La Universidad Nacional de Colombia en asocio con la Universidad de La Sabana, están realizando un estudio en Virus del Papiloma Humano en las diferentes lesiones de cuello uterino, en particular, se pretende describir el papel de la metilación en la expresión de ligandos de NKG2D como mecanismo de evasión de respuesta inmune innata.

Su colaboración es de vital importancia para nosotros, porque la investigación en la cual participa traerá consigo beneficios para la comunidad en general. La decisión que Ud. tome es voluntaria y no influirá en el tratamiento que recibe en ésta institución.

Si Ud. Tiene a gusto colaborar su participación consiste en:

1. Permitir la toma de una biopsia ó cepillado cervical, las cuales será tomadas por personal entrenado y experto para tal fin.
2. Autorizar la revisión de su historia clínica.
3. Autorizar el procesamiento de las muestras para el estudio.
4. Autorizar el almacenamiento de las muestras restantes de este estudio en un banco de muestras para posteriores investigaciones

Su colaboración es de vital importancia para nosotros, porque la investigación en la cual participa traerá consigo beneficios para las mujeres de nuestra sociedad.

Ninguno de los dos procedimientos tiene efectos adversos para su salud.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo.

Yo _____ identificado con C.C. _____
 acepto mi participación voluntaria en el estudio a realizar.

Firma _____ Fecha _____

Anexo B: Aprobación por parte del Comité de ética

Bogotá, octubre 11 de 2010

Profesor
FABIO ANCÍZAR ARISTIZÁBAL GUTIÉRREZ
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Ciudad

Respetado Profesor:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 11 de octubre de 2010 (Acta 05), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted.

Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto: "Influencia del estado de metilación del ADN en cáncer cérvico-uterino (CCU) asociado o no al virus de papiloma humano (VPH) en la regulación de la expresión de ligandos del receptor NKG2D de células naturales asesinas (NK)". Grupo Farmacogenética del Cáncer.

Observaciones: En este estudio se tomarán biopsias de cepillados cervicales de pacientes con lesiones preneoplásicas y neoplásicas de cuello uterino, muestras q serán analizadas posteriormente con técnicas moleculares e inmunohistoquímicas. Corresponde a una investigación con riesgo mínimo (Resolución 008430 de 1993 del MSP). Son claros los criterios de inclusión / exclusión de pacientes femeninas para el estudio. El formulario de "consentimiento informado" es suficientemente claro y reúne los aspectos básicos. Se resalta el compromiso de mantener la privacidad y confidencialidad de las mujeres participantes, así como el uso estrictamente científico de los datos. Los mismos criterios aplican para los datos obtenidos mediante la encuesta epidemiológica que deben contestar los pacientes.

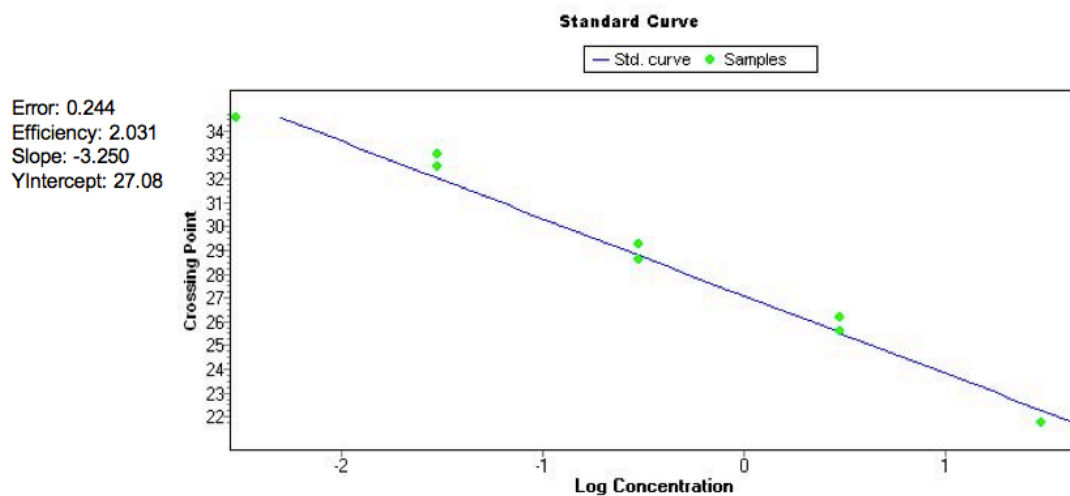
Concepto: Aprobado.

Cordialmente,

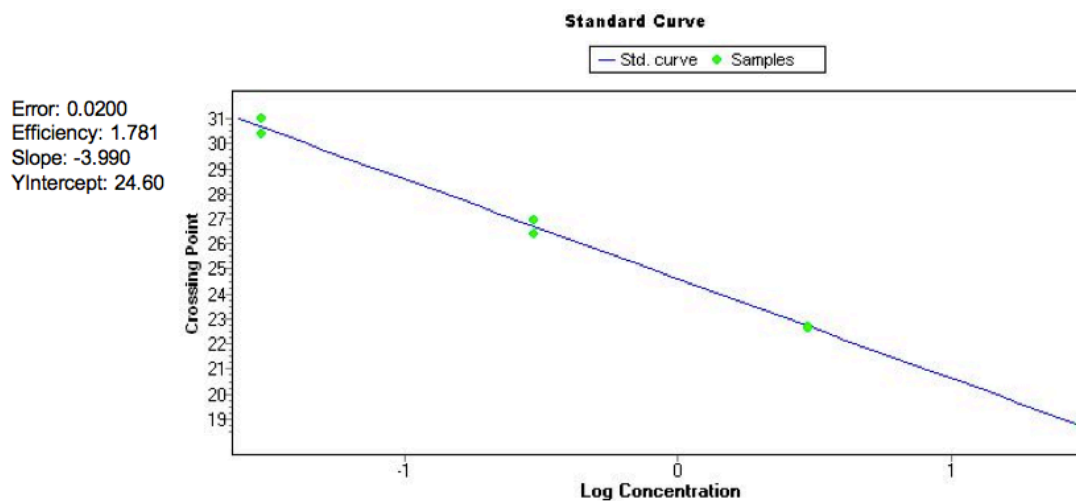


LUIS FERNANDO OSPINA G.
Coordinador Comité de Ética

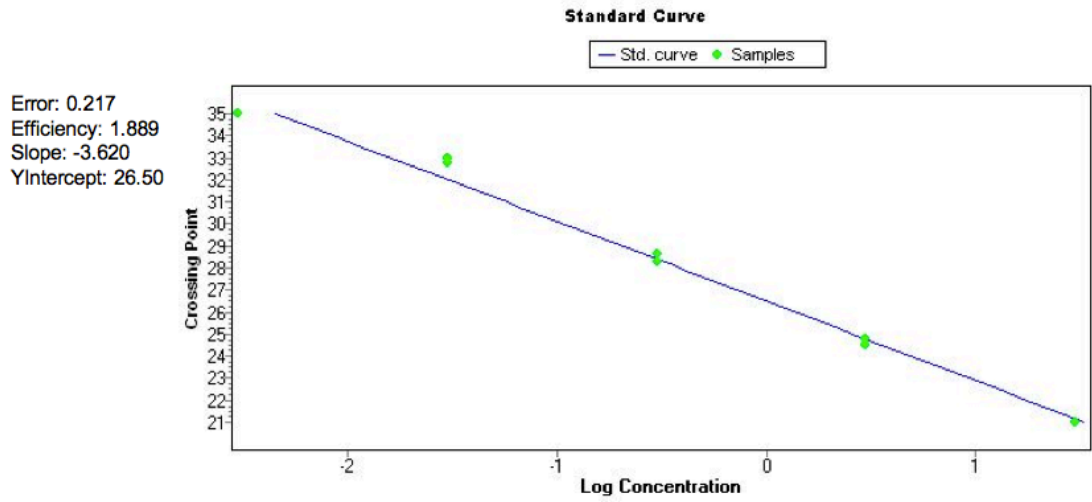
**Anexo C: Curvas de eficiencia
obtenidas para cada set de
iniciadores.**



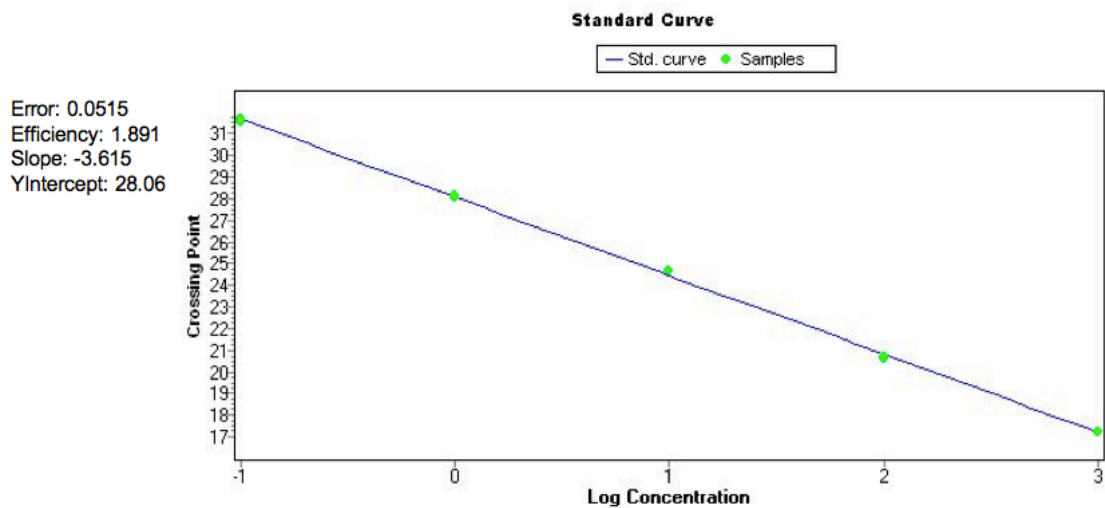
Gráfica C- 1 Cálculo de la eficiencia de los iniciadores utilizados para la evaluación del gen *β-actina*. Registro tomado del equipo LightCycler 480



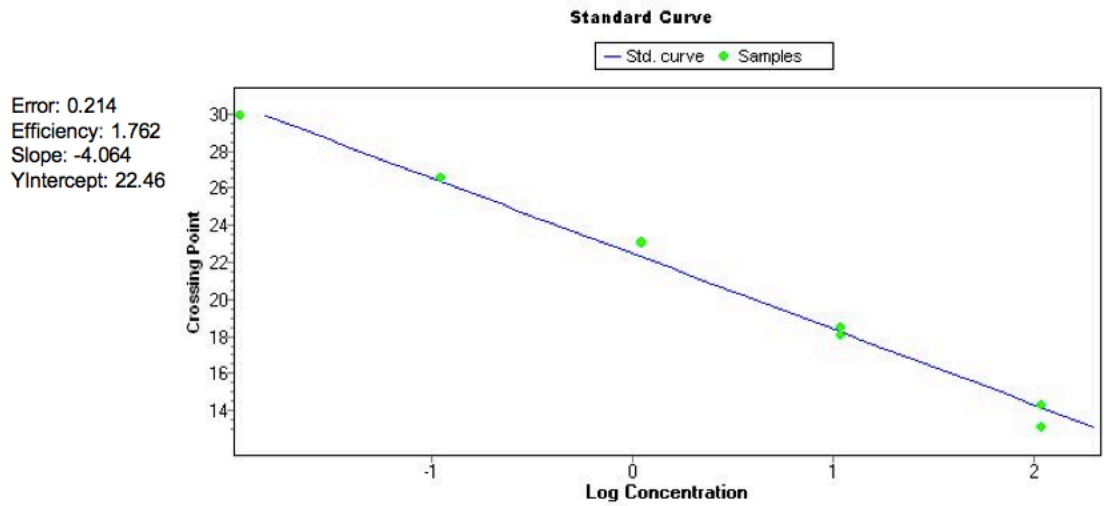
Gráfica C- 2 Cálculo de la eficiencia de los iniciadores utilizados para la evaluación del gen *mica*. Registro tomado del equipo LightCycler 480



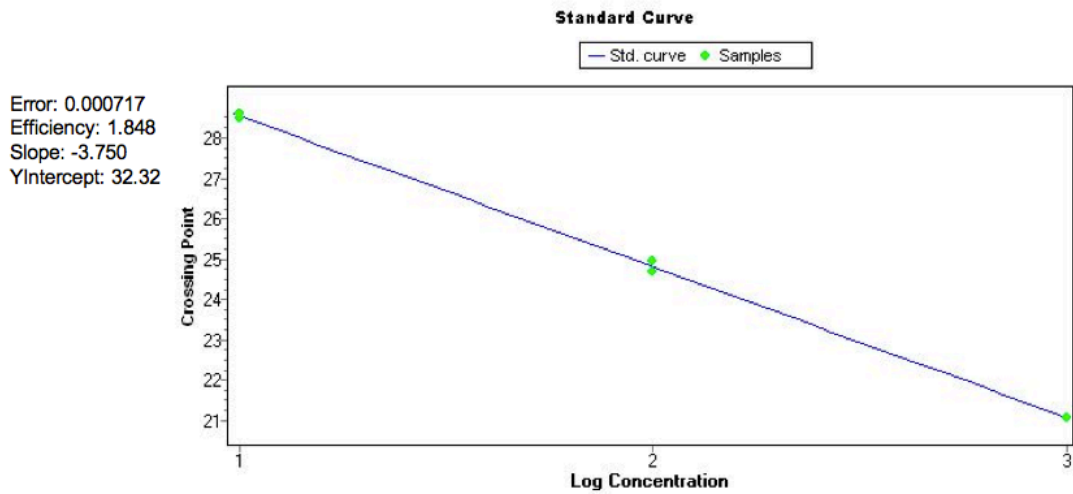
Gráfica C-3 Cálculo de la eficiencia de los iniciadores utilizados para la evaluación del gen *micb*. Registro tomado del equipo LightCycler 480.



Gráfica C-4 Cálculo de la eficiencia de los iniciadores utilizados para la evaluación del gen *adam10*. Registro tomado del equipo LightCycler 480.



Gráfica C-5 Cálculo de la eficiencia de los iniciadores utilizados para la evaluación del gen *adam17*. Registro tomado del equipo LightCycler 480.



Gráfica C-6 Cálculo de la eficiencia de los iniciadores utilizados para la evaluación del gen *mmp14*. Registro tomado del equipo LightCycler 480.

8. Bibliografía

- Arreygue, N., Daneri, A., del Toro, A., Cid, A., Gonzalez, O., *et al.* (2008). Augmented serum level of major Histocompatibility complex class I-related chain (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*. 8:16-24.
- Bosch, FX., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C., Shah, K. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J.Clin. Pathol.* 55:244-265.
- Boutet, P., Agüera, S., Atkinson, S., Pennington, C., Edwards, D., Murphy, G., Reyburn, H., Valés, M. (2009). Cutting Edge: The Metalloproteinase ADAM17/ TNF- α -Converting Enzyme Regulates Proteolytic Shedding of the MHC Class I-Related Chain B Protein. *J. Immunol.* 182: 49-53.
- Castellsagué, X., Bosch, F., Muñoz, N. (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 191-199.
- Chitadze, G., Bhat, J., Lettau, M., Janssen, O., Kabelitz, D. (2013). Generation of Soluble NKG2D Ligands: Proteolytic Cleavage, Exosome Secretion and Functional Implications. *Scand. J. Immunol.* 120-129.
- Choy, M., Phipps, M. (2010). *MICA* polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Cell press.* 16 (3): 97-106.
- Coleman, N., Birley, H., Renton, A., *et al.* (1994). Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol.* 102:768–74.
- Cripe, T., Haugen, T., Turk, J., *et al.* (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6–E7 promoter by a keratino- cyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6:3745– 375

- Da Silva, L., Boccardo, E., Termini, L., Robachini, T., *et al.* (2012). HPV 16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2 Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. *PLoS One*. 7:1-9.
- Day, P., Lowi, D., Schiller, J. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 307: 1-11.
- De Vet, H., Knipschild, PG., Sturmans, F. (1993). The role of sexual factors in the aetiology of cervical dysplasia. *Int. J. Epidemiol.* 22:798-803.
- Del Toro, S., Arreygue, N., Aguilar, A., Cid, A., Jimenez M., *et al.* (2011). MHC class I-related chain A and B ligands are differentially expressed in human cervical cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* 11:15
- Dickson, E., Vogel, R., Bliss, R., Downs, LS. (2013). Multiple-type HPV infections: a cross-sectional analysis of the prevalence of specific types in 309,000 women referred for HPV testing at time of cervical cytology. *Int J Gynecol Cancer.* 23(7): 1295-1302
- Doubrovina, E., Doubrovin, M., Vider, E., Sisson, R., O'Reilly, R., Dupont, P., Vyas, Y. (2003). Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma. *J. Immunol.* 171: 6891-6899.
- Eagle, R., Trowsdale, J. (2007). Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat. Rev. Immunol.* 7:737-744.
- Haverkos, H., Rohrer, M., Pickworth, W. (1999). The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomed. & Pharmacother.* 54: 54-9.
- Hacke, K., Rincon-Orozco, B., Buchwalter, G., *et al.* (2010). Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53. *Mol Cancer.* 9:82–94.
- Hildesheim, A., Herrero, R., Castle, PE. (2001). HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer.* 84(9): 1219-1226.
- Houchins, J., Yabe, T., McSherry, C., Bach. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med.* 173:1017–1020.

- Huergo, L., Acebes, A., López, A., Villa, M., Gonzalez, A., Gonzalez, S. (2014). Molecular bases for the regulation of NKG2D ligands in cancer. *Front Immunol.* 5: 1-7.
- Hughes, F. J., M. A. Romanos. (1993). E1 protein of human papilloma- virus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* 21:5817–5823.
- Kjaer, S., Frederiksen, K., Munk, C., Iftner, T. (2010). Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst.* 102: 1478-1488.
- Kohga, K., Takehara, T., Tatsumi, T., *et al.* (2009). Anticancer Chemotherapy Inhibits MHC Class I-Related Chain A Ectodomain Shedding by Downregulating ADAM10 Expression in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 69:8050-8057.
- Koromilas, A., Li, S., Matlashewski, G. (2001). Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12:157–70.
- García, D., Cid-Arregui, A., Schmitt, M., Castillo, M., Briceño, I., Aristizábal, F. (2011). Highly Sensitive Detection and Genotyping of HPV by PCR Multiplex and Luminex Technology in a Cohort of Colombian Women with Abnormal Cytology. *O Virol J.* 5: 70-79.
- García, T., del Toro, A., Albarran, B., del Toro, S., Sanchez, P., Ramirez, M., Balderas, L., *et al.* (2009). Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer.* 9:186-193.
- Giraudou, E., Inoue, M., Hanahan, D. (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP-9 expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 114: 623-633.
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, K., *et al.* (2001). Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J Virol.* 1565-1570.
- Globocan 2012, Section of Cancer Information. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp#WOMEN>. Consultado el 8 de Mayo de 2014.
- González, S., López, A., Suarez, B., López, A., López, C. (2008). NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Cell Press.* 29:397-403.

- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K., Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *PNAS*. 96: 6879-6884.
- Groh, V., Rhinehart, R., Hobecker, J., *et al.* (2001). Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ cells by NKG2D *via* engagement by MIC induce on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* 2(3):255-260.
- Lendeckel, U., Kohl, J., Arndt, M., *et al.* (2005). Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 131: 41-48.
- Li, M., Beard, P., Estes, P., *et al.* (1998). Intercapsomeric Disulfide Bonds in Papillomavirus Assembly and Disassembly. *J Virol.* 2160-2167.
- Liu, C., Walsh, C., Young, D. (1995). Perforin: structure and function. *Immunol Today.* 16(4):194-201.
- Liu, G., Atteridge, C., Wang, X., Lundgren, A., Wu, J. (2010). Cutting Edge: The Membrane Type Matrix Metalloproteinase MMP14 Mediates Constitutive Shedding of MHC Class I Chain-Related Molecule A Independent of A Disintegrin and Metalloproteinases. *J. Immunol.*184:3346-3350.
- Ljunggren, H., Karre, K. (1990). In search of the missing self: MHC molecules and NK recognition. *Immunol Today.* 11:237 –244
- Longworth, M., Laimins, L. (2004) Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(2): p. 362-72.
- Marshall, K. (2003). Cervical Dysplasia: Early Intervention. *Altern. Med. Rev.* 8: 156-170.
- Middleton, D., Curran, M., Maxwell, L. (2002). Natural Killer cells and their receptors. *Transpl. Immunology.* 10: 147-164.
- Mincheva-Nilsson L, Baranov V. (2014). Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interactions: Impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance. *Semin Cancer Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.02.010>.
- Mohr, I., Clark, R., Sun, S., *et al.* (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science.* 250:1694-1699.

- Mosciciki, A., Shiboski, S., Hills, N., *et al.* (2004). Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet*. 364: 1678-1683.
- Münger, K., Werness, B., Dyson, N. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. 8(13):4099-4015.
- Muñoz, N., Castellsagué, X., Berrington de González, A., Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 24S3: S3/1-S3/10.
- Muñoz, N., Bosch, F., Sanjosé, S. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med*. 348:518-527.
- Nausch, N; Cerwenka, A. (2008). NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene*. 27: 5944-5958.
- Obeidy, P., Sharland, A. (2009). NKG2D and its ligands. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 4:2364-2367.
- Östor, A. (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 12(2):186-192.
- Patel, S., Chiplunkar, S. (2009). Host immune responses to cervical cancer. *Curr. Opin. Obstet. Ginecol*. 21: 54-59.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., *et al.* (1999). Identification and Molecular Characterization of Nkp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells. *J. Exp. Med*. 190(10): 1505-1516.
- Pende, D., Rivera, P., Marcenaron, S., *et al.* (2002). Major Histocompatibility Complex Class I-related Chain A and UL16-Binding Protein Expression on Tumor Cell Lines of Different Histotypes : Analysis of Tumor Susceptibility to NKG2D-dependent Natural Killer Cell Cytotoxicity. *Cancer Res*. 62: 6178-6186.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29: 2003-2007.
- Piñeros, M., Pardo, C., Gamboa, O., Hernández, G. (2010). Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia. Instituto Nacional de Cancerología. ISBN: 978-958-99697-2-4. 39-40, 87.

- Richart RM. (1973). Cervical intraepithelial neoplasia. *Path Ann.* 8: 301-328.
- Rincón, O., Pareja, L., Jaramillo, S., Aristizábal, B. (2007). Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Rev. Col. Obstet. Gineco.* 58: 202-212.
- Rivas, F., Oliveira, L., Petzl-Erler, M., Bicalho, M. (2008). Major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B alleles in Euro-Brazilians. *Tissue Antigens.* 72: 532-538.
- Robertson, M., Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 76(12): 2421-2438
- Salih, H., Rammensee, H., Steinle, A. (2002). Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *J. Immunol.* 169:4098-4102.
- Sasagawa, T., Takagi, H., Makinoda, S. (2012). Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother.* 18:807–815
- Scheffner, M., Werness, B., Huibregtse, J., *et al.* (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63:1129-1136.
- Schmitt, M., Bravo, I., Snijders, P., Gissmann, L., Pawlita, M., Waterboer, T. (2006). Bead-Based Multiplex Genotyping of Human Papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 44: 504-512.
- Sheu, B., Lien, H., Ho, H., *et al.* (2003). Increased Expression and Activation of Gelatinolytic Matrix Metalloproteinases Is Associated with the Progression and Recurrence of Human Cervical Cancer. *Cancer Res.* 63: 6537-6542.
- Shwe, M., Harano, T., Okada, S., Win, A., Aye, K., *et al.* (2014). Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus (HR-HPV) infection among Women with Normal and Abnormal Cervical Cytology in Myanmar. *Acta Med. Okayama.* 68: 79-87.

- Sivori, S., Pende, D., Bottino, C. (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *E J Immunol.* 29(5): 1656-1666.
- Textor, S., Dürst, M., Jansen, L., Accardi, R., *et al.* Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 123: 2343-2353.
- Thomas, A., Mahantshetty, U., Kannan, S., Deodhar, K., *et al.* (2013). Expression profiling of cervical cancers in Indian women at different stages to identify gene signatures during progression of the disease. *Cancer Medicine.* 2(6): 836-848.
- Trottier, H; Mahmum, S; Costa, M *et al.* (2006). Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 15: 1274-1280
- van der Burg, S; Melief, C. (2011). Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr. Opin. Immunol.* 23: 252-257.
- Vetter, C., Lieb, W., Bröcker, E., Becker, J. (2004). Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma. *Br. J. Cancer.* 91: 1495-1499.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 12:239-252.
- Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, F., *et al.* (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical worldwide. *J Pathol.* 189:12-19.
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., *et al.* (2008). Tumor-Associated MICA is Shed by ADAM Proteases. *Cancer Res.* 68: 6368-6376.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A., *et al.* (1999). An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science.* 285: 730-732.

- Yabe, T., McSherry, C., Bach, F., *et al.* (1993). A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics*. 37:455-460.
- Yoshimura, T., Tomita, T., Dixon, M., *et al.* (2002). ADAMs (A Disintegrin and Metalloproteinase) Messenger RNA Expression in *Helicobacter pylori*-Infected, Normal, and Neoplastic Gastric Mucosa. *J. Infect. Dis.* 185: 332-40.
- Xu, Q., Ying, M., Chen, G., Lin, A., Xie, Y., *et al.* (2013). ADAM17 is associated with EMMPRIN and predicts poor prognosis in patients with uterine cervical carcinoma. *Tumor Biol.* DOI 10.1007/s13277-014-1990-1.
- Zhang, Y., Han, M., Vorhaben, R., *et al.* (2002). Study of MICA Alleles in 201 African Americans by Multiplexed Single Nucleotide Extension (MSNE) Typing. *Human Immunol.* 64:130-136.
- Zhang, Y., Lazaro, A., Zou, Y., *et al.* (2002). MICA polymorphism in South American Indians. *Immunogenetics*. 53:900-906.