

# Frecuencias de las pérdidas de heterocigocidad en la región que codifica para HLA en biopsias de pacientes con cáncer de cuello uterino

## Frequency of Heterozygosity Loss in the Region to be Encoded by HLA in Biopsies of Patients with Cervical Cancer

Josefa Antonia Rodríguez<sup>1</sup>, Liliana Galeano<sup>1</sup>, Diana María Palacios<sup>2,3</sup>, Martha Lucía Serrano<sup>1</sup>, María Mercedes Bravo<sup>1</sup>, Alba Lucía Cómbita<sup>1,2</sup>

1 Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia.

2 Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

3 Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, Colombia.

## Resumen

**Objetivo:** Determinar las frecuencias de pérdidas de heterocigocidad de LOH en las regiones 6p21.3 y 15q21 que codifican para HLA y  $\beta_2$ microglobulina, para establecer su correlación con el estadio tumoral, teniendo en cuenta que las LOH en HLA I ocurren como un evento genético temprano del cáncer y pueden contribuir a su desarrollo. **Métodos:** Se tomaron muestras de sangre periférica (SP) y biopsias de cuello uterino de pacientes con NIC-III y CCU. Se amplificaron 11 microsatélites relacionados con el sistema HLA en pares normal-tumor a partir de ADN purificado de células de SP y células tumorales microdisectadas. Las LOH fueron determinadas por electroforesis capilar y analizadas mediante los programas GeneScan y Genotyper. **Resultado:** Todas las muestras amplificaron más de 7 microsatélites (promedio 9,5). El porcentaje de heterocigocidad para los marcadores de microsatélites utilizados en las muestras de cuello uterino varió entre 51,8% y 95%, y la LOH, entre 17,4% y 50,0%. Las frecuencias observadas para LOH en los diferentes estadios tumorales fueron: 42,9% en el grupo de NIC-III; 57% en CCU en estadio I; 63,6% en CCU en estadio II y 92,85% en pacientes con estadios más avanzados (III-IV). **Conclusión:** Se observó una mayor frecuencia de LOH en los grupos de pacientes con estadios avanzados de CCU, al comparar con pacientes con NIC-III.

**Palabras clave:** neoplasias de cuello uterino, pérdida de heterocigocidad, antígenos HLA, escape del tumor.

Correspondencia:

Alba Lucía Cómbita, Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología. Av. 1 N° 9-85, Bogotá, Colombia. Teléfono: 334 0959.

Correo electrónico: acombita@cancer.gov.co

Fecha de recepción: 30 de diciembre del 2008. Fecha de aprobación: 6 de octubre del 2009.

## Abstract

**Objective:** To determine the frequency of LOH heterozygosity in the regions 6p21.3 and 15q21 which encode for HLA and  $\beta_2$ microglobulina in order to establish their correlation with tumoral stage, taking into account that LOH and HLA I occur as an early genetic event in cancer and can contribute to its development. **Methods:** Peripheral blood (PB) samples and cervical biopsies were taken from patients with CIN III and invasive cancer. Amplification was made of eleven microsatellites related to the HLA system, in normal-tumor pairs, based on purified DNA PB cells and micro-dissected tumor cells. LOH were determined through capillary electrophoresis and analyzed with GeneScan and Genotyper programs. **Results:** All samples amplified at more than 7 microsatellites (average 9.5). The percentage of heterozygosity for microsatellite markers used in the cervical samples varied between 51.8% and 95%; the LOH, between 17.4% and 50.0%. The frequencies observed for LOH in the different tumoral stages were: 42.9% in the CIN III group; 57% in invasive cancer Stage I; 63.6% in Stage II, and 92.85% in patients in the most advanced stages (III-IV). **Conclusion:** Greater frequency of LOH was observed in groups of patients with advanced stages of invasive cancer in comparison with patients with CIN III.

**Key words:** Uterine cervical neoplasm, loss of heterozygosity, HLA antigens, tumor escape.

## Introducción

El desarrollo del cáncer se inicia cuando una célula somática acumula una serie de mutaciones que le permiten escapar de la senescencia y de otros mecanismos de control del crecimiento, lo cual le proporciona una ventaja para su propagación. Existen numerosas alteraciones genéticas que pueden conducir al cáncer, tales como la activación de protooncogenes, la inactivación de genes supresores de tumor (TSG, *tumor suppressor genes*) (1-3) o la regulación negativa de genes que controlan la respuesta inmune antitumoral, como los genes de complejo mayor de histocompatibilidad (HLA, *human leucocitary antigen*) (4).

Los TSG son de tipo recesivo; es decir, se requiere la inactivación de ambos alelos para que estas mutaciones conduzcan a un cambio fenotípico en la célula (5). La inactivación de ambos alelos es conocida como el modelo de las dos mutaciones (6,7). En los organismos diploides la heterocigocidad con respecto a un gen determinado significa que cada *locus* posee dos alelos diferentes, mientras que en el homocigoto cada *locus* posee dos alelos iguales. En el caso de tumores heredados, existe una primera mutación en un gen supresor de tumor que es germinal y está presente en todas las células del cuerpo, por lo cual una pérdida de la heterocigocidad (LOH) en el segundo alelo inactiva el gen y establece así un cambio primario para la iniciación del crecimiento tumoral (8-10).

A diferencia de los TSG, los genes que codifican para HLA son codominantes, debido a lo cual ambos alelos se expresan en el heterocigoto; por lo tanto, la LOH en un gen de esta región suprime la expresión de un alelo funcionalmente diferente (11,12), y ello resulta en una disminución de la variedad de moléculas de HLA que son expresadas en la superficie celular. Esta podría constituir una de las estrategias desarrolladas por el tumor para evadir los mecanismos de control del sistema inmune (13).

Las moléculas de HLA están constituidas por una cadena pesada polimórfica, codificada en el cromosoma 6 en la región 6p21.3, la cual está asociada de manera no covalente con una cadena liviana, la  $\beta_2$ microglobulina ( $\beta_2m$ ), codificada en el cromosoma 15 en la región 15q21 (14) y presentan péptidos endógenos a los linfocitos T citotóxicos. Cualquier alteración en estos componentes afecta negativamente la expresión de la molécula en la superficie celular (15,16). Las LOH localizadas en la región que codifica para las moléculas del HLA han sido asociadas con el desarrollo y la progresión tumoral (17). En varios tipos de cáncer se ha observado una alta frecuencia de LOH en la región 6p21.3 y 15q21, donde se localizan estos genes (18,19). En cáncer de cuello uterino se ha reportado que las LOH ocurren como un evento temprano en su desarrollo, y, por lo tanto, estas alteraciones pueden ser utilizadas para identificar lesiones preneoplásicas con alto riesgo de progresar hasta cáncer invasor (20).

La determinación de LOH en tumores requiere utilizar marcadores altamente polimórficos, de manera que la mayoría de individuos sean heterocigotos para ese marcador y se pueda evidenciar la presencia de un solo alelo en tejido tumoral. Los microsatélites o STR (*Short Tandem Repeat*) son secuencias cortas de ADN que se encuentran dispersas por todo el genoma. Dichas regiones están formadas por fragmentos que van de uno a seis nucleótidos que se repiten de manera consecutiva (21). La secuencia de los microsatélites varía en el número de repeticiones dentro del motivo repetitivo, y esta variación da origen a los diferentes alelos, que se distinguen entre sí por su longitud. Los microsatélites son altamente polimórficos, por lo cual la gran mayoría de individuos son heterocigotos, y esto hace que sean excelentes marcadores utilizados para la determinación de la LOH en tumores (22).

El presente estudio tiene como objetivo determinar la frecuencia de LOH en las regiones 6p21.3 y 15q21 que codifican para HLA y  $\beta_2m$  respectivamente, en mujeres con diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical grado III y cáncer de cuello uterino, con el fin de establecer si existe correlación entre dichas alteraciones genéticas y el estadio tumoral en cáncer de cuello uterino.

## Métodos

### *Obtención de muestras*

Se obtuvieron muestras provenientes de 40 pacientes que asistieron por primera vez a la consulta de ginecología del Instituto Nacional de Cancerología, diagnosticadas con neoplasia intraepitelial cervical III (NIC III) y cáncer de cuello uterino. Una vez obtenido el consentimiento informado de las pacientes, durante la consulta se tomaron biopsias de las lesiones cervicales en criotubos que contenían 1 mL de medio de cultivo RPMI, y muestras de sangre periférica en tubos con EDTA.

### *Microdissección y extracción del ADN tumoral*

Las biopsias recolectadas fueron transferidas a un criotubo sobre 200  $\mu$ L de medio de congelación TBS Tissue freezing Medium TM (Triangle Biomedical Sciences Durham, N. C, EUA). Posteriormente se

adicionaron 200  $\mu$ L de medio de congelación. Las biopsias fueron congeladas a  $-20$  °C por 15 minutos, y almacenadas a  $-70$  °C hasta su uso.

Para la microdissección y extracción del ADN tumoral se realizaron cortes histológicos secuenciales de 4  $\mu$ m a partir de las biopsias congeladas, los cuales fueron fijados con etanol absoluto por 10 minutos, a temperatura ambiente. Después de la coloración con hematoxilina-eosina, las células tumorales fueron microdisectadas por un patólogo experto, de acuerdo con el protocolo descrito por Ramal *et al.*, con algunas modificaciones (23). Las células tumorales (aproximadamente 500 células) fueron microdisectadas con una aguja de insulina e incubadas en 100  $\mu$ L de *buffer* de digestión, el cual contiene *buffer* Taq polimerasa 1X, 0,1 mg/mL de proteinasa K y 1% de Tween 20, durante dos horas, a 56 °C. Finalmente, las células tumorales fueron incubadas a 95 °C por 10 minutos. El ADN producto de la microdissección se congeló, hasta su uso, a  $-70$  °C.

### *Extracción del ADN de sangre periférica*

La extracción y purificación del ADN de linfocitos de sangre periférica (PBLs) se realizó a partir de 200  $\mu$ L de sangre total; para ello, se empleó el *DNA easy blood isolation kit* (Mobio Laboratories Inc. Carlsbad, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado fue resuspendido en un volumen final de 100  $\mu$ L de *buffer* TE 10 mm, y se almacenó a  $-20$  °C hasta su uso.

### *Amplificación del gen de la $\beta$ -globina*

La calidad del ADN extraído para realizar la PCR fue comprobada mediante la amplificación del gen de la  $\beta$ -globina empleando los iniciadores PCO3/PCO5, según el protocolo descrito por Saiki (24) (tabla 1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, con 10 mM de Tris HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 200  $\mu$ M de dNTPs, 3,5 mM de  $MgCl_2$ , 25 pmoles de cada iniciador, 0,25 U de AmpliTaq DNA polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) y 5  $\mu$ L de la muestra. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un paso de denaturación inicial a 95 °C por 4 minutos, 40 ciclos de amplificación (denaturación a 95 °C por 1 minuto, hibridación a 55 °C por 2 minutos y

**Tabla 1.** Características y secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de la  $\beta$ -globina y los microsatélites utilizados en este estudio. Los iniciadores 5' fueron marcados con los fluorocromos FAM (azul) o TET (verde).

Gen	Localización (Kbp)	Tamaño	Alelos	% Het	Marcación	Secuencia
$\beta$ -globina	11p15.5	209 pb				5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3' 5'-GAAACCAAGAGTCTTCTCT-3'
D6S311	6q24 148543	229-276 pb	18	0,91	FAM	5'-ATGTCCTCATTGGTGTGTG-3' 5'-GATTCAGAGCCCAGGAAGAT-3'
D6S291	6p21 36373	168-200 pb	7	0,70	FAM	5'-CTCAGAGGATGCCATGTCTAAAATA-3' 5'-GGGGATGACGAATTATCTCACTAACT-3'
D6S1618	6p21.3 34212	126-164 pb	14	0,87	TET	5'-GGCCTGAGCAGTGCAT-3' 5'-TGATTCCTAATCTGCGGG-3'
D6S1583	6p21.3 35273	149-193 pb	7	0,84	TET	5'-GCCCTAACCTGCTTCTACTGA-3' 5'-GCAGATGGCCCACTGAC-3'
D6S273	6p21 31532	120-140 pb	8	0,76	TET	5'-GCAACTTTTCTGTCAATCCA-3' 5'-ACCAAATCTCAAATTTTCGG-3'
D6S265	6p21.3 29863	118-140 pb	12	0,78	FAM	5'-ACGTTTCGTACCCATTAACCT-3' 5'-ATCGAGGTAACAGCAGAAA-3'
D6S105	6p22 27624	144-170 pb	12	0,82	FAM	5'-GCCCTATAAAATCCTAATTAAC-3' 5'-GAAGGAGAATTGTAATTCGG-3'
D6S276	6p22 24062	197-230 pb	14	0,83	TET	5'-TCAATCAAATCATCCCCAGAAG-3' 5'-GGGTGCAACTTGTCTCTCT-3'
D6S1617	6p25 5441	101-123 pb	15	0,86	TET	5'-TGCAAACAGGCACACATAC-3' 5'-TTAATCAATTTCTGCAAAGATAAA-3'
D15S209	15q21 30667	189-212 pb			FAM	5'-AAACATAGT-GCTCTGGAGGC-3' 5'-GGGCTAACACAGTGTCTGC-3'
D15S126	15q21 26134	188-218 pb	11	0,82	FAM	5'-GTGAGCCAAGATGGCACTAC-3' 5'-GCCAGCAATAATGGGAAGTT-3'

pb: pares de bases.

elongación a 72 °C por 1,5 minutos), y un paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos. La amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con tinción de bromuro de etidio.

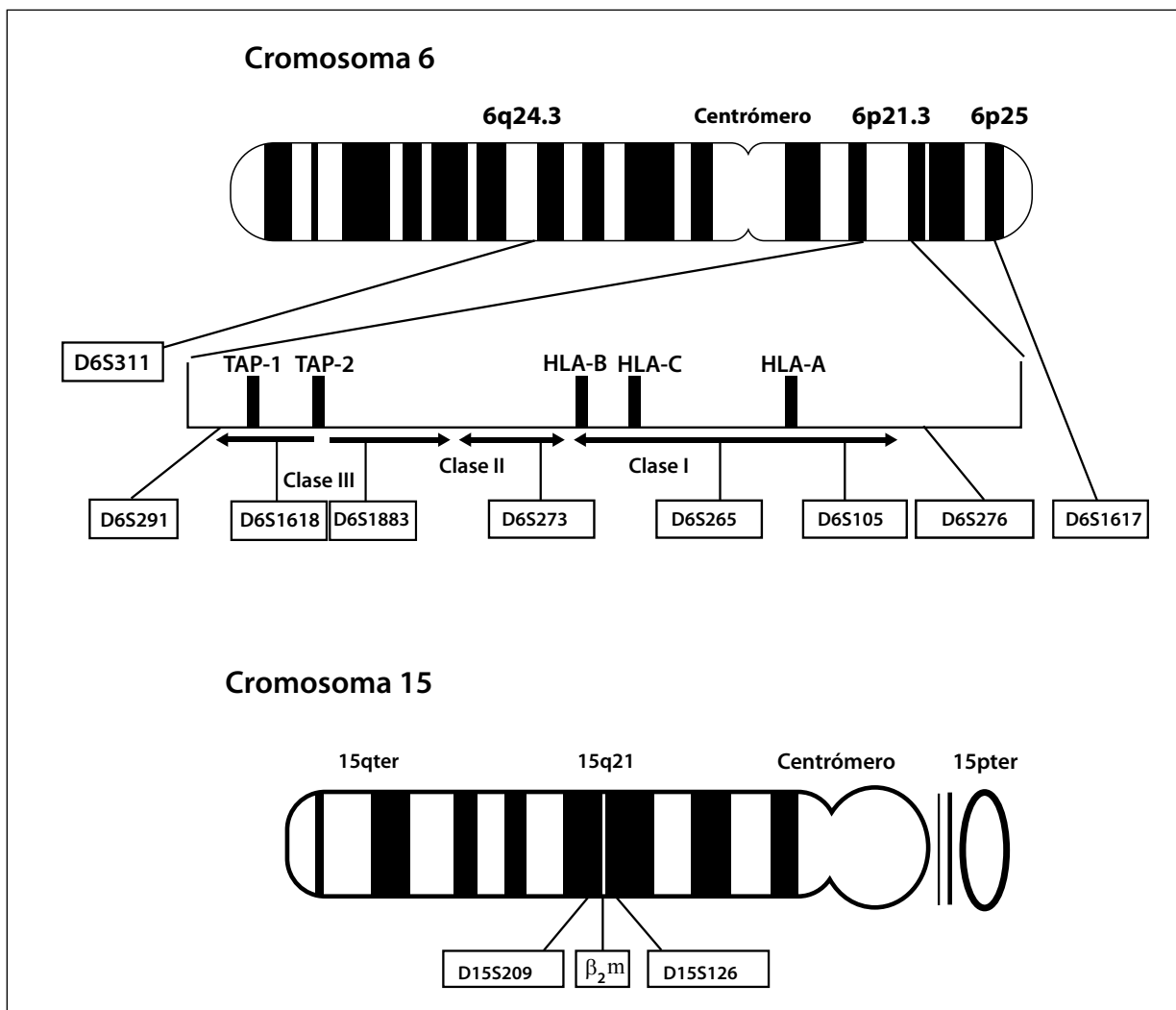
### Amplificación de los microsatélites

Para determinar la pérdida de heterocigocidad (LOH) relacionadas con el sistema HLA se amplificaron 11 microsatélites, localizados en los cromosomas 6 y 15 (figura 1) (23). El ADN obtenido de las células tumorales microdisectadas y de los PBLs fue analizado con nueve microsatélites del cromosoma 6. Siete hibridan en la región 6p21.3, (D6S291, D6S1618, D6S1583, D6S273, D6S265,

D6S105, D6S276), uno hibrida en la región 6p25 (D6S1617), y otro, en el brazo largo del cromosoma 6 en 6q24.3 (D6S311).

Para el estudio de la  $\beta_2m$  se emplearon dos microsatélites, localizados en el cromosoma 15, en la región 15q21 (D15S209 y D15S126) (figura 1). La secuencia y las características de los iniciadores se describen en la tabla 1.

La PCR se realizó siguiendo el protocolo descrito en el 14<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop, 2002 (<http://www.microbiol.unimelb.edu.au/14ihw/>). Brevemente, la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L de mezcla de



**Figura 1.** Localización de los microsatélites utilizados para evaluar la LOH en la región HLA y  $\beta_2m$  en los cromosomas 6 y 15, respectivamente. Un panel de nueve marcadores de microsatélites fue seleccionado para el presente estudio. Siete marcadores están localizados en el brazo corto del cromosoma 6 en 6p21.3, cubriendo la región HLA: tres marcadores de microsatélites que flanquean el locus de HLA-A (D6S265, D6S105 y D6S276); uno adyacente al locus de HLA-B/C (D6S273); uno adyacente al locus de TAP-1 (D6S291); dos adyacentes al locus de TAP2 (D6S1618 y D6S1583); uno que hibrida en la región 6p25 (D6S1617), y el último se localiza en 6q24.3 (D6S311). Los otros dos marcadores utilizados en este estudio se localizan en el cromosoma 15 en 15q21 e hibridan en la región adyacente al gen de la  $\beta_2m$  (D15S209 y D15S126).

reacción, la cual contiene: *buffer* de Taq polimerasa IX, 10 pM de cada iniciador, 2 mM de dNTP, 1,5 mM de  $MgCl_2$  y 0,25 U de Taq polimerasa y 1  $\mu$ L de ADN de PBLs (normal) o 4  $\mu$ L de ADN tumoral. La reacción de PCR se efectuó bajo las siguientes condiciones: un paso de denaturación inicial a 96°C por 5 minutos, 33 ciclos de amplificación (denaturación a 96°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 2 minutos y una extensión a 72°C por 1 minuto). Por último, un paso de extensión final a 72°C por 6 minutos. Los productos amplificados se analizaron

mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

Con el fin de optimizar el tiempo y los recursos para realizar los ensayos de detección de LOH, se hicieron PCR en multiplex, en las cuales se amplificaron tres productos diferentes en un mismo tubo. Los iniciadores incluidos en la PCR multiplex estaban marcados con diferentes fluorocromos o diferían en el tamaño, lo que permitió realizar un análisis simultáneo.

### *Electroforesis capilar de los productos amplificados*

Con el fin de obtener la concentración óptima del producto de PCR para realizar la electroforesis capilar, se efectuaron diluciones desde 1:10 hasta 1:200 en agua destilada estéril, según la intensidad del producto amplificado observado en el gel de agarosa. Posteriormente, 1 µL de la dilución del producto de PCR fue resuspendido en 12 µL de formamida y 0,5 µL del estándar interno de peso molecular TAMRA 500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Las muestras fueron luego homogenizadas y denaturadas por 3 minutos a 95 °C. La electroforesis capilar se realizó empleando el polímero POP4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) por 30 minutos a 60 °C en el secuenciador automático ABIPrism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

### *Análisis de LOH*

Para determinar las LOH se compararon los resultados de los electroferogramas obtenidos para cada marcador en pares normal-tumor, por cada sujeto analizado. El análisis se realizó mediante el programa GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) y los alelos fueron asignados con el programa Genotyper (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para que el marcador sea informativo, el producto de PCR obtenido a partir del ADN de la muestra de sangre periférica debe mostrar los dos alelos diferentes correspondientes a un individuo heterocigoto. Si el individuo es homocigoto, este marcador no se considera informativo para LOH.

La pérdida de heterocigocidad se definió como la reducción en la intensidad de la señal de un alelo en más del 25% en las muestras tumorales, al compararla con la intensidad de señal de los alelos presentes en las muestras de tejido normal (23). Las LOH fueron calculadas así:

$$\text{LOH} = \frac{\text{Tamaño de alelo tumoral 2} / \text{Tamaño del alelo tumoral 1}}{\text{Tamaño del alelo normal 2} / \text{Tamaño del alelo normal 1}}$$

Donde el alelo 2 es el alelo largo y el alelo 1 es el alelo corto.

### *Análisis estadístico*

El porcentaje de heterocigocidad se calculó como el cociente de individuos heterocigotos en muestras de sangre periférica sobre el total de la población analizada. Para el porcentaje de LOH sólo se tuvo en cuenta a los individuos heterocigotos en sangre periférica aplicando la fórmula anteriormente descrita. Para evaluar las diferencias de frecuencias de LOH se utilizó el Test exacto de Fisher, que permite analizar asociaciones entre dos variables cuando la muestra por estudiar es demasiado pequeña. La significancia se estableció cuando el valor de  $p$  fue menor de 0,05.

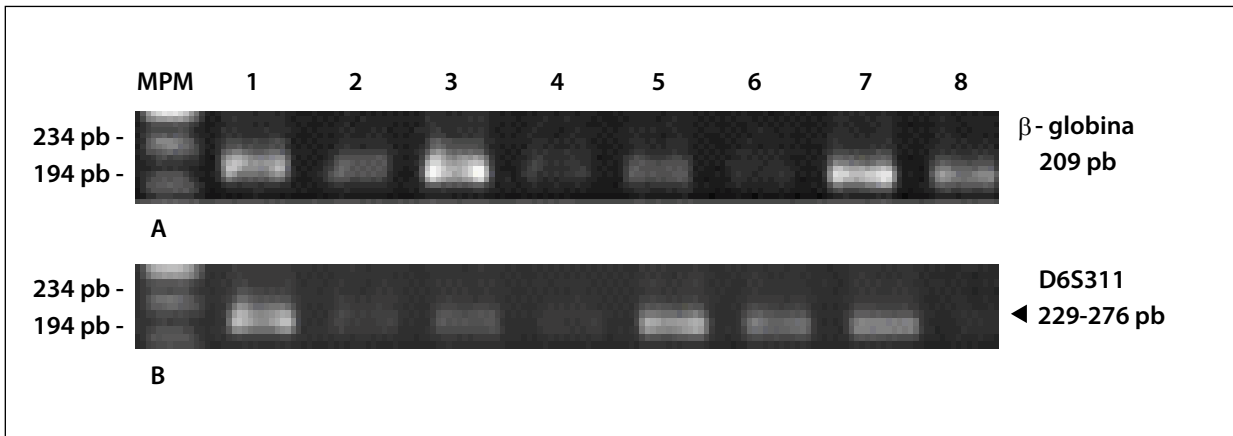
### **Resultados**

En este trabajo se obtuvieron muestras de 40 pacientes; 8 con NIC III y 32 con cáncer de cuello uterino en diferentes estadios: I B (n=7), II B (n=11), III - IV B (n=14), que no habían recibido tratamiento previo. La edad promedio de las pacientes con NIC III fue de 39 años, y la de las pacientes con cáncer de cuello uterino fue de 42,3 años.

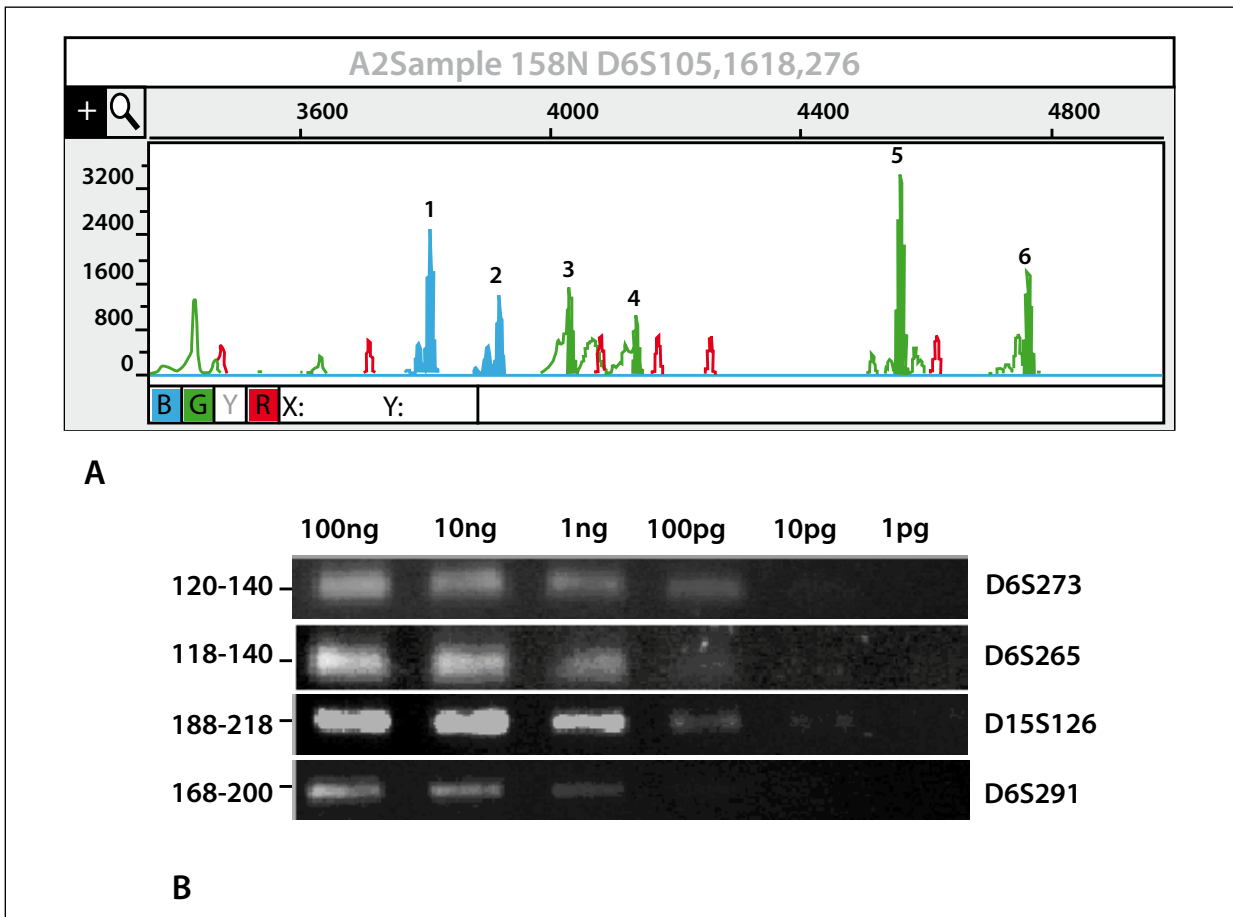
### *Amplificación de los microsatélites*

Inicialmente se amplificó el gen de la  $\beta$ -globina, con el fin de determinar la calidad del ADN para realizar la PCR de los microsatélites. Se observó una mayor amplificación a partir del ADN extraído de sangre periférica comparada con la amplificación realizada a partir de las células tumorales microdisectadas (figura 2). Estas diferencias se explican por la menor concentración de ADN tumoral, que está relacionada con el bajo número de células tumorales recuperadas durante la microdissección (500 células aproximadamente), en comparación con las células nucleadas contenidas en 200 µL de sangre periférica (aproximadamente 800.000 células), lo cual hace una relación de 400 veces más de células normales usadas para la PCR (8.000 vs. 20 células).

Igualmente, se observó una menor amplificación de microsatélites en el ADN obtenido a partir de las células microdisectadas. Sin embargo, la calidad del ADN tumoral fue adecuada, y se logró una sensibilidad hasta de 10 pg para algunos marcadores, lo que fue suficiente para realizar la PCR de los microsatélites (figura 3).



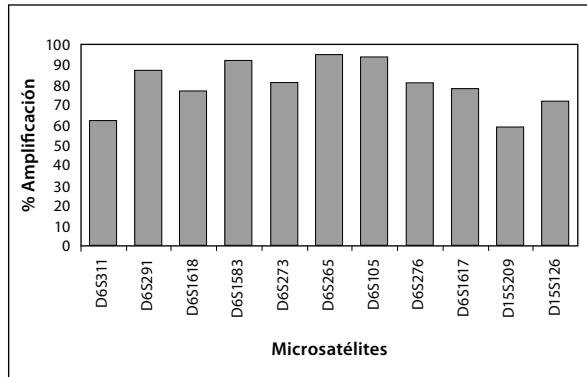
**Figura 2.** Comparación de la amplificación en sangre periférica y tumor. A. Amplificación del gen de la  $\beta$ -globina en sangre periférica (carriles impares) y células tumorales microdisectadas (carriles pares). B. Amplificación para el marcador D6S311 en sangre periférica (carriles impares) y células tumorales microdisectadas (carriles pares). MPM: marcador de peso molecular  $\phi$ X174 digerido con Hae III.



**Figura 3.** Amplificación de microsatélites. A. Electroferograma de una PCR múltiple; cada pico (alelo) indica la presencia de un producto de PCR de un peso molecular específico. Se observó una mayor amplificación con el marcador D6S276, en verde (5 y 6), comparado con los otros dos marcadores D6S105, en azul (1 y 2), y D6S1618, en verde (3 y 4). La señal roja corresponde al estándar interno de peso molecular TAMRA 500. B. Determinación de la sensibilidad de los iniciadores para los microsatélites D6S273, D6S265, D15S126 y D6S291, utilizando diferentes concentraciones de ADN de sangre periférica.



Todas las muestras amplificaron más de siete microsatélites, con un promedio de 9,5. En la figura 4 se muestra el porcentaje de amplificación para cada uno de los microsatélites; dicha amplificación varió entre el 59,4% (D6S265) y el 95,53% (D15S209).

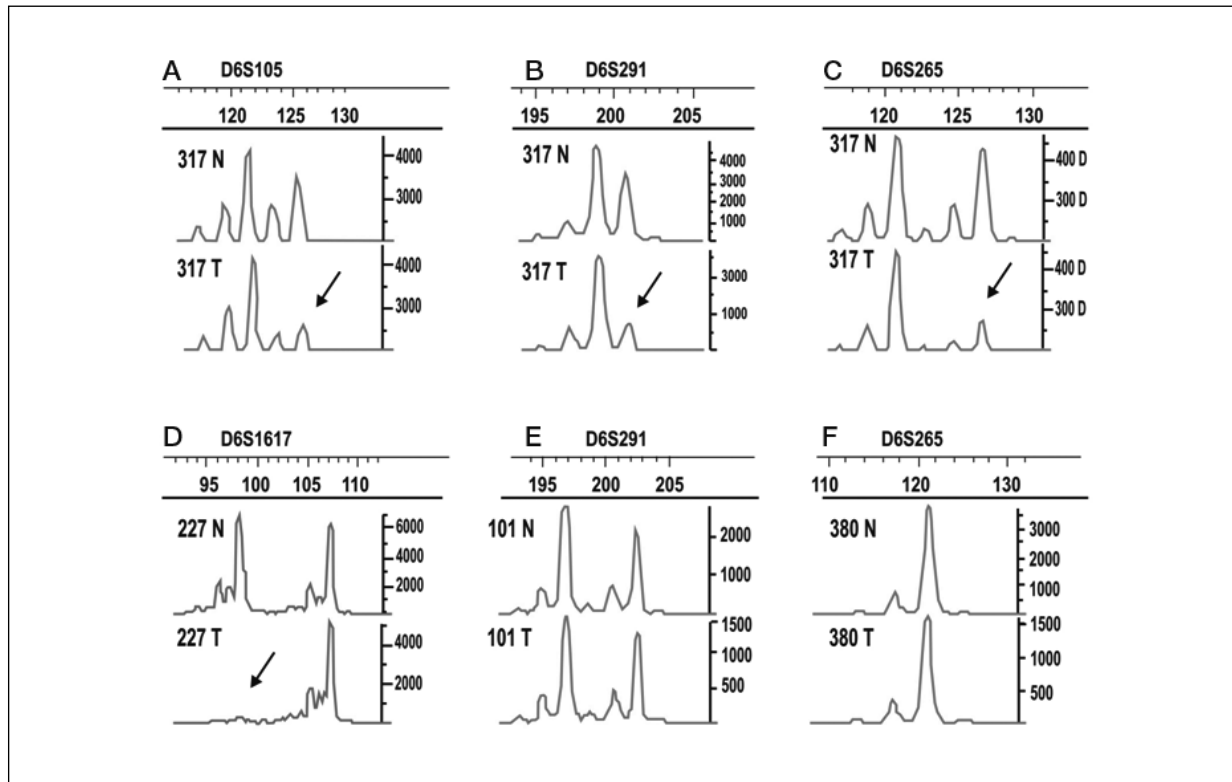


**Figura 4.** Porcentaje de amplificación de cada microsatélite empleado en este estudio.

*Determinación de las pérdidas de heterocigidad (LOH) en las regiones HLA y  $\beta_2m$  en biopsias de pacientes con cáncer de cuello uterino in situ e invasor*

En este estudio se analizó la pérdida de heterocigidad empleando once marcadores, que cubren las regiones de HLA y  $\beta_2m$  en los cromosomas 6 y 15, respectivamente. La pérdida de heterocigidad se define como la reducción de un alelo en más del 25% en las muestras tumorales cuando se compara con la muestra control (DNA de PBLs de la misma paciente), mientras que la pérdida de haplotipo se define cuando existen más de 3 LOH en la región HLA.

En la figura 5 se muestran ejemplos de los análisis de las pérdidas de heterocigidad realizados con el programa Genotyper para los marcadores D6S105, D6S291, D6S265 y D6S1617. Cuatro tipos de electroferogramas fueron observados:



**Figura 5.** Ejemplos de electroferograma obtenidos con diferentes marcadores de microsatélites de la región HLA clase I a partir de ADN de células tumorales microdisectadas y ADN de células normales. Los casos A, B, C y D ilustran LOH total de cuatro marcadores diferentes: D6S105, D6S291, D6S265, D6S1617. La flecha indica un alelo con la señal reducida (>25%) en el ADN tumoral, comparado con el control normal correspondiente. En el caso E se ilustra la retención de la heterocigidad, donde no hay reducción de la señal para ningún alelo. El caso F corresponde a un homocigoto para el marcador D6S265. Cada pico (alelo) indica la presencia de un producto de PCR de un peso molecular específico.



LOH con reducción en la intensidad de la señal  $\geq 25\%$  (figura 5A-C), LOH con pérdida total de un alelo (figura 5D), retención de la heterocigocidad (figura 5E) y homocigocia, donde ambos alelos son iguales, y, por lo tanto, se observa una sola señal en la muestra de ADN normal y se considera no informativo (figura 5F). En la figura 6A se muestran los porcentajes de heterocigocidad obtenidos para cada microsatélite.

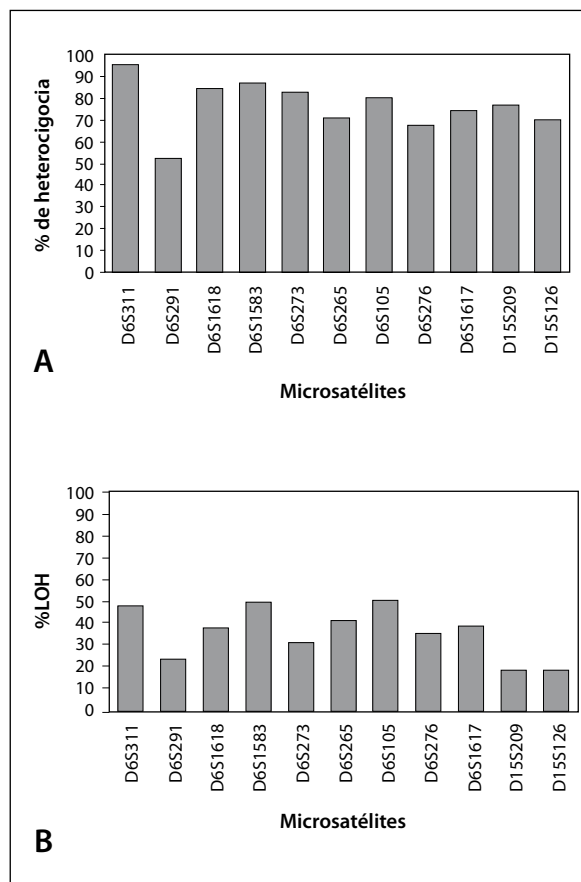
A excepción del marcador D6S291, todos los microsatélites mostraron porcentajes de heterocigocidad superiores al 65%. En la población del estudio para los microsatélites analizados se observó un porcentaje de heterocigocidad entre el 51,8% (D6S291) y el 95% (D6S311). En la figura 6B se observan los porcentajes de LOH calculado sobre el total de heterocigotos, los cuales variaron en un rango de 17,4% (D15S126) a 50% (D6S105).

En la figura 7 se muestran los resultados de pérdidas de heterocigocidad y pérdidas de haplotipo en las regiones 6p21.3 y 15q21 en los diferentes grupos estudiados. En general, para la región 6p21.3 se observó una mayor pérdida de heterocigocidad en los grupos de cáncer más avanzados. Cuando se realizó el análisis por grupo (figura 7), en una de las ocho pacientes con NIC III el análisis no fue informativo, pues era homocigota para todos los marcadores que se determinaron.

De las siete pacientes restantes, tres (42,9%) presentaron LOH; de ellas, dos correspondían a pérdidas de haplotipo que afectaban la región HLA de clase I. De las siete pacientes con cáncer en estadio I, cuatro (57,1%) mostraron LOH en 6p; de ellas, dos correspondían a pérdida de haplotipo que afectaba una gran parte de la región de HLA.

En el grupo de las pacientes con cáncer en estadio II, 7 de 11 (63,6%) presentaron LOH en 6p; de ellas, 6 correspondían a pérdida de haplotipo. Por otra parte, 13 de las 14 pacientes con cáncer en estadios III y IV (92,9%) presentaron LOH en 6p; de ellas, 8 correspondían a pérdidas de haplotipo.

El análisis de asociación entre el estadio tumoral y las pérdidas de heterocigocidad empleando el test exacto de Fisher no mostró diferencias significativas entre los cuatro estadios analizados (NIC III *vs.*



**Figura 6.** Frecuencias de la heterocigocidad (A) y LOH (B) para cada marcador analizado.

estadio I, estadio II o estadios III y IV); sin embargo, cuando se comparó entre las pacientes con NIC III y las pacientes con cáncer en estadios III y IV se observó una diferencia significativa ( $p=0,026$ ) (figura 8). Cuando se realizó el análisis de pérdida de haplotipo, incluyendo todos los marcadores analizados, se observó un mayor porcentaje de pérdidas de haplotipo (57%) en el grupo de las pacientes con CCU III y IV, mientras que en los grupos de pacientes con NIC III y CCU I el porcentaje de pérdida de haplotipo fue menor (28%).

Para la región 15q21, donde se localiza el gen de la  $\beta_2m$  se observó una LOH en el 25,8 % de las pacientes analizadas. Tres de las ocho pacientes con NIC III pudieron ser analizadas; dos, para el marcador D15S126; y dos, para el marcador D15S209. Una de las pacientes fue homocigota para los dos marcadores, mientras que las otras dos conservaron la heterocigocidad.

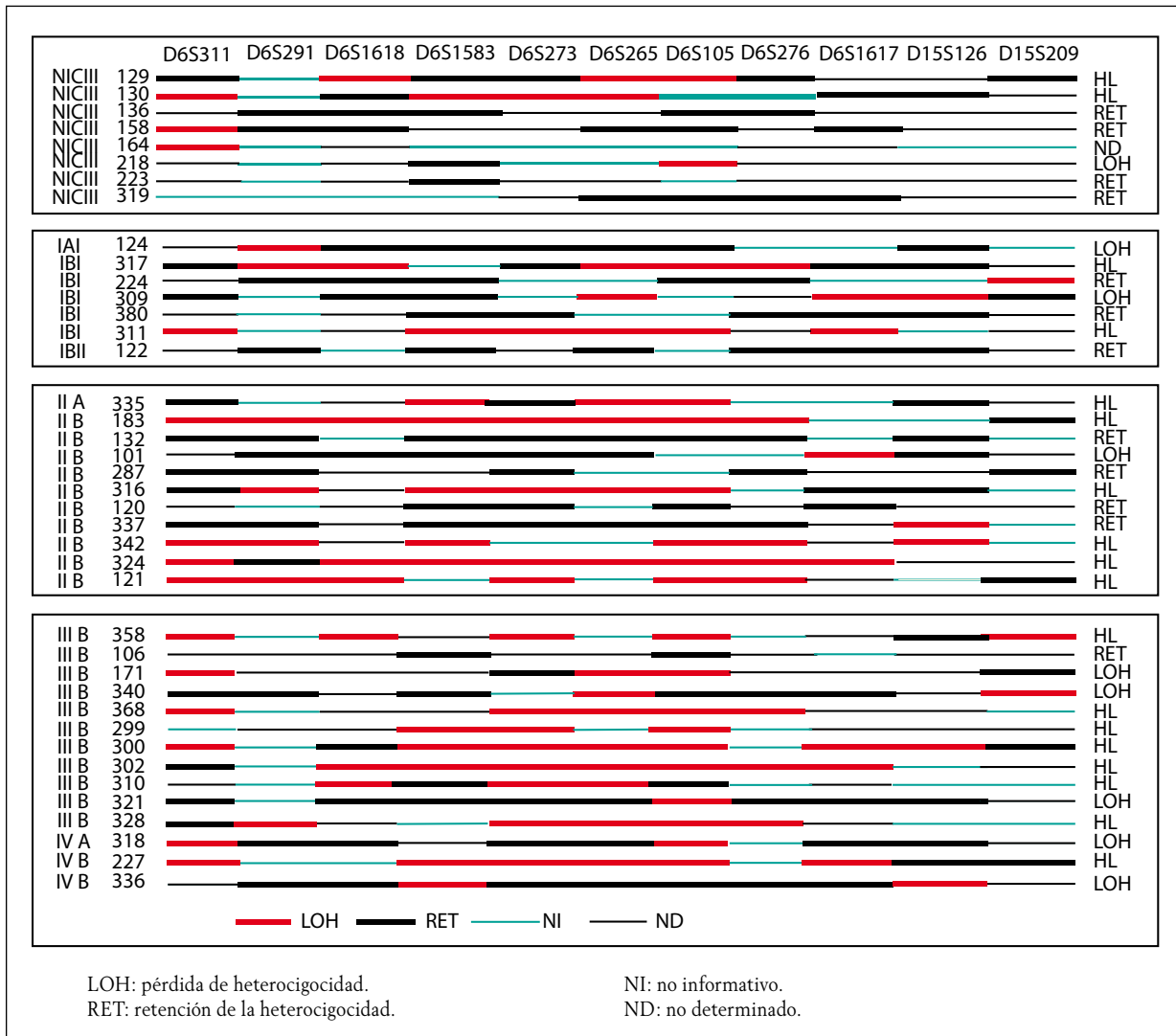


Figura 7. Resumen de los datos de LOH para los diferentes microsatélites analizados en los grupos de pacientes con CCU.

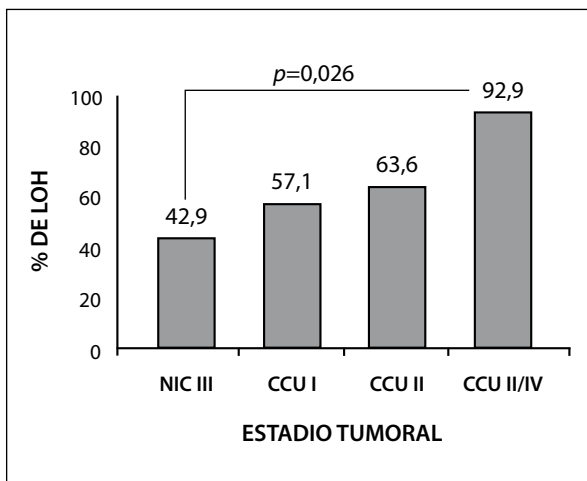


Figura 8. Comparación de LOH en función del estadio tumoral.

De las siete muestras de las pacientes en estadio I que pudieron ser analizadas, dos (28%) presentaron LOH en uno de los marcadores, cuatro retuvieron la heterocigidad y una fue homocigota.

En el grupo de las pacientes en estadio II, de las nueve que pudieron ser analizadas sólo dos (22%) mostraron LOH; las siete restantes retuvieron la heterocigidad en uno de los marcadores y fueron homocigotas para el otro marcador.

De las 14 pacientes en estadio III y IV, 12 pudieron ser analizadas. De ellas, 4 (33%) presentaron LOH en un marcador, 4 retuvieron la heterocigidad y 3 fueron homocigotas.

## Discusión

La adquisición de nuevas características genéticas y fenotípicas por parte de las células tumorales conduce a la evolución de variantes tumorales genéticamente inestables, capaces de evadir la respuesta del sistema inmune. El principal factor que contribuye al surgimiento de estos clones alterados es la inmunoselección llevada a cabo por las células T, las cuales reconocen los antígenos tumorales presentados en las moléculas de HLA clase I. Así, una alteración en la expresión de las moléculas de HLA clase I en las células tumorales constituye un mecanismo de escape de la respuesta inmune antitumoral durante la progresión del cáncer (17,25).

La alta frecuencia de LOH en la región 6p21.3, donde se localizan los genes que codifican para las moléculas de HLA, puede afectar dramáticamente la respuesta inmune antitumoral (25-30) al restringir la variedad de moléculas de HLA que pueden ser expresadas en la superficie celular para presentar antígenos asociados a tumor a los linfocitos T citotóxicos. Numerosos estudios en cáncer han mostrado una alta incidencia de LOH en esta región; sin embargo, no existe suficiente información acerca de la frecuencia de las pérdidas de heterocigidad en la región de HLA durante la progresión tumoral.

En el presente estudio se analizó la LOH en la región que contiene los genes HLA, mediante el empleo de un panel de 11 marcadores de microsatélites: 7 localizados en 6p21.3; uno, en 6p 25; uno, en 6q; y dos, para  $\beta_2m$ , localizados en 15q21, en 40 pacientes con cáncer de cuello uterino en diferentes estadios.

Hasta la fecha han sido definidos 7 fenotipos alterados de HLA. Estos fenotipos tumorales son producidos durante la selección inmune (31-33), y han sido definidos como: fenotipo I, pérdida total de HLA clase I; fenotipo II pérdida de haplotipo HLA; fenotipo III, pérdida de *locus* HLA-A, -B o -C; fenotipo IV, pérdida alélicas de HLA; fenotipo V, fenotipo combinado (pérdida de haplotipo y desregulación del *locus* HLA-A, -B o -C); fenotipo VI, no respondedor a IFN-g; fenotipo VII, desregulación de moléculas de HLA-A, -B y -C y expresión de moléculas de HLA E. Todos estos fenotipos pueden

ser encontrados en varios tumores, dependiendo de su origen o del carcinógeno que induce el tumor (17,34).

El fenotipo II o pérdida de haplotipo de HLA está asociado a la pérdida de heterocigidad (LOH) causada, a su vez, por la pérdida de una copia del cromosoma 6 o la pérdida de un fragmento de DNA que contiene los genes de HLA-A, -B y -C. Este fenotipo se ha descrito en muchos tumores y es un mecanismo implicado en el desarrollo de alteraciones irreversibles en la expresión de HLA-I. Se ha reportado que la LOH en 6p21.3 se asocia a la regulación negativa de la expresión de HLA-I en carcinoma escamoso de esófago (35). En este estudio se observó LOH en el 46,8% de las pacientes con cáncer invasor, y este resultado coincide con lo reportado en estudios previos, en los que se ha observado un porcentaje similar en pacientes con cáncer invasor, utilizando marcadores relacionados (D6S276, D6S1624 y D6S1583) (36).

Varias líneas de evidencia indican que las alteraciones en la expresión de HLA clase I juegan un papel importante en el curso clínico de la progresión maligna. En el presente estudio se observó una mayor frecuencia de LOH en la región de HLA clase I en los estadios más avanzados de CCU, en comparación con NIC-III. Las frecuencias observadas para LOH fueron: 42,9% para el grupo de NIC-III; 57% para el grupo de CCU en estadio I; 63,6% en el estadio II y 92,85% para el grupo de las pacientes en estadios más avanzados (III y IV). Adicionalmente, el mayor porcentaje de pérdidas de haplotipo (57%) se observó en el grupo de las pacientes con CCU en estadios III y IV, mientras que en el grupo de las pacientes con NIC-III y CCU estadio I se observó el menor porcentaje de pérdida de haplotipo (28%).

Si bien estos resultados presentan algunas diferencias con los reportados por Chatterjee, quien observó una mayor frecuencia de LOH en lesiones intraepiteliales de alto grado (91,7%) (37), las frecuencias observadas en este trabajo son similares a las reportadas en otros estudios, y apoyan el concepto de que las LOH en 6p21.3

constituyen un evento temprano en el desarrollo del cáncer de cuello uterino (38-40) y, adicionalmente, pueden contribuir a los mecanismos de escape del control de la respuesta inmune antitumoral y la progresión tumoral (25,34,41,42). Estudios previos han reportado que la progresión del carcinoma *in situ* a invasivo requiere LOH en 6p21.3, 8 y 4q26-28 (11).

La pérdida en la expresión de la  $\beta_2m$  es un evento relacionado con mecanismos que pueden también conducir a la pérdida total de la expresión de HLA-I (43-45). Esta alteración involucra frecuentemente mutaciones en una copia del gen de la  $\beta_2m$  (44,45). Sin embargo, también han sido reportadas LOH en el cromosoma 15, donde se ubica el gen de la  $\beta_2m$ , e, incluso, se ha observado que las LOH son más frecuentes que las mutaciones del gen  $\beta_2m$  en las líneas tumorales.

Estudios en tumores laríngeos han reportado hasta un 41% de LOH en el cromosoma 15 (11). En este estudio se observó una LOH en la región 15q21 en el 25,8% de los casos analizados. Este porcentaje de LOH fue menor que el observado en otros tipos tumorales. En carcinoma escamo celular del esófago se reportó un 65,31% de LOH para el marcador D15S209, y un 69,39% de LOH para el marcador D15S126 (35). Sin embargo, estas diferencias pueden deberse a la dificultad para amplificar los marcadores utilizados en el estudio.

Además, contrariamente a lo reportado en otros estudios —en los cuales se ha observado que la LOH en la región 15q21.3 se correlaciona a menudo con metástasis en cáncer de cabeza y cuello (46)—, en este estudio no se observó ninguna diferencia entre los diferentes estadios analizados. Tales discrepancias pueden relacionarse con el tipo y origen del tumor.

Para definir los diferentes fenotipos de HLA clase I en los tumores humanos se ha requerido una variedad de técnicas inmunoquímicas y moleculares. Por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales, que reconocen alelos de HLA clase I específicos, hace posible definir alteraciones específicas en la expresión de estas moléculas. Sin embargo, existe un número importante de alelos que no pueden ser definidos por la falta de un AcM apropiado.

El empleo de otras técnicas, como el análisis de las LOH basado en la amplificación de microsatélites en la región de HLA a partir del ADN de tejido tumoral y su correspondiente control normal, ha permitido discriminar entre diferentes fenotipos alterados, tales como los fenotipos II, III, IV y V, los cuales pueden tener un valor pronóstico en el seguimiento clínico e inmunoterapéutico.

En general, en el presente estudio se observó una clara relación entre un incremento progresivo de las LOH y pérdida de haplotipo con la progresión del tumor en las pacientes con cáncer de cuello uterino. Estos resultados soportan la hipótesis de que la LOH en la región 6p21.3 contribuye al desarrollo de nuevas variantes de evasión tumoral seleccionadas por el sistema inmune, capaces de evadir el control de la respuesta inmune antitumoral, y así continuar con la progresión tumoral.

El entendimiento de los mecanismos genéticos involucrados en el escape de las células tumorales del control del sistema inmune y la caracterización específica del fenotipo alterado de HLA clase I mediante el análisis de LOH podrían, en futuros estudios, contribuir a la identificación de biomarcadores de progresión tumoral, así como al desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas específicas.

## Fuentes de financiación

Departamento Nacional de Planeación (DNP), código: 41030310-7. Colciencias, código 2101-04-11896. Instituto Nacional de Cancerología, código 41030310-7.

## Agradecimientos

Al Grupo de Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología, por su participación en la recolección de las biopsias. A Mauricio Palau, patólogo de la Fundación Santa Fe, por su ayuda en la microdissección de algunos de los casos incluidos. A Isabel Maleno y Federico Garrido, del Hospital Virgen de las Nieves, en Granada, España, por confirmar nuestros resultados, por su colaboración para el análisis de algunos casos de difícil interpretación y por sus consejos para la optimización de la técnica. A todas las mujeres que desinteresadamente aceptaron participar en el estudio.

## Referencias

- Dutrillaux B. Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. *Adv Cancer Res* 1995;67:59-82.
- Pathak S, Multani AS. Aneuploidy, stem cells and cancer. *EXS* 2006;(96):49-64.
- Sugai T, Habano W, Jiao YF, Suzuki M, Takagane A, Nakamura S. Analysis of genetic alterations associated with DNA diploidy, aneuploidy and multiploidy in gastric cancers. *Oncology* 2005; 68(4-6):548-57.
- Algarra I, Collado A, Garrido F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int J Clin Lab Res* 1997; 27(2):95-102.
- Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ. Ever since Knudson. *Trends Genet* 2001;17(10):569-73.
- Armitage P, Doll R. A two-stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer. *Br J Cancer* 1957;11(2):161-9.
- Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(4):820-3.
- Knudson AG, Jr., Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(12):5116-20.
- Jackson CE, Block MA, Greenawald KA, Tashjian AH, Jr. The two-mutational-event theory in medullary thyroid cancer. *Am J Hum Genet* 1979; 31(6):704-10.
- Hethcote HW, Knudson AG, Jr. Model for the incidence of embryonal cancers: application to retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75(5):2453-7.
- Maleno I, López-Nevot MA, Cabrera T, Salinero J, Garrido F. Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51(7):389-96.
- Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, Paco L, López-Nevot MA, Collado A, et al. Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 2004; 56(4):244-53.
- Jiménez P, Canton J, Collado A, Cabrera T, Serrano A, Real LM, et al. Chromosome loss is the most frequent mechanism contributing to HLA haplotype loss in human tumors. *Int J Cancer* 1999; 83(1):91-7.
- Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:253-88.
- Palmisano GL, Pistillo MP, Capanni P, Pera C, Nicolo G, Salvi S, et al. Investigation of HLA class I downregulation in breast cancer by RT-PCR. *Hum Immunol* 2001; 62(2):133-9.
- Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, et al. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest* 1996; 98(7):1633-41.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18(2):89-95.
- Kersemakers AM, Kenter GG, Hermans J, Fleuren GJ, van de Vijver MJ. Allelic loss and prognosis in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Cancer* 1998; 79(4):411-7.
- Mitra AB, Murty VV, Li RG, Pratap M, Luthra UK, Chaganti RS. Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54(16):4481-7.
- Mitra AB, Murty VV, Singh V, Li RG, Pratap M, Sodhani P, et al. Genetic alterations at 5p15: a potential marker for progression of precancerous lesions of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(10):742-5.
- Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5(6):435-45.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samsón D, Drouot N, Vignal A, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; 380(6570):152-4.
- Ramal LM, Maleno I, Cabrera T, Collado A, Ferron A, López-Nevot MA, et al. Molecular strategies to define HLA haplotype loss in microdissected tumor cells. *Hum Immunol* 2000; 61(10):1001-12.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-4.
- Carretero R, Romero JM, Ruiz-Cabello F, Maleno I, Rodríguez F, Camacho FM, et al. Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics* 2008; 60(8):439-47.
- Campoli M, Chang CC, Ferrone S. HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 2002 Dec 19;20 Suppl 4:A40-A45.
- Campoli M, Chang CC, Oldford SA, Edgecombe AD, Drover S, Ferrone S. HLA antigen changes in malignant tumors of mammary epithelial origin: molecular mechanisms and clinical implications. *Breast Dis* 2004; 20:105-25.
- Campoli M, Ferrone S. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene* 2008; 27(45):5869-85.

29. Chang CC, Campoli M, Ferrone S. HLA class I defects in malignant lesions: what have we learned? *Keio J Med* 2003; 52(4):220-9.
30. Chang CC, Ferrone S. Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. *Cancer Immunol Immunother* 2006 Jun 17.
31. Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 2001; 83:117-58.
32. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; 74:181-273.
33. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 2002; 12(1):3-13.
34. Aptsiauri N, Cabrera T, García-Lora A, López-Nevot MA, Ruiz-Cabello F, Garrido F. MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells. *Int Rev Cytol* 2007; 256:139-89.
35. Yang Y, Zhang J, Miao F, Wei J, Shen C, Shen Y, et al. Loss of heterozygosity at 6p21 underlying [corrected] HLA class I downregulation in Chinese primary esophageal squamous cell carcinomas. *Tissue Antigens* 2008; 72(2):105-14.
36. Harima Y, Harima K, Sawada S, Tanaka Y, Arita S, Ohnishi T. Loss of heterozygosity on chromosome 6p21.2 as a potential marker for recurrence after radiotherapy of human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3):1079-85.
37. Chatterjee A, Pulido HA, Koul S, Beleno N, Perilla A, Posso H, et al. Mapping the sites of putative tumor suppressor genes at 6p25 and 6p21.3 in cervical carcinoma: occurrence of allelic deletions in precancerous lesions. *Cancer Res* 2001; 61(5):2119-23.
38. Mazurenko NN, Blied AI, Bidzhieva BA, Peskov DI, Snigur NV, Savinova EB, et al. [Loss of heterozygosity at chromosome 6 as a marker of early genetic alterations in cervical intraepithelial neoplasias and microinvasive carcinomas]. *Mol Biol (Mosk)* 2006; 40(3):436-47.
39. Vermeulen CF, Jordanova ES, Zomerdijk-Nooijen YA, ter Haar NT, Peters AA, Fleuren GJ. Frequent HLA class I loss is an early event in cervical carcinogenesis. *Hum Immunol* 2005; 66(11):1167-73.
40. Bontkes HJ, Walboomers JM, Meijer CJ, Helmerhorst TJ, Stern PL. Specific HLA class I down-regulation is an early event in cervical dysplasia associated with clinical progression. *Lancet* 1998; 351(9097):187-8.
41. Aptsiauri N, Carretero R, García-Lora A, Real LM, Cabrera T, Garrido F. Regressing and progressing metastatic lesions: resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(11):1727-33.
42. Cabrera T, Lara E, Romero JM, Maleno I, Real LM, Ruiz-Cabello F, et al. HLA class I expression in metastatic melanoma correlates with tumor development during autologous vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(5):709-17.
43. Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53(10):904-10.
44. Benítez R, Godelaine D, López-Nevot MA, Brasseur F, Jiménez P, Marchand M, et al. Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 1998; 52(6):520-9.
45. Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S. beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest* 1998; 101(12):2720-9.
46. Poetsch M, Kleist B. Loss of heterozygosity at 15q21.3 correlates with occurrence of metastases in head and neck cancer. *Mod Pathol* 2006; 19(11):1462-9.