

## Detección de mutaciones en los genes *K-ras*, *H-ras* y *EGFR* en muestras de plasma sanguíneo y cepillado cervical de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) III y cáncer de cuello uterino\*

DABEIBA ADRIANA GARCÍA, MSc<sup>1</sup>, YAZMÍN ROCÍO ARIAS, MSc<sup>2</sup>, FABIO ANCÍZAR ARISTIZÁBAL, PhD<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** El cáncer cervical es el segundo cáncer más importante en mujeres a nivel mundial y la segunda causa de muerte en mujeres por cáncer. Se ha demostrado que el proceso de carcinogénesis cervical presenta componentes tanto genéticos, epigenéticos y medio ambientales. En la actualidad, muchos estudios se encaminan en la búsqueda de marcadores moleculares como mutaciones en oncogenes y/o genes tumor supresor que se asocien con la progresión de esta entidad. Los genes candidatos más estudiados en cáncer cervical en distintas poblaciones han sido *H-ras*, *K-ras*, *EGFR* entre otros.

**Objetivos:** Se identificó el virus de papiloma humano (VPH) genérico y específico en el ADN libre de plasma y de cepillado cervical de pacientes con cáncer cervical invasivo y con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) III además de evaluar alteraciones genéticas, como mutaciones en los genes *H-ras*, *K-ras* y *EGFR*.

**Metodología:** Para ello se detectó el VPH genérico mediante PCR con los iniciadores GP5+/GP6+, y específico para VPH 16 y 18 en la región E6/E7. Para detectar las mutaciones en el codón 12 de *H-ras*, codones 12 y 13 de *K-Ras* y el exón 21 de *EGFR* se realizó mediante secuenciación directa de los productos de PCR de estos fragmentos génicos.

**Resultados:** Obteniendo una buena correlación entre las muestras de plasma sanguíneo y los cepillados cervicales, tanto para los hallazgos de VPH  $p=0.0374$  como para las mutaciones evaluadas  $p=0$ . En general, para *EGFR* en el exón 21 no se encontraron mutaciones, al igual que para los codones 12 y 13 en *K-ras* y codón 12 en *H-ras*.

**Conclusión:** El uso del ADN presente en el plasma puede ser relevante para el análisis de mutaciones y de la presencia de marcadores tumorales cuando no se dispone de otras muestras.

**Palabras clave:** Mutaciones; Cáncer cervical; Lesión intraepitelial de alto grado; Papilomavirus humano; *H-ras*; *K-ras*; *EGFR*.

*Detection of genes mutations in the K-RAS, H-RAS and EGFR in samples of blood plasma and cervical smears for patients with cervical intraepithelial neoplasia III and cervical cancer*

### SUMMARY

**Introduction:** Cervical cancer is the second most important cancer in women worldwide, and the second cause of cancer death in women. It has been shown that the process of cervical carcinogenesis presents as genetic and epigenetic components as environmental issues. At present, many studies are addressed in searching for molecular markers such as mutations in oncogenes and/or tumor suppressor genes that are associated with the progression of this disease, the most studied candidate genes in cervical cancer in different populations have been *H-ras*, *K-ras*, *EGFR* among others.

**Objective:** The present study identified human papilloma virus (HPV) generic and specific in DNA-free plasma and cervical smears of invasive cervical cancer patients and patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) III in addition to assessing genetic alterations, such as mutations in the genes *H-ras*, *EGFR* and *K-ras*.

**Methods:** To do so generic HPV was detected by PCR with primers GP5+/GP6+, and specific HPV 16 and 18 in E6/E7 region; to detect mutations in codon 12 of *H-ras*, codons 12 and 13 of *K-ras* and *EGFR* exon 21 was conducted by direct sequencing of PCR products of these gene fragments.

\* Proyecto financiado por la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

1. Pontificia Universidad Javeriana, Centro de Investigaciones Odontológicas, Bogotá, Colombia. e-mail: garciad@javeriana.edu.co y rariasm@unal.edu.co

2. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Bogotá, Colombia. e-mail: faaristizabal@unal.edu.co  
Recibido para publicación marzo 31, 2008 Aceptado para publicación enero 15, 2009

**Results:** Getting a good correlation between samples of blood plasma and cervical smears for both; the findings of HPV  $p=0.0374$  and evaluated mutations  $p=0$ . In general, for *EGFR* in exon 21 mutations were not found, as for codons 12 and 13 in *K-ras* and codon 12 in *H-ras*.

**Conclusion:** The use of DNA in plasma may be relevant to the analysis of mutations and the presences of tumor markers are not available from other samples.

**Keywords:** Mutation; Cervical cancer; High-grade lesion; Human papillomavirus; H-ras; K-ras; EGFR.

El cáncer cervical es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial. En Colombia, la incidencia estimada es de 29.4 casos por cada 100,000 habitantes<sup>1</sup>. El proceso de carcinogénesis cervical comienza por lesiones escamosas no invasivas que progresan a lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado; en algunos casos, las lesiones progresan a un carcinoma invasivo<sup>2</sup>. No obstante, aún no se conoce con exactitud qué lesiones progresan o cuáles regresan ni tampoco los mecanismos de la progresión tumoral en este tipo de neoplasia. Aún más, a pesar de los avances recientes que han revelado diferentes rutas de la carcinogénesis cervical, a la fecha no se ha encontrado un marcador molecular que esté significativamente asociado con la progresión o el resultado clínico de la enfermedad.

Múltiples hallazgos evidencian que pacientes con distintas neoplasias entre ellas el cáncer cervical evidencian cantidades crecientes de ADN humano en plasma, además de ADN viral<sup>3</sup>. En otro tipo de neoplasias, como cáncer de colon, esófago, estómago, seno, páncreas, cabeza y cuello y hepático en los cuales el ADN que circula en el plasma también posee las mismas características genéticas (amplificación de oncogenes, mutaciones puntuales en genes supresores de tumor, inestabilidad de microsatélites, otras) y/o epigenéticas (metilación de regiones promotoras de genes supresores tumorales) del tumor analizado<sup>4</sup>, se abre la posibilidad de usar al ADN de plasma como un blanco importante de estudio, pues su fácil obtención y la posibilidad de que a través de los cambios presentes en el ADN plasmático se puedan detectar no sólo recurrencias locales sino también distantes, lo convierten en una muestra ideal. Los cambios génicos más estudiados en cáncer cervical son mutaciones en los genes *EGFR*, *H-ras* y *K-ras*.

Harvey (H)-*ras* y Kirsten (K)-*ras* se localizan en los cromosomas 11 y 12 respectivamente; estos oncogenes codifican para una proteína de 21kDa denominada p21, la cual presenta actividad GTPasa y está implicada en la regulación del ciclo celular<sup>5</sup>. La activación de estos oncogenes mediante mutaciones puntuales principalmente en los codones 12, 13 y 61, inhiben su actividad GTPasa, representada en una activación constitutiva de p21, contribuyendo de esta forma a la transformación maligna. La elevada expresión de *ras* se ha observado en muchos tipos de cáncer como el de pulmón, seno, vejiga, colon y cervical entre otros. Además, mutaciones en dichos codones, pueden ser identificadas no sólo en tejido neoplásico sino también en lesiones preneoplásicas, sugiriendo un papel importante en la carcinogénesis cervical<sup>6</sup>.

Otro oncogen estudiado en cáncer cervical es el *EGFR*, involucrado en la proliferación celular; es un receptor de 170kDa que se encuentra anclado a la membrana celular y se localiza en el cromosoma 7, pertenece a la familia de los receptores tirosina quinasa ErbB, compuesta por cuatro miembros *EGFR* (*ErbB1*, *ErbB2*, *ErbB3* y *ErbB4*). Este receptor presenta varios ligandos entre ellos EGF y TGF $\alpha$ <sup>8</sup>. Cuando el ligando se une al dominio extracelular del receptor, ocurre una autofosforilación y dimerización, induciendo cambios conformacionales. La transducción de esta señal resulta en proliferación celular, diferenciación, migración, adhesión, protección a apoptosis y transformación. Mutaciones en los exones del 18 al 24, altera su actividad tirosina quinasa, las cuales se han encontrado en varios tipos de tumores epiteliales como en cáncer de seno y cervical principalmente<sup>7</sup>.

Debido a que las mutaciones en los dominios GTPasa para *K-ras* y *H-ras* y dominio tirosina quinasa para *EGFR* se han descrito como unos de los más prometedores marcadores moleculares asociados con la progresión y potenciales herramientas en el monitoreo de aparición de recurrencias y metástasis en tumores sólidos, el objetivo del presente estudio fue determinar si las mutaciones detectadas en cepillados cervicales eran las mismas detectadas en plasma sanguíneo de pacientes con NIC III y cáncer cervical invasivo. Asimismo se realizó una comparación de la presencia de VPH en los dos tipos de muestras de cada paciente participante en el estudio.

## MÉTODOS

**Población y muestras.** Este estudio es de tipo descriptivo, de corte transversal y observacional, el número de pacientes incluidas fue muestreo por conveniencia, que se recolectaron durante un período de seis meses en un hospital de tercer nivel de la ciudad de Bogotá, Colombia. Las muestras de cepillado cervical y sangre periférica se tomaron durante la colposcopia a mujeres quienes tuvieran diagnóstico citológico de lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) y/o CC, quienes eran remitidas para colposcopia-biopsia para confirmación de diagnóstico patológico; estas pacientes no habían iniciado tratamiento alguno y aceptaron participar voluntariamente en el estudio, firmando un consentimiento informado. Las mujeres se incluyeron en el estudio luego de la confirmación patológica de diagnóstico de NIC III y CC invasivo.

Las variables cualitativas que se tuvieron en cuenta fueron, diagnóstico patológico, presencia o no del VPH y tipo viral (VPH16 y/o 18). En total se obtuvieron 26 pacientes. De cada paciente se obtuvo una muestra mediante cepillado cervical tomado en el momento de la colposcopia, las cuales se colocaron inmediatamente en un tubo que contenía PBS 1X y timerosal al 0.05%. Los tubos se almacenaron en nevera de transporte hasta la recepción en el laboratorio para su procesamiento. El otro tipo de muestra fue sangre periférica obtenida por venopunción en tubos con anticoagulante EDTA.

Las suspensiones celulares se centrifugaron a 3,000 g por 10 min; a los precipitados obtenidos se les adicionó 1 ml de buffer tris-HCl 10 mM (pH 8.3). Las muestras se dejaron en ebullición durante 10 min y luego se realizó una centrifugación a 3,000 g por un minuto y el sobrenadante se utilizó directamente para realizar las PCRs. Las muestras de sangre periférica, se centrifugaron por 20 minutos a 3,000 g, la capa superior de plasma fue transferida a tubos de microcentrífuga y centrifugada por 3 min a 8,000 g para eliminar restos celulares. La extracción se realizó mediante un kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) utilizando el protocolo sugerido por el fabricante. A las muestras de ADN de plasma, se les realizó un proceso de restauración de los fragmentos de cadena sencilla del ADN utilizando como templado la cadena complementaria; este procedimiento se realizó antes de ser utilizado para las PCRs, y consistió en una mezcla de

ADN de plasma no restaurado, Tris-HCl 10 mM, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y 200 uM de cada dNTPs incubadas a 55°C por 60 minutos, luego se adicionó 1U de Taq polimerasa y se incubó a 72°C durante 20 minutos<sup>8</sup>.

**Calidad del ADN.** Los sobrenadantes de los cepillados cervicales y los ADN de plasma sin restaurar y restaurados, se utilizaron como moldes para amplificar el gen de β-globina, mediante los iniciadores PCO3 (sentido) 5' ACACAACCTGTGTTCACTAGC 3' y PCO4 (antisentido) 5' CAACTTCATCCACCTTCA CC 3'. Las concentraciones finales utilizadas fueron Tris-HCl 10 mM, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 7.5 pmol de cada iniciador, Taq polimerasa 1U y 200 uM de cada dNTPs. La amplificación se realizó en el termociclador MyCycler™ (BioRad Laboratorios, USA), las condiciones fueron 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos a 95°C por 20 seg, 58°C por 20 seg y 72°C por 20 seg. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en agarosa al 2% y teñida con bromuro de etidio 10 mg/ml, con un producto esperado de 110 pb. Como control positivo se utilizó ADN linfocitario de aproximadamente 25 ng y como control negativo la mezcla de la PCR<sup>8</sup>.

**Detección viral y tipificación de VPH.** Para la detección genérica del VPH, se realizó una PCR con los iniciadores GP5+ (S) 5' TTTGTTACTGTGGTAGATA CTA 3' y GP6+ (A) 5' GAAAAATAAACTGTAAAT CATA 3'. Las concentraciones finales utilizadas fueron Tris-HCl 10 mM, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 0.3 uM de cada iniciador, Taq polimerasa 1U y 200 uM de cada dNTPs, las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo a 95°C durante 4 min y 40 ciclos a 95°C por 1 min, 47°C por 1 min y 72°C por 1.5 min. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en agarosa al 2% y teñida con bromuro de etidio 10 mg/ml. En las muestras positivas para VPH, con el sobrenadante de los cepillados cervicales y el ADN de plasma restaurado, se realizó tipificación viral por PCR convencional de la región E6/E7 de los tipos virales 16 y 18 (VPH 16 iniciadores: sentido 5' ATCATCAAGAACACGTAG AG 3' y antisentido 5' GATCAGTTGTCTCTGGTTGC AAAT 3' y VPH 18 el sentido 5' GATTCACAACAT AGCTGGG 3' y el antisentido 5' TGCCTTAGGTCCA TGCATAC 3'). Las concentraciones finales utilizadas fueron las mismas que para la detección genérica del VPH. Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo

**Cuadro 1**  
**Secuencia de los iniciadores y tamaño del producto de la PCR para los genes H-ras, K-ras y EGFR**

Gen	Iniciadores	Producto
H-ras <sup>5</sup>	5' GAGACCCTGTAGGAGGACCC 3' (S) 5' GGGTGCTGAGACGAGGGACT 3' (A)	151 pb
K-ras <sup>5</sup>	5' ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT 3' (S) 5' TCAAAGAATGGTCCTGGACC 3' (A)	357 pb
EGFR <sup>20</sup>	5' TGATCTGTCCCTCACAGCAG 3' (S) 5' TCAGGAAAATGCTGGCTGAC 3' (A)	231 pb

a 94°C durante 2 min y 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 30 seg. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en agarosa al 2% y teñida con bromuro de etidio 10 mg/ml. El volumen final utilizado fue de 50 ul para la PCR genérica y 25 ul para la PCR tipo específica. Como control positivo para las PCR genérica y tipo viral específica se utilizaron plásmidos pBR322 para VPH 16 y 18, provenientes del Centro de Referencia para Papilomas Humanos del DKFZ (German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania) y como control negativo la mezcla de la PCR.

**Análisis de mutaciones en H-ras, K-ras y EGFR.** Tanto en los cepillados cervicales como en el ADN restaurado de plasma, se buscaron mutaciones en el codón 12 de H-ras, codones 12 y 13 de K-ras y de exón 21 de EGFR: para ello se realizó una PCR convencional para cada gen en donde se incluyera el fragmento a analizar, los iniciadores utilizados y el tamaño de los productos esperados (Cuadro 1). Las concentraciones finales utilizadas fueron Tris-HCl 10 mM, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 7.5 pmol de cada iniciador, Taq polimerasa 1U y 200 uM de cada dNTPs, con un volumen final de 25 ul. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron 1 ciclo a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 seg; 60°C por 30 seg para los genes H-ras y K-ras y 58°C para el gen de EGFR y 72°C por 30 seg y una elongación final a 72°C por 5 min, realizadas en el termociclador MyCycler™ (BioRad Laboratorios, USA).

Los productos de la PCR fueron purificados mediante el kit Wizard® DNA Clean-up System de Promega, siguiendo las recomendaciones del fabricante y secuenciados en el ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA) en McLab San Francisco (USA).

**Consideraciones éticas.** El estudio respetó los as-

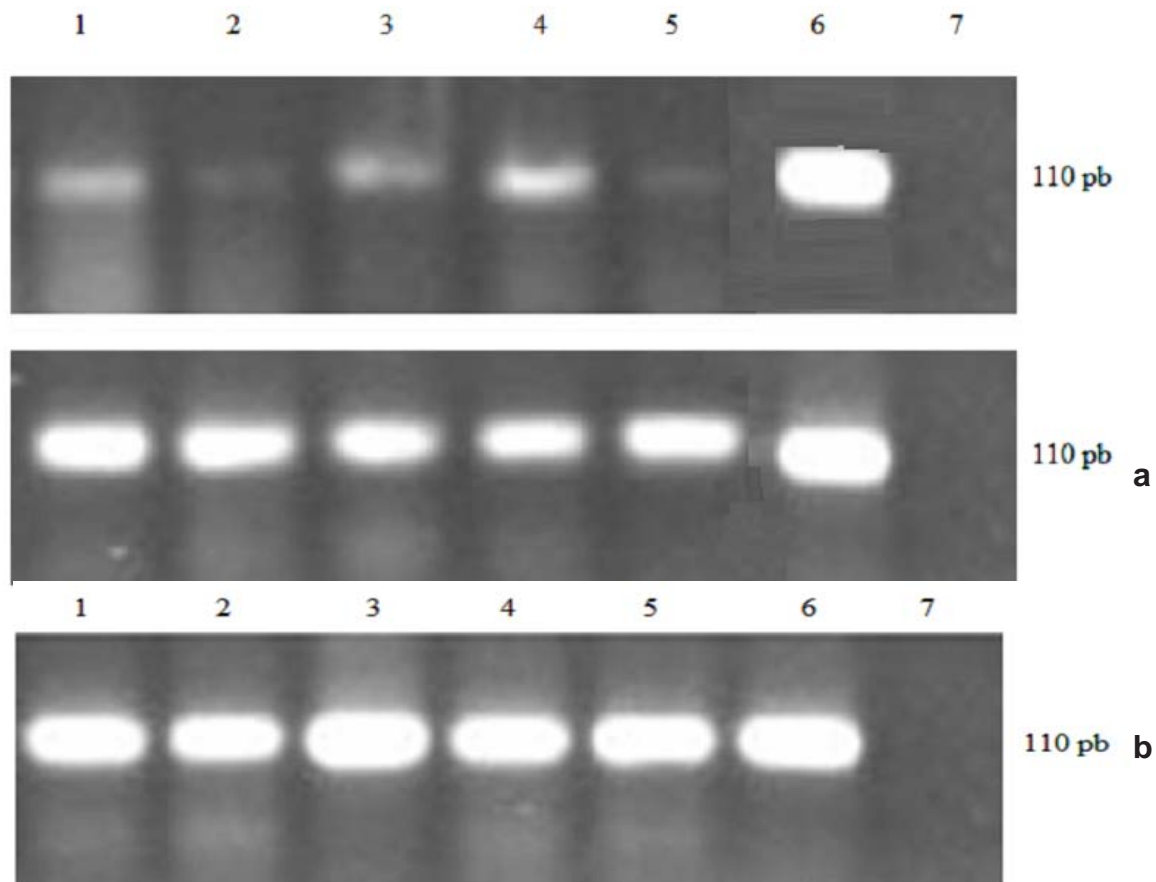
pectos éticos y legales de la investigación en seres humanos, según lo estipulado en la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia y según la Declaración de Helsinki de 1975 modificada en 2004. Las pacientes incluidas en el presente estudio, aceptaron participar voluntariamente después de leer y entender el consentimiento informado el cual fue aprobado por Comité de Ética de la Universidad Javeriana y Universidad Nacional.

**Análisis estadístico.** Se desarrolló una base de datos con la información de cada paciente en formato .xls de Microsoft Excel®. El procesamiento de los datos se realizó mediante un análisis descriptivo univariado construyendo tablas y gráficas, elaboradas con los estadígrafos para las variables cualitativas como presencia o ausencia de VPH y presencia o no de mutaciones en los codones analizados. Se obtuvo la distribución porcentual de frecuencias y se utilizó pruebas de asociación entre muestras de plasma y cepillados cervicales mediante la prueba de Pearson chi cuadrado.

## RESULTADOS

Todos los ADNs obtenidos evidenciaron una buena calidad, medida con la amplificación mediante PCR del gen β-globina, además, se observó que el proceso de restauración mejora la calidad del ADN de plasma, aumentando la sensibilidad de la amplificación de este gen (Figura 1), evidenciado con un incremento en la densidad óptica relativa (DOR), con una media en el ADN de plasma sin restaurar de 427,2 comparada con la media de DOR del ADN restaurado que fue de 1031,2 y una desviación estándar de 286,3 y 183,4 respectivamente. De las 26 muestras de cepillados cervicales, 100% y 84.6% de las de plasma mostraron resultados





**Figura 1. a.** Amplificación del gen de  $\beta$ -globina de ADN extraídos mediante kit comercial de plasma sanguíneo; en la parte superior ADN sin restaurar y en la parte inferior muestras equivalentes de los ADN después de restaurados, los carriles 1-5 son muestras de plasma y los carriles 6 y 7 son los controles positivo y negativo respectivamente. **b.** Amplificación del gen de  $\beta$ -globina de sobrenadantes de los cepillados cervicales, los carriles 1-5 son muestras cervicales y los carriles 6 y 7 son los controles positivo y negativo respectivamente.

positivos para la detección de VPH genérico mediante la amplificación de un segmento de la región L1 del virus con un amplímero esperado de 142 pb (Cuadro 2), observándose una asociación entre la muestra de plasma y los cepillados cervicales para la detección de VPH con una  $p$  de 0.0374.

La tipificación viral (VPH 16 y VPH 18), en muestras de cepillados cervicales fue de 61.5% para VPH16 y de 11.5% para VPH 18 (Cuadro 3). En plasma el tipo viral 16 estuvo presente en 50% de las muestras y el tipo viral 18 en 11.5% de las muestras (Cuadro 4). En 2 pacientes tanto con diagnóstico cáncer cervical invasivo (CC), como de NIC III no fue posible detectar en forma específica el VPH en plasma sanguíneo. En general, para el tipo viral 16 hubo datos similares entre las

muestras de plasma sanguíneo y las muestras de cepillado cervical con 50% y 61.5% respectivamente; para el tipo viral 18 fueron promedios de 11.5% y 11.5% respectivamente.

Se verificó el producto amplificado de los genes *K-ras*, *H-ras* y *EGFR* en las muestras estudiadas, con una buena amplificación tanto en las muestras de plasma restaurado como en cepillados cervicales (Figura 2).

Las secuencias de cada gen en estudio muestran que para *EGFR* todas las muestras presentaban isoforma A de este gen y no hubo mutaciones puntuales en el exón 21. Para el gen *H-ras*, no se evidenciaron mutaciones en el codón 12; sin embargo, en dos muestras analizadas tanto en muestras de plasma como en cepillado cervical, se encontró un cambio de nucleótido en el codón 27

**Cuadro 2**  
**Detección de VPH genérico en muestras de cepillado cervical y muestras de plasma restaurado de pacientes con NIC III y CC invasivo**

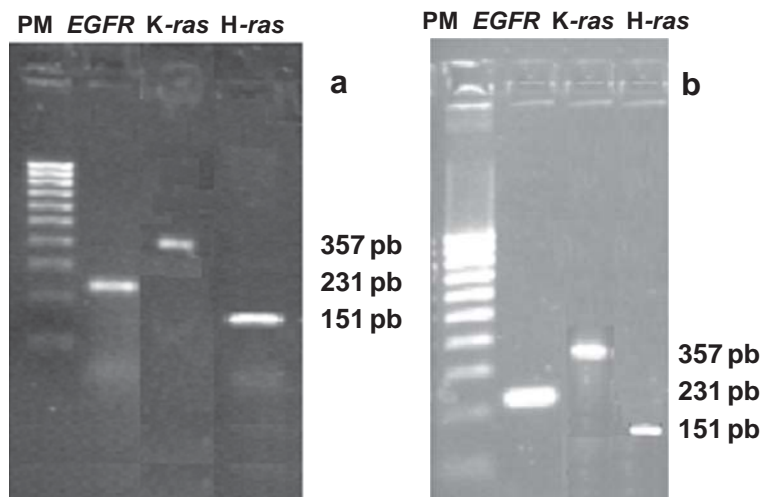
Diagnóstico	Frecuencia	VPH	
		plasma	raspado
NIC III	3	1	3
CC invasivo	23	21	23
Total	26	22	26

**Cuadro 3**  
**Tipificación de VPH (16 y 18) en muestras de cepillado cervical de pacientes con NIC III y CC invasivo**

Diagnóstico	Frecuencia	Raspado	
		VPH 16	VPH 18
NIC III	3	3	0
CC invasivo	23	13	3
Total	26	16	3

**Cuadro 4**  
**Tipificación de VPH (16 y 18) en muestras de plasma sanguíneo restaurado de pacientes con NIC III y CC invasivo**

Diagnóstico	Frecuencia	Plasma	
		VPH 16	VPH 18
NIC III	3	1	0
CC invasivo	23	12	3
Total	26	13	3



**Figura 2. a.** Amplificados de los genes *K-ras*, *H-ras* y *EGFR* en muestras de plasma restaurado. **b.** Amplificados de los genes *K-ras*, *H-ras* y *EGFR* en muestras de cepillado cervical.

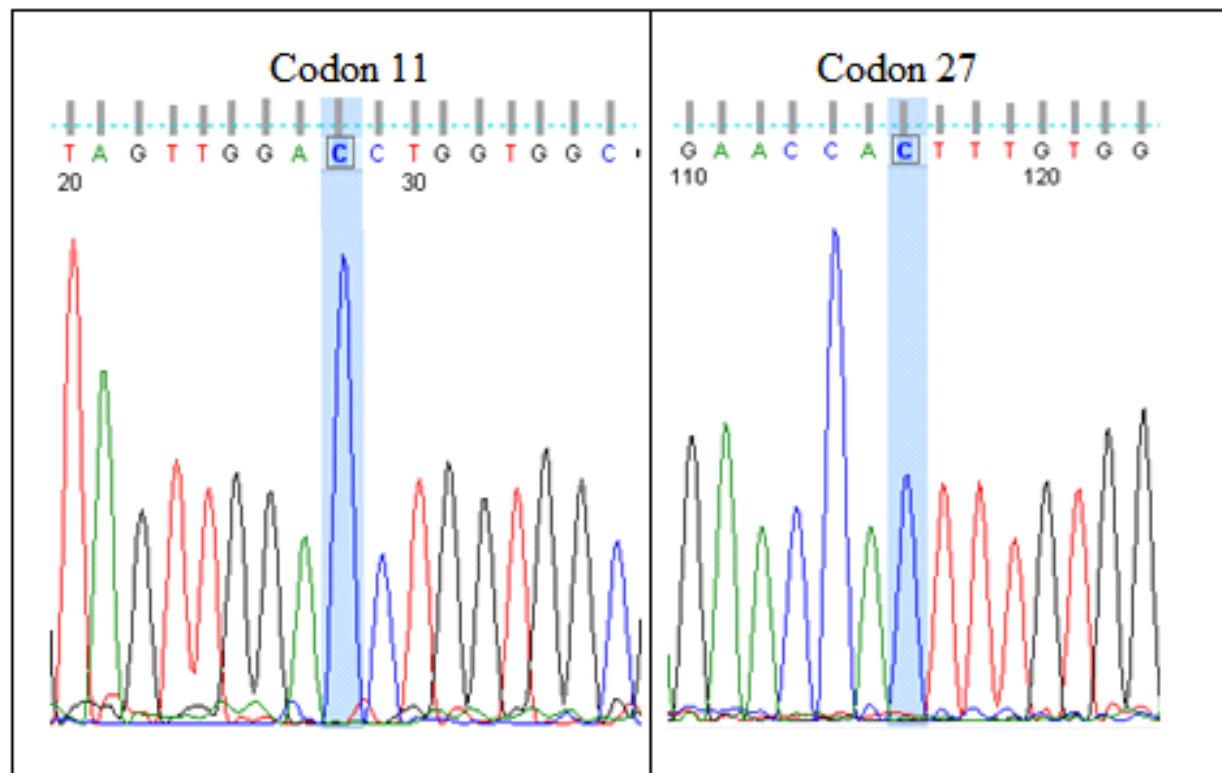


Figura 3. Electrofluorograma de los genes K-ras (codón 11) y H-ras (codón 27)

(CAT/CAC), que es silenciosa, debido a que no cambia el aminoácido básico de histidina traducido (Figura 3). Además, se encontró una asociación entre lo observado entre plasma y cepillado cervical con una  $p$  de 0. El gen K-ras no presentó mutaciones en los codones 12 ni 13; sin embargo, en el codón 11 se encontró un cambio de nucleótido (GCT/CCT) en todas las muestras analizadas, observándose una asociación en los dos tipos de muestras con una  $p$  de 0. Esta mutación, cambia el aminoácido traducido de alanina por prolina; sin embargo, aún cuando estos dos aminoácidos presentan la misma naturaleza apolar, esta modificación debe conducir a modificaciones conformacionales importantes en la proteína por el carácter rígido de la prolina (Figura 3).

## DISCUSIÓN

El ADN tanto genómico como viral puede ser detectado en plasma de pacientes con NIC III y CC invasivo, mostrando al plasma como una herramienta con valor diagnóstico y pronóstico<sup>3</sup>. Sin embargo, este ADN puede haber sufrido rompimientos en una de sus cadenas, con lo cual el procedimiento de restauración permite llenar estas

zonas, tomando como molde la cadena complementaria, mejorando de esta manera la eficiencia de la PCR, pues el proceso de restauración no incluye ciclos repetitivos de síntesis y denaturación característicos de la PCR, no es un tratamiento que incremente el tamaño del ADN molde, sino que repara las cadenas de modo que los iniciadores encuentran con mayor eficiencia su secuencia blanco<sup>8</sup>. El porcentaje de detección del VPH en raspados (100%), se correlaciona con los resultados de Bosch *et al.*<sup>9</sup>, (70%-100%). Con referencia a los resultados obtenidos en plasma de pacientes con NIC III y CC invasivo, la positividad de ADN de VPH fue 84.6%, cifra mayor a la obtenida por Wei *et al.*<sup>4</sup>, de 64.7% y la de Widschwendter *et al.*<sup>10</sup>, 2003 que fue de 45%; en estos dos estudios los datos obtenidos en plasma o suero respectivamente fue comparada con tejido tumoral cervical, que se asocia directamente con el proceso de restauración realizado, el cual mejora la calidad del ADN libre encontrado en plasma. En cuanto al tipo viral 16 presente en 615% se correlaciona con los resultados encontrados por Rabelo-Santos *et al.*<sup>11</sup> en Brasil (57.1%); para VPH 18 la prevalencia fue de 11.5%. Resultados similares fueron encontrados por Bosch *et al.*<sup>12</sup>, y Muñoz *et al.*<sup>13</sup>, 14% y 13.6%

respectivamente. En plasma sanguíneo, se encontró que el tipo viral 16 estuvo presente en 50% de las muestras y el tipo viral 18 en 11.5%. Sin embargo, los datos hasta ahora descritos por otros autores son muy bajos, ya que la detección genérica de VPH es baja y por ende la tipificación también se reduce drásticamente; por ejemplo en el estudio realizado por Dong *et al.*<sup>3</sup>, los porcentajes obtenidos fueron 3.4% para VPH 16 y 2.2% de VPH 18.

Para las alteraciones génicas se analizó el exón 21 de *EGFR (ErbB1)*, el cual no presentó mutaciones, similar a los resultados en cáncer de esófago<sup>14</sup>. Para el gen *H-ras*, no se encontró mutación en el codón 12 similar a los resultados de Mammas *et al.*<sup>5</sup>, Vachtenheim *et al.*<sup>15</sup>, pero se observó un polimorfismo en el codón 27 (CAT/CAC) en 2 muestras tanto de plasma como de cepillado cervical, resultados similares a los encontrados por Lev *et al.*<sup>16</sup> en células de melanoma. El gen *K-ras* tampoco se encontró mutado en los codones 12 y 13, correlacionándose con los resultados de Pochylski y Kwasniewska<sup>17</sup>; sin embargo, se encuentran mutaciones en el codón 11 (GCT/CCT) cambiando una alanina por prolina en todas las muestras analizadas, similar a los resultados de Gu *et al.*<sup>18</sup> y de Hongyo *et al.*<sup>19</sup> En general se encontró una buena correlación entre los resultados de mutaciones de los genes *H-ras*, *K-ras* y *EGFR* encontrados en plasma sanguíneo con los cepillados cervicales, resultados concordantes con lo encontrado por Dong *et al.*<sup>3</sup>, donde demostraron que las mismas mutaciones en oncogenes pueden ser evidenciadas tanto en ADN plasmático como en ADN tumoral.

En conclusión, el uso del ADN presente en el plasma puede ser relevante para el análisis de mutaciones y de la presencia de marcadores tumorales cuando no se dispone de otras muestras.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en especial al Departamento de Farmacia y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia), a la DIB por su apoyo financiero para la ejecución de este trabajo, Código 20100000 y al doctor Antonio Huertas Salgado del Instituto Nacional de Cancerología por su apoyo en el análisis de las secuencias y al doctor Fabián Carrillo por su colaboración en la traducción a inglés del presente artículo.

## REFERENCIAS

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide (IARC). Cancer Base N° 5, version 2.0.* Lyon: IARC Press; 2004.
2. Song SH, Lee JK, Oh MJ, Hur JY, Park YK, Saw HS. Risk factors for the progression or persistence of untreated mild dysplasia of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16: 1608-13.
3. Dong SM, Pai PI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, *et al.* Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11: 3-6.
4. Wei YC, Chou YS, Chu TY. Detection and typing of minimal human papillomavirus DNA in plasma. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007; 96: 112-6.
5. Mammas IN, Zafiroopoulos A, Koumantakis E, Sifakis S, Spandidos DA. Transcriptional activation of H- and N-ras oncogenes in human cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2004; 92: 941-8.
6. Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M, Lee EY. Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 1996; 62: 49-54.
7. Kim YT, Park SW, Kim JW. Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2002; 87: 84-9.
8. Arias YR, Carrillo EF, Aristizábal FA. Plasma DNA restoration for PCR applications. *J Clin Pathol.* 2007; 60: 952-4.
9. Bosch F, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55: 244-65.
10. Widschwendter A, Blassnig A, Wiedemair A, Müller-Holzner E, Müller HM, Marth C. Human papillomavirus DNA in sera of cervical cancer patients as tumor marker. *Cancer Lett.* 2003; 202: 231-9.
11. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98: 181-4.
12. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 796-802.
13. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, *et al.* Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis.* 2004; 190: 2077-87.
14. Pühringer-Oppermann FA, Stein HJ, Sarbia M. Lack of EGFR gene mutations in exons 19 and 21 in esophageal (Barrett's) adenocarcinomas. *Dis Esophagus.* 2007; 20: 9-11.
15. Vachtenheim J, Horakova I, Novotna H, Opaalka P, Roubkova H. Mutations of K-ras oncogene and absence of H-ras mutations in squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res.*



- 1995; 1: 359-65.
16. Lev DC, Onn A, Melinkova VO, Miller C, Stone V, Ruiz M, *et al.* Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in Enhanced tumor growth and metastasis *in vivo*. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 2092-100.
  17. Pochylski T, Kwasniewska A. Absence of point mutation in codons 12 and 13 of K-*ras* oncogene in HPV-associated high grade dysplasia and squamous cell cervical carcinoma. *Eur J Obst Gynecol Rep Biol.* 2003; 111: 68-73.
  18. Gu Q, Li L, Zhang Y, Li X, Xiao Y, Wu X. Sequencing analysis of human K-*ras* oncogene exon 1 in Chinese people. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 1998; 15: 98-100.
  19. Hongyo T, Buzard GS, Palli D, Weghorst CM, Amorosi A, Galli M, *et al.* Mutations of the K-*ras* and p53 genes in gastric adenocarcinomas from a high-incidence region around Florence, Italy. *Cancer Res.* 1995; 55: 2665-72.
  20. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, *et al.* Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.* 2005; 6: 279-86.