

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE MICRORNA Y SUS GENES BLANCO EN
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CÉRVIX**

Presentado por

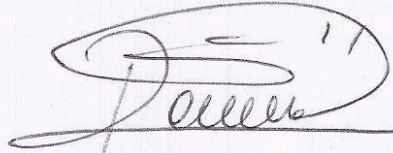
Q.C.B. MARIBEL MONTUFAR MARTÍNEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

ENERO, 2013

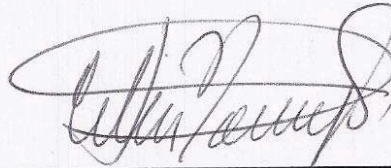
ANÁLISIS DE MICRORNA Y SUS GENES BLANCO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CÉRVIX

Aprobación de la tesis:



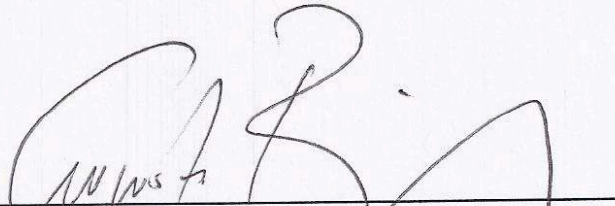
Dra. en C. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ

Director de Tesis



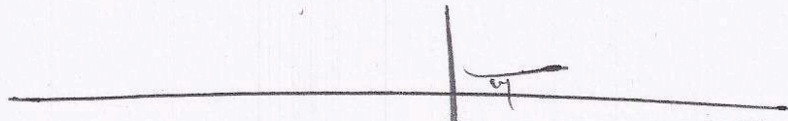
Dra. en C. CELIA N. SANCHEZ DOMÍNGUEZ

Co-Directora



Dr. en C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Miembro de la Comisión



Dr. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

ÍNDICE

| | PÁGINA |
|--|------------|
| LISTA DE FIGURAS | i |
| LISTA DE TABLAS | ii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | iii |
| RESUMEN | iv |
| | |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Epidemiología del Cáncer de Cervicouterino (CaCu) | 1 |
| 1.2 El VPH y su asociación con el CaCu | 3 |
| 1.3 Mecanismo de infección del VPH | 7 |
| 1.4 Diagnóstico | 10 |
| 1.5 El papel de los microRNAs en la regulación celular | 14 |
| 1.5.1 ¿Qué son los microRNAs? | 14 |
| 1.5.2 Biogénesis de los microRNAs | 16 |
| 1.5.3 Función de los microRNAs | 19 |
| 1.6 Antecedentes particulares | 20 |
| 1.6.1 Los microRNAs como biomarcadores de cáncer. | 20 |
| 1.6.2 Mecanismo de acción de los microRNAs frente al CaCu. | 24 |
| | |
| CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN | 27 |
| | |
| CAPÍTULO III. OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 Objetivo general | 28 |
| 3.2 Objetivos específicos | 28 |
| | |
| CAPÍTULO IV. ESTRATEGIA GENERAL | 29 |
| | |
| CAPÍTULO V. MATERIAL Y MÉTODOS | 30 |
| 5.1 Materiales | 30 |
| 5.1.1 Reactivos y Consumibles | 30 |
| 5.1.2 Estuches comerciales | 31 |
| 5.1.3 Material biológico | 31 |
| 5.1.4 Equipo | 31 |
| 5.1.5 Programas computacionales | 32 |
| 5.2 Métodos | 32 |
| 5.2.1 Lugar donde se realizó el estudio | 32 |
| 5.2.2 Grupos de estudio | 33 |
| 5.2.3 Cultivo de células SiHa, HeLa y C33a | 33 |
| 5.2.4 Cultivo de células Caski | 34 |
| 5.2.5 Cultivo de Queratinocitos | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.6 Prueba de detección de Mycoplasma | 35 |
| 5.2.7 Extracción de RNA total | 36 |
| 5.2.8 Microarreglos de expresión de miRNAs | 37 |
| 5.2.9 Análisis de expresión de miRNAs mediante qPCR | 40 |
| 5.2.10 Predicción <i>in silico</i> de genes diana | 41 |
| 5.2.11 Microarreglos de expresión génica global | 42 |
| 5.2.12 Verificación de la expresión de genes diana predichos | 46 |
| 5.2.13 Análisis estadístico | 46 |
| CAPÍTULO VI. RESULTADOS | 48 |
| 6.1 Análisis de la calidad del RNA total | 48 |
| 6.2 Prueba de Mycoplasma | 49 |
| 6.3 Descripción general de la expresión de miRNAs en los grupos de estudio | 49 |
| 6.4 Selección de miRNAs endógenos | 51 |
| 6.5 Validación de la expresión de miRNAs endógenos por qPCR | 52 |
| 6.6 Selección de miRNAs diferencialmente expresados | 53 |
| 6.7 Validación de la expresión de miRNAs diferencialmente expresados por qPCR | 54 |
| 6.8 Predicción de genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados | 55 |
| 6.9 Selección de genes diferencialmente expresados | 55 |
| 6.10 Selección de pares miRNA-Genes diferencialmente expresados | 57 |
| 6.11 El papel de los genes seleccionados en la regulación celular | 58 |
| CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN | 59 |
| 7.1 Modelo de estudio | 59 |
| 7.2 microRNAs endógenos | 59 |
| 7.3 microRNAs diferencialmente expresados | 60 |
| 7.4 microRNAs y genes diferencialmente expresados | 62 |
| CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES | 63 |
| CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA | 64 |

LISTA DE FIGURAS

| | PÁGINA |
|---|--------|
| Figura 1. Estimación de casos nuevos y muertes por cáncer a nivel mundial | 2 |
| Figura 2. Incidencia y Mortalidad del cáncer Cervicouterino por rango de edades | 3 |
| Figura 3. Genoma del VPH | 4 |
| Figura 4. El árbol familiar del <i>Papillomavirus</i> | 6 |
| Figura 5. Mecanismo de infección del Virus del Papiloma Humano (VPH) | 8 |
| Figura 6. Desarrollo del cáncer Cervicouterino. | 9 |
| Figura 7. Mecanismo de regulación celular en CaCu | 10 |
| Figura 8. . Biogénesis de los microRNAs | 17 |
| Figura 9. Estrategia general | 28 |
| Figura 10. Ligación y marcaje con biotina | 38 |
| Figura 11. Procedimiento de preparación de microarreglos de expresión global | 42 |
| Figura 12. Calidad de RNA | 48 |
| Figura 13. Gel de agarosa al 3% donde se observan los resultados de la prueba de Mycoplasma | 49 |
| Figura 14. Expresión de miRNAs en los grupos de estudio | 50 |
| Figura 15. Selección de miRNAs endógenos | 51 |
| Figura 16. Gráfica con valores de Ct. | 52 |
| Figura 17. Gráfica con valores de Desv. Std. | 52 |
| Figura 18. Expresión relativa de miRNAs por qPCR | 54 |
| Figura 19. Mapa de calor de genes diferencialmente expresados. | 56 |
| Figura 20. Gráfica de expresión génica | 56 |

LISTA DE TABLAS

| | PÁGINA |
|---|--------|
| Tabla 1. Tipos de VPH y sus manifestaciones clínicas | 5 |
| Tabla 2. MicroRNAs que podrían regular genes relacionados con cáncer. | 23 |
| Tabla 3. Preparación de Master Mix | 35 |
| Tabla 4. Preparación de reacción de PCR | 35 |
| Tabla 5. Procedimiento de Amplificación de qPCR | 36 |
| Tabla 6. Programa de termociclado para RT-PCR | 40 |
| Tabla 7. Programa de termociclado para PCR en tiempo Real | 41 |
| Tabla 8. RNA obtenido de las líneas celulares y muestras, cuantificadas por UV-Vis (NanoDrop) | 48 |
| Tabla 9. miRNAs diferencialmente expresados | 53 |
| Tabla 10. Predicción de genes blanco | 55 |
| Tabla 11. Tabla de pares Genes-miRNAs reguladores | 57 |
| Tabla 12. Genes y Función biológica | 58 |
| Tabla 13. Comparación de resultados con otros autores | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|---------------------------------------|
| CaCu | Cáncer Cervicouterino |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | Desoxirribonucleósidos trifosfatados |
| G | Gravedades |
| h | Horas |
| kV | Kilo volts |
| min | Minutos |
| miRNA | Micro RNA |
| seg | Segundos |
| mL | Mililitro |
| mM | Concentración milimolar |
| ng | Nanogramos |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| qPCR | quantitative PCR (Tiempo Real) |
| RNA | Acido Ribonucleico |
| RNAm | RNA mensajero |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-PCR | Retro Transcripción- PCR |
| pmol | Picomol |
| Taq | Thermus aquaticus (DNA polimerasa) |
| TE | Solución amortiguadora de Tris y EDTA |
| UI | Unidades Internacionales |
| VPH | Virus del papiloma humano |
| UV-Vis | Ultravioleta Visible |
| V | Voltios |
| X | Veces la concentración |
| µg | Microgramo |
| µL | Microlitro |
| µM | Concentración micromolar |
| °C | Grados centígrados |

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Q.C.B. Maribel Montufar Martínez

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 69

Título del estudio:

ANÁLISIS DE MICRORNA Y SUS GENES BLANCO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CÉRVIX.

El CaCU es el tercer cáncer mas diagnosticado y la cuarta causa de muerte a nivel mundial. El virus del papiloma humano (VPH) juega un papel importante en su génesis. Según su potencial oncogénico, los VPHs se clasifican como de alto o bajo riesgo. En años recientes se ha identificado a los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, principalmente, como de alto riesgo, por encontrarse fuertemente asociados al CaCU en más del 95% de los casos.

Durante el proceso de infección por VPH, la actividad o expresión de algunos genes se ve alterada, lo que genera que las células del epitelio cervical adquieran un fenotipo canceroso. Además de la regulación génica existen otros mecanismos de regulación, como lo son las proteínas reguladoras o los RNA reguladores los cuales también sufren alteraciones durante este proceso. De manera específica, la expresión de los microRNAs se ha visto alterada en diversos cánceres y actualmente están siendo estudiados con la posibilidad de usarse como biomarcadores. Los microRNAs (miRNA) son pequeños fragmentos de RNA no codificante de aproximadamente 19 a 22 nucleótidos que regulan la expresión génica a nivel del) del RNA mensajero (RNAm) debido a su unión con la región 3'UTR, resultando una reducida traducción de la proteína o la degradación del RNAm. Recientemente se demostró que la mayoría de los genes humanos se encuentran regulados por miRNAs por lo que se cree que juegan un papel importante en la formación y progresión del cáncer.

En este trabajo se determinaron miRNAs diferencialmente expresados en cuatro líneas celulares de Cáncer de Cérvix y algunos de los resultados se validaron por qCPR. Se realizaron predicciones *in silico* para determinar los genes que estos miRNAs se encontraban regulando y se determinaron perfiles de expresión génica global de las mismas líneas celulares mediante microarreglos. Con todos esta información se obtuvo una lista de 13 miRNAs y sus genes blanco que se encontraron diferencialmente expresados en las líneas celulares. Todos los genes seleccionados participan en procesos biológicos como apoptosis, proliferación, diferenciación y migración celular lo que los hace excelentes candidatos para estar fuertemente involucrados en la progresión del CaCu.

Dra. Rocío Ortiz López
Asesor

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del Cáncer de Cervicouterino (CaCu)

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que produce la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis). La incidencia del cáncer se relaciona directamente con la edad, ya que las personas están más tiempo expuestas a factores causales relacionados con esta enfermedad.(1)

La relación causal entre el alto riesgo del Virus del Papiloma Humano (VPH) y el Cáncer Cervicouterino (CaCu) ha sido bien documentado. Sin embargo, la infección por VPH sola, es insuficiente para inducir la transformación maligna, y otras variaciones genéticas no identificadas del huésped también están involucradas. La identificación de tales alteraciones genéticas es de considerable importancia porque los genes alterados serían dianas candidatos para el tamizaje, diagnóstico y tratamiento de cáncer cervical. Los tumores malignos representan aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios (2).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030,

aumentará un 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, se estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones (3).

El CaCu es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, es el tercer cáncer mas diagnosticado y la cuarta causa de muerte en mujeres, pues se estima que produce alrededor de 275,100 muertes por año. La incidencia en el año 2000 en el mundo fue de 529,800 casos nuevos con un estimado de 370,000 casos en países en vías de desarrollo (4,5).

Entre 95 y 99% de estos casos se encuentra asociado con el VPH y se han identificado al menos 200 tipos, clasificándose en 16 grupos, de los cuales los tipos 16 y 18 son considerados como carcinogénicos y el 31 y 33 como probablemente carcinogénicos. El VPH ha llegado a ser una de las causas más comunes de enfermedad transmitida sexualmente en el mundo (6-8).

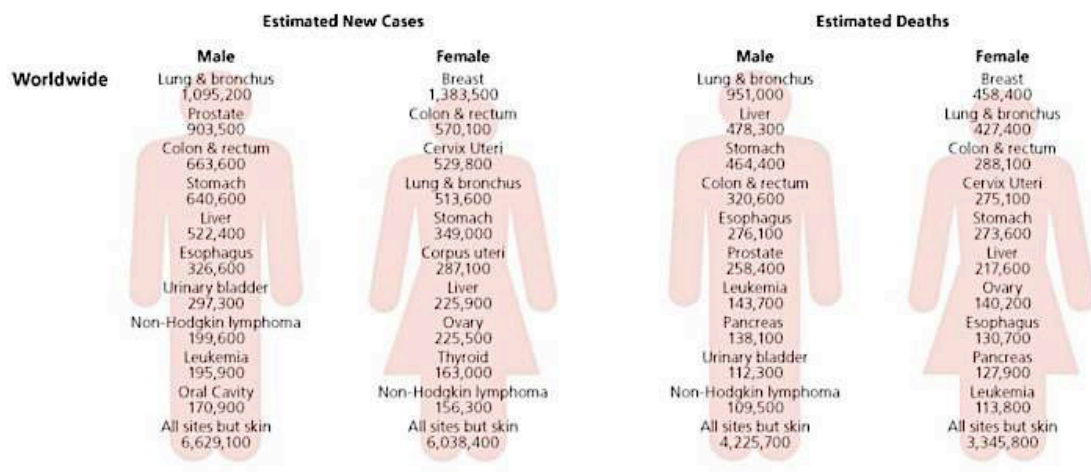


Figura 1. Estimación de casos nuevos y muertes por cáncer a nivel mundial. Fuente: GLOBOCAN 2008.

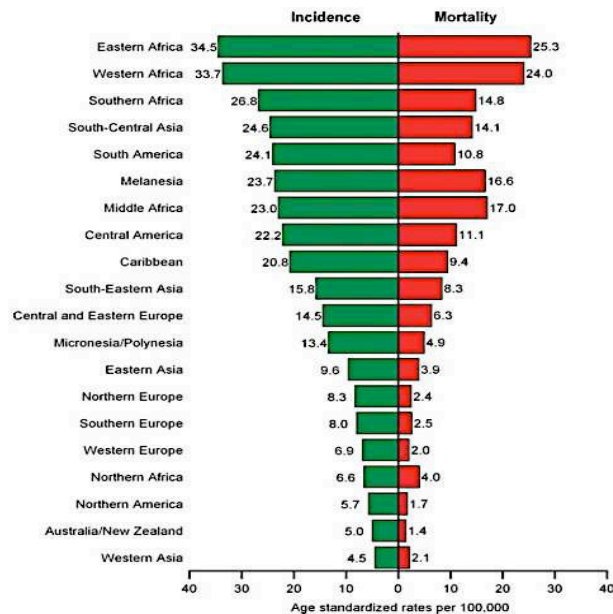


Figura 2. Incidencia y Mortalidad del cáncer Cervicouterino por rango de edades. GLOBOCAN 2008.

En algunos países en desarrollo se tienen datos sobre la incidencia y/o mortalidad, los cuales han registrado una tendencia estable o descendente en la incidencia de CaCu, más debido a los cambios sociodemográficos que a los esfuerzos de detección temprana o prevención (9).

1.2 El VPH y su asociación con el CaCu

El Género *Papillomavirus*, integrado en la Familia *Papillomaviridae*, es un grupo de virus ampliamente distribuido en la naturaleza e infecta a la mayoría de los mamíferos y aves. Dentro de esta Familia, el VPH presenta una creciente importancia en Salud Pública, fundamentalmente por su asociación con el cáncer de cérvix (10).

El VPH es un virus de ADN circular bicatenario, sus partículas virales tienen un diámetro de 52 a 55nm y un coeficiente de sedimentación de 300 S. La cápside viral es icosaédrica y está organizada en 72 capsómeros. Cada uno de estos capsómeros está constituido por dos proteínas estructurales, ambas codificadas por el virus, la proteína mayor L1, que tiene un peso molecular de 55Kd y representa el 80% del total de la cápside y la proteína menor L2, que está en menor proporción que L1 y tiene un peso molecular de aproximadamente de 75Kd.

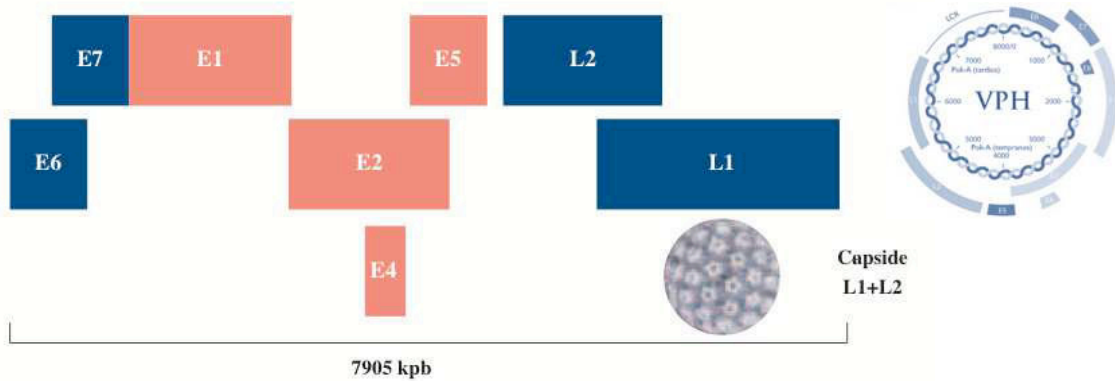


Figura 3. Genoma del VPH. Los genes E “early” están implicados en la replicación viral (E1 y E2), control transcripcional de la expresión genética (E2), regulación del ciclo celular (E6, E7 y E4) y evasión de la respuesta inmune (E5). Los genes L “late” codifican las proteínas de la cápside viral: L1 es la mayor que se autoensambla configurando pentámeros, y L2 es la menor que se dispone en el centro de dichos pentámeros. *Fuente: Stanley et al. 2004*

Actualmente se conocen más de 200 tipos de VPH, algunos pueden infectar la piel como pueden ser manos y pies, otros la mucosa como es el epitelio genital, mucosa oral, el tracto respiratorio y la conjuntiva (11). El VPH ha sido asociado a una variedad de condiciones clínicas, desde lesiones inocuas hasta cáncer (Tabla 1) .

| <i>Tipo viral</i> | <i>Tipos de VPH</i> | | <i>Enfermedades asociadas</i> |
|---|--|--|---|
| | <i>Vacuna</i> | <i>No vacuna</i> | |
| Cutaneos Bajo riesgo Alto riesgo | | | Verrugas plantares y cutaneas. Epidermodisplasia verruciforme. |
| Mucosos/Cutaneos Bajo riesgo | 6 11 >90% de los condilomas | 42, 43, 44, 55+ | Condilomas acuminados. Papilomatosis laríngea. Tumor de Buschke-Loewenstein. |
| Alto riesgo | 16, 18 >70% de los cánceres cervicales | 31, 33, 45 26, 35, 39, 51, 55 52, 56, 58, 59, 66, 68 | Verrugas planas, enfermedad de Bowen. Displasia y carcinoma cervical. Carcinoma de pene, vulva, vagina, ano y orofaríngea. |

Tabla 1. Tipos de VPH y sus manifestaciones clínicas

El análisis de los genotipos de VPH resulta importante por distintas razones, dentro de éstas se encuentra que los VPH son tejido específicos y en general producen diferentes tipos de lesiones. Cerca de 35 tipos de VPH se identifican en lesiones benignas y malignas tanto en hombres como en mujeres en la región anogenital, vagina, vulva y pene e incluso cavidad bucal, pero con una fracción atribuible considerablemente menor a la del CaCu (12).

La presencia de VPH también se ha correlacionado con otros tumores como el carcinoma escamoso de la conjuntiva, vejiga y uretra, pulmón, retina, mama, próstata, ovario y endometrio. Sin embargo, el papel del VPH en estos tumores es muy controvertido (13).

Las mujeres sexualmente activas, de cualquier edad, pueden infectarse con VPHs oncogénicos, Sin embargo, el CaCu invasor en mujeres jóvenes infectadas con virus oncogénicos es raro y la prevalencia de VPH en mujeres de 40 años o mayores no se correlaciona con la alta tasa de cáncer cervical. Es

la persistencia de VPHs oncogénicos lo que da lugar al desarrollo de lesiones precancerosas y potencialmente al cáncer invasor, lo que puede llevar varios años para su desarrollo (14).

El VPH tipo 16 es el mas prevalente de los VPHs oncogénicos, responsable de mas de la mitad de los tumores, mientras que el Papilomavirus tipo 18 esta involucrado en el 20% de los mismos (15). Son pocos los tipos de VPH que contribuyen a las infecciones en el tracto anogenital y que generalmente se encuentran tanto en personas asintomáticos como en pacientes con cáncer.

Se propone que además de los tipos 16 y 18, los VPH- 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 deben de ser considerados oncogénicos (carcinogénicos) o tipos de “alto-riesgo”; mientras que los tipos 26, 53 y 56 son “probablemente de alto-riesgo”.

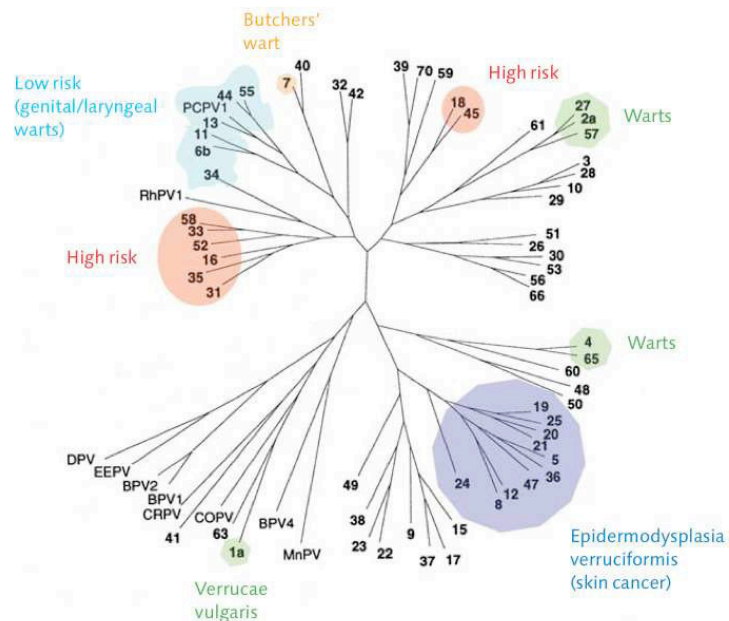


Figura 4. El árbol familiar del Papilomavirus. Mas de 100 tipos de VPH han sido descritos, la mayoría causan lesiones benignas como los son las verrugas. Alrededor de las tercera parte de los tipos de VPH infectan el epitelio genital. Los VPHs de alto riesgo además de ser agentes causales del cáncer de cérvix se ha visto implicado en el desarrollo de canceres no genitales ya que se ha encontrado ADN viral en lesiones malignas de piel y orofaringe. N.J. Maitland, modified from HPV website (<http://hpv-web.lanl.gov>)

1.3 Mecanismo de Infección del VPH

La infección por VPH ocurre a través de micro abrasiones en el epitelio, que expone a las células de la capa basal a la entrada de las partículas virales. Una vez en el interior, el ciclo del virus está íntimamente unido al programa de diferenciación de las células y aprovechando la maquinaria celular se replica y se propaga. Se puede hablar de infección productiva, cuando el virus expresa los genes tempranos en las capas basal y parabasal y los genes tardíos en las capas suprabasales, de manera paralela a la maduración del epitelio cervical dando lugar a la producción de partículas infecciosas; y de infección latente (persistente) cuando el virus permanece en el núcleo de las células de la capa basal replicándose como un plásmido multicopia estable (episoma) pero sin la producción de virus infeccioso. Sólo bajo la influencia de ciertos factores endógenos y exógenos (inmunodepresión local o general) no demasiado conocidos todavía, esta latencia evoluciona a infección productiva (16).

Después de la infección, los genes tempranos del VPH son expresados a la par de que las células se diferencian. A partir de un promotor temprano (PE) se generan las proteínas virales tempranas: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 que son proteínas no estructurales, relacionadas con el control de la replicación, la transcripción y la expresión genética del virus. Su expresión está estrechamente regulada tanto por factores celulares específicos de tejido, como por las propias proteínas virales. Mientras tanto, en las capas superiores del epitelio los genes tardíos se expresan en las células diferenciadas, a partir de un promotor tardío

(PL) para sintetizar las proteínas estructurales de la cápside viral. L1 y L2 encapsidan los genomas virales para formar viriones los cuales se liberan de la célula, de esta manera el virus puede iniciar una nueva infección (17). Los Papilomavirus son muy específicos de las especies que infectan y tienen un tropismo muy definido por las células del tejido epitelial estratificado queratinizado. Dependiendo del tipo de VPH que infecte el epitelio, se pueden producir lesiones de bajo grado o alto grado. Las lesiones sin tratar progresan a cáncer invasivo o microinvasivo y está asociado con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped, con la pérdida asociada o la interrupción de E2 y la sobre expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (19).

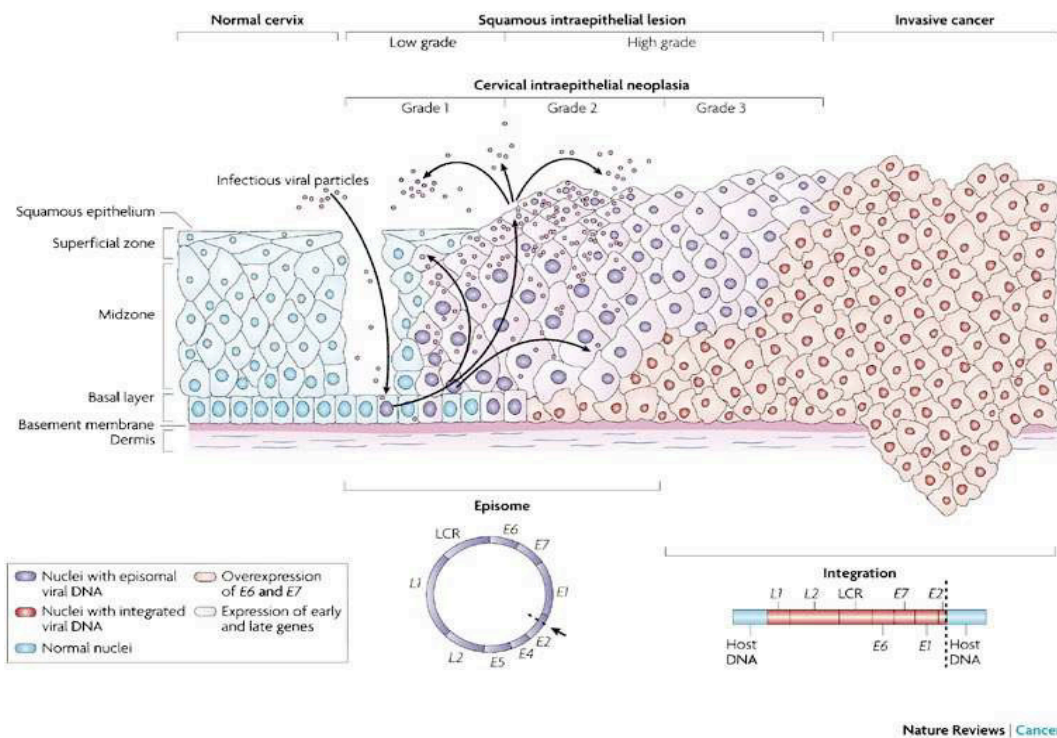
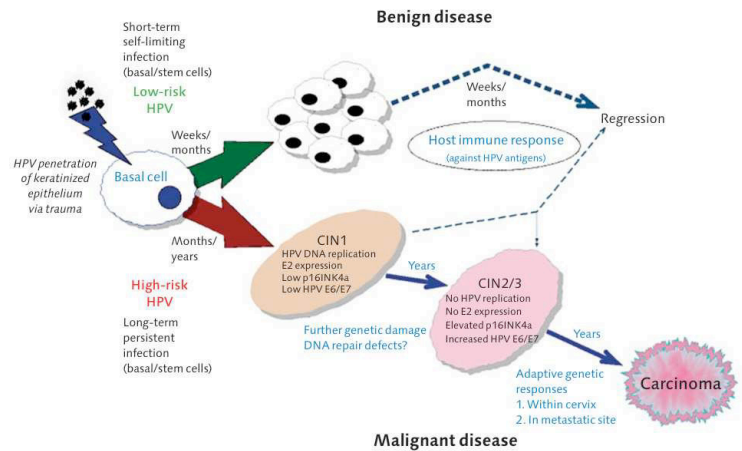


Figura 5. Mecanismo de infección del Virus del Papiloma Humano (VPH)

Figura 6. Desarrollo del cáncer Cervicouterino.

Las infecciones del epitelio genital con un virus de bajo riesgo resulta a corto plazo una infección limitada con lesiones benignas que eventualmente desaparecen. Las infecciones con VPH de alto riesgo pueden desarrollar lesiones precancerosas CIN1 y CIN2. La integración del genoma viral y la consecuente desregulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7 acompañados de la acumulación de daño genético permite la progresión de las lesiones malignas en un periodo de años.

N.J. Maitland



Durante el proceso de infección por VPH, la actividad o expresión de algunos genes se ve alterada, lo que genera que las células del epitelio cervical adquieran un fenotipo canceroso. En la transición hacia el estadio CIN1, se altera la expresión de los genes de proliferación celular y supresión que además generan una respuesta inmunológica que detectable. Más tarde, cuando las células del epitelio cervical pasan al estadio CIN2, se altera la expresión de los genes encargados de desencadenar la angiogénesis modificando también las características normales del epitelio. Finalmente, es evidente como la actividad de los genes involucrados en invasión se alteran en el estadio CIN3 (18).

Además de la regulación génica existen otros mecanismos de regulación, como lo son las proteínas reguladoras o los RNA reguladores los cuales también sufren alteraciones durante este proceso. De manera específica, la expresión de los microRNAs se ha visto alterada en diversos cánceres y actualmente están siendo estudiados con la posibilidad de usarse como biomarcadores. (19).

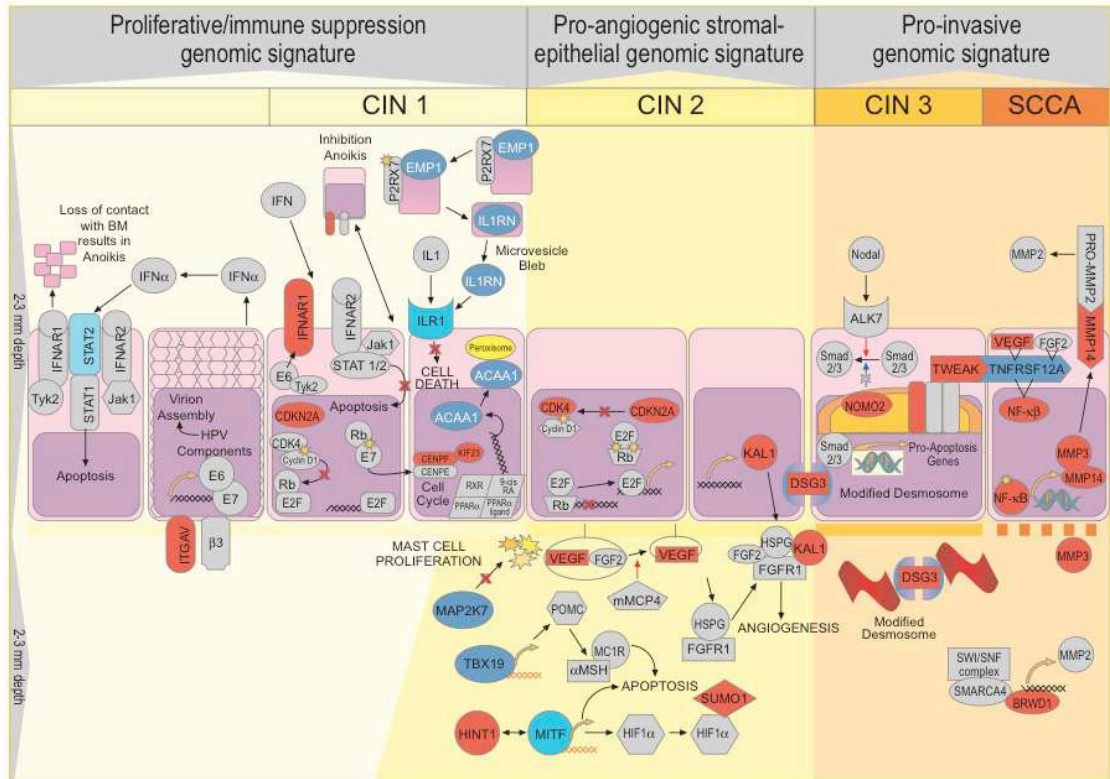


Figura 7. Mecanismo de regulación celular en CaCu

1.4 Diagnóstico

La prueba citológica de Papanicolaou sigue dando la pauta para el diagnóstico de lesiones cervicales precancerosas y/o la detección del carcinoma invasor, al igual que técnicas complementarias como colposcopia, biopsia, tipificación viral e inmunohistoquímica (20).

La mayor parte de los métodos de identificación directa de infección por VPH están basados en la detección del genoma del virus. De manera ideal, un método para la detección del ADN de VPH debe ser capaz de detectar, identificar y cuantificar la presencia de múltiples tipos de VPH. Debe además ser un método

que pueda realizarse con facilidad, alta reproducibilidad y elevada especificidad y sensibilidad. Actualmente, la tecnología disponible para la detección molecular del ADN viral, consiste en sistemas de hibridación directa en soporte sólido (hibridación in situ, Southern blotting), hibridación en soporte líquido (captura de híbridos) y los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos sintéticos específicos y/o consenso para su aplicación en métodos caseros y comerciales (21).

El método de captura de híbridos, comercializado por la empresa Digene Corporation, utiliza la metodología Hybrid Capture® que está disponible en dos formatos. El formato hc2 HPV DNA Test incluye dos mezclas de sondas, una para la detección de 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) y otra para la detección de 5 tipos de bajo riesgo (6, 11, 42, 43, 44). El ensayo puede realizarse con la sonda de bajo riesgo y/o de alto riesgo. Por otro lado, el formato hc2 High Risk DNA Test incluye sólo la mezcla de sondas para la detección de los 13 tipos de VPH de alto riesgo. Este método ha sido aprobado por la FDA en el 2003. La sensibilidad de la técnica es de 1pg de ADN de VPH-16 clonado por ml de muestra, lo que equivale a 100.000 copias por ml de muestra ó 5.000 copias por ensayo. El límite de detección para los dieciocho tipos de VPH incluidos en las sondas de alto y bajo riesgo, según las instrucciones del fabricante, varía entre 0,62-1,39pg por ml de muestra, con un valor promedio de 1,09 equivalente a 109.000 copias (22).

Los sistemas de PCR se diferencian según el diseño del sistema de amplificación, en función de que detecten tipos específicos, o bien aquellos capaces de

identificar un amplio número de tipos, denominados de amplio espectro. Las PCR específicas de tipo, utilizan cebadores que han sido diseñados para detectar un tipo determinado de VPH, por consiguiente, la detección de diferentes tipos implica la realización de múltiples reacciones de PCR. Los diseños de PCR múltiple (múltiples cebadores específicos de tipo en una única reacción) simplifican la realización de la técnica, pero la estandarización del método suele ser complejo. Los sistemas de PCR de amplio espectro, son los más utilizados en la detección de VPH y la mayoría están diseñados en la región L1, dado que es una de las regiones más conservadas dentro del genoma de los VPHs. La determinación de la carga viral se ha convertido en una necesidad debido a que los diferentes estudios realizados indican que un alto número de copias de ADN viral, o al menos de VPH del tipo 16, está relacionado con el incremento en el riesgo del desarrollo de una lesión cervical asociada a VPH. Actualmente, no existe un consenso sobre cuál de los métodos disponibles es el más exacto para la cuantificación de ADN viral en una muestra, pero la metodología que se desarrolla con mayor rapidez y tiene importantes ventajas frente al resto es el método de PCR en tiempo real.(19)

Detección de anticuerpos

Los métodos serológicos de VPH no se utilizan en el diagnóstico habitual. Hasta el momento no hay ningún método comercial validado. Las limitaciones de los métodos serológicos en el estudio de la infección por VPH, desde el punto de vista clínico, están asociadas con la gran variedad de tipos, con las reacciones cruzadas que existen entre diversos tipos y la respuesta inmunológica variable (la ausencia de anticuerpos no implica, como en otras infecciones víricas, la ausencia

de infección).

Hasta el momento, todos los métodos serológicos descritos son de diseño casero y se realizan en un número limitado de laboratorios. Algunos de estos ensayos se basan en la utilización de “virus-like particles” (VLPs), partículas originadas por el autoensamblaje de la proteína L1 ó L1/L2, que sirven como antígeno unido a soportes sólidos para detectar los anticuerpos presentes en el suero frente a las proteínas estructurales. Otra estrategia establece el uso de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos de VPH, como antígenos. La técnica ELISA con antígenos VLP es específica de tipo y la más frecuentemente utilizada. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica varía en función del antígeno y el protocolo utilizado (23).

El desarrollo de nuevos métodos en formato múltiple (Luminex), es una tecnología que permitirá la detección de anticuerpos frente a diferentes tipos de VPH simultáneamente. Asimismo, se han desarrollado sistemas de detección de anticuerpos neutralizantes, basados en técnicas de cultivos celulares y biología molecular (24).

1.5 El papel de los microRNAs en la regulación celular

1.5.1 ¿Qué son los microRNAs?

El Proyecto del Genoma Humano reveló aproximadamente 25.000 genes que codifican proteínas en el año 2004. Mientras que las funciones biológicas son mediadas principalmente por estas proteínas, la activación de mecanismos a menudo se requieren para la función celular adecuada, sin embargo hay varios obstáculos normativos a la transcripción de genes y la traducción. Es bien establecido que hay factores de transcripción que juega un papel importante en la activación de genes mediante la interacción con la región 5' no traducida (5'UTR) del ARN mensajero (ARNm). Curiosamente y, más recientemente, la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA también se ha encontrado que es importante en el control traduccional. Las secuencias conocidas como microRNAs (miRNAs) han sido descubiertas como reguladores de la eficacia de la traducción. (27)

Los microRNAs (miRNA) son pequeños fragmentos de RNA no codificante de aproximadamente 19 a 22 nucleótidos que regulan la expresión génica principalmente por la orientación de la región 3' no traducida (3'UTR) del RNA mensajero (RNAm), resultando una reducida traducción de la proteína o la degradación del RNAm. Los miRNAs son muy importantes en la formación y progresión del cáncer. Recientemente se demostró que la mayoría de todos los genes humanos están bajo el control de miRNAs. Los miRNAs contienen un tramo corto de 6-8 nucleótidos en su extremo 5', complementarios al RNAm diana. La

complementariedad entre un miRNA y su secuencia diana es accesible al análisis computacional, y múltiples algoritmos se han desarrollado para predecir los genes miRNA diana (26).

De acuerdo al tamizaje genómico de más de 200 miRNAs, más de la mitad estaban relacionados en la transcripción de proteínas o ARN no codificantes (ncRNA) (27). Más concretamente, el 40% de los miRNAs analizados se encuentran en los intrones transcritos de RNA que codifican a proteínas, mientras que el 10% de se encontró en intrones de transcritos de ncRNA. Además, el 10% de los genes miRNA se solapan con los exones de ncRNA, lo que sugiere una mayor complejidad en la maduración de miRNAs.(28)

Además de miRNA intrónicos y exónicos, algunos miRNAs se encontraron también entre los genes. Muchos de estos miRNAs intergénicos son agrupados en el genoma. Múltiples miRNAs separados por un máximo de 10kb se transcriben juntos en una transcripción (29). Para los miRNAs intergénicos, ha habido informes de motivos de unión a caja TATA rio arriba de los genes miRNA (30). Tener sus propios elementos de transcripción sugiere que los miRNAs pueden ser transcritos independientemente, lo que requiere el reclutamiento de factores de transcripción. Estudios recientes han descrito la implicación de varios factores de transcripción, tales como myc y p53, en la regulación de la expresión de miRNAs (31).

1.5.2 Biogénesis de los microRNAs

La ARN polimerasa II es la primera enzima que se cree que es responsable en la transcripción de los genes primarios de miRNA (pri-miRNA) (33). Algunos miRNAs humanos, que están rodeadas por repeticiones Alu, los cuales se han encontrado que son transcritos por la ARN transcriptasa III en lugar de la II (34). Estos transcritos que contienen pri-miRNA puede ser de varias kilobases de largo, y también tienen una brecha 5' 7-metilguanósina y una cola 3' poliadenilada similar al convencional RNA mensajero (RNAm). (34)

Los transcritos de pri-miRNA deben ser escindidos y empalmados durante la maduración de los miRNAs para formar miRNAs maduros. Los pri-miRNAs se transforma primero en un miRNA precursor de unos 70 nucleótidos de largo.

En el interior del núcleo, los pri-miRNA son escindidos por un microprocesador miRNA compuesto de Drosha y DGCR8 (Pasha). Drosha es una endonucleasa RNasa III que realiza la escisión a través de su dominio de la RNasa III (35). Para que el microprocesador reconozca el pri-miRNA, la conservación de la estructura del tallo de la horquilla pri-miRNA es esencial. Se ha reportado que Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el tallo bloquean el proceso adecuado de Drosha (36). DGCR8 funciona como una regla molecular que permite a Drosha cortar en una posición precisa para formar el miRNA precursor (pre-miRNA).

Después del procesamiento nuclear, el miRNA precursor se transporta hacia el citoplasma a través de la Exportina-5 [38]. La Exportina-5 reconoce miRNA precursor no por su secuencia, si no por su tallo y horquilla característica saliente 3' (38). Estos requerimientos de reconocimiento permiten el transporte de miRNAs

precursores correctamente procesados solamente. Con la unión de alta afinidad de la Exportina-5 al precursor miRNA se protege tan pronto como se procesa por Drosha (39).

Una vez dentro del citoplasma, el pre-miRNA se procesa adicionalmente generando miRNA de doble cadena, la composición de una hebra maduro y una cadena complementaria. Este procesamiento es llevado a cabo por otra endonucleasa RNasa III, Dicer (40). Dicer tiene una PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) de dominio, que se une preferentemente a la saliente 3' de RNA monocatenario (41). La distancia entre su dominio PAZ y dos dominios RNasa III es 65 angstroms, que es aproximadamente 25 nucleótidos de longitud de acuerdo con el análisis de la estructura cristalina. Por lo tanto, después de excisión de bucle terminal el pre-miRNA, de doble hebra es de aproximadamente 22-25 nucleótidos de longitud con 2 nucleótidos salientes en cada lado 3' (41,42).

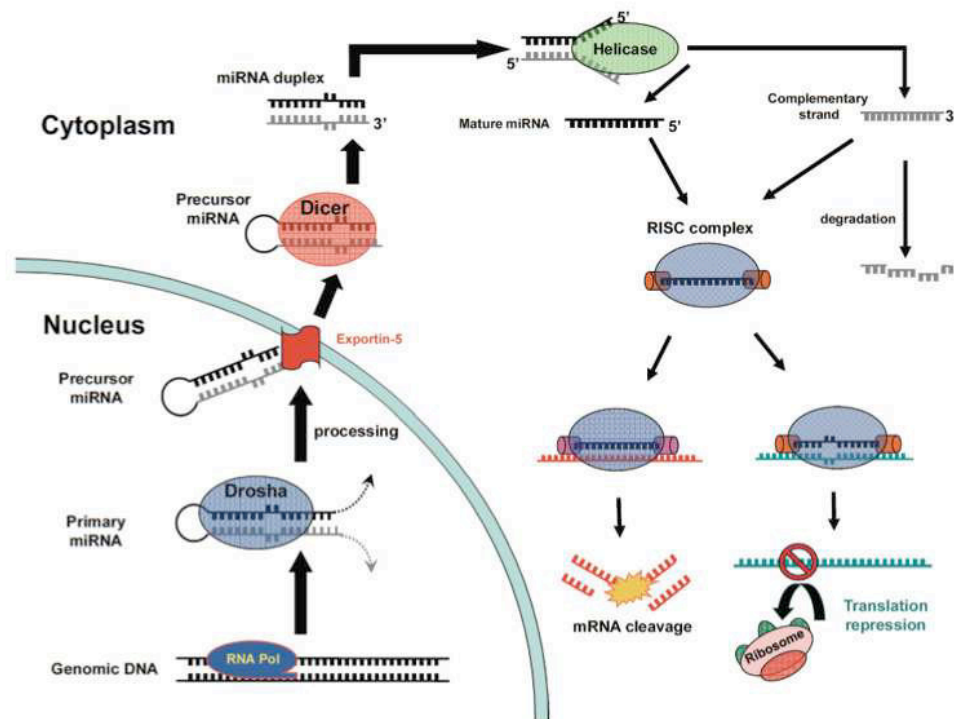


Figura 8. Biogénesis de los microRNAs

La subexpresión de Dicer reduce en gran medida la maduración de los miRNAs (43). La delección de Dicer en ratones es letal en el desarrollo temprano (44).

Este resultado demuestra la importancia de miRNAs en mantener la población de células madre embrionarias, y ha dado lugar a otros estudios sobre la función de los genes miRNA en células embrionarias (45).

A raíz de la escisión por Dicer, un dúplex miRNA pequeño se forma. Dicer y sus proteínas asociadas TRBP o PACT disocian el dúplex miRNA. Sin embargo, sólo una hebra del dúplex miRNA actuará como la hebra guía, la otra hebra del dúplex se refiere como la cadena complementaria y se degrada posteriormente. El mecanismo de esta asimetría en hebra selección sigue siendo poco clara (46), pero se sospecha que la selección hebra está determinada por un complejo de ribonucleoproteína llamada complejo de silenciamiento de RNA inducido (RISC). RISC es compuesto de Dicer, TRBP para RNA vinculante, y Argonata2 (Ago2) para la actividad catalítica (47). Ago2 parece pertenecer la capacidad de eliminar por cadenas complementarias para hacer un corte en la hebra endonucleolítica pasajera (48). La degradación de la hebra de pasajera facilita la carga de la hebra guía y la activación de RISC. En experimentos de reconstitución in vitro han demostrado que no hay chaperones o cofactores distintos de los mecanismos básicos son necesarios para la formación de RISC (49). Dicer, TRBP y Ago2 son los componentes básicos necesarios para el procesamiento de miRNA y su funcionamiento. Sin embargo, helicasas particulares pueden estar implicados en la facilitación de desenrollado de miRNAs específicos.

1.5.3 Función de los microRNAs

Los miRNAs son actualmente bien reconocidos por su importante rol en muchos procesos biológicos (50). Han cobrado gran importancia como reguladores clave de la expresión génica, jugando un papel crítico en procesos como angiogénesis, enfermedades vasculares y tumorigénesis. Sin embargo, la función de la mayoría de los miRNAs aún se desconoce.

La degradación del mRNA puede ser iniciada por desadenilación (51), además del corte de secuencias específicas por ribonucleasas 1 (PMR-1) que también puede ocurrir (52).

En general, la degradación del mRNA usualmente comienza con la desadenilación del extremo 3' siguiendo con la degradación de el extremo polieadenilado dejando expuesto el extremo 5' para degradación exonucleotica. Alternativamente los mRNA desadenilados pueden ser degradados de 3' a 5' mediante exonucleasas citoplasmáticas. Los miRNAs maduros eventualmente son transferidos a la Argonauta 2 y guiados hacia la actividad de RISC, donde para regular la traducción los miRNAs se unen con sus sitios diana en la región 3' UTR del mRNA (53). Se ha reportado que la represión transaccional también puede ocurrir aun y cuando el sitio diana se encuentre en la región 5'UTR del mRNA (54).

Sin embargo, el mecanismo detallado de cómo los miRNAs reprimen la traducción del mRNA aun no se conoce con claridad. Los resultados de diferentes estudios a veces son contradictorios debido a que su conducta es diferente dependiendo de la especie.

1.6 Antecedentes particulares.

1.6.1 Los microRNAs como biomarcadores de cáncer.

En enero de 2010, 721 miRNAs humanos habían sido identificados. A pesar del número relativamente pequeño de miRNAs, estudios experimentales y computacionales, han demostrado que muchos genes humanos están regulados por miRNAs de manera colectiva. Los miRNAs son considerados por ser reguladores maestros de muchos procesos biológicos importantes, tales como el crecimiento celular, la apoptosis, la infección viral y el desarrollo del cáncer. Estudios amplios del genoma (GWAS) indican que aproximadamente la mitad de los genes miRNA se encuentran en sitios frágiles y regiones genómicas con expresión frecuentemente desregulado en el cáncer (55)

Firmas de expresión de miRNA han demostrado ser prometedores biomarcadores para la clasificación o predicción de los resultados de una amplia gama de cánceres humanos. Sin embargo, hasta la fecha, el valor pronóstico de miRNAs en el CaCu no se ha investigado. Estudios recientes indican que la expresión de algunos miRNAs se ha alterado en células de cáncer cervical VPH+ y VPH- en comparación con las células de epitelio cervical normales (56).

En los últimos años, las diferencias en el *miRNome* (definido como el complemento completo de microARN en un genoma) se han detectado en los tejidos cervicales normales contra tejidos cervicales patológicos o en los mismos tejidos en diferentes fases de diferenciación.

Estas diferencias se producen con frecuencia en firmas de microRNA tumor-

específico, los cuales, son muy útiles para diagnosticar el origen de la neoplasia y, a veces, también subtipos de tumores específicos. (57)

Esos microRNAs específicos se encuentran con frecuencia en regiones genómicas relacionadas con el cáncer, que incluyen sitios frágiles en o cerca de sitios de integración de VPH así como las regiones comunes de punto de interrupción en o cerca de oncogenes o genes supresores de tumores. Todos los hallazgos indican que los microRNAs desempeñan un papel importante en la carcinogénesis cervical, que van desde la infección por VPH hasta cáncer.

Una mejor comprensión de los diversos microRNA tumor específico en el CaCu no sólo puede revelar el mecanismo novel patogénico de VPH, sino también identificar blancos potenciales tanto para la detección del CaCu, el diagnóstico y la terapia.(58)

Para utilizar los microRNAs como un biomarcador en la clínica, lo cual es crítico para normalizar las pruebas microRNA y hacerlo reproducible en cualquier laboratorio de diagnóstico. En los últimos años, una serie de enfoques de alto rendimiento se han utilizado para la cuantificación de microRNAs en muestras clínicas, como el Northern-blotting, microarreglos, un ensayo invasor modificado, un ensayo basado en perlas de citometría de flujo y PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR).

En términos de precisión y especificidad, la RT-qPCR se ha convertido en una herramienta cada vez más popular en la detección de la expresión de microRNA, ya que puede detectar un bajo número de copias del precursor y del microRNA maduro con una alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, la exactitud del

análisis de expresión de cualquier gen mediante RT-qPCR depende en gran medida de una normalización apropiada. El propósito de la normalización es reducir la variación técnica dentro de un conjunto de datos, lo que permite una mejor apreciación de la variación biológica y la mejora de la reproducibilidad entre los diferentes laboratorios. La selección de microRNA óptimos para la normalización adecuada es crítica en el análisis de datos mediante RT-qPCR.

Los microRNAs representan tal vez sólo el 0,01% de la cantidad masiva del ARN total en una muestra, y esta fracción puede variar significativamente entre diferentes muestras. Además, la eficacia de la extracción de microRNAs de muestras es muy diferente de los ARN más largos. (59)

Además, la expresión de microRNAs es mayor en tejido específico. Por lo tanto, los microRNAs representan un desafío significativo para la normalización, ya que el normalizador(es) no sólo debe reflejar cualquier cambio mayor en la población global de los microRNA, sino también tener propiedades similares de purificación como microRNAs.

Actualmente, existen muy pocos microRNAs de referencia (let-7a, miR-103, miR-16, miR-191, miR-26a, miR23a, snRNA U6, y rRNA 5S), de los cuales solo uno resulto efectivo para el estudio de miRNAs en cáncer de cérvix. Es importante resaltar que la selección adecuada de miRNAs de referencia es un paso crucial en este tipo de estudios, aunque hasta la fecha este tema todavía no se conoce a profundidad (59).

| Gene | Gene summary | Cell function | miRNAs |
|---------------|--|----------------|---|
| <i>AIB1</i> | Amplified in breast cancer 1 | | miR-17-5p |
| <i>AT1R</i> | Angiotensin receptor 1 | Angiogenesis | miR-155 |
| <i>BCL2</i> | B-cell CLL/lymphoma 2 | Apoptosis | miR-21 miR-15a miR-16-1 |
| <i>BCL6</i> | B-cell CLL/lymphoma 6 | Cell cycle | miR-127 |
| <i>E2F1</i> | E2F transcription factor 1 | Cell cycle | miR-17-5p |
| <i>E2F3</i> | E2F transcription factor 3 | Apoptosis | miR-20a |
| <i>FOS</i> | FBJ osteosarcoma virus oncogene homolog | Cell cycle | miR-34a |
| <i>HMGA2</i> | High mobility group AT-hook 2 | | miR-7b <i>let-7</i> family |
| <i>HOXB8</i> | Homeobox B8 | | miR-196a |
| <i>KIT</i> | KIT oncogene | | miR-221 miR-222 miR-146 miR-372 miR-373 |
| <i>LATS2</i> | Large tumour suppressor homolog | Cell cycle | miR-107 miR-233 |
| <i>NFI-A</i> | Nuclear factor I/A | | miR-26a |
| <i>PLAG1</i> | Pleomorphic adenoma gene 1 | Cell cycle | miR-21 |
| <i>PTEN</i> | Phosphatase and tensin homolog | Cell migration | |
| <i>RAS</i> | Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog | | <i>let-7</i> family |
| <i>RB</i> | Retinoblastoma | Cell cycle | miR-106a |
| <i>TCL1</i> | T-cell leukaemia/lymphoma 1A | Apoptosis | miR-29 miR-181 miR-20a |
| <i>TGFBR2</i> | Transforming growth factor-beta receptor 1 | | miR-17-92 |
| <i>TSP1</i> | Thrombospondin 1 | Angiogenesis | |

Tabla 2. MicroRNAs que podrían regular genes relacionados con cáncer. *Human Molecular Genetics*, 2007. Vol. 16, Review issue 1

Hoy en día, los miRNAs están ganando cada vez más importancia como reguladores de la expresión génica. Su capacidad de afectar a las actividades celulares mediante la regulación de la expresión génica hace que sea potencialmente poderoso en la regulación de transformaciones malignas. Un análisis de una serie de tejidos humanos y líneas celulares muestra que el procesamiento pre-miRNAs se reduce en las líneas celulares de cáncer (60). Muchos de estos miRNAs precursores son retenidos en el núcleo, y por lo tanto no se procesan en miRNAs maduros. Este resultado es consistente con la observación de la reducción global de la expresión de miRNAs maduro en los tejidos cancerosos en comparación con su expresión en tejidos normales (61). La baja de expresión Dicer también se ha observado que se producen en algunos tumores (62).

La expresión de miRNAs es diferente en los tumores en comparación con su expresión en tejidos normales. Por ejemplo, la expresión de miR-21, miR-125b, miR-145, miR-155 están claramente desregulados en cáncer de mama confirmado por microarreglos y el Northernblot (65). La desregulación de la expresión de los miRNAs puede ser el resultado de la alteración genética. Se encontró que 53% de los miRNAs se localizan en sitios frágiles, donde son mucho más probable que sea susceptible a la amplificación, deleción o punto de interrupción (65).

1.6.2 Mecanismo de acción de los miRNAs frente al CaCu.

La transformación de la células malignas es un procesos de múltiples pasos donde las células normales adquieren alteraciones genéticas y epigenéticas que contribuyen al crecimiento y sobrevivencia celular (54). Como resultado de estos procesos de transformación las células adquieren crecimiento independiente, así como resistencia a apoptosis.

Estudios recientes han indicado que la expresión de algunos miRNAs está estrechamente relacionada con el desarrollo de cáncer y algunos miRNAs pueden funcionar como oncogenes o supresores tumorales.

Las células cancerosas desarrollan diferentes firmas de expresión de miRNAs que las distinguen de las células normales. Por ejemplo, una disminución general de la expresión de los genes miRNA se informó en los cánceres probablemente debido a la implicación de algunos de ellos en la modulación de la diferenciación celular. La disminución de la expresión de los genes miRNA puede contribuir a la

generación y mantenimiento de las células cancerosas y las células madre tumorales (64). Además, algunos de estos miRNAs puede funcionar como supresores de tumores. Los ejemplos más bien caracterizados son miR-15a y miR-16, que son las reguladas en el 68% de la leucemia linfocítica crónica (65). Sus actividades supresoras son regular negativamente la expresión del factor antiapoptótico BCL2, la subexpresión de miR-15a y la expresión de miR-16 puede aumentar los niveles de BCL2 contribuyendo al aumento de su actividad antiapoptótica (66). Otro supresor tumoral conocido es el let-7 de la familia, su expresión se ha encontrado menor en el tejido pulmonar tumoral que en el tejido pulmonar normal. Let-7 contiene ocho miembros; el análisis computacional sugiere que la mayoría de sus miembros dirigen la subexpresión del proto-oncogen RAS(67).

La angiogénesis es el surgimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Es un fenómeno asociado con varias patologías humanas, incluyendo diversos trastornos oculares que potencialmente causan ceguera, artritis reumatoide y cáncer. La regulación de la angiogénesis por miRNAs no es un hallazgo nuevo, pues se sabe que miR-221 y miR-222 modulan las propiedades angiogénicas de vena umbilical humana células endoteliales (70), de hecho un número de miRNAs se ha encontrado que se expresa abundantemente en la angiogénesis asociada a las células endoteliales. Un ejemplo es la orientación de c-kit, un receptor tirosina quinasa que se une al factor de células madre y media la expresión de VEGF, por MIR-221 y miR-222 (71). La transfección de miR-221/222 reprime la expresión de c-kit sin cambiar el nivel de

ARNm. También la inhibición celular endotelial facilitó la formación del tubo. Células endoteliales expresan receptores de VEGF y, por lo tanto, los miRNAs podrían modular la angiogénesis mediante la regulación de la actividad del receptor de VEGF, lo que afecta la migración de células endoteliales y la invasión (70). Además se ha demostrado que Dicer y Drosha, dos enzimas que controlan el proceso de miRNAs, también son importantes en la angiogénesis (71).

Mediante la identificación firmas de miRNAs en la angiogénesis, se podrían identificar nuevos blancos dentro de una vía ó identificar sitios de unión específicos de miRNAs el tratamiento de diversas enfermedades. Este enfoque podría conducir a la identificación de nuevas e innovadoras dianas terapéuticas enfocadas a enfermedades relacionadas con la angiogénesis (72, 73).

Se sugiere que miRNAs puede tener un papel crucial en el desarrollo del cáncer. El exceso de expresión de miRNAs oncogénicos pueden dar lugar a baja regulación de genes supresores de tumores, mientras que en la expresión de miRNAs supresores de tumores puede conducir a la sobre-regulación de oncogenes.

Por lo tanto, estudiar en cáncer Cervicouterino los niveles de expresión de miRNAs y sus genes diana así como sus funciones podría dar a conocer el papel fundamental de los miRNAs en el desarrollo de esta enfermedad.

CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN

Es claro que los microRNAs juegan un papel importante en infecciones virales y tumorigénesis; sin embargo, para el VPH y el Cáncer de Cervicouterino (CaCu) aún no hay datos concluyentes.

Los estudios reportados presentan variabilidad en: tipos de muestras, metodología y miRNAs endógenos que impiden llegar a un consenso en los resultados.

La evaluación de la expresión de miRNAs en diferentes líneas celulares permitiría proponer un modelo de estudio e identificar genes y microRNAs involucrados en este padecimiento.

CAPÍTULO III: OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar microRNAs diferencialmente expresados en líneas celulares de cáncer de cérvix y determinar sus genes blanco.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar mediante microarreglos, los perfiles de expresión de microRNAs y seleccionar un microRNA endógeno para el estudio.
2. A partir de los perfiles de expresión de microRNAs, seleccionar los que se encuentren diferencialmente expresados.
3. Validar mediante qPCR la expresión de los microRNAs previamente seleccionados.
4. Identificar mediante microarreglos, los perfiles de expresión génica global y determinar la expresión de los genes blanco predichos.

CAPÍTULO IV: ESTRATEGIA GENERAL

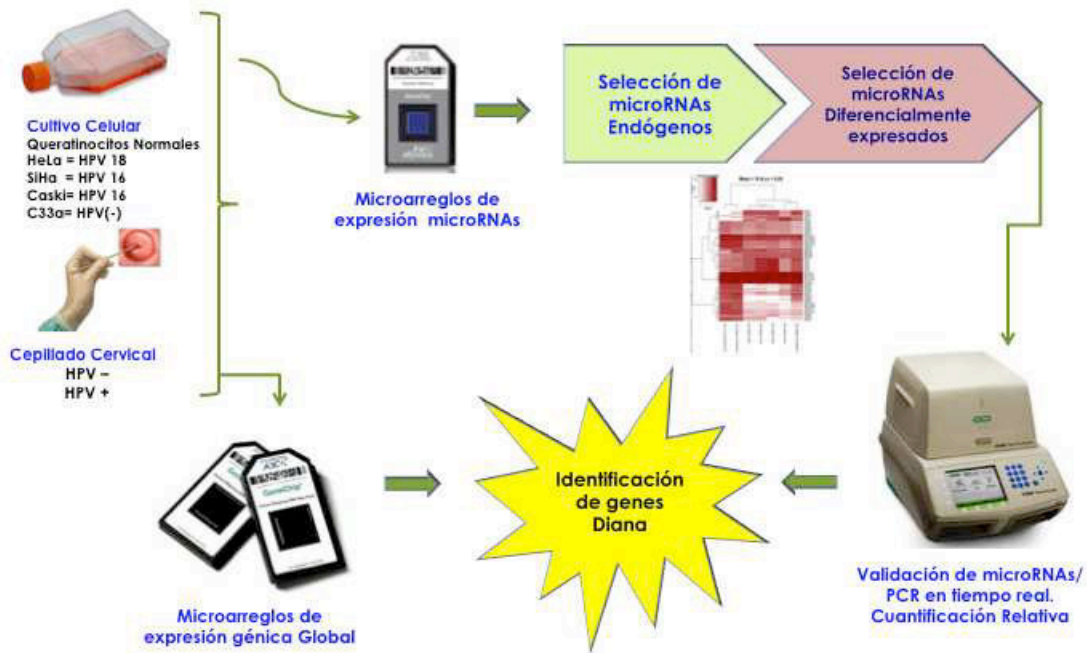


Figura 9. Estrategia general. En esta figura se esquematiza la estrategia que se siguió para llevar a cabo este estudio la cual consta de cuatro partes. La primera consistió en el cultivo, preparación y extracción de RNA de las muestras. La segunda fue determinar los perfiles de expresión de microRNAs mediante microarreglos. La tercera fue validar los resultados por qPCR. La cuarta fue determinar los perfiles de expresión génica global y compararla con los perfiles de microRNAs para determinar los genes diana.

En este estudio se realizó un análisis de microarreglos para determinar la expresión de microRNAs de todas las muestras mencionadas. A partir de los perfiles de expresión obtenidos se determinaron los microRNAs endógenos y los diferencialmente expresados, dichos resultados se validaron mediante PCR en tiempo real.

Posteriormente se realizó un análisis de microarreglos de para determinar los perfiles de expresión génica global de las mismas líneas celulares. Estos resultados se compararon con los perfiles de expresión de microRNAs para poder determinar sus genes Diana.

CAPÍTULO V: MATERIAL Y METODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Reactivos y Consumibles

Para el cultivo celular se utilizaron los medios de cultivo Advanced Dubecco's Modified Eagle (Invitrogen. Carlsbad, CA), Roswell Park Memorial Institute (Invitrogen. Carlsbad, CA), Dermal Cell Basal (ATCC Manassas, VA), Trypsin Neutralizing Solution (ATCC Manassas, VA), Trypsin-EDTA for Primary Cells (ATCC Manassas, VA), Suero Fetal Bovino (Invitrogen), Tripsina 0.25% (Invitrogen), Antibiótico-antimicótico 100X (GIBCO-BRL. Grand Island, NY), L-glutamina 200mM 100X (GIBCO-BRL. Grand Island, NY). Entre los materiales utilizados para cultivo celular se encuentran jeringas de 10 mL estériles desechables, tubos de 15 mL y 50 mL (Corning. Costar City, NY), pipetas serológicas desechables de 5 mL, 10 mL y 50 mL (Corning. Costar City, NY), botellas de cultivo celular de 25 cm², 75 cm² (Corning. Costar City, NY), SDS (Sigma, St. Louis, MO), DMSO (Sigma, St. Louis, MO).

Para el resto de los procedimientos como PCR, extracción de RNA y Microarreglos se utilizó Etanol Absoluto (Merck), Agarosa (BioRad, Hercules, CA), Buffer TBE 10X (BioRad, Hercules, CA), Agua Libre de Nucleasas (Promega, Madison, WI) Puntas para pipeta 0.5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf, Hamburg, DE), Placas 96 (BioRad, Hercules, CA), Films calidad óptica (BioRad, Hercules, CA), Bromuro de etidio (BioRad, Hercules, CA).

5.1.2 Estuches comerciales

MirVana Isolation Kit (Ambion, Austin, TX), Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC, Manassas, VA), GeneChip miRNA 2.0 Array, GeneChip U133 2.0 Array, FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit, 3' IVT Express Kit, GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit, GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA); TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), PCR TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA), Experion RNA Chips (BioRad, Hercules, CA), TaqMan 2× Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA).

5.1.3 Material Biológico

Se utilizaron dos muestras de Muestras de cepillado cervical VPH+ y VPH- de pacientes sin cáncer y las líneas celulares C33a (HTB-31/ATCC. Manassas, VA), SiHa (HTB-35/ATCC. Manassas, VA), Caski (CRL-1550/ATCC. Manassas, VA), HeLa (CCL-2/ATCC. Manassas, VA) y Queratinocitos Normales (PCS-200-011/ATCC. Manassas, VA).

5.1.4 Equipo

Horno de Hibridación, Escáner y GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA), Real Time PCR Detection System CFX96 (BioRad, Hercules, CA), Campana de flujo Laminar Clase II tipo A2 (Labconco, Kansas City, MO), Incubadora de CO₂ Series 8000 WJ (Thermo Scientific, Waltham, MA),

Microscopio Primo Star (Carl Zeiss, Jena, DE), Placa de calentamiento con agitación (Cimarec), Micro centrifuga 5417R (Eppendorf, Hamburg, DE), Termociclador Mastercycler epGradient (Eppendorf, Hamburg, DE), Experion (BioRad, Hercules, CA), Nano Drop 8000 (Thermo Scientific, Waltham, MA), Juego de pipetas Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, DE), GelDoc RX (BioRad, Hercules, CA), Termomixer (Eppendorf, Hamburg, DE), Cámara de electroforesis Sub cell GT y Fuente poder Basic Power Supply (BioRad, Hercules, CA).

5.1.5 Programas computacionales

Affymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC), Affymetrix Expression Console Software (Affymetrix, Santa Clara, CA); Microsoft Excel 2011 for Mac, Mendeley Desktop versión 1.5.2, Mirbase (<http://www.mirbase.org>), TargenScan (<http://www.targetscan.org>), GeneCards (<http://www.genecards.org>).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Lugar donde se realizó el estudio

Este estudio se realizó en la unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS-UANL).

5.2.2 Grupos de estudio

Se estudiaron dos grupos, el primero conformado por dos muestras de cepillado cervical de pacientes recientemente diagnosticadas negativas para CaCu; una de las muestras VPH- y la otra VPH+18. El segundo grupo esta conformado por 5 líneas celulares: **Queratinocitos Normales**: Cultivo primario de Queratinocitos de Epidermis de Adultos. Células epiteliales normales VPH negativo. **Caski**: Células epiteliales Caucásicas de carcinoma de cérvix con metástasis a intestino. Genoma integrado VPH+16, 400-600 copias por célula. **SiHa**: Células epiteliales Africanas de carcinoma escamoso de cérvix grado II. Genoma integrado HPV+16 de 1-2 copias por célula. **HeLa**: Afroamericano, epitelial. Adenocarcinoma de cérvix VPH+18 con 10-50 copias por célula. **C-33A**: Caucásica, epitelial, carcinoma de cérvix VPH negativo.

5.2.3 Cultivo de células SiHa, HeLa y C33a

Se descongeló, de manera individual, un vial con células SiHa, HeLa ó C33a almacenadas a -80 °C. Se adicionó todo el contenido del vial (1 mL) de células SiHa, HeLa ó C33a a una botella de 25 cm² con 4 mL de medio DMEM advanced suplementado con 10% SBF y antibiótico 1X; se incubó a 37 °C y 5% CO₂ por 24hrs. Se retiró el medio y se adicionaron 4 mL de medio DMEM advanced suplementado con 2% SBF y antibiótico 1X; se incubó a 37 °C y 5% CO₂. Cuando el cultivo celular alcanzó un 90% de confluencia, se hizo un subcultivo a una botella de 75 cm² y al alcanzar un 90% de confluencia se

recuperaron las células utilizando 2ml tripsina/EDTA 1x. Finalmente se realizó el conteo de células con azul tripano en cámara de Neubauer.

5.2.4 Cultivo de células Caski

Se descongeló un vial con células Caski almacenadas a -80 °C. Se adicionó todo el contenido del vial (1 mL) a una botella de 25 cm² con 4 mL de medio RPMI suplementado con 10% SBF y antibiótico 1X; se incubó a 37 °C y 5% CO₂ por 24hrs. Se retiró el medio y se adicionaron 4 mL de medio RPMI suplementado con 2% SBF y antibiótico 1X; se incubó a 37 °C y 5% CO₂. Cuando el cultivo celular alcanzó un 90% de confluencia, se hizo un subcultivo a una botella de 75 cm² y al alcanzar un 90% de confluencia se recuperaron las células utilizando 2ml tripsina/EDTA 1x. Finalmente se realizó el conteo de células con azul tripano en cámara de Neubauer.

5.2.5 Cultivo Primario de Queratinocitos

Se descongeló un vial con Queratinocitos almacenados en nitrógeno líquido. Se adicionó todo el contenido del vial (1 mL) a una botella de 25 cm² con 4 mL de Dermal Cell Basal Medium suplementado el Keratinocyte Growth Kit; se incubó a 37 °C y 5% CO₂ por 48hrs. Se retiró el medio y se adicionaron 4 mL de Dermal Cell Basal Medium ,suplementado con el Keratinocyte Growth Kit; se incubó a 37 °C y 5% CO₂. Cuando el cultivo celular alcanzó un 90% de

confluencia, se hizo un subcultivo a una botella de 75 cm² y al alcanzar un 90% de confluencia se recuperaron las células utilizando 2ml Trypsin-EDTA for Primary Cells y Trypsin Neutralizing Solution. Finalmente se realizó el conteo de células con azul tripano en cámara de Neubauer.

5.2.6 Prueba de detección de Mycoplasma

Para esta prueba se utilizó el Universal Mycoplasma Detection Kit y fue realizada en cada una de las líneas celulares con las que se trabajó en este estudio.

Preparación de la muestra: Se utilizaron de 10⁵ – 10⁶ células derivadas de cultivos celulares con 50%-70% de confluencia.

Preparación de PCR:

1. Preparación de Master Mix

| COMPONENTE | Volumen/Reacción |
|-------------------|------------------|
| Universal PCR Mix | 20µl |
| Universal Primers | 2.5µl |
| Volumen total | 22.5µl |

Tabla 3. Preparación de Master Mix

2. Preparación de Reacción de PCR

| COMPONENTE | Muestras | Control Positivo | Control Negativo |
|-----------------------|----------|------------------|------------------|
| Master Mix | 22.5µl | 22.5µl | 22.5µl |
| Muestra | 2.5µl | -- | -- |
| Control Positivo | -- | 2.5µl | -- |
| H ₂ O ó TE | -- | -- | 2.5µl |
| Volumen TOTAL | 25µl | 25µl | 25µl |

Tabla 4. Preparación de reacción de PCR

Procedimiento de Amplificación:

| | | | |
|------------------------|---------------------------------|----------------------|---------------|
| Paso 1 | Desnaturalización 94°C / 1.5min | | |
| Paso 2 | Temperatura | Tiempo (seg.) | Ciclos |
| Desnaturalización | 94 | 30 | 20 |
| Alineación | 70-60.5* | 30 | |
| Elongación | 72 | 45 | |
| Decremento 0.5°C/ciclo | | | |
| Paso 3 | Temperatura | Tiempo (seg.) | Ciclos |
| Desnaturalización | 94 | 30 | 12 |
| Alineación | 60 | 30 | |
| Elongación | 72 | 45 | |
| Paso 4 | 72°C/4min | Hold 4°C | |

Tabla 5. Procedimiento de Amplificación de qPCR

Procedimiento Gel de Electroforesis:

Se preparó un gel de agarosa al 3%. Se mezcló 10 μ l de producto de PCR mas 1.5 μ L de Buffer de carga. Se cargaron muestras y marcador de peso molecular en el gel de agarosa. Se correr el gel hasta que el colorante migró un 70%. Se tiñó el gel con un bromuro de etidio y se observó con luz UV.

5.2.7 Extracción de RNA total.

A partir de un cultivo celular, se recolectaron de 10⁵ a 10⁶ células de cada línea celular en un microtubo de 2ml, se centrifugaron a 13000 rpm durante 10min hasta formar un pellet. Se agregaron 600 μ l de buffer de lisis, se mezcló en vortex y se colocó en hielo por 10min. Parar realizar la extracción

orgánica se agregaron 60µl de Aditivo y se mezcló en vortex. Se agregaron 600µl de Fenol-Cloroformo y se mezcló en vortex por 1min. Se centrifugó a 10000g por 5min y al finalizar se transfirió la fase acuosa a otro microtubo de 2ml. Se agregaron 700µl de etanol al 100% y se transfirieron a un tubo recolector con cartucho de purificación, centrifugó a 10000g por 15seg y se descarto el eluido. Se agregaron 700µl de la solución de lavado 1 a la columna, se centrifugó a 10000g por 15seg y descartar el eluido. Se agregaron 500µl de la solución de lavado 2/3, se centrifugo a 10000g por 5min y se descartó el eluido. Se colocó un tubo nuevo de recolección y se agregó a la columna 100µl de solución de elución precalentada a 90°C, se centrifugó a 10000g por 1min y se descartó la columna.

Inmediatamente se cuantificó el RNA obtenido utilizando el equipo NanoDrop 8000 y se verificó su calidad e integridad mediante electroforesis capilar utilizando el equipo Experion de BioRad.

5.2.8 Microarreglos de expresión de miRNAs

Para llevar a cabo este análisis se requirieron concentraciones de RNA de 500 a 1000ng totales para cada línea celular.

Cola de Poli A

Se ajustó el volumen a 8ul de RNA con agua libre de nucleasas y se colocó en hielo. Se agregaron 2µl de RNA Spike Control Oligos y colocó hielo. Se diluyó el mix de ATP en Tris 1mM (diluyendo el mix de ATP 1:500). Se agregaron las siguientes soluciones a los 10µl de RNA/Spike Control Oligos que se tenían

previamente, para tener un volumen final de 15µl: 1.5µl del Buffer de Reacción 10X, 1.5µl de MnCl₂ 25mM, 1.0µl de Mix de ATP diluido, 1.0µl de Enzima PAP, se mezcló gentilmente. Se incubó a 37°C en un bloque caliente por 15min. Se descartó la dilución sobrante del paso 2.

Ligación y Marcaje con Biotina

Se le dio un spin a los 15µl resultantes del paso 6 y se colocaron en hielo. Se agregaron 4µl del FlashTag Biotin HSR Ligation Mix. Se agregaron 2µl de Ligasa T4 DNA. Se mezcló gentilmente y se dio un spin, se incubó a 25°C por 30min, se detuvo la reacción agregando 2.5µl de HSR Stop Solution. Se mezcló y se dio un spin a los 23.5µl de la muestra ligada y se almacenó a -20°C.

FlashTag HSR: Procedure Overview

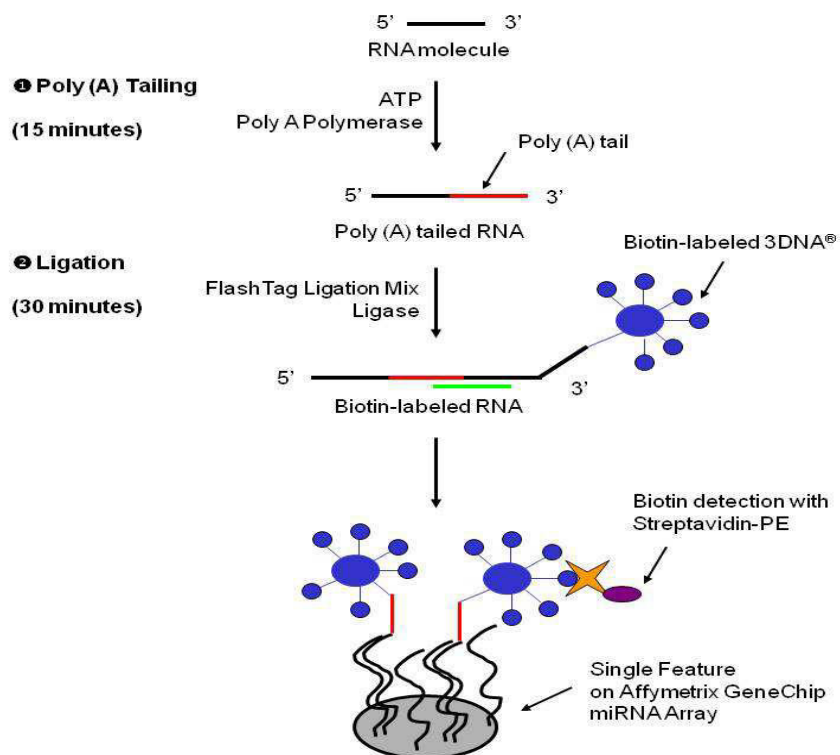


Figura 10. Ligación y marcaje con biotina

Hibridación

Se llevaron a temperatura ambiente los reactivos a utilizar, una vez descongelados, se calentó el Eukaryotic Hybridization Control 20X por 5min a 65°C. Se agregaron las siguientes soluciones a la muestra del paso 7 realizado anteriormente, para preparar el coctel de hibridación: 50µl del Mix de Hibridación 2X, 15µl de Formamida 27.5%, 10µl de DMSO, 5µl de Eukaryotic Hybridization Controls 20X, 1.7µl de Control Oligonucleotide B2, 3nM. El volumen total se incubó por 5min a 99°C y después a 45°C por 5min. Se aspiraron 100µl y se inyectaron al microarreglo. Se removió la puntilla de la septa superior derecha del chip. Se cubrieron las 2 septas con papel adherente para minimizar la evaporación. Se incubaron a 48°C y 60rpm por 16 horas en el horno de hibridación.

Lavado y teñido

Después de las 16 horas de hibridación, se removió el microarreglo del horno. Se removió el papel adherente del microarreglo. Se extrajo el coctel de hibridación del microarreglo y se transfirió a un tubo nuevo para guardarlo. Se almacenó en hielo durante todo el procedimiento o a -80°C a largo plazo. Se llenó cada microarreglo completamente con el Array Holding Buffer. Se dejó que el microarreglo alcanzara la temperatura ambiente antes de lavarlo y teñirlo. Se colocaron los viales en la estación de fluidos de la siguiente manera:

Un vial (ámbar) con 600ul de Stain Cocktail 1 en el porta muestras 1. Un vial (transparente) con 600ul de Stain Cocktail 2 en el porta muestras 2. Un vial (transparente) con 800ul de Array Holding Buffer en el porta muestras 3. Se lavó y teñió el microarreglo en la estación de fluidos utilizando el programa FS450_0003.

Se revisó si había burbujas, en caso de burbujas, se llenó manualmente el microarreglo con el Array Holding Buffer. Si no había burbujas, se cubrieron las 2 septas con el papel adherente, se limpió la superficie de vidrio con un papel libre de polvo (marca Kimwipes) antes de colocarla en el scanner.

5.2.9 Análisis de expresión de miRNAs mediante qPCR

Para este análisis se utilizaron los Taqman MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Preparación de RT-PCR específica para miRNAs

Para cada reacción se agregaron 0.15µl de 100mM dNTPs (with dTTP), 1µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL, 1.5µl de 10× Reverse Transcription Buffer, 0.19µl de RNase Inhibitor, 20 U/µL, 4.16µl de Agua libre de nucleasas, 3µl de RT Primers y 5µl de RNA total. Se mezcló gentilmente, se centrifugó y se incubó en el termociclador bajo el siguiente programa:

| Tiempo | Temperatura |
|---------|-------------|
| 30 min. | 16°C |
| 30 min. | 42°C |
| 5 min. | 85°C |
| ∞ | 4°C |

Tabla 6. Programa de termociclado RT-PCR

Preparación de PCR específica para miRNAs

Para cada reacción se agregó 1µl de TaqMan® Small RNA Assay (20×), 1.33µl de Producto de RT, 10µl de TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2×) y 7.67µl de Agua libre de nucleasas. Se mezcló gentilmente y se procesó en un termocicador de tiempo real. Cada ensayo se realizó por triplicado bajo las siguientes condiciones:

| PASOS | Activación Enzimática | | PCR 40 CICLOS | |
|--------------------|------------------------------|---------|----------------------|---------|
| TEMPERATURA | 50°C | 95°C | 95°C | 60°C |
| TIEMPO | 2 min. | 10 min. | 15 min. | 60 seg. |

Tabla 7. Programa de termociclado de PCR en tiempo Real

Una vez terminada la reacción, se analizaron los resultados de expresión de miRNAs mediante la técnica de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para obtener valores de cuantificación relativa.

5.2.10 Predicción *in silico* de Genes diana

Para llevar a cabo la predicción *in silico* de los genes diana se requirió utilizar bases de datos como miRbase ó Targen Scan, las cuales mediante diversos algoritmos nos dan a conocer los genes que son regulados por determinados microRNAs o viceversa. Específicamente se buscaron genes

diana para los miRNAs que resultaron diferencialmente expresados en el análisis de microarreglos.

5.2.11 Microarreglos de expresión génica global

Este análisis se llevo a cabo utilizando los microarreglos de Affymetrix, específicamente el GeneChip 3' IVT Express Kit, para cada microarreglo se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

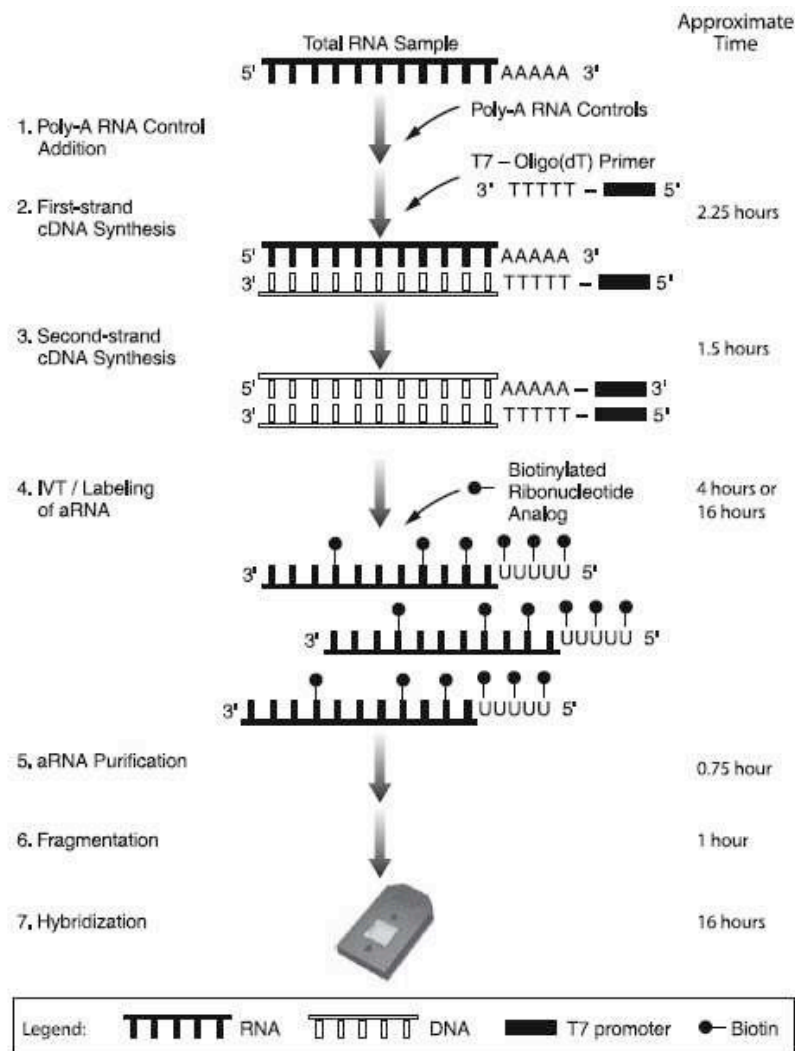


Figura 11. Procedimiento de preparación de microarreglos de expresión global.

Transcripción reversa para Síntesis de Primera cadena de cDNA

Se prepararon las diluciones del Poly-A RNA Control Stock. Se mezclaron 3ul de muestra (RNA 50-500ng) con 2ul de la dilución seleccionada del Poly-A RNA Control. Se mezclaron en vortex los 5ul del paso anterior con 4ul de First-Strand Buffer Mix y 1ul de First-Strand Enzyme Mix. Se incubaron por 2 hours a 42 °C en un termociclador utilizando el programa "First-Strand cDNA Synthesis". Después de la incubación se centrifugó brevemente y se colocó en hielo.

Síntesis de segunda cadena de cDNA

Se preparó el Second-Strand Master Mix agregando: 13ul de agua libre de nucleasas, 5ul de Second-Strand Buffer Mix y 2ul de Second-Strand Enzyme Mix, se mezclaron en vortex, se les dio un spin y se colocaron el hielo. Estos 20ul se mezclaron con los 10ul obtenidos de las síntesis de la primera cadena y se incubaron 1 hora a 60°C seguidos de 10min a 65°C utilizando el programa "Second-Strand cDNA Synthesis"

Transcripción in vitro para síntesis de aRNA marcado

Se preparó el IVT Master Mix con los siguientes componentes: 4ul de IVT Biotin Label, 20ul de IVT Labeling Buffer y 6ul de IVT Enzyme Mix, se mezclaron en vortex y se les dio un spin. Se transfirió el IVT Master Mix al tubo que contiene los 30ul de Second-Strand cDNA, se mezclaron en vortex y se centrifugaron por 5 segundos. Se incubó la reacción de IVT A 40°C por 16 horas en un termociclador. Al término de la incubación se almacenó a -20°C.

Purificación de aRNA

Después de la síntesis, el RNA se purificó para remover enzimas, sales y nucleótidos que no fueron incorporados mediante el siguiente procedimiento:

Se preparó el aRNA Binding Mix añadiendo, 10ul de RNA Binding Beads y 50ml de aRNA Binding Buffer Concentrate, se mezcló en vortex y se añadieron los 60ul de aRNA Binding Mix a la muestra de aRNA del paso anterior. Se transfirió toda la mezcla a una placa de 96 pozos y se añadieron 120ul de etanol al 100%, se mezcló por pipeteo. Para llevar a cabo el RNA Binding Beads capture se colocó la placa en un soporte magnético, se cuidadosamente el sobrenadante. Se retiró la placa del soporte magnético y se agregaron 100ul aRNA Wash Solution, se mezcló por pipeteo, se volvió a colocar la placa sobre el soporte magnético y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Para eluir el aRNA purificado de las perlas, se retiró la placa del soporte magnético, se agregaron 50ul de aRNA Elution Solution precalentado a 60°C, se mezclaron vigorosamente y se volvió a colocar la placa en el soporte magnético. Finalmente se transfirió el aRNA purificado (sobrenadante) a un tubo libre de nucleasas. Se cuantificó la muestra mediante espectroscopia UV-Vis utilizando el equipo NanoDrop8000 y se verificó su calidad mediante electroforesis capilar utilizando el equipo Experion.

Fragmentación de aRNA marcado

Se preparó el mix de fragmentación aRNA agregando: 15ug de aRNA (1-32ul), 8ul de 5x Array Fragmentation Buffer y Agua libre de nucleasas para completar un volumen total 40ul. Se llevó a cabo la reacción de fragmentación incubando

a 94°C por 35 minutos. Se evaluó la integridad del aRNA por electroforesis capilar para asegurarnos que se llevo a cabo la fragmentación y se almaceno a -20°C.

Hibridación de microarreglos

Se preparó el mix de Hibridación agregando 12.5µg (33.3µL) de aRNA Fragmentado, 4.2 µL de Control Oligonucleotide B2 (3nM), 12.5ul de 20X Hybridization Controls, 125µL de 2X Hybridization Mix, 25µL de DMSO, 50µL de agua libre de nucleasas y se calentó a 99°C por 5 minutos en un termociclador. Se lleno un chip (microarreglo) con 200ul de Pre-Hybridization Mix y se incubó a 45 °C por 10 minutos en el horno de hibridación. Se removieron del chip los 200ul del Pre-Hybridization Mix y se relleno con 250ul de mix de Hibridación precalentado, incubó a 45°C por 16 horas en el horno de hibridación.

Lavado y teñido de microarreglos

Después de las 16 horas de hibridación, se removió el microarreglo del horno. Se removió el papel adherente del microarreglo. Se extrajo el coctel de hibridación del microarreglo y se transfirió a un tubo nuevo para guardarlo. Se almacenó en hielo durante todo el procedimiento o a -80°C a largo plazo. Se llenó cada microarreglo completamente con el Array Holding Buffer, se dejó que el microarreglo alcanzara la temperatura ambiente antes de lavarlo y teñirlo. Se colocaron los viales en la estación de fluidos de la siguiente manera: Un vial (ámbar) con 600ul de Stain Cocktail 1 en el porta muestras 1. Un vial (transparente) con 600ul de Stain

Cocktail 2 en el porta muestras 2. Un vial (transparente) con 800ul de Array Holding Buffer en el porta muestras 3.

Se lavó y tiñó el microarreglo en la estación de fluidos utilizando el programa FS450_0001. Se revisó si había burbujas, en caso de burbujas, se llenó manualmente el microarreglo con el Array Holding Buffer. Si no había burbujas, se cubrieron las 2 septas con el papel adherente. Se limpió la superficie de vidrio con un papel libre de polvo (marca Kimwipes) antes de colocarla en el scanner.

5.2.12 Verificación de la expresión de Genes diana predichos.

Se analizó la expresión de los genes predichos utilizando los resultados del análisis de Expresión Génica Global que se llevo a cabo mediante microarreglos. Se utilizaron los valores de Fold Change arrojados para cada gen en cada una de las líneas celulares HeLa, SiHa, Caski y C33a y se compararon con los obtenidos de la línea celular de Queratinocitos, la cual se utilizo como calibrador en este estudio. Finalmente se seleccionaron solo aquellos genes que presentaran una diferencia de Fold Change mayor a 1.5 en comparación con la línea celular calibradora.

5.2.13 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los microarreglos de Expresión de miRNAs y de Expresión Génica Global se realizó la prueba Media Robusta de Multiarreglos (RMA) con la cual se normalizaron los datos, se agruparon en familias, se

determinaron los miRNAs de expresión constante así como los miRNAs y Genes diferencialmente expresados.

Para la validación de la expresión de miRNAs por qPCR se llevó a cabo el análisis de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con el que se determinó la expresión relativa de los mismos y finalmente la prueba T para verificar que la expresión de los miRNAs seleccionados fuera diferente en las líneas HeLa, SiHa Caski y C33a comparadas con los Queratinocitos Normales (calibrador).

CAPÍTULO VI: RESULTADOS

6.1 Análisis de la calidad del RNA total

La extracción y purificación de RNA total se realizó utilizando el MirVana Isolation Kit, a continuación se muestran los resultados de cuantificación y calidad de las muestras.

| RNA | ng/μl |
|----------------|-------|
| Queratinocitos | 187.8 |
| C33A | 179.6 |
| HeLa | 210.4 |
| SiHa | 162.7 |
| Caski | 190.6 |
| Cervix HPV- | 86.5 |
| Cervix HPV+ | 90.2 |

Tabla X. RNA obtenido de las líneas celulares y muestras, cuantificadas por UV-Vis (NanoDrop)

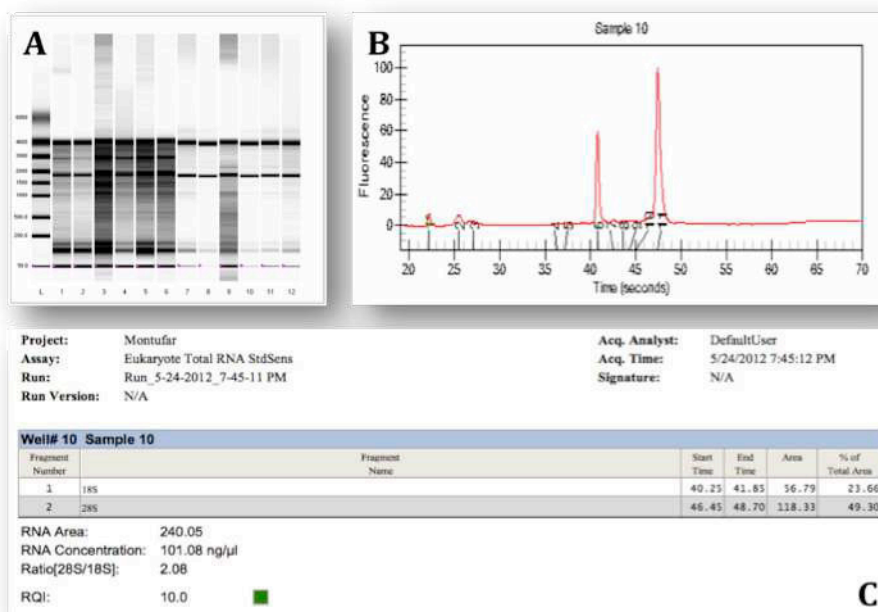


Figura 12. Calidad de RNA. A) Gel virtual de la electroforesis capilar donde se muestra la integridad del RNA B) Electroferograma donde se pueden apreciar 2 picos que corresponden al RNA 18s y 28s. C) Reporte final emitido por el software donde se muestran datos del Electroferograma y el valor RQI..

6.2 Prueba de Mycoplasma

A continuación se muestra un gel de agarosa con los resultados de la prueba de Mycoplasma, el cual fue realizado para todas las Líneas celulares utilizadas y donde se observa claramente que todas las líneas resultaron negativas.

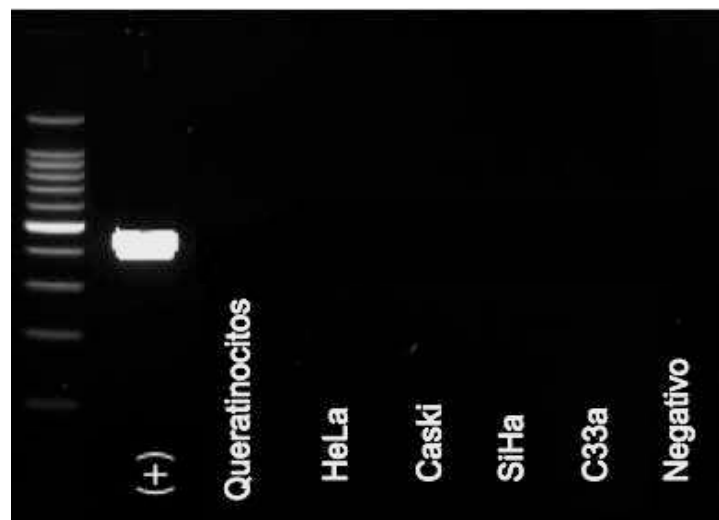


Figura 13. Gel de agarosa al 3% donde se observan los resultados de la prueba de Mycoplasma. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (100 pb), en el segundo el control positivo donde se observa una banda de 464 pb y el resto de los carriles muestra los resultados de las líneas celulares y el control negativo.

6.3 Descripción general de la expresión de miRNAs en los grupos de estudio.

Utilizando la prueba estadística de RMA para el análisis de microarreglos, se analizó la expresión de los miRNAs en los grupos de estudio y con base en los resultados fue posible agruparlos en familias.

Se genero primeramente un mapa de calor con los resultados de expresión de miRNAs de las líneas celulares Queratinocitos Normales, C33a, HeLa, SiHa, Caski y las muestras de pacientes VPH- y VPH+.

En segunda instancia se genero una gráfica de puntos también generada con los valores de expresión de cada uno de los miRNAs analizados en el microarreglo y claramente se pueden observar en las dos graficas dos familias, una perteneciente a las líneas celulares y la otra a las muestras de pacientes.

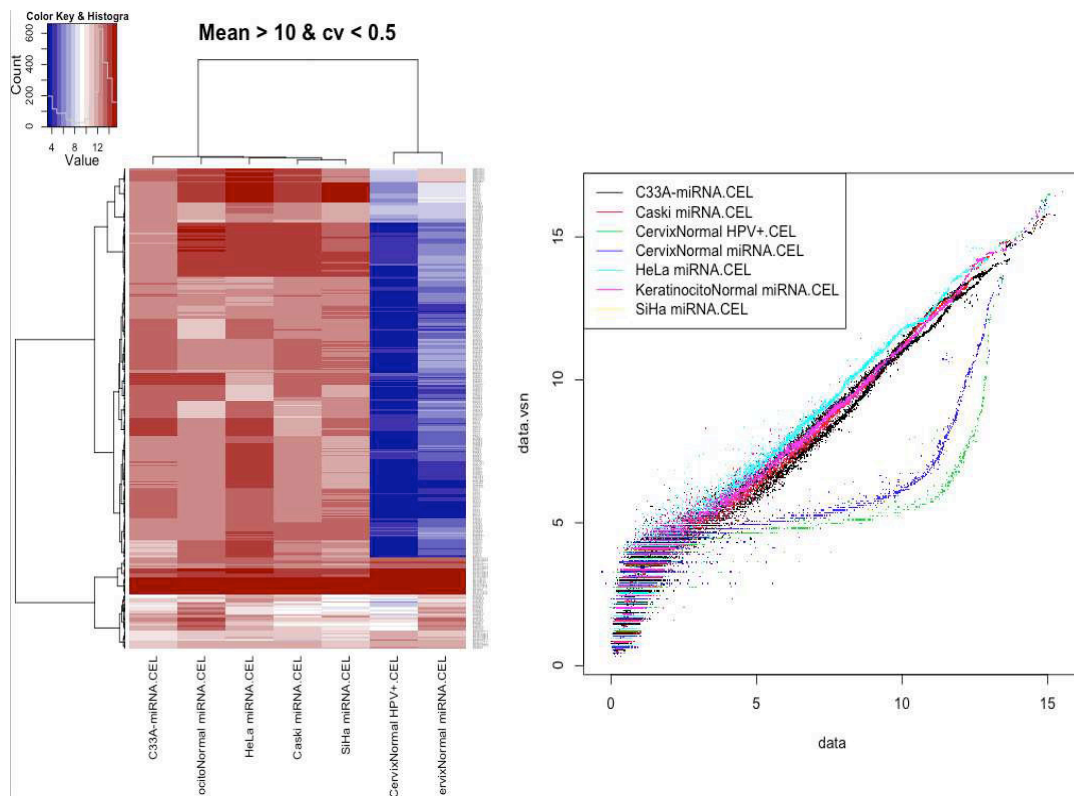


Figura 14. Expresión de miRNAs en los grupos de estudio. Se observa mapa de Calor y Gráfica de puntos donde en base a la expresión de miRNAs se observan dos familias, una conformada por todas las líneas celulares y otra conformada por las dos muestras de raspado cervical de pacientes.

6.4 Selección de miRNAs endógenos.

Para obtener los miRNAs de expresión constante en todas las muestras utilizadas con la finalidad de que funcionaran como miRNAs endógenos en este estudio, se seleccionaron aquellos que presentaran alta expresión en todas las muestras, es decir, que tuvieran una intensidad promedio mayor a 10 y un bajo coeficiente de variación entre ellas, es decir, un coeficiente de variación menor a 0.25. Bajo estos parámetros de selección se obtuvo un mapa de calor donde se puede apreciar claramente la región donde se encuentran los miRNAs de expresión constante y una grafica de puntos donde se señalan estos miRNAs de interés. Con estos datos se seleccionaron los miRNAs miR-23a y miR-320c.

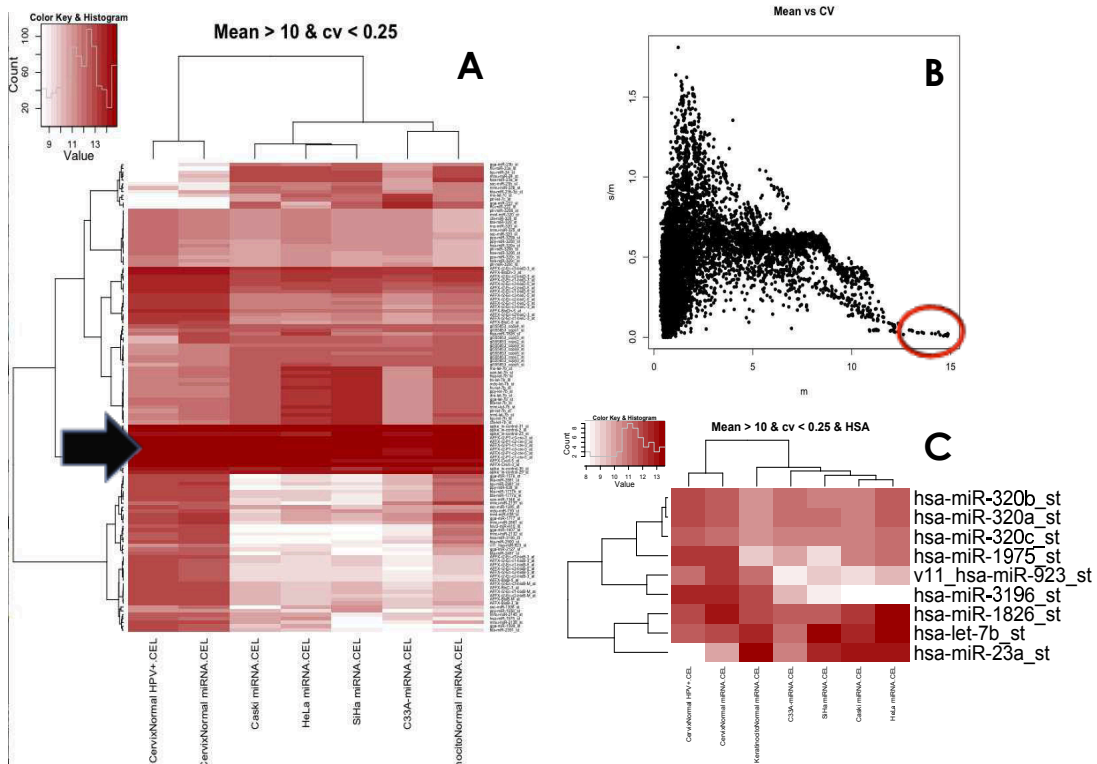


Figura 15. Selección de miRNAs endógenos. A) Mapa de calor donde se muestra la región de los miRNAs de expresión constante en todas las muestras. B) Gráfica de puntos donde se señalan los miRNAs con intensidad promedio >10 y Coeficiente de Variación < 0.25 C) Mapa de Calor donde se observan los miRNAs candidatos para utilizarse como endógenos.

6.5. Validación de la expresión de miRNAs endógenos por qPCR

Con base en los miRNAs seleccionados en el apartado 6.4, se validó la expresión del miR-23a y miR-320c mediante ensayos de PCR en tiempo real que se realizaron tres veces por triplicado de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

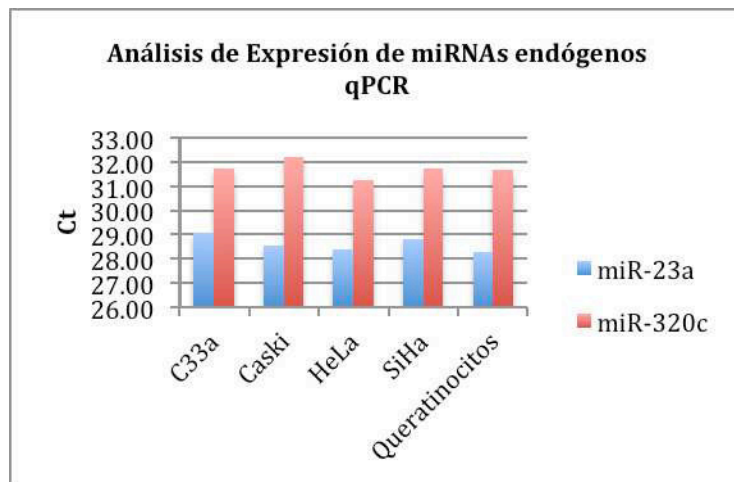


Figura 16. Gráfica con valores de Ct. En esta gráfica se observan los valores de Ct obtenidos de la amplificación de cada miRNA en cada una de las líneas celulares analizadas.

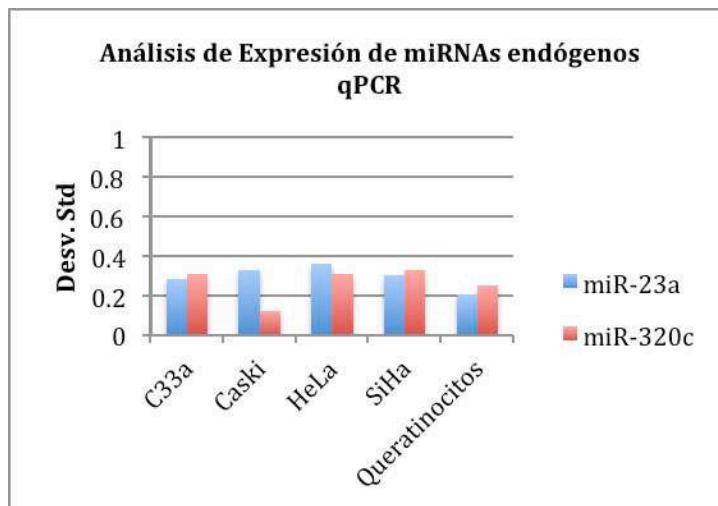


Figura 17. Gráfica con valores de Desv. Std. En esta gráfica se muestran los valores de Desviación Estándar calculados para la expresión de cada miRNA en cada línea celular de acuerdo a sus valores de Ct obtenidos en los ensayos por triplicado.

6.6 Selección de miRNAs diferencialmente expresados.

Con base en los resultados obtenidos mediante el análisis de microarreglos se seleccionaron 19 miRNAs diferencialmente expresados al compararlos con la expresión observada en los Queratinocitos.

En este punto del estudio se decidió descartar las muestras de pacientes ya que como se observó en el apartado 6.3, se agruparon en familias diferentes por lo cual sus resultados no pueden ser comparables con los de las líneas celulares.

| miRNAS | C33a (VPH-) | HeLa (VPH 18) | SiHa (VPH 16) | Caski (VPH 16) | Queratinocitos |
|--------------------|-------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| hsa-miR-10a_st | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-15b_st | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-21_st | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-25_st | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-125a-3p_st | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-93_st | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-148a_st | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-130b_st | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-106b_st | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-181d_st | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| hsa-miR-218_st | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| hsa-miR-638_st | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| hsa-miR-762_st | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| hsa-miR-1469_st | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| hsa-miR-1915_st | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| hsa-miR-2861_st | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| hsa-miR-3178_st | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| hsa-miR-3196_st | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| hsa-miR-4281_st | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |

Tabla 9. miRNAs diferencialmente expresados. En esta tabla se encuentran los miRNAs que resultaron diferencialmente expresados en todas las líneas celulares al compararlos con su expresión en los Queratinocitos. En color rojo se observan los sobre expresados y en azul los sub expresados.

6.7 Validación de la expresión de miRNAs diferencialmente expresados por qPCR.

Se validó la expresión de cinco miRNAs seleccionados como diferencialmente expresados (apartado 6.5). Todos los ensayos se realizaron tres veces por triplicado y los valores de expresión relativa se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ del cual posteriormente se obtuvo el valor de Fold Change para poder graficar la expresión en valores de Log base 2.

Se puede observar que los patrones de expresión son similares a los obtenidos por microarreglos, lo que sugiere que los resultados de microarreglos son bastante precisos.

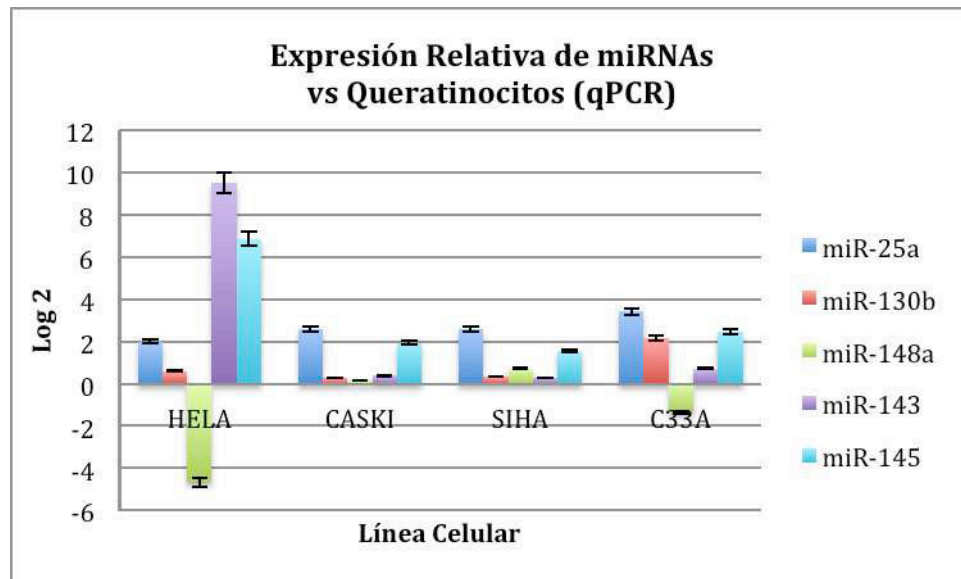


Figura 18. Expresión relativa de miRNAs por qPCR. En esta grafica se observan los resultados del análisis en tiempo real para la determinación de la expresión Relativa de miRNAs para cada una de las líneas celulares. Los niveles de expresión se graficaron en valores de Fold Change (Log2).

6.8 Predicción de genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados

Una vez seleccionados los miRNAs diferencialmente expresados, se utilizaron las bases de datos Target Scan y miRbase para predecir Genes que estos miRNAs se encontraran regulando.

| miRNAs | Genes blanco |
|------------------------|--|
| hsa-miR-3178_st | <i>EGR3, KLLN</i> |
| hsa-miR-762_st | <i>RAB35, RAB5A, BCAM, BCL2L13</i> |
| hsa-miR-125a-3p_st | <i>BOK BCL2, PTK6, BRCA1, MYCL1</i> |
| hsa-miR-25_st | <i>RAB23, BCL2L11, CDCA7L, RAP1B, SMAD7, GDF11, KSR2</i> |
| hsa-miR-130b_st | <i>RAB5A, ESR1, RRAGD, ST18, RASA1, RAP2C, TP53INP1, ARHGAP24, BCL2L11</i> |
| hsa-miR-638_st | <i>PAK2 p21, BRCA1</i> |
| hsa-miR-1915_st | <i>DAPK2, RAB1B, RAB3A, HYOU1, RAB5B, KSR2, SMAD3, BCAM</i> |
| hsa-miR-93_st | <i>RAB22A, MMP3</i> |
| hsa-miR-106b_st | <i>TNFRSF21, BRMS1L, RBL1, MKNK2, TP73, MMP3</i> |
| hsa-miR-3196_st | <i>BBC3, KLLN</i> |
| hsa-miR-2861_st | <i>RAB15, BOK BCL2</i> |
| hsa-miR-4281_st | <i>BCL2L2, FGF1, CDC42, RBBP4, BCL2L1, DDX3X</i> |
| hsa-miR-15b_st | <i>MMP3,</i> |
| hsa-miR-10a_st | <i>MAPRE1, RAP2A, RASL10B, BCL2L2, MTSS1L</i> |
| hsa-miR-148a_st | <i>BCL2L11, ERFF1, GADD45A, CDC14A, TGIF2, ST18, MRAS, RASSF8, RASAL1</i> |
| hsa-miR-21_st | <i>FGF18, FRS2</i> |
| hsa-miR-181d_st | <i>KRAS, RAP1B, TGFBRAP1, PDCCD6IP, RBBP7, BAG4, RASSF1</i> |
| hsa-miR-218_st | <i>BRCA1, PXN, RAP1GAP, UBE3A,</i> |

Tabla 10. Predicción de genes blanco. En esta tabla se encuentra la lista de genes predichos como blancos de los miRNAs diferencialmente expresados (los miRNAs resaltados en negritas ya han sido reportados en la literatura). Se seleccionaron solo genes que estuvieran involucrados en algún proceso como Crecimiento, diferenciación, proliferación, apoptosis, angiogénesis, adhesión ó migración celular.

6.9 Selección de Genes diferencialmente expresados

La selección de estos genes se realizó con base en los resultados obtenidos de los microarreglos de Expresión Génica Global. Solo se seleccionaron aquellos genes que presentaran una diferencia de Fold change > ±1.5 en comparación con su expresión en la línea celular calibradora (Queratinocitos Normales).

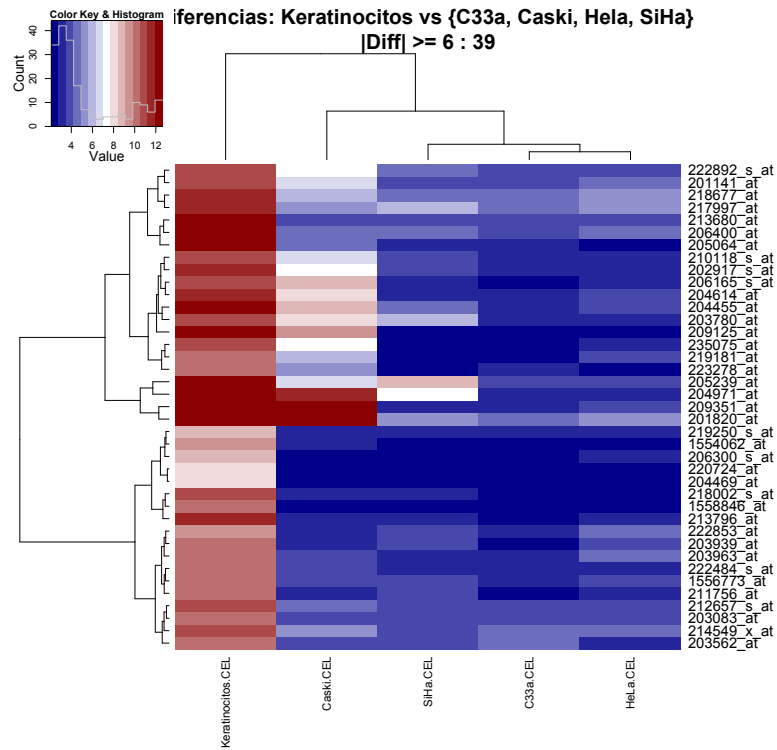


Figura 19. Mapa de calor de genes diferencialmente expresados. En este mapa se aprecian los genes diferencialmente expresados en las líneas celulares C33a, Caski, HeLa y SiHa comparados con la expresión en los Queratinocitos normales.

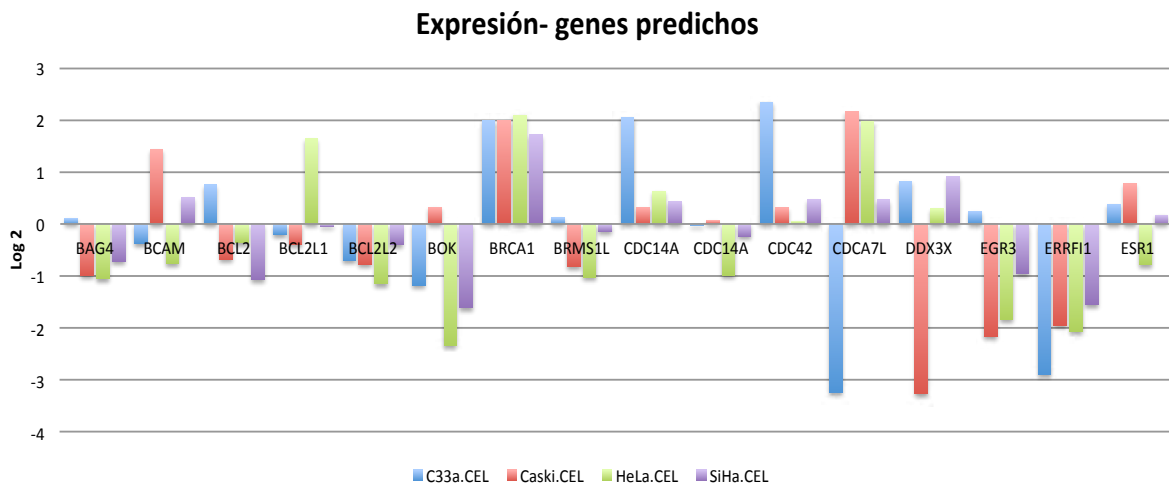


Figura 20. Gráfica de expresión génica. En esta gráfica se aprecian los valores de expresión de algunos genes predichos en las líneas celulares C33a, Caski, HeLa y SiHa comparados con su expresión en los Queratinocitos normales. De esta forma se seleccionaron aquellos genes que tuvieran una diferencia de Fold Change $>\pm 1.5$.

6.10 Selección de pares miRNAs - Genes diferencialmente expresados

Después de la selección de los miRNAs y genes diferencialmente expresados, se relacionaron de tal manera que tuviéramos el par gen-miRNA regulador, esperado también encontrar una relación en su expresión es decir, si el miRNA se encontraba sobre expresado que su gen diana se encontrara sub expresado y viceversa.

| GENES | | miRNAs | |
|---------|---|--------------|---|
| FRS2 | ↑ | hsa-miR-21 | ↓ |
| BCL2L2 | ↑ | hsa-miR-10a | ↓ |
| BRCA1 | ↓ | hsa-miR-638 | ↑ |
| MNK2 | ↑ | hsa-miR-106b | ↓ |
| PDCD6IP | ↑ | hsa-miR-181d | ↓ |
| PTK6 | ↑ | hsa-miR-125a | ↓ |
| PXN | ↑ | hsa-miR-218 | ↓ |
| RAB15 | ↓ | hsa-miR-2861 | ↑ |
| RASA1 | ↑ | hsa-miR-130b | ↓ |
| MMP3 | ↑ | hsa-miR-15b | ↓ |
| | | hsa-miR-93 | ↓ |
| | | hsa-miR-106b | ↓ |
| RBBP4 | ↓ | hsa-miR-4281 | ↑ |

Tabla 11. Tabla de pares Genes-miRNAs reguladores. En esta tabla se encuentra la lista de los pares Gen-miRNA que se encontraron diferencialmente expresados en las líneas celulares.

6.11 El papel de los genes seleccionados en la regulación celular

Para profundizar un poco a cerca de la importancia de los miRNAs y sus genes blanco seleccionados, se agregó una tabla con la función de cada uno de los genes.

| GEN | Procesos Biológicos |
|---------|---|
| FRS2 | Activación de MAPK, Participa en la vía de señalización del FGFR, Participa en la regulación de la proliferación de células epiteliales |
| BCL2L2 | Este gen codifica para un miembro de la familia de proteínas Bcl-2. Las proteínas de esta familia hetero u homodímeros y actúan como reguladores anti-y pro-apoptóticos. |
| BRCA1 | Es un gen supresor de tumores, que regulan el ciclo celular y evitan la proliferación descontrolada. |
| MNK2 | Este gen codifica para una proteína que fosforila el factor de iniciación eucariota 4E (eIF4E), jugando así un papel importante en la iniciación de la traducción del RNAm, la transformación oncogénica y la proliferación de células malignas. |
| PDCD6IP | Este gen codifica una proteína que participan en la muerte celular programada. |
| PTK6 | Codifica a una proteína No receptora de tirosina-quinasa implicada en la regulación de una variedad de vías de señalización que controlan la diferenciación y el mantenimiento de epitelio normal, así como el crecimiento del tumor. |
| PXN | Este gen codifica una proteína del citoesqueleto, está implicado en la adhesión celular. Existen diferentes isoformas, cada tienen diferentes funciones bioquímicas. |
| RAB15 | Miembro de la familia de oncogenes RAS |
| RASA1 | activador de proteínas RAS p21 (proteína activadora de GTPasa). Involucrada en el control de diferenciación y proliferación celular |
| MMP3 | Este gen codifica a la Estromelisin-1 también conocida como la metaloproteinasa de matriz-3, es una enzima que degrada la laminina, fibronectina, colágenos III, IV, IX, y X, y proteoglicanos del cartílago. Se cree que está implicada en la reparación de heridas, la progresión de la aterosclerosis y la iniciación del tumor. |

Tabla 12. Genes y Función biológica. En esta tabla se encuentra la lista de genes seleccionados y el papel que juegan en la regulación celular.

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN

7.1 Modelo de estudio

Debido a que hasta el momento no existe un modelo de estudio ideal para entender el papel de los miRNAs en la evolución del Cáncer Cervicouterino se decidió trabajar en primera instancia con líneas celulares, ya que con esto se reducirían significativamente las variables que se pudieran tener, ya que al trabajar con modelos *in vitro* se tiene un sistema controlado a diferencia de cuando se realizan estudios retrospectivos por ejemplo, con muestras de pacientes, en donde existen muchos factores ambientales que pudieran influir o alterar los resultados.

La finalidad de este estudio en general, fue obtener datos de miRNAs y Genes que de alguna manera pudieran estar involucrados en la progresión del Cáncer Cervicouterino, para posteriormente poder trabajar sobre esos datos en particular, pero ahora con muestras de pacientes solamente.

7.2 microRNAs endógenos

Actualmente los estudios para identificar perfiles de expresión de miRNAs han cobrado gran interés en los investigadores, sobre todo para estudios de cáncer. La metodología de primera elección para la validación de estos ensayos es la PCR en tiempo real para la cual es importante tener un buen normalizador o endógeno para que los resultados sean confiables. Durante la elaboración de este trabajo, se realizó una exhaustiva revisión

bibliográfica para encontrar el mejor miRNA endógeno, sin embargo encontramos que a diferencia de los estudios de expresión génica, donde ya se conocen diversos genes normalizadores, para el estudio de miRNAs la selección del miRNA endógeno dependerá del estudio que se este realizando. Existen diversos trabajos de investigación donde se pretende identificar perfiles de expresión de miRNAs en cáncer de Cervix, sin embargo cada uno utiliza diferentes miRNAs, RNAs pequeños e incluso algunos utilizan mRNA como endógenos lo que genera discrepancia de los resultados entre autores. Algunos ejemplos endógenos utilizados son el *let-7a* (Lee *et al*, 2011), *snRNAU6* (Pereira *et al*. 2010, Wang *et al*. 2009), *RNU4* (Martínez *et al*. 2010), *GAPDH* y *B-ACT* (Xiaoxia Hu *et al*, 2010) *miR-191* y *miR-23a* (Shen Y. *et al* 2011). Estos últimos son los únicos miRNAs que ha sido validados como endógenos en estudios de cáncer de cervix por Shen Y. *et al* 2011. Sin embargo, para este estudio en particular se decidió identificar y validar los propios miRNAs endógenos. Como se puede apreciar en los apartados 6.4 y 6.5, nuestros endógenos seleccionados fueron el *miR-23a* y *miR-320c*, los cuales resultaron ser los de mayor expresión con menor coeficiente de variación entre todas las líneas celulares analizadas.

7.3 microRNAs diferencialmente expresados

Con base en el apartado 6.5 podemos observar que se seleccionaron 19 miRNAs diferencialmente expresados, de los cuales el *miR-10a*, *miR-15b*, *miR-*

93, miR-148a, miR-21, miR-181d y miR-218 ya habían sido reportados por otros autores, el resto son nuevos hallazgos.

De la lista total de miRNAs seleccionados solo se validó por qPCR la expresión de los miR-25a, miR-130b y miR-148a. Además se validó la expresión de miR-143 y miR-145 que a pesar de que en nuestro estudio no resultaron seleccionados, se decidió validarlos ya que habían sido reportados por varios autores en diversas ocasiones. Al obtener los resultados de la validación se observó que los resultados obtenidos del análisis de microarreglos eran muy similares a los obtenidos por qPCR.

Para el resto de los miRNAs seleccionados, solo se tomaron en cuenta los valores de expresión obtenidos por el análisis de microarreglos.

| microRNA | Lui et al., 2007 | Martínez et al., 2008 | Avissar et al 2010 | Wang et al., 2009 | Montufar 2012 |
|-----------------|---------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| | Líneas | celulares | | | |
| miR-25a | | | | | up |
| miR-130b | | | up | | up |
| miR-143 | down | down | | | up |
| miR-145 | | | | down | up |
| miR-148a | | down | | up | up/down |
| mir-21 | up | | up | up | up |
| miR-10a | | | | | up |
| miR-638 | | | | | down |
| miR-106b | | | | | up |
| miR-181d | | | up | | up |
| miR-125a | | | | | up |
| miR-218 | | down | | down | up |
| miR-2861 | | | | | down |
| miR-4281 | | | | | down |
| miR-15b | | | | up | up |
| miR-93 | | | | up | up |

Tabla 13. Comparación de resultados con otros autores. En esta tabla se muestra la lista de miRNAs seleccionados y sus niveles de expresión. Se muestran también los hallazgos de otros autores.

7.4 microRNAs y genes diferencialmente expresados

Mediante predicción in silico se encontró que los miR-15b, miR-93, miR-106b regulan al gen MMP3, el cual se observó sub expresado en todas la líneas celulares a diferencia de los miRNAs que se encuentran sobre expresados. Este gen ya fue reportado diferencialmente expresado en un estudio donde se trabajó con muestras de cáncer de cérvix (Rajkumar et al, 2011). Los miR-93 y miR-130b fueron reportados diferencialmente expresados y como posibles biomarcadores de Leucemia de células T (Yeung et al., 2008). Por otra parte los miR-93 y miR-15b se encontraron diferencialmente expresados en muestras de Cáncer cervical (Wang et al., 2008 y Myklebust et al., 2011).

Un estudio in silico (Gu et al., 2011) reveló que los miR-466, miR-467, miR-669, miR-297 estaban relacionados con CaCx y VHP ya que se encontró que algunos de sus genes blanco son genes de VPH, sin embargo, en nuestro trabajo, la expresión de estos miRNAs no mostró diferencias al compararse entre las líneas celulares.

Deftereos et al., 2011 reportó en un estudio con líneas celulares de cáncer de cérvix, el miR-21 sobre expresado al igual que en nuestro trabajo y miR-143 sub expresado, que difiere de nuestros resultado.

Las discrepancias de resultados entre autores, puede deberse en gran parte al modelo de estudio, pero principalmente a una incorrecta selección del miRNA endógeno.

CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES

Las muestras de cérvix analizadas mostraron patrones de expresión similares entre ellas pero totalmente diferentes a los de las líneas celulares, por lo que los resultados de ambos no pueden ser comparables.

Con base en los resultados de microarreglos, seleccionamos un nuevo endógeno, el mir-320c (que no ha sido reportado por otros autores), debido a que mostró estabilidad en líneas celulares y muestras de cérvix.

Se determinaron los perfiles de expresión génica global y de miRNAs de las 5 líneas celulares utilizadas.

Se seleccionaron 13 pares miRNA-Ges diferencialmente expresados, de los cuales todos los genes están involucrados en procesos biológicos como diferenciación, proliferación, migración, crecimiento, apoptosis y adhesión celular.

Con los resultados obtenidos en este estudio, se observó que la expresión diferencial de los miRNAs está en su mayoría dada por el establecimiento de cáncer, más que por la presencia del VPH.

Los miR-25a, miR-638, miR-106b, miR-125a, miR-2861 y miR-4281 que se encontraron diferencialmente expresados en este estudio, no han sido reportados hasta el momento.

CAPÍTULO IX: BIBLIOGRAFÍA

1. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS] (2011). CÁNCER. NOTA DESCRIPTIVA NO. 297. DOCUMENTO REVISADO EL 7 DE ENERO DE 2011.
2. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2008). LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER TIENE QUE SER UNA PRIORIDAD DEL DESARROLLO. DOCUMENTO REVISADO EL 23 DE DICIEMBRE DE 2010.
3. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2009). SALUD DE LA MUJER. NOTA DESCRIPTIVA NO.334, NOVIEMBRE DE 2009. DOCUMENTOS REVISADO EL 6 DE ENERO DE 2011.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION. THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE: 2004 UPDATE. GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2008.
5. GLOBAL CANCER STATISTICS AHMEDIN JEMAL, DVM, FREDDIE BRAY, MELISSA M. CENTER, JACQUES FERLAY, ELIZABETH WARD, DAVID FORMAN, PHD. CA CANCER J CLIN 2011;61:69–90
6. FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS CD, PARKIN D. GLOBOCAN 2008, CANCER INCIDENCE AND MORTALITY WORLDWIDE: IARC CANCERBASE NO. 10. LYON, FRANCE: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER; YEAR. AVAILABLE AT: [HTTP://GLOBOCAN.IARC.FR](http://GLOBOCAN.IARC.FR). 2010.
7. WORLD HEALTH ORGANIZATION DATABANK. WHO STATISTICAL INFORMATION SYSTEM. GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION; YEAR AVAILABLE AT: [HTTP://WWW.WHO.INT/WHOSIS](http://WWW.WHO.INT/WHOSIS). 2010.
8. FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. ESTIMATES OF WORLDWIDE BURDEN OF CANCER IN 2008: GLO-BOCAN 2008. INT J CANCER.
9. PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE LA MORTALIDAD POR CÁNCER CERVICOUTERINO EN MÉXICO (1980-2004) VÍCTOR JOSÉ TOVAR GUZMÁN, FERNANDO ORTIZ CONTRERAS, FRANCISCO R JIMÉNEZ GAUNA, GUILLERMO VALENCIA VÁZQUEZ. REV FAC MED UNAM VOL. 51 NO. 2 MARZO-ABRIL, 2008.
10. HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND CERVICAL CANCER EILEEN M. BURD HENRY FORD HOSPITAL, DETROIT, MICHIGAN CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, JAN. 2003, P. 1–17
11. HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION AND CERVICAL CANCER: PATHOGENESIS AND EPIDEMIOLOGY DANIEL TENA GÓMEZ AND JUANA LÓPEZ SANTOS. SECTION OF MICROBIOLOGY. SERVICE OF CLINICAL ANALYSIS. UNIVERSITY HOSPITAL OF GUADALAJARA. C/. DONANTE DE SANGRE S/N. 19003. GUADALAJARA.
12. PARKIN DM, BRAY F. CHAPTER 2: THE BURDEN OF HPV-RELATED CANCERS. VACCINE 24S3 (2006) S3/11–S3/25.
13. TROTTIER H, BURCHELL AN. EPIDEMIOLOGY OF MUCOSAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION AND ASSOCIATED DISEASES. PUBLIC HEALTH GENOMICS 2009; 12:291-307

14. FRANCO EL, HARPER DM. VACCINATION AGAINST HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION: A NEW PARADIGM IN CERVICAL CAN- CER CONTROL. VACCINE 2005;23:2388-2394
15. REIMERS LL, ANDERSON WF, ROSENBERG PS, HENSON DE, CASTLE PE. ETIOLOGIC HETEROGENEITY FOR CERVICAL CARCINOMA BY HISTOPATHOLOGIC TYPE, USING COMPARATIVE AGEPERIOD-COHORT MODELS. CANCER EPIDEMIAL BIOMARKERS PREV. 2009; 18(3): 792-799
16. DOORBAR, J., MOLECULAR BIOLOGY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION AND CERVICAL CANCER. CLINICAL SCIENCE (2006) 110, 525–541.
17. THE NATURAL HISTORY OF CERVICAL HPV INFECTION: UNRESOLVED ISSUES. WOODMAN CB, COLLINS SI, YOUNG LS. NAT REV CANCER. 2007 JAN;7(1):11-22.
18. GIUS D, FUNK MC, CHUANG EY, FENG S, HUETTNER PC, NGUYEN L, BRADBURY CM, MISHRA M, GAO S, BUTTIN BM, COHN DE, POWELL MA, HOROWITZ NS, WHITCOMB BP, RADER JS. PROFILING MICRODISSECTED EPITHELIUM AND STROMA TO MODEL GENOMIC SIGNATURES FOR CERVICAL CARCINOGENESIS ACCOMMODATING FOR COVARIATES. CANCER RES 67: 7113–23, 2007.
19. LIZANO ET AL, INFECCIÓN POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: EPIDEMIOLOGÍA, HISTORIA NATURAL Y CARCINOGENESIS CANCEROLOGÍA 4 (2009): 205-216
20. SERMAN F., CÁNCER CERVICOUTERINO: EPIDEMIOLOGIA, HISTORIA NATURAL Y ROL DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO. PERSPECTIVAS EN PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO. REV CHILR EOVB SCTHEITL OGBINSETCEOTL G 2IN00E2C; O6L7 (240):0 321; 86-73(243)
21. DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZUR HAUSEN H. CLASSIFICATION OF PAPILLOMAVIRUSES. VIROLOGY. 2004; 324(1):17-27.
22. MUÑOZ, N, BOSCH FX, DE SANJOSÉ S, HERRERO R, CASTELLSAGUÉ X, SHAH KV ET AL. EPIDEMIOLOGIC CLASSIFICATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES ASSOCIATED WITH CERVICAL CANCER. N ENGL J MED. 2003;348(6):518-27.
23. OPALKA D, LACHMAN CE, MACMULLEN SA, JANSEN KU, SMITH JF, CHIRMULE N ET AL. SIMULTANEOUS QUANTITATION OF ANTIBODIES TO NEUTRALIZING EPITOPES ON VIRUS-LIKE PARTICLES FOR HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 6, 11, 16 AND 18 BY A MULTIPLEX LUMINEX ASSAY. CLIN DIAGN LAB IMMUNOL. 2003; 10(1): 108-15.
24. KIRNBAUER R, BOOY F, CHENG N, LOWY DR, SCHILLER JT. PAPILLOMAVIRUS L1 MAJOR CAPSID PROTEIN SELF-ASSEMBLES INTO VIRUS-LIKE PARTICLES THAT ARE HIGHLY IMMUNOGENIC. PROC NATL ACAD SCI. USA. 1992; 89(24):12180-4
25. FINISHING THE EUCHROMATIC SEQUENCE OF THE HUMAN GENOME. NATURE 2004;431:931-945.
26. M.E. PETER. REVIEW: TARGETING OF MRNAS BY MULTIPLE MIRNAS: THE NEXT STEP. ONCOGENE (2010) 29, 2161–2164.
27. RODRIGUEZ A, GRIFFITHS-JONES S, ASHURST JL, BRADLEY A: IDENTIFICATION OF MAMMALIAN MICRORNA HOST GENES AND TRANSCRIPTION UNITS. GENOME RES. 2009;19:92-105
28. FRIEDMAN RC, FARH KK, BURGE CB, BARTEL DP: MOST MAMMALIAN MRNAS ARE CONSERVED TARGETS OF MICRORNAS. GENOME RES 2009;19:92-105.

29. SAINI A, SELLER Z, DAVIES D, MARSHALL JF, HART IR: ACTIVATION STATUS AND FUNCTION OF THE VLA-4 (ALPHA4BETA1) INTEGRIN EXPRESSED ON HUMAN MELANOMA CELL LINES. INT J CANCER 1997;73:264 -270.
30. HOUBAVIY HB, DENNIS L, JAENISCH R, SHARP PA: CHARACTERIZATION OF A HIGHLY VARIABLE EUTHERIAN MICRORNA GENE. RNA 2005;11:1245-1257
31. ATARASHI K, NISHIMURA J, SHIMA T, UMESAKI Y, YAMAMOTO M, ONOUE M, YAGITA H, ISHII N, EVANS R, HONDA K, TAKEDA K: ATP DRIVES LAMINA PROPRIA T(H)17 CELL DIFFERENTIATION. NATURE 2008;455:808-812
32. CHOWDHURY TT, SALTER DM, BADER DL, LEE DA: INTEGRIN-MEDIATED MECHANOTRANSDUCTION PROCESSES IN TGF β -STIMULATED MONOLAYER-EXPANDED CHONDROCYTES. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 2004;318:873-881.
33. BORCHERT GM, LANIER W, DAVIDSON BL: RNA POLYMERASE III TRANSCRIBES HUMAN MICRORNAS. NAT STRUCT MOL BIOL 2006;13:1097-1101.
34. CAI X, HAGEDORN CH, CULLEN BR: HUMAN MICRORNAS ARE PROCESSED FROM CAPPED, POLYADENYLATED TRANSCRIPTS THAT CAN ALSO FUNCTION AS MRNAS. RNA 2004;10:1957-1966.
35. LEE MH, YANG HY: REGULATORS OF G1 CYCLIN- DEPENDENT KINASES AND CANCERS. CANCER METASTASIS REV 2003;22:435-449.
36. DUAN R, PAK C, JIN P: SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH MATURE MIR- 125A ALTERS THE PROCESSING OF PRI-MIRNA. HUM MOL GENET 2007;16:1124-1131.
37. LUND E, GUTTINGER S, CALADO A, DAHLBERG JE, KUTAY U: NUCLEAR EXPORT OF MICRORNA PRECURSORS. SCIENCE 2004;303:95-98.
38. GWIZDEK C, OSSAREH-NAZARI B, BROWNAWELL AM, DOGLIO A, BERTRAND E, MACARA IG, DARGEMONT C: EXPORTIN-5 MEDIATES NUCLEAR EXPORT OF MINIHELIX- CONTAINING RNAS. J BIOL CHEM 2003;278:5505- 5508.
39. BOHNSACK MT, CZAPLINSKI K, GORLICH D: EXPORTIN 5 IS A RANGTP-DEPENDENT DSRNA-BINDING PROTEIN THAT MEDIATES NUCLEAR EXPORT OF PRE- MIRNAS. RNA 2004;10:185-191.
40. BERNSTEIN E, CAUDY AA, HAMMOND SM, HANNON GJ: ROLE FOR A BIDENTATE RIBONUCLEASE IN THE INITIATION STEP OF RNA INTERFERENCE. NATURE 2001;409:363-366.
41. SONG E, LEE SK, WANG J, INCE N, OUYANG N, MIN J, CHEN J, SHANKAR P, LIEBERMAN J: RNA INTERFERENCE TARGETING FAS PROTECTS MICE FROM FULMINANT HEPATITIS. NAT MED 2003;9:347-351.
42. CARMELL MA, XUAN Z, ZHANG MQ, HANNON GJ: THE ARGONAUTE FAMILY: TENTACLES THAT REACH INTO RNAI, DEVELOPMENTAL CONTROL, STEM CELL MAINTENANCE, AND TUMORIGENESIS. GENES DEV 2002;16:2733-2742.
43. HUTVAGNER G, MCLACHLAN J, PASQUINELLI AE, BALINT E, TUSCHL T, ZAMORE PD: A CELLULAR FUNCTION FOR THE RNA-INTERFERENCE ENZYME DICER IN THE

MATURATION OF THE LET-7 SMALL TEMPORAL RNA. SCIENCE 2001; 293:834-838.

44. BERNSTEIN E, KIM SY, CARMELL MA, MURCHISON EP, ALCORN H, LI MZ, MILLS AA, ELLEDGE SJ, ANDERSON KV, HANNON GJ: DICER IS ESSENTIAL FOR MOUSE DEVELOPMENT. NAT GENET 2003;35:215- 217.
45. SUH MR, LEE Y, KIM JY, KIM SK, MOON SH, LEE JY, CHA KY, CHUNG HM, YOON HS, MOON SY, KIM VN, KIM KS: HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS EXPRESS A UNIQUE SET OF MICRORNAS. DEV BIOL 2004;270:488-498.
46. SCHWARZ DS, HUTVAGNER G, DU T, XU Z, ARONIN N,ZAMORE PD: ASYMMETRY IN THE ASSEMBLY OF THE RNAI ENZYME COMPLEX. CELL 2003;115:199-208.
47. ZERVAS CG, GREGORY SL, BROWN NH: DROSOPHILA INTEGRIN-LINKED KINASE IS REQUIRED AT SITES OF INTEGRIN ADHESION TO LINK THE CYTOSKELETON TO THE PLASMA MEMBRANE. J CELL BIOL 2001;152:1007- 1018.
48. RAND TA, PETERSEN S, DU F, WANG X: ARGONAUTE2 CLEAVES THE ANTI-GUIDE STRAND OF SIRNA DURING RISC ACTIVATION. CELL 2005;123:621-629.
49. MACRAE IJ, MA E, ZHOU M, ROBINSON CV, DOUDNA JA: IN VITRO RECONSTITUTION OF THE HUMAN RISC- LOADING COMPLEX. PROC NATL ACAD SCI U S A 2008.
50. AMBROS V: MICRORNA PATHWAYS IN FLIES AND WORMS: GROWTH, DEATH, FAT, STRESS, AND TIMING. CELL 2003;113:673-676.
51. THOMSON JM, PARKER J, PEROU CM, HAMMOND SM: A CUSTOM MICROARRAY PLATFORM FOR ANALYSIS OF MICRORNA GENE EXPRESSION. NAT METHODS 2004;1:47-53.
52. JIN W, DODSON MV, MOORE SS, BASARAB JA, GUAN LL: CHARACTERIZATION OF MICRORNA EXPRESSION IN BOVINE ADIPOSE TISSUES: A POTENTIAL REGULATORY MECHANISM OF SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE DEVELOPMENT. BMC MOL BIOL;11:29.
53. LAI EC: MICRO RNAS ARE COMPLEMENTARY TO 3' UTR SEQUENCE MOTIFS THAT MEDIATE NEGATIVE POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION. NAT GENET 2002;30:363-364.
54. LYTLE JR, YARIO TA, STEITZ JA: TARGET MRNAS ARE REPRESSED AS EFFICIENTLY BY MICRORNA-BINDING SITES IN THE 5' UTR AS IN THE 3' UTR. PROC NATL ACAD SCI U S A 2007;104:9667-9672.
55. M.E. PETER. REVIEW: TARGETING OF MRNAS BY MULTIPLE MIRNAS: THE NEXT STEP. ONCOGENE (2010) 29, 2161–2164.
56. HU ET AL. A MICRORNA EXPRESSION SIGNATURE FOR CERVICAL CANCER PROGNOSIS. CANCER RES; 70(4) FEBRUARY 15, 2010.
57. GRIFFITHS-JONES S: THE MICRORNA REGISTRY. NUCLEIC ACIDS RES 2004;32:D109-111.
58. ZAMORE PD, HALEY B: RIBO-GNOME: THE BIG WORLD OF SMALL RNAS. SCIENCE 2005;309:1519-1524.

59. SHEN Y., IDENTIFICATION OF MIR-23^a AS A NOVEL MICRORNA NORMALIZER FOR RELATIVE QUANTIFICATION I HUMAN UTERINE CERVICAL TISSUES. EXP. MOL. MED. VOL. 43(6), 358-366, 2011.
60. CHOWDHURY TT, AKANJI OO, SALTER DM, BADER DL, LEE DA: DYNAMIC COMPRESSION INFLUENCES INTERLEUKIN-1BETA-INDUCED NITRIC OXIDE AND PROSTAGLANDIN E2 RELEASE BY ARTICULAR CHONDROCYTES VIA ALTERATIONS IN INOS AND COX-2 EXPRESSION. BIORHEOLOGY 2008;45:257-274.
61. KARUBE Y, TANAKA H, OSADA H, TOMIDA S, TATEMATSU Y, YANAGISAWA K, YATABE Y, TAKAMIZAWA J, MIYOSHI S, MITSUDOMI T, TAKAHASHI T: REDUCED EXPRESSION OF DICER ASSOCIATED WITH POOR PROGNOSIS IN LUNG CANCER PATIENTS. CANCER SCI 2005;96:111-115.
62. IORIO MV, FERRACIN M, LIU CG, VERONESE A, SPIZZO R, SABBIONI S, MAGRI E, PEDRIALI M, FABBRI M, CAMPIGLIO M, MENARD S, PALAZZO JP, ROSENBERG A, MUSIANI P, VOLINIA S, NENCI I, CALIN GA, QUERZOLI P, NEGRINI M, CROCE CM: MICRORNA GENE EXPRESSION DEREGULATION IN HUMAN BREAST CANCER. CANCER RES 2005;65:7065-7070.
63. CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRU CD, HYSLOP T, NOCH E, YENDAMURI S, SHIMIZU M, RATTAN S, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM: HUMAN MICRORNA GENES ARE FREQUENTLY LOCATED AT FRAGILE SITES AND GENOMIC REGIONS INVOLVED IN CANCERS. PROC NATL ACAD SCI U S A 2004;101:2999-3004.
64. LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D, SWEET-CORDERO A, EBERT BL, MAK RH, FERRANDO AA, DOWNING JR, JACKS T, HORVITZ HR, GOLUB TR: MICRORNA EXPRESSION PROFILES CLASSIFY HUMAN CANCERS. NATURE 2005;435:834-838.
65. CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH E, ALDLER H, RATTAN S, KEATING M, RAI K, RASSENTI L, KIPPS T, NEGRINI M, BULLRICH F, CROCE CM: FREQUENT DELETIONS AND DOWN-REGULATION OF MICRO- RNA GENES MIR15 AND MIR16 AT 13Q14 IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. PROC NATL ACAD SCI U S A 2002;99:15524-15529.
66. CIMMINO A, CALIN GA, FABBRI M, IORIO MV, FERRACIN M, SHIMIZU M, WOJCIK SE, AQEILAN RI, ZUPO S, DONO M, RASSENTI L, ALDER H, VOLINIA S, LIU CG, KIPPS TJ, NEGRINI M, CROCE CM: MIR-15 AND MIR-16 INDUCE APOPTOSIS BY TARGETING BCL2. PROC NATL ACAD SCI U S A 2005;102:13944-13949.
67. OHNSON SM, GROSSHANS H, SHINGARA J, BYROM M, JARVIS R, CHENG A, LABOURIER E, REINERT KL, BROWN D, SLACK FJ: RAS IS REGULATED BY THE LET-7 MICRORNA FAMILY. CELL 2005;120:635-647.
68. SUAREZ Y, SESSA WC: MICRORNAS AS NOVEL REGULATORS OF ANGIOGENESIS. CIRC RES 2009;104:442-454.
69. POLISENO L, TUCCOLI A, MARIANI L, EVANGELISTA M, CITTI L, WOODS K, MERCATANTI A, HAMMOND S, RAINALDI G: MICRORNAS MODULATE THE ANGIOGENIC PROPERTIES OF HUVECS. BLOOD 2006;108:3068-3071.
70. NICOLI S, STANDLEY C, WALKER P, HURLSTONE A, FOGARTY KE, LAWSON ND: MICRORNA-MEDIATED INTEGRATION OF HAEMODYNAMICS AND VEGF SIGNALLING DURING ANGIOGENESIS. NATURE;464:1196-1200.

71. KUEHBACHER A, URBICH C, ZEIHNER AM, DIMMELER S: ROLE OF DICER AND DROSHA FOR ENDOTHELIAL MICRORNA EXPRESSION AND ANGIOGENESIS. CIRC RES 2007;101:59-68.
72. WU YJ, LA PIERRE DP, WU J, YEE AJ, YANG BB: THE INTERACTION OF VERSICAN WITH ITS BINDING PARTNERS. CELL RES 2005;15:483-494.
73. ZHENG PS, WEN J, ANG LC, SHENG W, VILORIA-PETIT A, WANG Y, WU Y, KERBEL RS, YANG BB: VERSICAN/ PG-M G3 DOMAIN PROMOTES TUMOR GROWTH AND ANGIOGENESIS. FASEB J 2004;18:754-756.