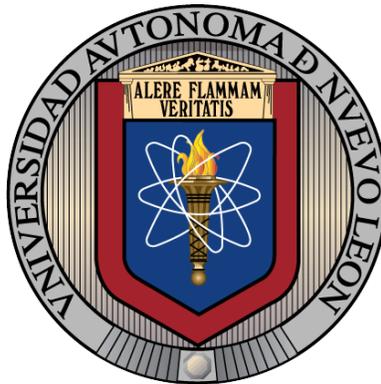


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS GLOBAL DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN MUESTRAS DE  
PLASMA Y SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN POR VPH**

**PRESENTADO POR:**

**Q.C.B. GRECIA IRIS USCANGA PERALES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**Diciembre, 2011**

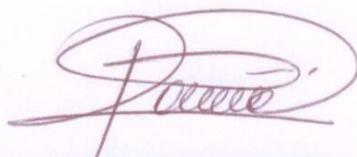
**Análisis global de la expresión de miRNAs en muestras de plasma y su relación con la infección por VPH**

**Aprobación de la Tesis:**



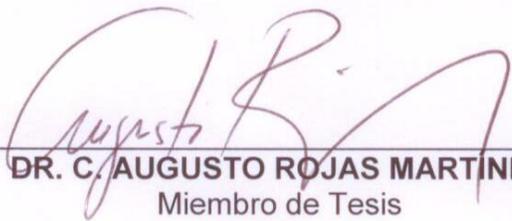
---

**DRA. C. ANA-MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA**  
Directora de Tesis



---

**DR. C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ**  
Co- Directora de Tesis



---

**DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Miembro de Tesis



---

**DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE GRÁFICAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
<b>CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO</b>	
1.1 Cáncer Cérvicouterino	1
1.1.1 Epidemiología	1
1.1.2 Desarrollo del Cáncer cérvicouterino	4
1.1.3 Factores de Riesgo	6
1.2 Virus del Papiloma Humano	7
1.2.1 Biología Molecular del Virus del papiloma humano	7
1.2.2 Ciclo de reproducción del Virus del papiloma humano	11
1.2.3 Técnicas de detección molecular del Virus del papiloma humano	13
1.3 ¿Qué son los miRNAs?	15
1.3.1 Biogénesis de los miRNAs	16
1.3.2 Mecanismos de los miRNAs	19
1.3.3 miRNAs en cáncer	21
1.3.4 miRNAs circulantes	23
<b>CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN</b>	27
<b>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS</b>	
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos	28

## **CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS**

4.1 Lugar de realización del estudio	29
4.2 Grupo de estudio	29
4.3 Materiales	30
4.3.1 Consumibles	30
4.3.2 Reactivos	31
4.3.3 Material Biológico	31
4.3.4 Instrumentación	32
4.3.5 Programas estadísticos	32
	33
4.4 Métodos	
4.4.1 Estrategia general	33
4.4.2 Toma de muestras	33
4.4.2.1 Toma de cepillado de cérvix	33
4.4.2.2 Flebotomía	34
4.4.3 Análisis de citología de cérvix	35
4.4.4 Extracción de ADN	35
4.4.5 Identificación y Genotipificación de VPH	36
4.4.6 Extracción de RNA	37
4.4.7 Microarreglos para análisis de expresión de miRNAs	39

## **CAPÍTULO 5. RESULTADOS**

5.1 Datos sociodemográficos de la población muestreada	41
5.2 Identificación de la presencia de cambios citológicos en cérvix	47
5.3 Identificación y genotipificación del VPH	49

5.4 Perfil de expresión de miRNAs de muestras de plasma de mujeres positivas para la presencia de VPH de alto riesgo.	53
---	----

## **CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN**

6.1 Asociación del perfil de expresión de miRNAs de plasma con la infección por el VPH de alto riesgo y/o con el estadio de la lesión	62
---	----

6.2 Relación de los miRNAs desregulados en diferentes cánceres con los expresados en muestras de plasma	64
---	----

## **CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN**

## **CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA**

### **ANEXOS**

Protocolo de extracción de ADN <i>mSample Preparation SystemDNA</i>	75
--	----

Protocolo de extracción de ARN <i>irVana™ miRNAIsolation</i>	82
---	----

Protocolo Q-PCR para la identificación y tipificación del VPH <i>Abbott RealTime High Risk HPV</i>	87
---	----

Protocolo de microarreglos <i>AffymetrixGeneChip 2.0 miRNAArray de Affimetrix</i>	91
--	----

Cuestionario	96
--------------	----

Consentimiento informado	99
--------------------------	----

## RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.  
Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud. Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación

### **Análisis de la expresión global de miRNAs en muestras de plasma y su relación con la infección por el VPH**

**Introducción.** El CaCu es uno de los principales problemas de salud en las mujeres en el mundo.<sup>2</sup> En México, esta enfermedad es la segunda causa de defunción por neoplasias de mujeres entre los 25 y los 64 años de edad.<sup>4</sup> La principal causa del desarrollo de CaCu y sus lesiones precursoras, es la infección persistente con el VPH AR.<sup>9</sup> Recientemente se ha visto que cambios en los espectros de los miRNAs en ciertos fluidos se correlacionan con diversas condiciones patológicas.<sup>56</sup>

**Objetivo.** Analizar la expresión global de miRNAs presentes en plasma de mujeres infectadas con el VPH de alto riesgo y compararlo con el perfil de expresión miRNAs de mujeres sin infección para determinar si existe un perfil diferencial inducido por la presencia de proteínas virales (tipo-específico) y/o el grado de lesión presentado.

**Material y métodos.** Se tomaron muestras de sangre y de cérvix de las mujeres que aceptaron participar en el estudio. Se realizó un tamizaje citológico y/o de la infección por el VPH AR para formar cuatro grupos de estudio: el primero de mujeres con citología negativa y VPH AR negativo; el segundo, de mujeres con citología negativa y VPH AR positivo; el tercero de mujeres con displasia y con VPH AR positivo y el cuarto de mujeres con CaCu y con VPH AR positivo. Se extrajo el ARN total de las 23 muestras de plasma que conformaron los cuatro grupos y se realizaron los microarreglos de cada una de estas.

**Resultados.** Se tamizaron un total de 198 muestras, el 26% de las muestras resultó positiva para la infección por al menos un VPH AR. Se observaron 2 grupos de miRNAs sub-expresados en muestras del grupo de displasia. Se encontró además, que el miR-185 estaba expresado de igual manera en todos los grupos.

**Discusión.** Se observó una sub-expresión de un grupo de 16 miRNAs en plasma de las mujeres con displasia por VPH AR, sin embargo, es probable que este perfil diferencial de expresión se deba en mayor medida al tipo de lesión celular y no a la infección propia por el virus. miR155 y miR-324-5p se encuentran desregulados en plasma de mujeres con displasia y en cérvix de mujeres con CaCu, estas observaciones son importantes ya que una de las hipótesis de la razón de los miRNAs circulantes, es que están involucrados en la comunicación célula-célula.<sup>64,65</sup>

**Conclusiones.** No se observó un perfil de expresión de miRNAs en plasma que distinga la presencia del VPH en un estadio de infección temprana. Se apreció un perfil diferencial de 16 miRNAs en el plasma de las mujeres con displasia.

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Cánceres más comunes en las mujeres en el mundo.	2
Figura 2.	Distribución porcentual de las defunciones por tipo de tumores malignos en mujeres de 25 años y más.	3
Figura 3.	Tasa estandarizada de mortalidad por cáncer cérvicouterino por entidad federativa.	4
Figura 4.	Desarrollo del CaCu.	5
Figura 5.	Representación del VPH.	8
Figura 6.	Representación de la organización del genoma del VPH.	9
Figura 7.	Ciclo de reproducción del genoma viral del VPH en el epitelio cervical.	12
Figura 8.	Técnicas de detección molecular del Virus del Papiloma Humano.	14
Figura 9.	Estructuras de los precursores de miRNAs con la enzima a la que se une a cada uno.	17
Figura 10.	Biogénesis de los miRNAs.	18
Figura 11.	Representación de la relación de miRNAs y sus genes blanco.	20
Figura 12.	Modelo de la diferenciación y expresión de miR-203 de un epitelio normal y otro infectado con el VPH.	21
Figura13.	Representación de las distintas formas en las que se encuentran los miRNAs circulantes.	25

Figura 14.	Estrategia general del procedimiento realizado para este estudio.	33
Figura 15.	Citología de una muestra normal de cérvix mediante la técnica de Papanicolaou.	47
Figura 16.	Citología de una muestra con displasia de cérvix mediante la técnica de Papanicolaou.	47
Figura 17.	Citología de una muestra con CaCu mediante la técnica de Papanicolaou.	48
Figura 18.	Ejemplos de resultados arrojados por el software del kit de Abbott RealTime High Risk HPV.	44
Figura 19.	Representación de los resultados arrojados por el software <i>Experion™</i> System.	50
Figura 20.	Muestras que se sometieron al análisis por microarreglos de miRNAs.	53
Figura 21.	Dendograma de los datos sin filtrar.	56
Figura 22.	Dendograma de los datos filtrados por media > 2.5.	58
Figura 23.	Mapa de calor de los datos (normalizados y filtrados por media) de expresión de miRNAs de las 23 muestras de plasma.	59
Figura 24.	Mapa de calor de los datos (prueba “F”) de expresión de miRNAs de las 23 muestras de plasma.	60
Figura 25.	Figura 26. Mapa de calor de los datos (prueba “F”) de expresión de miRNAs de las 23 muestras de plasma sin la muestra <i>miRNAs96</i> .	61

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. miRNAs circulantes desregulados en enfermedades humanas	26
Tabla 2. Grupos de estudio.	38
Tabla 3. Edad promedio, máxima y mínima de mujeres incluidas en el estudio.	41
Tabla 4. Edad promedio, máxima y mínima de la primera relación sexual de las mujeres que aceptaron participar en el estudio.	43
Tabla 5. Clasificación citológica de las muestras de mujeres que participaron en el estudio.	48
Tabla 6. Relación de las muestras de cérvix positivas y negativas para la presencia del VPH y la presencia de cambios morfológicos.	52
Tabla 7. Tipo de VPH presente en las muestras de cérvix con cambios citológicos.	52
Tabla 8. Resultados de la cuantificación de ARN de cada muestra.	54
Tabla 9. miRNAs desregulados en muestras de cérvix de mujeres con CaCu.	64

## LISTA DE GRÁFICAS

		Página
Gráfica 1.	Porcentaje de mujeres que acudieron a los diferentes niveles de educación escolar.	41
Gráfica 2.	Porcentaje de mujeres casadas, solteras, viudas o divorciadas que aceptaron participar en el estudio.	42
Gráfica 3.	Porcentaje del número de parejas de las mujeres que aceptaron participar en el estudio.	43
Gráfica 4.	Porcentaje de mujeres participantes en el estudio que responden si su pareja mantiene relaciones sexuales con otra mujer o con prostitutas.	44
Gráfica 5.	Porcentaje del número de embarazos de las mujeres que participaron en el estudio.	44
Gráfica 6.	Porcentaje de mujeres participantes en el estudio que se han realizado Papanicolaou.	45
Gráfica 7.	Porcentaje de mujeres participantes que son fumadoras o no.	45
Gráfica 8.	Porcentaje de mujeres que emplean los diferentes métodos anticonceptivos.	46
Gráfica 9.	Porcentaje de muestras positivas y negativas para la presencia del VPH.	51

Gráfica 10.	Porcentaje de tipos de VPH de las muestras de las muestras positivas.	51
Gráfica 11.	Dispersión de los datos empleando las variables: media y coeficiente de variación.	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribunocleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleic mensajero
°C	Centigrados
CaCu	Cáncer cérvicouterino
CHC	Carcinoma hepatocellular
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
RCF	Fuerza centrífuga relative
µL	Microlitro
ng	Nanogramo
nt	Nucleotidos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
p53	Proteína tumoral 53
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

UTR	Región no traducida
VHC	Virus de la hepatitis C
VPH	Virus del papiloma humano
VPH AR	Virus del papiloma humano de alto riesgo

### MARCO TEÓRICO

#### 1.4 Cáncer Cérvicouterino

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, habitualmente de lenta y progresiva evolución en el tiempo, que se suceden generalmente en etapas. En grado variable evolucionan a cáncer in situ cuando compromete sólo a la superficie epitelial y luego a cáncer invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal.<sup>1</sup>

##### 1.4.1 Epidemiología

El CaCu es uno de los principales problemas de salud en las mujeres en el mundo, cada año son diagnosticadas más de 500,000 mujeres con esta enfermedad, de las cuales llegan a morir casi las dos terceras partes. Según la *International Agency for Research on Cancer*, el CaCu ocupa el segundo lugar en cánceres más comunes en las mujeres en el mundo<sup>2</sup> (figura 1).

Aunque la incidencia del CaCu varía entre los distintos grupos poblacionales, la mayor mortalidad la sufren los países en vías de desarrollo, en los que la conjunción de factores sociales, políticos, culturales y económicos, sumados a un pobre conocimiento de la enfermedad, la han convertido en un problema muy grave de salud pública.<sup>3</sup> En México, esta enfermedad es la segunda causa de defunción por neoplasias de mujeres entre los 25 y los 64 años de edad (figura 2), con aproximadamente 6,000 decesos anuales.<sup>4</sup>

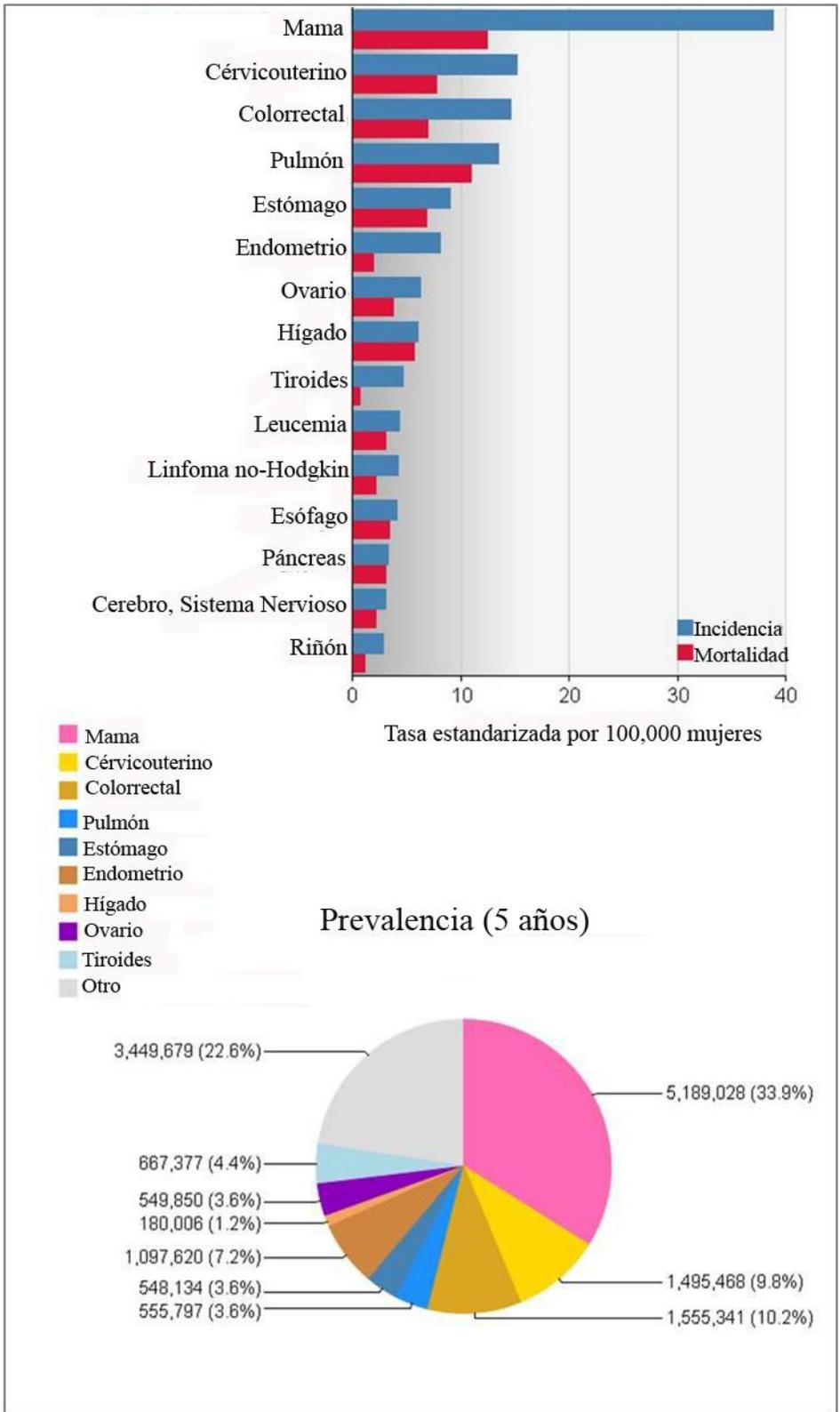


Figura 1. Cánceres más comunes en las mujeres en el mundo. A) Incidencia y mortalidad de los cánceres en mujeres. B) Prevalencia (en 5 años) de los cánceres en mujeres<sup>2</sup>.

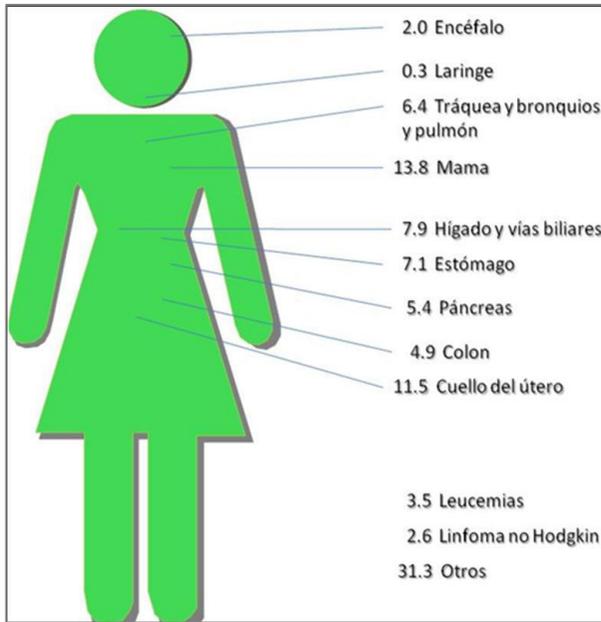


Figura 2. Distribución porcentual de las defunciones por tipo de tumores malignos en mujeres de 25 años y más, México, 2009<sup>3</sup>.

La tasa estandarizada de mortalidad del CaCu en México por 1000 mil mujeres de 25 años y más, para el año 2009, era de 9.1. En los estados de Hidalgo (tasa de 6.0), Zacatecas (tasa de 6.2) y Nuevo León (tasa de 7.1) se presentaban los menores índices de mortalidad, en tanto que Campeche (tasa de 15.4), Chiapas (tasa de 14.4) y Quintana Roo (tasa de 13.2) mostraban las tasas más altas (figura 3).

La tasa de mortalidad por cáncer cervicouterino de los 10 estados con mayor incidencia es 87.1% mayor que la de los 10 estados con menores tasas: 12.2 fallecimientos por cada 100 mil mujeres de 25 años o más, contra 6.5, respectivamente<sup>4</sup>.



Figura 3. Tasa estandarizada (por 100 mil mujeres de 25 años o más) de mortalidad por cáncer cérvicouterino por entidad federativa, México, 2009<sup>3</sup>.

El CaCu es una enfermedad altamente prevenible y tratable, ya que pueden transcurrir de 5 a 10 años para que una lesión pre-cancerosa evolucione a un tumor maligno.<sup>1</sup> Todo esto brinda un área de oportunidad importante para realizar el diagnóstico antes de que ocurra la progresión natural de la enfermedad hacia estudios intratables.

### 1.1.2 Desarrollo del CaCu

Los cánceres cervicales comienzan en las células de la superficie del cuello uterino. Existen dos tipos de células en dicha superficie: escamosas y columnares. La mayoría de los cánceres de cuello uterino provienen de las células escamosas.<sup>5</sup>

El desarrollo del cáncer cervical generalmente es muy lento y comienza como una afección precancerosa llamada displasia o lesión intraepitelial de cuello uterino. Este tipo de lesión no atraviesa la membrana basal del epitelio, por lo que no pueden invadir ni diseminarse por el resto del cuerpo, como lo hace un cáncer invasor.<sup>6</sup> Al microscopio se caracteriza porque las células presentan cambios en su forma, como se muestra en la figura 4.

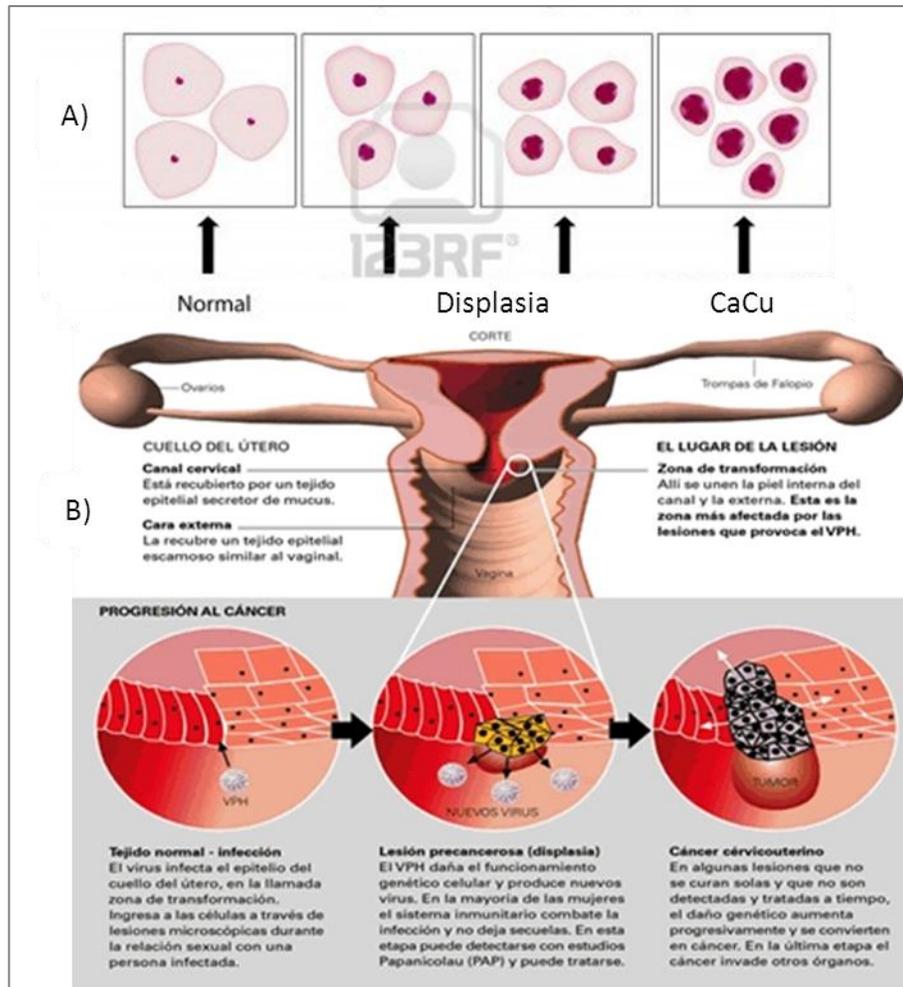


Figura 4. Desarrollo del CaCu. A) Prueba de Papanicolaou a muestras de cepillado de cérvix (una muestra normal, dos de displasia y una de CaCu). B) Representación de la progresión del CaCu en el epitelio del cérvix.<sup>7</sup>

La displasia se clasifica en moderada o severa según la morfología celular observada en la citología. Una displasia leve (Lesión intraepitelial de bajo grado), es una lesión que rara vez avanza a la invasión. En cambio la displasia moderada y la displasia severa (Lesiones intraepiteliales de alto grado) son lesiones que una vez detectadas deben ser tratadas porque presentan una alta posibilidad de avanzar hacia un carcinoma invasor. Sin embargo, la progresión de una displasia hacia carcinoma invasivo, puede ocurrir en pocos meses o producirse durante más de una década.<sup>8,9</sup>

### **1.1.3 Factores de Riesgo**

La principal causa del desarrollo de CaCu y sus lesiones precursoras, es la infección persistente con el VPH, como fue postulado en 1976 por Harald Hausen.<sup>9</sup> Sin embargo, se ha establecido que aunque la presencia del virus es necesaria, ello no es suficiente para el desarrollo de la neoplasia.<sup>10</sup> El VPH se encuentra presente en al menos el 20% de las mujeres, la mayoría de las cuales lo eliminan.<sup>11</sup> Por lo anterior es claro que existen factores de riesgo de cáncer cervical que están relacionados con características tanto del virus como del huésped, e incluyen:

1. Promiscuidad. Hay una fuerte asociación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida.<sup>12</sup>
2. Actividad sexual a temprana edad.
3. Fumar o ser fumadora pasiva.<sup>13</sup>
4. Paridad. Presentan un riesgo mayor las mujeres con más de 7 hijos.<sup>14</sup>

5. Tener historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente.
6. Edad. La infección por el VPH es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia. El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer.<sup>14,15</sup>
7. Uso prolongado de anticonceptivos orales. La región larga de control, LCR por las siglas en inglés, en el genoma viral, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroidales como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona. Estudios han reportado el uso de anticonceptivos orales y la alta positividad al DNA viral.<sup>16</sup>
8. Predisposición genética. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad.<sup>17</sup>
9. Persistencia viral. Común entre los tipos virales de alto riesgo y factor determinante en el desarrollo a cáncer. La persistencia puede inducir cambios genéticos secundarios dado que las proteínas virales interfieren con los puntos de control del ciclo celular e inducen inmortalización de los queratinocitos.
10. Carga viral. Correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad. El VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales.<sup>3</sup>

## 1.5 Biología Molecular del Virus del Papiloma Humano

Los VPH son un grupo de virus de ADN que pertenecen a la familia Papillomaviridae, no poseen envoltura, y tienen un diámetro aproximado de 52-55 nm (figura 5).<sup>18</sup>

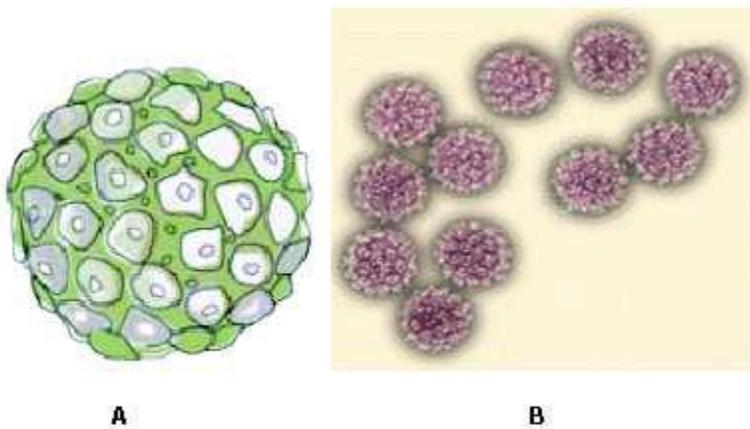


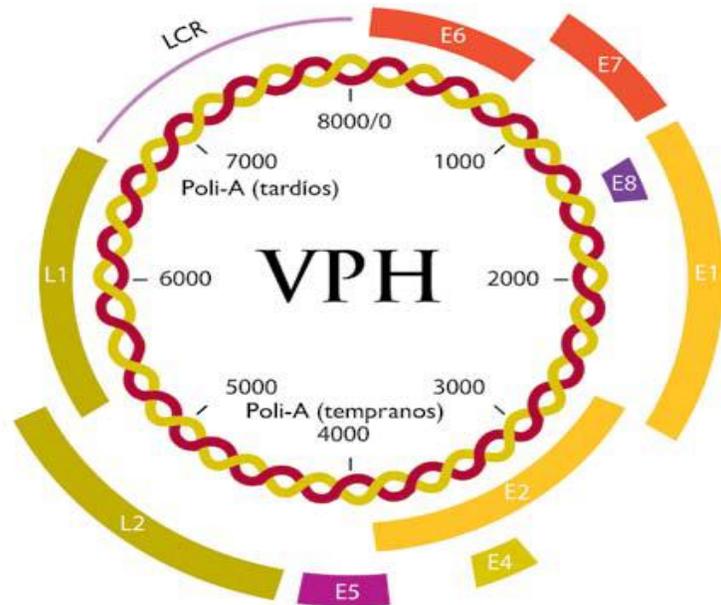
Figura 5. A) Representación del VPH. B) Micrografía electrónica del VPH.<sup>18</sup>

Las partículas virales están compuestas por una cápside proteica, conformada en un 95% por la proteína L1 y en un 5% por la proteína L2, las cuales se ensamblan para formar capsómeros heicosaédricos<sup>19</sup>. En el interior de la cápside encuentra el DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases, constituido por ocho genes y una región regulatoria no codificante (LCR), la cual contiene sitios de unión para factores proteicos y hormonales del hospedero, necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación.

El genoma del VPH lo conforman dos tipos de genes, aquellos que son codificados en las etapas tempranas de la infección, conocidos como genes E (del inglés Early), y aquellos que son codificados durante las etapas tardías del ciclo de replicación del mismo, conocidos como L (del inglés Late). Se conocen seis genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6 y E7, y dos tardíos: L1 y L2 (figura 6). Los genes

tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica. Por otro lado los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral.<sup>20,21</sup>

Figura 6. Representación de la organización del genoma del VPH.<sup>20</sup>



### 1.2.1 Ciclo de reproducción del Virus del Papiloma Humano

*Infección y desensamble del virus:* Las partículas infecciosas entran a las células basales o germinales a través de una abertura en el epitelio estratificado. Tal abertura puede ocurrir en condiciones donde la piel tenga alguna lesión o microtrauma. Para los VPH de alto riesgo, como VPH 16, la formación de lesiones cervicales se facilita por la infección de células columnares que después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación. No se ha identificado un receptor de membrana definido para la entrada del virus, aunque el complejo integrina  $\alpha 6 - \beta 4$  se ha propuesto como candidato. Además se ha visto que la entrada depende de la presencia de los proteoglicanos de sulfato de

heparina presentes en la membrana plasmática, que podrían ser el lugar de unión inicial previo a la unión con el receptor.<sup>22,23,24</sup> La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina.<sup>25</sup> El desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, lo que permitiría el transporte del DNA viral al núcleo de esta.<sup>26</sup>

*Mantenimiento del genoma:* Después de la infección y desensamble en las células basales y para mantener su genoma episomal en bajo número de copias, 10 a 200 por célula, se expresan las proteínas E1 y E2,<sup>27</sup> que además facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular. En VPH 31, en líneas celulares epiteliales, se ha visto que si hay una falla para expresar E1, se pierde el estado episomal y el genoma viral se integra al de la célula.<sup>28</sup> La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral, lo que puede requerir la expresión de las proteínas E6 y E7 que estimulan el progreso de la fase de ciclo celular G1 a S.

*Fase proliferativa:* La expresión de E6 y E7, de un ARNm bicistrónico bajo el control del promotor temprano en la LCR, evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que esta migra al estrato suprabasal del epitelio. Estas proteínas retardan la diferenciación celular<sup>29</sup> y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables del control del ciclo celular.

*Amplificación del genoma y síntesis de los viriones:* Para que se produzcan viriones infecciosos, los VPH deben amplificar su genoma y empaquetarlo en la partícula proteica. Esto ocurre en las capas superiores del epitelio, en el estrato espinoso, donde aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de la diferenciación. Este promotor se halla en el marco de lectura del

gen E7 y promueve la transcripción de proteínas involucradas en la replicación del DNA viral, tales como E1, E2, E4 y E5, así como las constituyentes de la cápside,

L1 y L2. Para la replicación viral se necesita que E2 se una a la LCR y que promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral. El ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman de la capa superior de este. El virus es estable extracelularmente ya que es resistente a la desecación y puede ser transmitido directamente a otros individuos. Alternativamente las células infectadas permanecen en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a una nueva superficie epitelial, como ocurre en virus que infectan superficies cutáneas. El VPH no es lítico y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye al egreso del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina.<sup>30</sup>

### **1.2.3 Asociación del Virus del Papiloma Humano con el Cáncer cérvicouterino**

Se han identificado más de 100 tipos virales, estos VPH muestran tropismo por sitios anatómicos específicos, siendo comunes las infecciones de piel y de mucosas del tracto oral, respiratorio y anogenital.<sup>31</sup> Un tipo se diferencia de otro en que los aminoácidos estructurales de la proteína mayor L1 de su cápside presenta una diferencia secuencial superior al 10%.<sup>32</sup>

Estos virus se clasifican en cutáneos y mucosos. Los tipos de VPH mucosos asociados con lesiones benignas (tipos 6 y 11 principalmente) son conocidos como tipos de "bajo riesgo" y se encuentra preferentemente en los condilomas acuminados, mientras que aquellos tipos asociados a lesiones malignas (tipos 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, 68, 73 y 82 principalmente) son conocidos como virus de "alto riesgo".<sup>2, 3</sup> Entre ellos, los VPH

16 y 18 son los oncogénicos más comunes, pues causan aproximadamente el 70 % de los cánceres cervicales en todo el mundo.

El riesgo relativo de la asociación entre infección por HPV y neoplasia cervicouterina es de alta magnitud, en un rango mayor que para la asociación entre tabaquismo y cáncer pulmonar y es comparable solamente al de la asociación entre hepatitis B crónica y cáncer hepático, relaciones causales que son indiscutibles. La evidencia reciente ha mostrado que el ADN del VPH está presente en el 99,7% de los casos.<sup>33</sup>

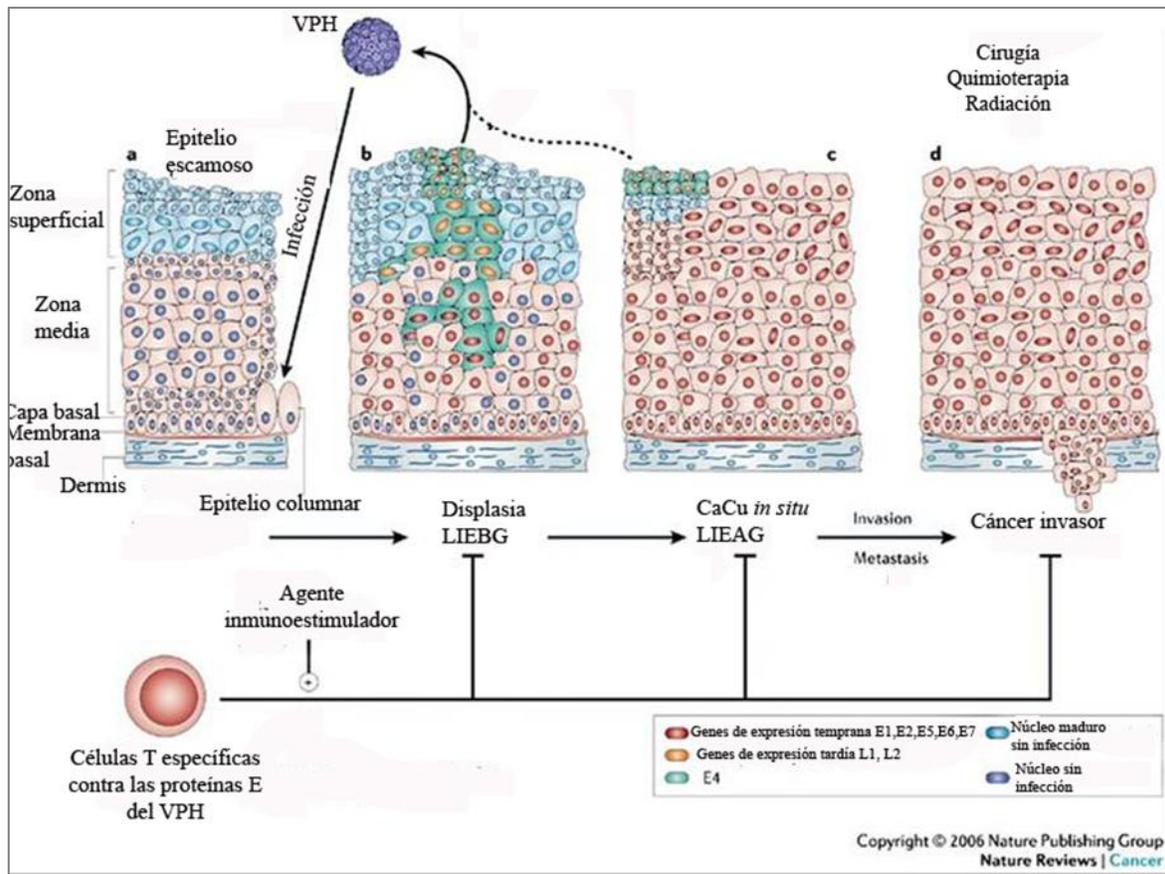


Figura 7. Ciclo de reproducción del genoma viral del VPH en el epitelio cervical.<sup>34</sup> a) El virus infecta a las células basales. b) se genera la displasia (o lesión intraepitelial de bajo grado LSIL) por la persistencia del virus y se empiezan a expresar los genes tempranos y tardíos. c) la displasia sigue evolucionando hasta invadir el epitelio en su mayor parte (lesión intraepitelial de alto grado HSIL). d) se genera el cáncer invasivo, pues las células cancerígenas atraviesan la membrana basal.

#### 1.2.4 Técnicas de detección molecular del Virus del Papiloma Humano

El VPH no puede ser mantenido en cultivos celulares convencionales, y los ensayos serológicos tienen una precisión limitada. La infección por el VPH es seguida por una respuesta inmune humoral contra la proteína principal de la cápside y los anticuerpos permanecen detectables por muchos años, por lo que la serología no es adecuada para distinguir las infecciones pasadas y presentes. Por consiguiente, el diagnóstico preciso de la infección por VPH se basa en la detección del ácido nucleico viral (figura 8).<sup>35</sup>

El ADN del VPH puede ser detectado de las muestras cervicales por diversos métodos, de los cuales la hibridación *in situ* es complementaria a la citología. Este método se basa en el uso de sondas marcadas que se hibridan específicamente al ADN del VPH, sin embargo, la sensibilidad de este método es limitada, además de que la identificación de los genotipos del VPH requiere el uso de sondas específicas, demandando la realización de múltiples experimentos de hibridación *in situ*. Entonces, la necesidad de aumentar la sensibilidad ha llevado al desarrollo de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, aumentando también la especificidad de la detección del ADN viral.

*Sistemas de amplificación de la señal:* El sistema de captura de híbridos (hc2, Digene Corp., EE.UU.) es un método no radiactivo de amplificación de señal basado en la hibridación del ADN diana del VPH con sondas marcadas de ARN en solución. Los resultantes híbridos ADN-ARN se capturan en pocillos de microtitulación y se detectan mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico y un sustrato quimioluminiscente, proporcionando una medida semi-cuantitativa del ADN del VPH.<sup>36</sup> Este ensayo se ha convertido en el estándar en muchos países, es ampliamente utilizado en estudios clínicos, y tiene la aprobación de la FDA. Sin embargo, hc2 tiene algunas limitaciones, pues puede distinguir entre los grupos de alto riesgo y de bajo riesgo, pero no permite la identificación de genotipos específicos del VPH, además, el límite de detección es de aproximadamente 5000 equivalentes de genoma, lo que lo hace menos sensible que la PCR.

*Amplificación de secuencia blanco:* La PCR es el método de amplificación de secuencia diana más usado. Se pueden usar oligonucleótidos que amplifiquen la secuencia de un tipo de VPH específico, sin embargo, esta metodología es poco práctica para tamizar. El tamizaje puede hacerse entonces mediante el uso de oligonucleótidos que amplifiquen una región conservada de diferentes VPH.<sup>37</sup> de esta manera se estarían detectando mas de un tipo de VPH. Mediante el uso de la PCR en tiempo real, se puede identificar el tipo de VPH mediante el uso de sondas específicas, además de que mediante una curva estándar se puede obtener la también la carga viral.<sup>38,39</sup>

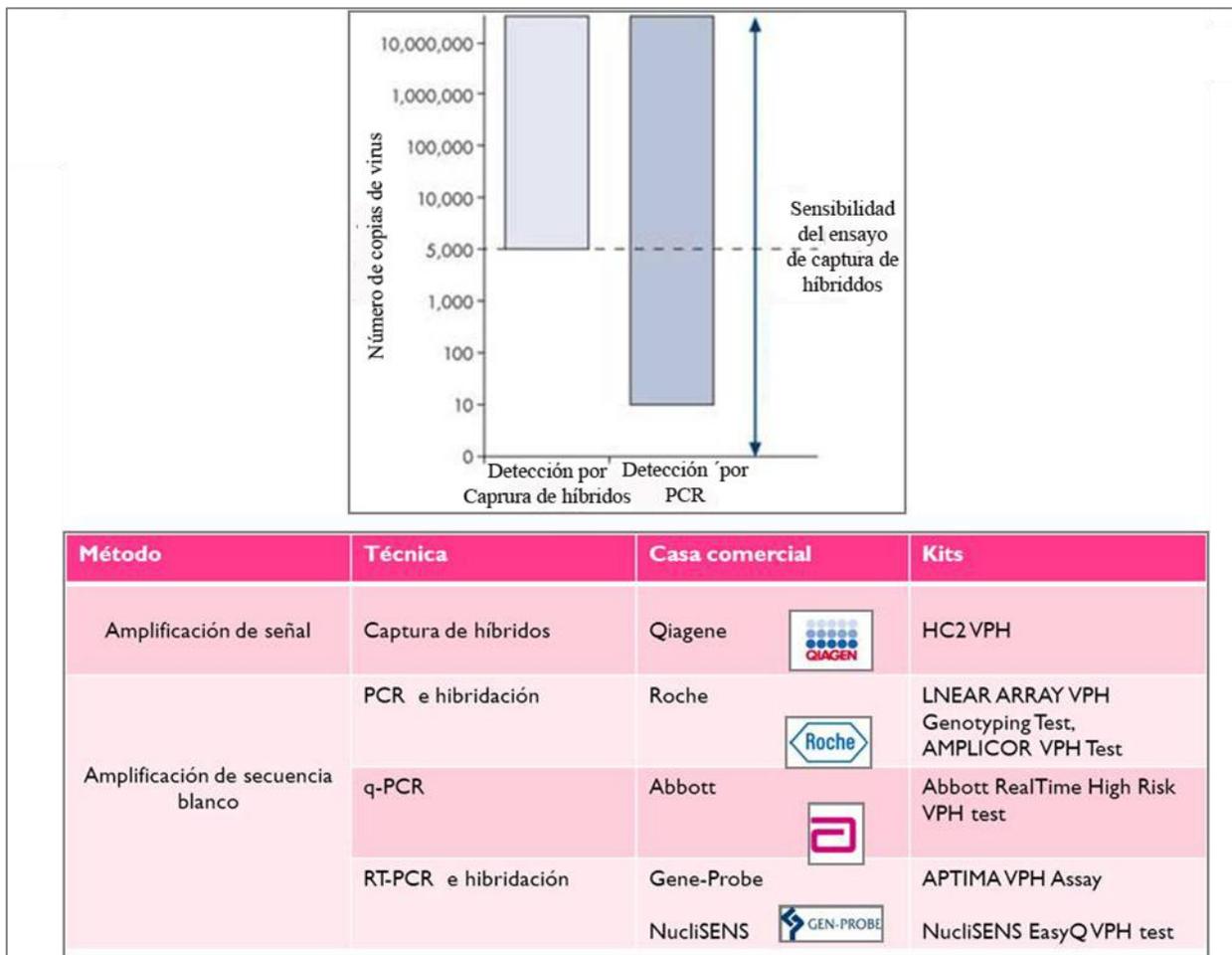


Figura 8. Técnicas de detección molecular del Virus del Papiloma Humano. Comparación de sensibilidad de la técnica de captura de híbridos y la PCR (arriba). Tabla de ejemplos con metodologías empleadas por diferentes casas comerciales en la actualidad (abajo).

### 1.3 ¿Qué son los miRNAs?

Cuando el RNA es extraído de cada tejido o células, se observan un conjunto de moléculas de RNA pequeño. Por muchos años se asumió que la mayoría de las especies de RNA pequeño eran simplemente productos de la degradación de RNA como resultado del procedimiento de extracción de este ácido nucleico. Hoy en día es claro que varias moléculas de RNA pequeño no codificante son una parte integral de la maquinaria celular de expresión génica. Algunos ejemplos bien conocidos incluyen los snRNAs (RNA nuclear pequeño involucrado en el corte y empalme de los pre-ARNm) y los snoRNAs (ARN nucleolar pequeño involucrado en el procesamiento del ARN ribosomal). Sin embargo, estas clases de ARN no son el total de todas las clases de ARN no codificantes. Ahora se sabe que existen clases adicionales de ARN no codificante implicado en el silenciamiento de la expresión génica, los cuales están subdivididos dentro de tres tipos: los siRNAs (ARN pequeño de interferencia) los cuales se unen a su ARNm blanco para su destrucción; otros siRNAs se unen a la cromatina para realizar modificaciones epigenéticas, y los miRNAs o microRNAs.<sup>40</sup>

Los miRNAs son moléculas pequeñas de ARN endógeno que no codifica para proteína y que actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica. Juegan un papel regulador muy importante en animales y plantas uniéndose a los ARNm inhibiendo su traducción a proteína. Forman parte de una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras génicas en organismos multicelulares, influenciando en los niveles finales de muchos genes que codifican para proteínas.<sup>41</sup>

Estos ARN pequeños no codificantes fueron descubiertos en el nematodo *Caenorhabditi elegans* en 1993 por Victor Ambros, Rosan Lee y Rhonda Feinbaum, quienes descubrieron que *lin-4*, un gen que actúa en el control del desarrollo de *C. elegans*, no codificaba para proteína alguna, en cambio transcribía dos ARN pequeños, uno de 61nt y otro de 22nt.<sup>42,43</sup> Se observó que el transcrito de 61nt adoptaba una conformación en horquilla y que este era el precursor del ARN más corto, estos transcritos además, mostraban regiones

complementarias (anti-sentido) a múltiples sitios de la zona 3'UTR del gen *lin-14*(5). Ambros y Ruvkun de forma independiente publicaron que el transcrito pequeño *lin-4* regulaba a *lin-14* a través de su extremo 3'UTR.<sup>42,44</sup> Se descubrió un mecanismo de regulación celular por medio de un transcrito de ARN no codificante de proteína.

Desde el descubrimiento del miRNA *lin-4* en *C. elegans* pasaron 7 años para que se encontrara el segundo gen conocido que codificaba otro miRNA, *let-7*, que pertenecía al mismo nematodo y que codificaba un miRNA de 22nt. Este actuaba promoviendo el desarrollo de la larva tardía hacia la forma adulta de la misma manera que *lin-4* actuaba en el desarrollo temprano, en la transición del primer estadio larvario al segundo.<sup>45,46</sup> A raíz de estos descubrimientos se han encontrado miRNAs en otras especies y ahora sabemos que muchos organismos multicelulares expresan cientos de miRNAs, los cuales presentan un patrón de expresión dependiente del tipo celular y del tejido.

### **1.3.1 Biogénesis de los miRNAs**

Los genes que codifican para los miRNAs están localizados principalmente dentro los intrones de genes que pueden codificar para proteínas, así como también en regiones intergénicas o exogénicas.<sup>40,47</sup> En el primer caso, la expresión de los miRNAs puede ir correlacionada con la regulación transcripcional de su gen huésped y de esta manera explicaría una especificidad tisular debida a la expresión de diferentes grupos de genes. En el segundo caso, la expresión de los miRNAs está regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores.<sup>47</sup>

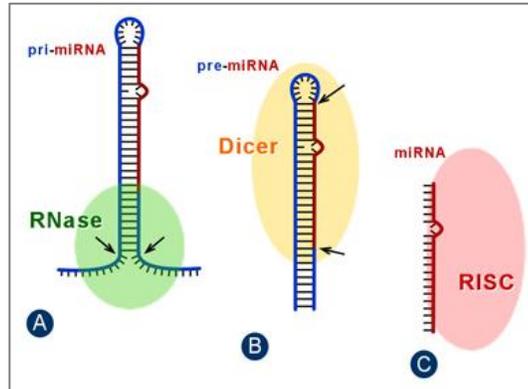


Figura 9. Estructuras de los precursores de miRNAs con la enzima a la que se une a cada uno.

Los miRNAs maduros son moléculas de unos 20-25nt de longitud, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'.<sup>40</sup> Estos derivan de un procesamiento que se inicia en el núcleo de la célula y termina en el citoplasma donde realizan su función. Son transcritos por una ARN polimerasa II que produce una larga molécula de ARN que puede exceder 1kb que se compone de un vástago imperfectamente emparejado, con un bucle terminal y segmentos flanqueantes (figura 9), conocida con el nombre de miRNA primario (pri-miRNA).

El primer paso del procesamiento, se produce en el núcleo, mediante una endonucleasa RNasa III.<sup>48</sup> (conocida con el nombre de Drosha) se escinde el tallo-bucle del resto de la molécula para crear un producto de pre-miARN. Drosha corta de forma asimétrica ambas cadenas en los sitios cercanos a la base de la estructura primaria en forma de horquilla, de forma que el producto resultante es una molécula de unos 60 a 70 nucleótidos denominada pre-miRNA. Este premiRNA es exportado del núcleo al citoplasma de forma activa a través del complejo dependiente de RAN-GTP, Exportina-5. Ran es un cofactor que une GTP durante la exportación nuclear del ARN. En el citoplasma, la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y el premiRNA es liberado del complejo exportador.<sup>49,50</sup> Una vez en el citoplasma, esta molécula de aproximadamente 70nt será cortada por otra endonucleasa RNasa III conocida como DICER<sup>51</sup>, dando lugar a molécula de doble cadena conocida como miRNA dúplex. De este miRNA dúplex, se separan

las dos cadenas y una de ellas da lugar al miRNA maduro de unos 20 a 25 nt que se incorpora al complejo proteico conocido como RISC (del inglés RNA-induced silencing complex), el cual es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del ARNm diana y/o de la inhibición de la traducción, mientras que la otra cadena conocida como miRNA\*, es degradada. Cuando el complejo RISC actúa con el miRNA se le conoce como miRISC.<sup>52,53</sup>

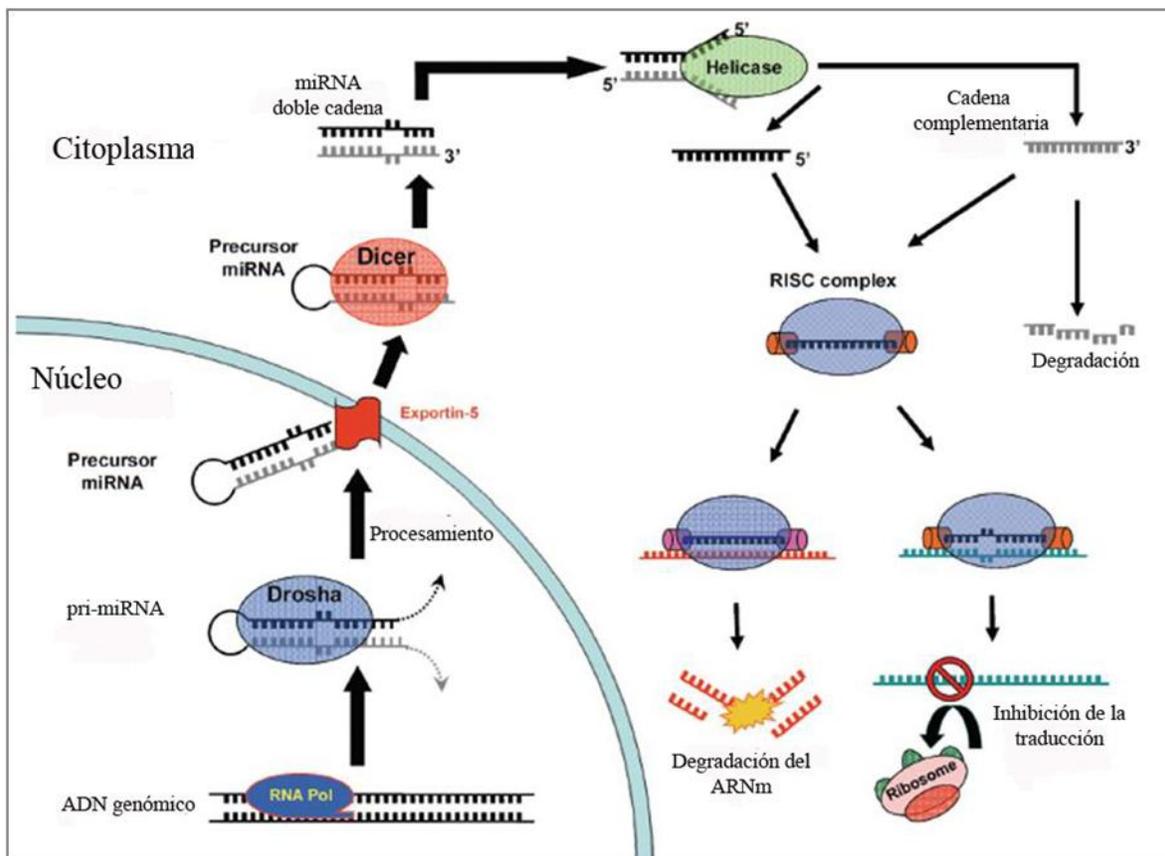


Figura 10. Biogénesis de los miRNAs. La biogénesis de los miRNAs sigue tres etapas secuenciales: 1) La transcripción, por la RNA polimerasa II de un primiRNA; 2) el origen del pre-miRNA en el núcleo y 3) finalmente la formación de un miRNA maduro en el citoplasma.<sup>54</sup>

Los dos pasos cruciales en el ensamblaje de miRISC son: la selección de la cadena de miRNA sentido o anti-sentido, seguido de la potencial destrucción de la otra cadena. No se conocen con exactitud los mecanismos que involucran estos sucesos y no está claro si la cadena sentido es destruida en todas las especies, pero una vez que miRISC se ha ensamblado con la cadena que le hace de guía, este se unirá al ARNm diana en la región 3'UTR para bloquear su traducción.<sup>55</sup>

Aunque algunos miRNAs de animales son producidos individualmente a partir de unidades de transcripción separadas, muchos miRNAs se producen a partir de unidades de transcripción que generan más de un producto. Un transcripto puede codificar grupos distintos de miRNAs, o puede codificar un miARN y una proteína.<sup>56</sup>

### **1.3.2 Mecanismos de los miRNAs**

Los miRNAs regulan la expresión génica a través de dos mecanismos principales: la degradación del ARNm diana o mediante la represión de la traducción. La utilización de un mecanismo u otro dependerá del grado de complementariedad del miRNA con el ARNm diana. Si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del ARNm mientras que si la complementariedad no es total o es insuficiente se producirá una inhibición de la traducción. Según los conocimientos disponibles sobre los siRNA, se cree que serían necesarios al menos 11pb para una elevada afinidad en el reconocimiento del ARNm diana y la unión al miRISC.

Sin embargo, la habilidad de los miRNAs para suprimir la traducción depende enormemente de la energía libre de unión de los primeros 8nt del extremo 5' del miRNA al ARNmdiana.<sup>57</sup> Según lo reportado, un miRNA puede actuar sobre un gran número de genes y varios miRNAs pueden actuar sobre un mismo gen(figura 11).

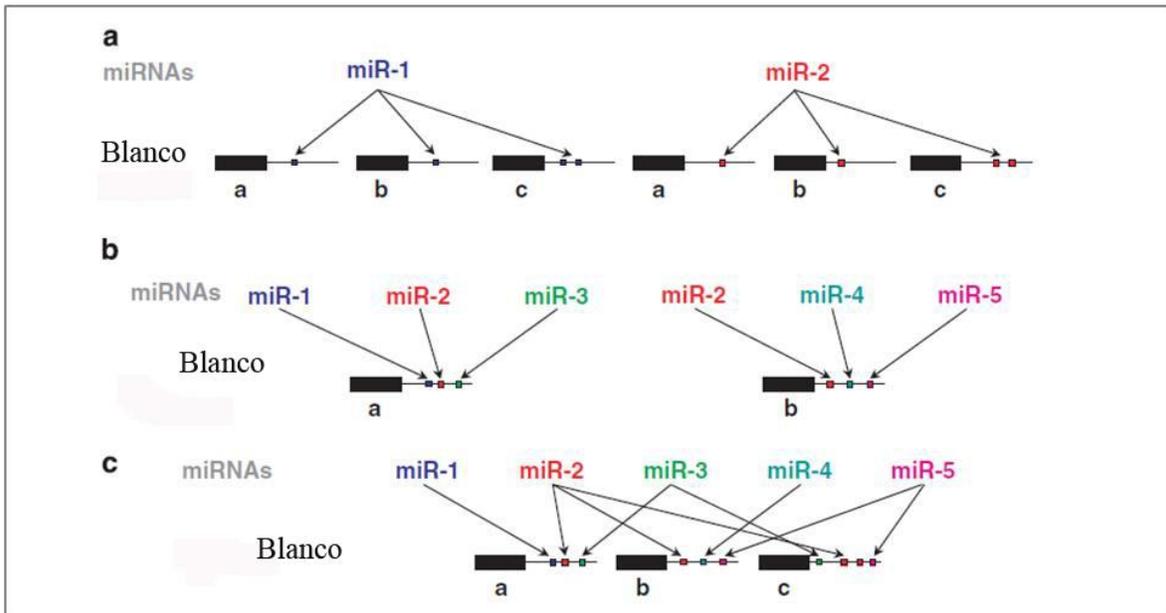


Figura 11. Representación de la relación de miRNAs y sus genes blanco. (a) Los miRNAs tienen múltiples genes blanco. (b) Diferentes miRNAs pueden unirse a un mismo gen. (c) Red compleja de interacción entre los miRNAs y sus dianas.<sup>58</sup>.

Es mediante estos mecanismos que los miRNAs desempeñan un importante papel modulador en diferentes vías de regulación, como lo es el desarrollo de los tejidos, proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis e Infección viral(figura12).

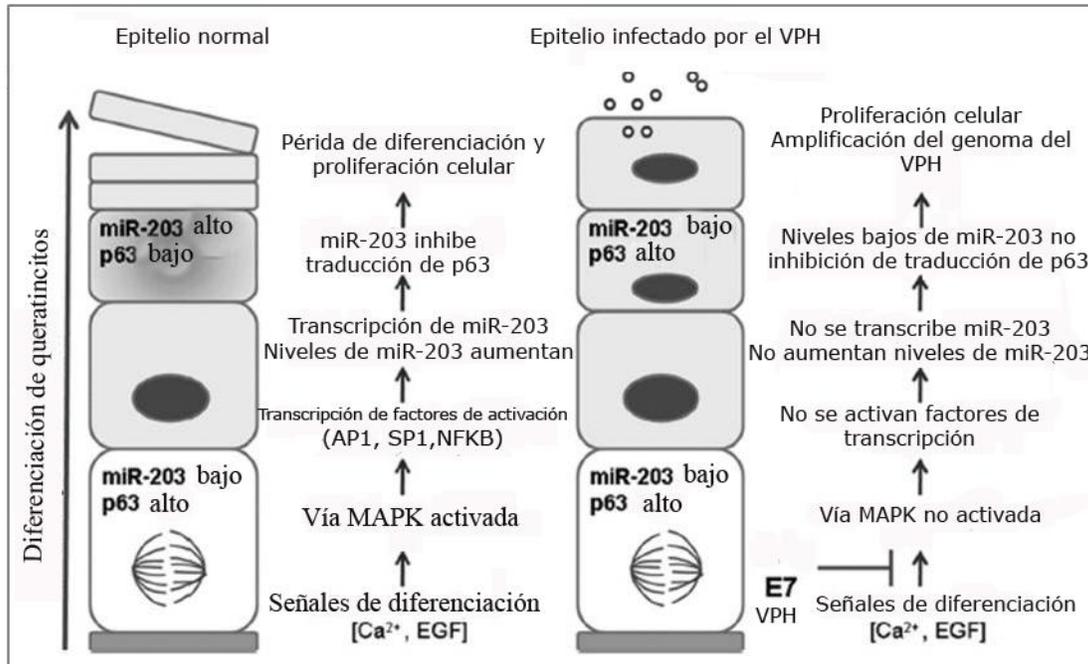


Figura 12. Modelo de la diferenciación y expresión de miR-203 de un epitelio normal y otro infectado con el VPH. El miR-203 es un ejemplo de un miRNA que actúa en la vía de regulación de la proliferación celular del epitelio. En un epitelio normal, a medida que se diferencian los queratinocitos se aumenta la expresión de miR-203, conduciendo a la supresión de la traducción de p63 (proteína implicada en el aumento de la proliferación celular). En un epitelio infectado por el VPH, E7 bloquea la transcripción de miR-203, dando lugar a mayores niveles de p63 en las células suprabasales, las cuales no pierden la capacidad proliferativa.<sup>59</sup>

### 1.3.4 miRNAs en cáncer

Diversos estudios han demostrado una asociación entre la expresión alterada de los miRNAs y el cáncer. Una fracción desproporcionada de los genes que codifican los diferentes miRNAs están en regiones donde la regulación de la expresión de estos genes puede ser potencialmente interrumpida por anomalías cromosómicas. Algo más de la mitad de los genes de miRNAs estudiados se encuentran localizados en regiones genómicas asociadas con cáncer, incluyendo las regiones de pérdida de heterocigosidad y en las regiones de los sitios frágiles.<sup>60</sup>

La localización de los genes de los miRNAs y la alteración general de su expresión en los tumores proporcionan evidencia circunstancial de un papel etiológico de la función de los miRNAs en la formación de tumores. Otra evidencia de la implicación de los miRNAs en la oncogénesis proviene de la demostración de la oncogenicidad o supresión tumoral de los miRNAs en cultivos celulares y en modelos animales.<sup>61</sup>

Refiriéndonos al CaCu, diversos investigadores han encontrado un conjunto de miRNAs sub-expresados (miR-126, miR-143, miR-145, miR-let-7c, miR-100, miR-125b, miR-143, miR-145 y miR-199a-5p) y otro conjunto sobre-expresado (miR-15b, miR-16, miR-146a, miR-155, miR-21) en células del cérvix de mujeres con cáncer cérvicouterino.<sup>62,63,64,65,66</sup> En líneas celulares de cáncer de cérvix infectadas con el VPH también se ha medido la expresión de los miRNAs y se han descubierto diversos de estos ARN pequeños desregulados, tal es el caso de miR-324-5p, miR-203, miR-23b y miR-205.<sup>59,66</sup> A la fecha no se sabe en qué vía de regulación podrían estar participando la mayoría de los miRNAs mencionados, sin embargo, se sabe que miR-23b está implicado en la regulación de la migración celular mediante la degradación del ARNm de uPA<sup>66</sup> (una serín proteasa involucrada en la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular, lo que lleva a la invasión de células tumorales y metástasis) y que el miR-203 participa en la vía de regulación de la proliferación celular mediante la degradación del ARNm de p63<sup>66</sup> (proteína involucrada en la regulación de la diferenciación, proliferación celular, apoptosis y morfogénesis del tejido epitelial). Ambos miRNAs (miR-23b y miR-205) son desregulados por las proteínas virales (E6 y E7 respectivamente) del VPH de alto riesgo en las células de cáncer de cérvix en cultivo, causando un aumento en la migración y proliferación celular.

Otro ejemplo de un miRNA desregulado en cáncer es el miR-122, pues en hígado de pacientes con CHC por el VHC se encuentra su expresión reducida. Se

ha demostrado que miR-122 regula positivamente la replicación y la producción viral mediante la unión de este ARN pequeño a dos sitios adyacentes cercanos al extremo 5' del ARN del VHC.<sup>67,68</sup> Sin embargo, el mecanismo de regulación aún no se entiende completamente.

Además de miR-122, se ha descubierto otro miRNA modulador en la enfermedad hepática, el miR-34a, que es un mediador central de la función de p53<sup>69</sup>. Mientras la mayoría de los estudios reportan una sub-expresión de miR-34a en diferentes cánceres humanos, en pacientes con CHC se ha encontrado aumentada su expresión,<sup>70</sup> así como en un modelo de ratón de la esteatohepatitis.<sup>71</sup>

Aunque miR-122 es un miRNA encontrado principalmente en hígado, se han realizado descubrimientos de este miRNA en la circulación, así como también mi-34a. Cermelli y colaboradores aportaron, que en pacientes con CHC, los niveles séricos de miR-122 y miR-34a eran significativamente mayores que en los controles, además los niveles de estos miRNAs se encontraron correlacionados positivamente con la severidad de la enfermedad.<sup>72</sup>

### **1.3.5 miRNAs circulantes**

Los primeros en observar que los miRNAs están presentes en fluidos biológicos fueron Chim y colaboradores, quienes encontraron miRNAs placentarios en plasma de la sangre materna en concentraciones fácilmente detectables.<sup>73</sup> Casi al mismo tiempo, Lawrie y co-autores informaron la detección de varias especies de miRNAs asociados a tumores en las muestras de suero de pacientes con linfoma difuso de células B. Los autores también, por primera vez, sugirieron que los genes de los miRNAs podrían tener potencial como biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer.<sup>74</sup> Sin embargo, se desconoce si los miRNAs detectados por Lawrie y colaboradores

derivan de las células tumorales o el resultado de tipos de células no malignas como respuesta al cáncer. En el mismo año, el grupo de Tewari puso de manifiesto que los miRNAs libres presentes en el plasma sanguíneo y el suero se encontraban en una forma muy estable.<sup>75</sup> Finalmente, Chen y colegas confirmaron la presencia de miRNAs resistentes a nucleasas en el suero sanguíneo y se demostró que sus niveles de expresión eran reproducibles y consistentes entre individuos. Además, se observó que los perfiles de miRNAs en suero de pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer colorrectal, y diabetes diferían en comparación con los donantes sanos.<sup>76</sup>

Una serie de informes ha revelado consistentemente la presencia de miRNA en todos los otros fluidos corporales como la saliva, leche materna, orina, plasma, líquido seminal, lágrimas, líquido amniótico, calostro, lavado bronquial, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal y líquido pleural.<sup>77,78,79</sup> Tanto la concentración total de los miRNAs y su composición relativa varían significativamente entre los diferentes tipos de líquidos. A pesar de la acumulación de evidencia de la presencia de miRNAs en los fluidos corporales, la función de estos aún sigue siendo poco conocida. Una de las ideas más interesantes es que los miRNAs extracelulares son usados como mediadores de la comunicación célula-célula.<sup>80,81</sup>

Además de la función, aún no hay una opinión común sobre el origen de los miRNAs extracelulares. Una razón parcial de esto podría ser que los miRNAs extracelulares no son una población homogénea. Pues se ha demostrado la presencia de los miRNAs en vesículas lipídicas, exosomas o unidos a proteínas de la familia Argonauta.<sup>82,83</sup> Las micro-vesículas lipídicas o la unión a estas proteínas, pueden ser entonces las responsables de la estabilidad de estos ARN pequeños evitando la degradación por medio de las ribonucleasas.

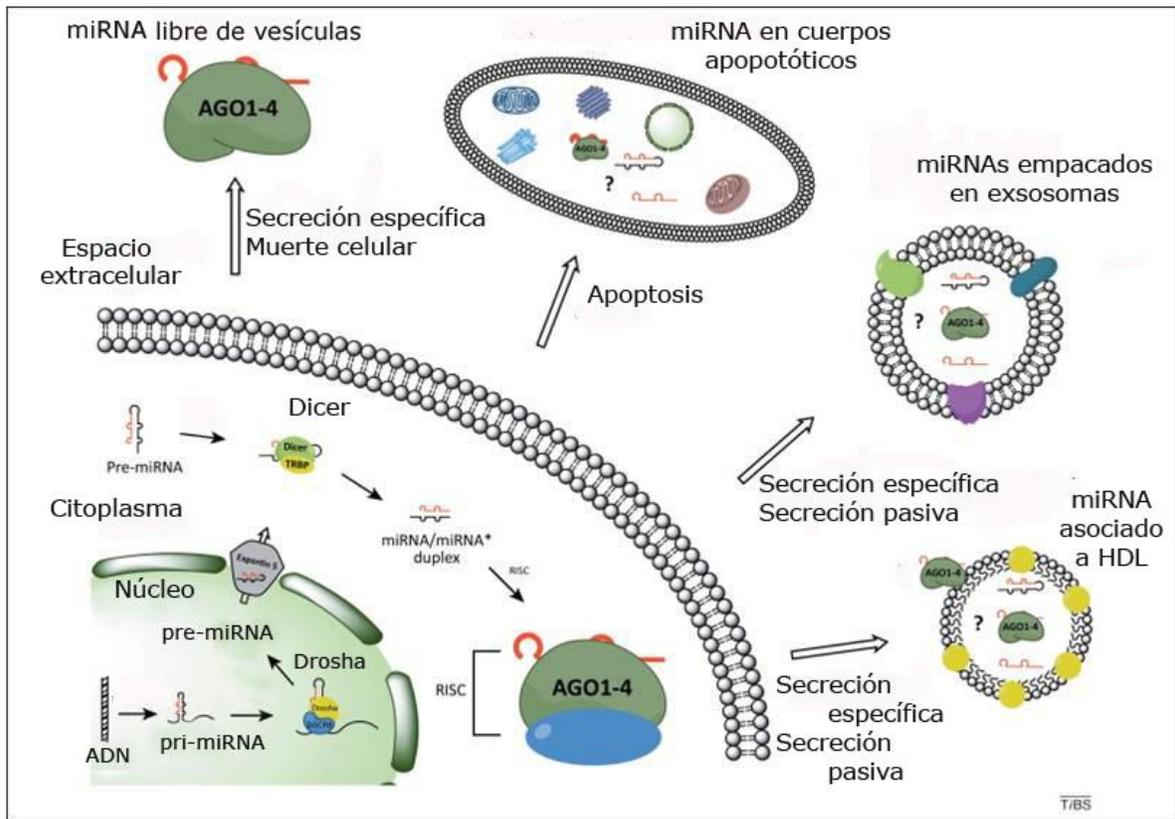


Figura 13. Representación de las distintas formas en las que se encuentran los miRNAs circulantes.<sup>84</sup>

Se ha visto que los cambios en los espectros de los miRNAs en ciertos fluidos se correlacionan con diversas condiciones patológicas (tabla 1), se sabe también que la secuencia de la mayoría de los miRNAs está conservada entre diferentes especies, que son estables en diversos fluidos corporales y que su nivel puede ser medido por diversas metodologías, lo que sugiere que los miRNAs extracelulares pueden servir como biomarcadores informativos para evaluar el estado patológico del cuerpo.<sup>77,78,79</sup>

<b>Tipo de Cáncer</b>	<b>miRNAs desregulados circulantes</b>
<b>Cáncer de próstata</b>	15 miRNAs sobre-expresados en suero de pacientes con cáncer de próstata en el estadio 3 y 4 (miR-16,-92a, -103, -107,-197,-34b,-328,-485-3p, -486-5p, -92b, -574-3p,-636,-640, -766, -885-5p).
<b>Cáncer de mama</b>	48 miRNAs fueron diferencialmente expresados en plasma (22 sobre-expresados, 26 sub-expresados) Sobre-expresión de miR-10b y -34a Sub-expresión de miR-195 y let-7 <sup>a</sup>
<b>Cáncer colorrectal</b>	Niveles elevados de miR-29a, 92a, miR-17-3p en suero
<b>Cáncer de vejiga</b>	Niveles elevados de miR-126 y miR182 en orina
<b>Cáncer oral</b>	Nivel elevado de miR31 en plasma Nivel bajo de miR-125 y 200a en saliva
<b>Cáncer de pulmón</b>	Niveles altos en plasma de 11 miRNAs (incluyendo miR-7i, -146b, -206, y -21) fueron asociados a pacientes con menor supervivencia. Los niveles de cuatro miRNAs fueron asociados a supervivencia. (miR-486, -30d, -1, -499).
<b>Cáncer de ovario</b>	miR-21, 92, 93, 126 and 29a fueron sobre-expresados en suero y miR-155, -127 y -99b fueron sub-expresados. Niveles altos de ocho miRNAs en suero: miR-21, -141,-200a,-200b,-200c, -203, -205,-214.

Tabla 1. miRNAs circulantes desregulados en enfermedades humanas.<sup>85</sup>

### JUSTIFICACIÓN

Los miRNAs han recibido una atención creciente a causa de numerosos informes sobre su desregulación en las enfermedades humanas y su potencial uso como dianas diagnósticas y terapéuticas.

Algunos autores han asociado la infección viral con la desregulación de los niveles de microRNAs circulantes en plasma, como es el caso de miR-122, que además de desregularse su expresión en células del hígado de pacientes con CHC por el VHC también se desregula en plasma.

A la fecha no se han realizado estudios sobre la expresión de los miRNAs presentes y/o desregulados en la circulación sanguínea de mujeres infectadas con el VPH o con CaCu, entonces, sería interesante conocer si existe relación entre la infección del VPH de alto riesgo en cérvix con perfiles de microRNAs circulantes en plasma, pues si se identificaran microRNAs circulantes en plasma asociados con la infección por el VPH de alto riesgo en cérvix, podrían estos ser de gran utilidad como biomarcadores diagnósticos de la infección.

Aún no se sabe el papel que juegan los miRNAs en la circulación sanguínea, sin embargo, se ha planteado que podrían participar en la comunicación celular, por lo que identificar en la circulación miRNAs reportados desregulados en células de cérvix de mujeres con CaCu, podría ayudar a elucidar mecanismos moleculares de patogenicidad de esta enfermedad.

### OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Analizar la expresión global de miRNAs presentes en plasma de mujeres infectadas con el VPH de alto riesgo y compararlo con el perfil de expresión miRNAs de mujeres sin infección para determinar si existe un perfil diferencial inducido por la presencia de proteínas virales (tipo-especifico) y/o el grado de lesión presentado.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Identificar en las mujeres que acuden a estudio de Papanicolaou la presencia de cambios citológicos en cérvix.
2. Identificar en las mujeres que acuden a estudio de Papanicolaou la presencia del VPH de alto riesgo.
3. Determinar el perfil de expresión de miRNAs en muestras de plasma de las mujeres negativas o positivas para la presencia de genotipos de VPH de alto riesgo incluidas en el estudio.
4. Analizar si existe una asociación entre los perfiles de expresión de los miRNAs circulantes en plasma con la infección por VPH y/o el grado de lesión.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 Lugar de realización del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, así como también, en el laboratorio de la Unidad de Hematología del Hospital Universitario, ambos de la UANL.

#### 4.2 Grupo de estudio

Se tomaron muestras de tejido cervical 198 mujeres que acudieron a realizarse análisis de citología cervical mediante Papanicolaou en las diferentes clínicas del programa de Salud-UNI:

- Centro de Salud Fomerrey No. 4 SSNL
- Centro de Salud Fomerrey 13 SSNL
- Clínica de Atención Integral para adolescentes y Jóvenes UANL
- Clínica Universitaria Pueblo Nuevo UANL
- Clínica Universitaria San Rafael UANL
- Clínica Universitaria Unidad Habitacional Independencia UANL
- Clínica Universitaria Vicente Guerrero UANL

También se incluyeron pacientes que acudieron a la clínica de displasias del Hospital de Ginecología y Obstetricia del IMSS de Monterrey, Nuevo León. El tipo de población que acudió a estos centros de atención y que participó en este estudio lo conformaron mujeres de un estrato socio-económico bajo.

Los criterios de inclusión para el tamizaje de citología cervical y/o infección por el VPH AR fueron los siguientes: mujeres mayores de 18 años, no embarazadas, sin histerectomía, que hayan acudido a consulta de revisión, que aceptaran participar en el estudio y que hubieran firmado hoja de consentimiento

informado para este estudio, aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UANL con número de registro BI09-004.

De las 198 muestras de plasma de las mujeres que participaron en el procedimiento, se seleccionaron 23 para conformar los cuatro grupos de estudio y posteriormente realizar el análisis de expresión de miRNAs.

- El primer grupo de 6 muestras se compuso de muestras de plasma de mujeres que no presentaron cambios en la citología de cérvix y no presentaban la infección por un VPH AR.
- El segundo grupo de 6 muestras se compuso de muestras de plasma las mujeres sin cambio en la citología de cérvix y con infección por un VPH AR.
- El tercer grupo se formó por muestras de plasma de mujeres con displasia y con infección por un VPH AR.
- El cuarto grupo estuvo integrado por muestras de plasma de mujeres con CaCu y con infección por un VPH AR.

Se excluyeron del estudio las muestras de plasma que presentaban hemólisis de glóbulos rojos y/o que la cantidad de plasma no fue suficiente para la extracción del ARN total.

## **4.3 Materiales**

### **4.3.1 Consumibles**

Para la toma de muestra de sangre se emplearon tubos con anticoagulante EDTA y agujas para toma múltiple de la marca BD Vacutainer® Para la toma de muestra de cérvix se emplearon cepillos de la marca BD Cervex-Brush® y el medio de transporte BD SurePath®.

Se emplearon placas ópticas de reacción de 96 pocillos de la ABBOTT. Para todos los procedimientos en los que fueron necesarios, se emplearon puntillas para las micropipetas de la marca BarrierTips y microtubos de la marca Axygen, Inc.

#### **4.3.2 Reactivos**

Para llevar a cabo la extracción de ADN se utilizaron los reactivos del estuche mSamplePreparationSystem<sub>DNAY</sub> para llevar a cabo la q-PCR se emplearon los reactivos del estuche RealTime High Risk HPV, ambos de los laboratorios de ABBOTT.

Para llevar a cabo la extracción de RNA se empleó el estuche de extracción *mirVana<sup>TM</sup>miRNA Isolation* de Life Technologies (California, EUA). La cuantificación de ARN se realizó con el estuche *Experion RNA StdSens Starter* (Hercules, EUA).

Para llevar a cabo los microarreglos de expresión de miRNAs se utilizaron los reactivos de los estuches FlashTagBiotin HSR, GeneChipEukaryoticHybridization Control, AffymetrixGeneChip 2.0 miRNAArray de Affimetrix (Santa Clara, EUA).

#### **4.3.3 Material Biológico**

Se procesaron un total de 198 muestras de sangre y 198 muestras de cérvix. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de una vena periférica de cualquiera de los brazos. La muestra de cérvix se colectó mediante cepillado un cepillado de las paredes del cérvix

#### 4.3.4 Instrumentación

Se utilizaron los siguientes equipos: micropipetas Eppendorf Research, Centrífuga modelo 5471r y bloque de calentamiento con agitador Thermomixer *comfort* de la compañía *Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania)*; agitador *Vortex-Genie2 modelo G560* de Scientific Industries, Inc. (Bohemia, EUA); Campana de seguridad Clase II tipo A2 Purifier Logic de Labconco (Kansas, EUA); Termociclador m2000rt de Abbott; estación de electroforesis *Experion™* de BioRad (Hercules, EUA); Horno GeneChip Hybridization modelo 640, *Scanner* modelo 3000 7G y la estación de lavado *Gene Chip Fluidics Station* modelo 450 de Affimetrix, Inc (Santa Clara, EUA).

#### 4.3.5 Programas estadísticos

Para el procesamiento de los datos de expresión de cada chip se empleó el Software *GeneChip Command Console®* de Affymetrix. Este software corresponde a la última generación para sistemas *GeneChip*. Proporciona un conjunto de herramientas para el control del escáner y la integración de los datos que resultan del procesamiento de los microarreglos de expresión. El software resume los datos de intensidad de las sondas de interés y los almacena como archivos con extensión .CEL.

Para el análisis estadístico de los datos guardados como archivos .CEL, se utilizó el software “R” de *The Comprehensive R Archive Network* (<http://www.r-project.org/>). Este software ofrece una gran variedad de estadísticas, tales como, modelos lineales y no lineales, pruebas estadísticas clásicas (prueba T, prueba F), el análisis de series de tiempo, clasificación y asociación de datos (dendogramas). El lenguaje S es a menudo el vehículo de elección para la investigación en metodología estadística, y R proporciona una ruta de código abierto para la participación en esa actividad.

## 4.4 Métodos

### 4.4.1 Estrategia general

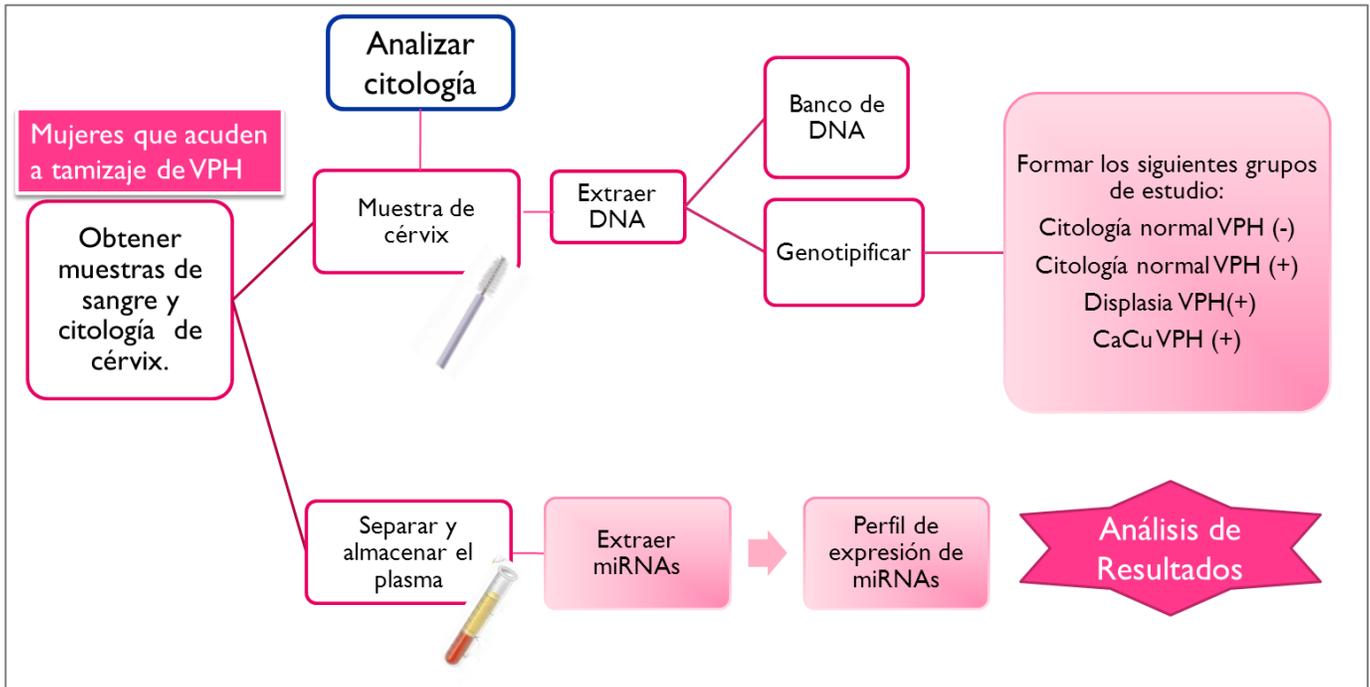


Figura 14. Estrategia general del procedimiento realizado para este estudio. Se tomaron muestras de sangre y de cérvix de las mujeres que llegaron a consulta de revisión para la prevención del CaCu y que aceptaron participar en el estudio. Se realizó un tamizaje citológico y/o de la infección por el VPH AR para formar cuatro grupos de estudio: el primero de mujeres con citología negativa y sin infección por el VPH AR; el segundo, de mujeres con citología negativa y con infección por el VPH AR; el tercero de mujeres con displasia y con infección por el VPH AR y el cuarto de mujeres con CaCu y con infección por el VPH AR. Se extrajo el ARN total de 23 muestras de plasma que conformaron los cuatro grupos y se realizaron los microarreglos de cada una de estas.

## **4.4.2 Toma de muestras**

### **4.4.2.1 Toma de cepillado de cérvix**

La toma de muestras cérvicouterinas se realizó de la siguiente manera: se introdujo un espéculo en la vagina para poder separar las paredes vaginales y visualizar el cuello uterino, de este modo se realizaron dos tomas de las paredes vaginales o del exudado vaginal en el fondo de saco posterior de la vagina:

- La primera toma se hizo con espátula de aire y se colocó el material celular en portaobjetos y se fijó con el citofijador (isopropanol al 80%).
- La segunda toma se realizó con el cepillo cervex-Brush, se gira 5 veces a la derecha con presión suave y se deposita en el vial con el medio de transporte SurePath.

### **4.4.2.2 Flebotomía**

El procedimiento de extracción de sangre se realizó de una vena periférica. La técnica fue llevada a cabo de la siguiente manera: se limpió el sitio de la punción con un antiséptico (etanol 70%) y se colocó un torniquete alrededor del antebrazo para aplicar presión y limitar el flujo sanguíneo a través de la vena, luego, se introdujo una aguja en la vena y mediante el sistema *vacutainer*, se recogieron 5ml de sangre en un tubo de recolección de 5ml con EDTA. Una vez recolectada la sangre, se retiró la aguja y se cubrió el sitio de punción para detener cualquier sangrado. Después de la flebotomía, se centrifugaron los tubos a 1,500xg y se separó el plasma, el cual fue almacenado a -80°C.

#### 4.4.3 Análisis de citología de cérvix

Para llevar a cabo el análisis citológico de las muestras de cérvix se colocaron las muestras fijadas en el portaobjetos en una solución de agua destilada y glicerina durante 5 minutos. A continuación se siguió el método de tinción de Papanicolaou, el cual inicia sumergiendo la muestra en etanol 96%, posteriormente se sumerge en agua corriente, para seguir con un paso de tinción con hematoxilina durante 45 segundos; a este paso le sigue un enjuague con agua y nuevamente sumergir en etanol al 96 %. Se sumerge después en colorante OG-6 por 3 minutos, nuevamente se coloca en etanol 96%. Se sumerge ahora en el colorante eosina por 3 minutos, consecuente con esto, se sumerge en etanol concentrado y xilol para finalmente hacer el montaje del portaobjetos con un cubreobjetos.

#### 4.4.4 Extracción de ADN

La extracción de ADN mediante el estuche *mSamplePreparation System<sub>DNA</sub>* se realizó como se describe a continuación.

- Se colocaron 25  $\mu$ L de *mMicroparticles<sub>DNA</sub>* a cada uno de los tubos en los que se procesaría cada muestra. Se agregaron 400 $\mu$ L del buffer *mLysis* y 400 $\mu$ L de muestra a cada tubo microcentrífugo. Se mezcló la solución restante hasta obtener una suspensión uniforme y posteriormente se incubó a 56°C por 10 minutos.
- Finalizada la incubación, se colocaron los tubos en las gradillas con captación magnética hasta que las partículas quedaran capturadas en un costado del tubo para poder retirar y desechar de cada tubo el material lisado.
- Se procedió a agregar 800 $\mu$ L del buffer *mWash1<sub>DNA</sub>* a cada tubo y se re-suspendieron las partículas magnéticas. Se colocaron nuevamente los tubos microcentrífugados en un soporte de captación magnético, se eliminó el *mWash1<sub>DNA</sub>*.

- Se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de *mWash2<sub>DNA</sub>* a cada tubo y se resuspendieron de nueva cuenta las partículas magnéticas en el líquido de lavado. Se colocan los tubos por tercera ocasión en un soporte de captación magnético y se eliminó el *mWash2<sub>DNA</sub>*. Se repitió el lavado con *mWash2<sub>DNA</sub>*.
- Se incubaron los tubos a 75°C durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de *mElutionBuffer<sub>DNA</sub>* a cada tubo y se resuspendieron las partículas magnéticas en el líquido de elución. Seguido a este paso, se colocaron los tubos a 75°C e incubaron durante 10 minutos. Terminado el tiempo, se colocaron los tubos en el soporte de captación magnético para finalmente, guardar en otro tubo el líquido eluido que contenía el ADN.

#### **4.4.5 Identificación y Genotipificación de VPH**

Después de obtenidas las muestras de ADN se procede a realizar la identificación del VPH mediante *Abbott RealTime High Risk HPV*, para esto se realizó el siguiente procedimiento. Como primer paso se preparó la mezcla (para 24 reacciones) de amplificación añadiendo en frasco de enzimas AmpliTaq Gold 278 $\mu\text{L}$  del reactivo de activación y 402 $\mu\text{L}$  del reactivo de oligonucleótidos de VPH. Se agregaron 12.5 $\mu\text{L}$  de esta mezcla a cada pocillo que sería utilizado de la placa de 96 pocillos. A continuación se agregaron 12.5 $\mu\text{L}$  de muestra a cada pocillo que contenía ya la mezcla de amplificación. Se cubrió la placa con el plástico de calidad óptica y se colocó en el termociclador m2000rt. El programa que se utiliza para la amplificación se encuentra bajo patente.

#### 4.4.6 Extracción de ARN

Después de la identificación de las muestras positivas para VPH y las muestras con cambios citológicos de cérvix se procedió a formar los 4 grupos de estudio (tabla 1).

Seguido de esto, se procedió a realizar la extracción de ARN mediante el estuche *demirVana<sup>TM</sup>miRNAIsolation* de las muestras de plasma de las mujeres de cada grupo. El procedimiento se realizó mediante una lisis seguida de una extracción orgánica.

- En un tubo, se agregaron 500µL de plasma y 300µL del Buffer de lisis y se agitó hasta homogenizar. Posteriormente se agregó el reactivo *miRNAHomogenateAdditive* en una relación 1/10, se mezcló y se dejó en hielo durante 10 minutos.
- Se adhirió un volumen de 800µL de ácido-fenol-cloroformo y se agitó durante un minuto. Seguido a esto, se centrifugó el tubo con la mezcla a 10,000xg durante 15 minutos. Se removió la fase acuosa y se transfirió a otro tubo.
- Se agregaron 1.25 volúmenes de etanol al tubo con la fase acuosa y se dejó precipitar toda la noche. A continuación hace pasar por la columna (proporcionada por el estuche) la solución con el ARN centrifugando por 10 segundos a 10,000xg.
- Se realizaron tres lavados, el primero pasando 700µL de *Wash Solution 1* y los últimos dos con 500µL de *Washsolution 2/3* (centrifugando 10 segundos a 10,000xg).
- El filtro que contenía el ARN se colocó en otro tubo y se agregó la solución de elución, se centrifugó 30 segundos a 10,000xg. La solución de ARN obtenido se cargó en el chip del estuche *Experion RNA StdSensStartert* para obtener la concentración.

Grupo	Muestra	Tipo de VPH
<b>Sin cambio citológico</b>	7	Negativo
<b>VPH negativo</b>	77	Negativo
	91	Negativo
	92	Negativo
	172	Negativo
	174	Negativo
<b>Sin cambio citológico</b>	55	VPH 18
<b>VPH positivo</b>	73	VPH 16, AR*
	74	VPH 16, AR*
	86	VPH 16
	126	VPH 16
	129	VPH AR
<b>Displasia</b>	99	VPH AR
<b>VPH positivo</b>	150	VPH 16
	233	VPH AR
	234	VPH 16
	236	VPH AR
	237	VPH 18
<b>CaCu</b>	95	VPH 18
<b>VPH positivo</b>	96	VPH AR
	97	VPH AR
	238	VPH 18
	239	VPH AR

Tabla 2. Grupos de estudio. El primero está formado por las mujeres sin cambio citológico y con resultado negativo para la presencia del VPH de alto riesgo. El segundo grupo está formado por las mujeres sin cambio citológico y con resultado positivo para la presencia del VPH de alto riesgo. El tercer grupo está formado por las mujeres con displasia y con resultado positivo para la presencia del VPH. Finalmente el cuarto grupo se encuentra formado por las mujeres con cáncer y con resultado positivo para la presencia del VPH. *\*Infección concomitante de VPH 16 y otro tipo de alto riesgo.*

#### 4.4.7 Microarreglos para análisis de expresión de miRNAs

Después de obtener el ARN de las muestras de plasma se continuó con la realización de los microarreglos de expresión de miRNAs.

Mediante el estuche *FlashTagBiotin HSR* se realizó el primer paso, el cual consistió en agregar una cola poliA a los miRNAs presentes en la muestra de 150 ng de ARN total.

- Se agregaron a un microtubo 8µL de ARN, 2µL de *Control Oligos*, 1.5µL de *10xReaction Buffer*, 1.5µL de *25mM MnCl<sub>2</sub>*, 1µL de *ATP Mixy* 1µL de *PAP Enzyme*. Realizada la mezcla, se incubó a 37°C durante 15 minutos.

El segundo paso consiste en etiquetar con Biotina a los miRNAs con la cola poliA. A los 15µL del paso anterior.

- Se agregaron 4µL de *5X FlashTagBiotin HSR LigationMix*, 2µL *swT4 DNA Ligase*, se mezcló y se dejó incubar a 25°C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se agregó al mismo tubo 2.5µL de *HSR Stop Solution*.

Como tercer paso, se realizó la hibridación y la tinción mediante los estuches *GeneChipEukaryoticHybridization Control* y *GeneChipWash and Stain*.

- Se agregó a la mezcla realizada hasta entonces lo siguiente: 50µL de *2X HybridizationMix*, 15µL de *27.5% Formamide*, 10µL de *DMSO*, 5µL de *20x EukaryoticHybridization Control* y 1.7µL de *Control Oligonucleotide B2, 3nM*. Se incubó el tubo con la mezcla a 99°C durante 5 minutos, después a 45°C durante 5 minutos. Se aspiraron 100µL de la mezcla y se inyectaron en el *GeneChip 2.0 miRNAArray* para dejar incubando a 48°C y 60rpm durante 16 horas.

- Pasado el tiempo de hibridación, se procedió a realizar el teñido del chip mediante el programa *FS450\_003* de la estación de fluidos *GeneChipFluidicsStation* con 600µL de *Stain Cocktail1*, 600µL de *Stain Cocktail2* y 800µL de *Array Holding Buffer* del estuche *GeneChipWash and Stain*. Finalmente se realizó el escaneo del chip.

RESULTADOS

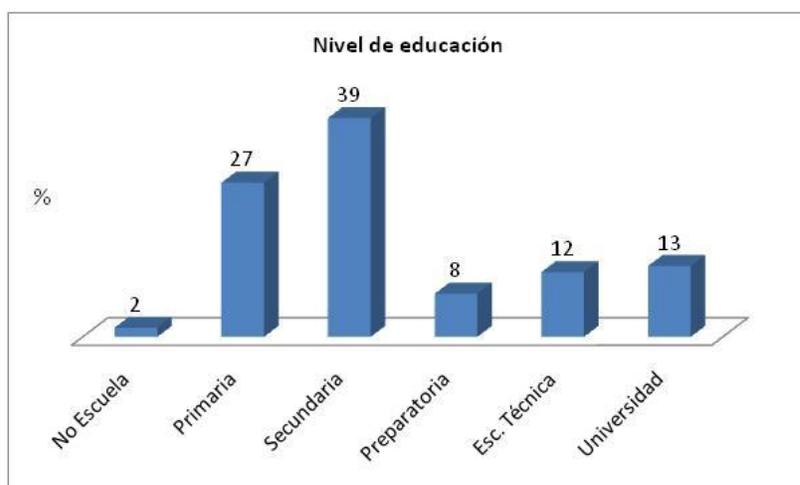
5.5 Datos sociodemográficos de la población muestreada

Se realizó una base de datos sociodemográficos de las 198 mujeres que aceptaron participar en el estudio. La tabla 1 muestra la edad promedio, máxima y mínima de las mujeres incluidas en el estudio.

Edad	
Promedio	39 años
Máxima	72 años
Mínima	18 años

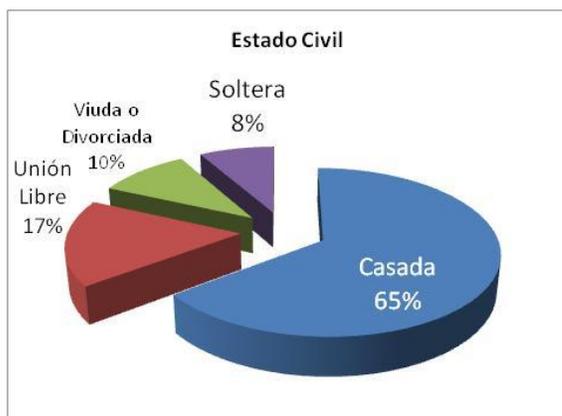
Tabla 3. Edad promedio, máxima y mínima de mujeres incluidas en el estudio.

De las 198 mujeres que aceptaron participar en la identificación y tamizaje del VPH y/o cambios citológicos, el 39% tenía como máximo nivel de estudio la educación secundaria(gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de mujeres que acudieron a los diferentes niveles de educación escolar.

En cuanto al estado civil de las mujeres que participan en el estudio, un 65% eran mujeres casadas, el menor porcentaje lo ocuparon las mujeres solteras, con un 8%(gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentaje de mujeres casadas, solteras, viudas o divorciadas que aceptaron participar en el estudio.

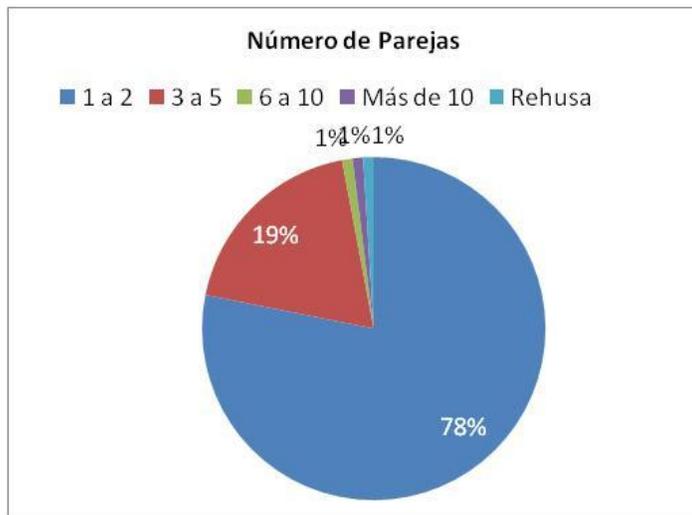
Como ya se mencionó anteriormente, existen diversos factores de riesgo que se asocian al CaCu y a la infección por el VPH, como lo es la edad de la primera relación sexual, el número de parejas sexuales, el número de embarazos, si son mujeres fumadoras o si utilizan píldoras anticonceptivas. A continuación se muestran los datos recolectados de la población muestreada.

La edad promedio de la primera relación sexual del total de las mujeres que acudieron a los centros médicos fue de 19 años. Siendo la mínima de 12 años y la máxima de 32 (tabla 2).

Edad de Primera Relación Sexual	
Promedio	19 años
Máxima	32 años
Mínima	12 años

Tabla 4. Edad promedio, máxima y mínima de la primera relación sexual de las mujeres que aceptaron participar en el estudio.

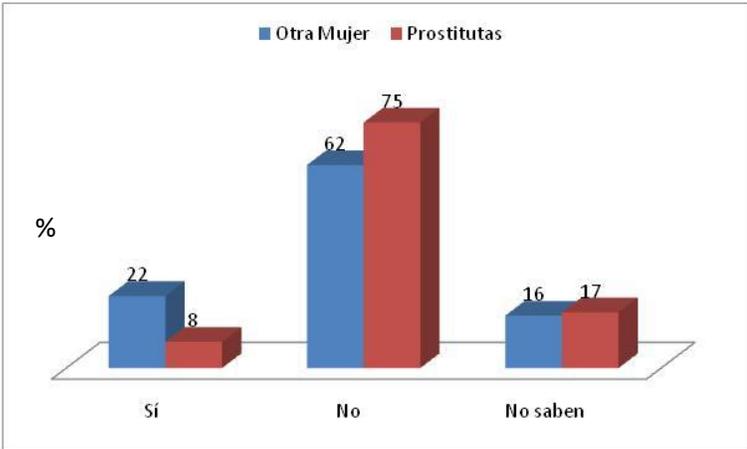
La mayoría de las mujeres que participaron en el estudio afirmaron haber tenido a la fecha de 1 a 2 parejas con las que en algún momento mantuvieron relaciones sexuales, siendo un porcentaje muy bajo las mujeres que tuvieron más de 6 parejas (gráfica 3).



Gráfica 3. Porcentaje del número de parejas de las mujeres que aceptaron participar en el estudio.

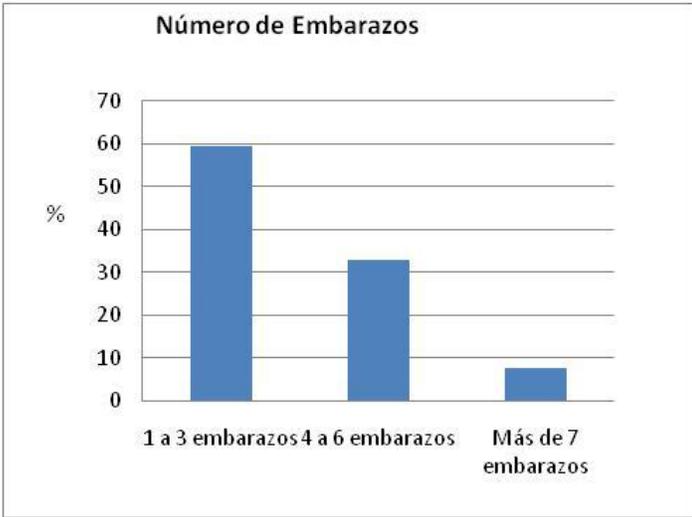
Se les preguntó a las mujeres participantes en el estudio si era de su conocimiento si su pareja mantenía relaciones sexuales con otras mujeres o con

prostitutas, la mayoría respondió que no, sin embargo, un porcentaje considerable respondió que sí o que no sabían (gráfica 4).



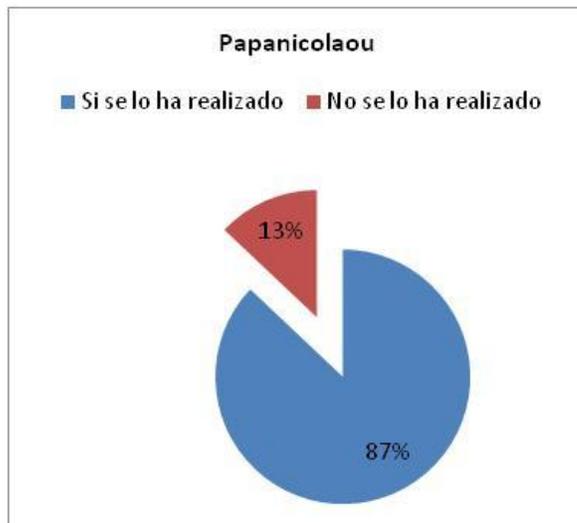
Gráfica 4. Porcentaje de mujeres participantes en el estudio que responden si su pareja mantiene relaciones sexuales con otra mujer o con prostitutas.

El número de embarazos de las mujeres que participaron en el estudio fue de hasta 12 embarazos, sin embargo la mayoría habían tenido a la fecha entre 1 y 3 embarazos (gráfica 5).



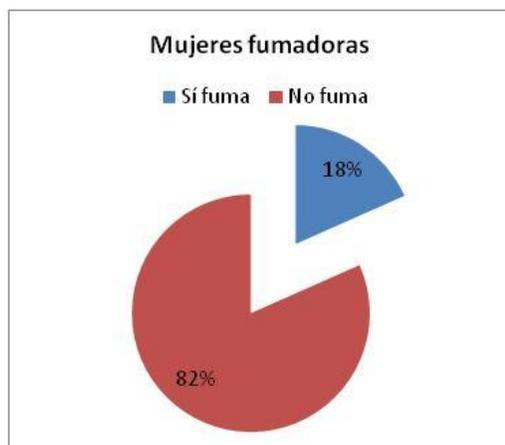
Gráfica 5. Porcentaje del número de embarazos de las mujeres que participaron en el estudio.

Aún y cuando la población de mujeres que acudió a los diferentes centros médicos pertenecía a un estrato socioeconómico bajo, el 87% del total de las mujeres, ya se había practicado antes una prueba de Papanicolaou (gráfica 6).



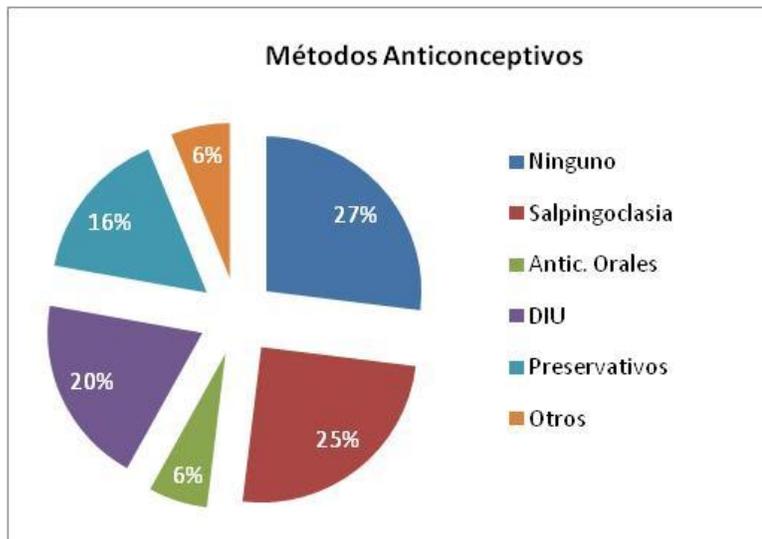
Gráfica 6. Porcentaje de mujeres participantes en el estudio que se han realizado Papanicolaou.

La mayoría de las 198 mujeres participantes, con un 82%, se ubicaron dentro de la población no fumadora (gráfica 7).



Gráfica 7. Porcentaje de mujeres participantes que son fumadoras o no.

Respecto al método anticonceptivo, sólo un 6% de las mujeres que asistieron empleaba anticonceptivos orales. De las 198 mujeres el 27%, no empleaba algún método anticonceptivo y casi el total no utilizaba alguna barrera de protección contra las enfermedades de transmisión sexual, como lo es el uso del preservativo (gráfica 8).



Gráfica 8. Porcentaje de mujeres que emplean los diferentes métodos anticonceptivos.

## 5.6 Identificación de la presencia de cambios citológicos en cérvix

Para la identificación de los cambios citológicos en cérvix se realizó una citología exfoliativa que se tiñó mediante la técnica de Papanicolaou. Fue gracias a esta práctica que se pudieron identificar en las 198 mujeres que acudieron a los diferentes centros de salud la existencia o no de cambios citológicos en cérvix.

En esta sección se muestran los resultados del tamizaje del total de las muestras de cérvix de las mujeres que aceptaron participar en el estudio. En la figura 15 se muestra una micrografía con aumento de 40X de una muestra de cérvix con citología normal.

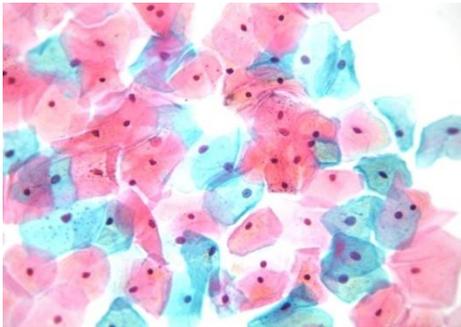


Figura 15. Citología de una muestra normal de cérvix mediante la técnica de Papanicolaou (aumento 40X). Células superficiales extendidas con núcleo picnótico, en parte basófilas.

En la figura 16 y 17 se muestran micrografías con aumento de 40X de dos muestras de cérvix con resultado anormal. La figura 16 corresponde a una citología de cérvix con displasia, que se caracterizan por presentar cambios anormales en la relación núcleo-citoplasma de las células de la superficie del cuello uterino.

Las células anormales que se observan en la figura 17 son resultado del CaCu, en esta figura se observan células características indiferenciadas.

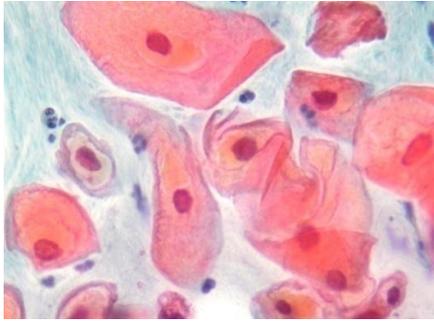


Figura 16. Citología de una muestra con displasia de cérvix mediante la técnica de Papanicolaou (aumento 40X). Células metaplásicas semimaduras y maduras con citoplasmas basófilos, de forma poligonal o redondeada, vacuolas ocasionales y núcleos vitales redondeados.

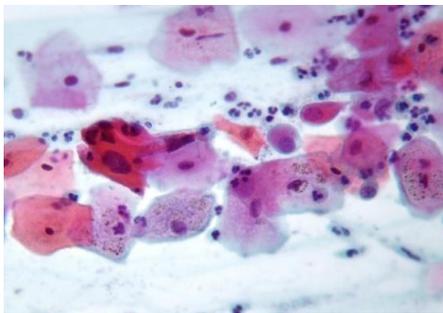


Figura 17. Citología de una muestra con CaCu mediante la técnica de Papanicolaou (aumento 40X). Las células aparecen indiferenciadas, con escaso citoplasma y núcleo relativamente grande.

Del total de las muestras de cepillado cérvicouterino procesadas y tamizadas mediante la técnica de Papanicolaou, 179 presentaron una citología normal, 11 muestras presentaron displasia y 8 fueron las citologías positivas para cáncer cérvicouterino (tabla 4).

Citología	Total
Normal	179
Displasia	11
CaCu	8
Total	198

Tabla 5. Clasificación citológica de las muestras de mujeres que participaron en el estudio.

## 5.7 Identificación y genotipificación del VPH

Mediante Abbott RealTime High Risk HPV se realizó la identificación del VPH AR de las 198 muestras de cérvix. Este es un ensayo cualitativo para la detección del ADN de 14 tipos de VPH de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en muestras clínicas.

Todas las muestras amplificaron el control interno de  $\beta$ -globina. Por lo que el Software arrojó tres resultados para cada una de estas. Uno de los resultados corresponde a la amplificación con la sonda para VPH 16, otro de los resultados corresponde a la amplificación con la sonda para VPH 18 y el último se refiere a la amplificación por algún VPH AR diferente a 16 y 18 (figura 19).

Del tamizaje del total de las muestras de cérvix se obtuvo un 26% de resultados positivos para la presencia de al menos un VPH AR (gráfica 9). De estas muestras positivas la mayor proporción fueron positivas para un VPH de alto riesgo diferente a 16 y 18 (gráfica 10).

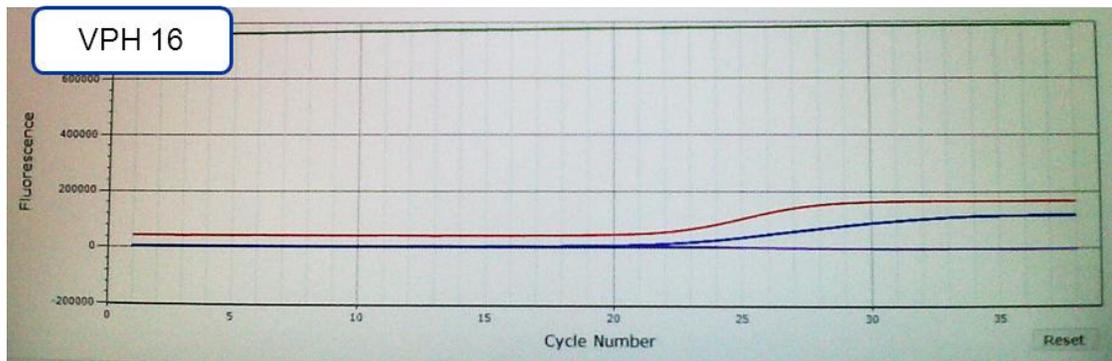
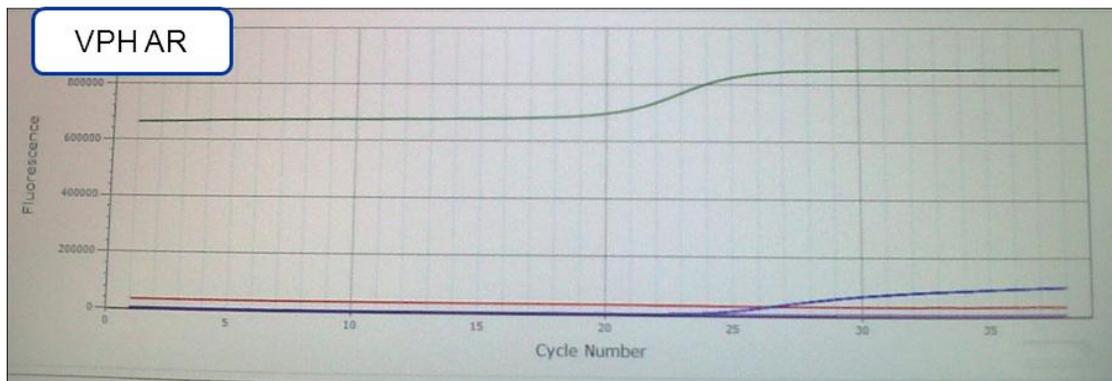
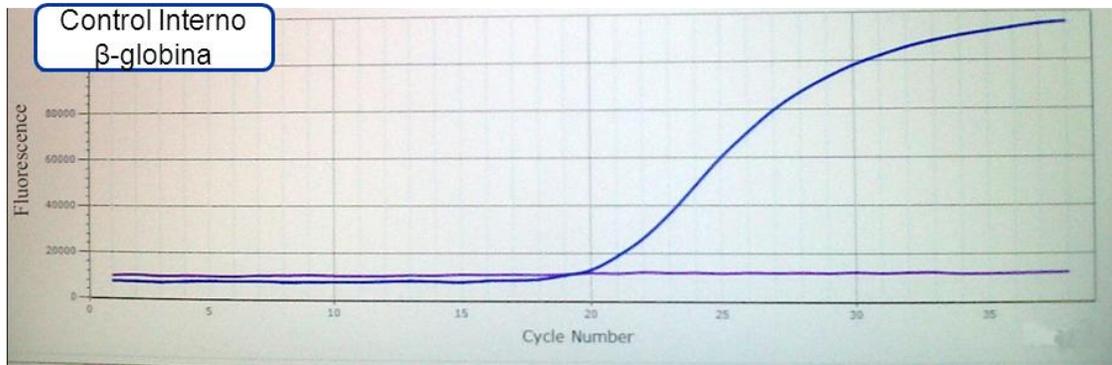
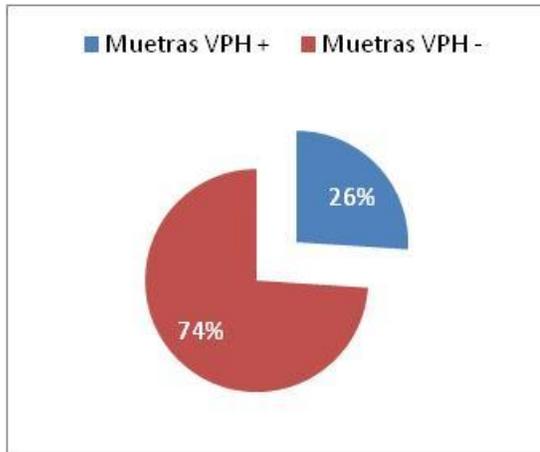
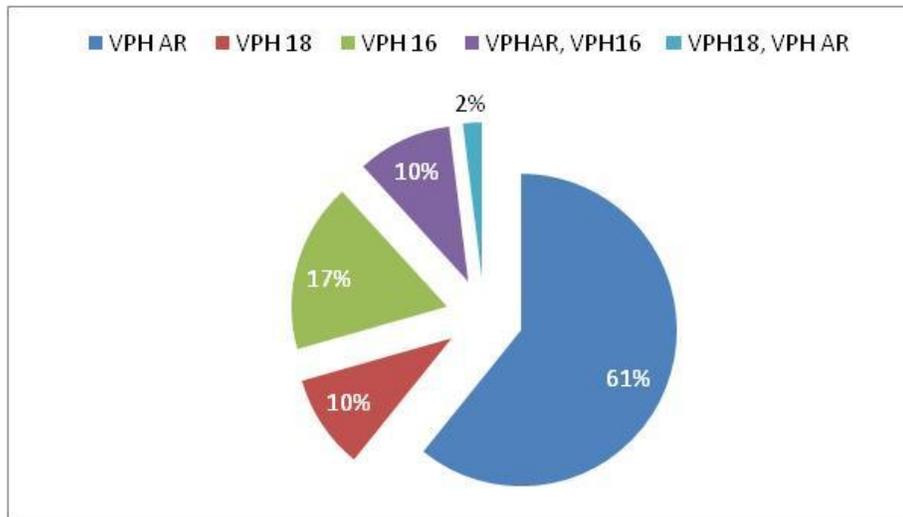


Figura 18. Ejemplos de resultados arrojados por el software del kit de Abbott RealTime High Risk HPV. En región superior se observa que hay amplificación con la sonda de  $\beta$ -globina (línea azul). En la región central se observa amplificación de una muestra positiva para un tipo de VPH de alto riesgo 21, 22, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59, 66, 68 (línea verde) y el control interno de  $\beta$ -globina(línea azul). En la región inferior se muestra la amplificación de una muestra positiva para el tipo de VPH 16 (línea roja) y el control interno (línea azul).



Gráfica 9. Porcentaje de muestras positivas y negativas para la presencia del VPH.



Gráfica 10. Porcentaje de tipos de VPH de las muestras de las muestras positivas.

La tabla 5 muestra el resultado de las citologías analizadas mediante la técnica de Papanicolaou así como también el número de muestras positivas y negativas para la presencia del VPH AR en cérvix del total de las mujeres que participaron en el estudio. La tabla 6 muestra el tipo de VPH presente en las muestras con cambios morfológicos.

<b>Citología</b>	<b>VPH (-)</b>	<b>VPH(+)</b>	<b>Total</b>
Normal	143	36	179
Displasias	1	10	11
CaCu	0	8	8
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>45</b>	<b>198</b>

Tabla 6. Relación de las muestras de cérvix positivas y negativas para la presencia del VPH y la presencia de cambios morfológicos. De las 179 muestras de cérvix sin cambios citológicos, 36 fueron positivas para un tipo de VPH de alto riesgo. De las 11 muestras con displasia sólo una fue negativa para la presencia del virus. El total de las muestras de CaCu fueron positivas para la presencia del VPH de alto riesgo.

Displasias	VPH AR	4
	VPH 16	2
	VPH 18	2
	VPH 16, VPH AR	1
	VPH 18, VPH AR	1
CaCu	VPH 16	4
	VPH 18	1
	VPH AR	3

Tabla 7. Tipo de VPH presente en las muestras de cérvix con cambios citológicos. Los tipos de VPH que se presentan con mayor frecuencia en las muestras de cérvix con displasia o cáncer son el 16 y el 18.

## 5.8 Perfil de expresión de miRNAs de muestras de plasma de mujeres positivas para la presencia de VPH de alto riesgo.

Mediante *Experion™ System* se midió la concentración del ARN extraído de las muestras de plasma. En la figura 20 se muestra el formato de los resultados arrojados por el software.

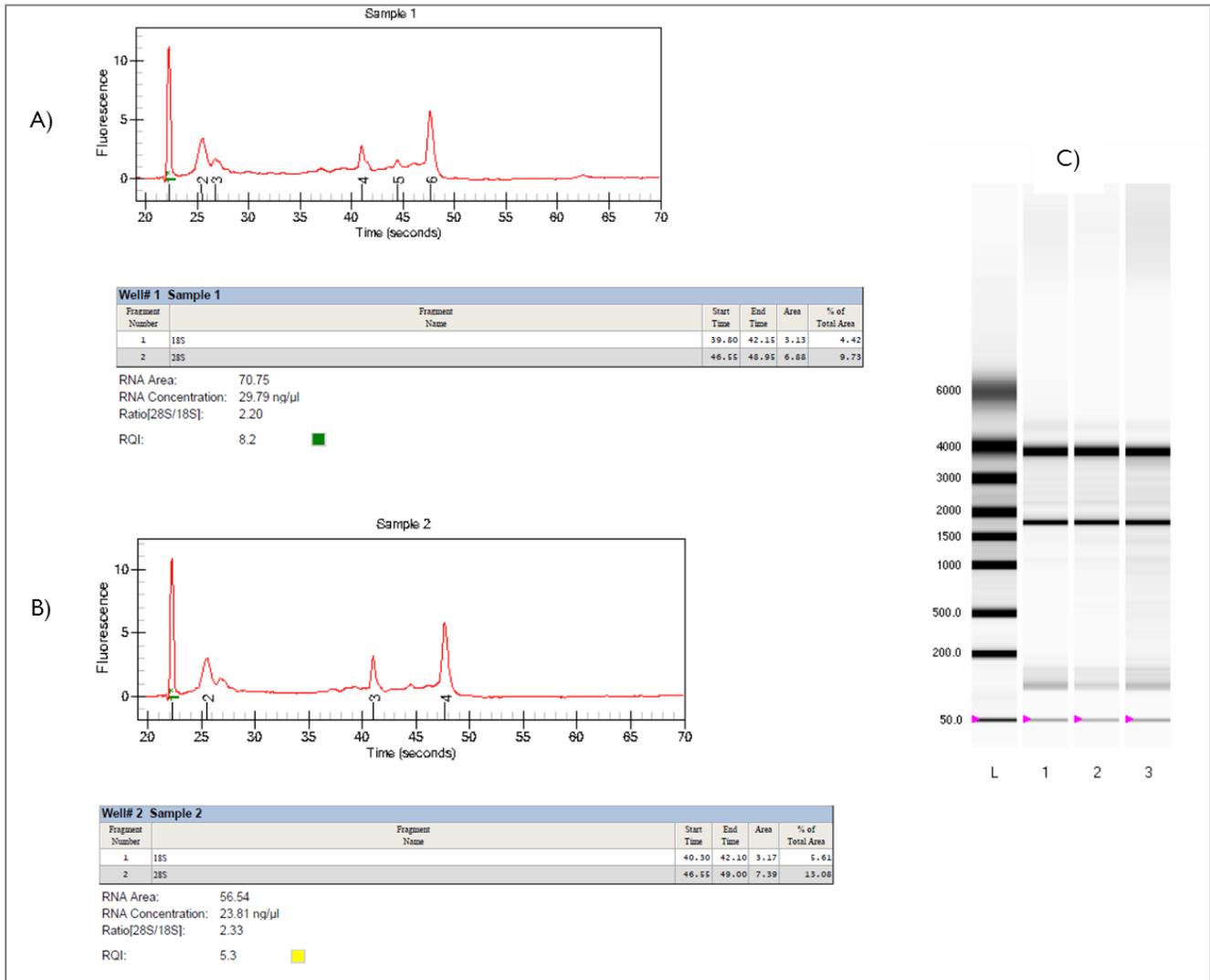


Figura 19. Representación de los resultados arrojados por el software *Experion™ System*. Los electroferogramas muestran los picos de los ARN 18s y 28s y las tablas muestran los resultados de la electroforesis capilar. A) Electroferograma y tabla de resultados de una muestra con bajo índice de degradación de ARN. B) Electroferograma y tabla de resultados de una muestra con un índice de degradación de ARN mediano. C) Un gel virtual de la electroforesis capilar del ARN, en el carril marcado con una “L” se encuentra el marcador de peso molecular, en los carriles 1,2 y 3 se corrieron 3 muestras.

En la tabla se muestra la concentración de ARN de cada extracción realizada. Se observa que en la mayoría de los casos, se obtuvieron concentraciones de ARN alrededor de los 25ng/ $\mu$ L, sin embargo, existieron muestras de las que se extrajo una mayor cantidad de ARN. Todas las muestras con las que se trabajó para el análisis de microarreglos tuvieron un bajo índice de degradación (RQI entre 7 y 10).

<b>Grupo</b>	<b>Muestra</b>	<b>ARN (ng/<math>\mu</math>L)</b>
Sin cambio citológico VPH negativo	7	19.53
	77	29.79
	91	33.47
	92	29.65
	172	58.40
	174	21.32
Sin cambio citológico VPH positivo	55	26.57
	73	52.38
	74	21.91
	86	36.54
	126	27.43
	129	24.55
Displasia VPH positivo	99	23.36
	150	29.81
	233	19.73
	234	28.64
	236	53.42
	237	46.17
CaCu VPH positivo	95	21.38
	96	36.95
	97	19.45
	238	44.17
	239	20.74

Tabla 8. Resultados de la cuantificación de ARN de cada muestra.

Se corrieron un total de 23 chips de expresión de miRNAs de muestras de plasma y todos pasaron los controles de calidad. En la figura 21 se observa la gráfica que se obtiene de la serie de valores de intensidad de cada elemento del chip.

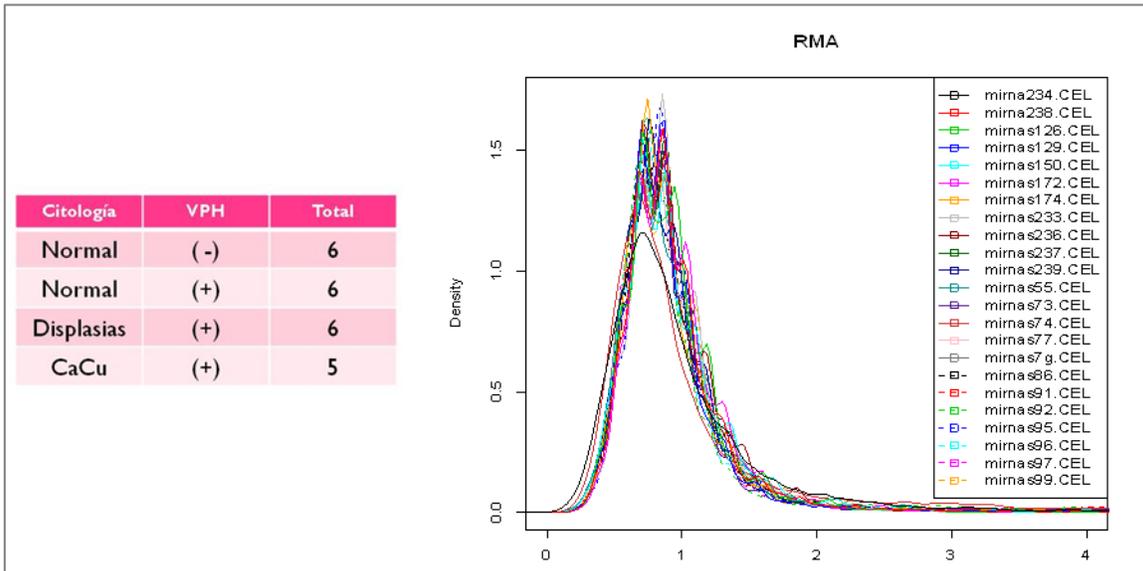


Figura 20. Muestras que se sometieron al análisis por microarreglos de miRNAs. A la izquierda se muestra una tabla de los grupos de muestras. A la derecha se muestra la gráfica de intensidades antes de normalizar por el método RMA; mediante esta gráfica podemos observar que la expresión en todos los chips sigue un mismo patrón de intensidad.

Después de obtener estos resultados, se normalizan los datos por el método RMA (RobustMulti-ArrayAverage). Este método ajusta el fondo (*background*) y toma logaritmos base 2 de cada intensidad ajustada por el background y realiza una normalización por cuantiles de los valores de todos los chips.

De los datos normalizados (sin filtrar por media) se realizó el dendograma que se observa en la figura 22. Un dendograma es una representación gráfica en forma de árbol que resume el proceso de agrupación en un análisis de clusters. Los objetos similares se conectan mediante enlaces cuya posición en el diagrama

está determinada por el nivel desimilitud/disimilitud entre los objetos. Podemos notar que en nuestro análisis no hay una asociación por similitud entre las muestras de cada grupo.

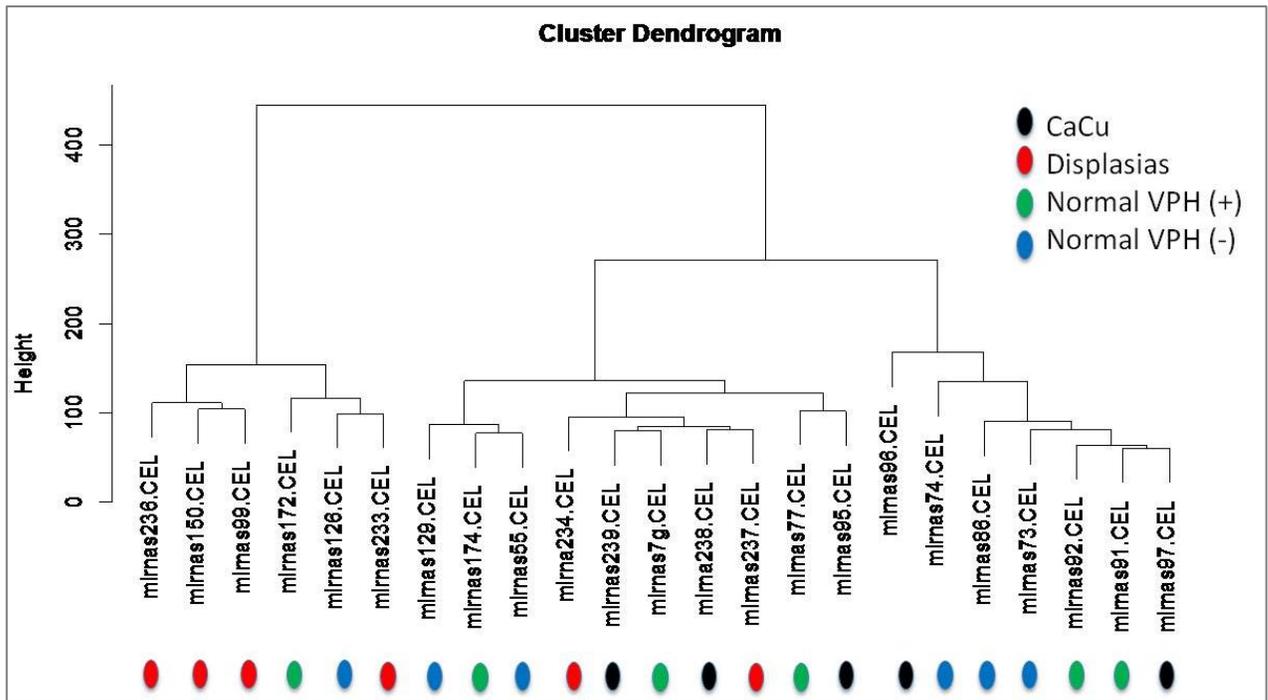
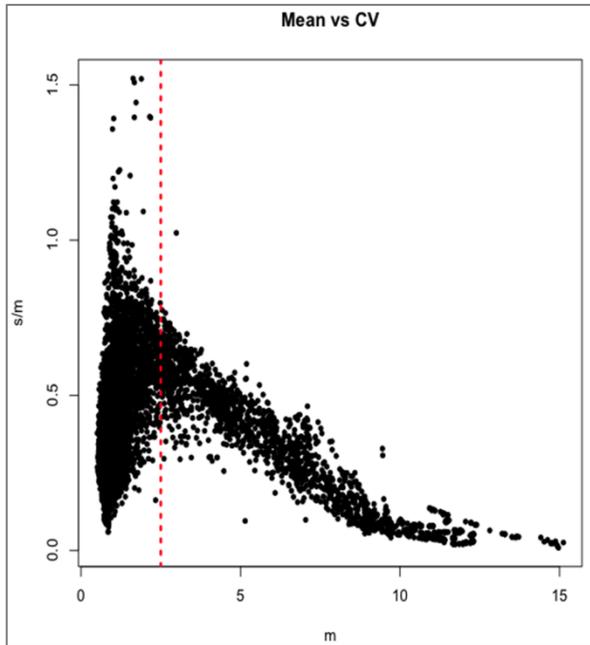


Figura 21. Dendrograma de los datos sin filtrar. Se observan dos grupos principales. Dentro del grupo de la izquierda se agrupan los datos de cuatro muestras de plasma de las mujeres con displasia, una de citología normal y VPH positiva y otra de citología normal VPH negativa. Dentro del segundo grupo principal se encuentran dos clusters que contienen el resto de los datos en donde no se observa un agrupamiento específico.

Para revisar la dispersión de los datos obtenidos de las 23 muestras procesadas, se graficó la media contra el coeficiente de variación (gráfica 11), se observó menor dispersión a una media mayor a 2.5.



Gráfica 11. Dispersión de los datos empleando las variables: media y coeficiente de variación. Se observa que entre más amplio es el coeficiente de variación se puede confundir con el fondo, por lo que se trazó una media de 2.5 (línea punteada) para obtener datos con un coeficiente de variación menor a 1.

De los datos normalizados y filtrados por media se obtiene el dendograma que se observa en la figura 23. Podemos notar que en nuestro análisis no hay una asociación por similitud entre las muestras de cada grupo, a excepción de las muestras de displasia, que como vimos en el dendograma anterior (sin filtrar por media) la mayoría se agrupan en un solo cluster.

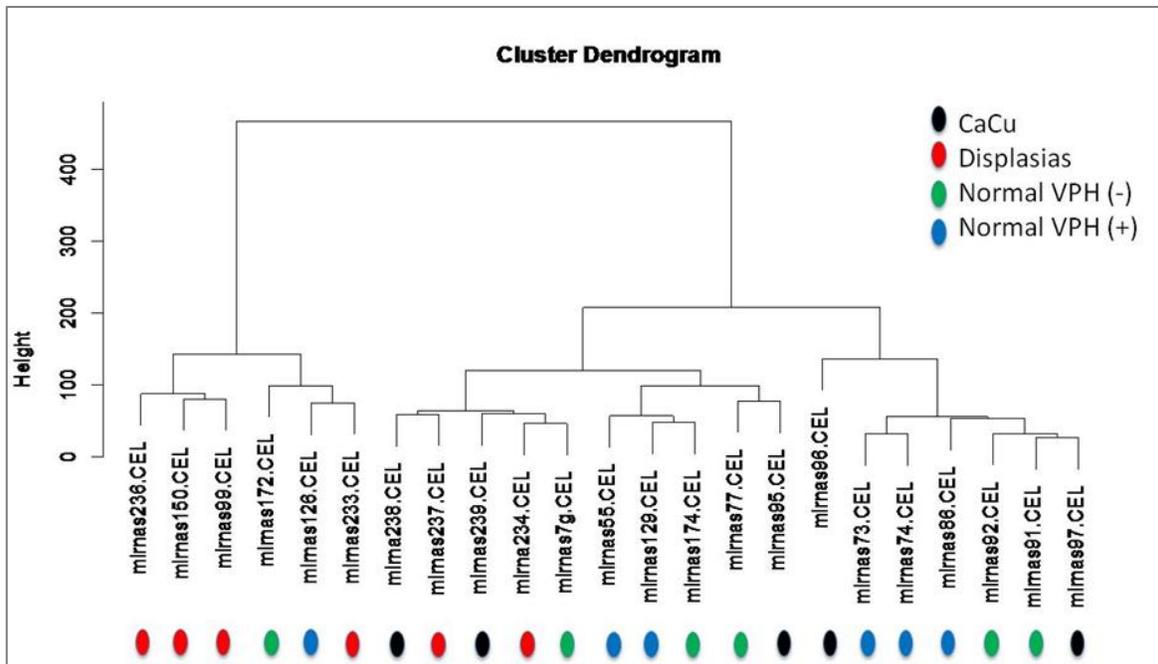


Figura 22. Dendrograma de los datos filtrados por media > 2.5. Se observan dos grupos principales. Dentro del grupo de la izquierda se agrupan los datos de cuatro muestras de plasma de las mujeres con displasia, una de citología normal y VPH positiva y otra de citología normal VPH negativa. Dentro del segundo grupo principal se encuentran diferentes clusters que contienen el resto de los datos en donde no se observa un agrupamiento específico.

De los datos normalizados y filtrados por media se obtiene el mapa de calor. Los mapas de calor permiten de manera muy sencilla y visual conocer cuáles son las zonas (miRNAs) de la placa que tuvieron mayor o menor número de sondas hibridadas (figura 24). En este mapa se puede observar que hay una muestra, miRNAs96, que rompe con el perfil de expresión en comparación con el resto de las muestras.

Posteriormente se realizó el estadístico (prueba “F”) para comparar los perfiles de expresión de miRNAs entre cada grupo de muestras y comprobar si existen diferencias significativas entre ellas. Se obtuvo el mapa de calor (figura 25) en el cual se observa, que efectivamente, la muestra *miRNAs96*, perteneciente al grupo de muestras de plasma de pacientes con cáncer presenta un perfil de expresión diferente comparado con el perfil de expresión de las otras cuatro muestras de plasma de mujeres con CaCu.

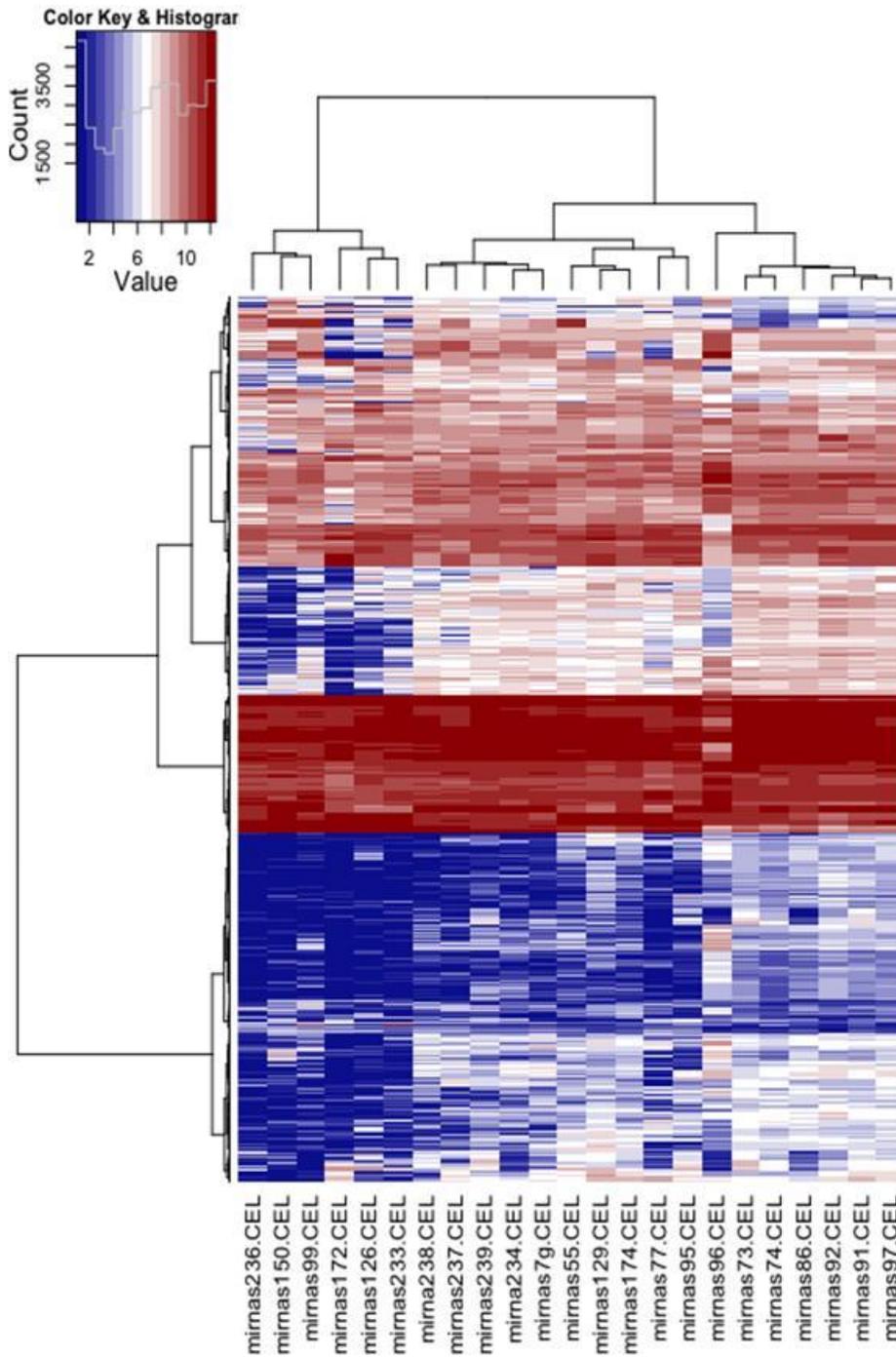


Figura 23. Mapa de calor de los datos (normalizados y filtrados por media) de expresión de miRNAs de las 23 muestras de plasma. Se observa (de los datos sin agrupar) que en general se distinguen 3 zonas, en la parte inferior un grupo de miRNAs sub-expresado, en la zona central se encuentran los miRNAs sobre-expresados y en la parte superior los miRNAs con expresión media. Se hace notar una muestra, *miRNAs96*, con perfil de expresión diferente comparado con el resto de los perfiles.

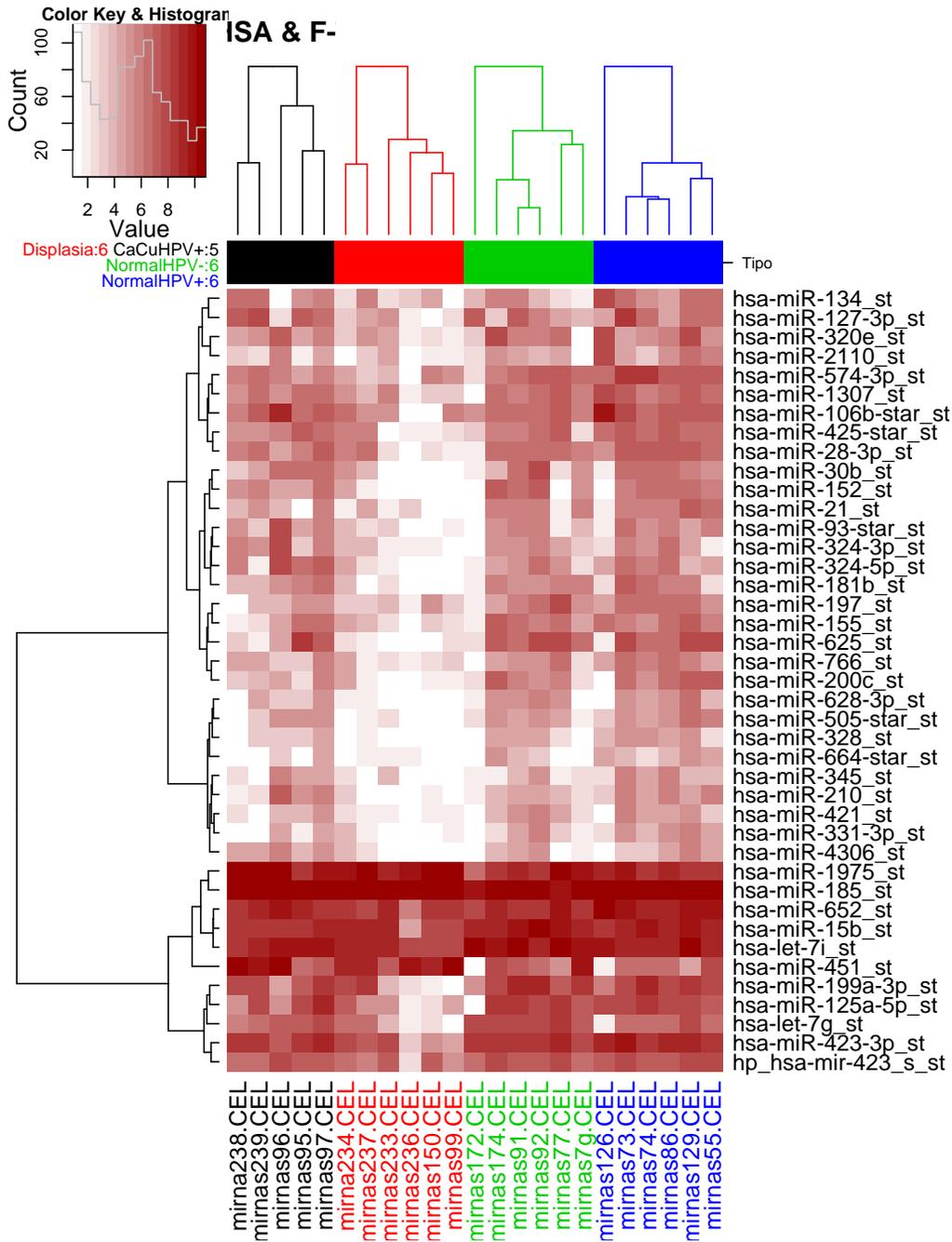


Figura 24. Mapa de calor de los datos (prueba "F") de expresión de miRNAs de las 23 muestras de plasma. Se observa la agrupación de los datos, muestras de plasma de pacientes con cáncer en color negro, displasia en color rojo, sin cambios en la citología y VPH negativos en color verde y sin cambios en la citología y VPH positivos en color azul. En general se distinguen 3 zonas, en la parte inferior un grupo de miRNAs sub-expresado, en la zona central se encuentran los miRNAs sobre-expresados y en la parte superior los miRNAs con expresión media. Se hace notar una muestra, *mirnas96*, con perfil de expresión diferente comparado con el resto de los perfiles.

Como la muestra *miRNAs96* tiene un perfil de expresión diferente, se procedió a realizar un nuevo mapa de calor (figura 26) sin contemplarla y poder efectuar el análisis. En general no se observan diferencias contundentes entre los grupos, sin embargo, se puede distinguir un grupo de microRNAs sub-expresados en el grupo de displasias.

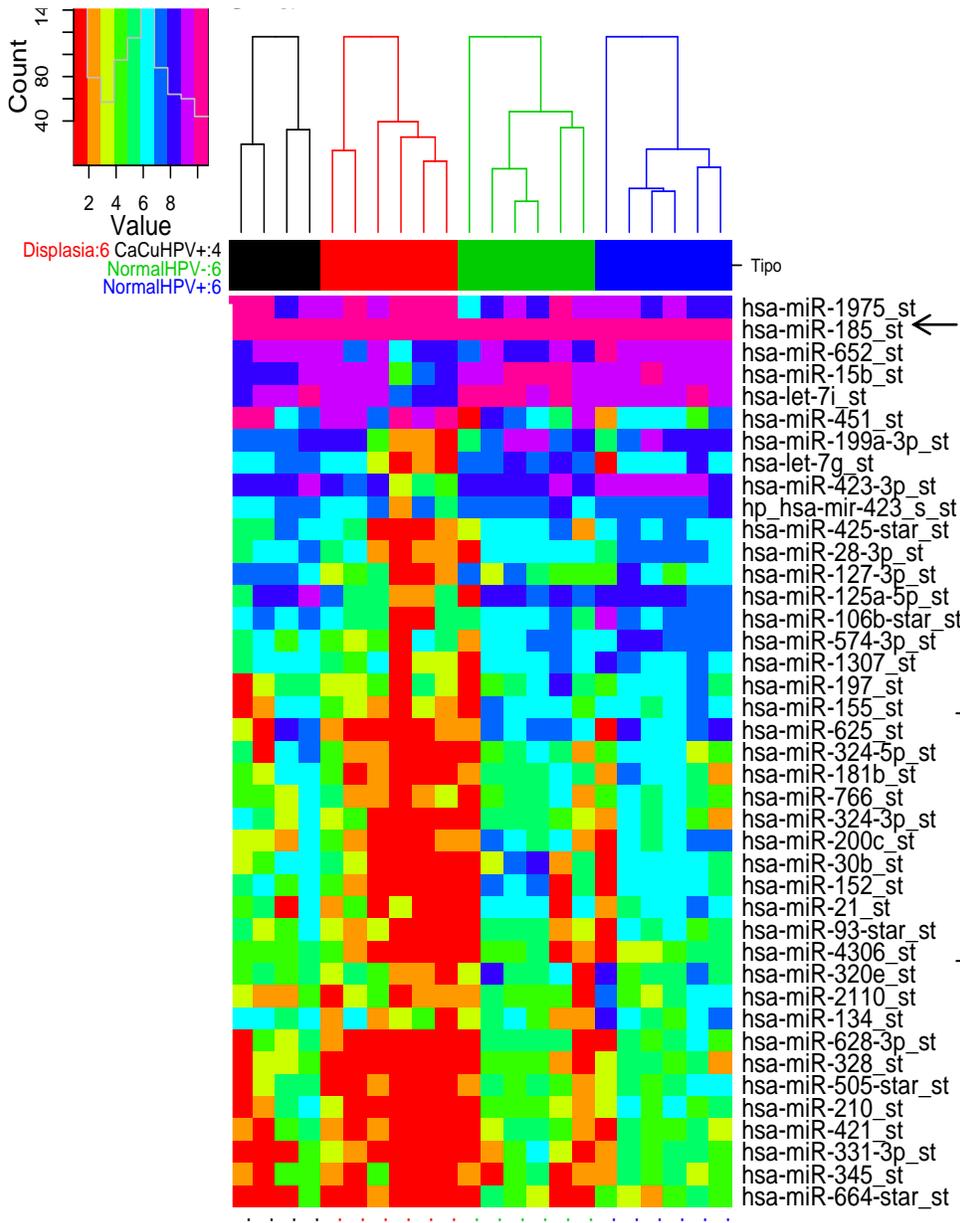


Figura 25. Mapa de calor de los datos (prueba "F") de expresión de miRNAs de las 23 muestras de plasma. Se observan 2 grupos de miRNAs sub-expresados (color rojo) en muestras del grupo de displasia, más claramente dentro de los corchetes. Se encuentra marcado con una flecha el miR-185, el cual se observa expresado de la misma forma en los cuatro grupos.

### DISCUSIÓN

#### **6.3 Asociación del perfil de expresión de miRNAs de plasma con la infección por el VPH de alto riesgo y/o el grado de lesión del cérvix.**

Al analizar los perfiles de expresión de miRNAs de los cuatro grupos de estudio se observó una sub-expresión de un grupo de 16 miRNAs en el plasma del grupo de las mujeres con displasia por VPH de alto riesgo, sin embargo, al analizar el perfil de expresión de miRNAs en plasma de las mujeres con infección por el VPH y sin cambios en la citología de cérvix y compararlo con el perfil de expresión de miRNAs de plasma de las mujeres sin infección por el VPH y sin cambios en la citología cervical nos damos cuenta de que no se observa diferencia. Por esto, es probable que el perfil diferencial de expresión en las muestras de plasma de las mujeres con displasia, se deba en mayor medida al tipo de lesión celular y no a la infección propia por el VPH.

Estudiando el perfil de expresión del grupo de CaCu comparado con los perfiles del resto de los grupos, observamos que presenta un perfil de expresión de miRNAs similar al de los grupos sin cambios en la citología de cérvix, entonces los miRNAs sub-expresados en el plasma durante la displasia no lo están de igual manera cuando existe el CaCu, por lo que no es posible mediante estos resultados elegir algún miRNA para validar como biomarcador diagnóstico de la infección por el VPH o de CaCu.

Se observó que el miR-185 presenta una expresión similar en todos los grupos, por lo que se podría medir la estabilidad de este miRNA mediante q-PCR para su posible uso como normalizador en la medición de la expresión de miRNAs en muestras de plasma.

A la fecha no se han realizado estudios de la desregulación de la expresión de los miRNAs en plasma en mujeres infectadas por el VPH o con CaCu., sin embargo, si se han realizado investigaciones sobre la desregulación de la expresión de los miRNAs presentes en cérvix de mujeres infectadas con el VPH y con CaCu, así que, además de comparar los perfiles de expresión de cada grupo para encontrar diferencias entre ellos, se buscó si los miRNAs reportados como desregulados en cérvix (de mujeres positivas para la infección por VPH de alto riesgo y con CaCu) o en líneas celulares de cáncer de cérvix (VPH positivas) se encuentran presentes y/o desregulados en el plasma de las mujeres con displasia de cérvix o con CaCu, pues aunque sabemos que los miRNAs son diferencialmente expresados en cada tejido o en diferentes etapas del desarrollo, se ha visto que en pacientes con cáncer de hígado se encuentran reducidos los niveles séricos de miR-122 y que además su nivel de expresión se encuentra correlacionado positivamente con la severidad de la enfermedad a pesar de que este miRNA es preferencialmente expresado en el hígado.<sup>72</sup>

Se han observado diferentes miRNAs desregulados en muestras de cérvix de mujeres con CaCu por VPH AR (tabla 8). Se realizó un análisis para saber cuáles de estos miRNAs sobre o sub-expresados en cérvix, se encontraban también desregulados en el plasma de las mujeres con CaCu o con displasia. Se descubrieron en plasma los miRNAs: miR-15b, miR155 y miR-324-5p. El primero se encuentra expresado de forma homogénea en el total de las muestras de plasma sometidas al análisis, sin embargo, miR155 y miR-324-5p se encuentran sub-expresados en las muestras de plasma de las mujeres con displasia de cérvix comparados con la expresión de miRNAs en plasma de los grupos con citología normal o con CaCu. Aún no se conoce la vía de regulación en la que participa miR-324-5p, pero se sabe que miR-155 tiene un papel crítico tanto en la respuesta inmune innata como en la respuesta adaptativa.<sup>86</sup> Estas observaciones son importantes ya que una de las hipótesis de la razón por la que los miRNAs se encuentran circulantes en diferentes fluidos biológicos, es que están involucrados en la comunicación célula-célula.<sup>79,80</sup>

Investigador	miRNAs des-regulados	Referencia
<i>Wang X, et al.</i>	Sub-regulados: miR-126, miR-143, y miR-145 Sobre-expresados: miR-15b,** miR-16, miR-146a, and miR-155**	62
<i>Deftereos G. et al.</i>	Sobre- expresado: mir-21	63
<i>HuangL,et al.</i>	Sub-expresados: miR-let-7c, miR-100, miR-125b, miR-143, miR-145 y miR-199a-5p	64
<i>*Xie H. et al.</i>	Sobre-expresado: miR-205 Sub-expresado: miR-324-5p**	65
<i>*M. Melar y L. A. Laimins</i>	Sub-expresado: miR203	59

Tabla 9. miRNAs des-regulados en muestras de cérvix de mujeres con CaCu. *\*Reportes en líneas celulares VPH positivas. \*\*miRNAs encontrados presentes en plasma de las mujeres que participaron en el estudio.*

#### **6.4 Relación de los miRNAs desregulados en diferentes cánceres con los expresados en muestras de plasma.**

Por otra parte se analizó si los miRNAs reportados como des-regulados en plasma de los pacientes con diferentes cánceres (figura 14) se encontraban también diferencialmente expresados en nuestro análisis en los grupos que comprometían algún cambio en la morfología celular, más específicamente, en los grupos de CaCu y displasia. Se encontró que el miR-574-3p reportado como sobre-expresado en pacientes con cáncer de próstata y cáncer de pulmón, se encuentra sub-expresado en el grupo de displasia. Otro miRNA desregulado en diferentes cánceres es el miR-21 que se encuentra sobre-expresado en cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de colon, en nuestro estudio, este miRNA se encuentra desregulado solamente en el grupo de las muestras de plasma de las mujeres con displasia, sin embargo, a diferencia de la sobre-expresión en plasma de los pacientes con los cánceres mencionados, en la displasia de cérvix se encuentra sub-expresado.

Los miRNAs desregulados en plasma en diferentes cánceres no coinciden con los reportados como desregulados en cérvix y encontrados también desregulados en plasma (miR-155 y miR-324-3p), por lo que podrían ser candidatos para validarse como biomarcadores de displasia.

Se ha visto que los miRNAs que se encuentran en la circulación pueden funcionar como silenciadores de genes, actuando en la comunicación celular, como es el caso de miR-16, sobre-expresado en plasma en pacientes con cáncer de próstata. Se sabe que este miRNA actúa como supresor de tumores y su expresión inhibe la proliferación celular, promueve la apoptosis de las células cancerosas y suprime la tumorigenicidad mediante unión a su gen blanco BCL2<sup>80</sup>. Por todo esto, se piensa que el descubrimiento de la expresión diferencial de miR-155 y miR-324-3p, podría ayudar a elucidar mecanismos moleculares de patogenicidad del CaCu.

### CONCLUSIONES

Se puede concluir que se alcanzó el objetivo planteado: *Analizar la expresión global de miRNAs presentes en plasma de mujeres infectadas con el VPH de alto riesgo y compararlo con el perfil de expresión miRNAs de mujeres sin infección para determinar si existe un perfil diferencial inducido por la presencia de proteínas virales (tipo-específico) y/o el grado de lesión presentado.* Mediante los siguientes hallazgos e interpretaciones del estudio:

- Se identificaron 11 displasias y 8 mujeres con CaCu de las 198 mujeres que participaron en el estudio. De estas mujeres se identificaron 47 con la infección con al menos un tipo del VPH de alto riesgo, siendo el 39% de la población positiva para VPH 16 o 18.
- No se observó un perfil diferencial de expresión de miRNAs en plasma de las mujeres que presentan la infección por el VPAH AR y que aún no presentan cambios en morfología de la citología de cérvix por lo que no se distingue la presencia del VPH AR en cérvix un estadio de infección temprana.
- Se identificó un perfil diferencial de 16 miRNAs en el plasma de las mujeres con displasia comparado con el perfil de expresión de miRNAs de muestras de plasma de mujeres sin la infección por el VPH y sin cambios citológicos en cérvix, mujeres con la infección y sin cambios citológicos en cérvix y mujeres con CaCu por el VPH de alto riesgo.
- Se observó que el miR-185 presenta una expresión similar en plasma tanto en las mujeres sin cambios en la citología de cérvix como en las mujeres con displasia de cérvix o con CaCu.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Lee J-W, Choi CH, Choi J-J, Kim BG. Altered MicroRNA Expression in Cervical Carcinomas, *Clin. Cancer Res*, 14, 2535-2542.
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Geografía del cáncer femenino, como causa de muerte. [Internet] 2011. Consulta 10 de diciembre, 2012, Disponible en:  
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Boletines/Boletin/Comunicados/Especiales/2011/Julio/comunica.pdf>
3. Borges G, et al. 2005. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud pública Méx.* 47, 342-350.
4. International Agency for Research on Cancer. Globocan [Internet] 2008. Consulta 10 de diciembre, 2012. Disponible en:  
<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
5. Celorio JA, Calero AF, Armas A. Fundamentos de ginecología oncológica, Ediciones Díaz de Santos, S.A., primera edición, 1986, p. 295, 296.
6. Abbas A, Yang G, Fakih M. 2010. Management of anal cancer in 2010: Overview, screening, and diagnosis. *Oncology* 24, 364–369.
7. Información sobre Biología, Sexualidad, Educación: VPH y vacunación. [Internet] 2011. Consulta 15 de diciembre, 2012. Disponible en:  
[http://fatouh.blogspot.mx/2011/10/vph-hpv-y-vacunacion\\_20.html](http://fatouh.blogspot.mx/2011/10/vph-hpv-y-vacunacion_20.html)
8. Khan MJ, et al., 2005. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 1072–1079.
9. Dillner J, et al., 2008. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ.* 337:a1754

10. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol J.* 189, 12-19
11. Chen Y, Hunter DJ. 2005. Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin.* 55,45-54
12. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z. 2000. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182(2), 257-264.
13. Burk RD, Ho GY, Beardsley L. 1996. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J. Infect. Dis.* 174(4), 679 – 89
14. Coker AL, et al. 2002. Active and passive smoking, high-risk human papillomaviruses and cervical neoplasia. *Cancer Detect Prev.* 26(2), 121-8
15. Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, 2001. Parity as a risk factor for cervical cancer. *American Journal of Epidemiology.* 153, 732-739
16. Burk RD, Kelly P, Feldman J. 1996. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis.* 23(4), 333-41
17. Negrini BP, Schiffman MH, Kurgan RJ. 1990. Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Res.* 50(15), 4670–5.
18. Magnusson PKE, Lichtenstein P, Gyllenstein UB, 2000. Heritability of cervical tumors. *Int. J. Cancer,* 88, 698-701.
19. Castellsagué X., 2008. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 110, S4-7.
20. Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, et al. 2005. HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* 115(3), 419-28.
21. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A. 2001. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 98, 1218–23.

22. Mantovani F, Banks L, 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20, 7874–7887.
23. Evander M, Frazer IH, Payne E, 1997: Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol*, 71, 2449-2456.
24. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M, 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75, 1565-1570.
25. Yoon CS, Kim KD, Park SN and Cheong SW, 2001. Alpha (6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *BiochemBiophys Res Commun*, 283, 668-673.
26. Day PM, Lowy DR, Schiller JT, 2003. Papillomavirus infect cells via clathrin-dependent pathway. *Virology.* 307, 1- 11.
27. Li M, Beard P, Estes PA, 1998. Intercapsomeric disulphide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol*, 72, 2160-7
28. Wilson VG, West M, Woytek K, 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes.* 24, 275-90
29. Frattini MG, Lim HB, Laimins LA, 1996. In vitro synthesis of oncogenic HPVs requires episomal genomes for differentiation-dependent late gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 3062–7
30. Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, 1997. Inhibition of serum - and calcium – induced differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6 oncoprotein: role of P53 inactivation. *Virology.* 237, 296–306
31. Doorbar J, Ely S, Sterling J, 1991. Specific interaction between HPV 16 E1 - E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 352, 824–7
32. Jung WW, Chun T, Sul D, Hwang KW, Kang HS, Lee DJ, Han IK. 2004. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol*; 42(4),255-66.
33. Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS, Ramaekers FC. 2005. HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* Jun 20; 115(3), 419-28.

34. Nature Reviews: Cervical carcinogenesis by HPV. [Internet] 2006. Consulta 15 de diciembre, 2012. Disponible en: [http://www.nature.com/nrc/journal/v6/n10/fig\\_tab/nrc1973\\_F2.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v6/n10/fig_tab/nrc1973_F2.html)
35. Seman Felipe. 2002. Cáncer cérvicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano. *Rev Chil. Obstet. Ginecol.* 67(4), 318-323
36. Dillner J. 1999. The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol*, 9, 423–30.
37. Bozzetti M, Nonnenmacher B, Mielzinska I, Villa L, Lorincz A, Breitenbach V, et al. 2000. Comparison between Hybrid Capture II and polymerase chain reaction results among women at low-risk for cervical cancer. *Ann Epidemiol*, 10, 466.
38. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, et al., 1994. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis*, 169, 235–40.
39. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. 2000. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*, 355, 2189–93.
40. Tucker RA, Unger ER, Holloway BP, Swan DC. 2000. Real-time PCR-based fluorescent assay for quantitation of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. *MolDiagn*, 6, 39–47.
41. Lodomery MR, Maddocks DG, Wilson ID. 2011. MicroRNAs: their discovery, biogenesis, function and potential use as biomarkers in non-invasive prenatal diagnostics. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2(3), 253-260.
42. Almeida MI, et al. 2011. MicroRNA history, Discovery, recent applications, and next frontiers, *Mutat Res.* 717(1-2), 1-8.
43. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell* 75(5), 843–854.
44. Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 116(2), 281–297.

45. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*, *Cell* 75(5), 855–862.
46. Ruvkun G, Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AR, Horvitz HR. 2000. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403(6772), 901–906.
47. Ruvkun G, Pasquinelli AE, et al. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408 (6808), 86–89.
48. Golan, D, Levy, C, Friedman, B, Shomron, N. 2010. Biased hosting of intronic microRNA genes. *Bioinformatics* 26, 992-995.
49. Lee Y., Kim. V.N, et al. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425(6956), 415-9.
50. Zhou, H, Huang, X, Cui, H, Luo, X, Tang, Y, Chen, S, Wu, L, Shen, N. miR155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2010; 116: 5885-5994.
51. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17(24), 3011–3016.
52. Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R., and Bertrand, E. 2003. Human *let-7* stem-loop precursors harbor features of RNase- III cleavage products. *Nucleic Acids Res.* 31(22), 6593-6597.
53. Hammond, S.C., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296.
54. Yang W, et al. 2011. The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis, *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 3(2), 140-55
55. Elbashir SM, Leneckel W, Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15(2), 188-200.

56. David P. Bartel. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, Cell 116(2), 281-9.
57. Doench, J.G., Peterson, C.P., and Sharp, P.A. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 17(4), 438-42.
58. PeterME. 2010. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step, *Oncogene*, 29, 2161–2164.
59. Melar-NewM, Laimins LA. 2010. Human Papillomaviruses Modulate Expression of MicroRNA 203 upon Epithelial Differentiation to Control Levels of p63 Proteins. *J Virol.* 84(10), 5212-21.
60. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 2999–3004.
61. Zhang W, Tam W. 2007. MicroRNAs in Tumorigenesis. *The American Journal of Pathology* 171(3) 728-738.
62. Wang X, Tang S, Le S-Y, Lu R, Rader JS, et al. 2008. Aberrant Expression of Oncogenic and Tumor-Suppressive MicroRNAs in Cervical Cancer Is Required for Cancer Cell Growth. *PLoS ONE* 3(7), e2557.
63. Deftereos G, Corrie SR, Feng Q, Morihara J, Stern J, et al. 2011. Expression of Mir-21 and Mir-143 in Cervical Specimens Ranging from Histologically Normal through to Invasive Cervical Cancer. *PLoS ONE* 6(12), e28423
64. Yao R, Ma Y-L, Liang W, Li H-H, Ma Z-J, et al., 2012. MicroRNA-155 Modulates Treg and Th17 Cells Differentiation and Th17 Cell Function by Targeting SOCS1. *PLoS ONE* 7(10), e46082.
65. Xie H, Zhao Y, Caramuta S, Larsson C, Lui W-O. 2012. miR-205 Expression Promotes Cell Proliferation and Migration of Human Cervical Cancer Cells. *PLoS ONE* 7(10), e46990.
66. YeungCL, TsangTY, Yau PL, Kwok TT. 2011. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene* 30, 2401–2410

67. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM and Sarnow P. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577–1581.
68. Chisari FV. 2005. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 436, 930–932.
69. Hermeking H. 2007. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 12, 414–418.
70. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. 2002. Identification of tissue specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 12, 735–739.
71. Pogribny IP, Starlard-Davenport A, Tryndyak VP, Han T, Ross SA, et al. 2010. Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Lab Invest* 90, 1437–1446
72. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L, 2011. Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* 6(8), e23937.
73. Chim SS, et al. 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma, *Clin. Chem.* 54, 482–490.
74. Lawrie CH, et al., 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 141(5), 672–675.
75. Mitchell PS, et al. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10513–10518.
76. Chen X, et al. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18, 997–1006.
77. Hanke M, Hoefig K, Feller AC, et al. 2010. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.* 28,655–661.
78. Park NJ, et al. 2010. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection *Clin. Cancer Res.* 15, 5473–5477.
79. Weber JA, et al., 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids, *Clin. Chem.* 56, 1733–1741.

80. Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. 2010. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol.*3(5), 478–481.
81. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. 2010. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* 15, 1603-11.
82. Valadi H, et al. 2000. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659
83. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, et al., 2008. Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS ONE* 3(11), e3694.
84. Turchinovich, L. Weiz, B. Burwinkel, 2012. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function, *Trends in biochemical sciences* 37(11), 460–465.
85. Wang K, Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D. 2011. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers, *Mutat Res.* 717(1-2), 85–90.
86. Yao R, Ma Y-L, Liang W, Li H-H, Ma Z-J, et al., 2012. MicroRNA-155 Modulates Treg and Th17 Cells Differentiation and Th17 Cell Function by Targeting SOCS1. *PLoS ONE* 7(10), e46082.

## PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

### *mSample PreparationSystem<sub>DNA</sub>*

#### Principios de uso

El objetivo de la preparación de muestras es el de extraer y concentrar las moléculas del ADN objetivo para volverlo accesible para la amplificación y eliminar los posibles inhibidores de la amplificación del extracto. El *mSamplePreparationSystem<sub>DNA</sub>* corresponde a un conjunto de reactivos para la obtención de ácidos nucleicos.

Durante la preparación de las muestras, se agrega *mMicroparticles<sub>DNA</sub>* al número necesario de recipientes de reacción. Cada una de las muestras se agrega al recipiente correspondiente para posteriormente incubarse. Durante la incubación a 56°C ocurre la lisis de la célula y los ácidos nucleicos son absorbidos en las micropartículas en la solución de *mLysis<sub>DNA</sub>*. Después de la incubación se coloca un imán para capturar las micropartículas y se desecha la fase flotante de la lisis. En una serie de pasos, se agregan las soluciones de lavado *mWash1<sub>DNA</sub>* y *mWash2<sub>DNA</sub>* para lavar la totalidad de las impurezas de las micropartículas; se desechan los lavados. Después se agrega *mElution Buffer<sub>DNA</sub>* a los recipientes de reacción, los que se incuban luego a 75°C para que los ácidos se separen de las micropartículas. Mediante un imán se eluye la muestra y se transfiere a un tubo nuevo.

#### Reactivos del estuche

- Buffer de lisis (mLysisDNA).
- Buffer 1 de lavado (mWash1<sub>DNA</sub>)
- Buffer 2 de lavado (mWash 2<sub>DNA</sub>)

- Buffer de elución ( $mElutionBuffer_{DNA}$ )
- Micropartículas ( $mMicroparticles_{DNA}$ )

## A. Preparación

- a. Encender el bloque de calentamiento seco de temperatura controlada para los tubos de 1.5 mL y dejar que llegue a los 56°C
- b. Etiquetar todos los tubos necesarios.
  - i. Un tubo microcentrífugo de 1.5 mL con tapa de tornillo por cada muestra para los pasos de  $mLysis_{DNA}$ ,  $mWash1_{DNA}$ ,  $mWash2_{DNA}$ , y  $mElutionBuffer_{DNA}$ .
  - ii. Un tubo microcentrífugo de 1.5 mL con tapa de tornillo por cada muestra o placa de poliuretano de 96 pocillos para el eluato.
- c. Comprobar la temperatura del bloque de calentamiento. NO continuar hasta que el bloque de calentamiento llegue a la temperatura correcta.
- d. Agregar 70 mL de etanol 190 a 200 Proof (etanol al 95 a 100%) al frasco del  $mWash2_{DNA}$ . Mezcle invirtiendo entre 5 y 10 veces.

## B. Lisis

- a. Resuspender las micropartículas del botenetiquetado  $mMicroparticles_{DNA}$  sometiéndolo a agitación vigorosa hasta que no se vean partículas en suspensión ni asentadas en el fondo del frasco.
- b. Colocar los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo en un soporte no magnético a temperatura ambiente. Luego de que las partículas vuelvan a suspenderse, con una punta de pipeta de repetición

con capacidad de 25  $\mu$ L de *mMicroparticles<sub>DNA</sub>* a cada uno de los tubos microcentrífugos de 1.5 mL.

- c. Con una punta de pipeta esteril de 1,000  $\mu$ L con filtro, agregar 0.4 mL de *mLysis* cada tubo microcentrífugo de 1.5 mL con tapa de tornillo en un soporte no magnético.
- d. Con una punta de pipeta estéril de 1,000  $\mu$ L con filtro, agregar 0.4 mL de muestra (muestras o controles) a los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo y preparar la mezcla de muestra-lisis aspirando y soltando hasta obtener una suspensión uniforme (al menos 5 ciclos aspirando y soltando).
- e. Después de agregar a todas las muestras *mLysis<sub>DNA</sub>* de mezclarse, colocar una tapa de tornillo a todos los tubos, transferir al bloque de calentamiento a 56°C, inicie el temporizador e incube todos los tubos durante 10 minutos.
- f. Luego de finalizada la incubación, retirar las tapas de tornillo y desechar, y colocar los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo en un soporte de captación magnético durante 2 minutos para que las partículas queden capturadas en un costado del tubo.
- g. Con los tubos en el soporte de captación magnético, usar una punta de pipeta estéril, nueva y limpia de 1,000  $\mu$ L para retirar cuidadosamente de cada muestra el material lisado y desechar el líquido en un recipiente para desechos líquidos. Eliminar el líquido tanto como sea posible. NO agitar ni aspirar las partículas magnéticas capturadas.
- h. Retirar el tubo microcentrífugo de 1.5 mL con tapa de tornillo del soporte magnético y transferir a un soporte no magnético.

### **C. Lavado 1**

- a. Con una punta de pipeta nueva y limpia de 1,000  $\mu$ L para cada muestra, agregar 800  $\mu$ L de *mWash 1<sub>DNA</sub>* a las muestras y volver a suspender las partículas magnéticas en el líquido de lavado aspirado y soltando suavemente con la punta de la pipeta. Lavar las partículas del costado del tubo si es necesario.
- b. Colocar los tubos microcentrifugados de 1.5 mL con tapa tornillo en un soporte de captación magnético durante un minuto para que las partículas queden capturadas en un costado del tubo.
- c. Con una punta de pipeta nueva y limpia de 1,000  $\mu$ L para cada muestra, eliminar el *mWash 1<sub>DNA</sub>* de los tubos microcentrifugos de 1.5 mL con tapa de tornillo y desechar el líquido en un recipiente para desechos líquidos. Eliminar el líquido tanto como sea posible. NO agite ni aspire las partículas magnéticas capturadas.
- d. Retirar los tubos microcentrifugos de 1.5 mL con tapa de tornillo del soporte magnético y transferir a uno no magnético.

### **D. Lavado 2**

- a. Con una punta de pipeta nueva y limpia de 1,000  $\mu$ L para cada muestra, agregar 800  $\mu$ L de *mWash 2<sub>DNA</sub>* a las muestras y volver a suspender las partículas magnéticas en el líquido de lavado aspirado y soltando suavemente con una punta de pipeta. Lavar las partículas del costado del tubo si es necesario.

- b. Colocar los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo en un soporte de captación magnético durante un minuto para que las partículas queden capturadas en el costado del tubo.
- c. Con una punta de pipeta nueva y limpia de 1,000  $\mu$ L para cada muestra, eliminar el *mWash 2<sub>DNA</sub>* de los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo y desechar el líquido en un recipiente para desechos líquidos. Eliminar el líquido tanto como sea posible. NO agite ni aspire las partículas magnéticas capturadas.
- d. Retirar los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo del soporte magnético y transferir a uno no magnético.

### **E. Lavado 3**

- a. Con una punta de pipeta nueva y limpia de 1,000  $\mu$ L para cada muestra, agregar 800  $\mu$ L de *mWash 2<sub>DNA</sub>* a las muestras y volver a suspender las partículas magnéticas en el líquido de lavado aspirado y soltando suavemente con una punta de pipeta. Lavar las partículas del costado del tubo si es necesario.
- b. Colocar los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo en un soporte de captación magnético durante un minuto para que las partículas queden capturadas en el costado del tubo.
- c. Con una punta de pipeta nueva y limpia de 1,000  $\mu$ L para cada muestra, eliminar el *mWash 2<sub>DNA</sub>* de los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo y desechar el líquido en un recipiente para desechos líquidos. Eliminar el líquido tanto como sea posible. NO agite ni aspire las partículas magnéticas capturadas.

- d. Retirar los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo del soporte magnético y transferir al bloque de calentamiento a 75°C; incubar durante 10 minutos y dejar que el etanol se evapore.

## **F. Elución del ADN**

- a. Con una punta de pipeta nueva y limpia de 200 µL para cada muestra, agregar 100 µL de *mElutionBuffer<sub>DNA</sub>* a las muestras y volver a suspender las partículas magnéticas en el líquido de lavado aspirado y soltando suavemente con la punta de pipeta. Lavar las partículas del costado del tubo si es necesario.
- b. Mantener los tubos individuales en el bloque de calentamiento a 75°C e incubar durante 10 minutos.
- c. Retirar los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo del bloque de calentamiento a 75°C y colocarlos en un soporte de captación magnético durante un minuto para que las partículas queden capturadas en un costado del tubo.
- d. Con una punta de pipeta nueva y limpia de 200 µL para cada muestra, eliminar la muestra eluída de los tubos microcentrífugos de 1.5 mL con tapa de tornillo. NO agite ni aspire las micropartículas capturadas.
- e. Las muestras eluídas se pueden colocar en un tubo microcentrífugo nuevo de 1.5 mL con tapa de tornillo o en una placa de poliuretano de 96 pocillos.

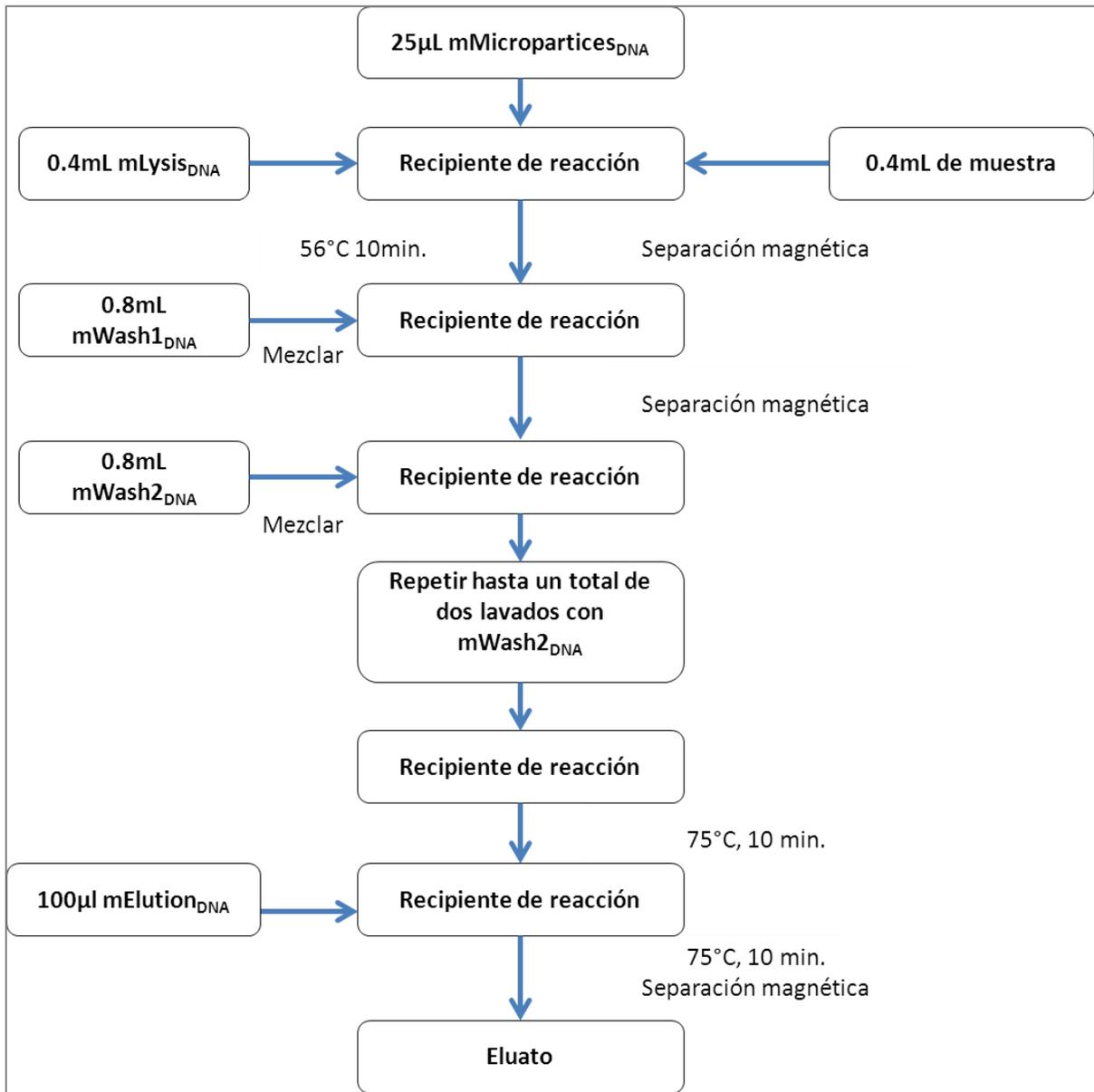


Figura A1. Representación del procedimiento del estuche *mSamplePreparationSystem*<sub>DNA</sub>.

## PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN

### *mirVana™ miRNA Isolation*

El procedimiento de aislamiento del ARN mediante este estuche, combina las ventajas de extracción orgánica y la extracción en fase sólida, mientras que evita las desventajas de ambos. Se pueden aislar en 30 minutos pequeñas moléculas de ARN con altos rendimientos y alta calidad.

El primer paso corresponde a la lisis de las muestras en un tampón de lisis de desnaturalización. A continuación, las muestras se someten a una extracción ácido-fenol: cloroformo que proporciona la eliminación la mayoría del ADN. La purificación final del ARN se realiza mediante una columna de fibra de vidrio en la que se quedará unido solo el ARN, finalmente se eluye el ARN mediante una solución de elución o con agua libre de nucleasas.

#### **Reactivos del estuche**

- miRNA Wash Solution 1
- Wash Solution 2/#
- Collection tubes
- Filtros
- Lysis Binding/Buffer
- miRNA Homogenate Additive
- Acid-Phenol:Chloroform
- Elution Solution

## **A. Preparar las soluciones de lavado**

- a. Agregar 21mL de etanol 100% al bote etiquetado *miRNAWashSoln*. Mezclar bien. Marcar el bote para indicar que el etanol fue agregado.
- b. Agregar 40mL de etanol 100% al bote etiquetado como *WashSolution 2/3*. Mezclar bien. Marcar el bote para indicar que el etanol fue agregado.

## **B. Tipo de muestra y cantidad**

- a. Tipo de muestra. Este procedimiento es designado para el aislamiento de ARN de plantas y tejido o células en cultivo, bacterias, levaduras, partículas virales o reacciones enzimáticas. Puede ser utilizado en tejido fresco, congelado o almacenado con *RNAlater-ICE*.
- b. Cantidad de muestra. Muestras de  $10^2$ - $10^7$  células o 0.5-250mg de tejido pueden ser procesadas por unidad. Sin embargo, si el volumen inicial excede los 300 $\mu$ L, las muestras deberán ser procesadas en múltiples pasos debido a la limitación del filtro.

## **C. Lisis**

- a. Mezclar las muestras en 300-600 $\mu$ L de *Lysis/Binding Buffer*. Se usan 300 $\mu$ L cuando la cantidad de células es pequeña (cientos) y 600 $\mu$ L para aislar el ARN de mayores cantidades de células (miles).
- b. Mezclar vigorosamente para completar el lisado de las células y obtener una solución homogénea. Las células cultivadas típicamente no requieren homogenización mecánica, sin embargo, esto no daña al ARN.

#### **D. Extracción orgánica**

- a. Agregar un volumen de 1/10 de *miRNAHomogenateAdditive* a la solución del lisado y mezclar mediante agitación mecánica o inversión del tubo varias veces. Por ejemplo, si el lisado es de 300µL, agregar 30µL de *miRNAHomogenateAditive*.
- b. Incubar la mezcla en hielo 10 minutos.
- c. Agregar un volumen de *Ácid-Phenol:Chloroform* equivalente al volumen del lisado antes de agregar el *miRNAHomogenateAditive*. Por ejemplo, si el volumen original del lisado fue de 300µL, agregar 300µL de *Ácid-Phenol:Chloroform*.
- d. Mezclar durante 30-60 segundos.
- e. Centrifugar durante 5 minutos a máxima velocidad (10,000xg) a temperatura ambiente para separar la fase orgánica de la acuosa. Después de la centrifugación, la interfase debería estar compacta; de no ser así, repetir la centrifugación.
- f. Cuidadosamente remover la fase acuosa (arriba) sin interrumpir la fase de abajo y transferir a un tubo diferente. Calcular el volumen removido.

#### **E. Aislamiento del ARN**

- a. El ARN puede ser eluido en agua libre de nucleasas o en *ElutionSolution*. *ElutionSolution* es agua libre de nucleasas 0.1mM EDTA.
- b. Precalear la *ElutionSolution* o el agua libre de nucleasas a 95°C para usar en la elución del ARN del filtro al final del procedimiento.

- c. Si el etanol 100% que se usará es almacenado en frío, dejarlo a temperatura ambiente hasta alcanzar esta misma.
- d. Agregar 1.25 volúmenes de etanol 100% a la fase acuosa. Por ejemplo. Si se recuperaron 300µL de la fase acuosa agregar 375µL de etanol.
- e. Para cada muestra, colocar un filtro en cada uno de los tubos de colección proporcionados en el estuche.
- f. Pipetear la solución resultante en el filtro. Mezclas mayores a 700µL deberán hacerse pasar por el mismo filtro en pasos sucesivos.
- g. Centrifugar por 15 segundos a 10,000xg para pasar la mezcla por el filtro. Centrifugar a más velocidad que la establecida puede dañar el filtro.
- h. Descartar el líquido que pasa el filtro y repetir hasta que la solución de lisado/etanol haya pasado completamente por el filtro.
- i. Aplicar 700µL de *miRNAWash Solution1* al filtro y centrifugar durante 10-15 segundos. Descartar el líquido que pasa por el filtro y colocar el filtro en el mismo tubo.
- j. Aplicar 500µL de *WashSolution 2/3* y hacer pasar el líquido por el filtro como en el paso anterior. Descartar el líquido que pasa por el filtro.
- k. Repetir con una segunda alícuota de 500µL de *WashSolution 2/3*.
- l. Después de descartar el líquido que pasa por el filtro, colocar el filtro en el tubo en el que se recolectará el ARN.

m. Agregar 100µL de *ElutionSolution*o agua libre de nucleasas precalentada a 95°C en el centro del filtro. Centrifugar 20-30 segundos a máxima velocidad y recuperar el ARN.

n. Almacenar la solución con el ARN a -20°C o menos.

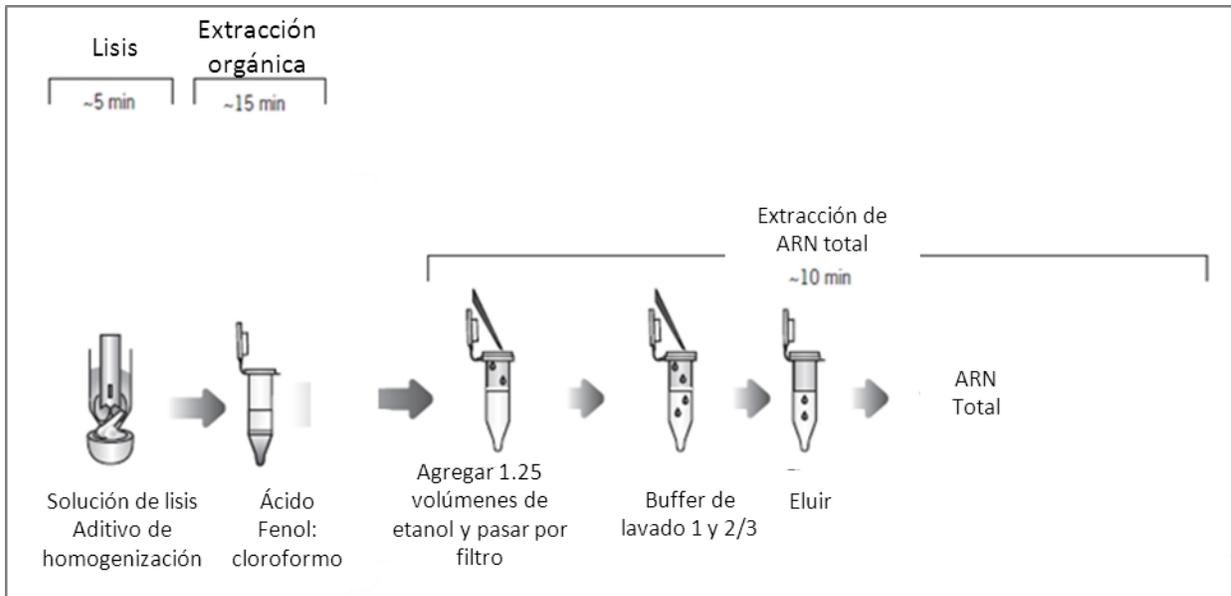


Figura A2. Representación del procedimiento del estuche *mirVana™ miRNA Isolation*.

## PROTOCOLO Q-PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VPH

### *Abbott RealTime High Risk HPV*

Este es un ensayo cualitativo *in vitro* para la detección de ADN de 14 tipos de VPH de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en muestras clínicas.

Para amplificar las dianas del VPH se utilice una mezcla de cebadores compuesta portres cebadores directos y dos cebadores inversos dirigidos hacia la región L1 conservada. La señal de 14 genotipos del VPH AR se genera mediante el uso de sondas fluorescentes. Los amplicones del control interno se generan con un conjunto de cebadores dirigidos hacia una secuencia de  $\beta$ -globina humana endógena como un control de validez de la muestra para la aceptabilidad de las células, la extracción de la muestra y la eficiencia de la amplificación.

El ADN se amplifica por acción de la enzima polimerasa *AmpliAq Gold* en presencia de dNTPs y magnesio. Esta enzima es termofílica modificada en su sitio activo por una molécula que la convierte en inactiva. Cuando a enzima se calienta antes de la iniciación de la PCR, la molécula inhibidora se escinde de la enzima, lo que le permite recuperar su actividad. Así, la enzima sólo esta activa a temperaturas en las que tiene lugar una interacción específica ADN-ADN. Esto reduce los artefactos de la PCR inespecíficos como por ejemplo, la dimerización de los cebadores. La enzima se activa a 92°C durante 10 minutos. Durante cada serie de termociclado, se utiliza una temperatura alevada para disociar las cadenas dobles de ADN en cadenas sencillas, a continuación se utiliza una temperatura baja para que los cebadores hibriden con sus respectivas cadenas de ADN diana y se elonguen para formar productos de ADN de cadena doble.la amplificación exponencial de los productos se consigue mediante la repetición de los ciclos de ascenso y descenso de temperatura, dando lugar la amplificación de las secuencias diana en un mínimo de un millón de veces. La amplificación de ambas dianas (VPH y CI) tiene lugar simultáneamente en una misma reacción.

## Reactivos del estuche

- Paquete de Amplificación (*Amplificationreagent pack*) que contiene:
  - 1 frasco de *Activationreagent*. 38mM de cloruro de magnesio en solución tamponada (reactivo 1).
  - 1 frasco de *HPV OligonucleotideReagent* en solución tamponada con colorante de referencia (reactivo 2).
  - 1 frasco de *AmpliTaq Gold Enzime* en solución tamponada con estabilizantes (reactivo 3).
  
- Controles:
  - Control negativo. 0.01% de ADN no infeccioso con la secuencia de  $\beta$ -globina en solución tamponada con ADN portador.
  - Control positivo. 0.01% de ADN no infeccioso de VPH y secuencias  $\beta$ -globina en solución tamponada con ADN portador.

Con el ensayo *AbbotRealTimeHR HPV* se pueden utilizar muestras recogidas con la solución *PreservCyt* o el conservatnte *SurePath*.

- A. Descongelar las muestras una temperatura entre 15-30°C, mezclarlas durante 15-20 segundos y mantenerlos a temperatura entre 2-8°C hasta su uso.
  
- B. Descongelar los controles a una temperatura entre 15-30°C, mezclarlos y mantenerlos a temperatura entre 2-8°C hasta su uso.
  
- C. Descongelar los reactivos de amplificación a una temperatura entre 15-30°C y mantenerlos a temperatura entre 2-8°C hasta su uso.
  
- D. Para realizar hasta 24 reacciones, utilizar: un tubo de control positivo, un tubo de control negativo y un envase de reactivo de amplificación.

- a. Agregar 278 $\mu$ L del reactivo 1 y 402 $\mu$ L del reactivo 2 en el frasco del reactivo 3.
  - b. Mezclar el frasco del reactivo 3 aspirando y dispensando con cuidado 6 veces. Evitar la formación de espuma.
  - c. Agregar 12.5 $\mu$ L de la mezcla en cada pocillo de la placa de reacción óptica de 96 pocillos en función del número de muestras a procesar incluyendo controles.
  - d. Agregar al pocillo correspondiente 12.5 $\mu$ L de cada muestra o controles.
- E. Colocar la placa de reacción óptica de 96 pocillos en el sistema m2000rt e iniciar el protocolo del ensayo *RealTime HR HPV*.
- a. Una vez finalizado el procedimiento los resultados se visualizan en el sistema m2000rt.

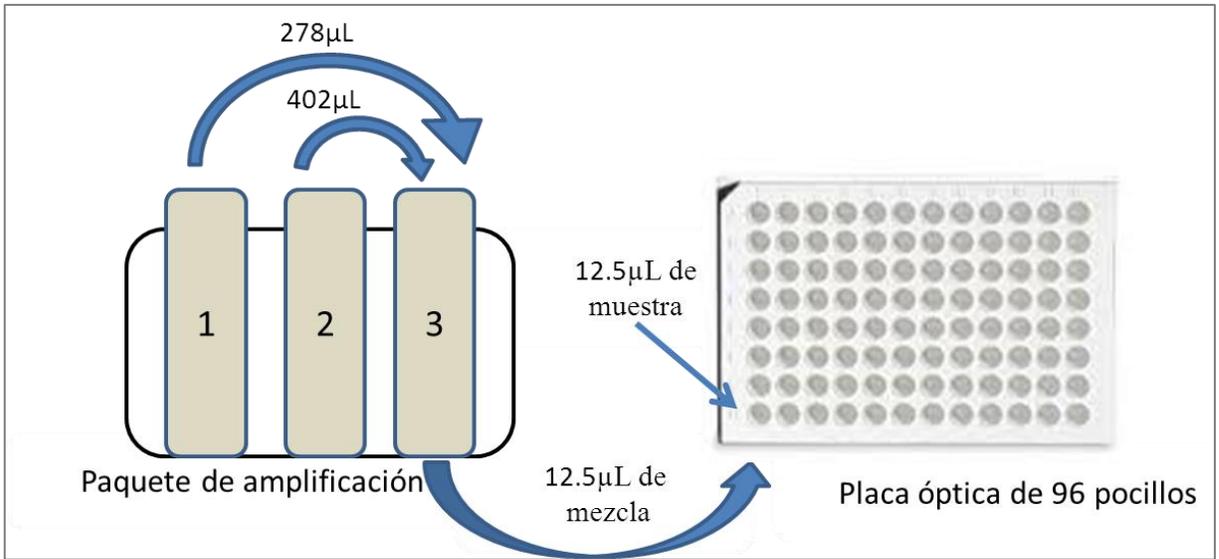


Figura A3. Representación del procedimiento del estuche *Abbott RealTime High Risk HPV*.

## PROTOCOLO DE MICROARREGLOS

### *AffymetrixGeneChip 2.0 miRNAArray de Affimetrix*

El proceso se basa en la hibridación de las moléculas de ácidos nucleicos (miRNAs) que funcionan como sondas y se hibridan con miRNAs complementarios provenientes de la muestra en estudio, los cuales han sido marcados mediante una etiqueta de Biotina.

Se realiza el procedimiento a partir de 100 - 1000 ng de ARN total, el proceso comienza con una reacción en el que se agrega una cola poliA a los diferentes miRNAs de la muestra, seguido de la ligación con la molécula señal biotinilada a la muestra de ARN diana.

#### **Procedimiento de Etiquetado.**

- A. Ajustar el volumen de RNA a 8  $\mu$ L con *Nuclease-Free Water*. (Vial 11)
- B. Transferir los 8  $\mu$ L de RNA a hielo. Adicionar 2  $\mu$ L *RNA Spike Control Oligos*(Vial 8) y volver a hielo.
- C. Diluir el *ATP mix* (Vial 3) en 1 mM como a continuación se muestra:

Para muestras de RNA total, diluir el *ATP Mix* 1:500

Para muestras enriquecidas cuantificadas, calcular el factor de dilución acorde a la siguiente fórmula:

$$5000 \div \text{ng de RNA}$$

Para muestras enriquecidas no cuantificadas, calcular el factor de dilución de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$1000 \div \mu\text{g RNA total}$$

D. Adicionar los siguientes componentes a la solución de 10  $\mu$ L de *RNA/Spike Control Oligos*, para un volumen final de 15  $\mu$ L:

1.5  $\mu$ L 10X *Reaction Buffer* (Vial 1)

1.5  $\mu$ L 25 mM  $MnCl_2$  (Vial 2)

1.0  $\mu$ L Dilución del *ATP Mix* (Vial 3 dilución descrita en el paso 3)

1.0  $\mu$ L *PAP Enzyme* (Vial 4)

E. Mezclar gentilmente por inmersión (NO VORTEX) y centrifugar brevemente.

F. Incubar a 37°C en un bloque de calor por 15 minutos.

### **Ligación.**

A. Centrifugar brevemente la solución de 15  $\mu$ L de RNA poliadenilado y mantener en hielo.

B. Adicionar 4  $\mu$ L 5X *FlashTag Biotin HSR Ligation Mix*. (Vial 5)

C. Adicionar 2  $\mu$ L de *T4 DNA Ligase* (Vial 6)

D. Mezclar gentilmente por inmersión (NO VORTEX) y centrifugar brevemente.

E. Incubar a 25°C (temperatura ambiente) por 30 minutos.

F. Detener la reacción adicionando 2.5  $\mu$ L *HSR Stop Solution* (Vial 7). Mezclar y centrifugar la solución de la muestra ligada con un volumen total de 23.5  $\mu$ L.

### **Hibridación.**

A. Permitir que los reactivos a utilizar en el paso 3, tengan una temperatura similar a la del ambiente.

B. Completamente descongelado, calentar la solución 20X *Eukaryotic Hybridization Controls* (bioB, bioC, bioD, cre de *Gene Chip Eukaryotic Hybridization Control Kit*) por 5 minutos a 65°C.

C. Adicionar los siguientes componentes respetando el orden de la lista, a la solución de un volumen 23.5 µL con la muestra ya marcada con biotina que corresponde al cóctel para el ensayo de hibridación.

50 µL 2X *Hybridization Mix* (de *GeneChipHyb, Wash and Stain Kit*)

15 µL Formamida al 27.5% (Vial 12)

10 µL DMSO (de *GeneChipHyb, Wash and Stain Kit*)

5 µL 20X *Eukaryotic Hybridization Controls* ( de *GeneChipHyb, Wash and Stain Kit*)

1.7 µL *Control Oligonucleotide B2, 3nM* (de *GeneChipHyb, Wash and Stain Kit*)

D. El volumen total hasta este paso será de 105.2 µL. Incubar a 99°C por 5 minutos, seguido de una incubación a 45°C por 5 minutos.

E. Aspirar 100 µL e inyectar al chip.

F. Cubrir ambos septos con ½" *Tough-Spots* para minimizar la evaporación y/o prevenir fugaz en el chip.

G. Colocar el chip dentro de la bandeja para horno de hibridación y colocar la bandeja dentro del horno.

H. Incubar el chip a 48°C por 16 horas a 60 rpm.

## Lavado y tinción

- A. Después de la hibridación por 16 horas, retirar el chip del horno. Remove las *Tough-Spots* del chip.
- B. Extraer el cóctel de hibridación del chip.
- C. Llenar el chip completamente con *Array Holding Buffer*.
- D. Permitir que el chip tenga una temperatura similar a la presente en el ambiente antes de la tinción y el lavado.
- E. Colocar los viales en su lugar correspondiente en la estación de fluido:
  - a. Colocar un vial (ambar) que contenga 600  $\mu$ L de la solución *StainCocktail 1* en la primera posición.
  - b. Colocar un vial (claro) que contenga 600  $\mu$ L de la solución *StainCocktail 2* en la segunda posición.
  - c. Colocar un vial (claro) que contenga 800  $\mu$ L de la solución *Array Holding Buffer* en la tercera posición.
- F. Lavar y teñir en la estación de fluidos *FluidicsStation450* usando el programa *fluidics script FS450\_0003*.
- G. Cerciorar que no existan burbujas de aire en el chip. Si se encuentran burbujas, llenar manualmente con *Array Holding Buffer*. Si no existen burbujas de aire, cubrir ambos septos con 3/8" *Tough-Spots*. Inspeccionar la superficie transparente del chip, la cual debe de estar libre de polvo y/u otras partículas. Si es necesario, limpiar cuidadosamente la superficie con *cleanlabwipe* antes de realizar el escáner.

## Escaneo

Las instrucciones para el uso del escáner, pueden ser encontradas en el manual del usuario precargado en la consola, nombrado *AffymetrixCommandConsole Software User Manual* en el capítulo 6 (<http://www.affymetrix.com>).

## Análisis.

Analizar los resultados del escaneo mediante el programa *ExpressionConsole* de Affymetrix.

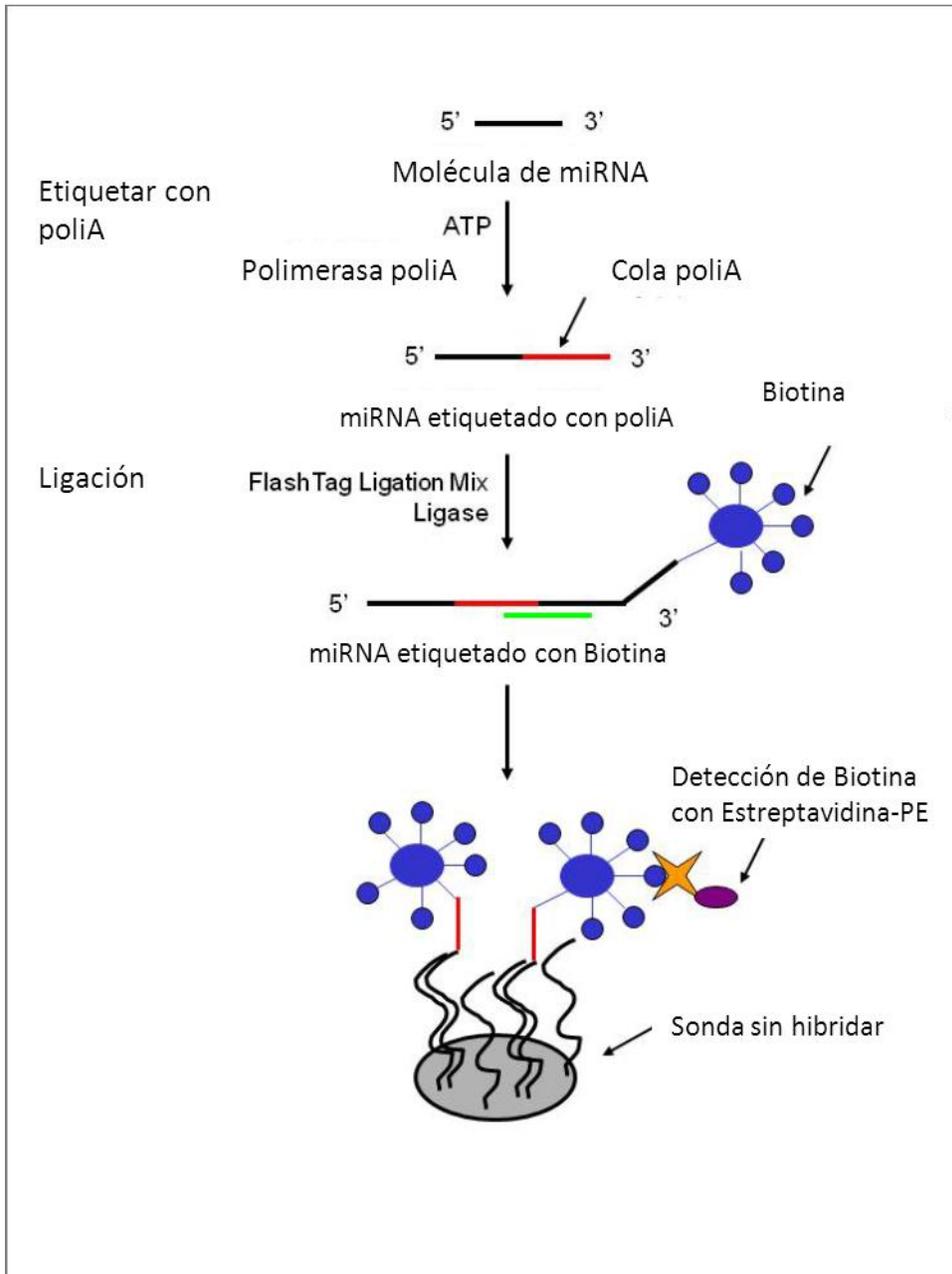


Figura A4. Representación del procedimiento de etiquetado.



PROTOCOLO: IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE microRNAs EN SUERO, QUE PERMITEN EL DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE CÉRVIX (Comité de Ética Núm: BI-09-004)

CUESTIONARIO

CLAVE: \_\_\_\_\_

FECHA: (mes/día/año) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Le agradecemos que haya decidido participar en este importante estudio acerca del virus del Papiloma Humano que se está realizando a través de la Facultad de Medicina de la UANL. Por favor llene o circule la respuesta correcta.

- 1. Origen de nacimiento de su abuelos paternos: Abuelo: \_\_\_\_\_ Abuela: \_\_\_\_\_
2. Origen de nacimiento de su abuelos maternos: Abuelo: \_\_\_\_\_ Abuela: \_\_\_\_\_

- 3. ¿Cuánto tiempo ha vivido en el estado de Nuevo León?:
1) Menos de un año 2) 1-5 años 3) más de 5 años

4. ¿Cuál es su fecha de nacimiento? (mes/día/año) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

5. Su estatura: \_\_\_\_\_ Su peso: \_\_\_\_\_ Kg

- 6. ¿Hasta qué año atendió la escuela?
1) Nunca fui a la escuela o sólo fui al Kinder.
2) Grados 1 a 6 (Primaria)
3) Grados 7 a 9 (Secundaria)
4) Grados 10 a 11-12 (Preparatoria)
5) 3 primeros años de Universidad o Escuela Técnica.
6) 4 o más años de Universidad (Graduado de la Universidad)
7) Otro (Especifique: \_\_\_\_\_)

- 7. ¿Cuál es su estado civil?
1) Casada 2) Vivo con alguien 3) Viuda, divorciada o separada 4) Soltera

- 8. ¿Quién está pagando su tratamiento médico?
1) Seguro privado 2) IMSS 3) ISSSTE 4) SSNL 5) Yo misma

- 9. ¿Está actualmente embarazada?
1) Sí 2) No 3) No sé
Si está embarazada, ¿En qué semana de embarazo está? \_\_\_\_\_ semana

10. ¿Cuántas veces ha estado embarazada anteriormente? \_\_\_\_\_ (Si nunca ha estado embarazada escriba 0 y vaya a la pregunta 10)

¿Cuántos partos? \_\_\_\_\_
¿Cuántas cesáreas? \_\_\_\_\_
¿Cuántos abortos? \_\_\_\_\_

11. ¿Cuántos años tenía cuando tuvo su primer embarazo? \_\_\_\_\_ años

- 12. ¿Le han hecho una histerectomía (quitarle la matriz)?
1) Sí 2) No 3) No sé



13. ¿Alguna vez le han hecho un Papanicolaou, examen de laboratorio de su vagina (partes privadas) o citología vaginal?

- 1) Sí 2) No (Vaya a la pregunta 15)

14. Aproximadamente, ¿cuántos exámenes de Papanicolaou le han hecho en los últimos 5 años? \_\_\_\_\_

(Si no le han hecho ninguno, ponga 0 y vaya hasta la pregunta 15)

15. ¿Cuándo le hicieron su último Papanicolaou? (mes/ año) \_\_\_\_/\_\_\_\_

16. ¿Cuál fue el resultado de su examen de Papanicolaou más reciente?

- 1) Normal 2) No sé 3) Anormal (si recuerda el diagnóstico exacto, por favor especifíquelo\_\_\_\_\_)

17. ¿Alguna vez a le dijeron (un doctor, una enfermera o una promotora de salud) que tuvo un examen anormal o algún problema con el cuello de su matriz?

- 1) Sí 2) No

18. ¿Cuál tratamiento ha recibido para este o estos exámenes anormales? (Circule todas las que se apliquen)

- 1) Sin tratamiento 2) Crema vaginal 3) Criocirugía (quemar) / Cauterización (congelar) / Láser 4) Biopsia 5) Otra (por favor especifique)\_\_\_\_\_ 6) No sé

17. ¿Algún doctor u otro profesional de la salud le dijo que usted tuvo algún tipo de cáncer cervical?

- 1) Sí 2) No

Table with 2 columns: ¿Dónde recibió tratamiento para este cáncer? (especifique el nombre y la localización de la institución) and ¿Qué edad tenía usted cuando le diagnosticaron el cáncer? (años). Includes fields for Nombre and Dirección.

18. ¿Alguna vez ha fumado al menos un cigarro, cigarrillo, o pipa al día por seis meses o más?

- 1) Sí 2) No (continúa con la pregunta 20)

19. ¿Fuma actualmente? 1) Sí 2) No

20. ¿Qué edad tenía cuando tuvo su primera menstruación? \_\_\_\_\_ años 2) No sé

21. ¿Qué edad tenía cuando tuvo su primera relación sexual?

- 1) \_\_\_\_\_años 2) No sé 3) Nunca ha tenido relaciones sexuales (vaya a la pregunta 26)

22. ¿Con cuántos hombres ha tenido relaciones sexuales?

- 1) 1-2 2) 3-5 3) 6-10 4) más de 10 5) Rehúsa responder esta pregunta

24. ¿Piensa que su pareja actual o más reciente tiene (tuvo) sexo con otras mujeres durante el mismo tiempo que tiene (tuvo) relación con usted? 1) Sí 2) No 3) No sé



25. ¿Piensa que su actual o más reciente pareja tiene (tuvo) sexo con prostitutas durante el mismo tiempo que tiene (tuvo) relación con usted?

- 1) Si 2) No 3) No sé

26. ¿Cuál es el principal método anticonceptivo que usa?

- 1) Inyecciones para el control de natalidad
2) Dispositivo intrauterino (DIU)
3) Píldoras/ anticonceptivos orales
4) Condones
5) Espermicidas o Espuma
6) Diafragma
7) Norplant
8) Ninguno
9) Otros (Especifique)

27. Algún doctor le ha dicho que usted sufre de:

Table with 3 columns: Enfermedad, Edad que tenía cuando tuvo la enfermedad, ¿Cuántas veces ha tenido la enfermedad? Rows include Diabetes, Infección vaginal, Infección por clamidia, etc.

¡GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN EN NUESTRO ESTUDIO!