

## 12. MicroRNAs reguladores de proteínas blanco de la acción de E6 y E7 de VPH como biomarcadores de Lesiones Preneoplásicas de alto grado de cérvix (NIC 2+)

Martha I. González<sup>1</sup>, Gloria I. Sánchez<sup>2</sup>

### INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical (CC) ocupa el primer lugar en mortalidad en poblaciones con un bajo índice de desarrollo humano (IDH) donde ocurren 80% de los 570,000 casos y las 311,000 muertes estimados en el 2018 en todo el mundo. La infección con genotipos de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano (VPH-AR) es la causa necesaria pero no suficiente del CC, otros factores contribuyen a la inducción de altos niveles de expresión de las oncoproteínas virales y la desregulación del control de la proliferación del ciclo celular que causan la acumulación de mutaciones que conducen al cáncer. Las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH-AR bloquean los supresores de tumores p53 y pRB induciendo pérdida total del control del crecimiento celular.

El cáncer cervical se puede prevenir mediante la detección temprana apropiada. Sin embargo, la baja sensibilidad y complejidad de la citología y la baja especificidad de las pruebas de VPH son limitaciones para la implementación de un programa de detección adecuado en estas poblaciones. Se ha descrito que la expresión de microRNAs, RNAs cortos de 18 a 25 nucleótidos bloqueadores de la transcripción y traducción de proteínas, está desregulada en varios cánceres y que la expresión diferencial de microRNAs en lesiones precursoras de bajo y alto grado pudiera estar relacionada con el proceso carcinogénico inducido por las oncoproteínas E6 y E7.

<sup>1</sup> Estudiante Maestría Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas U. de A.

<sup>2</sup> Coordinadora Grupo Infección y Cáncer y Profesora titular Facultad de Medicina U. de A.

Correspondencia: Martha I. González: martha.gonzalezr@udea.edu.co;

Gloria I. Sánchez: gloria.sanchez@udea.edu.co

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prueba de VPH-AR es recomendada para tamizar lesiones de alto grado de cérvix porque es una prueba robusta, reproducible, altamente sensible. Sin embargo no todas las infecciones con VPH-AR progresan a cáncer, por eso, esta prueba tiene baja especificidad. Se necesitan métodos, capaces de distinguir las mujeres con mayor riesgo transformación oncogénica de aquellas que tienen infecciones con VPH-AR benignas. Existe evidencia de que los microRNAs modulan la expresión de genes relacionados con procesos carcinogénicos del VPH-AR. **Nuestra hipótesis es que los microRNAs reguladores de proteínas blanco de la acción de E6 y E7 del VPH de alto riesgo, están aumentados en lesiones preneoplásicas de alto grado de cérvix y cáncer cervical.**

### OBJETIVO GENERAL

Comparar la expresión de los microRNAs candidatos que regulan las proteínas blanco de la acción de E6 y E7 entre mujeres con lesiones de bajo grado y lesiones de alto grado de del cérvix.

### METODOLOGÍA

MicroRNAs reguladores de proteínas blanco de acción de E6 y E7 de VPH fueron predichos mediante algoritmos bioinformáticos de miRWalk2.0, y de estos se eligieron los microRNAs validados en ensayos in vitro con expresión de E6 y E7 del VPH-AR. El análisis de la expresión diferencial de microRNAs candidatos se llevara a cabo en exfoliados cervicales de pacientes VPH+ o VPH- y diagnosticadas con lesiones cervicales de alto (Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2 o más severo o NIC2+) o bajo grado (Negativas o NIC 1). La extracción de microRNAs se llevó a cabo con el kit High Pure miRNA Isolation (Roche) y la cuantificación con el kit Qubit™ microRNA Assay (Invitrogen™). Se obtendrá el cDNA con el kit miRCURY LNA RT (Qiagen) y la amplificación con el Kit miRCURY LNA SYBR® Green PCR utilizando cebadores LNA (Qiagen). Los niveles relativos de microRNAs se calcularan usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y U6snRNA como normalizador de la expresión relativa. Se compararan medianas entre dos grupos por el test de U- Mann Whitney y Kruskal Wallis para más de dos grupos, se tomara significativo para valores de  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS ESPERADOS

Un set de microRNAs expresados diferencialmente en NIC 2+ versus lesiones de bajo grado (NIC 1) positivas o negativas para el AR-VPH.

### RESULTADOS PARCIALES

Los algoritmos de predicción bioinformática identificaron un set de 41 microRNAs potencialmente desregulados por las proteínas E6 y E7 de VPH-AR. Por literatura hemos identificado 8 microRNAs de estos 41 (106b, 15b, 16, 181b, 205p, 20b-5p, 25-3p, y 378a-5p) que regulan la expresión de las proteínas TP53, EP300, CDK1A y CDK1B, involucradas en la carcinogénesis del cáncer cervical. La evaluación de la concentración de microRNAs extraídos de células de exfoliados cervicales almacenadas a -30°C en diferentes medios: STM (Specimen Transport Medium), STM+DNR (células desnaturalizadas), PBS y RNAlater; mostro diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de microRNAs extraídos de células lisadas en STM+DNR con respecto a células almacenadas en STM ( $p=0.0002$ ), en cambio no hubieron diferen-

cias entre las células almacenadas en RNAlater y PBS ( $p=0.9300$ ). Variables de calidad como el tiempo de almacenamiento no tuvo efecto sobre la concentración de microRNAs extraídos de células de exfoliados cervicales,  $p= 0.0724$ , ni tampoco el tiempo que tardó la muestra a temperatura ambiente hasta ser almacenada en el laboratorio ( $p= 0.6534$ ).

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PRELIMINARES (SI LAS TIENEN)

Se identificó in sílico 41 microRNAs y de estos 8 microRNAs se eligieron con potencial de ser utilizados como biomarcadores para distinguir lesiones de alto grado de lesiones de bajo grado del cérvix. Las células desnaturalizadas almacenadas en STM+DNR, preservan mejor los microRNAs que las células sin desnaturalizar en STM probablemente por la ausencia de enzimas ribonucleasas en el medio. En cuanto a las variables de calidad como el tiempo de almacenamiento y el tiempo que tardó la muestra a temperatura ambiente no mostraron tener un efecto sobre la concentración de microRNAs extraídos de células de exfoliados cervicales.