



USO DE BIOMARCADORES EN EL CANCER DE
CAVIDAD ORAL



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
USO DE BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE CAVIDAD ORAL

INTEGRANTES

Keila Mildrez Sarmiento Tovar

Karen Julieth Ibarra Díaz

Lizeth Fajardo López

Asesor

Manuel García Flórez PhD
Programa de Odontología
Universidad Antonio Nariño

Mayo de 2020



TABLA DE CONTENIDO

1. introducción	4
2. antecedentes	5
3. justificación	7
4. objetivos	9
general	9
específicos	9
5. marco teorico	10
6. metodología	12
7. resultados	34
8. discusión	38
9. bibliografía	43



Introducción

El cáncer es el resultado de la proliferación descontrolada de células anormales, ya sea provocada por cambios genéticos (moleculares) que se transmiten de los padres a sus hijos (hereditarios) o que se presentan en el cuerpo a lo largo de la vida de una persona (adquiridos). Cada tipo de cáncer presenta un grupo único de cambios moleculares en las células cancerosas. Los avances tecnológicos han hecho posible las pruebas moleculares, lo cual permite a los médicos identificar las diferencias moleculares entre las células cancerosas y las células sanas.

El desarrollo de este trabajo tiene como finalidad proponer y desarrollar un estudio sobre un marcador (o *pool* de marcadores) que permita tener un diagnóstico preciso del estado de la patología y si este es de fácil obtención a través de métodos poco invasivos, estaríamos ante un marcador ideal que contribuiría con un tratamiento a tiempo promoviendo la calidad de vida de los pacientes, hablaremos de los microRNA que son pequeños ARNs que regulan la expresión de sus genes diana a través de la disminución de expresión de las proteínas codificadas por dichos genes, mediante represión de la traducción y/o degradación de su ARNm. Los miRNAs juegan un papel fundamental en virtualmente todos los procesos celulares incluyendo desarrollo, función y supervivencia. los miRNAs son como reguladores críticos de la tolerancia inmunológica y de la autoinmunidad, estos son como potenciales nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de múltiples enfermedades.



Antecedentes

En relación con la incidencia de todos los cánceres, los carcinomas de células escamosas orales y orofaríngeos representan aproximadamente el 3% de los cánceres en los hombres y el 2% de los cánceres en las mujeres. Anualmente, se espera que ocurran más de 36.000 casos nuevos de cáncer oral y orofaríngeo en hombres y mujeres.

Las muertes causadas por cáncer oral y orofaríngeo representan aproximadamente el 2% del total en varones y el 1% del total en mujeres. El número total de muertes anuales estimadas como resultado de cáncer oral y orofaríngeo es tan alto como 7880 en los estados unidos, aunque se observa una disminución de un poco más del 1.8% en las tasas de mortalidad por cáncer entre 1991 y 2006 para esta afección.

En India y algunos otros países asiáticos, el cáncer oral es el tipo más común de malignidad y puede representar más del 50% de todos los casos de cáncer. Este hallazgo generalmente está relacionado con la alta prevalencia de un hábito de tabaco sin humo único. El tabaco, típicamente mezclado con nuez de areca (betel), cal apagada y especias, se conoce como quid o paan, y se mantiene en el vestíbulo bucal durante largos períodos. Esta combinación de ingredientes, que puede variar de un lugar a otro, es más cancerígeno que el tabaco usado solo.

Los factores que se cree que contribuyen a la etiología del cáncer oral, el tabaco se considera el más importante. Todas las formas de fumar tabaco se han relacionado fuertemente con la causa del cáncer oral. Fumar tabaco y pipas está



relacionado con mayor riesgo de desarrollar dicha patología que el asociado con fumar cigarrillos.

Este alto riesgo se debe a la intensidad de la combustión del tabaco adyacente a los tejidos palatales y linguales. En cualquier caso, la relación tiempo – dosis de los carcinógenos encontrados en el tabaco es de suma importancia para determinar la causa del cáncer oral. Además de su mayor riesgo general de desarrollar cáncer en todas las regiones de la boca. Se cree que el uso a largo plazo de tabaco sin humo, ya sea en forma de tabaco (tabaco molido y finamente cortado) o tabaco de mascar (tabaco en hoja suelta) aumenta el riesgo de cáncer oral, aunque el nivel de riesgo es probablemente bajo.

En vista de este menor riesgo de cáncer oral, algunos han abogado por el tabaco sin humo o incluso los cigarrillos electrónicos como alternativas a los cigarrillos convencionales, aunque la razón para esto es sospechosa cuando existen métodos alternativos seguros para dejar de fumar. Además, muchos pacientes que usan

Productos de tabaco sin humo también consumen cigarrillos y alcohol, lo que aumenta su riesgo de cáncer oral. Además, el uso de tabaco sin humo conlleva otros riesgos para la salud, como presión arterial elevada, dependencia fisiológica y empeoramiento de la enfermedad periodontal.

El alcohol, aunque generalmente no se cree que sea un carcinógeno en sí, parece aumentar el riesgo de desarrollo de cáncer oral. La identificación del alcohol solo como factor cancerígeno ha resultado ser algo difícil debido a la combinación de fumar y beber que se observa en la mayoría de los pacientes con cáncer oral. Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes sugieren que el consumo de alcohol solo puede aumentar el riesgo de cáncer oral. Se cree que los efectos del alcohol se producen a través de su capacidad para irritar la mucosa y actuar como un solvente para los carcinógenos (especialmente aquellos en el tabaco).



Justificación

El cáncer es un tumor maligno, duro o ulceroso, que tiende a invadir y destruir los tejidos orgánicos circundantes. Los cánceres orales se dividen en dos categorías: los que ocurren en la cavidad oral (los labios, la parte interior de los labios y mejillas, dientes, encías, los dos tercios frontales de la lengua y el piso y el cielo de la boca) y los que ocurren en la orofaringe (la parte media de la garganta, incluyendo las amígdalas y la base de la lengua).

Los factores de riesgo son el tabaquismo, el alcoholismo y la infección con el virus del papiloma humano (hvp). los síntomas incluyen llagas que no sanan, protuberancias, o manchas blancas o rojas en el interior de la boca, el tratamiento incluye cirugía y radioterapia. En algunos casos, puede requerir quimioterapia. Los posibles efectos secundarios de la radioterapia son los cambios en la piel como una quemadura de sol o bronceado el área tratada en la cabeza que lentamente desaparecen, ronquera, pérdida del sentido del gusto, enrojecimiento e irritación o incluso dolor en la boca y en la garganta.

Algunos individuos son vulnerables a la presencia de cáncer, causadas principalmente por sus hábitos, por lo cual es de gran importancia la generación de conocimiento de las poblaciones que son o están en un estado de mayor vulneración, se destacan las personas mayores de edad, alcohólicas, con hábito de tabaquismo, personas que trabajan al aire libre, donde están expuestas a la luz solar por mucho tiempo, individuo que tienen un sistema inmunitario debilitado o con ciertos síndromes, personas con prótesis mal adaptadas lo cual causa una irritación a largo plazo del revestimiento de la boca.

La población universitaria en el área de la salud oral, están capacitados y poseen las herramientas para ayudar a las personas dándoles a conocer los efectos secundarios que causa un mal hábito.



Las neoplasias de la cavidad oral detectadas tardíamente son de pronóstico negativo, esta detección a destiempo se debe en parte a que frecuentemente son subvaloradas e inicialmente catalogadas como lesiones epiteliales simples. Otro factor, que dificulta su diagnóstico es su localización anatómica lo que impide un análisis más detallado de su evolución. Por lo tanto, su detección precoz es fundamental en el momento de prevenir y manejar adecuadamente esta patología. Por tal razón se debe encontrar un marcador (o *pool* de marcadores) que permita tener un diagnóstico preciso del estado de la patología y si este es de fácil obtención a través de métodos poco invasivos, estaríamos ante un marcador ideal que contribuiría con un tratamiento a tiempo promoviendo la calidad de vida del paciente.



Objetivos

Objetivo General

- Encontrar marcadores moleculares que sirvan como factor diagnóstico y/o pronóstico del cáncer de cavidad oral

Objetivos Específicos

- Relacionar las características morfológicas del tejido con la expresión de marcadores moleculares
- Relacionar las características clínicas de los pacientes con los marcadores moleculares



Marco Teórico

El aspecto clínico y el grado de displasia de las lesiones cancerosas de la cavidad bucal sugieren su capacidad de malignidad; sin embargo, éstas generalmente son diagnosticadas en estadios avanzados, disminuyendo la probabilidad de supervivencia, lo que justifica el diseño de nuevas pruebas diagnósticas que determinen el grado de alteración celular. Esta búsqueda para mejorar los métodos diagnósticos, apunta a que sean sensibles, específicos y menos invasivos, por lo cual el estudio de diferentes biomarcadores en saliva que desde una perspectiva molecular proporcionan información adicional al examen clínico e histopatológico, es considerada como una alternativa eficaz y más cómoda con respecto a los ensayos en sangre

Un potencial marcador molecular y de reciente descubrimiento son los microRNAs, RNA de pequeño tamaño que tienen diferentes papeles en el control de la expresión génica, incluso evidencias recientes indican que estas moléculas pequeñas de RNA que no codifican proteínas, pueden funcionar como supresores tumorales o como oncogenes:

La visión de que los genes que participan en la patogénesis y progresión del cáncer, oncogenes y genes supresores de tumor, eran genes que codificaban proteínas, fue cambiada después de los resultados de Calin *et al.* 2002,⁽¹⁾ quien demostró que las mayores alteraciones genéticas de la leucemia linfática crónica de células B, consistía en la pérdida de los microRNAs miR-15a y miR-16-1^(1, 2). Demostrando así que las alteraciones en los genes que no codifican proteínas también podían ser responsables por el desarrollo y progresión de algunos tipos de cáncer.



Los microRNAs han sido implicados en el cáncer oral y ya que están en la saliva estos podrían usarse como marcadores de diagnóstico y de pronóstico, para una enfermedad de difícil acceso como el cáncer de cavidad oral.

El cáncer oral se detecta de forma tardía y generalmente presenta un pobre pronóstico para los pacientes. Es indispensable encontrar un mecanismo de detección temprana que permita un abordaje adecuado de la enfermedad. Es importante que el investigador sea el pionero y líder en esta detección temprana. Previamente se ha reportado la presencia de microRNAs en fluidos biológicos, y consideramos que la saliva puede contener un perfil de microRNAs que pueden reflejar el estado celular del tejido oral, lo que en el caso de las patologías sería un instrumento adicional de clasificación.

Metodología

Para la realización de esta investigación se seleccionaron bloques de parafina de cáncer oral de pacientes tratados quirúrgicamente formando así una muestra por conveniencia de pacientes con cáncer oral. Los casos fueron seleccionados por el Departamento de Patología del Hospital Universitario Hernando Moncalenao Perdomo. (Tabla 1).

Criterios de inclusión

Se seleccionaron los pacientes que fueron atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano con cáncer en cavidad oral como faringe, laringe, lengua, epiglotis en el año 2014-2016, se excluyeron los pacientes con cáncer de labio ya que está relacionado con la exposición solar y otros factores.

Tabla 1. Diagnostico patológico, edad, género y lugar anatómico de las muestras seleccionadas por conveniencia para identificar características histológicas del carcinoma escamocelular.

Caso	Diagnósticos histopatológico	Edad	Gen	Lugar Anatómico
1	Carcinoma escamo celular moderadamente diferenciado de la región glótica izquierda con extensión supraglótica e infraglótica	80	M	Laringe
2	Carcinoma escamo celular pobremente diferenciado infiltrante	64	M	Base de lengua, ganglios y epiglotis
3	Carcinoma escamo celular bien diferenciado	47	M	Lengua
4	Carcinoma escamo celular moderadamente diferenciado.	75	M	Laringe
5	Carcinoma escamocelular bien diferenciado, ulcerado, infiltrante, que compromete la supraglotis, glotis y subglotis.	74	M	Laringe
6	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado infiltrante.	63	M	Laringe
7	Carcinoma escamoscelular sarcomatoie.	33	F	Lengua
8	Carcinoma escamocelular infiltrante de células grandes, queratinizante, moderadamente diferenciado	56	M	Lengua y paladar blando



9	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado ulcerado infiltrado.	54	F	Lengua
10	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante.	79	M	Lengua
11	Carcinoma escamocelular bien diferenciado	66	M	Lengua
12	Carcinoma escamocelular de células grandes no queratinizante	66	M	Cavidad oral y ganglio mandibular
13	Carcinoma escamocelular infiltrante de células grandes, queratinizante, bien diferenciado.	72	F	Laringe
14	Carcinoma escamocelular bien diferenciado	55	M	Laringe
15	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado, infiltrante.	54	M	Amígdala izquierda
16	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado, infiltrante.	52	M	Laringe
17	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante ulcerado e infiltrante.	49	M	Lengua: bode lateral izquierdo
18	Carcinoma escamocelular infiltrante de crecimiento endofítico, ulcerado de células escamosas grandes, queratinizante, bien diferenciado	43	M	Lengua
19	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado, ulcerado, infiltrante.	87	F	Lengua
20	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado.	41	M	Lengua
21	Carcinoma escamocelular de la lengua, ulcerado, que infiltra	63	M	Lengua
22	Carcinoma escamocelular bien diferenciado, ulcerado, infiltrante.	58	M	Lengua
23	Carcinoma escamocelular pobremente diferenciado no queratinizante.	60	M	Amígdala derecha
24	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante infiltrante.	92	M	Amígdala izquierda
25	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado	62	M	Hipofaringe
26	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado	47	F	Amígdala
27	Comisura anterior y Glotis: Carcinoma escamocelular queratinizante moderadamente diferenciado	66	M	Comisura anterior y glotis: Laringe
28	Carcinoma escamocelular pobremente diferenciado abscesado.	76	M	Lengua
29	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante ulcerado infiltrante.	48	F	Hemilengua derecha
30	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado queratinizante ulcerado infiltrante.	56	F	Hemilengua



31	Carcinoma escamocelular bien diferenciado.	72	M	Cuerda vocal derecha y laringe
32	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante e infiltrante.	67	M	Hemilengua Izquierda
33	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante infiltrante.	65	F	Hemilengua izquierda
34	Carcinoma escamocelular bien diferenciado ulcerado e infiltrante	38	F	Lengua

Variables de modelación:

Se analizarán las biopsias previamente tomadas de los pacientes con lesiones, para confirmar o descartar la presencia de la patología, una vez confirmados los casos se procederá a su respectiva clasificación patológica de acuerdo con los criterios del *American Joint Committee on Cancer* ⁽³⁾, finalmente se realizará la correlación entre la clasificación patológica con la expresión génica de los microRNAs

Consideraciones Éticas

Todos los procedimientos realizados en el estudio siguen las consideraciones éticas de investigación biomédica, y han sido aprobados por los respectivos Comités de Ética Institucionales. La confidencialidad de los pacientes ha sido mantenida, además ellos han aceptado de esta participación previamente.



Selección de las muestras

EXAMEN MICROSCÓPICO

Las biopsias de los pacientes fueron procesados de forma convencional en parafina. Todo el tejido será sometido al examen histológico. Cortes de 4 a 6 μ m fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina y han sido analizados en el microscopio óptico por el Dr. Fernando Bolaños. Quien confirmó la presencia de la neoplasia en el tejido.

EXTRACCIÓN de microRNA

Las muestras fueron recolectadas en tubos estériles el estudio y preservado en la solución RNA^{later}® solution (Life technologies™, Carlsbad, CA, USA) a -80°C, posteriormente fue usado el kit *mirVana*™miRNA Isolation Kit AM 1560 (Life technologies™, Carlsbad, CA, USA) para la extracción de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para este fin, cada muestra (500 μ L aprox.) fue mezclada con 500 μ L de buffer de lisis durante 3 minutos a 50rpm, enseguida el sobrenadante fue llevado cuidadosamente a un nuevo tubo eppendorf y se le adicionó 50 μ L de aditivo (*homogenate additive*), y será invertido varias veces para su completa mezcla y se dejó en reposo por 10 min a 4°C. Enseguida, fueron agregados 500 μ L de fenol-cloroformo, agitados por 30 segundos y centrifugado a 13500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, en una centrifuga eppendorf 5415D, (eppendorf AG. Hamburgo, Alemania).



Posterior a la centrifugación fueron obtenidas dos fases, a continuación se recolectó la fase superior o acuosa de manera cuidadosa para no contaminar la muestra, enseguida esta fue medida y transferida para un nuevo tubo.

En este se adicionado el equivalente a 1/3 del volumen anteriormente medido de etanol 100%, y se procedió a transferir el volumen total a un nuevo tubo que contiene una columna de sílice. El material fue centrifugado a 10000 rpm por 15 segundos. En el nuevo filtrado, que contiene los microRNAs, fue agregado 2/3 del volumen de etanol 100%. En el filtro quedan retenidos los RNA de mayor tamaño los cuales fueron retomados posteriormente. El filtrado con los microRNAs fueron transferidos para un nuevo tubo con una columna de sílice siendo centrifugado a 10000 rpm por 15 segundos. Se descartó el filtrado, entonces se procedió al lavado de la columna con RNA total anteriormente guardada y la columna con los microRNAs, así: se adicionó, en las columnas 700 μ L de tampón de lavado 1 (*Wash Solution 1*), se centrifugó a 10000 rpm por 15 segundos, la columna fue lavada nuevamente con buffer de lavado 2/3 (*Wash Solution 2/3*). Una vez descartado el buffer de lavado se centrifugo nuevamente, en la misma velocidad, para su secado. Finalmente los microRNAs fueron resuspendidos en 50 μ L de agua libre de nucleasas (*Elution Solution*) (Resumen del procedimiento figura 1). La cuantificación del material colectado (RNA y el microRNA), se realizó con ayuda del Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), colocando 1 μ L de la muestra en el pedestal de lectura. La longitud de onda usada para determinar la concentración fue de 230 nm, para analizar la calidad y pureza de

las muestras se tendrá en cuenta la relación (260/280 nm). Posteriormente el material es conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

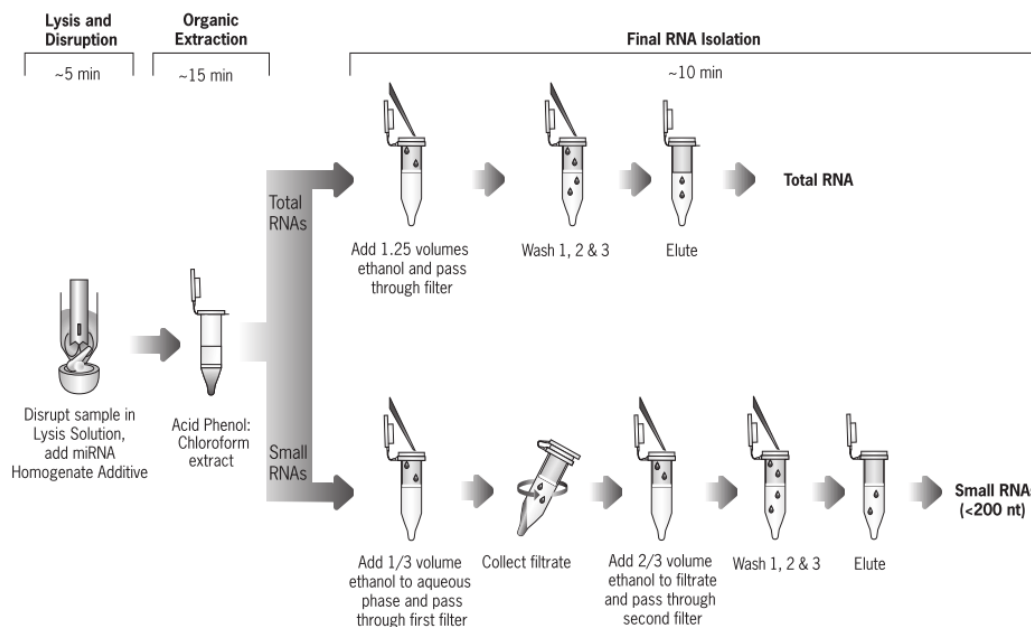


Figura 1. El material proveniente de los pacientes será conservado en la solución **RNA^{later}® solution**, que preserva el RNA, posteriormente, la muestra es fraccionada en una solución de lisis desnaturante la cual estabiliza el RNA e inactiva las RNAsas. El lisado resultante es entonces purificado con ácido-fenol-cloroformo hasta conseguir una muestra semipura de RNA. De esta, finalmente se obtiene el RNA total y los microRNAs con el uso de filtros y soluciones específicamente formulados y producidos por la casa comercial para este fin. Tomado de **mirVana™ miRNA Isolation Kit Protocol**.

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/fm_1560.pdf.

Figura 2. Cuantificación en nanodrop, de RNAs de pequeño extraídos con el kit Ambion invitrogen. Observar la calidad de la muestra cercana a 2,0 en el radio 260/280



TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

El DNA complementario (cDNA) fue generado usando los kits *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*[®] (Applied Biosystems, CA, USA) para el RNA y Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit[®] (Applied Biosystems, CA, USA) para el microRNA. Las respectivas soluciones fueron entonces sometidas a ciclos de temperaturas en el equipo de PCR Veriti (Applied Biosystem, Foster City, CA), siguiendo los siguientes parámetros: reacciones de RNA fueron incubadas a 25° C por 10 minutos, seguida por 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos, y las reacciones de microRNA a 16° C por 30 minutos, 42° C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. El cDNA obtenido se almacenado a -20° C hasta su uso.

AMPLIFICACIÓN DEL MICRORNA

Los iniciadores que fueron utilizados para la amplificación de los genes serán diseñados en el programa primer Express (Applied Biosystems, California, USA), que cubre los requerimientos de *Real Time* PCR que fueron realizados en el termociclador ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, California, USA) en el modo standard usando Master Mix PCR Taqman Universal. Las principales características de estos oligos son: amplificar fragmentos cuyo tamaño máximo no excede 20 pb, cantidad moderada de CG (40-60%), no poseen capacidad de anillar entre sí o de formar una estructura secundaria, y temperatura de anillamiento entre 58°C y 60°C. Llevando en cuenta los parámetros citados, los iniciadores entonces fueron diseñados para cada uno de los genes que fueron



analizados. El siguiente microRNA relacionado en diferentes procesos fue analizados: microRNA-301.

Análisis de la expresión por PCR en tiempo real Cuantitativo

Para la cuantificación de las muestras fue utilizado el kit TaqMan (Applied Biosystems, California, USA). Este protocolo utiliza dos iniciadores no fluorescentes y una sonda con doble marcación que se une a la región localizada entre los iniciadores. Esta marcación doble es formada por un fluoróforo que emite luz cuando es excitado y un *quencher* que absorbe la luz emitida por el fluoróforo. Durante los ciclos de la reacción de PCR, la sonda es quebrada por la enzima *Taq* polimerase en la etapa de extensión del iniciador anillado. Esta quiebra de la sonda elimina la absorción por el *quencher* de la fluorescencia emitida que puede ser entonces medida a través de una cámara situada en la parte superior del equipo. La cuantificación de la emisión absorbida por la cámara después de la ruptura de la sonda permite entonces la detección del producto de PCR en tiempo real (RT-PCR).

Las reacciones ocurrieron en las siguientes concentraciones: 0,5µl de una solución con un par de iniciadores y la sonda, 5µl del TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA), 3,5µl de agua libre de nucleasas, y 1 µl de cDNA. Las condiciones de la reacción fueron: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, e 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C.

Los perfiles de expresión de los miRNAs fueron obtenidos a través de cuantificación relativa determinada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (Figura 1)

Analisis de Expresion de microRNAs de Cancer de Cavidad Oral

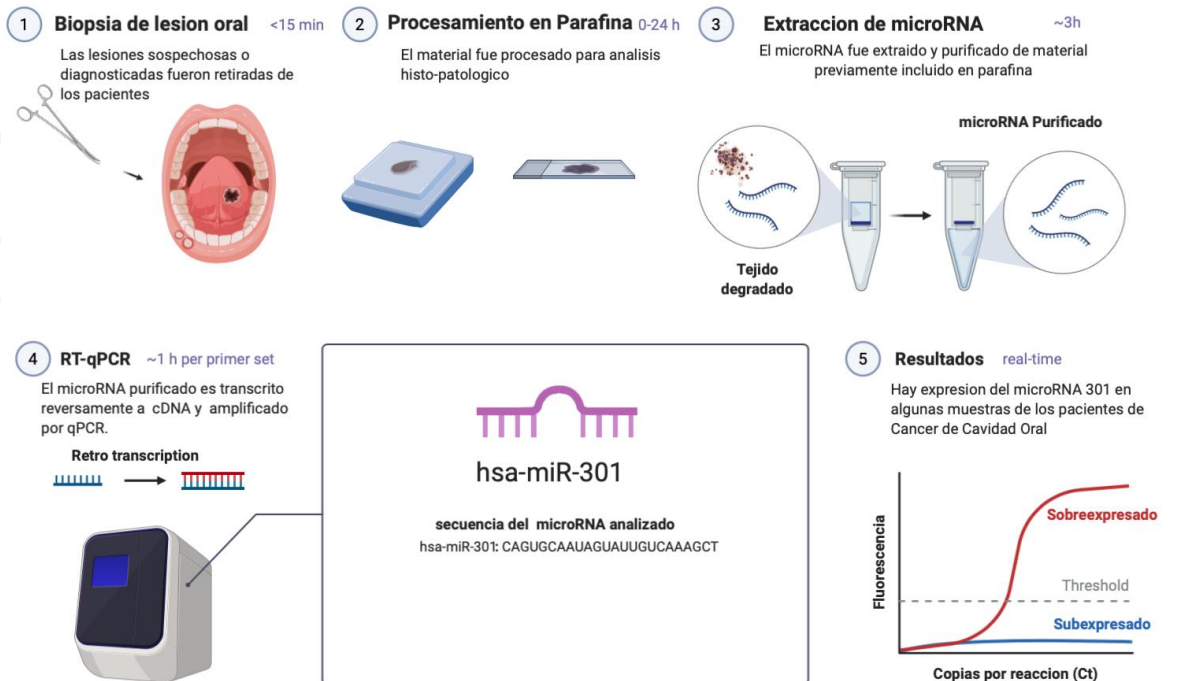




Tabla 1. Primer iniciador utilizado en este estudio para el análisis de la expresión. Génica de microRNAs

microRNA	Ensayo
miR-301	000528
U6RNA	Control

Resumen de procedimientos

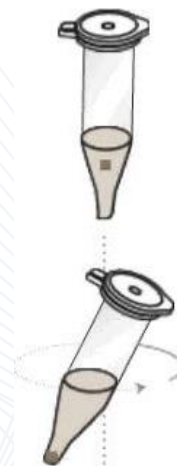
1. Desparafinización

Máximo de cuatro rodajas de 20 μm , 8 de $10 \mu\text{m}$ o 16 de $5 \mu\text{m}$ en un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml.

Ensamble secciones de FFPE equivalentes a $<80 \mu\text{m}$ o $<35\text{mg}$ de núcleo no seccionado

Corte secciones de 5 – 20 μm de bloques de tejidos FFPE usando un micrótopo

20 minutos

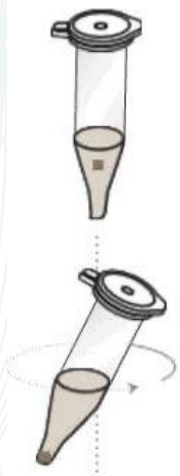


Centrifugue brevemente para llevar el tejido adherido a los lados del tubo hacia el xileno. Calentar la muestra durante tres minutos sobre 50°C para derretir la parafina

Añadir uno ml de xileno al 100 % mezclar e incubar durante tres minutos a 50°C Vórtice brevemente para mezclar

Centrifugar durante dos minutos a velocidad máxima y desechar el xileno, a temperatura ambiente, hasta formar un granulado o precipitado, retírelos sin dañar el sedimento

20 minutos



Paso1: añadir 1 ml de etanol al 100% (temperatura ambiente) a la muestra y vórtice para mezclar

Lave el sedimento dos veces con 1 ml de etanol al 100%, a temperatura ambiente, vórtice brevemente para mezclar el tejido debe tornarse opaco

Paso 2: centrifugue la muestra durante 2 min a temperatura ambiente y velocidad máxima para sedimentar el tejido

Secado durante 15-45 min a temperatura ambiente

Repetir paso 1 y 2

2. Digestión de proteasas

A. Añadir Buffer de digestión y proteasa

30 min
16 hr



1. adicione buffer de digestión según el tamaño de las muestras (tamaño >40 μ m, buffer 100 μ l (tamaño 40-80 μ m buffer 200 μ l)

2. agregue 4 μ l de la proteasa a cada muestra.
Agite el tubo suavemente para mezclar

B. Incubar a 50°C/80°C (ARN) o a 50°C (ADN)

1. para el aislamiento del ARL, incube la muestra en bloques de calor durante 15 min a 50°C luego a 15 min a 80 °c

2. para el aislamiento del ADN, incubar la muestra a 50°C

2. Aislamiento de ácido nucleico

A. prepare la mezcla de aditivo de aislamiento/etanol, según la cantidad de BUFFER colocado en la muestra

B. agregue el aditivo de aislamiento/etanol y mezcle, pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Algunas muestras pueden aparecer blancas y turbias después de mezclar

Pase la mezcla a través de un cartucho de filtro y para cada muestra, coloque un cartucho de filtro en uno de los tubos de recolección suministrados. Centrifugar a 10.000 xg (típicamente 10.000 rpm) durante 0 segundos para la mezcla a través del filtro

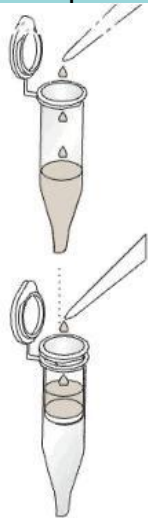
Para cada muestra, coloque un cartucho de filtro en uno de los tubos de recolección suministrados. Pipetee gata 700 ul de la mezcla de muestra/etanol (del paso B) en el cartucho del filtro y cierre la tapa

Lavado 1: lavar con 700 ul, con el cartucho del filtro, y centrifugar durante 30 segundos a 10.000 x g para pasar la mezcla a través del filtro

Deseche el flujo y vuelva a insertar el cartucho del filtro en el mismo tubo de recolección

Lavado 2/3: lave con 500 ul y luego centrifugue para eliminar el líquido residual, y centrifugar durante 30 segundos a 10.000 x g para pasar la mezcla a través del filtro

Deseche el flujo y vuelva a insertar el cartucho del filtro en el mismo tubo de recolección, gire el conjunto durante 30 segundos adicionales para eliminar el fluido residual del filtro



10 minutos

3. Digestión de nucleasas y purificación final

Agremente mezcla de DNasa o RNasa a cada cartucho de filtro e incube durante 30 minutos

Convine las siguientes soluciones para hacer la mezcla de DNasa (se puede usar una mezcla maestra si hay más de una muestra

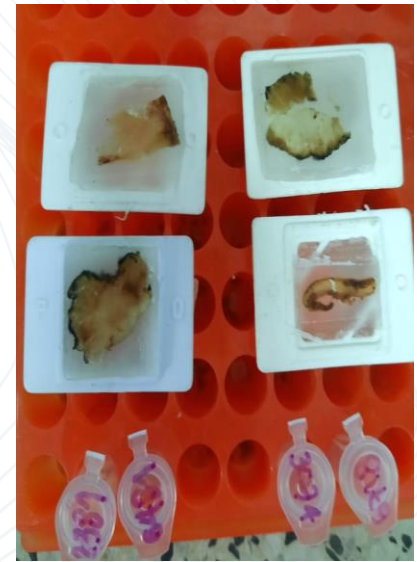
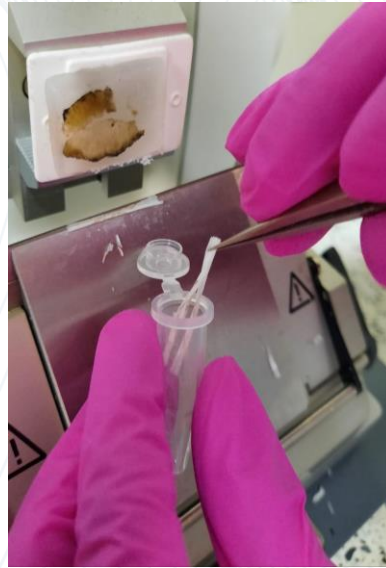
Agregue 60 ul dela mezcla de DNasa al centro de cada cartucho de filtro.
Tape el tuvo e incube duraente 30 min a temperatura ambiente (22-25° c)

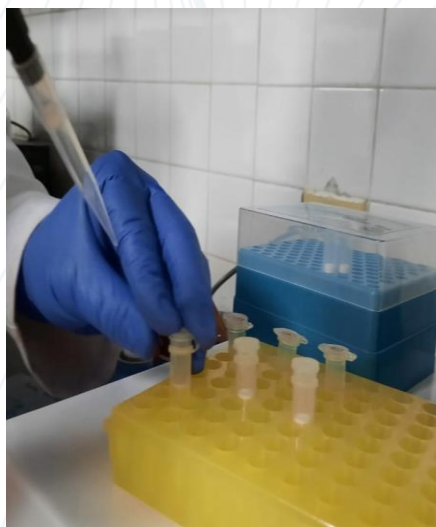
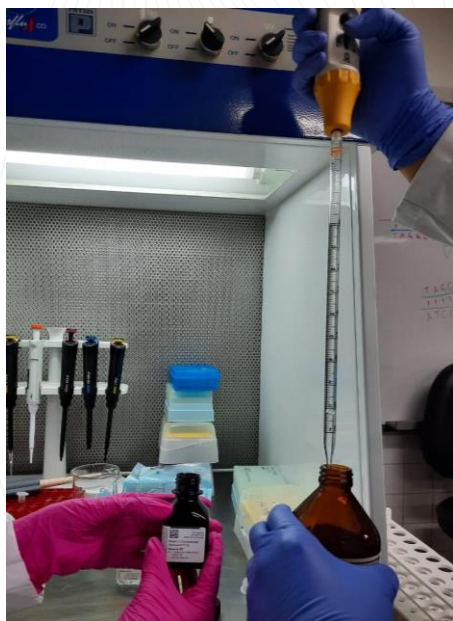
RNA

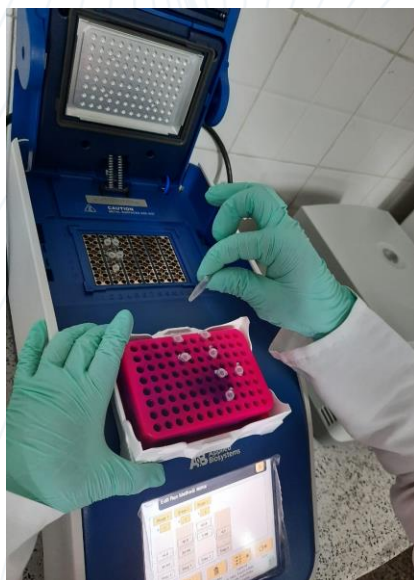
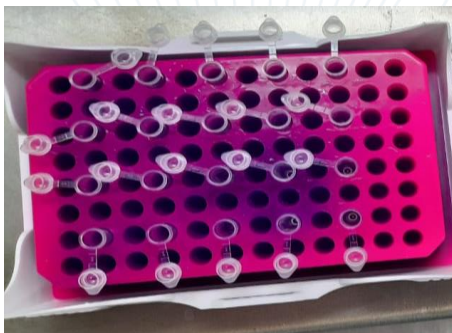
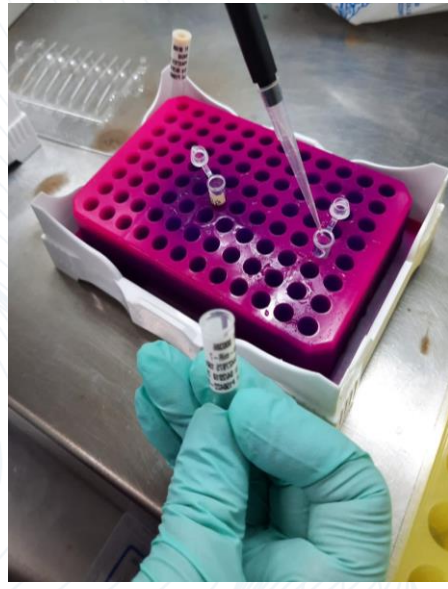
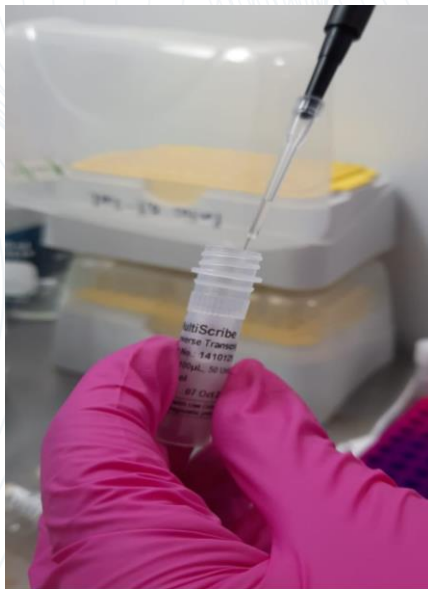


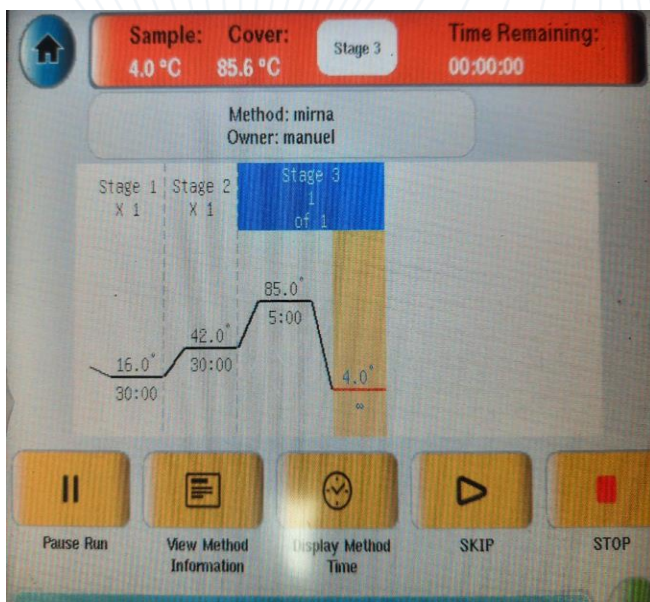
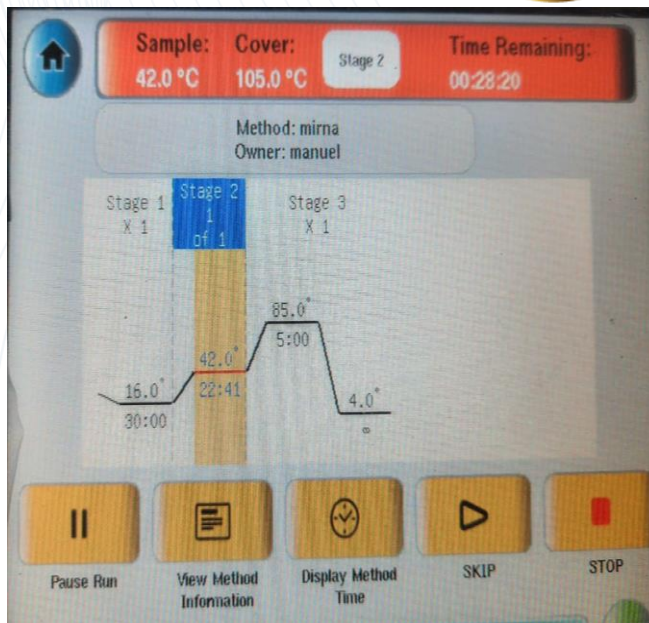
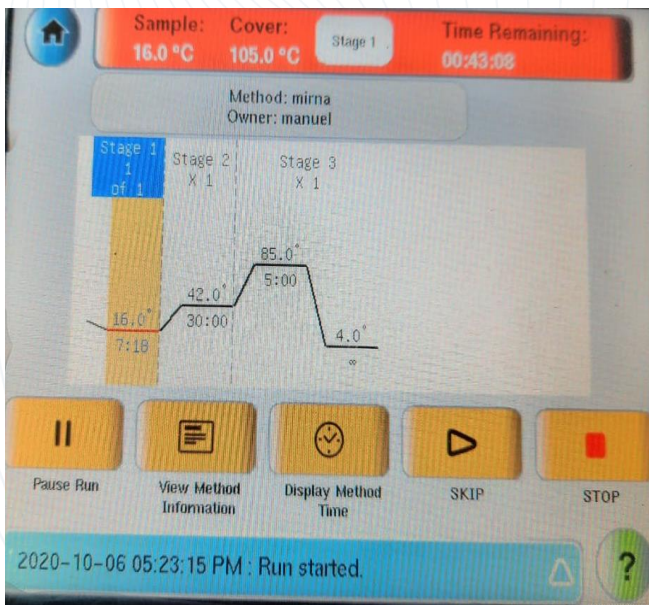
45 minutos

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE microRNAs









Reacciones por PCR en tiempo real Cuantitativo



Overview of TaqMan™ Small RNA Assay chemistry

Reverse transcription

cDNA is reverse transcribed from total RNA using a small RNA-specific, stem-looped primer.

- cDNA template
- Small RNA
- Looped RT primer
- RT Reverse transcriptase

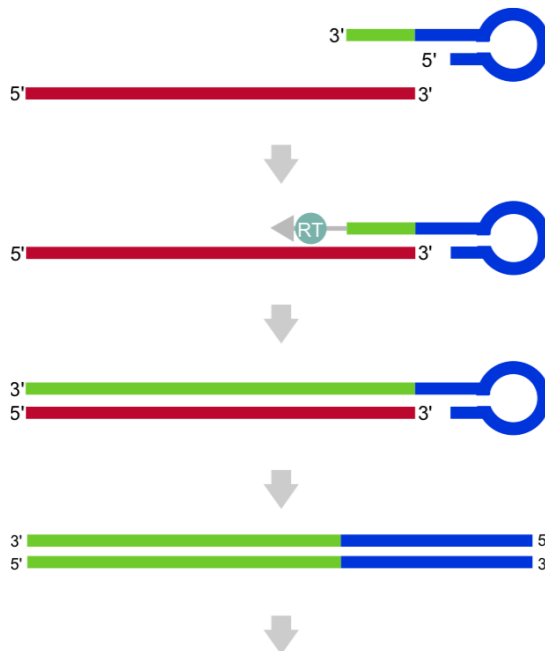


Figure 1 Stem loop primer

Primer ciclo se muestra la construcción del cDNA a partir del primer y la transcripción reversa

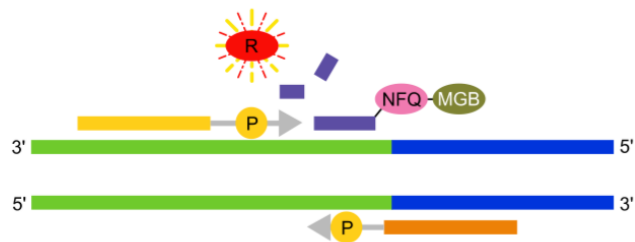


Figure 3 Initial polymerization and cleavage of reporter dye

Polymerization of the strand continues, but because the 3' end of the probe is blocked, no extension of the probe occurs during PCR.

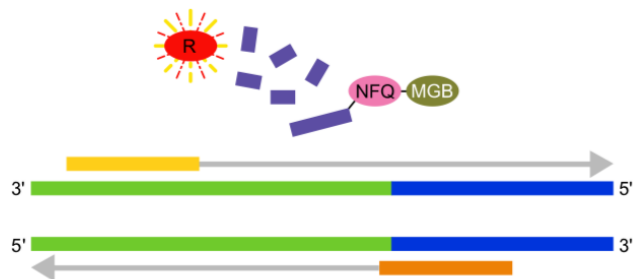
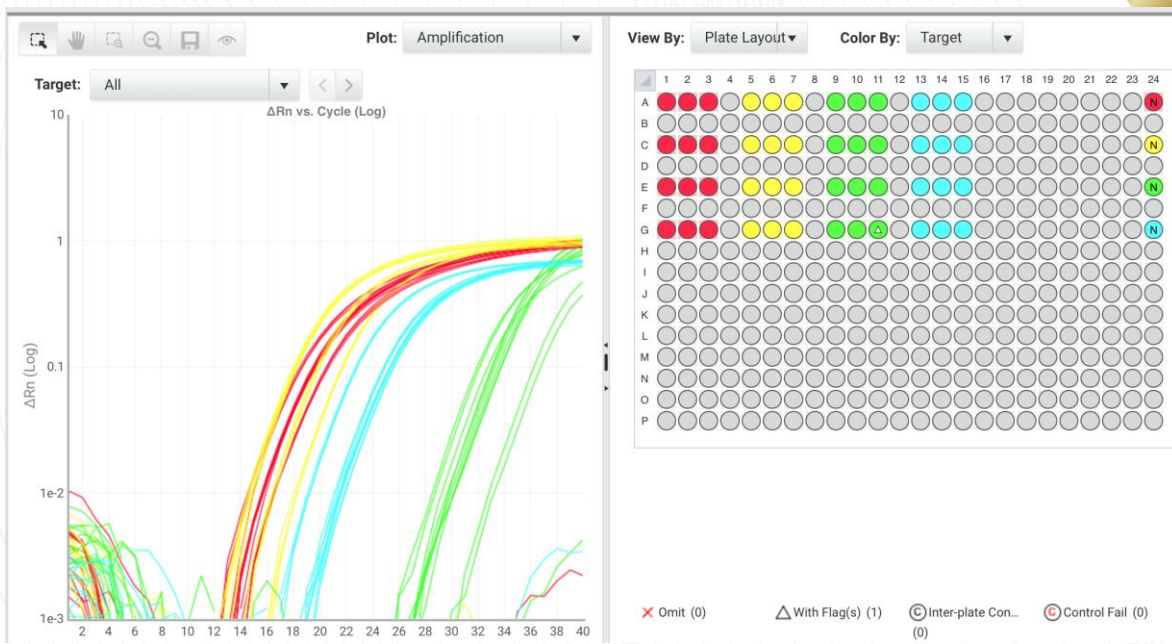


Figure 4 Completion of polymerization

En el segundo ciclo se produce la amplificación del cDNA por acción de la ADN polimerasa la cual corto la prueba específica del microRNA-301 y microRNA-7 unido al cDNA. Este al ser degradado emite una señal de fluorescencia la cual es capturada por el equipo y nos resultó en un gráfico de la siguiente forma:



RESULTADOS

Posterior al análisis de expresión genica de los microRNAs se encontro el siguiente patron de expresion

microRNA 301

De las 30 muestras estudiadas el microRNA 301 fue subexpreso en 20 de ellas, en las restantes 10 este microRNA fue superexpreso.

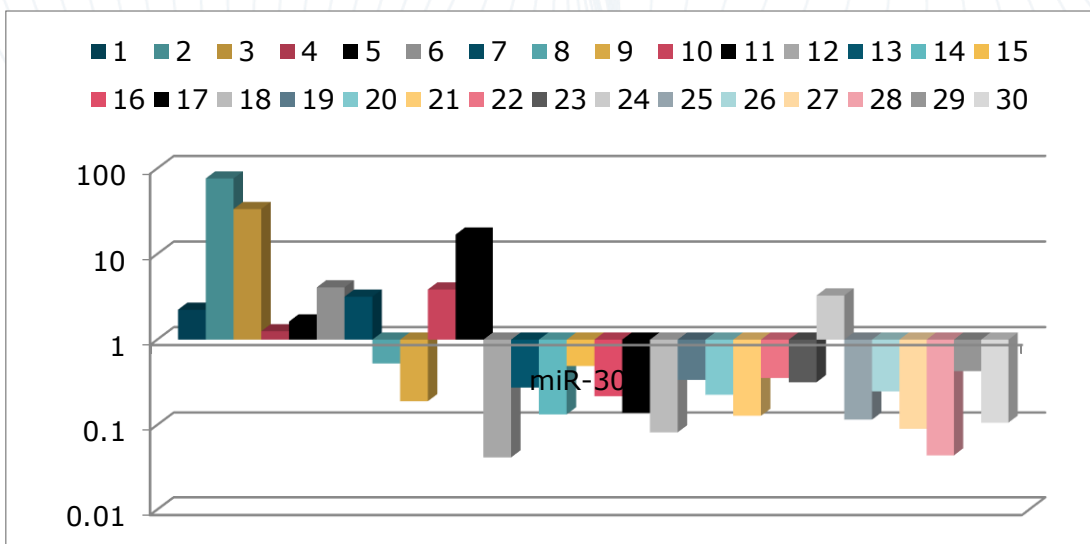


Figura 1. Expresión génica relativa del microRNA 301 (logarítmica) , en las muestras de pacientes con cáncer escamocelular.

microRNA 7

La expresión del microRNA 7 se ilustra en la figura 2, allí se observa que este microRNA estuvo sub expresado en la mayor parte de las muestras 26 en total y solo en cuatro tuvo una expresión mayor

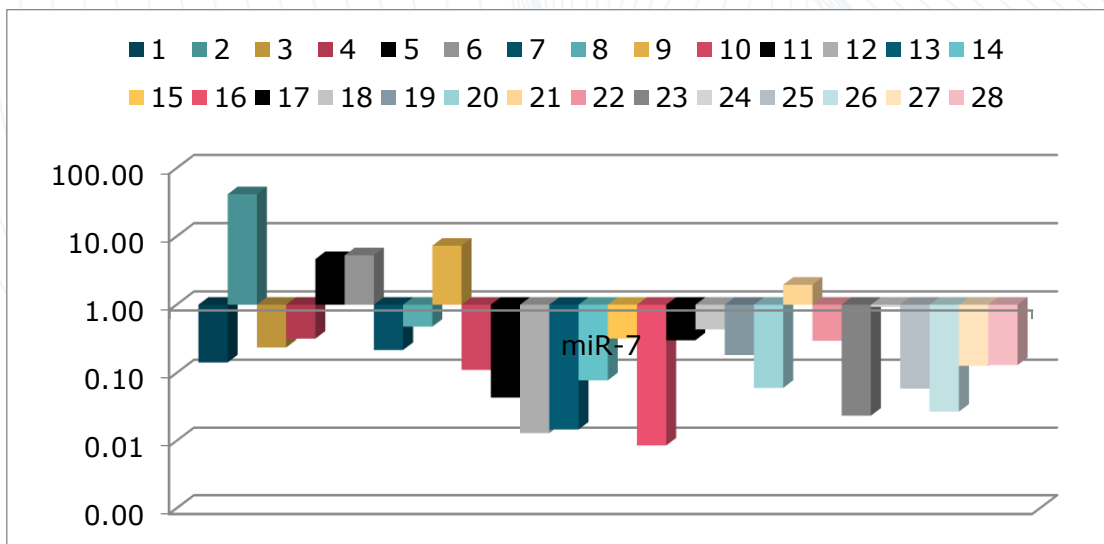


Figura 2. Expresión génica relativa del microRNA 7 (logarítmica) , en las muestras de pacientes con cáncer escamocelular.



Muestra	Grado Cancer	microRNA 301	microRNA 7
1	Moderadamente	↑	↓
2	Moderadamente	↑	↑
3	Moderadamente	↑	↓
4	Bien	↑	↓
5	Bien	↑	↑
6	Pobre	↑	↑
7	Bien	↑	↓
8	Pobre	↓	↓
9	Pobre	↓	↑
10	Bien	↑	↓
11	Bien	↑	↓
12	Moderadamente	↓	↓
13	Bien	↓	↓
14	Moderadamente	↓	↓
15	Bien	↓	↓
16	Moderadamente	↓	↓
17	Moderadamente	↓	↓
18	Moderadamente	↓	↓
19	Bien	↓	↓
20	Bien	↓	↓
21	Bien	↓	↑
22	Bien	↓	↓
23	Bien	↓	↓



24	Bien	↑	↓
25	Bien	↓	↓
26	Pobremente	↓	↓
27	Bien	↓	↓
28	Moderadamente	↓	↓
29	Moderadamente	↓	↓
30	Pobremente	↓	↓



Discusión

Estudios previos han demostrado que el microRNA-7 juega un papel importante en la aparición y desarrollo de tumores, siendo estrechamente relacionado con el crecimiento, metástasis y el pronóstico de varios tumores malignos. Cabe resaltar que estos miARN no solo están desregulados en todos los tipos de cánceres, sino que también se incluyen en la caracterización de tumores poco diferenciados lo que lleva a implicaciones clínicas relevantes.

El microARN-7 fue identificado por primera vez por Lagos-Quintana en 2001, Muchos estudios han informado de que miR-7 esta enriquecido en una variedad de tejidos normales y participa tanto en el desarrollo de múltiples órganos como en las funciones biológicas de las células. En los seres humanos esta codificado por tres loci-genómicos diferentes 9q21, 15q26, 19q13 respectivamente, en transcripciones primarias las cuales se procesan en moléculas precursoras de horquilla y luego en las mismas secuencias maduras que se incorporan en el complejo RISC y guiado a ARNm diana miR7 para reprimir su expresión.

En el cáncer de mama metastásico fue significativamente más bajo que en los tejidos de mama normales, en un estudio webster et al, informo



que miR-7 inhibe la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico y la vía de transmisión de la proteína quinasa B, regulando así el crecimiento y la metástasis de las células de cáncer de mama. Por otro lado, este miR-7 está relacionado con el cáncer de pulmón, ya que, si se aumentan los niveles, este puede reducir los niveles de proteínas asociadas al ciclo celular e inhibir la proliferación de células de la línea celular A549 del cáncer de pulmón.

En el cáncer de cerebro tenemos que el miR-7 al estar en el cerebro va a regular la diferenciación neuronal, también regula la tumorigenesis cerebral al dirigirse a proteínas oncogénicas lo que nos indica que el miR-7 puede ser una diana terapéutica potencial para suprimir la tumorigenesis, metástasis e invasión del cerebro.

Un gran número de estudios han demostrado que miR-7 puede usarse como un posible marcador de diagnóstico de cáncer. Un ejemplo muy claro lo vemos en el nivel de expresión de miR-7 es más bajo en los tejidos de cáncer de pulmón que en los tejidos pulmonares normales, y la regulación a la baja de expresión de miR-7 se asocia con la metástasis del cáncer de pulmón. Cuando las células epiteliales se queratinizan, las queratinas y las proteínas asociadas a los filamentos de queratina se sintetizan y ensamblan para formar filamentos de queratina. Durante estos procesos, moléculas de señalización como las



metaloproteinasas de matriz (MMPS) modulan el proceso de queratinización. En particular, MMP-9 se ha implicado en el proceso de queratinización. Se sabe que los MMPS desempeñan un papel crucial en la progresión del tumor al degradar las barreras de la matriz extracelular que abarcan el tumor y permiten la invasión de los tejidos conectivos circundantes. Al menos tres MMPS asociados con cáncer (MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP) están regulados por RECK. La proteína rica en cisteína que induce la reversión con motivos kazal (RECK) es una glicoproteína anclada a la membrana detectada en una variedad de tejidos humanos normales. La expresión reducida de RECK se ha observado en varios tipos de tejidos tumorales y con frecuencia se asocia con un mal pronóstico. Por lo tanto, los estudios de la relación entre RECK y queratinización pueden aportar importantes conocimientos sobre los mecanismos de carcinogénesis y el pronóstico de los pacientes con cáncer oral.

En el cáncer oral el miR-7 está inhibido se expresó en condiciones normales lo cual funciona regulando moléculas y controlando el cáncer. Cuando ya existe este diagnóstico el miR-7 se descontrola y estimula la proliferación celular. En 30 muestras tomadas encontramos que en 5 muestras ese microRNA está aumentado y en 25 muestras está



disminuido donde encontramos que en verde esta moderadamente es decir elevado y rosado esta pobremente es decir inhibido.



Conclusión

Las consecuencias del cáncer oral y orofaríngeo afectan dramáticamente la calidad de vida de hombres y mujeres. Además, el número de decesos por esta causa es considerable, evento que puede ser prevenido con el adecuado diagnóstico y tratamiento.

Como nuevas herramientas para diagnosticar y pronosticar la enfermedad se pueden usar los microRNAs, moléculas que están relacionadas en varios procesos incluyendo el cáncer

En este estudio se analizó el comportamiento del microRNA 301 y microRNA 7 en muestras de cáncer escamocelular de cavidad oral, encontrando principalmente la subexpresión de estas moléculas. Es decir, que la pérdida de ellas estaría relacionado con la progresión del tumor. Sin embargo, para tener resultados más concluyentes es necesario realizar experimentos in vitro.

Con este y otros estudios relacionando el comportamiento del cáncer escamocelular con la expresión de microRNAs se abren nuevas fronteras de investigación que finalmente buscan tratar de la enfermedad de manera precoz y de una forma eficaz contribuyendo al bienestar del paciente.



Bibliografía

1. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(24):15524-9.
2. Croce C. Introduction to the role of microRNAs in cancer diagnosis, prognosis, and treatment. Cancer J. 2012;18(3):213-4.
3. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol. 2010;17(6):1471-4.

