



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Campo del Conocimiento de las Ciencias Médicas

“MicroARNs en cáncer cervico-uterino en etapas tempranas y su valor predictivo en metástasis ganglionares y recurrencias”

Tesis
Que para optar por el grado de
Maestría

Presenta:
Salim Abraham Barquet Muñoz

Tutor
Dr. David Cantú de León
Instituto Nacional de Cancerología

CD.MX. Febrero 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Firmas

Tutor de tesis

Dr. David Cantú de León

Alumno

Dr. Salim Abraham Barquet Muñoz

**Responsable de la Entidad Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la
Nutrición**

Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas

Dedicatoria

A mi esposa Sofía Peregrina Ramírez por su amor, tolerancia, paciencia y apoyo incondicional.

A mis hijos Abraham y Elena por ser mi motivación.

A mis padres y mi hermano por su ejemplo y por darme las herramientas para llegar a ser un excelente médico, maestro y persona.

A mi tutor y amigo David Cantú de León por sus enseñanzas, apoyo y confianza.

INDICE

I.	Lista de abreviaturas	5
II.	Resumen	6
III.	Introducción	7
IV.	Marco teórico	9
V.	Planteamiento del problema	22
VI.	Justificación del proyecto	23
VII.	Pregunta de investigación	24
VIII.	Hipótesis del proyecto	25
IX.	Objetivos del proyecto	26
X.	Material y métodos	27
XI.	Consideraciones éticas	34
XII.	Resultados	35
XIII.	Discusión	46
XIV.	Conclusiones	50
XV.	Referencias	51

I. LISTA DE ABREVIATURAS

CaCU: cáncer cervicouterino

DNA: ácido desoxirribonucleico

EC: etapa clínica

HR: hazard ratio

IC: intervalo de confianza

FC: fold change

LPB: linfadenectomía pélvica bilateral

miRNA: microARN

MLA: marcos de lectura

mRNA: ARN mensajero

OR: odds ratio

PLE: periodo libre de enfermedad

PLV: permeación linfovascular

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa reversa

RB: gen retinoblastoma

RNA: ácido ribonucleico

SG: supervivencia global

VPH: virus de papiloma humano

II. RESUMEN

Antecedentes: El cáncer cervicouterino (CaCU) es la segunda causa de mortalidad e incidencia de cáncer en la mujer en México. La persistencia del VPH y ciertos co-factores propician el desarrollo de esta neoplasia. A pesar de esto, múltiples estudios han sugerido que los miRNAs pudieran estar relacionados en la patogénesis del mismo.

Objetivo: Identificar el perfil de expresión de miARNs en un grupo de pacientes con CaCU en estadios tempranos tratados quirúrgicamente con afección ganglionar microscópica y otro a recurrencia.

Metodología: Se recolectaron los expedientes con diagnóstico de CaCU confirmado histológicamente con etapas IB1-IIA operadas de histerectomía radical con linfadenectomía. Se realizó un grupo con afección ganglionar, y otro sin afección ganglionar. En el laboratorio se extrajo y purificó el ARN a partir de los tumores cervicales. Se realizó la verificación de la fracción de miRNAs. Se escogieron bloques de parafina que cumplieran con adecuada cantidad y calidad de miRNA. Se identificó el perfil de expresión global de los miRNAs por medio de microarreglo. Se realizó un análisis de agrupamiento realizando análisis de semejanzas y diferencias con una prueba de t-student, seleccionando los miRNAs con valor $p \leq 0.01$. Se realizó un análisis bivariado estableciendo odd ratios asociado a afección ganglionar. La significancia estadística se definió con valor $p < 0.05$.

Resultados: Se escogieron 12 pacientes con afección ganglionar y 13 sin afección ganglionar. Se encontró una asociación en la afección ganglionar con la sobreexpresión de los miRNAs miR-92b-star (OR 6.74, $p=0.033$), miR-483-5p (OR10, $p=0.014$), miR-4534 (OR 16.67, $p=0.006$) y miR-548ac (OR 27.5, $p=0.002$). Los miRNAs subexpresados asociados a afección ganglionar fueron miR-487b (OR 60.5, $p=0.002$), miR-29b-2-star (OR 7.7, $p=0.035$) y miR-195 (OR 24.74, $p=0.008$). Adicionalmente se realizó un perfil de expresión asociado a recurrencia.

Conclusión: En nuestra población, se encontró un perfil de miRNAs asociado a afección ganglionar y otro a recurrencia en pacientes con CaCu en etapas tempranas. Este es un estudio exploratorio, se necesitan estudios prospectivos para validar dichos perfiles de expresión y su valor real como predictores tanto de enfermedad ganglionar como recurrencia de la enfermedad.

III. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es una de las neoplasias malignas más comunes en la mujer, siendo en México el segundo lugar en incidencia y mortalidad después del cáncer de mama.¹ El factor etiológico para el desarrollo de esta neoplasia es la persistencia del virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo. Sin embargo, la persistencia del VPH y ciertos co-factores parecen no ser suficientes para el desarrollo de lesiones malignas.²

El CaCU para fines de tratamiento se puede dividir en etapas tempranas, localmente avanzadas y metastásica. En etapas tempranas, el tratamiento principal es la histerectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral (LPB).³ Adicionalmente es importante tomar en cuenta los factores de riesgo patológicos de recurrencia para la administración de adyuvancia que puede incluir radioterapia exclusivamente, o bien radioterapia con quimioterapia concomitante, siendo esta última modalidad el mismo tratamiento para las etapas localmente avanzadas, sin tener el beneficio de la cirugía.⁴ En varios estudios se ha visto una disminución en el periodo libre de enfermedad (PLE) y en la supervivencia global (SG) en pacientes con afección ganglionar, siendo este el factor pronóstico más importante.^{5,6,7,8}

Los microARNs (miRNAs por sus siglas en inglés) son cadenas sencillas de ARN constituidas de 21-23 nucleótidos.^{9,10} Estos pueden inhibir la expresión de genes a través de represión transcripcional o degradación del ARN mensajero (mRNA).¹⁰ Entre sus funciones está la de regular la expresión génica en una gran gama de procesos fisiológicos y patológicos.¹¹ En el cáncer, los miRNAs pueden funcionar como oncogenes o como genes supresores de tumores.^{12,13,14} Múltiples estudios han sugerido que los miRNAs pudieran estar involucrados en la patogénesis del CaCU.^{15,16,17} Así mismo, se han descrito miRNAs que influyen en la presencia de factores pronósticos para el PLE y la SG del CaCU, incluyendo la afección ganglionar.^{11,18,19,20}

El objetivo de este estudio fue identificar un perfil de expresión de miRNAs en un grupo de pacientes con CaCU en estadios tempranos tratados quirúrgicamente con afección ganglionar oculta. Adicionalmente se evaluó un perfil de expresión de miRNAs asociados a recurrencia en pacientes con CaCU en estadios tempranos tratados quirúrgicamente.

IV. MARCO TEÓRICO

Antecedentes del cáncer de cérvix.

El CaCU es una de las neoplasias malignas que afecta el tracto genital femenino más comúnmente. Se estima que a nivel mundial, su incidencia es de 527,624 casos por año, con una mortalidad de 265,653 de casos al año, con una prevalencia a 5 años de 1,547,161 casos.¹ Ocupa el cuarto lugar en mortalidad después del cáncer de mama, el cáncer colon rectal y el cáncer de pulmón. Este cáncer ocupa el 12% en incidencia entre todas las neoplasias malignas, y el 7.5% de mortalidad específica por cáncer específica. Así mismo, el 87% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo.²¹ En México, tiene una incidencia de 13,960 casos por año, ocupando el 23.3% entre todas las neoplasias malignas; y una mortalidad de 4,769 casos por año, siendo el 11.9%; ocupando el segundo en incidencia y mortalidad después del cáncer de mama.¹

Ciertamente, el agente etiológico conocido para el desarrollo del CaCU es la infección y persistencia del VPH.² Sin embargo, se han identificado otros co-factores que incrementan el riesgo para adquirir la infección o potencializan la progresión a la transformación de malignidad. Los co-factores etiológicos involucrados en la adquisición del VPH y la malignización son el inicio temprano de la vida sexual, el tener compañeros sexuales de riesgo, múltiples parejas sexuales, la multiparidad, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales, y la infección por el virus de inmunodeficiencia humana.²² Estos factores incrementan el riesgo de progresión a una lesión intraepitelial de alto grado.²³ Sin embargo, hay estudios que muestran datos contradictorios si realmente estos factores de riesgo incrementan la persistencia del virus.²⁴ El factor mejor conocido es la inmunodeficiencia, sobre todo en mujeres infectadas por virus de inmunodeficiencia adquirida, ya que este llega a incrementar el riesgo de persistencia por VPH en todas las edades.²⁵ Así mismo se ha visto que el fumar y el uso de anticonceptivos orales de forma prolongada promueve el desarrollo de metaplasia escamosa, promoviendo la persistencia de la infección viral, siendo este el factor de riesgo mas importante para la progresión de las lesiones

intraepiteliales.²⁶ La co-infección con otros patógenos de transmisión sexual ha sido muy controvertido como factor de riesgo.²⁷

La persistencia de VPH y sus co-factores son necesarios para el desarrollo de lesiones malignas, a pesar de esto, se cree que hay algunas variaciones genómicas en el huésped relacionadas con el desarrollo de esta neoplasia.²

Posterior a la infección por VPH, la neoplasia evoluciona de una lesión preinvasora como es una lesión intraepitelial cervical, hasta convertirse en cáncer *in situ* y posteriormente invasor cuando las células malignas atraviesan la membrana basal en un plazo de tiempo que va de 1 a 20 años.²⁸ El tumor se mantiene confinado a la pelvis durante mucho tiempo, con un patrón de diseminación generalmente ordenado y de forma predecible. Por extensión directa se disemina fuera del cuello uterino a través de los ligamentos de fijación como los parametrios o los ligamentos úterosacos, el conducto endocervical, el endometrio, o de forma distal hacia la vagina. En etapas más avanzadas infiltra la vejiga y el recto. La diseminación ganglionar también es un evento ordenado en la mayoría de las veces, invadiendo los ganglios paracervicales, parametriales, paraureterales, obturatrices hipogástricos, iliacos externos e iliacos comunes. Posteriormente la diseminación suele continuar hacia los ganglios inguinales, presacos y paraaórticos. Finalmente, se afectan los ganglios mediastinales y supraclaviculares.²⁹ La diseminación hematogena es propia de las etapas avanzadas afectando pulmón, hígado y hueso.²⁹

En el 2009, la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) estableció que el CaCU debe ser estadificado clínicamente, debido a que es más fácil el diagnóstico para los sectores de bajos recursos.⁴ La estadificación se basa en la revisión de la biopsia cervical o cono biopsia, así como la revisión clínica de las pacientes afectadas (Tabla 1).

Tabla 1. Estadificación cervical FIGO 2009	
EC I	Confinado al cérvix
Ia	Identificada microscópicamente.Limitada a invasión menor a 5mm de profundidad y 7 de extensión.
Ia1	Invasión no mayor a 3mm y extensión no mayor a 7 mm.
Ia2	Invasión mayor a 3mm pero no mayor a 5mm y extensión no mayor a 7 mm
Ib	Lesión clínica confinada al cérvix
Ib1	Lesión no mayor a 4cm
Ib2	Lesión mayor a 4cm
EC II	Afección a tercio superior de vagina o parametrios sin llegar a pared pélvica
IIa 1	Afección del tercio superior de vagina. < 4 cm,
IIa 2	Afección del tercio superior de vagina. > 4 cm.
IIb	Afección de los parametrios sin llegar a pared pélvica
EC III	Involucro del tercio inferior de vagina, parametrios hasta pared pélvica , hidronefrosis o Insuficiencia renal
IIIa	Involucro del tercio inferior de vagina
IIIb	Parametrios hasta pared pélvica , hidronefrosis o insuficiencia renal
EC IV	Extensión fuera del tracto reproductor
IVa	Involucro de mucosa rectal o vaginal
IVb	Metástasis a distancia

Biología molecular en cáncer de cérvix.

La primera vez que se estudio una causalidad entre el VPH y el desarrollo de CaCU fue en 1970 cuando el Dr. Harald zur Hausen, sugirió que las mismas partículas virales

encontradas en las verrugas genitales eran responsables de la neoplasia maligna.³⁰ Una década después se encontró que el HPV tipo 16 y posteriormente el tipo 18 eran los responsables de cerca del 70% de los casos a nivel mundial.^{31,32} Por su trabajo en la causalidad del VPH, el Dr. zur Hausen recibió el Premio Nobel en medicina en el 2008.

El VPH pertenece a la familia de los Papillomaviridae, los cuales se caracterizan por tener alta afinidad a las mucosas y epitelios, causando una proliferación epitelial en el sitio de infección. Existen al menos 120 genotipos diferentes, de los cuales al menos 40 infectan los genitales.³³ Estos los podemos dividir en virus de bajo o alto riesgo para el desarrollo de neoplasias malignas (Tabla 2). Los primeros se relacionan con verrugas genitales y lesiones intraepiteliales de bajo grado mientras que los segundos con lesiones intraepiteliales de alto grado y el CaCU.

Tabla 2. Clasificación del VPH según su potencial para causar CaCU³⁴
Virus de bajo riesgo
6, 11, 40, 42, 54, 57
Virus de alto riesgo
16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68

El genoma del virus tiene forma circular de doble cadena dividido en marcos de lectura abiertos (MLA) tempranos (E1-E7) y tardíos (L1-L2) que codifican cerca de 8,000 pares de base. El VPH tiene una cubierta de proteínas que protege el ácido desoxirribonucléico (DNA por sus siglas en inglés) viral, compuesta por 72 capsómeros hechos de proteínas codificadas de los MLAs L1 y L2 que sirven de protección e interacción con las proteínas del huésped. Los MLAs tempranos codifican proteínas para la replicación, regulación y proliferación celular.³⁵ En las lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado y en el carcinoma, las secuencias que codifican E1 y E2 se rompen en el momento de ser integrado el DNA viral en el genoma de las células epiteliales. Dado que E2 funciona como represor de las oncoproteínas virales E6 y E7, su rompimiento resulta en la sobreexpresión de estas proteínas. La sobreexpresión de E6 promueve la degradación de la proteína reguladora p53

por medio de la vía mediada por ubiquitina, resultando en una progresión del ciclo celular, previniendo la apoptosis y promoviendo la replicación las células transformadas. Así mismo, la oncoproteína E7 se une y promueve la degradación del gen de retinoblastoma (RB) resultando en una disrupción de la vía regulatoria del ciclo celular de la ciclina Rb-D/p16^{INK4a}.²² Estos dos sucesos promueven la inmortalización y el potencial oncológico de la célula.

Tratamiento del cáncer de cérvix en etapas tempranas.

El CaCU para fines de tratamiento se puede dividir en etapas tempranas, que incluye las etapas IA hasta IB1 y IIA1, etapas localmente avanzadas que son IB2 hasta IVA sin incluir IIA1, y la etapa metastásica o IVB. En etapas tempranas el tratamiento es principalmente quirúrgico. Así mismo, las etapas tempranas las podemos dividir en etapas microinvasoras (IA1 y IA2) y no microinvasoras (IB1 y IIA1).³⁶ El tratamiento del CaCU microinvasor consiste en la realización de una histerectomía extrafacial, con o sin la realización de linfadenectomía pélvica bilateral (LPB) dependiendo del estatus de la permeación linfovascular (PLV).³ En estas etapas se ha visto que la afección parametrial es menor al 1%, así como el porcentaje de presencia de permeación vascular y de afección ganglionar es de 8.3% y 3% respectivamente, con una tasa de recurrencia de 1.6% a 5 años.³⁷

En CaCU con etapas IB1 y IIA1, el tratamiento quirúrgico consiste en realización de histerectomía radical con LPB.³ En un estudio aleatorizado realizado por Fabio Landoni et al. se demostró que la supervivencia global (SG) y el periodo libre de enfermedad eran similares en pacientes tratadas con histerectomía radical modificada vs radioterapia definitiva.³⁸ En otro estudio se analizaron 1039 pacientes en etapas IB1-IIa, las pacientes que fueron sometidas a cirugía tuvieron una SG a 5 años de 84% contra las que fueron sometidas a radioterapia con una SG a 5 años de 69% (p=0.001).³⁹ Por último, en un estudio en que se tomaron los resultados de 4,885 pacientes del Registro Epidemiológico de Estados Unidos y que tenían etapas IB1-IIA, se encontró que las pacientes a las que se les realizó histerectomía radical tenía una disminución en la mortalidad de un 59% en comparación con las que se les daba radioterapia definitiva (p=0.0001).⁴⁰ Actualmente, en

estas pacientes se considera un estándar de tratamiento la histerectomía radical con linfadenectomía bilateral.

Factores de riesgo para recurrencia

En estas pacientes con etapas tempranas operables, es importante tomar en cuenta los factores de riesgo de recurrencia patológicos para la administración de adyuvancia. Se consideran como pacientes con riesgo intermedio aquellas que tengan como hallazgos patológicos la presencia de tumores mayores de 4 cm, con PLV y que invadan más de 1/3 del estroma; a estas pacientes se les debe administrar radioterapia adyuvante.⁴ Se considera a las pacientes de alto riesgo de recurrencia, cuando tienen como hallazgos patológicos ganglios linfáticos con metástasis, márgenes positivos y afección parametrial; estas pacientes se beneficiarán de la radioterapia y quimioterapia concomitante, como tratamiento adyuvante.⁴ En el estudio GOG-92 se analizaron los factores de riesgo intermedio y de qué forma la radioterapia adyuvante otorgaba un beneficio. Se analizaron 277 pacientes llevadas a histerectomía radical con PLV, invasión profunda al estroma y tumores voluminosos y se compararon 137 pacientes a las cuales no se les administró radioterapia contra 140 pacientes que si se les dio radioterapia, encontrando una reducción del 44% de recurrencia, con un PLE de 88% en pacientes radiadas contra un 79% en las que no fueron radiadas ($p=0.008$).⁴¹ En pacientes con riesgo alto de recurrencia, Peters et al. evaluó la necesidad de radioterapia concomitante con quimioterapia en 268 pacientes en etapas IA2, IB y IIA que fueron sometidas a histerectomía radical con LPB y que tuvieran ganglios linfáticos positivos, parametrios afectados y márgenes positivos, encontrando que las pacientes se les dio la radioterapia concomitante con quimioterapia tenían una mayor SG (HR 1.96; $p=0.007$) y un mayor PLE (HR 2.01; $p=0.003$) en comparación con las pacientes que solo recibieron radioterapia adyuvante.⁴²

La American Joint Committe on Cancer describe que el factor de riesgo para recurrencia más importante en CaCU es la afección ganglionar, describiendo que en etapas IB la probabilidad de afección ganglionar pélvica es de 20% aproximadamente.^{43,44} En varios estudios se ha visto una disminución en el PLE y en la SG en pacientes con afección ganglionar o que presentan recurrencia. En el estudio de Delgado et al. se encontró que las

pacientes en etapas tempranas y operadas de histerectomía radical con LPB y que tenían afección ganglionar tenían una mayor tasa de recurrencias en comparación con las que no (74.4% contra 85.6%, $p=0.04$).⁵ Así mismo, en el estudio de Suprasert se encontró que la afección ganglionar es un factor pronóstico para la recurrencia en pacientes con CaCU en etapas tempranas (Hazard Ratio (HR) 3.1; intervalo de confianza (IC) 95% 1.55-6.24; $p=0.001$).⁶ Shinichi Togami et al. encontraron que en pacientes con etapas IA2 a IIB con afección ganglionar tenían menor SG (61% contra 94%, $p=0.0001$) y menor PLE (46% contra 92%, $p=0.0001$) en comparación con las que no tenían afección ganglionar. Así mismo, en el análisis multivariable, encontró una relación entre la afección ganglionar y la afección parametrial (Odds ratio(OR), 3.37; IC 95% 1.31-9.0; $p=0.01$) y un tamaño tumoral mayor de 2 cm (OR, 4.93; IC 95% 1.31-9.0; $p=0.005$).⁷ Por último, Ditto y colaboradores encontraron que la presencia de ganglios pélvicos o para-aórticos positivos eran factores pronósticos para la SG (HR 3.01, IC 95% 1.78-5.08, $p<0.001$) y el PLE (HR 2.83, IC 95% 1.70-4.70, $p<0.001$). Incluso, se ha visto una relación entre la cantidad de ganglios pélvicos afectados y una disminución en la SG, disminuyendo hasta un 62% si hay un ganglio afectado, 36% si hay dos ganglios afectados y un 20% si hay tres.⁸ En pacientes con etapas IB2 a IVA, la recomendación de tratamiento es la administración de radioterapia concomitante con quimioterapia y braquiterapia, sin haber un beneficio en el tratamiento quirúrgico.³

Generalidades de los MicroRNA.

En 1993, Ambros y colegas descubrieron que *lin-4*, un gen que se conoce que controla el tiempo de desarrollo de la larva *C. elegans*, no codificaba para alguna proteína pero que en su lugar producía un par de pequeños ácidos ribonucleicos (RNA), y que éstos tenían un complemento en múltiples sitios de 3' UTR del gen *lin-4*, controlando su tasa de expresión.⁹ Actualmente se sabe que este RNA *lin-4* pertenece a la familia de una clase abundante de pequeños RNAs reguladores llamados microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son cadenas solitaria de RNA constituidas de 21-23 nucleótidos.^{9,10} Se consideran como pequeños RNAs no codificantes que pueden inhibir la expresión de genes a través de represión transcripcional o degradación del mRNA. Estos están presentes en animales,

plantas y células eucariotas.¹⁰ La génesis de los miRNA inicia con su transcripción por la ARN polimerasa II al miRNA primario (pri-miRNA). Esta transcripción primaria es dividida en pre-miRNAs por la RNasa III Drosha, y posteriormente el pre-miRNA es trasladado al citoplasma y transformada en un miRNA maduro por la Dicer, otra RNasa III. El miRNA se une a las secuencias complementarias en la región no traducida (3'-UTR) de un mRNA blanco, reprimiendo la traducción de los genes blanco y resultando en el bloqueo de los efectos de los factores de iniciación de las células.⁴⁵ El mecanismo de regulación depende del nivel de complementaridad entre el miRNA y el blanco del mRNA. El silenciamiento genético se puede obtener ya sea por degradación o por inhibición del mRNA.⁴⁶ Este silenciamiento ocurre cuando el complejo de silenciamiento inducido de RNA (RISC por su siglas en inglés) que contiene el miRNA se une al 3'-UTR en el mRNA e induce la formación del complejo CCR4-CAF1-NOT, una enzima truncadora de cola tipo poly A, resultando en el corte de la cola, reduciendo la unión de factores de iniciación de traducción y reprimiéndola.⁴⁷ La mayoría de los genes de los miRNAs provienen de regiones del genoma distantes de los genes blanco, infiriendo que derivan de una unidad de transcripción independiente; así mismo, los miRNA no son transcritos desde sus propios promotores, sino de los intrones en su mayoría.⁹

Función de los miRNAs

Se han identificado miles de miRNAs en nemátodos, insectos, pájaros, anfibios, peces, plantas y mamíferos.⁴⁸ Su función se ha visto como reguladores importantes en la expresión de una gran gama de procesos fisiológicos y patológicos. En la actualidad se sabe que el papel específico de los miRNAs incluye la regulación de la proliferación celular y su metabolismo, la regulación del tiempo de desarrollo, la muerte celular, hematopoyesis, desarrollo neuronal, tumorigénesis, metilación del DNA y modificaciones en la cromatina.¹¹ Se ha visto que un miRNA individual puede ser capaz de regular docenas de distintos mRNAs, mientras que múltiples miRNAs pueden corregular un gen individual.⁴⁹

Métodos de obtención de expresión de miRNAs.

Se han utilizado múltiples métodos para la obtención y cuantificación de los miRNAs, cada uno con sus ventajas y desventajas (Tabla 3). El método ideal es aquel que es fácil de utilizar, que es reproducible y que no requiere equipamiento costoso, y sobre todo que sea específico para la obtención de únicamente el miRNA de interés, sin que haya interferencia en la detección con otros miRNA similares. El método debe ser lo suficientemente sensible para proveer el análisis de la expresión cuantitativa, a pesar de que se tenga una pequeña cantidad de muestras y que debe ser capaz de procesar múltiples muestras en paralelo.⁵⁰

	Ventajas	Limitaciones
qRT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de producción elevada • Buena cuantificación • Amplificación permite mayor sensibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para distinguir diferencias en un solo nucleótido • No para descubrimiento de ncRNA.
Microarreglos	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de producción muy elevada • Buena relación entre costo y generación de información • Fácil para realización de análisis de datos • Los resultados han sido validados con qRT-PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede fallar la especificidad • Sensibilidad media • La sensibilidad y la especificidad puede ser mejorada con modificación de los ácidos nucleicos cerrados en las sondas • Cuantificación limitada • No útil para el descubrimientos de ncRNA
Hibridación in situ	<ul style="list-style-type: none"> • Localiza los miRNA en tejido y compartimientos celulares • Se utiliza la misma laminilla para la obtención del miRNA y del blanco de identificación 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja capacidad de producción • Sensibilidad limitada • Cuantificación muy limitada
Recuento de RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de producción elevada • Alta sensibilidad • Alta especificidad • Se puede usar para descubrir nuevos ncRNA 	<ul style="list-style-type: none"> • Una alta cantidad de datos complejos que necesitan ser analizados • Alto costo

miRNA: microRNA; qRT-PCR: reacción en cadena de polimerasa-trascriptasa reversa cuantitativa; ncRNA: RNA no codificable.

El estándar de oro para la detección de miRNAs utilizado en laboratorios clínicos es la reacción en cadena con polimerasa-trascriptasa reversa cuantitativa (qRT-PCR).⁵¹ Otro método utilizado son los microarreglos, los cuales se pueden utilizar para el descubrimiento

de nuevos biomarcadores, sin embargo, es más costoso.⁵² La hibridación *in situ* puede ser utilizado para la detección de un miRNA de interés entre diferentes tipos de células que componen dicho tumor, y provee información adicional, tal como la localización subcelular del miRNA.⁵³ Por último, la secuenciación de RNA es un nuevo método para el descubrimiento de nuevos miRNA y su cuantificación, sin embargo, implica un alto costo y su uso no es el ideal para propósitos diagnósticos.⁵⁴

MiRNA y cáncer.

La regulación de los genes que codifican a los miRNAs es de gran importancia porque se puede conocer sobre el desarrollo de cualquier tipo de procesos fisiopatológicos como es el caso de la supervivencia de las células B, el patrón cerebral, la secreción de insulina por las células pancreáticas, el desarrollo de adipocitos, el control de la proliferación celular y la supervivencia de la célula.⁴⁶ En el humano se han identificado muchas enfermedades en donde hay alteraciones con los miRNAs, tales como enfermedades autoinmunes, enfermedades cardíacas, esquizofrenia y el cáncer. Se ha visto que los miRNAs son expresados diferencialmente entre los distintos tipos de tumores y tejidos normales, incluidos los tumores benignos y malignos, tal como es el caso de las leucemias, los linfomas, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer colorectal, carcinoma papilar de tiroides, glioblastomas y otros tumores cerebrales, el carcinoma hepatocelular, tumores pancreáticos, cáncer de próstata, riñón y vejiga, cáncer de ovario y el cáncer de cérvix.⁵⁵

Los miRNAs pueden funcionar como oncogenes y/o como genes supresores de tumores. Como oncogenes se ha visto que el miR-21 y el miR-155 están frecuentemente sobreexpresados en tumores malignos humanos.¹² Así mismo, los miRNAs también pueden actuar como supresores de tumor, como es el caso del grupo de los miR-15a/16-1, que frecuentemente se detecta en leucemias linfocíticas crónicas y en cáncer de próstata.^{13,14} En otras ocasiones, el mismo miRNA puede tener actividad dual, actuando como oncogén en un tipo específico de células y como supresor de tumor en otras.⁵⁶ Sin embargo, las bases genéticas para la expresión anormal de los miRNAs en las células neoplásicas es complejo. Se ha visto una gran variedad de interrupciones relacionadas con la expresión de miRNA en

células malignas y se cree que hay una gran variedad de anormalidades que pueden influir en la regulación de los miRNAs en cada tumor; estas expresiones ocasionan niveles anormales de miRNAs maduros o de sus precursores en comparación con el tejido sano o incluso dependiendo de las distintas etapas o grados de invasión.⁵⁷ También, se ha visto que más el 50% de los genes de los miRNAs están localizados en los dominios de los cromosomas que genéticamente están alterados en el cáncer del ser humano.⁵⁸

MiRNAs en cáncer de cérvix.

Como se mencionó anteriormente, la persistencia del VPH es el paso inicial para el desarrollo de CaCU, pero otros factores se necesitan para el desarrollo y progresión de los fenotipos malignos. El desarrollo y la progresión de esta neoplasia requieren de una compleja interacción entre el virus, el huésped y factores ambientales; centrándose en el análisis molecular de genes supresores y oncogenes para la génesis del mismo. Múltiples estudios han sugerido que los miRNAs pudieran estar relacionados en la patogénesis. Entre ellos, el miR-21 se ha visto sobreexpresado, actuando como regulador negativo en la expresión del gen supresor de tumor PDCD4, que se ha visto involucrado en la apoptosis y en el bloqueo de la inhibición del crecimiento tumoral favoreciendo el crecimiento celular;¹⁵ así mismo, se ha visto relacionado como regulador del gen CCL20, relacionado con la diferenciación tumoral y la metástasis a ganglios linfáticos.⁵⁹ El mi-10a promueve el crecimiento celular, las metástasis y la invasión suprimiendo la expresión de CHL1,¹⁶ mientras que el mi-19a y el miR-19b están sobreexpresados, promoviendo el crecimiento celular y la invasión.¹⁷ Así mismo, se han examinado los miRNAs supresores de tumores. Por ejemplo, se ha visto que las líneas celulares HeLa y C33-A de CaCU, sobreexpresan miR-7 inhibiendo el crecimiento celular y promoviendo la apoptosis, mientras que la supresión del miR-7 produce los efectos contrarios.⁶⁰

En una revisión de la literatura realizado por Garima Sharma y Subhash Agarwal se analizaron 22 estudios en donde se describieron los posibles blancos y los miARNs relacionados con el CaCU, encontrando 8 genes blanco regulados por al menos 41 miARNs, entre los primeros, se encontró que los genes blanco *BIRC5*, *HOXA1* y *RARB*

fueron considerados como críticos en la modulación de la progresión, y que estos estaban regulados por al menos 7 miRNAs (miR-106a, miR-10a, miR-10b, miR-203, miR-20a, miR-30b, miR-34a) en al menos 2 genes, y que estaban asociados con el desarrollo tumoral, la progresión y las metástasis.⁶¹ Por último, algunos otros miRNAs sobreexpresados son miR-9, miR-127, miR-199, miR-522*, miR-148a, miR-196a, miR-132 y el miR-886-5p; mientras que algunos otros que están hipoactivos son miR-218, miR-372, miR-26a, miR-143, miR-145, miR-99a, miR-513, miR-29a y el miR-100, cada uno influyendo en conjunto o separado en distintos procesos en la génesis del CaCU, ya sea en el proceso celular de progresión, apoptosis, proliferación, movimiento celular, daño en el ciclo celular, en la transformación maligna y metástasis.¹⁰

Los MiRNAs como factor pronóstico en cáncer de cérvix

Como se describió previamente, existen factores pronóstico clínico-patológicos ya identificados en el CaCU en etapas tempranas que influyen en la SG y en el PLE. Sin embargo, los miRNAs también se han identificado como factores pronóstico en la supervivencia y la recurrencia. Zhao et al. analizaron la expresión del miR-20a y del miR203 recolectados en suero antes de la cirugía y del tratamiento definitivo en 80 pacientes con etapas I a IIa. Los niveles de miR-20a fueron más altos en comparación con las pacientes voluntarias sanas; además, éste estaba sobreexpresado en pacientes con metástasis en ganglios linfáticos. La expresión de los niveles de miR-203 en pacientes con CaCU mostraron una tendencia de ser superiores en comparación con las pacientes sanas; sin embargo, las metástasis a ganglios linfáticos fueron más frecuentes cuando la expresión de miR-203 estaba suprimida. Basado en los grupos de pacientes con o sin afección ganglionar, el miR-20a en suero tenían un área por debajo de la curva (AUC) de 0.734, con una sensibilidad de 75% y una especificidad de 72.5% con un valor de corte de 3.0 como marcador para metástasis. Usando los mismo grupos, el miR-203 tuvo una AUC de 0.658 y fue menos efectivo que el miR-20a, con una sensibilidad de 65% y una especificidad del 62.5% con un valor de corte de 0.13. Los autores concluyeron que la sobreexpresión de miR-20a está relacionada con metástasis a ganglios linfáticos, incremento en el tamaño tumoral, etapas más avanzadas y grados histológicos avanzados.¹⁸

Chen et al. hicieron un estudio usando como marcador miRNAs en pacientes con CaCU en etapas tempranas con afección ganglionar. Analizaron 40 pacientes con CaCU y afección ganglionar, 40 pacientes sin afección ganglionar y 20 voluntarias sanas. La expresión de los niveles de miRNAs fue medida por PCR cuantitativa y se determinó una curva ROC. Los candidatos como marcadores para afección ganglionar fueron miR-1246, miR-20a, miR-2392, miR-3147, miR-3162-5p y miR-4484. Estos tuvieron una sensibilidad de 85.6% y una especificidad del 85.0% para la predicción de metástasis a ganglios linfáticos cuando se hizo en suero. Cuando se analizaron tejidos de pacientes con CaCU, la sensibilidad fue de 96.7% y la especificidad de 95.0%.¹⁹

Lee et al. encontraron una correlación entre la expresión de miR-127 y la afección ganglionar en pacientes con CaCU tipo escamoso ($p=0.0061$).¹¹ En el estudio de Shen et al. se identificó la expresión del miR-224 en tejido cervical de 126 pacientes con CaCU, encontrando que éste estaba sobreexpresado en comparación con el tejido sano ($p<0.001$); siendo significativamente mayor ($p=0.002$) en pacientes con etapas avanzadas en comparación con las etapas tempranas. Además, el miR-224 también estuvo sobreexpresado en una mayor cantidad en pacientes con afección ganglionar en comparación con las que no tenían afección ($p=0.008$) y PLV ($p=0.01$). Así mismo, las SG tuvo una tendencia a ser menor en las pacientes que sobreexpresaron el miR-224 en comparación con las que no ($p<0.001$).²⁰ Por último, Hu et al. identificaron que los miR-200a y miR-9 sobreexpresados en pacientes con CaCU eran las que tenía mayor radiosensibilidad al momento de dar el tratamiento, correlacionando significativamente estos miRNAs con la SG ($p=0.03$ y 0.02 respectivamente).⁶² Así mismo, Pedroza-Torres et al. describieron 7 miRNAs asociados a una baja respuesta a la radioterapia en pacientes con CaCU localmente avanzados.¹⁰

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de incidencia y mortalidad por cáncer en la mujer mexicana. La mayoría de las pacientes en etapas tempranas son tratadas de forma quirúrgica con histerectomía radical y linfadenectomía pélvica bilateral. La necesidad de tratamiento adyuvante con radioterapia o radioterapia y quimioterapia concomitante se basa en los hallazgos histopatológicos. La afección ganglionar es el factor pronóstico más importante asociado a recurrencias, y en etapas tempranas los estudios de imagen no son lo suficientemente eficaces para su adecuada identificación.

Así mismo, se conoce el factor etiológico para el desarrollo del cáncer cervicouterino, sin embargo, éste no es suficiente para explicar la evolución y el riesgo de recurrencia de esta neoplasia, por lo que es necesario la presencia de otros factores. Muchos de estos factores aún no han sido completamente entendidos, como es el caso de los miRNAs. Se necesita buscar una asociación entre la afección ganglionar y la presencia de un perfil de miRNAs específico. La importancia de esta asociación establecerá que pacientes no se benefician de una histerectomía radical como tratamiento inicial en una población de mujeres mexicanas con cáncer cervicouterino en etapas tempranas. Así mismo, se necesita un perfil de miRNAs asociado a recurrencia para poder establecer que pacientes requieren un seguimiento más estrecho para ser detectadas tempranamente o requieren además un tratamiento complementario.

VI. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La identificación de expresión de miRNAs ha sido relacionada con factores para el desarrollo y progresión del cáncer. Con este proyecto se encontraría una asociación entre la sobreexpresión o subexpresión de miRNAs específicos y el riesgo de afección ganglionar microscópica y recurrencia en estadios tempranos de cáncer cervicouterino de manera precoz. De identificarse un grupo de miRNAs asociados a afección ganglionar y otro a recurrencia, se podrán generar estudios de seguimiento, haciendo posible individualizar el uso de métodos diagnósticos y/o del tratamiento a estos grupos particulares de pacientes, ya sea limitando los procedimientos quirúrgicos o agregando tratamiento adyuvante en forma más temprana.

VII. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Existe un perfil de miRNAs asociado a la afección ganglionar oculta en pacientes con CaCU en etapas tempranas tratadas quirúrgicamente inicialmente?

¿Existe un perfil de miRNAs asociado a la recurrencia en pacientes con CaCU en etapas tempranas tratadas quirúrgicamente inicialmente?

VIII. HIPÓTESIS

Existe un perfil de expresión de miRNAs específico asociado a la afección ganglionar en pacientes con CACU en etapas tempranas tratadas inicialmente con histerectomía radical y LPB.

Existe un perfil de expresión de miRNAs específico asociado a la recurrencia en pacientes con CACU en etapas tempranas tratadas inicialmente con histerectomía radical y LPB.

IX. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo general

Identificar un perfil de expresión de miRNAs asociado a la afección ganglionar en pacientes con CaCU en estadios tempranos tratados quirúrgicamente.

Objetivos particulares

1. Obtener el perfil de expresión de miRNAs en un grupo de muestras de pacientes con CaCU en etapas tempranas tratados quirúrgicamente.
2. Identificar el perfil de expresión de miRNAs con afección ganglionar microscópica.
3. Comparar los perfiles de expresión entre pacientes con afección ganglionar y sin afección ganglionar en pacientes con CaCU en estadios tempranos tratados quirúrgicamente.
4. Identificar los miRNAs asociados a afección ganglionar en pacientes con CaCU en estadios tempranos tratados quirúrgicamente.
5. Obtener los riesgos de presencia de los miRNAs escogidos en pacientes con CaCU en estadios tempranos con afección ganglionar tratados quirúrgicamente.

Objetivos secundarios

1. Identificar el perfil de expresión de miRNAs de un grupo de pacientes con CaCU en etapa temprana tratados quirúrgicamente que presentaron recurrencia.
2. Conocer las características clínico-patológicas de las pacientes con CaCU en etapas tempranas tratadas quirúrgicamente.

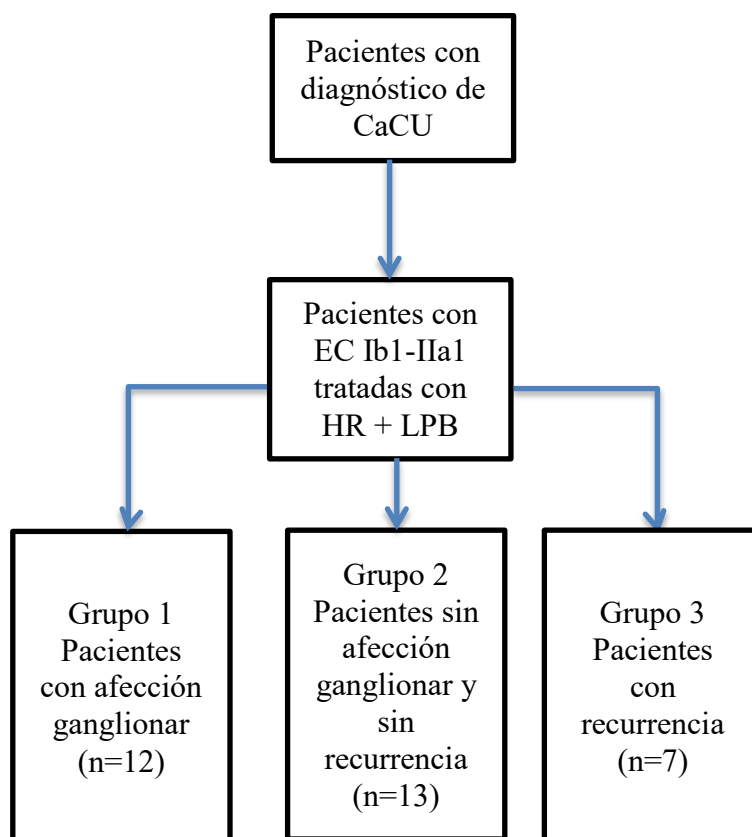
X. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de investigación

Se trata de un estudio exploratorio.

Universo a estudiar y tamaño de muestra

Grupos de estudio



El grupo 1 y el grupo 2 fueron pareados por edad, tercio de invasión al estroma y presencia de permeación linfovascular.

Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se definió con base en la fórmula:

$$n = \frac{2PQ (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{(p_2 - p_1)^2}$$

p1: sobrevida con afección ganglionar. 32.4%

p2: sobrevida sin afección ganglionar. 80.3%

$$P = (p_2 - p_1) / 2$$

$$Q = 1 - P$$

Z_{alfa} = 1.96 para 95% de seguridad

Z_{beta} = 0.84 para potencia del 80%

Tamaño de muestra deseada es de 57 casos para el grupo 1 y 3

Muestra final

Sin embargo, el tamaño de muestra final fue de 12 pacientes con afección ganglionar de los cuales 2 presentaron recurrencia, 5 pacientes con recurrencia sin afección ganglionar y 13 pacientes controles que se pudieron parear con el grupo 1 (con afección ganglionar). Esta muestra fue definida según la cantidad de expedientes y muestras viables del Instituto Nacional de Cancerología así como por los recursos económicos disponibles. Con esta muestra, la precisión Z_{alfa} del estudio es de 70.5%.

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de CaCU confirmado histológicamente.
- Pacientes en etapas tempranas (IB1 y IIA) y operadas de histerectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral.

Criterios de exclusión

- Pacientes con tumores malignos con dobles primarios.
- Pacientes que no hayan recibido el tratamiento estándar.
- Pacientes con muestras de parafina de mala calidad.
- Pacientes con seguimientos menores de 24 meses posteriores a finalizar tratamiento.

Criterios de eliminación

- Pacientes con muestras procesadas de forma incorrecta.
- Pacientes que han abandonado el tratamiento.
- Pacientes con expedientes incompletos.
- Muestras de calidad o cantidad inadecuadas de miRNAs para su procesamiento en el microarreglo.

Obtención de expedientes

Los expedientes se obtuvieron de la base de datos del archivo electrónico del Instituto Nacional de Cancerología del departamento de Ginecología Oncológica entre enero del 2006 y diciembre del 2013. Se realizó una recolección de los expedientes que cumplieron con las características descritas en los criterios de inclusión obteniendo un total de 255 expedientes. De estos se seleccionaron las pacientes para crear los 2 grupos iniciales del estudio:

- Grupo 1: pacientes con CaCU con etapas IB1 o IIA1 y que fueron sometidas a histerectomía radical con LPB y que presentaron afección ganglionar oculta diagnosticada por patología.
- Grupo 2: pacientes con CaCU con etapas IB1 o IIA1 que fueron sometidas a histerectomía radical con LPB que no presentaron afección ganglionar, pareados por

edad y por características patológicas (tamaño de tumor y presencia de permeación linfovascular) con el grupo 1.

Adicionalmente, para los objetivos secundarios se identificó un tercer grupo (pacientes con recurrencia):

- Grupo 3: pacientes con CaCU con etapas IB1 o IIA1, que fueron sometidas a histerectomía radical con LPB, y que presentaron recurrencia en un periodo de mínimo 6 meses.

Posteriormente se realizó una base de datos con las características clínicas y patológicas de cada uno de los expedientes y números de identificación de patología para la obtención de los bloques de parafina del sitio del tumor primario (cérvix). Se corroboró por un patólogo oncólogo que los bloques de parafina tuvieran tumor por medio de revisión de laminillas teñidas con hemtoxilina y eosina. De estos bloques de parafina se realizaron al menos 5 cortes de por lo menos 10 micras cada uno y que fueron las más representativas para la realización de las extracciones del RNA.

Metodología en laboratorio

Se procedió a la extracción del RNA a partir de los tumores cervicales mediante el “método del TRIzol”, empleando perlas de porcelana MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostic Cat. # 03358941001), en el equipo MagNA Lyser Instrument (Roche Diagnostics Cat. # 14082) para la homogenización del tejido cervical. Posteriormente, se purificó el RNA total pasándolo a través de las columnas RNeasy Mini Spin Columns de Qiagen (Qiagen RNeasy mini Kit Cat. # 74104) de acuerdo a las condiciones del fabricante.

En seguida se realizó la verificación de la fracción de miRNAs en los RNAs extraídos, por medio de un enriquecimiento de RNAs menores de 200 nucleótidos utilizando el kit comercial mirVana miRNA isolation kit (Ambion Cat. #PN 1560M) tomando como controles las cadenas de RNAs RNU6b y miR-1 para establecer que el ARN extraído fuera

de adecuada cantidad y calidad para su manejo posterior. Las muestras que no cumplieran con los requerimientos del fabricante fueron descartadas.

De las muestras que tuvieron una adecuada cantidad y calidad de RNA total se realizó la identificación del perfil de expresión global de miRNAs. La identificación del perfil de expresión global de miRNAs se realizó empleando el microarreglo GeneChip miRNA 3.0 Array de Affymetrix (Cat. 902018), cuantificando la expresión de 1733 miRNAs maduros, para la identificación de los posibles marcadores moleculares para afección ganglionar y recurrencia. El microarreglo cuenta con una reproducibilidad $> 95\%$ con un 85% de detección de los transcritos con una cantidad de al menos 1 amol. Se consideró sobreexpresado un gen cuando se detectó con una cantidad menor de 35 ciclos de amplificación; y subexpresado cuando se detectó con más de 35 ciclos. A partir de los datos de expresión obtenidos para cada miRNA, se realizaron los análisis de agrupamiento jerárquico y un mapa de calor, realizando análisis de semejanzas y diferencias de componentes principales seguido de una prueba de t-student, seleccionando los microARNs con valor estadístico de $p \leq 0.01$ y con una tasa de cambio mayor o menor a 1.5 veces de la media de la firma en la sobreexpresión o subexpresión respectivamente.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión de los datos de acuerdo a la distribución de los mismos. La distribución de las variables se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk. En el caso de las variables categóricas se utilizó frecuencias absolutas y frecuencias relativas. En el caso de las variables continuas con distribución no normal se usó mediana y valor intercuartilar, y para las distribuciones continuas se usó media y desviación estándar. Las comparaciones entre los grupos se realizó con X^2 de Pearson o exacta de Fisher en el caso de las proporciones; las comparaciones de las concentraciones de las variables continuas se realizó con la prueba de t student para los grupos independientes en el caso de que las distribuciones normales o con prueba de U de Mann-Whitney si la distribución no era normal. Para la realización de las razones de momios, se seleccionaron los miRNAs del microarreglo que tuvieran un valor estadístico

de $p \leq 0.01$ y que tuvieran un doble cambio en la sobreexpresión o subexpresión, tanto para el grupo de afección ganglionar, como para el grupo de recurrencias. Se dicotomizó la expresión dependiendo de la media de sobreexpresión o subexpresión para realizar razones de momios y establecer los riesgos. El análisis estadístico se realizó con el programa de STATA 14.1 y se consideró significativo un valor $p < 0.05$. El apoyo financiero fue a través de la red temática del Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer de CONACYT (No. 271928)

Variables

- Edad (variable cuantitativa discreta)
- Etapa clínica: IB1/IIA1/IIB (variable nominal)
- IMC (variable cuantitativa discreta)
- IMC2: $< 25/25.1-30/> 30$ (variable nominal)
- Estudio de imagen: si/no (variable dicotómica)
- Cx: HR2/HR3 (variable dicotómica)
- Tiempo de cirugía en minutos (variable cuantitativa discreta)
- Sangrado durante cirugía (variable cuantitativa discreta)
- Complicaciones transoperatorias: si/no (variable dicotómica)
- Días de estancia intrahospitalaria (variable cuantitativa discreta)
- Complicaciones tardías: si/no (variable dicotómica)
- Tipo de adyuvancia: ninguno/RT/QTyRT (variable nominal)
- Tipo de quimioterapia: Cisplatino/gemcitabina/ninguno (variable nominal)
- Recurrencia: ninguna/local/regional/distancia (variable nominal)
- Histología: Epidermoide/adenocarcinoma/adenocarcinoso/otros (variable cualitativa nominal)
- Tamaño de tumor en mm (variable cuantitativa continua)
- Tercios del estroma afectados: 1/3,2/3,3/3 (variable nominal)
- Permeación linfovascular: presente/ausente (variable cualitativa dicotómica)
- Invasión estromal: positiva/negativa (variable cualitativa dicotómica)
- Márgenes: positivos/negativos (variable cualitativa dicotómica)

-
- Parametrios: positivos/negativos (variable cualitativa dicotómica)
 - Afección ganglionar: presente/ausente (variable cualitativa dicotómica)
 - Número de ganglios resecados (variable cuantitativa discreta)
 - Perfil de miARN específicos (variable cualitativa nominal)

XI. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Cancerología con el número de referencia INCAN/CI/248/15

Proceso de obtención de muestras

Las muestras de bloques de parafina se obtuvieron del archivo de muestras del Departamento de Patología, con previo permiso del Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Cancerología.

Proceso de obtención del consentimiento informado

No aplica ya que se utilizarán muestras del archivo tanto clínico como de patología, lo cual hace que el proyecto sea de nulo riesgo para los pacientes. En todo momento se mantendrá la confidencialidad de los datos de los individuos incluidos en el análisis y en las futuras publicaciones de los resultados.

Acuerdos para indemnización a los pacientes participantes por daños potenciales derivados del estudio

No aplica ya que se trata de un estudio retrospectivo.

Ingresos para investigadores:

No existen ingresos, es un protocolo de iniciativa de los investigadores

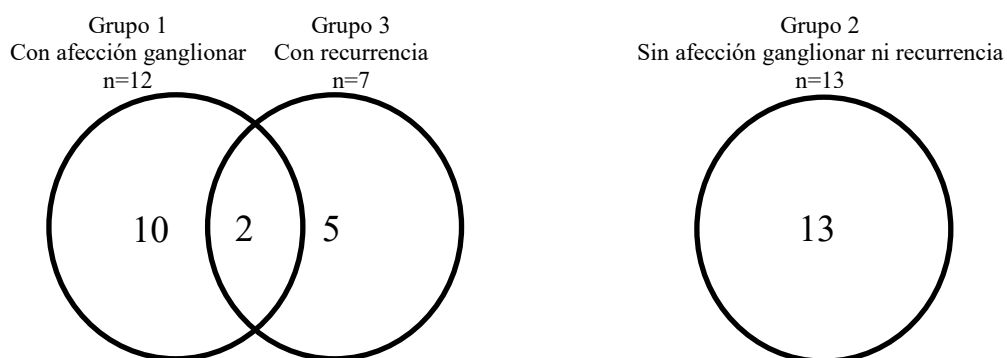
El estudio se condujo de acuerdo con lo señalado en:

	SI	NO	NO APLICA.
- <u>Declaración de Helsinki</u>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
- <u>Buenas Prácticas Clínicas</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- <u>Normas establecidas en la Ley General de Salud.</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

XII. RESULTADOS

Se revisaron un total de 255 expedientes de pacientes que se les hizo histerectomía con linfadenectomía pélvica bilateral entre enero del 2005 y diciembre del 2013. De estos, 22 pacientes presentaron afección ganglionar en el reporte final de patología. Se buscaron 22 pacientes que pudieran ser pareados por edad, tercio de invasión al estroma cervical y por permeación linfovascular. Adicionalmente se obtuvieron 12 expedientes extra que presentaron recurrencia. De los 56 expedientes totales se eliminaron 26 (46%) expedientes debido a que las muestras no cumplieron con los requerimientos de calidad para ser procesadas en los microarreglos, obteniendo un total de 30 bloques de parafina para su procesamiento final en laboratorio.

Para el grupo 1 (afección ganglionar) se seleccionaron 12 pacientes de los cuales 2 presentaban recurrencia, para el grupo 2 (sin afección ganglionar o recurrencia) se seleccionaron 13 pacientes, y para el grupo 3 (con recurrencia) se seleccionaron 7 pacientes. Las pacientes del grupo 1 y 3 no fueron mutuamente excluyentes.



Características clínicas de la población general (tabla 4)

La media de edad de todas las pacientes fue de 55.27 (desviación estándar [DE] 9.4) años. Para la etapa clínica, 1 (3.33%) fue Ia2, 27 (90%) Ib1 y 2 (6.67%) IIa1. La media de índice de masa corporal (IMC) fue de 29.27 (DE 3.9). A 11 (36.67%) pacientes se realizó un estudio de imagen. En 13 (43.33%) pacientes se realizó una histerectomía radical tipo 2, y

en el resto una tipo 3. La mediana de tiempo quirúrgico fue de 240 (rango intercuartilar [RIC] 210-325) minutos, mientras que la mediana de sangrado fue de 600 (RIC 400-800) centímetros cúbicos. En 3 (10%) pacientes hubo complicaciones intraoperatorias, mientras que en 7 (23.33%) complicaciones tardías. A 25 (83.33%) pacientes se les dio adyuvancia, de las cuales 13 (43.33%) recibieron radioterapia y 12 (40%) radioterapia y quimioterapia concomitante; el resto no recibieron adyuvancia (N=5). En cuanto a la recurrencia, 7 (23.33%) pacientes presentaron algún tipo de recurrencia, siendo 4 locales, 1 regional y 2 a distancia.

Tabla 4. Características generales clínicas y de tratamiento de las pacientes con CaCU en etapas tempranas operadas de HR con LPB.	
	N=30 (100)
Edad	55.27±9.4
Etapa	
Ia2	1 (3.33)
Ib1	27 (90.0)
IIa1	2 (6.67)
IMC	29.27±3.9
IMC2	
≤ 25	7 (23.33)
25.1-30	9 (30.00)
> 30	14 (46.67)
Adyuvancia	25 (83.33)
Tipo de adyuvancia	
Ninguno	5 (16.67)
RT o BT	13 (43.33)
QT/RT	12 (40.0)
Tipo de QT	
CDDP	6 (20.00)
GMZ	6 (20.0)
Ninguno	18 (60.00)
Tipo de recurrencia	
Ninguna	23 (76.67)
Local	4 (13.33)
Regional	1 (3.33)
Distancia	2 (6.67)
CaCU: Cáncer cervicouterino, HR: histerectomía radical, LPB: linfadenectomía pélvica bilateral, IMC: índice de masa corporal, RT: radioterapia externa y braquiterapia, BT: sólo braquiterapia, QT/RT: quimioterapia y radioterapia concomitante y braquiterapia, CDDP: cisplatino, GMZ: gemcitabina.	

Características patológicas de la muestra (tabla 5)

En 22 (73.33%) pacientes la histología fue epidermoide, 4 (13.33%) adenocarcinoma y 4 (13.33%) adenoescamoso. En 1 (3.33%) paciente se diagnosticó grado 1, mientras que en 16 (53.33%) y en 13 (43.33%) fueron grados 2 y 3, respectivamente. En 24 (80%) pacientes hubo permeación linfovascular. La mediana de profundidad de invasión fue de 11 (RIC 8-15) milímetros. En cuanto al tercio de invasión del estroma, 5 (16.67%) presentaron un tercio de invasión, mientras que en 5 (16.67%) y en 20 (66.67%) presentaron dos tercios y tres tercios, respectivamente. La media de tamaño tumoral fue de 26.89 (DE 11.26) milímetros. En 8 (26.67%) pacientes hubo márgenes positivos, 5 (16.67%) parametrios afectados y 12 (40%) afección ganglionar.

Tabla 5. Características generales histopatológicas de las pacientes con CaCU en etapas tempranas operadas de HR con LPB.	
	N=30 (100)
Afección ganglionar	12 (40.00)
No. ganglios resecaados	21.93±8.22
Grado	
1	1 (3.33)
2	16 (53.33)
3	13 (43.33)
PLV	24 (80.00)
Profundidad de invasión en mm	11 (8-15)
Tercios	
1/3	5 (16.67)
2/3	5 (16.67)
3/3	20 (66.67)
TT en mm	26.89±11.26
Márgenes positivos	8 (26.66)
Parametrios positivos	5 (16.67)
CaCU: Cáncer cervicouterino, HR: histerectomía radical, LPB: linfadenectomía pélvica bilateral, PLV: permeación linfovascular, TT: tamaño tumoral en mm, No: número.	

Comparación de características clínicas entre pacientes con afección ganglionar y el grupo control (tabla 6 y 7).

En cuanto a las variables clínicas y de tratamiento, se encontró una diferencia significativa en cuanto al tipo de adyuvancia ($p=0.02$) y el tipo de quimioterapia ($p=0.01$) (tabla 6). En cuanto a las variables patológicas, hubo una diferencia significativa en cuanto a la afección ganglionar ($p<0.001$) y la profundidad de invasión ($p=0.04$) (tabla 7). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el resto de las variables clínicas, de tratamiento e histopatológicas.

Tabla 6. Características clínicas y de tratamiento de las pacientes con afección ganglionar y sin afección ganglionar.			
	Afección ganglionar	Sin afección ganglionar	p
N (%)	12(48)	13 (52)	
Edad	54.92±8.89	54.85±10.80	0.98
Etapa			
Ia2	0 (0.0)	1 (7.7)	
Ib1	12 (100.0)	10 (76.9)	
IIa1	0 (0.0)	2 (15.4)	
IMC	28.82±2.69	30.36±4.23	0.34
IMC2			
≤ 25	3 (25.00)	3 (23.08)	0.67
25.1-30	4 (33.33)	2 (15.38)	
> 30	5 (41.67)	8 (61.54)	
Tipo de adyuvancia			
Ninguno	0 (0.00)	4 (30.77)	0.02
RT o BT	4 (33.33)	7 (53.84)	
QT/RT	8 (66.67)	2 (15.38)	
Tipo de QT			
Ninguno	6 (50.0)	11 (84.62)	0.01
CDDP	3 (25.0)	0 (0.0)	
GMZ	3 (25.0)	2 (15.38)	
Tipo de recurrencia			
Ninguna	10 (83.33)	13 (100)	0.22
Local	1 (8.33)	0 (0.0)	
Regional	0 (0.0)	0 (0.0)	
Distancia	1 (8.33)	0 (0.0)	

IMC: índice de masa corporal, RT: radioterapia externa y braquiterapia, BT: sólo braquiterapia, QT/RT: quimioterapia y radioterapia concomitante y braquiterapia, CDDP: cisplatino, GMZ: gemcitabina.
Se uso X^2 para la comparación de las variables

Tabla 7. Características histopatológicas de las pacientes con afección ganglionar y sin afección ganglionar			
	Con afección ganglionar	Sin afección ganglionar	p
N (%)	12 (48)	13 (52)	
Histología			
Epidermoide	8 (66.67)	10 (76.92)	0.57
Adenocarcinoma	3 (25.00)	1 (7.69)	
Adenoescamos	1 (8.33)	2 (15.38)	
Grado			0.90
1	0 (0.0)	1 (7.69)	
2	7 (58.33)	7 (53.85)	
3	5 (41.67)	5 (38.46)	
PLV	11 (91.67)	10 (76.92)	0.33
Profundidad de invasión en mm	15 (10.5-17)	10 (7-11)	0.04
Tercios			
1/3	1 (8.33)	3 (23.08)	0.83
2/3	2 (16.67)	2 (15.38)	
3/3	9 (75.00)	8 (61.54)	
TT en mm	30.75±9.55	25.23±12.07	0.22
Márgenes positivos	3 (25.00)	3 (23.08)	0.90
Parametrios positivos	4 (33.33)	1 (7.69)	0.16
No. ganglios resecaados	20 (17.5-29)	19 (12-28)	0.46
Afección ganglionar	12 (100.00)	0 (0.0)	< 0.001

PLV: permeación linfovascular, TT: tamaño tumoral en mm, No: número.
Se uso X² para la comparación de las variables

Perfil de miRNAs seleccionados asociados con afección ganglionar (figura 1 y tabla 8)

Se encontraron 56 miRNAs que tuvieron una expresión estadísticamente significativa y se agruparon en un mapa jerárquico (figura 1). De estos, se seleccionaron por tener un $p < 0.01$ y que fueran los que tuvieran mayor tasa de cambio (Fold Change [FC]) (Tabla 8) los siguientes miRNAs: miR-487b, miR-194, miR-34c-5p, miR-29b-2-star, miR-195, miR-92b-star, miR-564, miR-483-5p, miR-4534, miR-548ac. De estos, miR-487b (FC: -3.269, $p=0.00038$), miR-194 (FC: -2.83, $p=0.0065$), miR-34c-5p (FC=-2.4643, $p=0.0088$), miR-29b-2-star (FC=-2.293, $p=0.00714$) y miR-195 (FC: -2.068, $p=0.0011$) presentaron subexpresión. Los miRNAs sobreexpresados fueron miR-548ac (FC: 2.743, $p=0.0003$), miR-4534 (FC: 2.479, $p=0.0014$), miR-483-5p (FC:2.2159, $p=0.00196$), miR-564 (FC: 2.0728, $p=0.00623$), miR-92b-star (FC: 1.8276, $p=0.005$) (Tabla 8).

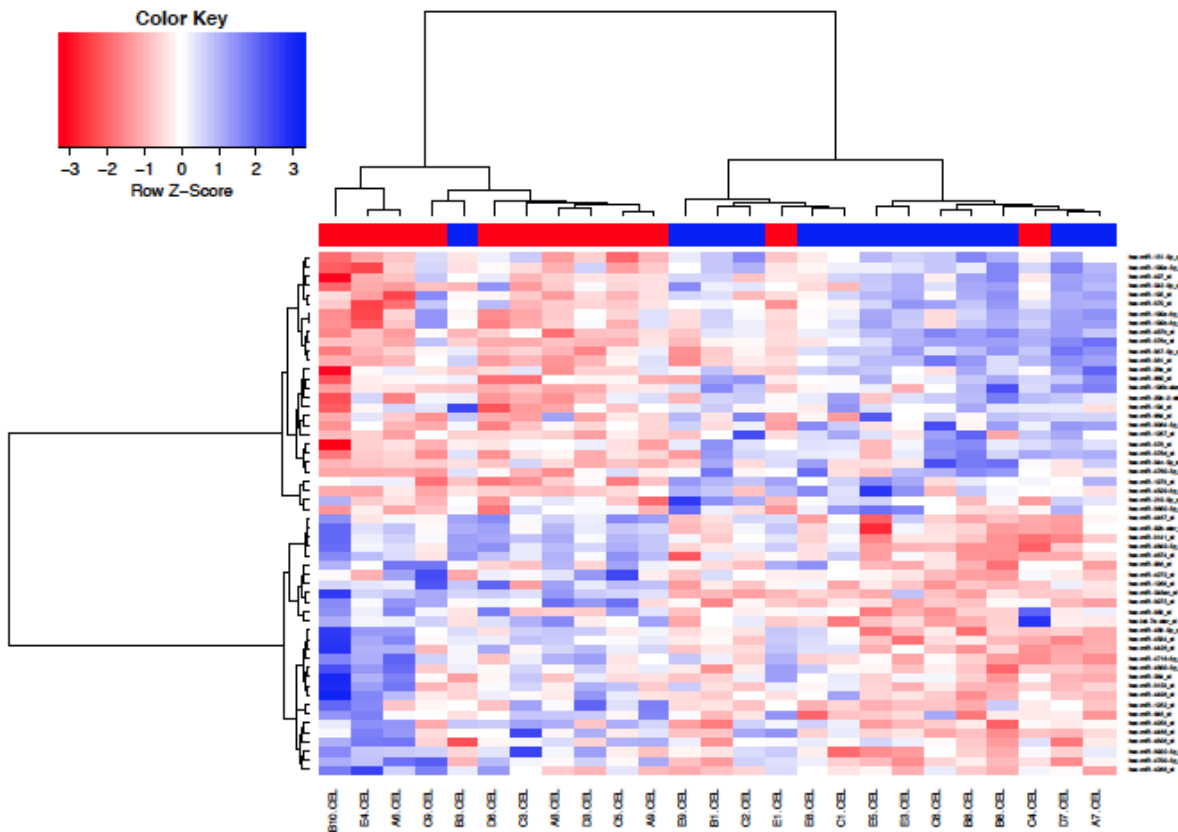


Figura 1. Heat Map de los miRNAs estudiados en las pacientes con cáncer cervico uterino comparando las pacientes con afección ganglionar y sin afección ganglionar.

Tabla 8. Perfil de miRNAs asociados a afección ganglionar en pacientes con CaCU en etapas tempranas tratadas con HR y LPB.

MicroRNA	logFC	Expresión	t	Valor p	Fold change
miR-487b	-1.709095584	4.968114099	-4.094644184	0.000383725	-3.269557928
miR-194	-1.505449985	5.877174174	-2.965850414	0.006521666	-2.839132115
miR-34c-5p	-1.30121818	3.080217223	-2.837676216	0.008848497	-2.464368807
miR-29b-2-star	-1.197342786	4.482610916	-2.927967371	0.007140576	-2.293169167
miR-195	-1.048421405	10.25850899	-3.675365904	0.001124426	-2.068265515
miR-92b-star	0.869963448	6.399097627	3.074873799	0.005013234	1.827616595
miR-564	1.051584527	3.327330169	2.984313132	0.006238891	2.072805182
miR-483-5p	1.147903266	4.765735858	3.454773384	0.001962294	2.215916111
miR-4534	1.310018758	4.499945637	3.569552397	0.001470073	2.479447637
miR-548ac	1.455791982	4.336457259	4.140327402	0.000340988	2.743071034

CaCU: cáncer cervico uterino, HR: histerectomía radical, LPB: lifadenectomía bilateral, miR: miRNA, t: t student.

Razones de momios de los miRNAs seleccionados en asociación con afección ganglionar (tabla 9)

Se determinó la asociación de los miRNAs con la afección ganglionar en comparación con el grupo control por medio la estimación de razones de momios (OR). En los miRNAs sobreexpresados, se encontró una asociación estadísticamente significativa en miR-92b-star (75% vs 30.77%; OR 6.74 IC95% 1.16-39.20, p=0.033), miR-483-5p (75% vs 23.08%; OR 10 IC 95% 1.59-62.73, p=0.014), miR-4534 (83.33% vs 23.08%; OR 16.67 IC 95% 2.27-122.12, p=0.006) y el miR-548ac (83.33% vs 15.38%; OR 27.5 IC 95% 3.24-233.47, p=0.002).

Tabla 9. Análisis bivariado de los miRNAs asociados a la afección ganglionar en pacientes con CaCU en etapas tempranas tratadas con HR y LPB.				
	Con afección ganglionar	Sin afección ganglionar	OR (IC95%)	p
N (%)	12 (48)	13 (52)		
miR-487b*	11 (91.67)	2 (15.38)	60.5 (4.76-768.49)	0.002
miR-194*	7 (58.33)	5 (38.46)	2.24 (0.45-11.11)	0.32
miR-34c-5p*	9 (53.85)	7 (53.85)	2.57 (0.47-14.10)	0.28
miR-29b-2-star*	7 (58.33)	2 (15.38)	7.7 (1.16-51-17)	0.035
miR-195*	11 (91.67)	4 (30.77)	24.74 (2.33-262-58)	0.008
miR-92b-star**	9 (75.00)	4 (30.77)	6.74 (1.16-39.20)	0.033
miR-564**	7 (58.33)	5 (38.46)	2.24 (0.45-11.11)	0.324
miR-483-5p**	9 (75.00)	3 (23.08)	10 (1.59-62.73)	0.014
miR-4534**	10 (83.33)	3 (23.08)	16.67 (2.27-122.12)	0.006
miR-548ac**	10 (83.33)	2 (15.38)	27.5 (3.24-233.47)	0.002

CaCU: cáncer cervico uterino, HR: histerectomía radical, LPB: lifadenectomía bilateral, OR: Odd ratio, miR: micro RNA, IC: intervalo de confianza.
 *miRNAs subexpresados
 ** miRNAs sobreexpresados

En cuanto a los miRNAs subexpresados, los que tuvieron una asociación estadísticamente significativa en pacientes con afección ganglionar en comparación con los controles fueron miR-487b (91.67% vs 15.38%, OR 60.5 IC 95% 4.76-768.49, p=0.002), miR-29b-2-star (58.33% vs 15.38%; OR 7.7 IC 95% 1.16-51.17, p=0.035) y miR-195 (91.67% vs 30.77%; OR 24.74 IC 95% 2.33-262.58, p=0.008).

Comparación del grupo de pacientes con recurrencia (tablas 10 y 11).

Las pacientes que presentaron recurrencia tuvieron una media de edad de 59.14 (DE 9.77) años y de IMC de 27.85 (DE 3.53). En cuanto al tipo de adyuvancia, 1 (14.29%) no recibió, 2 (28.57%) recibieron radioterapia y 4 (57.14%) quimioterapia y radioterapia concomitante. Para el tipo de recurrencias, 4 (57.14%) fueron locales, 1 (14.29%) regional y 2 (28.57%) a distancia. Para los tercios de invasión del estroma cervical, 1 (14.29%) tuvo un tercio de invasión, 1 dos tercios y 5 (71.43%) tres tercios. Cinco (71.43%) pacientes presentaron permeación linfovascular, 3 (42.86%) márgenes positivos, 2 (28.57%) presentaron afección ganglionar y 1 (14.29%) parametrios afectados. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las características clínicas, de tratamiento e histopatológicas entre las pacientes en quienes hubo recurrencia y aquellas que no (tabla 10 y 11).

Tabla 10. Características clínicas y de tratamiento de las pacientes con recurrencia y sin recurrencia.			
	Con recurrencia	Sin recurrencia	p
N (%)	7 (35)	13 (65)	
Edad	59.14±9.77	54.85±10.80	0.39
Etapa			
Ia2	0 (0.0)	1 (7.69)	0.68
Ib1	7 (100.0)	10 (76.92)	
IIa1	0 (0.0)	2 (15.38)	
IMC	27.85±3.53	30.36±4.23	0.19
IMC2			
≤ 25	2 (28.57)	3 (23.08)	
25.1-30	3 (42.86)	2 (15.38)	
> 30	2 (28.57)	8 (61.54)	
Tipo de adyuvancia			
Ninguno	1 (14.29)	4 (30.77)	0.34
RT o BT	2 (28.57)	7 (53.84)	
QT/RT	4 (57.14)	2 (15.38)	
Tipo de QT			
Ninguno	3 (42.86)	11 (84.62)	0.16
CDDP	1 (14.29)	0 (0.0)	
GMZ	3 (42.86)	2 (15.38)	

IMC: índice de masa corporal, RT: radioterapia externa y braquiterapia, BT: sólo braquiterapia, QT/RT: quimioterapia y radioterapia concomitante y braquiterapia, CDDP: cisplatino, GMZ: gemcitabina.
Se utilizó X² para la comparación de las variables

Tabla 11. Características histopatológicas de las pacientes con recurrencia y sin recurrencia.			
	Con recurrencia	Sin recurrencia	p
N(%)	7 (35)	13 (65)	
Histología			
Epidermoide	5 (71.43)	10 (76.92)	0.90
Adenocarcinoma	1 (14.29)	1 (7.69)	
Adenoescamos	1 (14.29)	2 (15.38)	
Grado			
1	0 (0.0)	1 (7.69)	0.77
2	3 (42.86)	7 (53.85)	
3	4 (57.14)	5 (38.46)	
PLV	5 (71.43)	10 (76.92)	0.59
Profundidad de invasión en mm	13 (5-15)	10 (7-11)	0.58
Tercios			
1/3	1 (14.29)	3 (23.08)	0.92
2/3	1 (14.29)	2 (15.38)	
3/3	5 (71.43)	8 (61.54)	
TT en mm	24.23±24.09	25.23±12.07	0.86
Márgenes positivos	3 (42.86)	3 (23.08)	0.61
Parametrios positivos	1 (14.29)	1 (7.69)	0.97
No. ganglios resecaados	20 (19-23)	19 (12-28)	0.58
Afección ganglionar	2 (28.57)	0 (0.0)	0.11
PLV: permeación linfovascular, TT: tamaño tumoral en mm, No: número, NS: no significativo. Se utilizó X ² para la comparación de las variables			

MiRNAs asociados con recurrencia (Figura 2 y tabla 12).

En el perfil de expresión de miRNAs asociados a recurrencia se encontraron 25 que tuvieron un valor estadísticamente significativo y se agruparon en un mapa jerárquico (figura 2). De estos, se seleccionaron por tener un $p < 0.01$ y que fueran los que tuvieran mayor tasa de cambio (Fold Change [FC]) (Tabla 9) los siguientes miRNAs: miR-3613-5p, miR-4722-5p, miR-4482, let-7e-star, miR-136-star, miR-331-3p, miR-424-star, miR-432, miR-503 y el miR-542-5p. Los miRNAs subexpresados fueron miR-331-3p (FC -2.0841, $p=0.0062$), miR-424-star (FC -3.044, $p=0.0056$), miR-432 (FC -3.2206, $p=0.0025$), miR-503 (FC -3.2206, $p=0.00423$) y el miR-542-5p (FC -3.2889, $p=0.00384$). Los miRNAs sobreexpresados fueron miR-3613-5p (FC 7.025, $p=0.00176$), miR-4722-5p (FC 1.5237, $p=0.00567$), miR-4482 (FC 1.5147, $p=0.00052$), let-7e-star (FC 1.2744, $p=0.00349$) y el miR-136-star (FC 1.2707, $p=0.00517$).

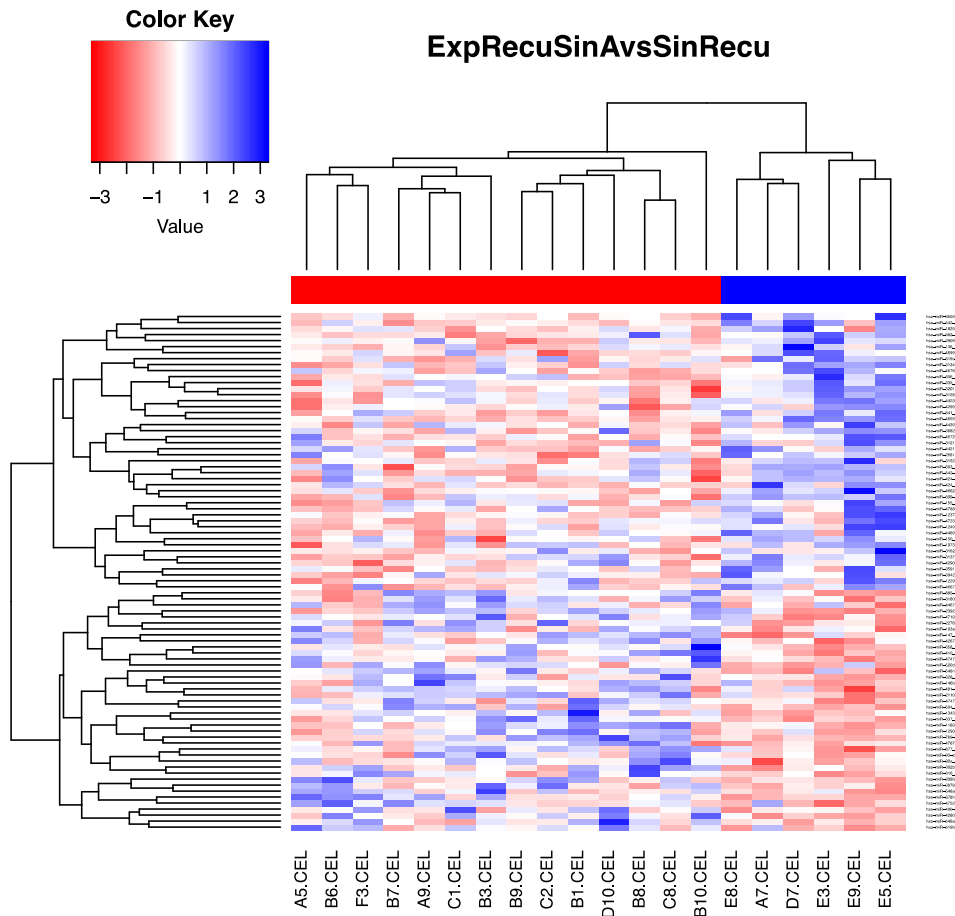


Figura 2. Heat Map de los miRNAs estudiados en las pacientes con cáncer cervico uterino comparando las pacientes con recurrencia y sin recurrencia.

Tabla 12. Perfil de Mirnas seleccionado asociado a recurrencia en pacientes con CaCU en etapas tempranas tratadas con HR y LPB.

MicroRNA	logFC	AveExpr	t	P.Value	Fold change
miR-3613-5p	2.812514176	2.726323291	3.601648324	0.001759586	7.025077671
miR-4722-5p	0.607579679	2.427019598	3.093770914	0.005678511	1.523700844
miR-4482	0.599028577	2.103641284	4.121178191	0.000520698	1.514696319
let-7e-star	0.349860767	1.690984578	3.306186896	0.003491466	1.274437626
miR-136-star	0.345660794	1.710344251	3.134888241	0.005170934	1.27073288
miR-331-3p	-1.059428756	5.440752353	-3.053560037	0.006221409	-2.084106143
miR-424-star	-1.606012187	5.940030247	-3.09434553	0.005671095	-3.044092476
miR-432	-1.61498546	5.265341195	-3.435167358	0.00259145	-3.063085123
miR-503	-1.687316964	6.640313289	-3.222227897	0.004234704	-3.220572041
miR-542-5p	-1.717639377	4.905171859	-3.264736849	0.003840927	-3.288978044

CaCU: cáncer cervico uterino, HR: histerectomía radical, LPB: lifadenectomía bilateral, miR: miRNA, t: t student.

Razón de momios entre los miRNAs seleccionados (tabla 13)

En los miRNAs sobreexpresados, se encontró una asociación estadísticamente significativa con recurrencia en comparación con el grupo control en miR-331-3p (85.71% vs 23.08%: OR 19.99 IC 95% 1.68-238.36, p=0.018) y en el miR-542-5p (71.43% vs 23.08%, OR 8.3 IC 95% 1.03-67.14, p=0.047).

Tabla 13. Análisis univariado de los miRNAs asociados a recurrencia en pacientes con CaCU en etapas tempranas tratadas con HR y LPB.				
	Con recurrencia	Sin recurrencia	OR (IC95%)	P
N (%)	7 (35)	13 (65)		
miR-331-3p*	6 (85.71)	3 (23.08)	19.99 (1.68-238.36)	0.018
miR-424-star*	5 (71.43)	5 (38.46)	4 (0.55-29.10)	0.171
miR-432*	4 (57.14)	4 (30.77)	3 (0.45-20.15)	0.258
miR-503*	6 (85.71)	6 (46.15)	7 (0.65-75.73)	0.109
miR-542-5p*	5 (71.43)	3 (23.08)	8.3 (1.03-67.14)	0.047
miR-3613-5p**	3 (42.86)	0 (0.0)	NA	0.010
miR-4722-5p**	4 (57.14)	2 (15.38)	7.33 (0.88-61.33)	0.066
miR-4482**	7 (100)	2 (15.38)	NA	< 0.001
let-7e-star**	6 (85.71)	2 (15.38)	32.99 (2.45-443.59)	0.008
miR-136-star**	5 (71.43)	2 (15.38)	13.75 (1.48-127.47)	0.021

CaCU: cáncer cervico uterino, HR: histerectomía radical, LPB: lifadenectomía bilateral, OR: Odd ratio, miR: micro RNA, IC: intervalo de confianza.
 * miRNAs subexpresados
 ** miRNAs sobreexpresados

En cuanto a los miRNAs subexpresados, los que tuvieron una asociación estadísticamente significativa para recurrencia en comparación con el grupo control fueron miR-3613-5p (42.86% vs 0%, p=0.010), miR-4482 (100% vs 15.38%, p<0.001), let-7e-star (85.71% vs 15.38%; OR 32.99 IC 95% 2.45-443.59, p=0.008) y en miR-136-star (71.43% vs 15.38%, OR 13.75 IC 95% 1.48-127.47, p=0.021).

XIII. DISCUSIÓN

La identificación de un perfil de expresión de miRNAs asociados a afección ganglionar oculta tiene importancia ya que permite conocer mejor la biología de la enfermedad, y en un futuro poder predecir que pacientes requerirán un tratamiento más agresivo, un seguimiento más estrecho y la identificación de recurrencias en forma más temprana. En este estudio se pudo identificar un perfil de miRNAs asociado a afección ganglionar en pacientes con CaCU en etapas tempranas que presentan afección ganglionar oculta. De los 10 miRNAs escogidos para el perfil de expresión, 7 fueron los que tuvieron una asociación más fuerte en comparación con el grupo control (tabla 9).

De estos, la subexpresión del miR-195 tuvo un OR de 24.74 ($p=0.008$), encontrándose subexpresado en el 92% de las pacientes con afección ganglionar en comparación con el 31% del grupo control. Se ha visto, que cuando el miR-195 se encuentra sobreexpresado, se relaciona con la inhibición de la migración, proliferación e invasión en el CaCU.⁶³ DU et al. encontró que el miR-195 regula el ciclo celular en la transición G1 a S, regulando a la baja la expresión de CCND2 inhibiendo la proliferación celular, así mismo, disminuye la expresión del factor de transcripción MYB, relacionado con la migración e invasión celular.⁶³ Li et al. demostró que el miRNA 195 está subexpresado en líneas celulares HeLa y SiHa de CaCU ($p<0.0001$); y que está implicado en las vía de señalización D1, sobreexpresándola y promoviendo la proliferación celular e invasión.⁶⁴ Así mismo, Zhou et al. encontraron que el miR-195 estaba asociado a afección ganglionar ($p=0.009$), etapa clínica ($p=0.011$), y a mayor afección al estroma cervical ($p=0.03$) en pacientes con CaCU; y que está asociada con la regulación de la proteína Smad3, relacionada con la migración y proliferación de células malignas en CaCU, así como en otras neoplasias como cáncer de esófago y cáncer de próstata.⁶⁵

La subexpresión del miR-487b está fuertemente asociado (OR 60.5, $p=0.002$) con afección ganglionar en este estudio. La subexpresión del miR-487b se ha relacionado con el CaCU en algunos estudios, sin embargo, no hay mucha literatura al respecto; aunque se ha visto más una relación con la progresión de tumores de tubo digestivo, neurológicos y

adenocarcinomas de próstata y pulmón.^{45,66-68} En el estudio de Hata y colaboradores, se describió el miRNA 487b como regulador negativo para la formación de metástasis regulando el gen KRAS en cáncer colorectal.⁶⁹

El miR-29b-2-star se encontró subexpresado en 58% de las pacientes con afección ganglionar en comparación con el 15% del grupo control (OR 7.7, $p=0.035$). Kinoshita et al. describieron que la familia de miRNAs 29, entre los que se encuentran el miR-29a, miR-29b y el miR-29c, estaban significativamente subexpresados en tumores con carcinoma, en comparación con tejidos sin tumor.⁷⁰ En un metanálisis realizado por Qi y colaboradores se describió que la subexpresión de la familia de los miRNAs 29 está asociada en la SG (HR 1.57 IC 95% 1.18-2.08) y el PLE (HR 1.51, IC 95% 0.99-2.30).⁷¹ Adicionalmente, se ha reportado que la familia miRNAs-29b está asociado a la inducción de la apoptosis por medio de las vías de señalización Mcl-1, Bcl-2, AKT-2 y p53; así como en la inhibición de la diseminación metastásica por las vías Mcl-1, MMP-2, SOCs-2 y GATA-3 entre otras.⁷² En cuanto a su relación con el CaCU, se ha visto que la subexpresión de miR-29b tiene una asociación directa con la expresión de las proteínas E6 y E7 en pacientes infectadas con VPH, modificando el ciclo celular por medio de las vías de CDK6 promoviendo la malignización de las células epiteliales.⁷³

En cuanto a los miRNAs sobre expresados, se encontró que el miR-483-5p presentó una sobreexpresión en un 75% el grupo de pacientes con afección ganglionar en comparación con el 23% del grupo control (OR 10, $p=0.014$). Nagamitsu et al. encontró que en pacientes con CaCU, el miRNA 483-5p tenía un sobreexpresión, junto con otros 3, en comparación con las pacientes que no tenían CaCU, con un FC > 3.0 ($p=0.01$).⁷⁴ Así mismo, Nishi encontró también que el miR-483-5p sérico estaba estadísticamente sobreexpresado en 40 pacientes con CaCU en comparación con 20 controles.⁷⁵

La sobreexpresión del miR-4534 se encontró fuertemente asociada a la afección ganglionar en pacientes con CaCU (OR 16.67, $p=0.006$). No se encontró literatura de este miRNA relacionado con CaCU, sin embargo, se encontró su relación con el cáncer de próstata. En el estudio de Nip et al. se encontró que el miRNA 4534 se encuentra sobreexpresado en un

grupo de pacientes con carcinoma de próstata, así mismo se describió que la expresión de este miRNA ejerce un efecto oncogénico en la regulación a la baja del gen supresor PTEN. PTEN es un gen supresor tumoral crítico relacionado con supervivencia, proliferación, migración celular y angiogénesis por medio de la vía PI3/Akt.⁷⁶

Por último, otro miRNA sobreexpresado asociado a afección ganglionar fue el miR-548ac, encontrándose sobreexpresado en 83% de las pacientes con afección ganglionar en comparación con el 15% del grupo control (OR 27.5, p=0.002).

Para la presencia de recurrencia, se encontró un perfil de miRNAs específico asociado a esta. Entre los miRNAs que encontramos asociados a recurrencia y que están descritos en la literatura, están el miR-331-3p, y el let-7e-star. En nuestro estudio se encontró que la sub expresión del miR-331-3p tiene un OR de 19.99 (p=0.018) de presentarse en pacientes con recurrencia en comparación con los controles. Fujii et al. describieron el papel de la supresión del miR-331-3p en un modelo in vitro para el desarrollo, proliferación y disminución de la apoptosis por medio de la vía de NRP2 y p21.⁷⁷ Así mismo, el papel del miR-331-3p se ha relacionado con la inhibición de la proliferación celular y expresión de la proteína E7, poniendo a este miRNA como un potencial blanco terapéutico.⁷⁸ En cuanto a la sobre expresión del miRNA let-7e-star, se encontró un OR de 32.99 (p=0.008) asociado a recurrencia. Este miRNA está descrito sobreexpresado en pacientes con CaCU en el estudio de Zhang.⁷⁹ Adicionalmente, este miRNA se ha descrito en otras neoplasias como en el adenocarcinoma de ovario y de sarcomas uterinos. Llama la atención la expresión del miRNA 3613-5p, el cual presentó un FC de 7.025 (p=0.00176), y que ninguna paciente del grupo control tuvo expresión del miRNA en comparación con el 43% del grupo de recurrencia. Así mismo, el miR-4482 se sobreexpresó en el 100% de la población con recurrencia, en comparación con el 15% de los que no tuvieron recurrencia. Adicionalmente encontramos los miRNAs miR-542-5p (OR 8.2, p=0.047) y el miR-136-star (OR 13.75, p=0.021) asociados a recurrencia. El miR-542-5p se ha descrito como un factor pronóstico negativo promoviendo la tumoregénesis en osteosarcoma;⁸⁰ y el miR-136-star en adenocarcinoma de mama y de sistema nervioso central.^{81,82}

El presente estudio cuenta con algunas deficiencias. Una de las principales debilidades de este estudio es el tamaño de muestra pequeño. Las causas de esto se debe a que son etapas tempranas, poco frecuentes en México y que la afección ganglionar se presenta en menos de un 15%. Adicionalmente, de las 255 pacientes en etapas tempranas, solo se pudieron escoger 22 expedientes que presentaban afección ganglionar y que estaban completos con la información requerida, de estos, únicamente 13 pacientes tuvieron un adecuado control de calidad para poder extraer el ARN. Otra debilidad es que se trata de un estudio retrolectivo. Adicionalmente, casi un 50% de las pacientes seleccionadas no tuvieron muestras parafinadas de buena calidad, por lo que no pudieron ser ingresadas en el análisis de microarreglos. Por último, aún esta pendiente la segunda validación por TR-PCR de cada uno de los miRNAs seleccionados, así como la búsqueda de blancos moleculares por medio de un análisis bioinformático.

Entre las fortalezas se encuentran que es el primer estudio en población mexicana que analiza perfiles de expresión de miRNAs asociados a afección ganglionar y a recurrencia en pacientes con CaCU en etapas tempranas, y que los grupos están pareados por todas las características clínicas y patológicas, siendo grupos muy similares para la realización de las comparación de los perfiles de expresión de los miRNAs. Adicionalmente, hay que tomar en cuenta que el perfil obtenido en las pacientes con afección ganglionar es muy diferente al de las pacientes que presentaron recurrencia, que sugiere que puede haber otros factores genéticos relacionados de forma muy particular con la recurrencia de estas pacientes.

XIV. CONCLUSIONES

En nuestra población, se encontró un perfil de miRNAs asociado a afección ganglionar en pacientes con CaCu en etapas tempranas tratadas con histerectomía radical y LPB. De este perfil los miRNAs sobreexpresados asociados fueron miR-92b-star, miR-483-5p, miR-4534 y miR-548ac; mientras que los miRNAs subexpresados fueron miR-487b, miR-29b-2-star y miR-195. Algunos de éstos están descritos en el desarrollo, proliferación y migración de células malignas en CaCU, así como en otras neoplasias malignas. Adicionalmente, se describió otro perfil de expresión de miRNAs asociados a recurrencias. Este es un estudio generador de hipótesis. Es indispensable la realización de estudios con un mayor número de individuos con la neoplasia, prospectivos y que evalúen estos perfiles como posibles biomarcadores relacionados a afección ganglionar oculta o recurrencia en pacientes con CaCU en etapas tempranas.

XV. REFERENCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M PD, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. *Lyon, Fr Int Agency Res Cancer*. 2013;11:<http://globocan.iarc.f>.
2. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol*. 2008;39:154–166. doi:10.1016/j.humpath.2007.11.002.
3. Koh W-J, Greer BE, Abu-Rustum NR, et al. Cervical cancer. In: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. Vol 11.; 2013:320–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486458>.
4. Lea JS, Lin KY. Cervical Cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2012;39:233–253. doi:10.1016/j.ogc.2012.02.008.
5. Delgado G, Bundy B, Zaino R, Sevin BU, Creasman WT, Major F. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: A gynecologic oncology group study. In: *Gynecologic Oncology*. Vol 38.; 1990:352–357. doi:10.1016/0090-8258(90)90072-S.
6. Suprasert P, Charoenkwan K, Khunamornpong S. Pelvic node removal and disease-free survival in cervical cancer patients treated with radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *Int J Gynaecol Obstet*. 2012;116:43–6. doi:10.1016/j.ijgo.2011.08.001.
7. Togami S, Kamio M, Yanazume S, Yoshinaga M, Douchi T. Can Pelvic Lymphadenectomy be omitted in Stage IA2 to IIB Uterine Cervical Cancer? *Int J Gynecol Cancer*. 2014;24:1072–1076.
8. Tanaka Y, Sawada S, Murata T. Relationship between lymph node metastases and prognosis in patients irradiated postoperatively for carcinoma of the uterine cervix.

Acta Radiol Oncol. 1984;23:455–459. doi:10.3109/02841868409136048.

9. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116:281–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
10. Pedroza-Torres A, López-Urrutia E, García-Castillo V, et al. MicroRNAs in Cervical Cancer: Evidences for a miRNA Profile Deregulated by HPV and Its Impact on Radio-Resistance. *Molecules.* 2014;19:6263–81. doi:10.3390/molecules19056263.
11. Lee J-W, Choi CH, Choi J-J, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2008;14:2535–2542. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1231.
12. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:857–866. doi:10.1038/nrc1997.
13. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* 2008;14:1271–1277. doi:10.1038/nm.1880.
14. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, 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;99:15524–15529. doi:10.1073/pnas.242606799.
15. Yao Q, Xu H, Zhang QQ, Zhou H, Qu LH. MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388:539–542. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.044.
16. Long M-J, Wu F-X, Li P, Liu M, Li X, Tang H. MicroRNA-10a targets CHL1 and promotes cell growth, migration and invasion in human cervical cancer cells. *Cancer Lett.* 2012;324:186–196. doi:10.1016/j.canlet.2012.05.022.
17. Xu XM, Wang XB, Chen MM, et al. MicroRNA-19a and -19b regulate cervical carcinoma cell proliferation and invasion by targeting CUL5. *Cancer Lett.* 2012;322:148–158. doi:10.1016/j.canlet.2012.02.038.
18. Zhao S, Yao D-S, Chen J-Y, Ding N. Aberrant expression of miR-20a and miR-203

in cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:2289–93. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23725129>.

19. Chen J, Yao D, Li Y, et al. Serum microRNA expression levels can predict lymph node metastasis in patients with early-stage cervical squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*. 2013;32:557–67. doi:10.3892/ijmm.2013.1424.
20. Shen S, Wang L, Jia Y, Hao Y, Zhang L, Wang H. Upregulation of microRNA-224 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer. *Diagn Pathol*. 2013;8:69. doi:10.1186/1746-1596-8-69.
21. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis. *Lancet*. 2011;378:1461–1484. doi:10.1016/S0140-6736(11)61351-2.
22. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013;382:889–99. doi:10.1016/S0140-6736(13)60022-7.
23. Syrjanen K, Shabalova I, Sarian L, et al. Covariates of high-risk human papillomavirus (HPV) infections are distinct for incident CIN1, CIN2 and CIN3 as disclosed by competing-risks regression models. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2012;33:5–14. Available at:
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L365515192>.
24. Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Osler M, Iftner T. Persistence of high-risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women. *J Med Virol*. 2010;82:616–623. doi:10.1002/jmv.
25. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*. 2001;285:2995–3002. doi:10.1001/jama.285.23.2995.
26. Hwang LY, Ma Y, Benningfield SM, et al. Factors That Influence the Rate of Epithelial Maturation in the Cervix in Healthy Young Women. *J Adolesc Heal*. 2009;44:103–110. doi:10.1016/j.jadohealth.2008.10.006.

-
27. Safaeian M, Quint K, Schiffman M, et al. Chlamydia trachomatis and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:1794–1804. doi:10.1093/jnci/djq436.
 28. Steenbergen RDM, De Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol.* 2005;32. doi:10.1016/j.jcv.2004.11.019.
 29. Bader AA, Winter R, Haas J, Tamussino KF. Where to look for the sentinel lymph node in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197. doi:10.1016/j.ajog.2007.09.053.
 30. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009;384:260–265. doi:10.1016/j.virol.2008.11.046.
 31. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984;3:1151–1157.
 32. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:3812–3815. doi:10.1073/pnas.80.12.3812.
 33. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H zur, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401:70–79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002.
 34. Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther.* 2011;11:295–306. doi:10.4161/cbt.11.3.14686.
 35. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int.* 2013;2013:519619. doi:10.1155/2013/519619.
 36. Rob L, Robova H, Chmel R, Komar M, Halaska M, Skapa P. Surgical options in early cervical cancer. *Int J Hyperth.* 2012;28:489–500.

doi:10.3109/02656736.2012.675116.

37. Raspagliesi F, Ditto A, Solima E, et al. Microinvasive squamous cell cervical carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;48:251–261. doi:10.1016/S1040-8428(03)00130-6.
38. Landoni F, Manco A, Colombo A, et al. *Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer.*; 1997. doi:10.1016/S0140-6736(97)02250-2.
39. Brewster WR, Monk BJ, Zigos A, Anton-Culver H, Yamada SD, Berman ML. Intent-to-treat analysis of stage Ib and IIa cervical cancer in the United States: Radiotherapy or surgery 1988-1995. *Obstet Gynecol*. 2001;97:248–254. doi:10.1016/S0029-7844(00)01117-0.
40. Bansal N, Herzog TJ, Shaw RE, Burke WM, Deutsch I, Wright JD. Primary therapy for early-stage cervical cancer: radical hysterectomy vs radiation. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201. doi:10.1016/j.ajog.2009.06.015.
41. Sedlis A, Bundy B, Rotman M, Lentz S. \dots Therapy in Selected Patients with Stage IB Carcinoma of the Cervix after Radical Hysterectomy and \dots. *Gynecol Oncol*. 1999. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825899953878>.
42. Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, et al. *Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix.*; 2000. doi:10.1097/00006254-200008000-00017.
43. Benedetti Panici P, Basile S, Angioli R. Pelvic and aortic lymphadenectomy in cervical cancer: The standardization of surgical procedure and its clinical impact. *Gynecol Oncol*. 2009;113:284–290. doi:10.1016/j.ygyno.2008.12.014.
44. Egner JR. AJCC Cancer Staging Manual. *JAMA J Am Med Assoc*. 2010;304:1726. doi:10.1001/jama.2010.1525.
45. Banno K, Iida M, Yanokura M, et al. MicroRNA in cervical cancer: OncomiRs and

-
- tumor suppressor miRs in diagnosis and treatment. *Sci World J.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/178075.
46. Hwang H-W, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2006;94:776–780. doi:10.1038/sj.bjc.6603023.
 47. Gilabert-Estelles J, Braza-Boils A, A. Ramon L, et al. Role of microRNAs in Gynecological Pathology. *Curr Med Chem.* 2012;19:2406–2413. doi:10.2174/092986712800269362.
 48. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010;466:835–840. doi:10.1038/nature09267.
 49. Wu M, Liu L, Chan C. Identification of novel targets for breast cancer by exploring gene switches on a genome scale. *BMC Genomics.* 2011;12:547. doi:10.1186/1471-2164-12-547.
 50. De Planell-Saguer M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review. *Anal Chim Acta.* 2011;699:134–152. doi:10.1016/j.aca.2011.05.025.
 51. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods.* 2010;50:244–249. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.026.
 52. Liu C-G, Calin GA, Volinia S, Croce CM. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc.* 2008;3:563–578. doi:10.1038/nprot.2008.14.
 53. Sempere LF, Preis M, Yezefski T, et al. Fluorescence-based codetection with protein markers reveals distinct cellular compartments for altered MicroRNA expression in solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2010;16:4246–4255. doi:10.1158/1538-7445.AM10-LB-360.
 54. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13:358–369. doi:10.1038/nrg3198.
 55. Berindan-Neagoe I, Monroing P del C, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome Genome: A treasure for Cancer Diagnosis and Therapy. *Ca Cancer J Clin.*

2014;00(00):00.

56. Liu X, Zhang Z, Sun L, et al. MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4. *Carcinogenesis*. 2011;32:1798–1805. doi:10.1093/carcin/bgr213.
57. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:293–302. doi:10.1038/nrc2619.
58. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2999–3004. doi:10.1073/pnas.0307323101.
59. Yao T, Lin Z. MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2012;1822:248–260. doi:10.1016/j.bbadis.2011.09.018.
60. Liu S, Zhang P, Chen Z, Liu M, Li X, Tang H. MicroRNA-7 downregulates XIAP expression to suppress cell growth and promote apoptosis in cervical cancer cells. *FEBS Lett*. 2013;587:2247–2253. doi:10.1016/j.febslet.2013.05.054.
61. Sharma G, Agarwal SM. Identification of Critical MicroRNA Gene Targets in Cervical Cancer Using Network Properties. *MicroRNA*. 2014;3:37–44.
62. Hu X, Schwarz JK, Lewis JS, et al. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res*. 2010;70:1441–1448. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3289.
63. DU X, Lin LI, Zhang L, Jiang J. microRNA-195 inhibits the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells via the inhibition of CCND2 and MYB expression. *Oncol Lett*. 2015;10(4):2639–2643. doi:10.3892/ol.2015.3541.
64. Li Z, Wang H, Wang Z, Cai H. MiR-195 inhibits the proliferation of human cervical cancer cells by directly targeting cyclin D1. *Tumor Biol*. 2015. doi:10.1007/s13277-015-4540-6.
65. Zhao W, Zou J, Wang B, et al. microRNA-140 suppresses the migration and

-
- invasion of colorectal cancer cells through targeting Smad3. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2014;36(10):739–745.
66. Feng N, Wang Z, Zhang Z, He X, Wang C, Zhang L. MiR-487b promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation, migration, invasion and tube formation through regulating THBS1. *Neurosci Lett*. 2015;591:1–7. doi:10.1016/j.neulet.2015.02.002.
 67. Formosa a, Markert EK, Lena a M, et al. MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene*. 2014;33(44):5173–82. doi:10.1038/onc.2013.451.
 68. Gattolliat C-H, Thomas L, Ciafrè SA, et al. Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma. *Br J Cancer*. 2011;105(9):1352–61. doi:10.1038/bjc.2011.388.
 69. HATA T, MOKUTANI Y, TAKAHASHI Hideka, et al. Identification of microRNA-487b as a negative regulator of liver metastasis by regulation of KRAS in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2017;50:487–496.
 70. Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T, et al. Tumour-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2013;109(10):2636–45. doi:10.1038/bjc.2013.607.
 71. Qi Y, Huang Y, Pang L, et al. Prognostic value of the MicroRNA-29 family in multiple human cancers: A meta-analysis and systematic review. doi:10.1111/1440-1681.12726.
 72. Yan B, Guo Q, Fu F, et al. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *Onco Targets Ther*. 2015;8:539–548.
 73. Li Y, Wang F, Xu J, et al. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J Pathol*. 2011;224(4):484–495. doi:10.1002/path.2873.
-

-
74. YUZO NAGAMITSU, HIROTAKA NISHI, SASAKI T, TAKAESU Y, TERAUCHI F, ISAKA K. Profiling analysis of circulating microRNA expression in cervical cancer. *Mol Clin Oncol*. 2016;5(1):189–194.
 75. Nishi H, YUZO NAGAMITSU, Sasaki T, Takaes Y, Terauchi F, Isaka K. Exosomal-miRNA profiles as diagnostic biomarkers in cervical cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30.
 76. Nip H, Dar AA, Saini S, et al. Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016.
 77. Fujii T, Shimada K, Asano A, et al. MicroRNA-331-3p Suppresses Cervical Cancer Cell Proliferation and E6/E7 Expression by Targeting NRP2. *Int J Mol Sci*. 2016;17:1351–1364.
 78. Fujii T, Tatsumi Y, Konishi N. microRNA-331-3p inhibits cell proliferation and E7 expression by targeting NRP2 in cervical cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(supplement 6).
 79. Zhang Y, Dai Y, Huang Y, et al. Microarray profile of micro-ribonucleic acid in tumor tissue from cervical squamous cell carcinoma without human papillomavirus. *J Obstet Gynaecol Res*. 2009;35(5):842–849. doi:10.1111/j.1447-0756.2009.01055.x.
 80. Cheng D-D, Yu T, Hu T, Yao M, Fan C-Y, Yang Q-C. MiR-542-5p is a negative prognostic factor and promotes osteosarcoma tumorigenesis by targeting HUWE1. *Oncotarget*. 2015;6(40):42761–42772. doi:10.18632/oncotarget.6199.
 81. Yang Y, Wu J, Guan H, et al. MiR-136 promotes apoptosis of glioma cells by targeting AEG-1 and Bcl-2. *FEBS Lett*. 2012;586(20):3608–3612. doi:10.1016/j.febslet.2012.08.003.
 82. Yan M, Li X, Tong D, et al. miR-136 suppresses tumor invasion and metastasis by targeting RASAL2 in triple-negative breast cancer. *Oncol Rep*. 2016;36(1):65–71. doi:10.3892/or.2016.4767.
