

BM-4

ESTANDARIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES MICA/MICB EN CÉLULAS DEL CERVIX: INFECTADAS POR VPH DE ALTO RIESGO

García López Eduardo Stanlin, Mata Rocha Minerva, Bravata Alcántara Juan Carlos, Mendoza Rincón Jorge Flavio. Carpermor, S.A. Alfonso Herrera No. 75, Col. San Rafael, C.P. 06470, México, D. F. E-mail: eduardo.garcia@carpermor.com.mx

Palabras clave: MICA/MICB, VPH, cáncer cervicouterino, estrés fisiológico, epitelio.

Introducción: Los genes MICA/MICB se localizan en el cromosoma 6 en el locus p21.3 y se expresan principalmente en tejidos de origen epitelial. Reportes recientes indican que el estrés fisiológico provocados por el cáncer en tejidos epiteliales regulan la expresión de las proteínas *mica/micb* en la superficie celular a través de proteínas de choque térmico.¹ El Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo es el causante del cáncer cervicouterino, y ocupa la segunda mayor incidencia en mujeres de nuestro país.² Es posible que exista una regulación en la expresión de los genes MICA/MICB entre las distintas neoplasias intraepiteliales cervicales (NICI, NICII y NICIII) y cáncer por la presencia de VPH de alto riesgo.

Objetivo: Establecer las condiciones óptimas para cuantificar la expresión de los genes MICA/MICB en tejidos endocervicales.

Metodología: Muestras: Se utilizaron muestras de raspado endocervical: 10 con VPH(-) para determinar las condiciones de extracción de ARN y de RT-PCR, y 5 con VPH(+) de pacientes con NICI, de los cuales de 3 se conocía su genotipo. *Extracción de ADN/ARN:* Se realizaron las extracciones de ADN con el uso del kit QIAamp®UltraSens™ y de ARN total por el método de triZol en muestras de raspados endocervicales. Clonación de MICA/MICB y ARNr en plásmidos: Para realizar la curva de calibración se clonaron los fragmentos amplificados de MICA/MICB y ARNr en el plásmido pCR® 4-Topo de Invitrogen. *RT-PCR tiempo real:* Se amplificó 440 pb del gen MIC A, y 320 pb del gen MICB usando los primers y sondas TaqMan de Schrambach S y colaboradores.³ El amplicón de 240 pb del ARNr 18S fue mediante primers y sonda determinados en el laboratorio. Los niveles de expresión de MICA y MICB fueron balanceados usando el gen constitutivo: ARNr 18S.

Resultados: Se obtuvieron las condiciones óptimas para la extracción de ARN y la RT-PCR como se observa en la curva de calibración que se realizó a partir de diluciones 1:10 de los plásmidos de cada uno de los genes mencionados con una $r^2=0.99$ y $m=-3.39$ (Figura 1). Se determinó la cuantificación relativa de los genes MICA y MICB en las 8 muestras endocervicales. Cinco de las muestras VPH(+), se observó una expresión mayor de MICB con respecto a MICA de aproximadamente 2 veces, mientras que en las 2 muestras VPH(-) se observó una expresión similar en ambos genes (Cuadro I).

Discusión: Los plásmidos obtenidos para los genes MICA, MICB y ARNr 18S son útiles para realizar una curva de calibración que permitan asignar valores reales, y por lo tanto, una cuantificación absoluta (Figura 1). En el presente trabajo se realizaron cuantificaciones relativas en muestras endocervicales con NICI y fue factible determinar que la expresión de MICB se expresa aproximadamente el doble con respecto a MICA en

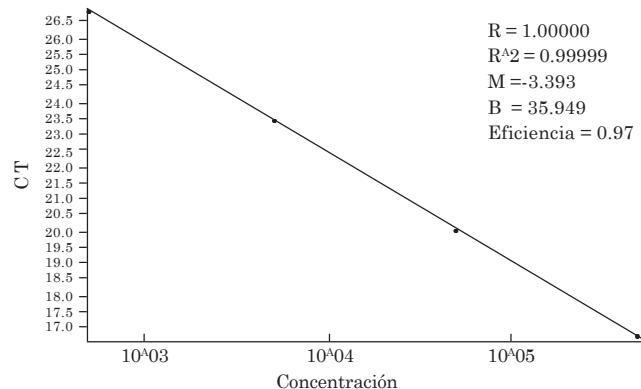


Figura 1. Curva de calibración de MICA.

Cuadro I. Cuantificación relativa de la expresión de MICA y MICB

Edad	VPH	Genotipo	Expresión del gen		MICB/MICA
			16	18	
29	+	+		1.3	1.83
27	+	+		0.39	0.79
29	+	+		1.06	1.49
36	+			0.55	0.95
34	+			0.38	0.67
24	-			0.86	1.16
30	-			0.57	0.65

condiciones de estrés fisiológico por la presencia de VPH, mientras que en las muestras ausentes de VPH la expresión de ambos genes fueron semejantes (Cuadro I). Esto sugiere que la presencia de VPH en un NICI es un factor que sobreexpresa MIC B. Con la finalidad de determinar si esto es real, se procesarán un número mayor de muestras endocervicales para cuantificación absoluta de ambos genes.

Conclusión: Se determinaron las condiciones óptimas para realizar una cuantificación de los genes MICA y MICB en tejidos endocervicales, a través de la calibración mediante plásmidos y nivelación por el ARNr 18S.

REFERENCIAS

1. Stephens HA. MICA and MICB genes: can enigma of their polymorphism be resolved?. *Trends Immunol.* 2001; 15: 23-41.
2. Lascano-Ponce E, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican woman with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 2001; 91: 412-20.
3. Schrambach S, et al. In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *Plos One.* 2007; 6: 1-10.