EVALUACIÓN DE PEQUEÑOS ARN CIRCULANTES COMO POTENCIALES BIOMARCADORES EN CÁNCER DE PULMÓN

Rodriguez Sande V [1, 2, 3], Bianchi S [2, 4, 5], Amarillo D [1, 3], Cuello M [3], Cayota A [1, 2, 4]

[1] Departamento Básico de Medicina, [2] Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, [3] Servicio de Oncología Clínica,
[4] Laboratorio de Genómica Funcional del Instituto Pasteur de Montevideo [5] Departamento de Fisiopatología

HOSPITAL DE CLINICAS Dr. Manuel Quintela

SEMANA ACADÉMICA 2021

INTRODUCCIÓN

El cáncer broncopulmonar ocupa el primer lugar en mortalidad por cáncer, debido en parte al diagnóstico tardío, su agresividad inherente y la falta de marcadores específicos predictores de la respuesta a tratamientos disponibles. Esto apoya la búsqueda de estrategias accesibles y poco invasivas para su detección precoz.

Los pequeños ARN no codificantes (ARNpnc) son reguladores de la expresión génica involucrados en múltiples procesos biológicos, cuya expresión aberrante puede tener un rol central en la carcinogénesis. Estos pueden ser secretados al medio extracelular, circulando de forma estable en sangre y otros fluidos, donde son captados por células adyacentes o a distancia con funciones conservadas. Recientemente, se describieron nuevas clases de ARNpnc como los fragmentos derivados de ARN de transferencia (ARNth) y los YARN. Su secreción al medio extracelular se ha vinculado a distintas respuestas regulatorias frente al estrés celular.

El objetivo de este estudio fue caracterizar ARNpnc circulantes, derivados de ARNt-Gly, ARNt-Glu e YARN-4, como potenciales biomarcadores circulantes en el diagnóstico de cáncer de pulmón. Así como evaluar una posible relación de estos con determinadas características de la enfermedad, como el estadio y el subtipo histopatológico.

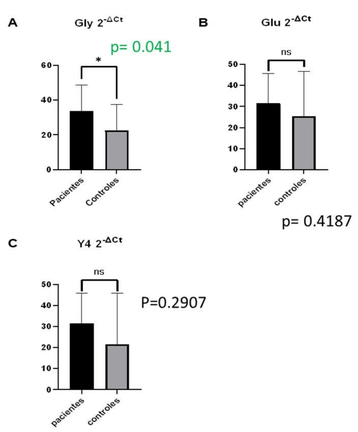
MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron 40 pacientes con diagnóstico anatomopatológico de cáncer broncopulmonar atendidos en el Hospital de Clínicas, en forma previa a cualquier tipo de tratamiento oncológico. Asimismo, se reclutaron 20 controles clínicamente sanos, pareados según sexo, edad y perfil tabáquico. En todos los casos se firmó consentimiento informado de acuerdo con la normativa vigente y aprobado por el comité de ética del Hospital de Clínicas.

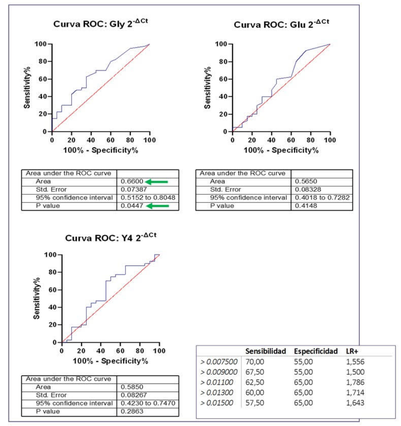
Se realizó extracción de ARN a partir de muestras de suero de pacientes y controles, utilizando un kit específico para pequeños ARN. Se midió la concentración obtenida para posteriormente utilizar una concentración normalizada a 1 ng de ARN para todas las muestras en los siguientes procedimientos. Los niveles de expresión relativa de cada marcador fue cuantificada mediante RT-qPCR de tipo convencional paralas ARNt de Gly y Glu y una stem-loop RT-qPCR para YARN-4. Como control positivo normalizador de la qPCR se utilizó un oligonucleótido sintético de tamaño similar llamado spike-in que fue agregado a cada muestra durante la extracción del ARN. Para cuantificar la expresión de cada especie se utilizó el método de cuantificación relativa por estudio de Ct modificado utilizando la fórmula $2^{-\Delta Ct.}$ Se compararon los niveles de expresión mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney (para dos colas) para muestras no pareadas. Se consideraron estadísticamente significativos resultados con valores de $p < 0.05$. El valor como biomarcadores en suero fue analizado mediante la construcción de curvas ROC. Se calculó el área debajo de la curva (AUC) y su intervalo de confianza al 95% para evaluar la capacidad discriminante global del test

RESULTADOS

Se observó una expresión tres veces mayor de ARNth-Gly circulante en pacientes con cáncer broncopulmonar en comparación con controles. Solo este fragmento se comportó como un potencial biomarcador circulante diagnóstico con significancia estadística. Este fue un mejor biomarcador en estadios avanzados de la enfermedad, lo que no pudo demostrarse para estadios precoces.

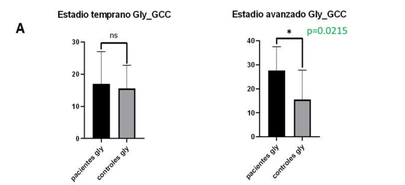


Comparación de los niveles de expresión de Gly_GCC, YARN-4 y Glu_TTC entre pacientes con cáncer de pulmón y controles clínicamente sanos mediante test de Mann-Whitney para dos colas. Los datos se expresaron como medianas con sus rangos intercuartílicos.



Análisis mediante la construcción de curvas ROC de Gly_GCC, Glu_TTC y YARN-4 como biomarcadores circulantes en suero en pacientes con cáncer de pulmón. Para cada uno se muestra el área debajo de la curva y valor p.

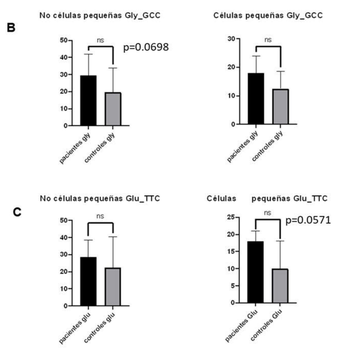
Se observó una fuerte tendencia al aumento de los ARNth-Gly en cáncer de pulmón no células pequeñas y de los ARNth-Glu en tumores de células pequeñas. Este es el primer estudio en analizar el rol de los fragmentos de ARNt-Gly, ARNt-Glu y YARN-4 como biomarcadores circulantes en el diagnóstico de cáncer broncopulmonar.



Área debajo de la curva ROC para Estadios avanzados	Gly	Y4	Glu
Area	0.7021	0.6229	0.5963
Std. Error	0.08011	0.08925	0.09057
95% confidence interval	0.5451 to 8591	0.4480 to 0.7978	0.4187 to 0.7738
P value	0.0222 *	0.1643	0.2977
Pacientes	24	24	24
Controles	20	20	20

A. Comparación de los niveles de expresión de Gly y Glu entre pacientes con cáncer de pulmón y controles según estadio de la enfermedad mediante test de Mann-Whitney para dos colas. Los datos se expresaron como medianas con sus rangos intercuartílicos.

Análisis del área debajo de la curva ROC para los biomarcadores Gly_GCC, YARN-4 y Gly_TTC según la etapa de la enfermedad.



B y C. Comparación de los niveles de expresión de Gly y Glu entre pacientes con cáncer de pulmón y controles según subtipo histologico mediante test de Mann-Whitney para dos colas. Los datos se expresaron como medianas con sus rangos intercuartílicos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El área de los pequeños ARN circulantes como biomarcadores requiere mayor desarrollo, con pocos trabajos publicados hasta la fecha, por lo que estas primeras aproximaciones pueden ayudar a comprender mejor su rol como moléculas circulantes y sentar las bases para estudios a mayor escala, venciendo las dificultades encontradas hasta el momento.

Este es el primer estudio en analizar el rol de los ARNth-Gly, ARNth-Glu y YARN-4 como biomarcadores circulantes en el diagnóstico de cáncer broncopulmonar.

De nuestro análisis surge que sólo el fragmento Gly-GCC se comportó como un potencial biomarcador de cáncer de pulmón con significación estadística. A su vez, existe una tendencia de Gly-GCC y de Glu-TTC a asociarse a los tipos histológicos de células no pequeñas y de células pequeñas respectivamente.

La capacidad diagnóstica debería ser analizada en cohortes de un mayor tamaño poblacional y con una mejor definición del grupo control exigiendo una imagenología negativa ya que se trata de individuos con factores de riego elevados para cáncer de pulmón asintomático. Asimismo, consideramos importante reclutar mayor número de pacientes con enfermedad en estadio localizado para poder definir fehacientemente su rol en estadios precoces.

Con estos datos consideramos importante realizar un secuenciado masivo de pequeños ARNnc en suero de muestras seleccionadas con el fin de identificar no sólo diferentes tamaños de estos biomarcadores, lo que permitiría diseñar RT-qPCR más específicas, sino también poder identificar nuevos pequeños ARN candidatos que no fueron analizados en este estudio. Analizar la evolución de los niveles de estos biomarcadores antes y después de realizado algún tipo de tratamiento oncológico para conocer cómo se modifican los niveles de expresión de estos. Estudiar en una siguiente etapa la correlación entre los niveles de expresión y la evolución clínica de los pacientes con el fin de analizar su rol pronóstico.

Consideramos que estos aspectos deberían analizarse en un nuevo estudio antes de validar estas biomoléculas como biomarcadores diagnósticos en cáncer broncopulmonar. Otro aspecto interesante podría ser el estudio de sARNnc como factores predictivos de respuesta a los diferentes tratamientos con especial énfasis en inmunoterapia dada su comunicación demostrada con el sistema inmune.

Agradecimientos:

Dra. Mariela Garau del Depto. de metodología científica, ANII, colegas del Laboratorio de Genómica Funcional del IPMON, colegas de la unidad de oncotórax del Hospital de Clínicas Dra. Clara Rodriguez y Dr. Siul Salisbury.

Información de Contacto: v.rodriguezsande@gmail.com