



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**Universidad Autónoma del Estado de Morelos**

**Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas**

**Centro de Investigación en Dinámica Celular**

**Análisis funcional de la regulación del gen BRMS1L por miR-21 a través de elementos de respuesta para micro-RNAs en células tumorales humanas transformadas con VPHs.**

**T e s i s**

**para obtener el título de:**

**Licenciado en Ciencias (área terminal en Bioquímica y Biología Molecular)**

**Presenta:**

**Déborah Talina Popoca Moreno.**

**Director de Tesis**

**Dr. Óscar Peralta Zaragoza.**

**Cuernavaca, Mor.,**

**Agosto, 2019.**

## **Agradecimientos**

Esta tesis de Licenciatura se realizó en la Dirección de infecciones Crónicas y Cáncer del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP); bajo la Dirección del Dr. Oscar Peralta Zaragoza. La tesis está anidada al proyecto de investigación: “Análisis de la regulación génica del MicroRNA MIR21 en células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV”; el cual tienen un financiamiento por parte de la agencia financiadora del fondo sectorial de investigación para la educación, Investigación en ciencia básica SEP-CONACYT convocatoria 2011, con clave del proyecto: CB-2011-01-169209. Además, este proyecto está registrado en el SIID del INSP con clave de proyecto: CISEI-1209. El Dr. Oscar Peralta Zaragoza es el responsable técnico del proyecto de investigación y es el director de tesis.

## **Dedicatorias**

Gracias a mis padres por su gran apoyo a lo largo de mi vida y de mis estudios, por su cariño, paciencia y por ser el pilar de mí vida. A mis abuelos por apoyarme incondicionalmente en todo este tiempo. ¡Todo este trabajo es gracias a ustedes!

A mí hermano por ser una parte esencial en mí vida. A mí tía Vero por sus consejos, recomendaciones y apoyo para continuar con mis estudios.

¡Gracias a toda mi familia por siempre estar presentes!

Gracias Mariana y Marco por sus consejos, por ayudarme sin pedir nada a cambio y sin dudar de mi capacidad. Gracias Isaac por siempre motivarme, por extender tu mano en los momentos más difíciles y siempre estar ahí. ¡Los quiero!

Agradezco al Dr. Óscar Peralta por haber depositado su confianza en mí para la realización de este proyecto, su tiempo y asesoría. Gracias al Instituto Nacional de Salud Pública por el espacio brindado para realizar esta investigación. Muchas gracias a la UAEM por haberme forjado durante mi educación profesional y por todos los aprendizajes que obtuve durante todo este tiempo.

## Contenido

Agradecimientos .....	1
Dedicatorias .....	2
Contenido.....	3
Abreviaturas.....	4
Resumen.....	6
1. Introducción .....	8
1.1 Epidemiología del cáncer cervical .....	8
1.2 Biogénesis de los microRNAs. ....	9
1.3 microRNA-21 (miR-21). ....	10
1.4 Función biológica de BRMS1L (Breast Cancer Metastasis-Suppressor 1 Like) .....	14
2. Justificación .....	15
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos .....	16
4.1 Objetivo General .....	16
4.2 Objetivos particulares. ....	16
5. Metodología.....	17
5.1 Análisis bioinformático de los MREs. ....	17
5.2 Generación de construcciones de plásmidos reporteros.....	18
5.3 Análisis de la actividad de Luciferasa. ....	19
5.4 Análisis estadístico .....	20
5.5 Cultivo celular.....	20
6. Resultados.....	22
6.1 Obtención de las construcciones y diseño de los oligos que contienen las secuencias MREs del gen BRMS1L reguladas por miR-21. ....	22
6.2 Ensayos de transfección para comprobar la regulación del gen BRMS1L a través de las secuencias específicas de reconocimiento MRE por miR-21. ....	32
7. Discusión .....	40
8. Conclusiones.....	44
9. Bibliografía .....	45
Apéndice A .....	48

## **Abreviaturas**

BRMS1L: Breast Cancer Metastasis Suppressor 1-Like.

CMV: Citomegalovirus.

C33A: Células tumorales cervicales humanas no transformadas con VPH (VPH-).

DMEM: Dulbecco's Modified.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

E6: Unidad transcripcional temprana 6 del VPH.

E7: Unidad transcripcional temprana 6 del VPH.

HaCaT: Queratinocitos primarios humanos.

HeLa: Células tumorales cervicales humanas transformadas con VPH18+.

microRNA: RNA pequeño de cadena sencilla no codificante.

miRNA: RNA pequeño de cadena sencilla no codificante.

miR-21: microRNA codificada por el gen MIR21.

MRE: Elemento de Reconocimiento de microRNA.

mRNA: RNA mensajero.

psimiR-21: Plásmido de silenciamiento del microRNA miR-21.

pRb: Proteína de retinoblastoma.

p53: Proteína supresora de tumores del gen P53 localizado en el cromosoma 17.

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa. Supresor tumoral.

PMRL: PMIR-Report-Luciferase. Plásmido reportero que contiene el gen de luciferasa.

SBF: Suero Bovino Fetal.

SiHa: Células tumorales cervicales humanas transformadas con VPH16+.

Sin3A: Proteína con hélices emparejadas anfipáticas.

TIMP3: Inhibidor de las metaloproteasas 3.

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

UTR: Región no traducida.

VPH: Virus del Papiloma Humano.

## Resumen

**Introducción.** El cáncer cervical ocurre debido a una proliferación celular anormal en el cuello uterino llegando a causar una invasión a diferentes tejidos y órganos del cuerpo. Este tipo de cáncer es causado por el Virus del Papiloma Humano (VPH), el cual forma complejos mediante sus oncoproteínas virales (E6 y E7) causando la inhibición de las funciones de los supresores tumorales, p53 y pRb. El cáncer es una consecuencia de una inestabilidad genómica, en la cual, se ven involucrados diferentes tipos de factores, entre ellos, la expresión de microRNAs (miRNAs). Los miRNAs tienen una expresión alterada en cáncer y regulan la expresión de genes blanco a través de sitios específicos de reconocimiento localizados en el extremo 3'-UTR, denominado como MREs (elementos de Reconocimiento de MicroRNAs). Se sabe que miR-21 se encuentra sobre expresado en células de cáncer cervical, mientras que, BRMS1L (Breast Cancer Metastasis-Suppressor 1 Like), un gen blanco de miR-21, está reprimido en células cervicales tumorales. Por lo tanto, en esta tesis se propone estudiar el mecanismo de regulación de BRMS1L por miR-21 en células de cáncer cervical.

**Objetivo general.** Analizar el mecanismo molecular de regulación de BRMS1L por miR-21 en células cervicales tumorales humanas transformadas por VPH.

**Metodología.** Se generaron construcciones de plásmidos reporteros que contienen las secuencias MREs del gen BRMS1L. Se transfectaron las células SiHa (VPH16), HeLa (VPH18), C33A (VPH-) y HaCaT (queratinocitos normales) con los plásmidos reporteros y se co-transfectaron con el plásmido PSIMIR-21 que induce represión de miR-21. Se evaluó de manera estadística, la expresión del gen reportero de luciferasa por luminiscencia como indicador de la actividad de las secuencias MREs de BRMS1L reguladas por miR-21.

**Resultados.** Los resultados obtenidos, indican que existe la regulación molecular del microRNA con su gen blanco mediante las secuencias MREs predichas siendo esto mediado y observado en las líneas celulares humanas transformadas con VPH.

**Conclusiones.** Dados los resultados reportados, se demuestran las secuencias funcionales MREs del gen BRMS1L las cuales son reconocidas por miR-21 y, por este medio, se logra la regulación molecular entre microRNA y gen blanco. En células cervicales humanas transformadas con VPH, se pudo observar que las secuencias MRE2 y MRE3 son un mejor sitio de reconocimiento para miR-21.

## **1. Introducción**

El cáncer es una patología de particular interés debido a su alta incidencia y mortalidad en todo el mundo<sup>1</sup>. Los esfuerzos por erradicar y crear terapias más específicas han ido aumentando conforme van pasando los años, sin embargo, aún se necesitan más investigaciones y desarrollo científico para lograrlo.

En México, el cáncer cervical ha sido un problema de salud pública debido a las altas tasas de incidencia y mortalidad reportadas en mujeres. Los estudios recientes, se han enfocado en el silenciamiento de mRNA (RNAs mensajeros) con el uso de microRNAs, como posible terapia génica ante este tipo de enfermedad. Esto se debe a la alta presencia que han demostrado los miRNAs en diversos tipos de cáncer y su estudio se debe a la desregulación génica que presentan ante genes blanco específicos<sup>2</sup>. Un miRNA de particular interés es miR-21, se ha demostrado que este microRNA regula la expresión de genes que participan en diversos procesos celulares como proliferación celular, metástasis y angiogénesis<sup>3</sup>. En 2008, el grupo de Gabriely G. y colaboradores, mostraron un análisis de microarreglos que sugería que BRMS1L (Breast Cancer 1 Like) era un blanco directo de miR21<sup>4</sup>. Interesantemente se ha reportado que miR-21 se encuentra sobreexpresado en células de cáncer cervical<sup>6</sup>, mientras que BRMS1L se ha observado que se encuentra reprimida su expresión<sup>6</sup>, y esta desregulación se asocia a una posible metástasis en el cáncer cervical<sup>3</sup>.

Por lo tanto, la pregunta de investigación de este proyecto de tesis es: ¿Cuál es el mecanismo molecular de regulación de BRMS1L por miR-21 en células cervicales tumorales humanas transformadas por VPH?

### **1.1 Epidemiología del cáncer cervical.**

El cáncer cervical ocurre debido a una proliferación celular anormal en el cuello uterino llegando a causar una invasión a diferentes tejidos y órganos del cuerpo<sup>7</sup>. Ocupa el cuarto lugar entre los tipos de cáncer más comunes en mujeres, presentando 311, 365 muertes y 564 847 nuevos casos aproximadamente,

reportados hasta el 2018 según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y hay mayor incidencia en las regiones en desarrollo, siendo México parte de esta zona<sup>1</sup>. Existen muchos factores que pueden conllevar al cáncer cervical, entre los que se pueden mencionar las infecciones de transmisión sexual, tabaquismo, disminución de la respuesta inmune, y factores de nutrición<sup>7</sup>. Sin embargo, su detección es de las menos complejas debido a que su desarrollo es gradual al igual que visible, y esto ayuda siempre y cuando se realicen exámenes periódicos para detectarlo a tiempo antes de que se propague<sup>7</sup>. Según las estadísticas de la OMS del 2012, aproximadamente de 4,769 mujeres infectadas con VPH, alrededor de 500 de ellas mueren cada año debido al cáncer cervical entre los 24 y 60 años de edad, siendo estas asociadas a los genotipos de VPH 16 y 18<sup>1</sup>.

Este tipo de cáncer es causado por la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH), el cual forma complejos mediante sus oncoproteínas virales, E6 y E7, causando la inhibición de las funciones de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRb. Esto se debe a que E6 interactúa con p53 degradándose por la vía del proteosoma y E7 se asocia con pRb provocando la liberación de un factor de transcripción llamado E2F. De esta forma, se inhibe la apoptosis, continúa la replicación celular y favorece a la formación de un tumor<sup>8,9,10,11,12</sup>.

## **1.2 Biogénesis de los microRNAs.**

El cáncer es una consecuencia de una inestabilidad genómica, en la cual, se ven involucrados diferentes tipos de factores, entre ellos, las alteraciones en la expresión de los micro-RNAs (miRNAs)<sup>13,14</sup>. Los miRNAs son pequeños RNAs de cadena sencilla no codificantes y oscilan entre los 21-25 nucleótidos<sup>13</sup>. Participan en la regulación de diversos procesos celulares y, su alteración ha sido asociada al desarrollo de diferentes patologías, entre ellas, el cáncer<sup>14</sup>. Este tipo de RNAs tienen complementariedad con los RNAm de genes blanco a través de sitios específicos de reconocimiento localizados en el extremo 3'-UTR del RNAm denominados: Elementos de Reconocimiento de MicroRNAs (MREs), los cuales

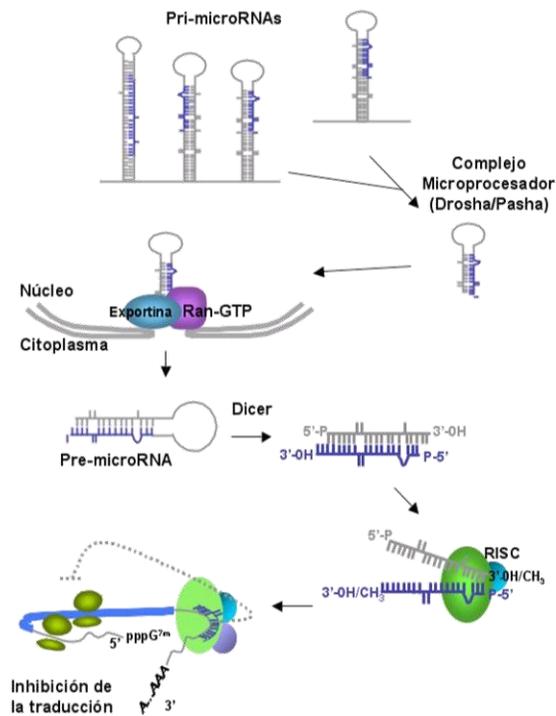
se unen por medio de complementariedad de nucleótidos<sup>13,14</sup>. La transcripción de los microRNAs está mediada por las RNA polimerasas II o III que, dentro del núcleo de la célula, se encargará de transcribir el gen específico del microRNA para generar transcritos primarios conocidos como pri-microRNA. Estos serán procesados por *Drosha* (endonucleasa-RNAsa tipo III), por DGCR8 (subunidad de *Drosha*) y por *Pasha* (proteína de unión a RNA de doble cadena), para llegar a un pre-microRNA, el cual tiene una estructura de tallo-asa. El pre-microRNA, será exportado gracias a la Exportina 5, siendo este un proceso dependiente de GTP. Posteriormente, en el citoplasma, la endonucleasa *Dicer* reconocerá y procesará este pre-microRNA para obtener un miRNA maduro de doble cadena mediante la remoción de su asa terminal. De esta doble cadena, sólo una se unirá y será reclutado por RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por el RNA). Dentro de este complejo se encuentra una proteína conocida como Argonauta que, por medio de homología e hibridación del miRNA con el RNAm, se encargará de inhibir la traducción parcial o totalmente (Figura 1)<sup>15</sup>.

### **1.3 microRNA-21 (miR-21).**

El estudio de los miRNAs ha sido de particular interés debido a las relaciones que han sido encontradas con el cáncer. El de mayor estudio ha sido su silenciamiento por medio de degradación o inhibición del RNA mensajero<sup>13,18</sup>. Se sabe que la alteración de los microRNAs puede ocasionar una alteración celular y esto puede ser debido a una sobreexpresión o una represión de la actividad de estos miRNAs al igual que de los genes blancos que regulan<sup>13,14</sup>. Uno de los microRNAs de particular interés es miR-21.

miR-21 se encuentra localizado en el cromosoma 17q23.2 en el intrón 10 del gen TMEM49<sup>16</sup>. Se ha demostrado que miR-21 se encuentra sobreexpesado y asociado a diversos tipos de cáncer<sup>17</sup>, entre los que se pueden mencionar: cáncer de mama, glioblastoma, pulmón, ovario, hígado, gastrointestinal. Sin embargo, hay pocos estudios sobre el papel que juega este miRNA en cáncer cervical, por lo

tanto, se requiere conocer la regulación de genes blanco específicos de este que participan en la desregulación génica.



**Figura 1.** Proceso de maduración de lo microRNAs. Comenzando por la estructura tallo-asa de los pri-microRNAs procesada por el complejo microprocesador y siendo exportada por la Exportina en un proceso dependiente de GTP. Posteriormente, Dicer procesará a este pre-microRNA para obtener un microRNA maduro de doble cadena el cual se unirá al complejo RISC para poder inhibir parcial o totalmente la traducción del RNAm<sup>15</sup>.

Según lo reportado por Peralta-Zaragoza y colaboradores<sup>18</sup>, se ha encontrado que miR-21 se encuentra clasificado como un microRNA oncogénico y se vio involucrado en la regulación del gen supresor tumoral PTEN (Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa). Se realizó un estudio en células de cáncer cervical para determinar el mecanismo de regulación que presenta miR-21 con el gen blanco propuesto. Los resultados demuestran que miR-21 reprime la expresión post-transcripcional de PTEN, esta desregulación permite la continuidad de la proliferación celular, así como su supervivencia<sup>18</sup>.

En estudios anteriores realizados en el grupo de laboratorio (resultados aún no publicados), se logró demostrar la participación de miR-21 en cáncer cervical en la regulación de los genes RECK (Reversion- Cysteine- with Kazal Motifs) que es un inhibidor de metaloproteasas (MMP), el cual es necesario para evitar una invasión y metástasis por medio de la degradación de la matriz extracelular en donde se ven involucradas las MMP. Como resultado de estos estudios, se concluyó que la sobreexpresión de miR-21 logra disminuir la actividad de los genes RECK ayudando así al proceso de metástasis del cáncer cervical<sup>19</sup>.

La propiedad de regulación de RECK con este microRNA, también se ha encontrado en diferentes tipos de cáncer como en el glioma y cáncer de colón, en donde se ve involucrado otro supresor de metaloproteasas de matriz extracelular llamado TIMP3<sup>19,26</sup>. El papel que juega miR-21 en glioma, se encuentra relacionada al proceso de metastasis siendo esto evitable si se silencia éste miRNA. Por lo tanto, estas evidencias sugieren que miR-21 tiene varios genes blanco involucrados en diversos procesos celulares, que se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de cáncer y esta sobreexpresión está relacionada al proceso de metastasis<sup>26</sup>. Además, este microRNA supone un posible biomarcador para blanco terapéutico, así como para tratamiento y diagnóstico<sup>18</sup>.

#### **1.4 Función biológica de BRMS1L (Breast Cancer Metastasis-Suppressor 1 Like)**

BRMS1L (Breast Cancer Metastasis-Suppressor 1 Like) es un gen supresor tumoral que codifica para la proteína Sin3a la cual se encuentra involucrada en la represión transcripcional dependiente de la histona deacetilasa y en la actividad reguladora del gen Myc<sup>20</sup>. Gracias a los resultados publicados en el artículo "*BRMS1L suppresses breast cancer metastasis by inducing epigenetic silence of FZD10*". Se demostró que, en cáncer de mama, cuando BRMS1L es funcional, inhibe la migración e invasión de células transformadas esto mediante la inhibición de la transición epitelio-mesénquima<sup>21</sup>. Sin embargo, durante la progresión del cáncer, el gen BRMS1L muestra una reducción de actividad, ocasionando la activación del protooncogen Myc, transformándolo en un oncogen. Esta actividad de BRMS1L sobre el gen c-Myc sugiere que BRMS1L está involucrado en el desarrollo del cáncer<sup>22</sup>.

En condiciones celulares normales, miR-21 regula a BRMS1L y la actividad que tiene este gen, sigue un curso normal<sup>20</sup>. Sin embargo, en células cancerosas, se sabe que BRMS1L se encuentra reprimido mientras que miR-21 está sobre-expresado<sup>20</sup>. Esta alteración de la actividad se encuentra asociado al proceso de metástasis<sup>3</sup>. Por lo tanto, en el presente proyecto de tesis, se propone investigar el mecanismo de regulación molecular del gen BRMS1L como un gen blanco regulado por el microRNA miR-21, mediante el análisis funcional de los elementos de respuesta a miR-21 del gen de BRMS1L, en células cervicales humanas transformadas con VPH.

## 2. Justificación

La infección con el virus del VPH es el principal factor etiológico para el desarrollo del cáncer cervical, el cual es provocado por un crecimiento celular anormal, el cual llega a formar un tumor en el cuello uterino o cérvix. Este tipo de cáncer, al igual que muchos otros, se puede prevenir si es que se detecta a tiempo y hay una asistencia médica adecuada. Sin embargo, hay poca información acerca de este padecimiento y esto aumenta la incidencia y mortalidad en poblaciones femeninas entre la edad de 20 y 60 años. Este tipo de infección se transmite sexualmente. En esta afección ocurren cambios en muchas funciones celulares entre las que se encuentra la regulación génica por miRNAs. Los muchos miRNAs en el cáncer cervical incrementan o bajan su expresión debido a esta desregulación celular y este es un factor que altera directamente a sus genes blanco.

Un miRNA de interés es miR-21, el cual se ha visto involucrado en diversos tipos de cáncer como, por ejemplo: glioblastoma, estómago, pulmón, ovario, hígado, cervical, entre otro. En células transformadas con VPH oncogénico, se ha demostrado una desregulación de los miRNAs y sus genes blanco. Se ha observado que miR-21 incrementa su expresión a lo largo de la progresión del cáncer cervical y el gen blanco BMRS1L disminuye a través de la misma.

BMRS1L, el cual codifica para una deacetilasa (Sin3A), se encarga de regular genes involucrados en la transición epitelio-mesénquima, entonces puede ser un candidato terapéutico para inhibir la metástasis en el cáncer cervical.

Por lo tanto, es importante conocer y entender el mecanismo de regulación molecular de miR-21 con el gen BRMS1L en cáncer cervical a través de las secuencias MREs localizados en el extremo 3' UTR del mensajero del gen blanco.

### **3. Hipótesis**

En las células cervicales tumorales hay una sobre expresión de miR-21 y una represión del gen BRMS1L, y además este gen blanco tienen secuencias MREs para miR-21, por lo tanto, miR-21 puede regular la expresión de BRMS1L en células de cáncer cervical transformadas con VPH a través de su unión a los MREs.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo General**

Analizar el mecanismo molecular de regulación de BRMS1L por miR-21 en células cervicales tumorales humanas transformadas por VPH.

#### **4.2 Objetivos particulares.**

- a) Establecer las secuencias MREs para miR-21 en la región 3'UTR del gen BRMS1L.
- b) Generar plásmidos reporteros que contengan las secuencias MREs de BRMS1L.
- c) Evaluar la funcionalidad de las secuencias MREs por análisis de la actividad del gen reportero en células transformadas con VPH.

## 5. Metodología.

### 5.1 Análisis bioinformático de los MREs.

El análisis de las secuencias MREs para miR-21 se realizaron con la base de datos de miRTarBase (<http://www.mirtarbase.org/>) (No. acceso: MIMAT0000076; miRBase), y se identificaron las secuencias MREs del gen BRMS1L (No. acceso: NM\_032352; NCBI). Posteriormente, se diseñaron los oligos que contuvieron las secuencias de los MREs con los sitios de restricción Spe I y Hind III para generar las construcciones de plásmidos reporteros. Los oligos se enviaron a sintetizar a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Las secuencias MRE sintetizadas y enviadas fueron las siguientes:

MRE	Secuencia
1 (1716-1737pb)	F: 5'- CTAGACTAGTGGTATTTATGATGCAGTATATAAGTGGTGAACAAGCTTGGG -3' R: 5'- CCCAAGCTTGTTCCACCACTTATATACTGCATCATAAATACCACTAGTCTAG -3'
2 (1786-1806pb)	F: 5'- CTAGACTAGTCTTTTGAAACAGATTTTAGTAAGCATTTTCCAAGCTTGGG -3' R: 5'- CCCAAGCTTGGAAAATGCTTACTAAAATCTGTTTCAAAGACTAGTCTAG -3'
3 (2378-2398pb)	F: 5'- CTAGACTAGTTTATGTATACAATGTTTGATAAGCATTTTTAAAGCTTGGG -3' R: 5'- CCCAAGCTTTAAAAATGCTTATCAAACATTGTATACATAAACTAGTCTAG -3'
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="background-color: #FF00FF; padding: 5px; border: 1px solid black;">Spe I</div> <div style="background-color: #FF0000; padding: 5px; border: 1px solid black;">MRE</div> <div style="background-color: #FFFF00; padding: 5px; border: 1px solid black;">HindIII</div> </div>

**Tabla 1.** Diseño de los oligos sentido y antisentido para cada secuencia MRE del gen BRMS1L. Los extremos fueron flanqueados por las enzimas Spe I (5') y HindIII (3').

## 5.2 Generación de construcciones de plásmidos reporteros.

Se generarán las construcciones de plásmidos reporteros por clonación de las secuencias MREs en el plásmido pMIR-REPORT Luciferasa el cual contiene el sitio múltiple de clonación en el extremo 3'-UTR del gen reportero de luciferasa y que además contiene el promotor fuerte de CMV (Figura 2). Se medirá la funcionalidad de los plásmidos reporteros por transfección en células cervicales tumorales humanas infectadas con VPH. Para la generación de las construcciones de plásmidos reporteros, primero se tuvo que hacer la producción a gran escala del plásmido reportero. Para esto, se transformaron bacterias quimiocompetentes *E. coli DH5α* para su posterior extracción de ADN plasmídico utilizando el kit PureYield™ Plasmid Midiprep System de Promega (Promega Madison, WI). La integridad del plásmido fue verificada por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se realizaron los ensayos de restricción usando las enzimas Spe I y Hind III. Una vez realizado esto, se prosiguió alineando los MREs con sus respectivas cadenas sentido y antisentido. Se utilizaron cinco condiciones: **1)** 10' a 95°C + 10' a 77°C, **2)** 10' a 95°C + disminución gradual 1 hr, **3)** 10' a 95°C + 1 hr a 37°C, **4)** 10' a 95°C + choque térmico 1 hr) y **5)** 3' a 90°C + 1 hr a 37°C. Para comprobar alineamiento, se verificó en gel de poliacrilamida al 10%. Ya que se comprobó, se realizó el ensayo de restricción con las enzimas Spe I y Hind III para generar los extremos cohesivos y poder ligar cada secuencia MRE con los plásmidos reporteros.

Para la reacción de ligación se colocaron 5 µL de inserto, 1 µL del plásmido reportero: pMIR-Report-Luciferasa (PMRL), 1 µL Buffer y 2 µL H<sub>2</sub>O. Se dejó incubando toda la noche. Pasada la incubación, se continuó con el protocolo de transformación de bacterias quimiocompetentes *E. Coli DH5α* y se plaqueó en placas con medio LB con ampicilina, para este paso se ocupó toda la reacción de ligación. Las colonias crecidas se picaron y re-estriaron en una nueva placa con medio LB con ampicilina. De esta nueva placa, se tomó una muestra y se purificó mediante el kit Wizard<sup>RT</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). De esta purificación se tomó otra muestra y a esta se le realizó un ensayo de

restricción con la enzima Sac I. Para la digestión, se colocaron 2 µg de DNA + 1 µL Sac I + 1 µL Buffer. Este ensayo de restricción se realizó de igual forma para el plásmido reportero PMRL vacío.

Se visualizaron resultados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar que no hubiera digestión. Los plásmidos de las colonias positivas que no fueron digeridos con la enzima Sac I, se mandaron a secuenciar para corroborar que la construcción por MRE esté en los plásmidos reporteros.

### **5.3 Análisis de la actividad de Luciferasa.**

Se realizaron transfecciones transitorias usando las construcciones de plásmidos reporteros que se generaron las cuales llevaron por nombre: PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3 y las co-transfecciones se realizaron con el plásmido de silenciamiento de miR-21 (psimiR-21-5p) previamente generados por el grupo de trabajo y que inducirá el silenciamiento de miR-21. Las transfecciones se realizaron en las células cervicales tumorales humanas VPH16+ (células SiHa), VPH18+ (células HeLa), VPH negativas (células C33A) y queratinocitos epiteliales primarios (células HaCat). Las células se colocaron en placas de 9 pozos y se utilizaron para el ensayo de transfección teniendo una confluencia del 80%. Las células fueron incubadas con el químico FuGene por 5 horas. Pasadas 48 horas, las células se lavaron con PBS 1X y se lisaron con el Buffer de Lisis. Las células lisadas fueron recolectadas en placas especiales para ser leídas y evaluadas en el luminómetro multidetector Glomax mediante el uso del kit Dual-Gluo Luciferase System. El resultado fue medido a través de la luminiscencia producida a partir del gen de luciferasa de pMIR-Report Luciferase. Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al plásmido vacío PMRL usado como control positivo. Para los ensayos de transfección, se utilizaron 2µg de DNA plasmídico. Durante el ensayo, el reactivo FuGene y el DNA plasmídico fue diluido en medio DMEM sin suplementar, esta dilución se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la incubación, las muestras se colocaron en el pozo correspondiente de la placa, teniendo como controles a PMRL y psimiR-21-5p. Para las transfecciones simples se ocuparon las tres

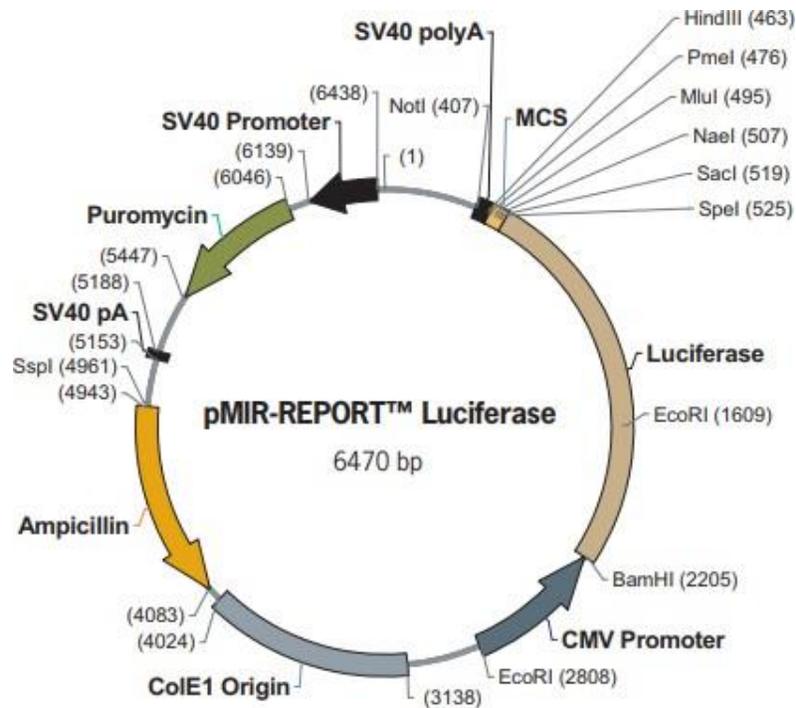
construcciones y, para las co-transfecciones, se utilizaron las construcciones más el plásmido de silenciamiento de miR-21 (psimiR-21-5p). Todas las transfecciones y co-transfecciones se realizaron por triplicado.

#### **5.4 Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos de la transfección con el plásmido reportero y la co-transfección del silenciamiento de miR21, fueron analizados por medio de la Prueba U de Mann-Whitney para comprobar la significancia de los datos de actividad de luminiscencia en cada línea celular infectada con VPH.

#### **5.5 Cultivo celular.**

Las líneas células cervicales tumorales humanas utilizadas fueron: células SiHa (VPH16+), células HeLa (VPH18+), células C33A (VPH negativas) y células HaCat (queratinocitos epiteliales primarios), las cuales se cultivaron con DMEM suplementado con 10% SBF (Suero Bovino Fetal), 1% de antibiótico (penicilina, estreptomycin y ampicilina) y 1% de aminoácidos no esenciales en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.



**Figura 2.** Plásmido reportero pMIR-Report Luciferase. Tiene un tamaño de 6470pb, contiene un sitio de clonación múltiple localizado en el extremo 3' UTR y un promotor fuerte de CMV el cual controla al gen reportero de luciferasa. Está flanqueado por las enzimas HindIII y SpeI. Tiene resistencia a neomicina y puromicina, esto permite selección de antibióticos y genera líneas celulares más estables<sup>24</sup>.

## 6. Resultados.

### 6.1 Obtención de las construcciones y diseño de los oligos que contienen las secuencias MREs del gen BRMS1L reguladas por miR-21.

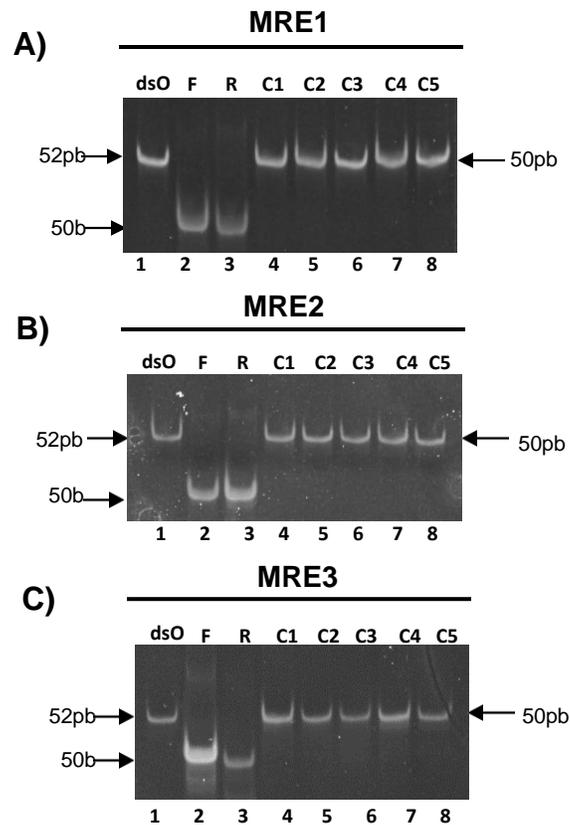
El análisis de las secuencias MREs para miR-21 se realizó en la base de datos de miRTarBase (<http://www.mirtarbase.org/>), y se identificaron las secuencias MREs predichas para el gen BRMS1L. Estas secuencias MREs identificadas se muestran en la Tabla 2, en donde se observa las características de una estructura de doble cadena del miRNA y su MRE blanco, posición, complementariedad y su energía libre mínima.

ID	Duplex structure	Position	Score	MFE
13	<pre>miRNA 3' aguUGUAGUCAGACUAUUCGau 5'           :   :        Target 5' tatACAAT-GTTTGATAAGCat 3'</pre>	1406 - 1426	146.00	-13.20
2	<pre>miRNA 3' agUUGUAGUCAGACUAUUCGau 5'               :  :      Target 5' gaAACA-GATTTTAGTAAGCat 3'</pre>	814 - 834	123.00	-5.70
1	<pre>miRNA 3' aguugUA-GUCAGACUAUUCGau 5'                      : Target 5' ttatgATGCAGTAT-ATAAGTgg 3'</pre>	744 - 765	120.00	-6.80

**Tabla 2.** Datos obtenidos por la base de datos de miRTarBase. Se identificaron 3 secuencias MREs del gen BRMS1L reguladas por miR-21. En esta tabla se puede observar la complementariedad de bases entre miR-21 y la secuencia MRE localizada en el extremo 3'UTR (región no traducida) del gen BRMS1L, su posición y su energía libre mínima de interacción.

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó el diseño de los oligos sentido y antisentido para cada una de las secuencias MREs. Estas se construyeron tomando en cuenta los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción de interés las cuales son Spe I (localizado en el extremo 5') y HindIII (localizado en el extremo 3'). (Tabla 1)

Los oligos diseñados se mandaron a sintetizar a la Unidad de Síntesis en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Una vez entregados, se realizó el alineamiento con los oligos correspondientes de cada MRE por medio de un análisis de movilidad electroforética. Se evaluó el alineamiento por medio de cinco condiciones. Una vez realizado esto, se corrió un gel de poliacrilamida al 10% para conocer cuál condición era la más eficiente (Figura 3). Las cinco condiciones aplicadas funcionaron de manera eficiente en los tres MREs y se obtuvieron las inserciones del DNA, la secuencia del MRE1 con un tamaño de 51pb y MRE2 y 3 con un tamaño de 50pb. Con base en esto, se pudo comprobar que los MREs fueron alineados de manera adecuada y se tiene DNA de doble cadena.

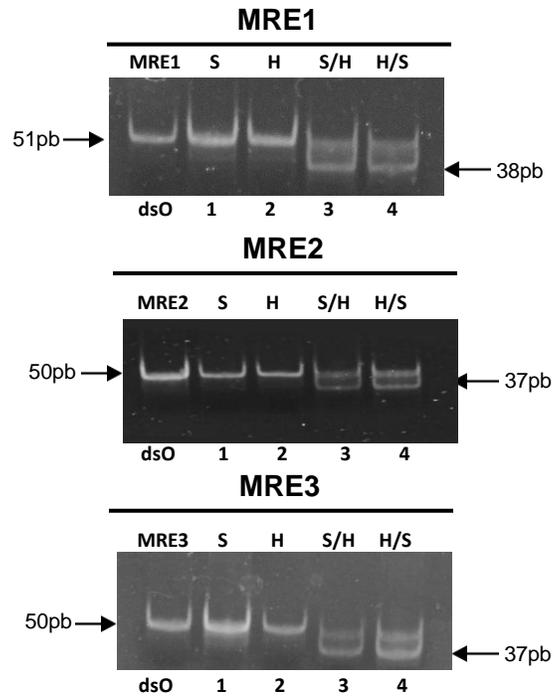


**Figura 3.** Alineamiento realizado en gel de poliacrilamida al 10% de los oligos sentido (F) y antisentido (R) de los tres MREs para obtener una doble cadena de DNA, se utilizó como marcador de peso molecular un oligo previamente alineado en el grupo del laboratorio (dsO: double-stranded Oligonucleotide). **A)** Alineamiento para la construcción PMRE21BRMLuc1. **B)** Alineamiento para la construcción PMRE21BRMLuc2. **C)** Alineamiento para la construcción PMRE21BRMLuc3. Se aplicaron cinco condiciones (C1-C5): **1)** 10' a 95°C + 10' a 77°C, **2)** 10' a 95°C + disminución gradual 1 hr, **3)** 10' a 95°C + 1 hr a 37°C, **4)** 10' a 95°C + choque térmico 1 hr) y **5)** 3' a 90°C + 1 hr a 37°C.

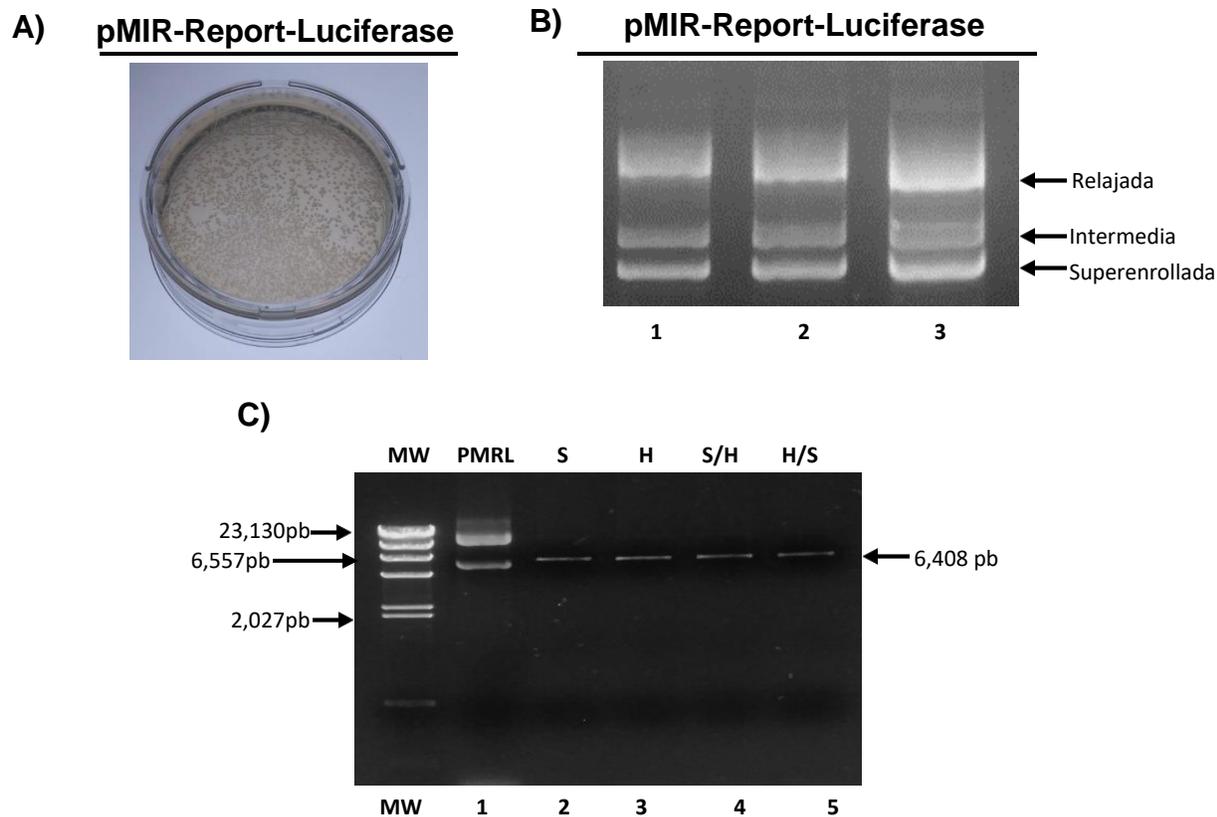
Posteriormente, se realizó un ensayo de restricción enzimática utilizando las enzimas Spe I y HindIII en cada inserto de doble cadena de DNA de los MREs. Los resultados obtenidos demuestran una pérdida de 12-13 nucleótidos debido a la generación de los extremos cohesivos. (Figura 4) Se obtuvieron los siguientes fragmentos de DNA por secuencia de MRE: de la secuencia MRE1: 38pb, MRE2: 37pb y MRE3: 37pb.

El mismo ensayo de restricción se aplicó para el plásmido reportero: pMIR-Report-Luciferase. PMRL tiene el sitio múltiple de clonación para la inserción de miRNA localizado en el extremo 3' UTR y, principalmente, la presencia del gen reportero de luciferasa regulado por un promotor fuerte de Citomegalovirus (CMV) (Figura 2). Este plásmido fue previamente purificado por transformación de bacterias *E. Coli* de la cepa DH5 $\alpha$  y, posteriormente, purificado por medio de lisis alcalina para obtener a gran escala PMRL. (Figura 5A)

Por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, se pudo comprobar la integridad del plásmido. (Figura 5B) A continuación, se llevó a cabo el ensayo de restricción para obtener una estructura lineal del plásmido reportero y generar extremos cohesivos para generar las construcciones de plásmidos. Los resultados que se obtuvieron demuestran la forma lineal de PMRL por medio del corte de Spe I y HindIII, dando un tamaño de aproximadamente 6,408pb (Figura 5C). Por lo tanto, estos datos sugieren que la conformación del plásmido reportero es lineal y puede ser usado para realizar la ligación con los MREs para generar las construcciones de plásmidos reporteros.

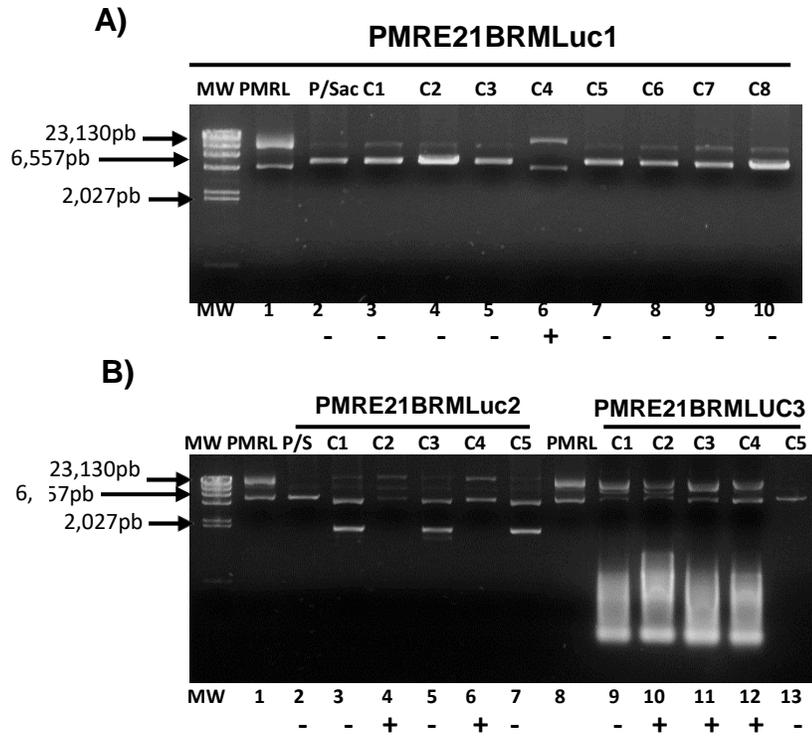


**Figura 4.** Digestión con las enzimas de restricción Spe I y HindIII en gel de poliacrilamida al 10%. Las digestiones se realizaron tanto individual (S o H) como en conjunto (S/H-H/S), utilizado como control para comprobar eficiencia y funcionamiento correcto de cada enzima. Como marcador de peso molecular, se utilizó el MRE de doble cadena de DNA.



**Figura 5. A)** Transformación de bacterias *E. Coli* DH5 $\alpha$  en caja Petri con medio LB y con ampicilina. Se muestran las colonias transformadas con el plásmido pMIR-Report-Luciferase. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Integridad de pMIR-Report-Luciferase, se muestran las tres conformaciones del DNA: superenrollada, intermedia y relajada. Se observan tres carriles, cada uno demuestra diferente concentración: 1) 0.9 $\mu$ g/ $\mu$ L, 2) 1.8 $\mu$ g/ $\mu$ L y 3) 3 $\mu$ g/ $\mu$ L. **C)** Ensayo de restricción de PMRL. Se utilizaron las enzimas Spe I y HindIII, nuevamente se realizaron tanto por separado como en conjunto la digestión. Se puede observar el cambio de conformación del plásmido reportero al presentar sólo una banda.

Una vez obtenida la digestión de los insertos de doble cadena de DNA que contienen las secuencias MREs, estas secuencias se clonaron en el plásmido pMIR-Report-Luciferase para obtener las construcciones PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3. Esta clonación se llevó a cabo por medio de transformación de bacterias *E. Coli* DH5 $\alpha$  en cajas Petri con medio LB y ampicilina. Las colonias crecidas se re-estriaron en una nueva caja Petri para posteriormente producir a gran escala las construcciones de DNA plasmídico por medio de lisis alcalina. Para asegurar que las colonias crecidas tenían las construcciones deseadas, se hizo un ensayo de restricción con la enzima Sac I. Se realizó este ensayo debido a que no está presente el sitio de corte de esta enzima ya que Spe I y HindIII cortan los sitios internos y el sitio de restricción de Sac I se pierde. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar que no hubiera sido digerida la construcción plasmídica, siendo esto observado al encontrar una sola banda indicando que el plásmido tiene conformación lineal y no se encuentra la construcción esperada. Las colonias que no fueron digeridas y presentan una conformación plasmídica circular, corresponden a las colonias posiblemente positivas. (Figura 6)



**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se muestran colonias positivas transformadas con *E. Coli* DH5 $\alpha$  con los plásmidos de cada MRE. Cada colonia positiva representa a las construcciones PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3 respectivamente. Se utilizó como controles el plásmido reportero sin digerir (PMRL) y plásmido PMRL digerido con Sac I (P/S). **A)** Construcciones PMRE21BRMLuc1. Colonia positiva: C4. **B)** Construcciones PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3. Colonias positivas MRE2: C3 y C4. Colonias positivas MRE3: C2, C3 y C4.

Una vez realizado el ensayo de restricción, se llevó a cabo la secuenciación de DNA de sólo una colonia por MRE. Las colonias seleccionadas fueron: MRE1: C4, MRE 2: C3 y MRE3: C4. Las muestras se llevaron al Instituto de Biotecnología, UNAM. En relación con el análisis de secuenciación no hubo deleciones, inserciones o mutaciones que hubieran diferido a las secuencias mandadas. Esto confirma que los insertos de DNA se encuentran íntegros, corresponden a las secuencias MREs del gen BRMS1L que son reconocidas por miR-21, y que está correctamente clonados para generar las construcciones de plásmidos reporteros PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3. (Tabla 3)

>15123 MRE1

GTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTCTAGACTAGTGGTATTTATGATGCAGTATATAAGTGGTGAACAA  
GCTTGGGAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGGCA  
CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCAC  
ATCCCCCTTTGCCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCA  
GCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCAT  
ATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCC  
GCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG  
AGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGGAGACGAAAGATTGGTGTGAAAAGTC  
CCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAA  
GTCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCG  
CCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAA  
TTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCT  
TTTTTGGAGGCCTAG

TTATGATGCAGTATATAAGTGG

>15124 MRE2

ATTGCTCGAGTGATGAAAGCTCTAGACTAGTCTTTTGAAACAGATTTTAGTAAGCATTTTCCAAGCTTGGG  
AAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGGCCG  
TCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCC  
TTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAARAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA  
TGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACG

GAAACAGATTTTAGTAAGCAT

>15125 MRE3

GGAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTCTAGACTAGTTTATGTATACAATGTTTGATAAGCATTTTTA  
AAGCTTGGGAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGG  
CACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGC  
ACATCCCCCTTTGCCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCG  
CAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGC  
ATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACAC  
CCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCG  
GGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGGAGACGAAAGATTGGTGTGAAA  
GTCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGG  
AAAGTCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCASMAACCATAGTC  
CCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGA  
CTAATTTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGA  
GGCTTTTTTGG

TATACAATGTTTGATAAGCAT

**Tabla 3.** Secuencia FASTA obtenida a partir del programa Chromas. Se muestra el análisis de secuenciación por cada MRE, siendo está secuencia subrayada en cada caso.

## **6.2 Ensayos de transfección para comprobar la regulación del gen BRMS1L a través de las secuencias específicas de reconocimiento MRE por miR-21.**

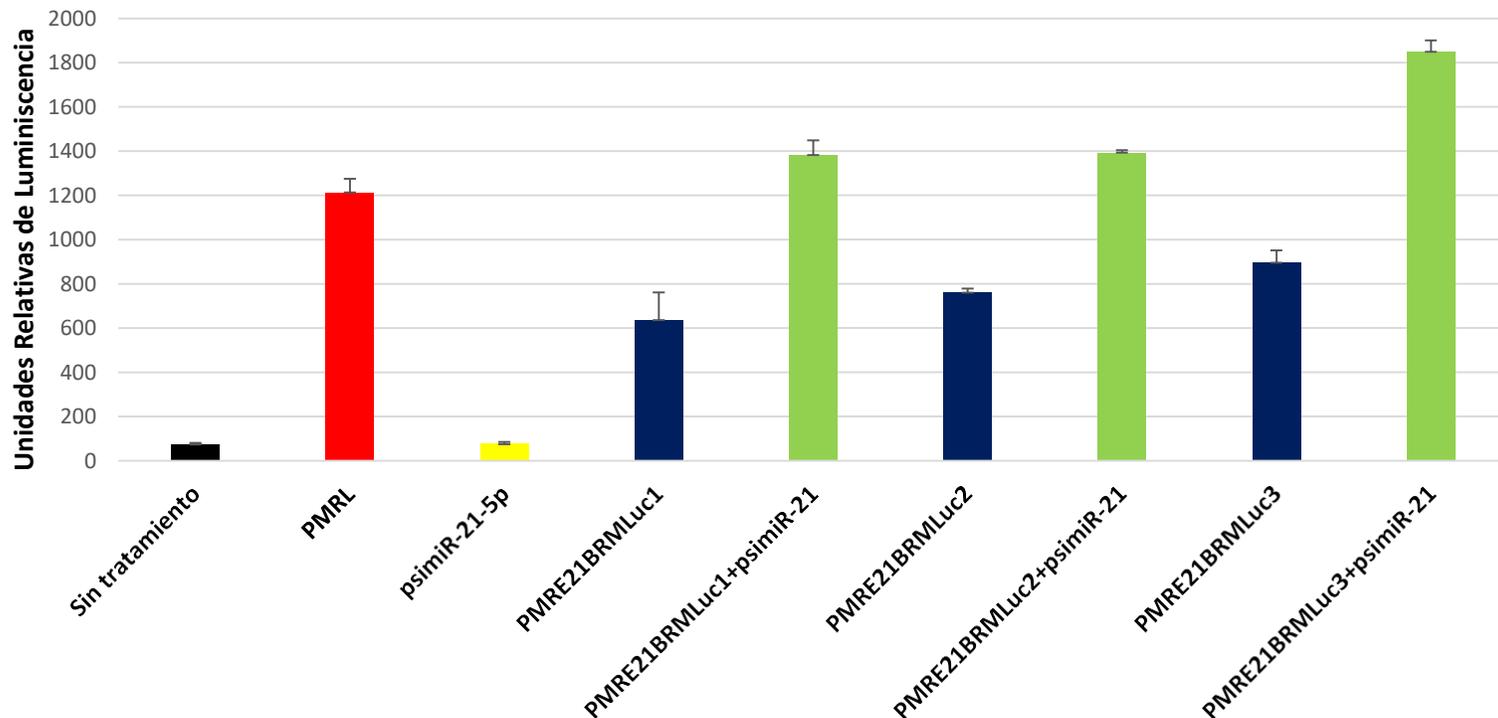
A partir de la generación de las construcciones de plásmidos reporteros PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3), se procedió a realizar los ensayos de transfección con estos plásmidos, así como con el plásmido reportero pMIR-Report- Luciferase, y los ensayos de co-transfección se realizaron con el plásmido de silenciamiento del microRNA miR-21 (psimiR-21-5p) en las líneas celulares SiHa, HeLa, C33A y HaCaT propuestas y descritas en metodología (VPH+ y VPH-).

Cuando las células SiHa se transfectaron con la construcción PMRE21BRMLuc1, se observó una disminución en la actividad del gen reportero del 50% comparando con el control de PMRL (plásmido vacío). Sin embargo, al co-transfectar con el plásmido de silenciamiento (psimiR-21-5p) y el plásmido PMRE21BRMLuc1, se observó el restablecimiento de esta expresión de luminiscencia teniendo un aproximado del 110% comparado con el control de PRML. (Figura 7)

Por otro lado, al realizar la transfección en SiHa con PMRE21BRMLuc2, se pudo observar el mismo patrón de comportamiento del gen reportero de luciferasa, siendo este de menor expresión al momento de realizar las transfecciones simples y restableciendo su actividad al momento de co-transfectar. Interesantemente, este comportamiento lo compartió el último ensayo de transfección en esta línea celular con PMRE21BRMLuc3. Sin embargo, en este ensayo se mostró un aumento en el nivel de expresión de Luciferasa comparando con el control de PMRL (plásmido vacío) y que, en las otras dos construcciones, siendo aproximadamente del 150% mayor. (Figura 7) Esto sugiere que la construcción del MRE3 tiene mayor complementariedad de bases y podría ser el principal sitio de reconocimiento de miR-21 en la línea celular SiHa transformada con VPH.

Se realizó el análisis estadístico utilizando la Prueba U de Mann-Whitney. De acuerdo a los resultados obtenidos, las tres regiones MRE tienen una diferencia estadística significativa con valores de  $p=0.0495$ .

## SiHa



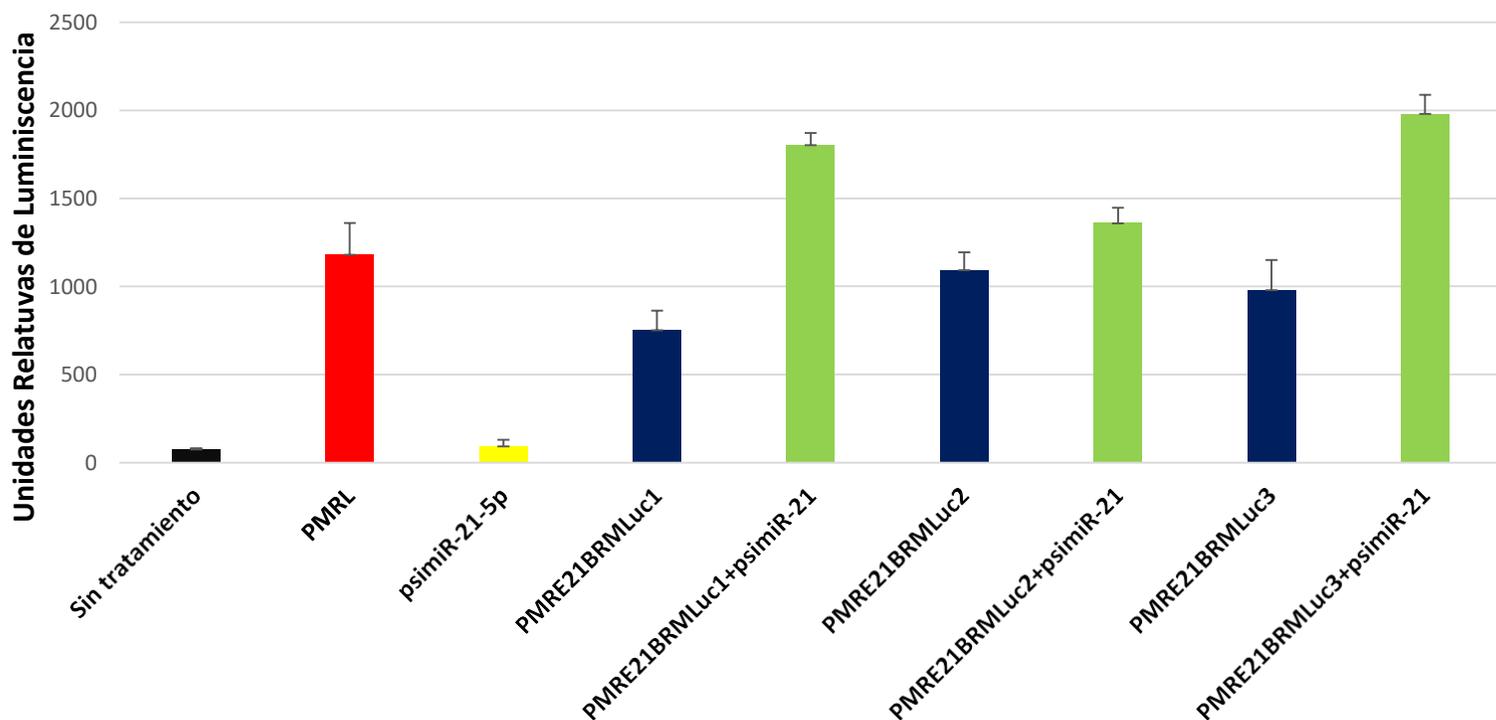
**Figura 7.** Análisis de las secuencias MREs en la línea celular SiHa (VPH 16+). Las células fueron transfectadas con las construcciones PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3 y co-transfectadas con el plásmido de silenciamiento psimiR-21-5p. Los niveles de expresión de luciferasa se midieron 48 horas post-transfección. El plásmido pMIR-Report-Luciferase (PMRL) corresponde al plásmido vacío el cual se usó como control, representado por la columna negra. Las transfecciones simples están representadas en las columnas de color azul, cada una corresponde a las tres construcciones: PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3. Las columnas azules corresponden a las co-transfecciones con el plásmido correspondiente por MRE y el plásmido de silenciamiento psimiR-21-5p. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes reproducibles.

Cuando se realizó el ensayo de transfección con las células HeLa con el plásmido PMRE21BRMLuc1, se observó una disminución de aproximadamente del 40% de la actividad del gen de Luciferasa en comparación con las células HeLa transfectadas con el plásmido PMRL (plásmido vacío). Cuando se realizó la co-transfección con los plásmidos PMRE21BRMLuc1 y psimiR-21-5p, se observó que hubo una recuperación del gen del Luciferasa del 130% en comparación con el plásmido vacío. (Figura 8)

Se observó una disminución en el comportamiento del gen reportero al realizar la transfección simple de las células HeLa con PMRE21BRMLuc2 de aproximadamente del 80% comparando con el control de PMRL. Este nivel de expresión cambio al realizar la co-transfección con los plásmidos psimiR-21-5p y PMRE21BRMLuc2 teniendo un aumento del 110% aproximadamente en comparación con el control. Lo que se observa en el patrón de expresión del gen reporte de luciferasa al realizar la transfección simple con el plásmido PMRE21BRMLuc3, el cual mostró una disminución del 79% de la actividad del gen reportero. Esta expresión se recuperó de manera significativa hasta un 170% aproximadamente (en comparación con control), al co-transfectar con los plásmidos psimiR-21-5p y PMRE21BRMLuc3. (Figura 8) Estos resultados sugieren que es muy probable que la secuencia establecida para el MRE3 es reconocida de manera más eficiente por miR-21 en células HeLa transformadas con VPH.

Se realizó el análisis estadístico utilizando la Prueba U de Mann-Whitney. De acuerdo a los resultados obtenidos, las tres regiones MRE tienen una diferencia estadística significativa con valores de  $p=0.0495$ .

## HeLa



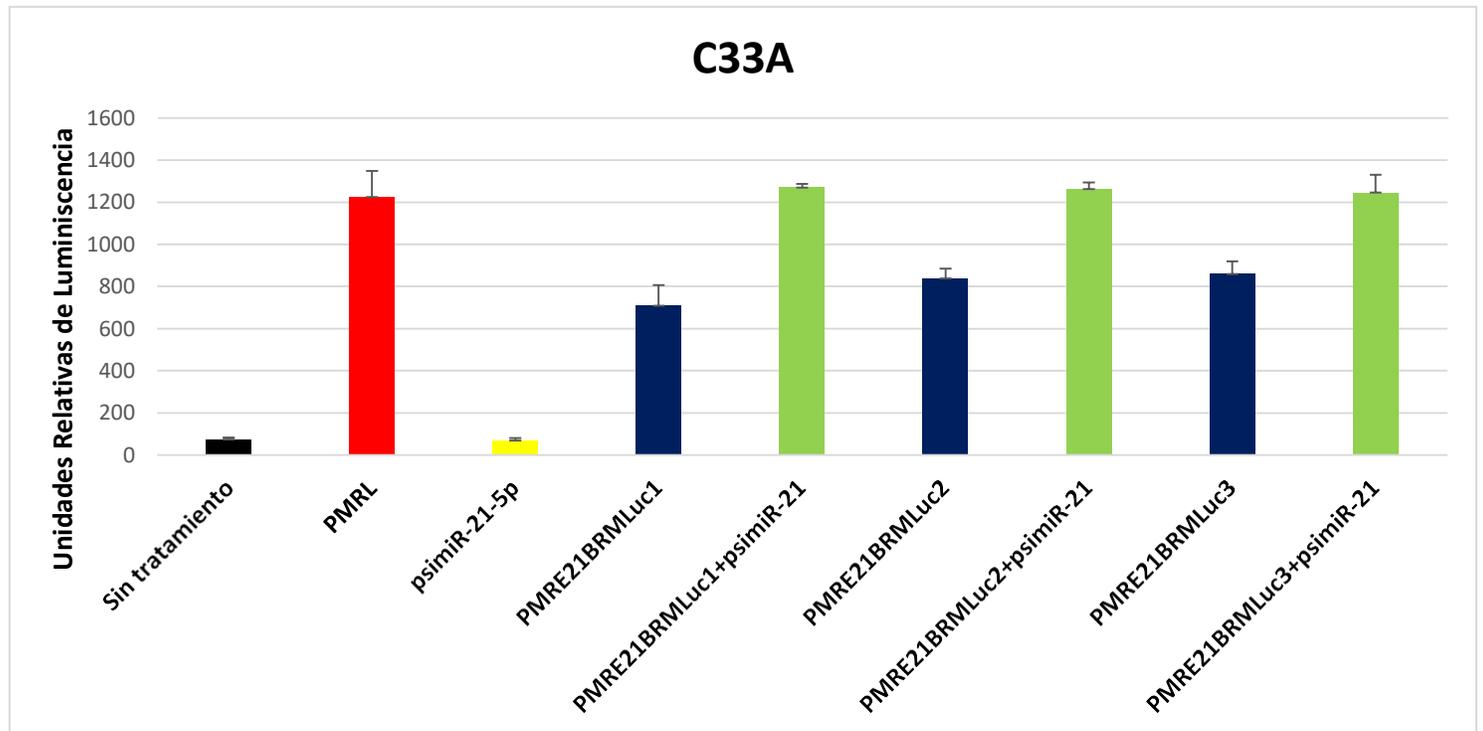
**Figura 8.** Análisis de las secuencias MREs en la línea celular HeLa (VPH18+). Las células fueron transfectadas con las construcciones PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3 y co-transfectadas con el plásmido de silenciamiento psimiR-21-5p. Los niveles de expresión de luciferasa se midieron 48 horas post-transfección. El plásmido pMIR-Report-Luciferase (PMRL) corresponde al plásmido vacío el cual se usó como control, representado por la columna negra. Las transfecciones simples están representadas en las columnas de color azul, cada una corresponde a las tres construcciones: PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3. Las columnas azules corresponden a las co-transfecciones con el plásmido correspondiente por MRE y el plásmido de silenciamiento psimiR-21-5p. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes reproducibles.

Cuando la línea celular C33A fue transfectada con el plásmido PMRE21BRMLuc1, se observó una disminución en la actividad del gen reportero de Luciferasa del 60% aproximadamente en comparación con el control de PMRL (plásmido vacío). Sin embargo, cuando se co-transfectó con los plásmidos psimiR-21-5p y PMRE21BRMLuc1, se pudo observar una recuperación mayor al control de la actividad de Luciferasa del 110%. (Figura 9)

Cuando se realizó la transfección simple con PMRE21BRMLuc2, también se observó una disminución del 80% aproximadamente de la actividad del gen reportero en comparación con el control de PMRL (plásmido vacío). Interesantemente, cuando se co-transfectó con los plásmidos psimiR-21-5p y PMRE21BRMLuc1, se observó el mismo patrón de comportamiento observado en la co-transfección de PMRE21BRMLuc1 del gen de Luciferasa, observando una recuperación de la actividad del gen reportero del 110%. (Figura 9)

Los resultados de la transfección con PMRE21BRMLuc3 fue muy similar a la que se observó con el plásmido PMRE21BRMLuc2, obteniendo una disminución del 82% aproximadamente en comparación con el control de PMRL (plásmido vacío). Por otro lado, los resultados de la co-transfección muestran un patrón similar al observado en los datos obtenidos con las construcciones de PMRE21BRMLuc1 y PMRE21BRMLuc2 al ser co-transfectados, obteniendo una recuperación significativa del 105%. (Figura 9) Estos datos sugieren que las tres secuencias propuestas por cada MRE, son los sitios de reconocimiento por miR-21 los cuales pueden regular la expresión del gen BRMS1L en células C33A no transformadas con VPH, pero que corresponden a células de cáncer cervical.

Se realizó el análisis estadístico utilizando la Prueba U de Mann-Whitney. De acuerdo a los resultados obtenidos, las tres regiones MRE tienen una diferencia estadística significativa con valores de  $p=0.0495$ .



**Figura 9.** Análisis de las secuencias MREs en la línea celular C33A (VPH -). Las células fueron transfectadas con las construcciones PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3 y co-transfectadas con el plásmido de silenciamiento psimiR-21-5p. Los niveles de expresión de luciferasa se midieron 48 horas post-transfección. El plásmido pMIR-Report-Luciferase (PMRL) corresponde al plásmido vacío el cual se usó como control, representado por la columna negra. Las transfecciones simples están representadas en las columnas de color azul, cada una corresponde a las tres construcciones: PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3. Las columnas azules corresponden a las co-transfecciones con el plásmido correspondiente por MRE y el plásmido de silenciamiento psimiR-21-5p. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes reproducibles.

Cuando se realizó el ensayo de transfección con el plásmido PMRE21BRMLuc1. Por otra parte, los resultados de la co-transfección mostraron un restablecimiento de la actividad del gen reportero del 80% comparado con el control. (Figura 10)

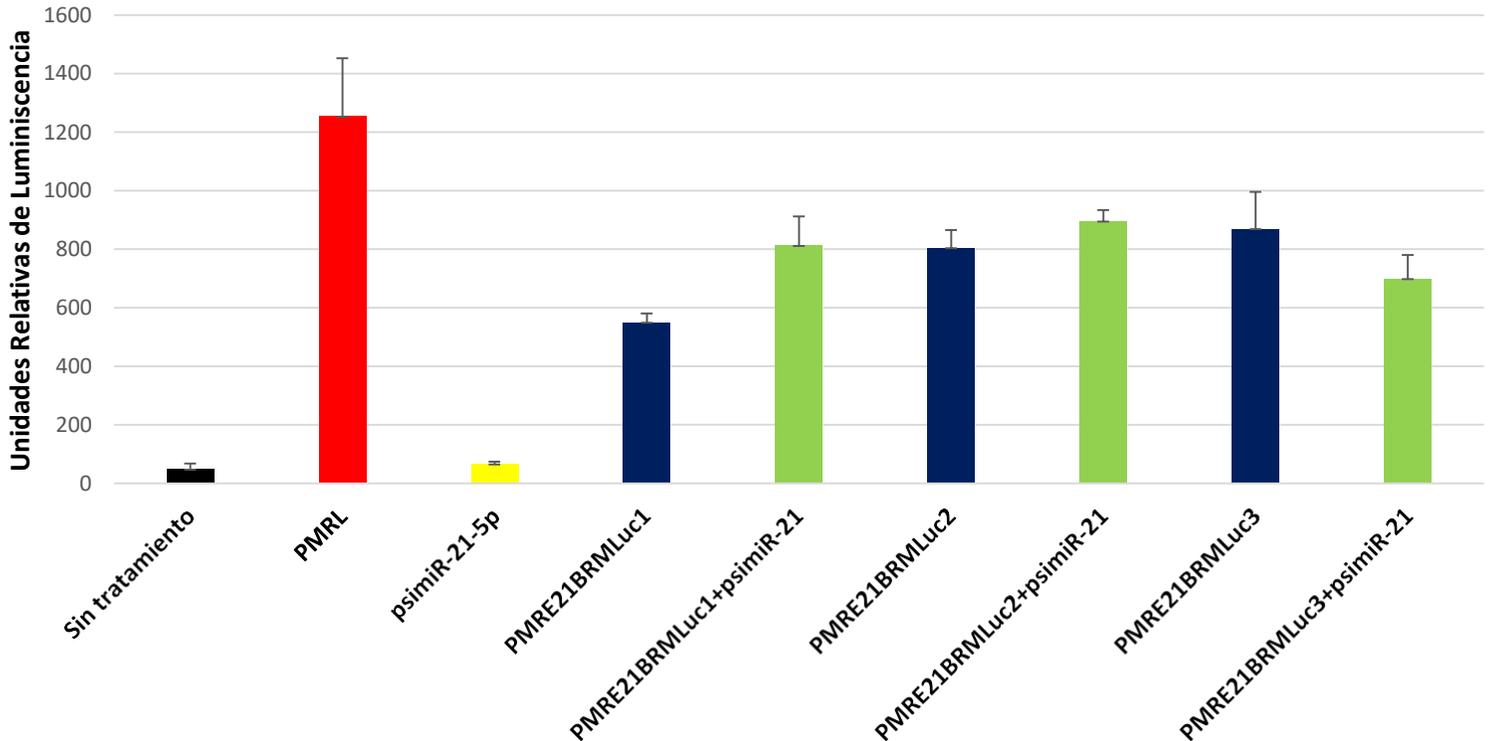
Cuando se transfectó con el plásmido PMRE21BRMLuc2, se apreció una disminución del gen de Luciferasa del 80% comparado con el control de PMRL (plásmido vacío). En los ensayos de co-transfección con los plásmidos psimiR-21-5p y PMRE21BRMLuc2 se observó un aumento del 85% del gen reportero comparado con el control. (Figura 10)

Por otro lado, en la transfección con el plásmido PMRE21BRMLuc3, se pudo observar una disminución del 83% aproximadamente del gen reportero de Luciferasa en comparación con el control de PMRL (plásmido vacío). Sin embargo, cuando se realizó la co-transfección con los plásmidos psimiR-21-5p y PMRE21BRMLuc3, se observó una disminución de la actividad de Luciferasa de un 75% aproximadamente comparando con el control. (Figura 10)

Estos datos sugieren que el comportamiento del gen reportero de Luciferasa en las secuencias propuestas del gen BRMS1L no están siendo o son reguladas de manera distinta por el microRNA, esto puede ser asociado al tipo de línea celular transfectada en la cual no hay sobreexpresión de miR21 y no son células transformadas como tal.

Se realizó el análisis estadístico utilizando la Prueba U de Mann-Whitney. De acuerdo a los resultados obtenidos, en la línea celular HaCaT, sólo existe una diferencia significativa en el MRE1 con un valor de  $p= 0.0495$ , mientras para las secuencias MRE2 y 3, los resultados arrojan un valor de  $p=0.1266$ .

## HacaT



**Figura 10.** Análisis de las secuencias MREs en la línea celular HaCaT (No transformada). Las células fueron transfectadas con las construcciones PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3 y co-transfectadas con el plásmido de silenciamiento psimiR-21-5p. Los niveles de expresión de luciferasa se midieron 48 horas post-transfección. El plásmido pMIR-Report-Luciferase (PMRL) corresponde al plásmido vacío el cual se usó como control, representado por la columna negra. Las transfecciones simples están representadas en las columnas de color azul, cada una corresponde a las tres construcciones: PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3. Las columnas azules corresponden a las co-transfecciones con el plásmido correspondiente por MRE y el plásmido de silenciamiento psimiR-21-5p. Los datos mostrados son el promedio de tres

## 7. Discusión.

El cáncer cervical es uno de los tipos de cáncer más común en mujeres y ha sido un problema de salud pública debido a la alta tasa de incidencia y mortalidad reportadas, siendo el Virus del Papiloma Humano el principal factor etiológico del cáncer cervical<sup>1</sup>. Es por esto, que es indispensable encontrar terapias que prevengan y erradiquen la progresión y desarrollo de este tipo de cáncer. Muchos estudios recientes se han centrado en el estudio del silenciamiento de los mRNAs como posible terapia génica para combatir esta enfermedad y esto es debido a la relevancia que han demostrado los microRNAs en diversos tipos de cáncer<sup>2,13</sup>.

Existe un panel de microRNAs involucrados en diferentes etapas de desarrollo del cáncer cervical<sup>13</sup>, sin embargo, un miRNA de particular interés es miR-21 debido a que se encuentra asociado a varios procesos de la carcinogénesis (apoptosis, migración e invasión)<sup>25</sup> a la alta relevancia biológica ya que regula a diversos genes involucrados los cuales se ven involucrados en diferentes procesos celulares<sup>19,25</sup> y, por otro lado, se encuentra sobre-expresado en cáncer cervical después de la infección con el Virus del Papiloma Humano<sup>18</sup>. La sobreexpresión que tiene miR-21, está asociada al proceso de metástasis<sup>18,19,25</sup>. Por esta razón, miR-21 puede ser un candidato como posible biomarcador para usarlo como blanco terapéutico, así como para diagnóstico y tratamiento.

Tomando esto en cuenta, se han realizaron análisis informáticos para encontrar genes blanco de diversos microRNAs. De esta forma, se han identificado secuencias MRE donde utilizan a PTEN como blanco de miR-21. En este estudio, se demuestra la regulación post-transcripcional entre miR-21 y la expresión de PTEN la cual se ve involucrada en los procesos de la promoción de la proliferación y supervivencia del cáncer cervical en líneas cervicales tumorales humanas transformadas con VPH, según lo reportado por Peralta-Zaragoza y colaboradores.<sup>18</sup>

También se ha demostrado que miR-21 juega un papel importante en cáncer cervical mediante la regulación de los genes RECK. Según lo reportado por Michiyoshi H y col., se observó que si miR-21 se encuentra sobre-expresado, la

actividad de los genes RECK disminuye; esta desregulación se asocia al proceso de metástasis<sup>19</sup>.

Además, en el grupo de trabajo (resultados aún no publicados), se realizó un análisis por medio de la regulación de miR-21 con el gen RECK en células cervicales humanas transformadas con VPH oncogénicos. De igual forma, se hizo un análisis informático y se demostró la regulación por medio de secuencias MRE. Los resultados muestran que el gen RECK es blanco de miR-21 siendo esta regulación génica positiva para el restablecimiento de la actividad del gen además de que el silenciamiento de miR-21 inhibe los procesos de invasión y metastasis.

Por otro lado, se ha observado la participación que tiene miR-21 en diversos tipos de cáncer como, por ejemplo, en glioma. El trabajo reportado por Gabriely G y col., demostró que miR-21 también participa en el proceso de metástasis al interrumpir la regulación a la baja de los supresores de metaloproteasas RECK y TIMP3<sup>4</sup>.

El microRNA miR-21 puede regular la expresión de diversos genes blanco los cuales pueden alterar procesos celulares<sup>4,14,18,19,25</sup>, así como a supresores tumorales o pueden tener actividades celulares importantes tales como el de un supresor tumoral<sup>18,19</sup>, por lo tanto, es importante conocer la regulación molecular que tiene miR-21 de genes blanco específicos. Se ha identificado en cáncer de mama una disminución en la expresión del gen BRMS1L, gen supresor tumoral que inhibe la transición epitelio-mesénquima y que codifica para la proteína SIN3A (involucrada en la represión transcripcional)<sup>6</sup>. Se ha demostrado que participa en el proceso de metastasis, sin embargo, la vía de regulación de este gen aún no está bien caracterizada<sup>6</sup>. Aunque existen mecanismos que pueden alterar la expresión de BRMS1L y esto es mediante las secuencias MREs de dicho gen las cuales son reguladas por miR-21.

En el presente proyecto de tesis, se identificaron tres secuencias MREs del RNA mensajero del gen BRMS1L localizadas en el extremo 3'-UTR, las cuales se obtuvieron de la plataforma miRTarBase (<http://www.mirtarbase.org/>). la cual es una base de datos específica que contiene elementos diana de diferentes microRNAs, así como sus interacciones con diversos genes blanco.

Con las secuencias encontradas, se realizaron las construcciones con el plásmido reportero, las cuales llevaron por nombre: PMRE21BRMLuc1, PMRE21BRMLuc2 y PMRE21BRMLuc3, las cuales corresponden a las 3 secuencias encontradas en miRBase. Estas construcciones fueron usadas para realizar los ensayos de transfección en las líneas celular con VPH+ (SiHa y HeLa), VPH- (C33A) y células no transformadas (HaCaT).

En los resultados obtenidos, se puede observar un patrón similar de comportamiento del gen reportero de Luciferasa en las líneas celulares SiHa y HeLa, las cuales son VPH +. En ambas líneas celulares se pudo observar un mayor restablecimiento de la expresión del gen reportero con las secuencias MRE2 y MRE3. Esto puede sugerir que ambas secuencias son el sitio de mayor reconocimiento a través del cual se realiza la regulación de miR-21 y BRMS1L en líneas celulares humanas transformadas con VPH con oncogénico.

Por otro lado, cuando se comparan con los datos obtenidos con la línea celular con VPH- (C33A), se puede observar una conducta similar a la apreciada con las células SiHa y HeLa en la expresión del gen reportero de luciferasa. Sin embargo, en contraste con las células SiHa y HeLa, las tres secuencias MREs tienen el mismo o un comportamiento similar, lo cual puede indicar que el comportamiento de regulación del gen reportero no solo es propio de VPH sino del cáncer como tal. Tomando al gen BRMS1L, los resultados podrían indicar que las tres secuencias MRE tienen la misma contribución en la regulación del gen.

Sin embargo, en la línea celular HaCat se observó un comportamiento distinto, en las cuales el patrón no se conserva y se puede observar que el silenciamiento del microRNA afecta de manera distinta o no afecta a la expresión del gen reportero de Luciferasa. Con respecto a las secuencias MRE, las diferencias obtenidas en los resultados entre las transfecciones y co-transfecciones de MRE2 y MRE1, no es significativa. En contraste con el MRE1 en donde sí hay una diferencia significativa y esto podría sugerir que existe una contribución en la regulación de BRMS1L ya que es el único MRE que detecta a miR21, pero de una manera

contraria. Esto quiere decir que, en lugar de reprimir al gen reportero, lo sobreexpresa. Esto puede ser debido a que no es una línea celular transformada como tal y en los ensayos de co-transfección, se aumenta el nivel de miR21 provocando que se disminuya la expresión endógena del microRNA y esto hace que se aumenten los niveles de genes blanco, en este caso, del gen reportero de luciferasa.

Estos resultados coinciden con lo reportado en la plataforma de miRTarBase (<http://www.mirtarbase.org/>) (Tabla 2), en donde se puede observar que el MRE que mayor complementariedad tiene respecto al gen BRMS1L es el MRE3.

Con base a los datos obtenidos se puede hacer una suposición del efecto que tendrá la transfección con miR-21 a nivel funcional en el gen BRMS1L en los distintos tipos celulares probados en este ensayo. Se vería un aumento en el nivel tanto de mRNA como de proteína en las células transformadas, sin embargo, en HaCaT no se vería cambio. Asimismo, probando las capacidades de migración de las células transfectadas, se observaría una diferencia respecto a las control en las líneas tumorales, pero esto no se apreciaría en líneas celulares no transformadas. Esto se tendría que comprobar mediante ensayos de PCR en tiempo real, Western-Blot y ensayos de migración celular como la Cámara de Boyden o ensayos de cierre de herida.

## 8. Conclusiones

1. Se identificaron tres secuencias MREs que son reconocidas por miR-21 y las cuales se encuentran en el extremo 3'-UTR del mensajero del gen BRMS1L.
2. Se demostró que miR-21 regula y tiene como blanco a BRMS1L en células cervicales humanas transformadas con VPH (SiHa y HeLa) y en la línea celular tumoral (C33A), mediante las tres secuencias MREs predichas siendo el MRE3 el principal sitio de reconocimiento para SiHa y HeLa por el cual miR-21 pueda regular a BRMS1L. Por otro lado, en C33A, las tres secuencias MRE tienen la misma contribución.
3. En los resultados obtenidos, se observa que en líneas celulares transformadas tanto con VPH + (SiHa y HeLa) como aquellas con VPH – (C33A), se muestra el mismo patrón de expresión de luciferasa. Esto sugiere que el microRNA blanco se está silenciando debido al RNA de interferencia y, por lo tanto, se reestablece la actividad del gen reportero sin haber una diferencia entre células VPH+ o – sugiriendo que el comportamiento depende tanto de la infección del VPH como de la transformación celular.
4. Por otro lado, en células no transformadas (HaCaT), se muestra un patrón diferente. Esto implica, que no se está llevando a cabo un silenciamiento significativo del microRNA blanco y, de esta forma, indica que no hay una alteración importante.

## 9. Bibliografía

1. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN database 2019. CANCER Mondial: <https://gco.iarc.fr/> [online].
2. Meng F, Henson R, Lang M, et al. *Involvement of human Micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines*. Gastroenterology. 2006;130(7):2113-29
3. Zhu S, Wu H, Wu F, et al. *MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis*. Cell Res. 2008;18(3):350-9.
4. Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C. C., Burchard, J., Linsley, P. S., & Krichevsky, A. M. (2008). *MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators*. Molecular and cellular biology, 28(17), 5369-80.
5. 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(5):6263-81.
6. Gong, Chang & Qu, Shaohua & Lv, Xiao-Bin & Liu, Bodu & Tan, Weige & Nie, Yan & Su, Fengxi & Liu, Qiang & Yao, Herui & Song, Erwei. (2014). *BRMS1L suppresses breast cancer metastasis by inducing epigenetic silence of FZD10*. Nature communications. 5. 5406. 10.1038/ncomms6406.
7. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2018*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2018.
8. Doorbar J. *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond). 2006; 110(5):525-41.
9. DiGiuseppe S, Bienkowska-Haba M, Guion LG, et al. *The cellular highways: how human papillomavirus travels from the surface to the nucleus*. Virus Res. 2017; 231:1-9.

10. Gadelha SR, Soares-Barreto DMV, Costa GB, et al. *Clinical, laboratory and epidemiological aspects of HPV infection in a low-income population from South Bahia, Brazil*. *Epidemiol Infect.* 2017;1-7.
11. Mittal S, Banks L. *Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation*. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017; 772:23-35
12. Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, et al. *Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53*. *Nature.* 2016; 529(7587):5415
13. Díaz-González SM, Deas J, Peralta-Zaragoza O et al. *Utility of microRNAs and siRNAs in cervical carcinogenesis*. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:374924
14. Juan L, Tong HL, Zhang P, et al. *Identification and characterization of novel serum microRNA candidates from deep sequencing in cervical cancer patients*. *Sci Rep.* 2014; 4:6277.
15. Fabián Flores, Miguel Ángel Martínez, Catalina Arenas, Alejandra Covarrubias y José Luis Reyes. (2007). *¡Silencio mensajeros! Qué son y cómo actúan los microRNAs*. Facultad de Medicina, UNAM.
16. GRCh38: Ensembl release 89: ENSG00000284190 - Ensembl, Mayo 2017.  
Recuperado de:  
[http://may2017.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000284190;r=17:59841266-59841337;t=ENST00000362134](http://may2017.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000284190;r=17:59841266-59841337;t=ENST00000362134)
17. Mjelle R, Sellæg K, Sætrom P, et al. *Identification of metastasis-associated microRNAs in serum from rectal cancer patients*. *Oncotarget.* 2017; 8(52):90077-90089.
18. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Meneses-Acosta A, De-la-O-Gómez F, Fernández-Tilapa G, Gómez-Cerón C, Benítez-Boijseauneau O, Burguete-García A, Torres-Poveda K, Bermúdez-Morales VH, Madrid-Marina V, Rodríguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A, Pérez-Plasencia C. *Relevance of mir-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells*. *BMC Cancer.* 16(1):215-232; 2016.)

19. Michiyoshi H, Mitsuo N, Naoya I, et al. *The Membrane-Anchored Matrix Metalloproteinase (MMP) Regulator RECK in Combination with MMP-9 Serves as an Informative Prognostic Indicator for Colorectal Cancer*. Clin Cancer Res. 2004; 10(16):5572-9.
20. Petrović N. *MiR-21 Might be involved in Breast Cancer Promotion and Invasion Rather than in Initial Events of Breast Cancer Development*. Mol Diagn Ther. 2016; 20(2):97-110.
21. (2018). *Uniprot*. Paired amphipathic helix protein Sin3a. Recuperado de: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q96ST3>
22. Dannenberg, J.-H., David, G., Zhong, S., van der Torre, J., Wong, W. H., & DePinho, R. A. (2005). *mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival*. *Genes & Development*, 19(13), 1581–1595. <http://doi.org/10.1101/gad.1286905>.
23. Hoja técnica: pMIR-Report Luciferase. Applied Biosystems. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/bp\\_5795.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/bp_5795.pdf)
24. Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, et al. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res. 2005; 65(16):7065-70.
25. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in Human glioblastoma cells*. Cancer Res. 2005;65(14):6029-33.

## Apéndice A

Línea celular	Condición de transfección	Actividad de luciferasa	MRE	$p$
SiHa	Transfección simple	636.681	1	0.0495
	Co-transfección	1383.341		
	Transfección simple	761.3383333	2	0.0495
	Co-transfección	1393.338667		
	Transfección simple	896.6723333	3	0.0495
	Co-transfección	1850.005333		
HeLa	Transfección simple	753.3476667	1	0.0495
	Co-transfección	1803.341		
	Transfección simple	1094.671667	2	0.0495
	Co-transfección	1360.005333		
	Transfección simple	980.0056667	3	0.0495
	Co-transfección	1980.005333		
C33A	Transfección simple	710.0143333	1	0.0495
	Co-transfección	1270.007667		
	Transfección simple	840.005	2	0.0495
	Co-transfección	1263.338667		
	Transfección simple	860.0056667	3	0.0495
	Co-transfección	1246.672		
HaCaT	Transfección simple	549.3516667	1	0.0495
	Co-transfección	812.028		
	Transfección simple	804.0353333	2	0.1266
	Co-transfección	895.041		
	Transfección simple	869.3686667	3	0.1266
	Co-transfección	698.052		

**Tabla de datos obtenidos en los ensayos de transfección para todos los tipos de líneas celulares.**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS**

Control Escolar de Licenciatura



~~2018-2019~~ **2019-2020**: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

**VOTOS DE APROBATORIOS**

Presidente del Consejo Directivo del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
**Presente.**

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. Papra Moreno Deborah Talina

Con número de matrícula 20144008618 cuyo título es:

"Análisis funcional de la regulación del gen BRMS1L por miR-21 a través de elementos de respuesta para micro-RNAs en células tumorales humanas transformadas con VPHs"

Consideramos que Si reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias con Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular**

**Atentamente**  
**"Por una humanidad culta"**

Cuernavaca, Morelos, a 25 de noviembre de 2019.

Grado, Nombre y Apellidos completos del jurado

PRESIDENTE: DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE

SECRETARIO: DR. RAÚL PERALTA RODRÍGUEZ

VOCAL: DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA

PRIMER SUPLENTE: DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA

SEGUNDO SUPLENTE: DRA. SONIA DÁVILA RAMOS

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo IICBA@uaem.mx

Firma

