



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**REGULACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL DEL GEN MDR1/PGP-170 A
TRAVÉS DE MIR-223.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ERIKA SICAHUI LÓPEZ CASTILLEJOS.

ASESORES: DR. GUILLERMO AQUINO-JARQUIN.

M. EN C. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

Regulación postranscripcional del Gen MDR1/Pgp-170 a través de miR-223

Que presenta la pasante: Erika Sicahui López Castillejos

Con número de cuenta: 408022501 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 7 de Marzo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er SUPLENTE	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
2do SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, bajo la dirección del Dr. Guillermo Aquino-Jarquin.

Este proyecto fue aprobado por el comité de investigación, ética y bioseguridad del Hospital infantil de México Federico Gómez, con el número de proyecto HIM/2012/037 y recibió financiamiento por parte de la fundación Terry Fox para apoyo de investigación en cáncer.

AGRADECIMIENTOS

Con cariño, a mis padres Heriberto López Valdivieso y Olga Castillejos Zurita por brindarme su apoyo y amor incondicional durante toda mi educación, tanto académica, como de vida, siendo mí ejemplo a seguir a través del tiempo.

A mi hermana Karla por ser mi compañera y amiga, de todos los días.

A mi director de tesis el Dr. Guillermo Aquino Jarquin, y a mi asesora interna la M. En C. Andrea Becerril Osnaya, agradezco su valioso apoyo y confianza en mi trabajo, y la capacidad de guiar mis ideas en el desarrollo de esta tesis, compartiendo desinteresadamente sus conocimientos, experiencia y consejos.

A mi abuelita Olga Zurita y a mi tía Nery Castillejos, por su compañía, apoyo y cuidado, durante estos últimos cinco años de mí desarrollo universitario, las quiero mucho.

A mi tía Leticia López por su ejemplo académico, para alcanzar las metas. Además de comprensión y cariño que agradezco infinitamente.

A todos mis familiares que no menciono, pero siempre llevo en mi mente con mucho aprecio, los cuales me han expresado palabras de aliento, cariño y apoyo, contribuyendo al termino exitoso de mi carrera.

A mis queridos amigos y compañeros, por acompañarme en esta gran experiencia, compartiendo vivencias en el trabajo cotidiano, y el gusto de realizar lo que hacemos.

Agradezco a Alejandro por su apoyo en todo momento, paciencia y tierna compañía. Gracias por compartir conmigo mis logros.

ÍNDICE GENERAL.

	Página
Índice de abreviaturas.	i
Índice de figuras.	ii
Índice de tablas.	iv
I. Resumen.	1
II. Introducción.	3
2.1 Pequeños RNAs horquillados (microRNA).	3
2.1.1 Biogénesis de los microRNAs.	4
2.1.2 Mecanismo de acción de los miRNAs.	5
2.1.3 Identificación del blanco de los miRNAs.	8
2.1.4 Papel de los miRNAs en la homeostasis fisiológica.	11
2.2 Proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples drogas. (Proteínas-MDR).	12
2.2.1 La glicoproteína P estructura y función.	13
2.2.2 Regulación de Pgp-170 a través de miRNAs.	15
III. Planteamiento del problema.	17
IV. Justificación.	18
V. Hipótesis.	19
VI. Objetivo general.	19
6.1 Objetivos particulares.	19
VII. Diagrama experimental.	20
VIII. Estrategia experimental.	21
IX. Resultados.	27
X. Discusión.	38
XI. Conclusiones.	42
XII. Perspectivas.	43
XIII. Anexos	44
XIV. Bibliografía.	45
XV. Referencia electrónica.	48

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

ABC	Casete de unión al ATP
ABCB1	Casete de unión al ATP, subfamilia B, miembro 1.
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosín Trifosfato
CAP	Caperuza
cDNA	DNA complementario
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dsODN	Oligonucleótidos de doble cadena
FT	Factores de Transcripción
H	Hora
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MDR	Multirresistencia a Drogas
MDR1	Multirresistencia a Drogas Familia 1
MFE	Energía libre mínima
Min	Minuto
miRISC	MicroRNA asociados al complejo de silenciamiento inducido por RNA
miRNA	Micro RNA
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MUT	Mutado
NBD	Dominio de Unión a Nucleótidos
nt	Nucleótido
ORF	Marco de lectura abierto en inglés Open Reading frame
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pgp-170	Glicoproteína P-170
Pre-miRNA	Micro RNA precursor
Pri-miRNA	Micro RNA primario
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción inversa
SC	Complementariedad de la secuencia
Seg	Segundo
siRNA	RNA pequeño interferente
SLC	Acarreador de soluto
SM	Secuencia semilla
U	Unidad
UTR	Región no traducible
WT	Silvestre
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromoles

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Página
1. Biogénesis de los miRNAs.	6
2. Mecanismo de acción de los miRNAs en busca de su mRNA blanco.	7
3. Represión de la traducción en las células animales mediada por miRNAs	8
4. Esquema de RT-PCR en tiempo real basada en sonda Taqman, para la cuantificación de miRNAs.	11
5. Estructura de la glicoproteína P.	14
6. Análisis <i>in-sílico</i> del UTR-3' del mRNA de Pgp-170, en donde se muestra un posible sitio de unión a miR-223	16
7. RT-PCR en tiempo real para miR-223 y U6, en células U937.	27
8. Amplificación de U6 por RT-PCR en tiempo real, en las células U937, con diluciones seriales del cDNA.	28
9. Amplificación de U6 y miR-223 por RT-PCR en tiempo real, en las células U937.	29
10. RT-PCR en tiempo real en las células AD-293, transfectadas o no con 1 µg del plásmido pLVXmiR-223 amplificando miR-223, además de la amplificación de miR-223 en las células U937.	30
11. Secuencia precursora de miR-223. De color verde se muestra la secuencia precursora de miR-223 y en color turquesa y rosa, la secuencia de los oligonucleótidos usados para la reacción de PCR punto en gradiente.	31
12. Amplificación de miR-223 por PCR en gradiente. Electroforesis en agarosa al 1 % para amplificar miR-223 a 5 temperaturas distintas.	32
13. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, de 5 µl del fragmento doblemente digerido (<i>EcoRI/BamHI</i>), correspondiente a la secuencia precursora de miR-223.	32
14. Electroforesis en geles de agarosa al 1%. En el panel a), primer	33

- carril se muestra en marcador de tamaño molecular (MWM) de 1kb. En el carril 2 se muestra el vector pLVX-shRNA2 control (sin digerir). En el carril 3, una alícuota del vector pLVX-shRNA2 digerido con *BamHI* y en carril 4, el vector digerido con la enzima *EcoRI*. En el panel b), se muestra la banda del vector doblemente digerido (*EcoRI/BamHI*), purificado por columna.
15. Representación esquemática del plásmido recombinante pLVXmiR-223. La región que da origen al precursor de miR-223 fue clonada río abajo del promotor Pol III U6. La proteína verde fluorescente que sirvió para evaluar la eficiencia de transfección, está bajo el promotor Pol II de CMV. 34
 16. A) Electroferograma obtenido de la secuenciación del plásmido pLVX-miR-223, usando el oligonucleótido U6-shRNA. B) Secuencia de 110 bases, correspondientes a la secuencia precursora de miR-223. 34
 17. Secuencia de unión de miR-223 al UTR-3' de Pgp-170. 35
 18. Secuencia correspondiente a las 65 bases del ER a miR-223, clonado en el vector de expresión psiABCB1wt. 35
 19. Representación esquemática de las construcciones generadas psiABCB1wt y psiABCB1mut. 36
 20. Electroferograma donde se muestra la secuencia del UTR-3' del mRNA de Pgp-170 clonada en el vector de expresión. En el recuadro rojo, se muestran los nucleótidos que fueron cambiados. 36
 21. Ensayo reportero de luciferasa para determinar el efecto regulador de miR-223, sobre el UTR-3' de mRNA de Pgp-170. 37
 22. Efecto regulador de miR-126 en el UTR-3' de IKBA en células HT29. Se transfectaron con vector original dual reportero de luciferasa (psi-vector), el mismo con el sitio tipo silvestre para miR-126 en de IKBA (psi-IKBA) o el sitio mutado (psi-mutIKBA). 44

INDICE DE TABLAS.

Tabla	Página
1. Bases bioinformáticas de miRNAs.	9
2. Secuencia de oligonucleótidos para amplificar la secuencia precursora de miR-223.	21
3. Secuencia de los oligonucleótidos para el UTR-3' de Pgp-170.	22
4. Tabla 4. Oligonucleótidos para RT-PCR en tiempo real.	25
5. Tabla 5. Condiciones de transfección para los ensayos de luciferasa.	26
6. Tabla 6. Unidades relativas de luciferasa de los controles	36

I. RESUMEN.

Se ha demostrado que la sobre-expresión de Pgp-170, el producto génico de *MDR1*, provoca la expulsión de los fármacos que ingresan a la célula, lo que reduce de manera importante su eficacia terapéutica. Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante, de 21-23 nucleótidos, que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional. De esta forma, los miRNAs pueden disminuir los niveles de RNA mensajero o bloquear su traducción, después de su alineamiento en las regiones no traducibles 3' (UTR-3') de los transcritos. Interesante, un análisis *in silico* de la región UTR-3' del mRNA de *MDR1*, indica la presencia de un posible sitio de unión para miR-223, lo que sugiere que este miRNA puede regular la expresión de Pgp-170. Hasta el momento, no existen reportes que involucren a miR-223 en la regulación de *MDR1*, en algún tipo de cáncer. En este proyecto, nuestro interés se centró en evaluar si existe una regulación directa de miR-223 sobre la región UTR-3' de Pgp-170.

La expresión de miR-223 fue determinada por RT-PCR tiempo real, usando una sonda TaqMan diseñada en el grupo de trabajo y que es específica para este miRNA. Para evaluar la funcionalidad de miR-223 sobre la región UTR-3', la secuencia precursora de miR-223 fue clonada en el vector pLVX-shRNA2 y la secuencia UTR-3' de mRNA de *MDR1* en el vector psiCHECK2. Posteriormente se evaluó la actividad postranscripcional, mediante ensayos de luciferasa, usando el kit comercial "Dual Luciferase Assay System".

Se corroboró la funcionalidad del plásmido que expresa el miR-223 utilizado para los ensayos reporteros. En células AD-293, que no expresan de manera endógena miR-223, por medio de RT-PCR en tiempo real, que al transfectar el plásmido pLVX-miR-223, existe una expresión de este miRNA, incluso mayor al de las células U937 que si lo expresan. Los ensayos de luciferasa sugieren fuertemente una regulación directa de miR-223 sobre el UTR-3' de Pgp-170, en donde existe una disminución en la actividad de luciferasa, cuando se cotransfecta el plásmido que expresa miR-223 y el plásmido que contiene la secuencia del UTR-3' (pLVX-miR-223/psiABCB1wt). El efecto de este miRNA fue específico ya que la actividad de luciferasa fue restablecida al transfectar la versión mutada del UTR-3', la cual presenta una mutación en el sitio de unión al miRNA (psiABCB1mut).

Se concluye que el vector de expresión pLVX-miR-223 es funcional para expresar miR-223 y permitió demostrar la regulación postranscripcional ejercida por este miRNA sobre la región UTR-3' de *MDR1*, en células en cultivo AD-293.

II. INTRODUCCIÓN.

2.1 Pequeños RNA horquillados (microRNA).

Los microRNAs son una clase de pequeños RNA no codificantes de cadena sencilla de 21 a 23 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica, a través de la unión al UTR-3' de los mRNA, resultando en la degradación o inhibición de su blanco. Estos RNAs juegan un papel importante en la regulación de procesos biológicos como el desarrollo, diferenciación y proliferación celular, los mecanismos de respuesta al estrés o en distintos procesos patológicos como el cáncer (AQUINO, G. 2007, HE, L. 2004).

En 1993, Víctor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum, fueron los primeros en descubrir los microRNAs (miRNAs); quienes encontraron que *lin-4*, un gen que actuaba en el control del desarrollo de *Caenorhabditis elegans*, no codificaba para proteínas, en cambio producía RNAs pequeños, de 22 nt de longitud. Víctor Ambros y Gary Ruvkun vieron que estos RNAs mostraban porciones antisentido complementarias a múltiples sitios de la región UTR-3' del gen *lin-14*. Observaron que se veía una disminución de la cantidad de proteína sin que hubiera una reducción de los niveles de mRNA. El pequeño RNA *lin-4*, es ahora reconocido como el miembro fundador de una clase muy abundante de pequeños RNAs reguladores. Desde el descubrimiento de *lin-4* en *C. elegans*, se han ido descubriendo miRNAs en otras especies y ahora sabemos que muchos organismos multicelulares expresan cientos de miRNAs. El segundo miRNA identificado fue *let-7*, proveniente de otro gen de *C. elegans*, el cual actuaba promoviendo el desarrollo de la larva tardía hacia la forma adulta. En 1999, Baulcombe y colaboradores descubrieron miRNAs que también participan en el silenciamiento de genes vegetales. Pero hasta el año 2001 fue introducido el término miRNA formalmente (LAGOS-QUINTANA, M. 2001; LAU, NC. 2001). El descubrimiento de miRNAs y sus mRNAs blanco ha descubierto nuevos mecanismos de regulación de la expresión génica (WEI, SUN. 2010).

2.1.1 Biogénesis de los microRNAs.

Los genes que codifican para los miRNAs están localizados en el genoma, en regiones inter e intragénicas, así como también en regiones intrónicas de genes que pueden codificar para proteínas. En el caso de las microRNAs intragénicas, la expresión de los éstos, puede ir correlacionada con la regulación transcripcional de su gen huésped y de esta manera explicaría una especificidad tisular debida a la expresión de diferentes grupos de genes. En el caso de los miRNAs intergénicos, la expresión de los miRNAs viene regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores, como sus propios promotores. También se ha observado que los miRNAs pueden estar derivados de secuencias repetidas de DNA (GAROFALO, M. 2011). Los microRNAs se generan en el núcleo de la célula, transcritos por la RNA polimerasa II, que produce una molécula larga de RNA, con una estructura en forma de tallo-burbuja. Esta estructura se denomina miRNA primario (pri-miRNA), la cual es reconocida por una endonucleasa RNasa III llamada Drosha, que corta solo RNAs de doble cadena y que se asocia a la proteína DGCR8 en mamíferos o Pasha en *Drosophila* y *C. elegans*. El corte realizado por la enzima Drosha se da en el extremo cercano a la base de la horquilla del pri-miRNA y genera una estructura conocida como miRNA precursor (pre-miRNA), que tiene un tamaño de aproximadamente 60 a 70 nucleótidos de longitud. Posteriormente, los miRNAs precursores son exportados al citoplasma celular de forma activa, a través de Exportina-5, un complejo proteico dependiente de RAN-GTP, para su proceso de maduración. RAN es un cofactor que se une GTP durante la exportación nuclear de RNA. En el citoplasma, la molécula GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miRNA es liberado del complejo exportador. Posteriormente, ocurre un segundo corte por otra endonucleasa tipo III de reconocimiento de RNAs de doble cadena llamada Dicer, asociada a las proteínas TRBP y PACT en mamíferos, dando lugar a una estructura de doble cadena, de 21 a 23 nucleótidos. Sin embargo, estas dobles cadenas tienen que separarse, pues solo una de las dos será incorporada a una maquinaria enzimática denominada "Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA" (RISC, por sus siglas en inglés), para dirigir el reconocimiento y acoplamiento de los miRNAs con los mRNAs blanco que se desean desactivar. La hebra que se une al complejo RISC se convierte en el miRNA maduro, también denominada hebra guía, mientras que la otra hebra complementaria, denominada pasajera, es degradada. Una vez que se lleva a cabo este reconocimiento del miRNA con su mRNA, este es cortado por la enzima Argonata 2 que se encuentra asociada a RISC. Después del corte, el miRNA se mantiene intacto y puede guiar el reconocimiento y

destrucción de mensajes adicionales, lo que hace altamente eficiente el silenciamiento génico mediado por estos pequeños RNAs (Figura 1). (GAROFALO, M. 2011; AQUINO, G. 2007).

2.1.2 Mecanismo de acción de los miRNAs

Los miRNAs pueden regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: la degradación del mRNA blanco o mediante la represión traduccional. Esto dependerá del grado de complementariedad del miRNA con su blanco. Si la complementariedad es perfecta o total se producirá la degradación del mRNA, mientras que si la complementariedad es parcial se producirá una inhibición de la traducción.

Los 7 nucleótidos de la región semilla, que comienza en el segundo nucleótido del 5' terminal del miRNA, son necesarios para la interacción miRNA-mRNA. La interacción miRNA-mRNA se produce predominantemente en la region UTR-3' del mRNA blanco, situado 3' rio abajo del marco de lectura abierto (ORF) (Figura 2). (WEI, SUN. 2010).

Cuando el apareamiento de bases es perfecto, entre el miRNA y el mRNA, principalmente en las células vegetales, existe una escisión endonucleolítica y por lo tanto la degradación del transcrito.

De acuerdo a los estudios realizados con siRNAs, se cree que serían necesarios al menos 11 pb para una elevada afinidad en el reconocimiento del mRNA diana y la unión a RISC. Sin embargo, Doench y Sharp reportaron que el potencial de los miRNAs para suprimir la traducción dependía enormemente de la energía libre de unión entre los primeros 8 nt del extremo 5' del miRNA y del mRNA blanco (DOENCH, J. 2004).

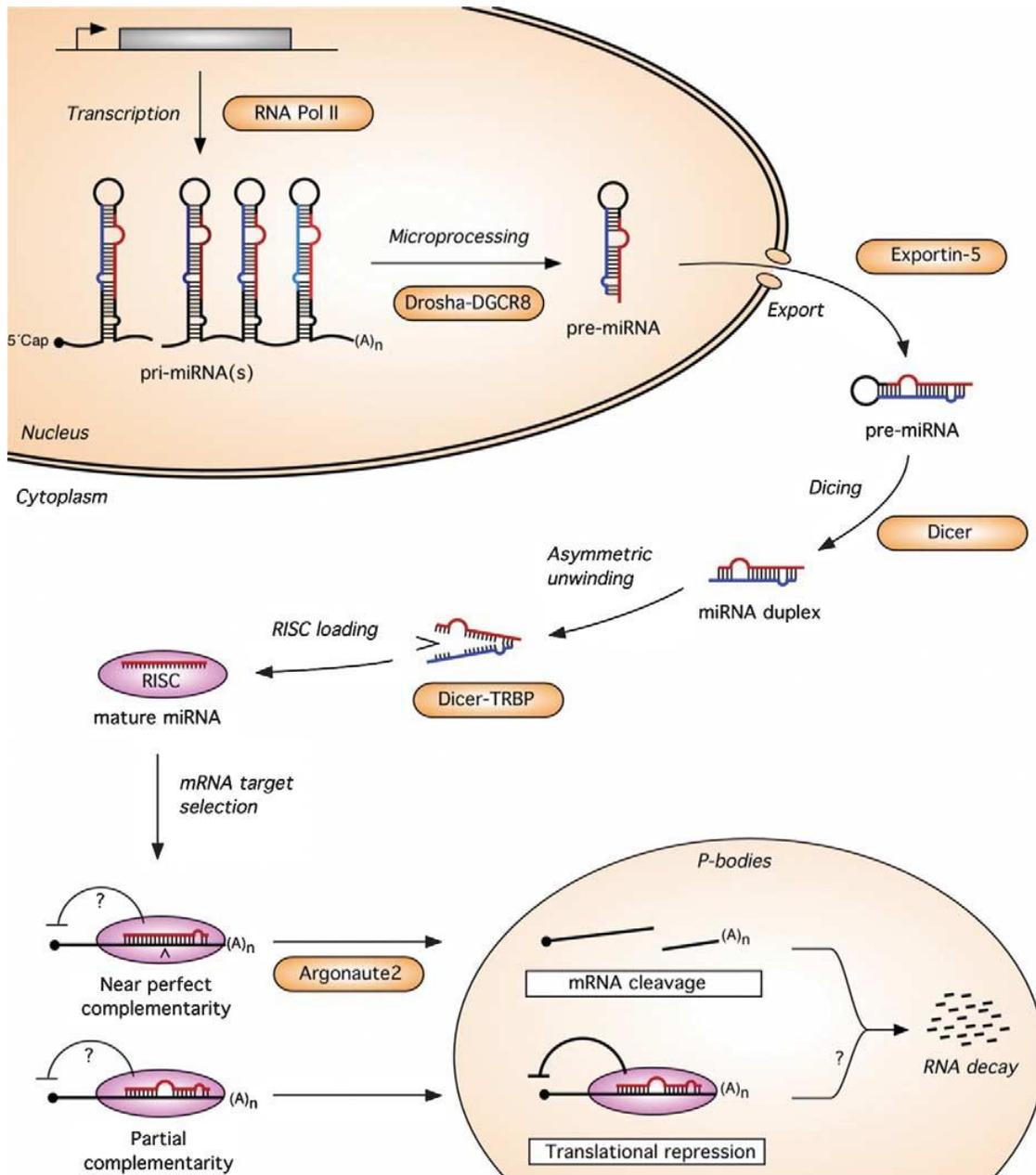


Figura 1. Biogénesis de los miRNAs. (WIENHOLDS, E. 2005).

Respecto a la represión traduccional, se requieren varias regiones de unión de miRNAs para una interacción miRNAs-mRNA de alta afinidad, que suprima la traducción. Es plausible pensar que microRNAs asociados a RISC (miRISC) reconoce una unión imperfecta entre miRNA/mRNA con solo 7-9 nt, por lo que se uniría a su blanco con baja afinidad. Uniones no canónicas pueden estar presentes en la parte media del dúplex

miRNA-mRNA. Por lo que múltiples copias de miRISC podrían unirse al blanco para compensar la unión de baja afinidad entre el miRISC y mRNA. (NIELSEN, C. 2007).

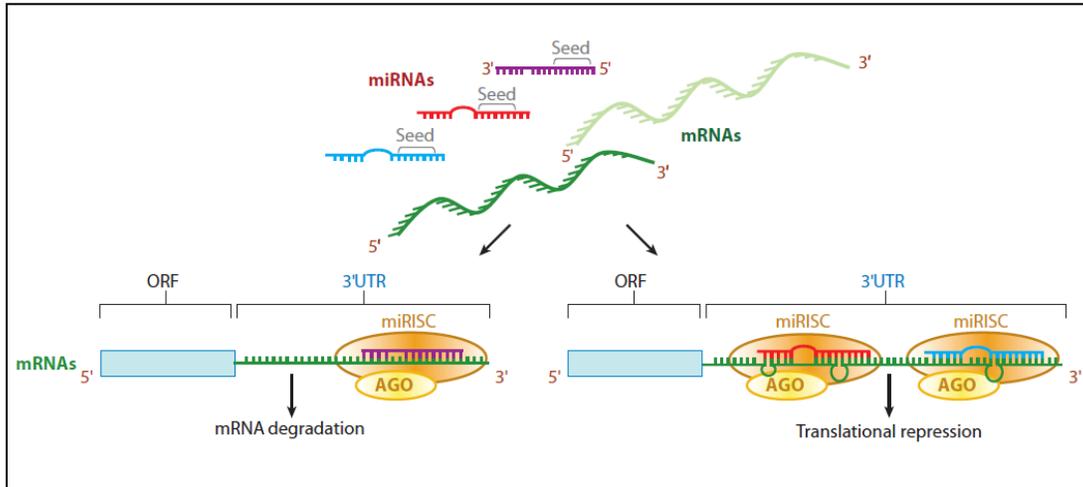


Figura 2. Mecanismo de acción de los miRNAs en busca de su mRNA blanco. (WEI SUN, 2010).

En las células animales, el miRNA puede suprimir la traducción de proteínas por los efectos directos e indirectos (Figura 3). Los efectos directos se ejercen en las diversas fases de la traducción de proteínas, incluyendo la represión en la iniciación de la traducción, evitar el ensamblaje del ribosoma para la iniciación, la represión en pasos post-iniciación, y la inhibición de la elongación o terminación.

La represión traduccional indirecta mediada por los miRNAs, se produce al nivel de mRNA y es causado por la desestabilización y la posterior degradación, así como la compartimentalización y el secuestro de los mRNA blanco. En este modo de acción, los miRNAs desestabilizan su blanco principalmente a través de deadenilación. La compartimentalización y el secuestro se llevan a cabo en regiones del citoplasma de células eucariotas conocidas como cuerpos de procesamiento (cuerpos P), donde los mRNAs son silenciados (WEI SUN, 2010).

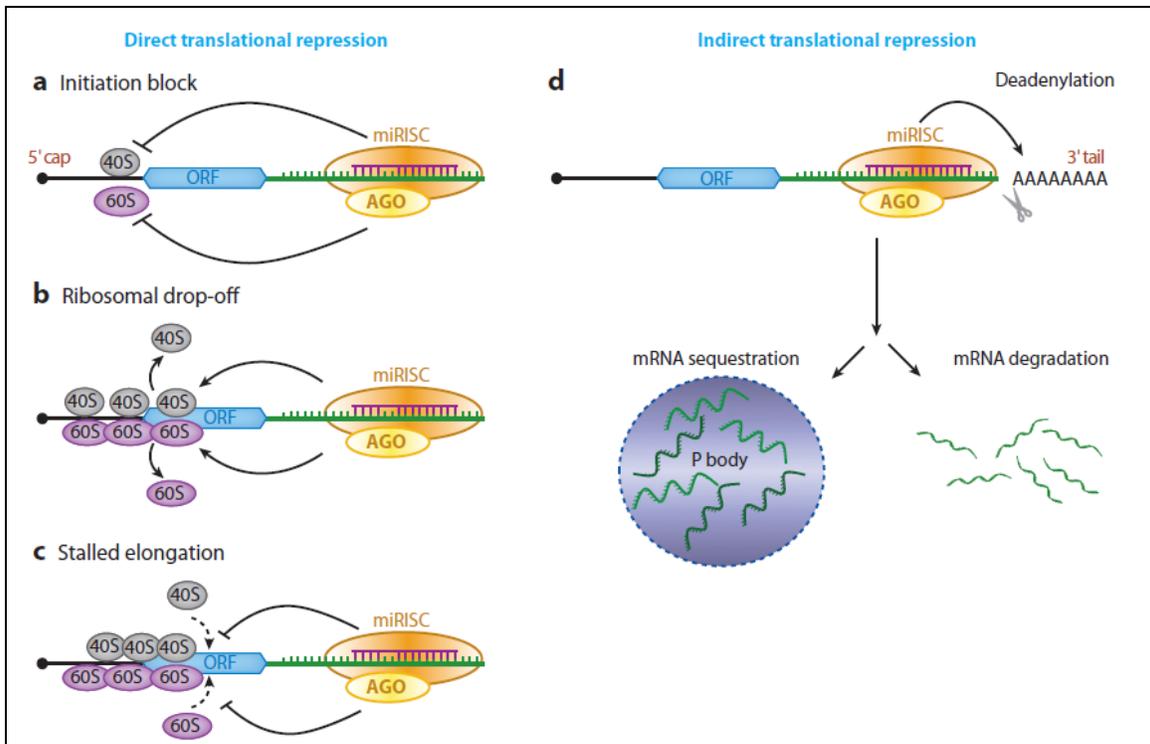


Figura 3. Represión de la traducción en las células animales mediada por miRNAs. La interacción miRISC-mRNA puede dar lugar a diversos modos de represión de la traducción. (a) El bloqueo de la iniciación: el reclutamiento de la subunidad 40S y/o 60S de los ribosomas cerca de la cap 5' de mRNA se inhibe. (b) Desensamblaje ribosomal: Los ribosomas 40S/60S se disocian del mRNA. (c) Represión del alargamiento: Evita que los ribosomas 40S/60S formen parte en el proceso de elongación. (d) La represión indirecta de traducción por miRISC se produce a través de adenylation, cuando la cola de poli A 3' del mRNA es eliminada, dando lugar a aumento de la degradación del mRNA. Alternativamente, el mRNA desestabilizado resultante de adenylation se va a los cuerpos P y por lo tanto es secuestrado por la maquinaria de degradación traduccional. (WEI SUN, 2010).

2.1.3 Identificación del blanco de los miRNAs

Cada miRNA puede tener muchos mRNAs blanco y cada mRNA puede estar regulado por más de un miRNA. Debido a que la identificación experimental de blancos de los miRNAs es difícil, se han diseñado programas bioinformáticos para la predicción de estos posibles sitios. La mayoría de los algoritmos consideran los siguientes parámetros: la complementariedad de secuencia miRNA-mRNA, la termodinámica del híbrido miRNA-mRNA, la conservación de secuencias blanco entre las especies, la estructura secundaria del mRNA y los cambios después de la formación del híbrido miRNA-mRNA entre otros. Las predicciones obtenidas mediante el empleo de estos algoritmos bioinformáticos, han sido validadas experimentalmente, apoyando las predicción *in silico* (Tabla 1.).

Tabla 1. Bases bioinformáticas de miRNAs.

Base de datos de miRNAs o predicción de blancos de miRNAs	Dirección electrónica	Abordaje
miRBase	http://www.mirbase.org	Colección completa de miRNAs conocidos para todas las especies.
ASRP	http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/	Colección de miRNAs conocidos en plantas.
miRGen	http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html	Identifica interacciones de miRNAs y sus blancos en animales con el uso de múltiples programas de predicción.
CoGemiR	http://cogemir.tigem.it/	Genómica comparativa de miRNAs.
Base de datos de predicción de blancos de miRNAs	Dirección electrónica	Abordaje
TargetScan	http://www.targetscan.org	Secuencia semilla (SM), la complementariedad de secuencia (SC), y un mínimo de energía libre (MFE) del miRNA /dúplex blanco, las preferencias de la secuencia de sitios diana
miRanda	http://www.microrna.org	SM, SC, and MFE
PicTar	http://www.pictar.org/	Identifica SM, SC, MFE e interacciones miRNA.
mirWIP	http://mirtargets.org/	Considera SM, SC, MFE, la estadística de las interacciones entre los miRNA y su diana.

Así, software y algoritmos basados en enfoques *in silico*, son necesarios para ayudar a determinar los loci genómicos, funciones y blancos de los miRNAs. Los rápidos avances en la biología de los miRNA, incluyendo funciones de estos, han dado la motivación para introducir este campo fronterizo a la disciplina de bioingeniería.

Los métodos actuales para la detección y cuantificación de miRNAs son Northern blott, análisis de microarreglos y qPCR entre otros. A pesar de que estos métodos podrían mejorar el rendimiento de los perfiles de expresión génica de los miRNA, algunos de estos

son relativamente limitados en términos de sensibilidad y especificidad. La baja sensibilidad se convierte en un problema para la cuantificación de los miRNA, ya que es difícil amplificar estas secuencias tan cortas de RNA. Por otra parte, la baja especificidad de los métodos de detección puede dar lugar a falsos positivos. (CHEN, C. 2005).

La PCR en tiempo real es el estándar de oro para la cuantificación de la expresión génica. Es un método de detección preciso y sensible para la cuantificación de miRNAs y otros RNAs pequeños. Este método expande la tecnología de PCR, para la detección de los cambios en la expresión de macromoléculas (por ejemplo, mRNA) a micromoléculas (por ejemplo miRNAs). (CHEN, C. 2005).

Ha sido un reto para los científicos diseñar un ensayo convencional de PCR para miRNAs con un promedio de de 22 nt de longitud. En la actualidad, el método estándar que cuantifica específicamente miRNAs está basado en un oligonucleótido tallo-burbuja RT (del inglés stem-loop RT primer). La reacción de RT-PCR en tiempo real, incluye dos pasos: reacción de retro-transcripción y PCR en tiempo real. 1) En primer lugar, la formación de cDNA a partir de oligonucleótido tallo-burbuja RT, que hibridan en la secuencia 3' de la molécula miRNA y se transcribe de forma inversa. 2) Posteriormente, al producto de la RT, se hibrida el oligonucleótido sentido y antisentido, para el alargamiento producido por el despliegue del oligonucleótido tallo-burbuja RT, en donde la formación de dobles cadenas, es cuantificado usando una sonda TaqMan convencional, acoplada a un fluoróforo (Figura 4). (CHEN, C. 2005).

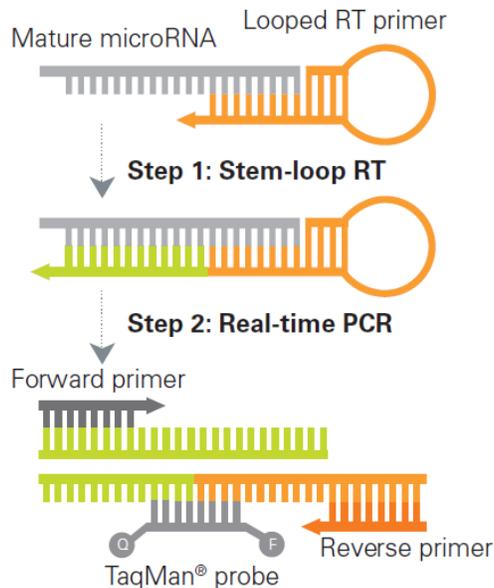


Figura 4. Esquema de RT-PCR en tiempo real basada en sonda Taqman, para la cuantificación de miRNAs. (Life Technologies Corporation, 2010).

Los ensayos de RT-PCR en tiempo real con sondas TaqMan, para miRNAs pueden detectar tan poco como diez copias de transcripción en una muestra; incluso pequeños cambios se detectados en la expresión. Las sondas son más pequeñas que las tradicionales doblemente marcadas, lo que permite llegar eficazmente a las secuencias difíciles y aumentar la especificidad. Con las ventajas de esta técnica de oro, la capacidad de perfilar eficazmente a los miRNAs aumenta, proporcionando una solución práctica para su detección. (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION, 2010).

2.1.4 Papel de los miRNAs en la homeostasis fisiológica.

Los miRNAs pueden jugar un papel clave en diversos procesos biológicos, incluyendo la proliferación celular, la apoptosis, la tumorigénesis, la multiresistencia a drogas (MDR) y de manera importante en carcinogénesis. Lo anterior les confiere un papel importante en la homeostasis celular y su papel en las alteraciones fisiopatológicas. (HONGWEI, ZHANG., 2010, HAITAO, BAI, 2011).

Se ha demostrado que la participación de los miRNAs en apoptosis, proliferación, supervivencia y metástasis, sin duda contribuyen al desarrollo del cáncer. La evidencia

experimental indica que el uso miRNAs puede representar una poderosa estrategia terapéutica, para interferir con las principales vías moleculares involucradas en cáncer, que proporciona información detallada acerca de cómo actúan los miRNAs, ya sea como oncogenes o genes supresores de tumores. Aunado a la creciente comprensión de esta regulación, los miRNAs podrían ser útiles herramientas moleculares para futuras aplicaciones clínicas (GAROFALO, M. 2011).

2.2 Proteínas Relacionadas con la Resistencia a Múltiples Drogas (Proteínas-MDR).

La práctica clínica diaria pone en evidencia que la mayoría de los tumores sólidos, de forma innata o adquirida, terminan siendo resistentes a múltiples fármacos quimioterapéuticos, con estructura y mecanismos de acción muy diferentes. Este fenómeno se ha descrito experimentalmente y recibe el nombre de resistencia a múltiples drogas o MDR (del inglés "Multidrug Resistance"). En su descripción inicial, este fenómeno se relacionó con una proteína transportadora de la membrana celular llamada Pgp, pero posteriormente se descubrieron otros mecanismos causantes del fenotipo celular multirresistente, como los ligados a otras proteínas transportadoras, a las alteraciones de enzimas como las topoisomerasas, o a sistemas detoxificantes como el del glutatión (GSH). (SANCHEZ, P. 2006).

La historia de las proteínas causantes de resistencia a múltiples drogas o proteínas-MDR, se inicia en 1973, con el descubrimiento por Keld Dano, de la expulsión activa de daunomicina en células tumorales resistentes. Estas células habían sido expuestas únicamente a esta droga, pero presentaban resistencia cruzada con la doxorubicina y los alcaloides de la vinca. Estudios posteriores describieron el fenotipo celular resistente a múltiples drogas o fenotipo MDR, que consistía en que células seleccionadas para resistencia mediante la exposición a un único agente antineoplásico, desarrollaban resistencia a una amplia variedad de compuestos estructuralmente diferentes. En 1976, Juliano y Ling descubrieron una glucoproteína en la membrana plasmática de células multi-resistentes, que por sus características, parecía una buena candidata para ser una bomba de expulsión. Pero fue en 1983, cuando Víctor Ling y otros investigadores, dieron a conocer que el aumento de expresión de esa proteína llamada glicoproteína P (Pgp; del

inglés “P-glycoprotein”), estaba implicada en la resistencia a múltiples drogas en líneas celulares de mamíferos (DANO, K. 1973; JULIANO, R. LING, V. 1976; KARTNER, N.1983).

Estas proteínas se encuentran presentes en numerosos tejidos normales del organismo humano y en los tumores que de ellos se derivan. El hecho de que muchos de estos tejidos tengan funciones secretoras-excretoras (riñón, hígado, epitelio digestivo y respiratorio), hace pensar que las proteínas-MDR desempeñen funciones fisiológicas de protección ante toxinas exógenas (ZAMAN, G. 1994).

Las drogas afectadas por las proteínas-MDR, aunque presentan diferencias en su estructura y mecanismo de acción, tienen características comunes como ser compuestos de origen natural, lipofílicos, y con peso molecular entre 300 y 900 Da, que entran en la célula por difusión pasiva.

2.2.1 La glicoproteína P estructura y función.

Los transportadores de membrana son proteínas que regulan la entrada de nutrientes esenciales y iones, así como la salida de los productos del metabolismo celular, las toxinas ambientales y otros productos xenobióticos. En lo referente al transporte de los fármacos, los transportadores más representantes son los miembros de dos superfamilias:

- ABC: casete de unión de trifosfato de adenosina (ATP), del inglés *ATP binding cassette*.
- SLC: acarreador de solutos, del inglés *solute carrier*.

La mayor parte de las proteínas ABC corresponden a transportadores activos primarios, que dependen de la hidrólisis del ATP para bombear en forma activa sus sustratos a través de la membrana. Existen 49 genes conocidos para las proteínas ABC, que se pueden agrupar en siete subclases o familias de ABCA a ABCG. Actúan como “bombas de expulsión”, disminuyendo la acumulación intracelular de varias sustancias. Uno de los transportadores mejor conocidos en la superfamilia ABC es la glucoproteína P, codificada por ABCB1, también llamada MDR1. (UEDA, K. 2011).

De los genes de multi-resistencia a fármacos, el gen MDR1 es el más estudiado, localizado en el cromosoma 7. Su producto génico, la glicoproteína P, es una proteína transmembranal de 170-kD (Pgp-170) (Figura 5). La Pgp-170 es expresada de manera constitutiva en tejido normal y su función fisiológica es la de una bomba expulsora dependiente de ATP, que minimiza la exposición de componentes potencialmente tóxicos en el medio intracelular, entre los que se incluyen los fármacos quimioterapéuticos (HABER, 1992).

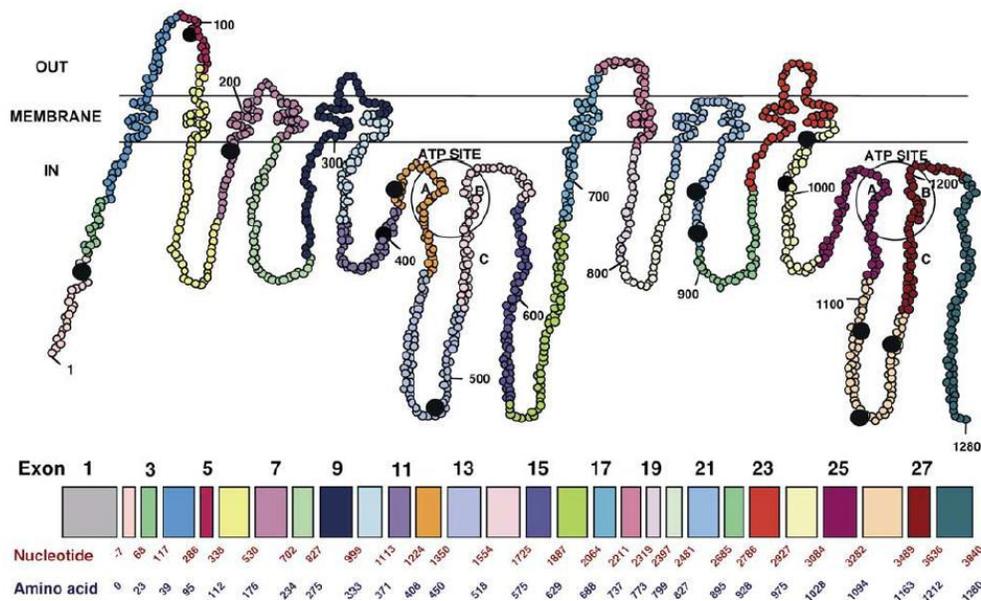


Figura 5. Estructura de la glicoproteína P. (AMBUDKAR, SV. 2003).

La expresión de Pgp determina un fenotipo celular resistente a varios productos naturales como son: antraciclinas, alcaloides de la vinca, taxanos entre otros; y a compuestos exógenos como son los bloqueadores de los canales del calcio (verapamil), digoxina, opiáceos, hidrocarburos aromáticos, complejos sintéticos como el Tc99-sestamibi, rodamina 123 o antiviricos como son los inhibidores de proteasas. (SANCHEZ, P. 2004).

Se ha demostrado que la sobre-producción de Pgp-170 provoca la secreción de los fármacos que ingresan a la célula y posteriormente, la reducción del contenido intracelular de los mismos (FORD JM, 1990; WANG, 2007). Debido a que muchos fármacos son sustratos de Pgp-170, su grado de expresión y la funcionalidad afecta directamente a la eficacia terapéutica de estos agentes, por lo que se ha propuesto que la expresión de

mRNA de Pgp-170 correlaciona con la agresividad intrínseca del tumor y a la resistencia a fármacos, después de la quimioterapia (GOLDSTAIN, 1989; FOJO, 1987). Así por ejemplo, se conoce que la exposición a fármacos quimioterapéuticos induce la sobreexpresión de la Pgp-170, de manera significativa, en células blásticas (PASTAN, 1987; HARBER, 1992). En particular, la resistencia a la quimioterapia se ha convertido en un obstáculo importante en el tratamiento contra el cáncer, pero el mecanismo exacto de regulación de la expresión de la proteína gp-170 no ha sido completamente elucidado.

2.2.2 Regulación de Pgp-170 a través de miRNAs.

En años recientes, el papel de los miRNAs en la regulación de este gen, se ha propuesto en diferentes tipos de cánceres. Por ejemplo, tanto en cáncer de ovario, como en carcinoma hepatocelular, la P-gp-170 y los miRNAs miR-27 y miR-16, respectivamente, se encuentran sobre-expresados. (TSUN, Y, 2011, LI Z, 2010). Por otra parte, en cáncer de mama, se ha visto que miR-505 actúa como un supresor de tumor, cuando ocurre la inhibición de la expresión de MDR1, de manera indirecta por la proteína TP53INP1 (YAMAMOTO Y, 2011). En Leucemia Mieloide Crónica, miR-331-5P y miR-27a están asociados a la resistencia con doxorrubicina, mediada por Pgp-170. (DAN-DAN, 2011). Particularmente en células de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), de linaje T, se ha reportado un conjunto de miRNAs responsables de la supresión cooperativa de tumores, entre los que se encuentran miR-19b, miR-20a y miR-223. Entre estos miRNAs, se ha destacado la participación de miR-223, el cual se ha encontrado sobre-expresado de manera importante en LLA, donde se le ha atribuido un valor diagnóstico en este padecimiento. (KONSTANTINOS J, 2011, YUAN D, 2011).

Por otra parte, no existen reportes del papel del miR-223 en la modulación de MDR1/Pgp-170 en algún tipo de cáncer. Interesantemente, un análisis *in silico* realizado en nuestro grupo de trabajo, indica que el UTR-3' del mRNA de Pgp-170, presenta un posible sitio de unión a miR-223 (Figura 6), lo que sugiere que este miRNA podría regular a MDR1/Pgp-170 de manera postranscripcional. Siendo MDR1 un obstáculo para el tratamiento eficiente contra el cáncer, el encontrar los mecanismos involucrados en la regulación ejercida por los miRNAs, impactará en el entendimiento de la biología que subyace en la resistencia a agentes quimioterapéuticos.

ABC1 ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1



Figura 6. Análisis *in-silico* del UTR-3' del mRNA de Pgp-170, en donde se muestra un posible sitio de unión a miR-223. (www.microRNA.org).

MiR-223 es un microRNA hematopoyético con funciones cruciales en el desarrollo del linaje mielóide. Desempeña un papel esencial en la promoción de la diferenciación granulocítica mientras que también se asocia con la supresión de la diferenciación eritrocitaria (CHEN, C. 2004). En algunos tipos de cáncer, miR-223 se correlaciona con mayor carga tumoral, agresividad de la enfermedad y factores de mal pronóstico (YUAN-DONG, Z. 2011). Este miRNA también está asociado con la artritis reumatoide, sepsis, diabetes tipo 2, e isquemia hepática.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La práctica clínica diaria pone en evidencia que gran parte de los tratamientos antineoplásicos de diferentes tipos de cáncer, terminan siendo resistentes a múltiples agentes antineoplásicos, impidiendo su efecto terapéutico. Esto debido a que el fármaco activo no llega a su diana molecular en el interior de la célula, por lo tanto cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo puede ser causa de resistencia.

Se han demostrado diversas causas que provocan la resistencia quimioterapéutica, de las cuales, la expulsión del fármaco fuera de la célula, a través de proteínas transportadoras de membrana, es el mecanismo de resistencia más estudiado. Se ha indicado que la sobreproducción de Pgp-170, provoca la secreción de los fármacos que ingresan a la célula. No obstante, el mecanismo exacto de la expresión de esta proteína no ha sido completamente elucidado, por lo que es necesario comprender otros mecanismos implicados en la regulación de esta proteína. Interesantemente, ensayos *in silico* sugieren un sitio de unión a miR-223 y por ende podría estar implicado en el mecanismo de quimioresistencia en cáncer. Lo anterior permite plantear la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe una regulación directa de miR-223 en la expresión de Pgp-170?

IV. JUSTIFICACIÓN.

La resistencia a la quimioterapia representa un obstáculo importante en la eficacia al tratamiento contra el cáncer. En la actualidad los miRNAs se han visto implicados en diversos procesos biológicos como el desarrollo, la diferenciación y la proliferación celular, así como en los mecanismos de respuesta al estrés y de manera importante en carcinogénesis. El mecanismo de regulación de la expresión de Pgp-170 mediada por miR-223 no se conoce, por lo que elucidar esta posible regulación, permitirá proponer un mecanismo alternativo, implicado en la adquisición de resistencia a fármacos.

V. HIPÓTESIS.

Si existe una interacción directa de miR-223 sobre la región UTR-3' del mRNA de MDR1/Pgp-170, se observará una disminución en la señal de luciferasa, lo que denotará una regulación postranscripcional ejercida por el miRNA.

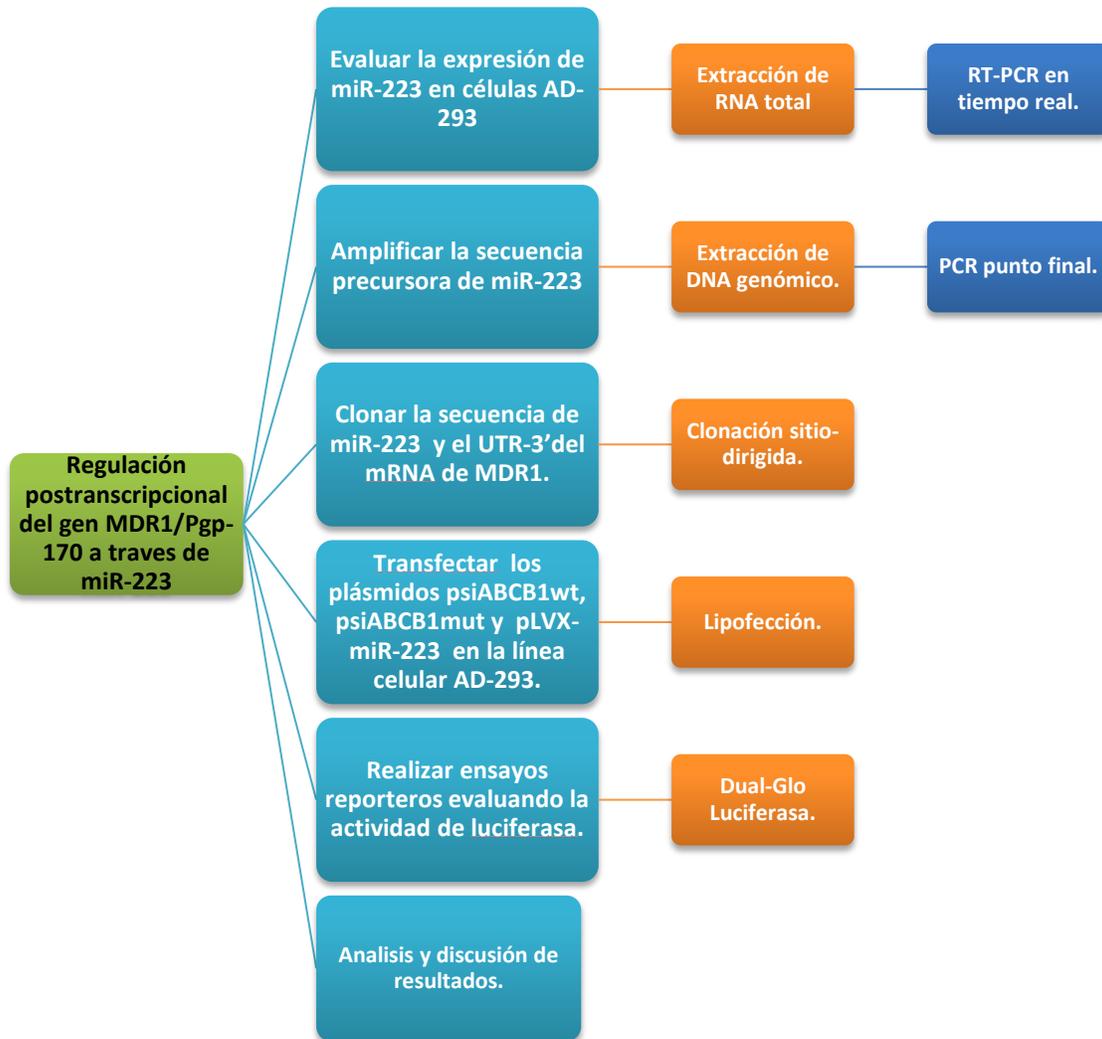
VI. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la funcionalidad de miR-223 sobre la región UTR-3' de MDR1/Pgp-170.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Amplificar y clonar la secuencia precursora de miR-223 en el vector pLVX-shRNA2 (Clonación sitio-dirigida).
- Clonar la secuencia UTR-3' del mRNA de MDR1/Pgp-170, en el vector psiCHECK2 (dsODN).
- Transfectar los plásmidos psiABCB1 y pLVX-miR-223 en la línea celular AD-293 (Lipofección).
- Evaluar la expresión de miR-223 en células AD-293 (RT-PCR tiempo real).
- Realizar ensayos reporteros con las construcciones generadas, para evaluar la actividad de luciferasa (Dual Glo-luciferasa).
- Sintetizar dsODN que incluyan la mutación en el sitio de unión de miR-223 y clonarlo en el vector psiCHECK2.
- Evaluar la actividad de luciferasa con el plásmido mutado para el sitio de unión de miR-223 (Dual Glo-luciferasa).

VII. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.



VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Reacción de PCR punto final.

Para amplificar la secuencia precursora de miR-223 mediante PCR punto final, se diseñaron oligonucleótidos específicos, con los sitios de restricción seleccionados para su posterior clonación en el vector de expresión pLVX-shRNA2 (Clontech):

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos para amplificar la secuencia precursora de miR-223.

Oligonucleótidos	Secuencia
MiR-223 sentido	5'- GGATCC CTCTAGGGTCACATCTCCAG -3' *
MiR-223 antisentido	5'- GAATTC AACTTGGTGCTTGGTGAGCATC-3' *

*Las letras en negritas denotan los sitios de restricción empleados (*BamHI/EcoRI*).

Inicialmente, se extrajo DNA genómico a partir de sangre periférica de un individuo aparentemente sano, usando el kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para la reacción de PCR se utilizaron 100 ng los oligonucleótidos específicos (900nM), 1 U *TaqPlatinum*® pfx (Invitrogen), buffer de amplificación 10x Pfx, dNTPs 10 mM, MgSO₄ 50 mM, aforando a un volumen final de 25 µl con H₂O libre de nucleasas. Para las condiciones de amplificación primero se realizó un gradiente de temperaturas de alineamiento (60°C, 63°C, 66°C, 67°C y 70°C), para seleccionar la más adecuada, por lo que los parámetros finales fueron: desnaturalización inicial de 95 °C/5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C/ 30 seg, alineamiento 63 °C/ 30 seg, extensión 72 °C/ 1 min, una extensión final a 72 °C/ 10 min.

Posteriormente, se realizó un gel preparativo de agarosa al 1% para limpiar el amplicón obtenido mediante el kit comercial PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Reacción de hibridación de los oligonucleótidos (formación de oligonucleótidos de doble cadena; dsODN).

Antes de la clonar de la secuencia UTR-3' del mRNA de MDR1/Pgp-170 en el vector psiCHECK2, primero se generó un oligonucleótido de doble cadena (dsODN), de ~60 pb que contenía el sitio de unión de miR-223. La reacción de hibridación se llevó a cabo calentando cantidades equimolares de cada oligonucleótido (100 μ M), en agua libre de nucleasas, a 95 °C/ 5 min y la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. Esta misma estrategia se siguió para la obtención de las secuencias mutantes (dsODN mutados).

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos para el UTR-3' de Pgp-170.

Oligonucleótido	Secuencia
UTR-3' Pgp-170 sentido	5'-TCGAGTTTATATTTTCCCATTGGACTGTAACTGACTGC CTTGCTAAAAGATTATAGAC -3' *
UTR-3' Pgp-170 antisentido	5'-GGCCGCTCTATAATCTTTAGCAAGGCACTCAGTTACA GTCCAAATGGGAAAATATAAACG-3' *
UTR-3' Pgp-170 sentido mutado	5'- TCGAGTTTATATTTTCCCGACAGTCA TGTGGTACAA TGC CTTGCTAAAAGATTATAGAC -3'*
UTR-3' Pgp-170 antisentido mutado	5'- GGCCGCTCTATAATCTTTAGCAAGGCA TTGTACCACA TGACTGTCGGGAAAATATAAACG-3'*

*Las secuencias subrayadas de color azul representan las secuencias de unión al miR-223. En los oligonucleótidos mutados, se sustituyó la secuencia de unión a miR-223 por nucleótidos diferentes.

Construcción de plásmidos recombinantes.

Para demostrar la actividad post-transcripcional de miR-223 sobre el UTR-3' de Pgp-170, se construyó el plásmido reportero pLVX-miR-223. Una vez amplificada la secuencia precursora de miR-223, esta fue doblemente digerida con las enzimas *EcoR1/ BamHI*. El vector pLVX-shRNA2 también fue cortado con ambas enzimas. La ligación del inserto al vector, se hizo en un radio 3:1 (300 ng inserto/100 ng vector), utilizando 1 μ l (400 U/ μ l) la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), buffer de ligasa 10X y agua libre de nucleasas para un volumen final de 15 μ l. La reacción fue incubada a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente, 1hr a 37°C y almacenada hasta su transformación a 4°C.

La transformación bacteriana de *E.coli* DH5 α , mediante choque térmico a 42 °C. Las transformantes, se plaquearon en platos con medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) e incubaron a 37 °C durante 16 h. Después de este tiempo, se seleccionaron 5 colonias para purificar el DNA plasmídico por el sistema comercial PureYield™ plasmid midiprep system (Promega), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El DNA plasmídico fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific) y analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

La construcción de los plásmidos que contienen el UTR3' de Pgp-170 silvestre (psiABCB1wt) y mutado (psiABCB1mut) se realizó mediante la clonación sitio-dirigida vector psiCHECK2/XhoI/NotI, con el protocolo previamente descrito.

Secuenciación.

Para verificar la integridad de la secuencias clonadas en los vectores de expresión, se realizó una secuenciación automatizada, utilizando 400 ng de DNA plasmídico, 10 pg del oligonucleótido sentido específico de cada secuencia, 2 μ l buffer BigDye 5X y 2.5 μ l de reactivo Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Posteriormente, la reacción de secuenciación se sometió a una desnaturalización inicial de 96 °C/1 min, 25 ciclos a 96 °C 10 seg, alineamiento 50 °C 5 seg y extensión 60 °C 4 min.

La reacción se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se procedió a limpiarla con la EDTA-Etanol. Para ello se usaron 5 μ l de EDTA 125 mM pH 8 y 60 μ l de ETOH absoluto. Se agito brevemente para mezclar, y los tubos se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó 20 min a máxima velocidad. Se procedió a remover el sobrenadante y los botones se lavaron con 250 μ l de Etanol al 70 % dos veces. El sobrenadante fue eliminado y los tubos se dejaron secar completamente por 15 min. La reacción de secuenciación fue sometida a un secuenciador automático ABI Prism 3200 (Applied Biosystems), para obtener los electroferogramas.

Líneas celulares y cultivo.

La línea celular AD-293 (ATCC Catalogo #240085) se deriva de células renales embrionarias humanas (HEK-293) comúnmente utilizada, con adherencia y propiedades de formación de placa mejorada. Las células AD-293 presentan una mejora en la adherencia a placas de cultivo, por lo que la monocapa de estas células es menos susceptible a pases celulares. Las células se cultivaron a 37 °C, en una atmosfera de CO₂ al 5 % en medio OPTI-MEM (Invitrogen), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SBF) (GIBCO).

La línea celular U937 (ATCC CRL-1593.2) de linaje mielóide y con expresión de miR-223 (NALDINI, L. 2009). La células se cultivaron a 37 °C, en una atmosfera de CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 advanced (Invitrogen), suplementado con 5% de SBF, 10 mM L-glutamina, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomina.

Transfección.

Las células AD-293, se plaquero 1×10^5 células por pozo en una placa de 24 pozos. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con 1 µg del plásmido pLVX-miR-223 y 1 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células se incubaron 3h/37°C con la mezcla de transfección (lipofectamina + DNA plasmídico). Después de la incubación, se agregó a cada pozo 800 µl de medio sin antibiótico y se dejó incubando por 24 h. Posterior a la incubación, las células se observaron en el microscopio de epifluorescencia para corroborar la eficiencia de transfección de las células. Se sembró el mismo número de células AD-293 sin transfectar como control.

Después de observar una eficiencia de transfección ≥ 40 % las células se cosecharon para la extracción de RNA total mediante el kit comercial "SV Total RNA Isolation System" (Promega), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

RT-PCR en tiempo real.

Para evaluar la expresión de miR-223 en células AD-293, se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real. Inicialmente, se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA), utilizando el kit comercial “TaqMan MicroRNA Reverse Transcription System” (Applied Biosystems). Se usaron 300ng de RNA total, dNTPs 100 mM, enzima Multiscribe™ RT (50 U/μl), buffer RT 10X, 20U/μl inhibidor de RNasa, el oligonucleótido RT específico para miR-223 y agua libre de nucleasas para un volumen final de 15 μl. Las condiciones de la reacción de retro-transcripción fueron: 1 ciclo a 16 °C/30 min, 1 ciclo a 42°C/30 min y 1 ciclo a 85°C/5 min.

Posteriormente, se realizó la PCR en tiempo real, empleando 10μl del sistema comercial TaqMan Universal Master Mix II (Applied biosystem), 1.33 μl de cDNA (dilución 1/100), 5 μl de una sonda TaqMan acoplada con el fluoróforo 6-FAM (10 μM), 2.5μl de los oligonucleótidos sentido y antisentido para miR-223 y agua libre de nucleasas para una reacción final de 25 μl. Las condiciones de amplificación fueron: a) 1 ciclo 50 °C/2 min, b) 1 ciclo 95°C/10 min, c) 40 ciclos con desnaturalización 95°C/15 seg, alineamiento/extensión 60°C/1 min y d) 1 ciclo 25°C/10 min. Como control endógeno, se amplificará el RNA pequeño nuclear U6, el cual tiene un nivel de expresión constante, por lo que es abundante y cuya expresión no debe cambiar ninguna condición experimental.

Tabla 4. Oligonucleótidos para RT-PCR en tiempo real.

Oligonucleótido	Secuencia
RT- miR-223	5'-GCGACTGTTCCCTCTCTTCCTCTGTGTGTGTGTGTGTAGTCGCAATGGGGT-3'
miR-223 sentido	5'-GAGTGTCAGTTTGCAAAT-3'
miR-223 antisentido	5' -GACTGTTCCCTCTCTTCCTC-3'

Ensayo de luciferasa.

Para evaluar la funcionalidad del miR-223, los plásmidos pLVX-miR-223, psiABCB1wt y psiABCB1mut, se transfectaron en la línea celular AD-293. Las condiciones de transfección se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Condiciones de transfección para los ensayos de luciferasa.

1° pozo	2° pozo	3° pozo	4° pozo	5° pozo
1x10 ⁵ AD-293 sin transfectar	1x10 ⁵ AD-293 + 1µg pLVXmiR-223	1x10 ⁵ AD-293 + 1µg psiCHECK2 vacío	1x10 ⁵ AD-293 + 1µg pLVXmiR-223 + 1µg psiABCB1wt	1x10 ⁵ AD-293 + 1µg pLVXmiR-223 + 1µg psiABCB1mut

24 h de la post-transfección, las células se cosecharon y la actividad de luciferasa fue evaluada usando el kit comercial “Dual Glo Luciferase Assay System” (Promega). Brevemente, las células fueron lavadas con PBS y se despegaron con 100 µl de buffer de lisis 1X, con agitación suave durante 15 min. El lisado fue transferido a microtubos de 1.5 ml y centrifugado brevemente (30 seg). En otro microtubo de 1.5 ml se colocó 100 µl del sustrato del ensayo luciferasa (LAR II), al que se le transfirieron 20 µl del lisado, se mezcló e inmediatamente se evaluó la actividad de la luciferasa “*Firefly*” por medio del luminómetro ModulustTM Luminometer (Turner BioSystems), posteriormente se adicionó el reactivo Stop & Glo (100 µl) y se volvió a evaluar la actividad de luciferasa “*Renilla*”.

IX. RESULTADOS.

Evaluación de la expresión de miR-223 en células AD-293.

Para evaluar la expresión de miR-223 en las células AD-293, se diseñaron oligonucleótidos específicos con base en la secuencia precursora reportada en miRBase (www.mirbase.org). Este sistema no es comercial, pero es similar a un sistema de RT-PCR tallo-burbuja, basado en sondas TaqMan comerciales. Es por ello, que fue necesario llevar a cabo la estandarización para lograr amplificar miR-223. Se decidió usar la línea celular U937 como control de expresión, debido a que expresa de manera endógena este miRNA. Inicialmente se realizó una curva de concentración de 0.3-2 μ g RNA total, para la síntesis del cDNA. Para la reacción de PCR en tiempo real, no hubo amplicón con el cDNA de ninguna de las concentraciones usadas. Esto mismo ocurrió al intentar amplificar U6 (Figura 7).

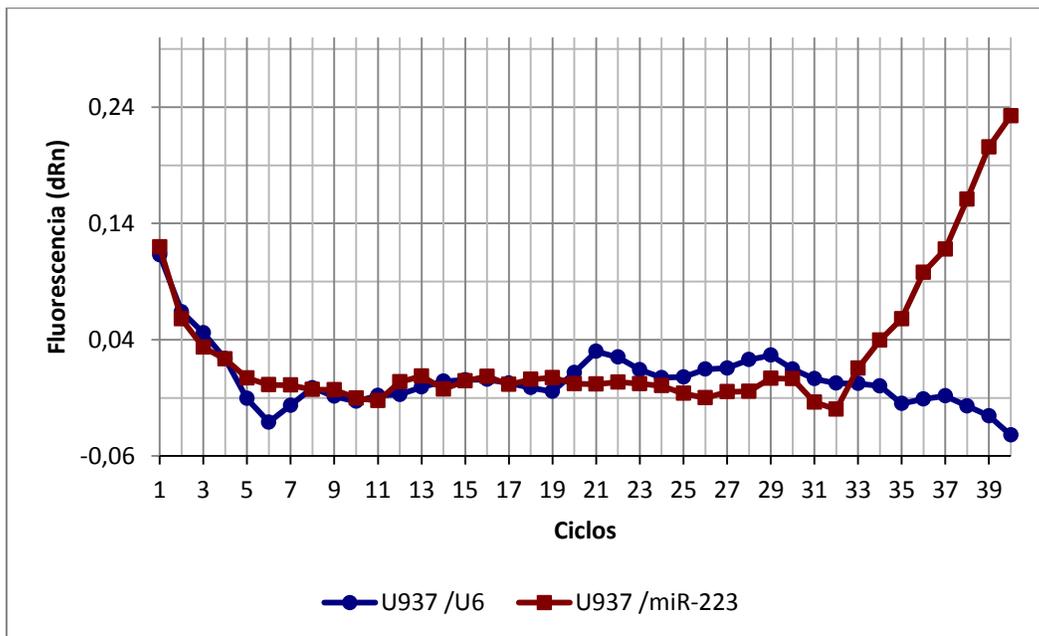


Figura 7. RT-PCR en tiempo real para miR-223 y U6, en células U937.

Al no obtener amplicón, se pensó que la concentración de RNA total usada para la síntesis de cDNA era muy alta, debido a que U6 es muy abundante y por ende, con poca cantidad de RNA total es suficiente para amplificarlo. Es por ello que se realizó una curva de concentración, con tres diluciones de cDNA (1/10, 1/100 y 1/1000), obtenido con 300 ng de RNA total. Interesantemente, solo con la dilución 1/100, la expresión de U6 fue constante (la curva no decayó). Por lo anterior, se decidió trabajar con los parámetros de síntesis de cDNA a partir de 300 ng de RNA y después realizar una dilución 1/100 para la reacción de PCR en tiempo real (Figura 8).

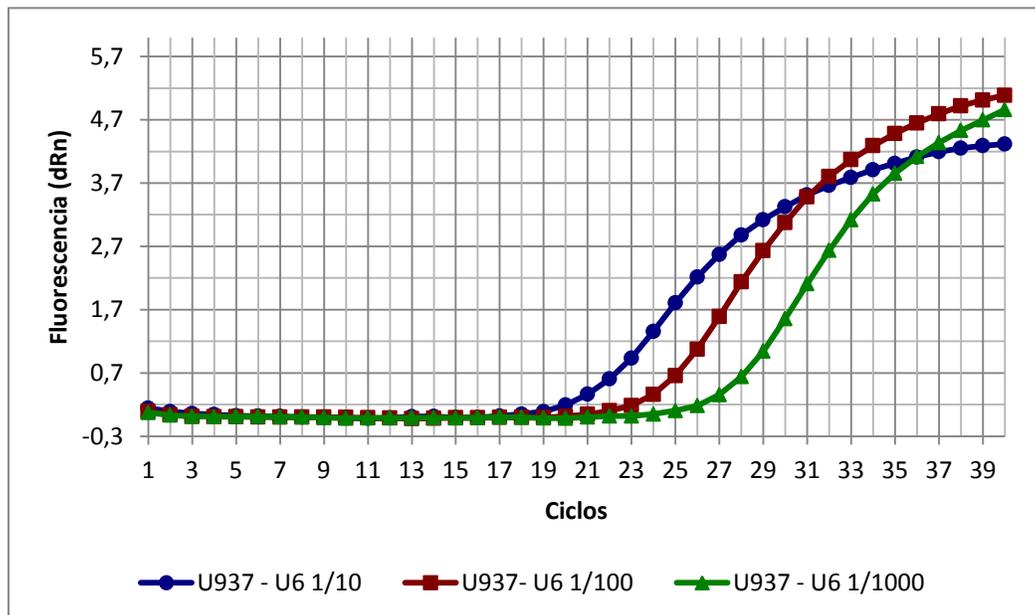


Figura 8. Amplificación de U6 por RT-PCR en tiempo real, en las células U937, con diluciones seriales del cDNA.

Posteriormente, se verifico la expresión de miR-223 en las células U937, usando las condiciones previamente establecidas (Figura 9).

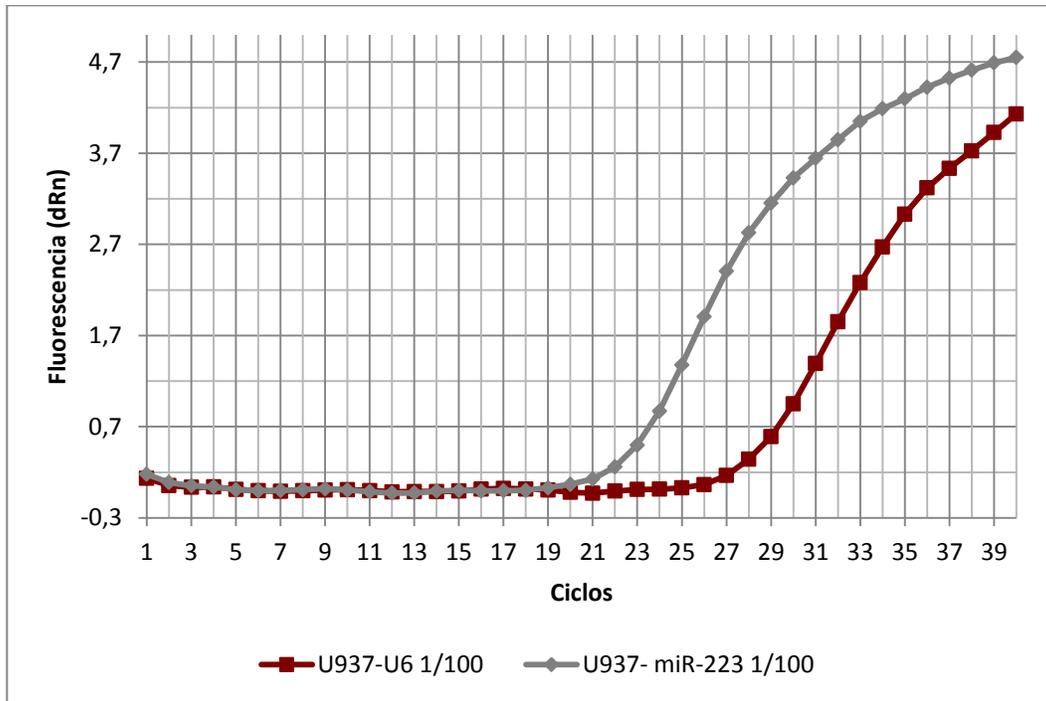


Figura 9. Amplificación de U6 y miR-223 por RT-PCR en tiempo real, en las células U937.

El siguiente paso fue verificar que el plásmido pLVX-miR-223, expresará a este miRNA en las células AD-293, que fueron usadas para los ensayos de la actividad de luciferasa.

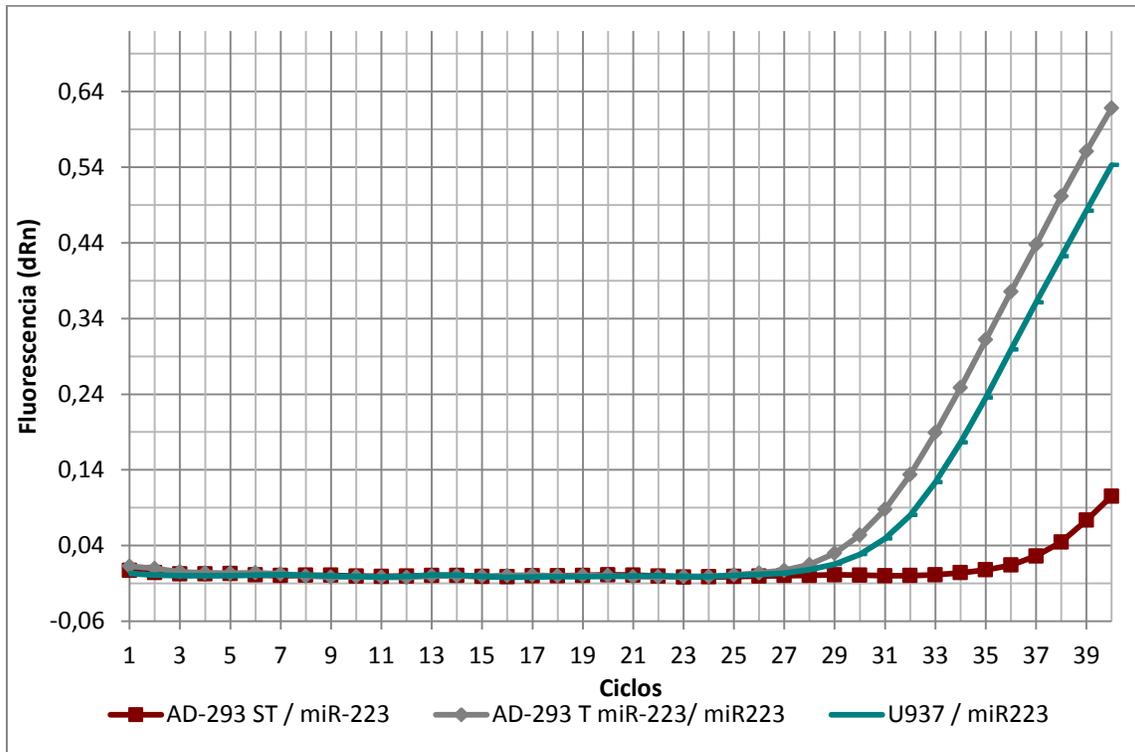


Figura 10. RT-PCR en tiempo real en las células AD-293, transfectadas o no con 1µgdel plásmido pLVXmiR-223 amplificando miR-223, a demás de la amplificación de miR-223 en las células U937.

En la figura 10 se observa que en las células AD-293 sin tranfectar no tiene expresión de miR-223, comparado con la que si fueron transfectadas, lo que nos indica que el plasmido recombinante funciona. Como un control de expresión de miR-223, se utilizo la línea celular U937 .

Amplificación y clonación de la secuencia precursora de miR-223 en el vector pLVX-shRNA2.

Para amplificar la secuencia precursora de miR-223, se diseñaron oligonucleótidos específicos que flanquearan una región de 236 pb, donde estaba contenida la secuencia que da origen a miR-223 (figura 11) y posteriormente se hizo un PCR en gradiente.

A)



www.mirbase.org

B)

```
TGGTTGGTCCTTTGAGCAAGATCCCCGGGGCTAAGGGTGTGACTTCATCATT
CCTTTCTCTCTCTTTCCCTCTAGGGTCACATCTCCCAGGAAGATCTCACTTCC
CCACAGAAGCTCTTGGCCTGGCCTCCTGCAGTGCCACGCTCCGTGTATTGA
CAAGCTGAGTTGGACACTCCATGTGGTAGAGTGTGAGTTTGTCAAATACCCCA
AGTGCGGCACATGCTTACCAGCTCTAGGCCAGGGCAGATGGGATATGACGAA
TGGACTGCCAGCTGGATAACAAGGATGCTCACCAAGCACCAAGTTCTCACAAG
TTATTTTATGTGACTTTGCAGGAAGTGGCATTATATCTGAGGACACCAGGG
GAAAAGTGTGGCATCTCAGGGAAATACAGCCCTGGGCTGTGTCTACACACAC
```

Figura 11. Secuencia precursora de miR-223. De color verde se muestra la secuencia precursora de miR-223 y en color turquesa y rosa, la secuencia de los oligonucleótidos usados para la reacción de PCR punto en gradiente.

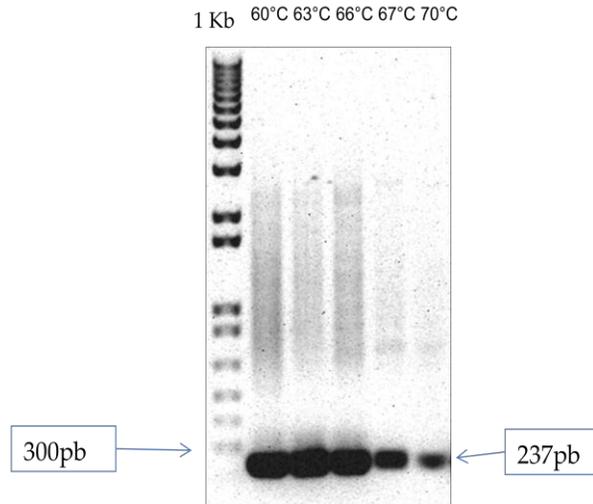


Figura 12. Amplificación de miR-223 por PCR en gradiente. Electroforesis de agarosa al 1 % para amplificar miR-223 a 5 temperaturas distintas.

Como puede verse en la figura 12, hay tres temperaturas a las cuales se obtiene un buen amplicón. En este caso, se decidió utilizar la temperatura de 63°C, en donde aparentemente, hay un mayor rendimiento. Después de encontrar esta temperatura, se realizó una PCR en punto final por triplicado, en donde los volúmenes de reacción fueron mezclados para realizar doble restricción de los sitios que flanqueaban el inserto (figura 13).

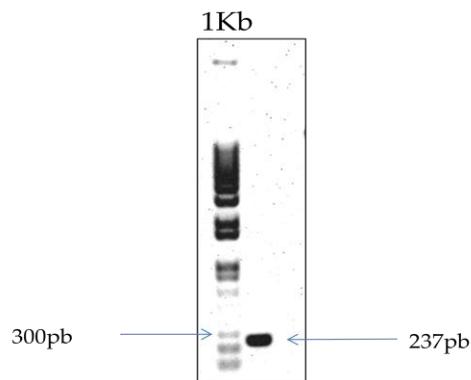


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % , de 5µl del fragmento doblemente digerido (*EcoRI/BamHI*), correspondiente a la secuencia precursora dPe miR-223.

En paralelo, se realizó la misma restricción *EcoRI/BamHI*, en el vector pLVX-shRNA2 (figura 14).

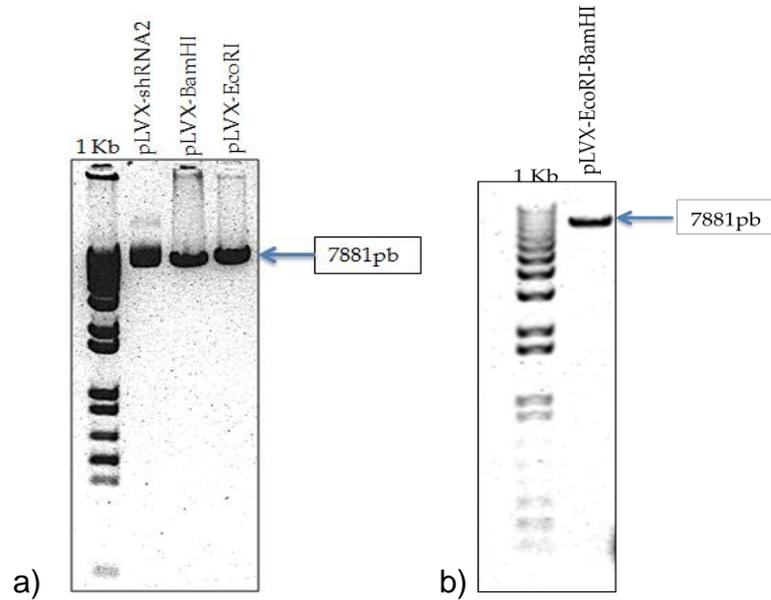


Figura 14. Electroforesis en geles de agarosa al 1 %. En el panel a), primer carril se muestra en marcador de tamaño molecular (MWM) de 1kb. En el carril 2 se muestra el vector pLVX-shRNA2 control (sin digerir). En el carril 3, una alícuota del vector pLVX-shRNA2 digerido con *BamHI* y en carril 4, el vector digerido con la enzima *EcoRI*. En el panel b), se muestra la banda del vector doblemente digerido (*EcoRI/BamHI*), purificado por columna.

Después de realizar la clonación sitio-dirigida en el vector pLVX-shRNA2, la construcción generada fue denominada pLVX-miR-223 (figura 15) y la integridad de la secuencia que fue clonada fue verificada por secuenciación automática, usando un secuenciador automático ABI Prism 3200 (AppliedBiosystems) (Figura 16).

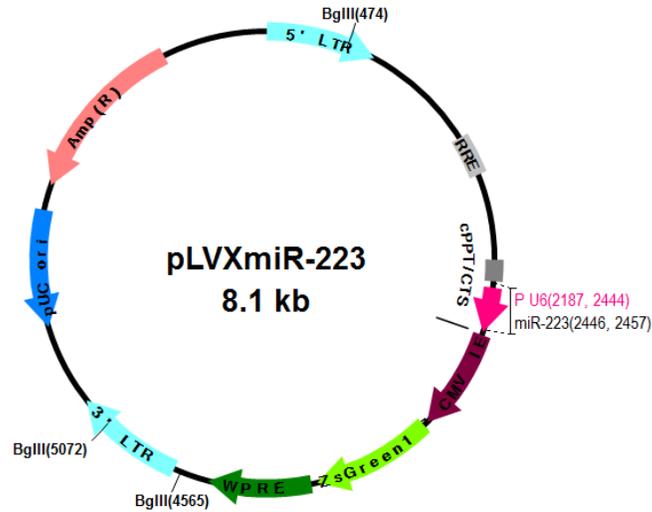
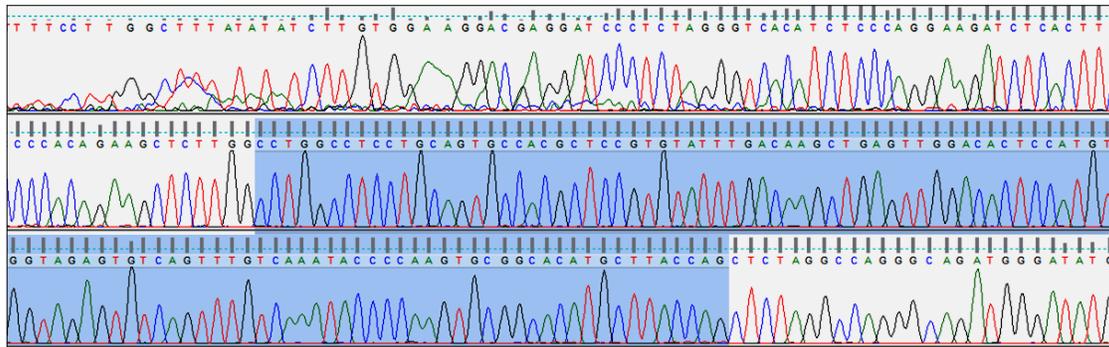


Figura 15. Representación esquemática del plásmido recombinante pLVXmiR-223. La región que da origen al precursor de miR-223 fue clonada río abajo del promotor Pol III U6. La proteína verde fluorescente que sirvió para evaluar la eficiencia de transfección, está bajo el promotor Pol II de CMV.

A)



B)

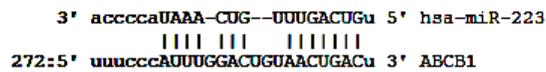
5'CCTGGCCTCCTGCAGTGCCACGCTCCGTGTATTTGACAAGCTGAGTTGGAC
ACTCCATGTGGTAGAGTGTCAAGTTTGTCAAATACCCCAAGTGCGGCACATGCT
TACCAG 3'

Figura 16. A) Electroferograma obtenido de la secuenciación del plásmido pLVX-miR-223, usando el oligonucleótido U6-shRNA. B) Secuencia de 110 bases, correspondientes a la secuencia precursora de miR-223.

Clonación de las secuencia UTR-3' del mRNA de MDR1/Pgp-170 silvestre y mutada, en el vector psiCHECK2 (dsODN).

Para evitar amplificar por PCR la secuencia del UTR-3' del mRNA de MDR1/Pgp-170 y después tener que hacer ensayos de mutagénesis sitio-dirigida para mutar el sitio de unión de miR-223, se decidió clonar un fragmento 64 pb donde estuviera contenido el Elemento de Respuesta (ER) a dicho miRNA, mediante oligonucleótidos de doble cadena (Figura 17).

A)



(www.targetscan.org).

B)

ACTCTGACTGTATGAGATGTAAATACTTTTTAATATTTGTTTAGATATGACATTTATTCAAAGTTAAAAGCAAACACTTACA
 GAATTATGAAGAGGTATCTGTTAACATTTCTCAGTCAAGTTCAGAGTCTTCAGAGACTTCGTAATTAAGGAACAGAGT
 GAGAGACATCATCAAGTGGAGAGAAATCATAGTTTAAACTGCATTATAAATTTTATAACAGAATTAAGTAGATTTAAAA
 GATAAATGTGTAATTTT**TTTATATTTCCCATTTGGACTGTA**ACTGACTGCCTTGCTAAAAGATTATAGAAAGTAGCAA
 AAAGTATTGAAATGTTTGATAAAGTGTCTATAATAAACTAACTTTTCATGTGAAA (Gene Bank).

Figura 17. Secuencia de unión de miR-223 al UTR-3' de Pgp-170

Para corroborar que la secuencia del vector recombinante creado de la misma manera que en el vector de expresión de miR-223, estos vectores fueron secuenciados de forma automatizada (Figura 18-20).

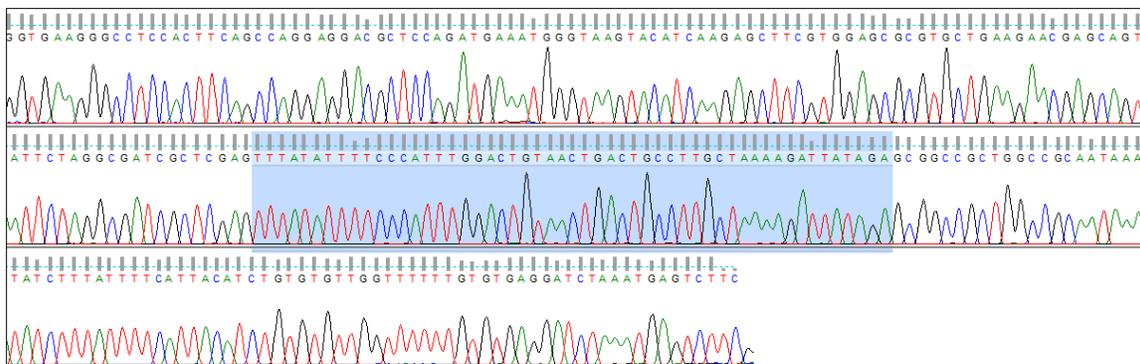


Figura 18. Secuencia correspondiente a las 65 bases del ER a miR-223, clonado en el vector de expresión psiABC1wt.

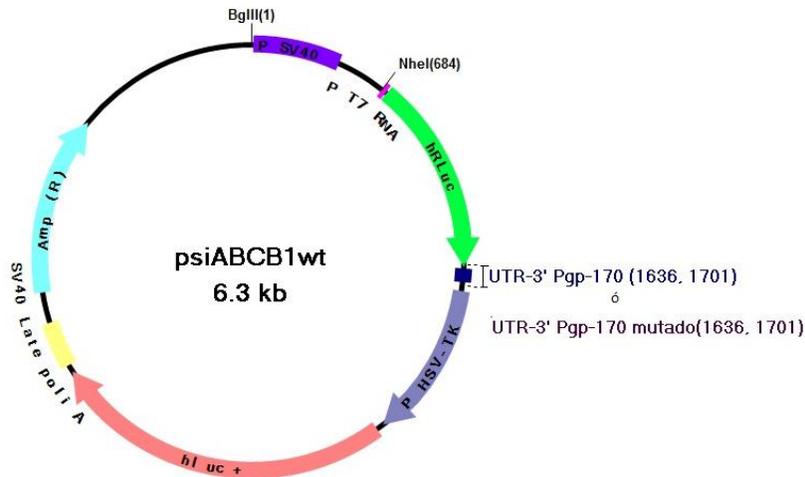


Figura 19. Representación esquemática de las construcciones generadas psiABC1wt y psiABC1mut.

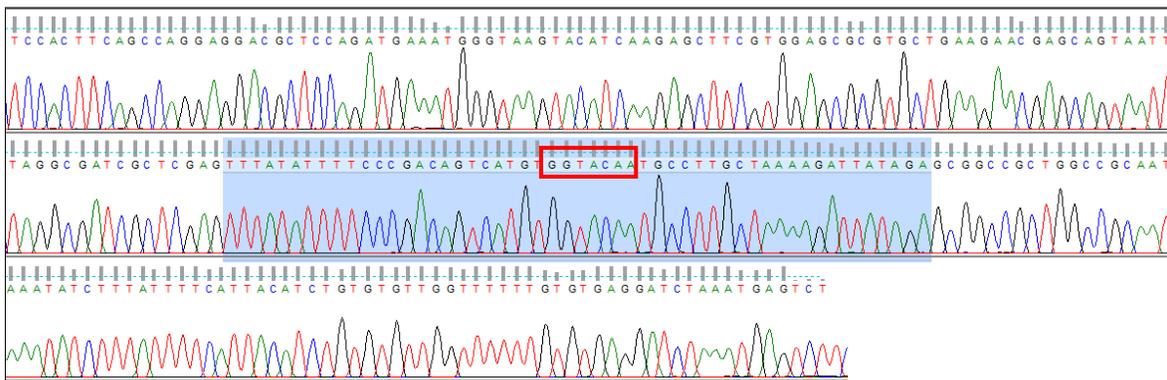


Figura 20. Electroferograma donde se muestra la secuencia del UTR-3' del mRNA de Pgp-170 clonada en el vector de expresión. En el recuadro rojo, se muestran los nucleótidos que fueron cambiados.

Evaluación de la actividad de luciferasa con las construcciones generadas.

Para evaluar la funcionalidad del miRNA, los plásmidos pLVX-miR-223, psiABC1wt y psiABC1mut fueron cotransfectados en la línea celular AD-293 y 24h postransfección fue evaluada la actividad de luciferasa (Dual-Glo Assay System).

Tabla 6. Unidades relativas de luciferasa de los controles

Controles	Unidades relativas de luciferasa (URL)
Células no transfectadas	61
AD-293 + pLVX-miR-223	49

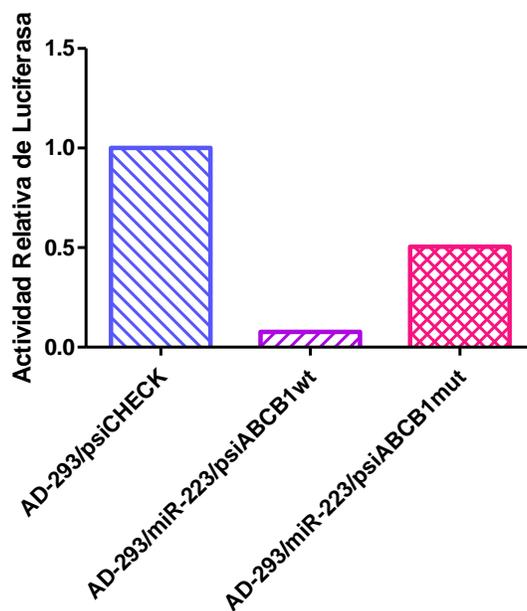


Figura 21. Ensayo reportero de luciferasa para determinar el efecto regulador de miR-223, sobre el UTR-3' de mRNA de Pgp-170. La actividad postranscripcional fue evaluada después de cotransfectar 1 μ g del vector psiABC1 silvestre y mutado (wt y mut) con 1 μ g del plásmido que expresa miR-223 (pLVXmir-223) en células AD-293. Las células transfectadas con el vector vacío (psiCHECK2) y el solo con el plásmido pLVXmir-223, fueron usadas como control. Los resultados muestran un experimento independiente.

El ensayo de luciferasa fue repetido con 50 μ g de los plásmidos siguiendo una misma tendencia de actividad en el gen de luciferasa, pero al ser parámetros diferentes en la concentración de los plásmidos estos resultados no pueden ser promediados.

X. DISCUSIÓN.

Los miRNAs, al poseer secuencias de nucleótidos muy cortas, complican su análisis y detección, mediante métodos convencionales como el northern blot. ((CHEN, C. 2005). El estándar de oro para evaluar la expresión de miRNAs es la RT-PCR en tiempo real, que proporciona mayor sensibilidad y exactitud para su detección. Nuestra estrategia experimental está basada en el diseño de un oligonucleótido RT tallo-burbuja, que confiere mayor estabilidad térmica y aumenta la especificidad de la reacción.

Tomando en cuenta estas consideraciones, la evaluación de la expresión de miR-223 en las células AD-293, se realizó mediante RT-PCR tiempo real. La expresión de miR-223 pudo haberse realizado por RT-PCR punto final y evaluar de manera cuantitativa si el vector pLVXmir-223, expresa el miRNA o no. Debido a que La RT-PCR en tiempo real es una herramienta cuantitativa, nos permite detectar el número de copias de amplificación que se generan durante todo el proceso de la reacción, a partir de la generación inicial de un número tan pequeño como 10 copias.

El diseño y construcción del sistema de oligonucleótidos para la generación de cDNA y la PCR en tiempo real para miR-223, fue diseñado no solo para evaluar este miRNA, sino también, para ser utilizado en la amplificación de cualquier miRNA, al cambiar la secuencia semilla (región “seed”) del oligonucleótido RT y el oligonucleótido sentido. La secuencia del oligonucleótido antisentido es conservada debido a que hibrida en una porción del tallo-burbuja del oligo RT al igual que la sonda TaqMan, que hibrida en otra región del tallo-burbuja (figura 4). Es por ello que se decidió utilizar este sistema, para estandarizar la reacción de amplificación de miR-223. Lo anterior nos permitió conocer la expresión relativa de miR-223 en las células AD-293, utilizando el plásmido construido pLVX-miR-223, con respecto al nivel de expresión endógena que tiene la línea celular AD-293.

El utilizar una línea celular que expresa miR-223, como las células U937, fue con el fin de conocer si el diseño de los oligonucleótidos para amplificar miR-223, incluyendo la sonda TaqMan, funcionaban bien. De no detectar miR-223 en las células U937, usando nuestro sistema, podríamos pensar que habría un problema con el diseño de los oligos. De no

haber amplificado el control de expresión U6, podríamos haber pensado que existía un problema con los componentes de la reacción o en el programa de amplificación.

Considerando que la fracción más pequeña de los miRNAs representa aproximadamente el 10% del RNA total, se decidió utilizar una curva de concentración de RNA de 0.3-2 µg, para la obtención del cDNA. Sin embargo, en ningún caso se obtenía amplicón, lo que nos hizo pensar que la cantidad de RNA era abundante, causando una saturación en la reacción de PCR tiempo real. Lo anterior se propuso debido a que en las reacciones de RT-PCR en tiempo real, para la obtención del cDNAs, el RNA total utilizado es del orden de nanogramos. Por lo anterior, se propuso realizar diluciones seriales de cDNA obtenido a partir de 0.3 µg, lo que nos permitió la amplificación de miR-223 en al menos tres de las diluciones realizadas.

Se seleccionó la dilución de 1/100 para el trabajo experimental, debido a que la curva exponencial de amplificación fue constante y no decae al término del ciclado, en comparación con otras las diluciones.

Posteriormente, se evaluó la expresión de miR-223 en las células AD-293 transfectadas con el vector pLVXmiR-223, con respecto a las no transfectadas. El nivel de expresión de miR-223 en las células AD-293 transfectadas, no puede compararse con el nivel de expresión de la línea celular U937, en términos de cuantas veces más miR-223 se expresa por el vector y cuanto de manera endógena, por ser líneas celulares diferentes. Solo podría decirse que hay más miR-223 en las AD-293 de manera exógena con respecto a las U937 que lo expresan endógenamente.

Lo anterior tiene una explicación lógica al observar que el vector de expresión pLVXmiR-223 es un sistema diseñado específicamente para promover la expresión de RNAs no codificantes, mediante el promotor fuerte U6 humanizado tipo Pol III, que le confiere una mayor eficiencia de expresión del pre-miRNA. En cambio, la maquinaria endógena de síntesis para miR-223, en las células U937, es dirigida por un promotor Pol II, además de poder ser inducida por del microambiente celular, en donde existen estímulos para que la expresión del miRNA aumente o disminuya.

La integridad de las secuencias clonadas en los diferentes plásmidos permitió la evaluación de la funcionalidad de los mismos, mediante ensayos de luciferasa. En donde se observa que la actividad de luciferasa Renilla en los controles (células no transfectadas

y células transfectadas solo con el plásmido pLVX-miR-223), no presentan actividad de luciferasa como se esperaba, al no poseer el gen que codifica para luciferasa. En el caso del control de psiCHECK2 vacío, la señal emitida por este vector vacío era demasiado alta, al grado de no ser detectada por el luminómetro. La cantidad de plásmido usada para la primera transfección fue de 1 µg, por lo que se decidió realizar un segundo experimento con 50ng, en donde ya no se tuvo el problema de saturación del sistema.

En el caso de las co-transfecciones (pLVX-miR-223:psiABCB1wt; relación 1:1), la actividad de luciferasa decayó, como era esperado, comparado con el vector vacío psiCHECK. Esto sugiere una interacción de miR-223 con el UTR-3' de Pgp-170 causando una inhibición traduccional del gen de luciferasa, por lo que la actividad de la misma, disminuye. Por lo tanto, para conocer si la interacción es directa y no causada por otro factor del microambiente; se evaluó la actividad de luciferasa para el UTR-3' de Pgp-170 con el sitio de unión al miRNA mutado, en donde se observa que esta actividad de luciferasa se restablece. Esto nos indicó que al estar mutado el sitio de unión para miR-223, este miRNA no es capaz de unirse su blanco, por lo tanto no inhibe la traducción, denotando así que hay una regulación directa.

También se observa que al cotransfectar el plásmido psiABCB1mut + miR-223, las unidades de luciferasa no alcanzan los niveles del vector vacío como se esperaría. Sin embargo, debido a que se realizó una co-transfección, la eficiencia de transfección no es la misma que si solo se transfectara un solo plásmido. Es decir, al tratarse de dos plásmidos diferentes, existe la posibilidad de que algunas células incorporen el plásmido reportero, pero no el que expresa miR-223 y viceversa. Solo algunas células incorporaran ambos, lo que sin duda disminuirá la señal. Esto podría resolverse evitando una cotransfección de plásmidos y en lugar de ello utilizar moléculas de RNAs de doble cadena fabricados sintéticamente para imitar a los miRNAs nativos (un mimic de miR-223) o utilizando una línea celular que exprese miR-223, como las U937, pero que los problemas para la transfección de los plásmidos, no sea una limitante para su uso.

En la figura del anexo 1 de un artículo recientemente publicado (Feng, X. 2012), podemos observar una regulación directa del miR-126 con el UTR-3' del su mRNA blanco y cuyo resultado es muy similar a la regulación que encontramos con miR-223, observando que aun utilizando el mimic de miR-126, la actividad de luciferasa no se restablece completamente.

Se realizaron dos experimentos independientes, con tres repeticiones cada uno, pero con concentraciones de plásmido diferentes (50ng y 1µg, respectivamente) que sugieren fuertemente una regulación directa entre miR-223 y su blanco, estos experimentos no pueden ser promediados al no tratarse de las mismas condiciones experimentales, por lo que es conveniente realizar un par de experimentos más repitiendo alguna de las dos condiciones, para poder realizar un análisis estadístico, con valores significativos que corroboren que existe contundentemente una regulación directa del UTR-3' de Pgp-170, a través de miR-223.

XI. CONCLUSIONES.

El vector de expresión pLVX-miR-223 es funcional para expresar miR-223 y permitió demostrar la regulación postranscripcional ejercida por este miRNA sobre la región UTR-3' de *mdr1*, en células en cultivo AD-293.

XII. PERSPECTIVAS.

1. Repetir los ensayos de luciferasa para poder obtener la estadística que corroboren la regulación post-transcripcional directa del UTR-3' de Pgp-170 a través de miR-223.
2. Evaluar la expresión de Pgp-170 por ensayos de inmunofluorescencia, al transfectar miR-223, para corroborar la expresión ya mencionada.

XIII. ANEXOS.

1) Regulación postranscripcional de IKBA a través de miR-126, gráfica con un comportamiento similar al trabajo realizado con miR-223.

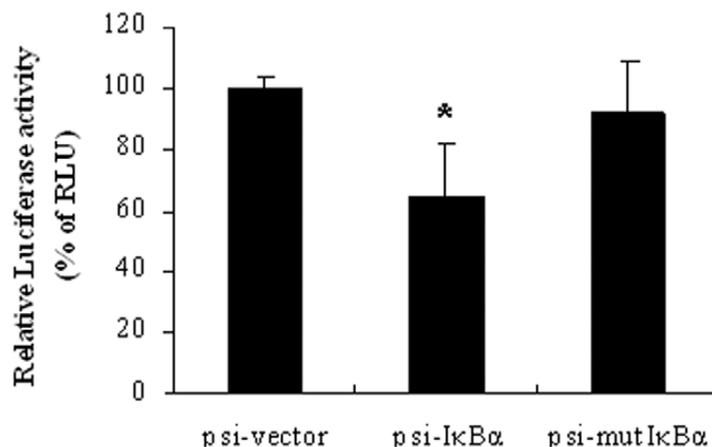


Figura 22. Efecto regulador de miR-126 en el UTR-3' de IKBA en células HT29. Se transfectaron con vector original dual reportero de luciferasa (psi-vector), el mismo con el sitio tipo silvestre para miR-126 en de IKBA (psi-IKBA) o el sitio mutado (psi-mutIKBA). La actividad de Luciferasa de Renilla (normalizada a la actividad de luciferasa de luciérnaga) se midió 24 horas después de la transfección. (A) la actividad relativa de luciferasa de Renilla se redujo en células transfectadas con el tipo silvestre IKBA (psi-IKBA) en comparación con el que con la psi-vector (100 ng/pozo de un placa de 24 pozos). Renilla relativa actividad de la luciferasa fue restaurada en las células transfectadas con el mutante de constructo (psi-mutIKBA).

(* P <0.05 comparado con el de psi-vector). (Feng, X. 2012).

XIV. BIBLIOGRAFÍA.

- AQUINO G. (2007). Pequeños gigantes en el mundo del ARN. *Innovación y tecnología*. 14:4 39-45.
- CHEN, C., RIDZON, D., BROOMER, A., ZHOU, Z., LEE, D., NGUYEN, J., BARBISIN, M., XU, N., MAHUVAKAR, V., ANDERSEN, M., LAO, K., LIVAK, K. AND GUEGLER K. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *NA Res*. 33; 20: 179.
- DAN-DAN F, et al. (2011). Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukemia. *J. Cell. Mol. Med*. 15:10, 2164-2175.
- DAN-DAN FENG, HUA ZHANG, PENG ZHANG, YU-SHENG ZHENG, XING-JU ZHANG, BO-WEI HAN, XUE-QUN LUO, LING XU, HUI ZHOU, LIANG-HU QU, YUE-QIN CHEN (2011). Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *J. Cell. Mol. Med*. Vol 15, No 10, 2011 pp. 2164-2175.
- DANO, K. (1973). Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascitis tumor cells. *Biochim Biophys Acta*. 323: 466-483
- DOENCH, J.G. AND SHARP P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development*. 18:504-511.
- Feng, X., Wang, H., Ye, S., Guan, J., Tan, W., et al. (2012). Up-Regulation of microRNA-126 May Contribute to Pathogenesis of Ulcerative Colitis via Regulating NF-kappaB Inhibitor Ikb α . *Plos one*. 7(12): e52782. doi:10.1371/journal.pone.0052782.
- FOJO AT, UEDA K, SLAMON DJ, POPLACK DG, GOTTESMAN MM, PASTAN I. (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*. 84(1):265-9.
- FORD JM, HAIT WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev*. 1990; 42:155-99.
- GAROFALO, M. AND CROCE, C. (2011). MicroRNAs: Master Regulators as Potential Therapeutics in Cancer *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 51:25-43.

- GENTNER, B., SCHIRA, G., GIUSTACCHINI, A., AMENDOLA, M., BROWN, M., PONZONI, M., NALDINI, L. (2009). Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *N Methods*. 6; 1: 63-66.
- GOLDSTEIN LJ, GALSKI H, FOJO A, WILLINGHAM M, LAI SL, GAZDAR A, PIRKER R, GREEN A, CRIST W, BRODEUR GM, ET AL.(1989). Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst.*, 18; 81(2):116-24.
- HABER DA, et al. (1992). Multidrug resistance (MDR 1) in leukemia: is it time to test? *Blood*. 79: 295-298.
- HAITAO, BAI. (2011). Involvement of miR-21 in resistance to daunorubicin by Biochemical Societies. *Elsevier*. 585: 402-408.
- HE L, HANNON GJ. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet*. 5, 522-31.
- HONGWEI, ZHANG. (2010). Down-Regulation of miR-27a Might Reverse Multidrug Resistance of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Dig. Dis. Sci*. 55:2545–2551.
- JOHNNIDIS, J. B., HARRIS, M. H., WHEELER, R. T., STEHLING-SUN, S., LAM, M. H., KIRAK, O., BRUMMELKAMP, T. R., FLEMING, M. D., CAMARGO, F. D. (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 451: 1125-1129.
- JULIANO, RL. LING, V. (1976). A Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants. *Biochim Biophys Acta*. 455:152-162.
- KARTNER, N., RIORDAN, JR., LING, V. (1983). Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*. 221: 1285-1288.
- KONSTANTINOS J. (2011). A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nature America, Inc*. 43:7, 673-682.
- LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, TUSCHL T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294:853–58.
- LAU NC, LIM LP, WEINSTEIN EG, BARTEL DP. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294:858–62.

- NIELSEN CB, SHOMRON N, SANDBERG R, HORNSTEIN E, KITZMAN J, BURGE CB. (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA*. 13:1894–910.
- PASTAN I, GOTTESMAN M. (1987). Multiple-drug resistance in human cancer. *N Engl. J Med.* May 28; 316(22):1388-93.
- PIERCE, B. (2008). Genetics. A conceptual approach. 2ed. W. H. Freeman. EUA. pp. 546.
- SÁNCHEZ, P y BENÍTEZ, L. (2006). Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. *Cancerología*. 1: 187-199.
- TSUN Y, WAN Y, JUDY YUET WA CHAN NGAI NA CO, CHI L, PAK L, KWOK P, TIM T. (2011). P-glycoprotein enhances radiation-induced apoptotic cell death through the regulation of miR-16 and Bcl-2 expressions in hepatocellular carcinoma cells. *Apoptosis*. 16:524–535.
- Ueda, K. (2011) ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci Biotechnol Biochem*. 75: 401-409.
- WANG, D., KE XY, WANG J, XU F, HU YF. (2007). Correlation between MDR1 genetic polymorphism and prognosis in acute myeloid leukemia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 29; 87(20):1384-8.
- WEI SUN, YI-SHUAN JULIE LI, HSIEN-DA HUANG, JOHN Y-J. SHYY, AND SHU CHIEN. (2010). microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 12:1–27.
- WIENHOLDS, E, PLASTERK RH. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS letters*. 579(26):5911-22.
- YAMAMOTO Y, et al. (2011). An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells. *Molecular Cancer*, 10:135.
- YUAN-D, LI W, CHAO S, LEI F, CHENG F, YIN-HUA W, ZHI-JIAN Z, JIAN-Y, WEI X. (2011). Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia. *Med. Oncol.*12032:11,140.
- ZAMAN, G., FLENS, M., VAN LEUSDEN MR. (1994). The Human Multidrug Resistance-associated Protein MRP is a Plasma Membrane Drug-Efflux Pump. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 8822-8826.

XV. REFERENCIA ELECTRÓNICA.

- ASRP. Base informática de microRNAs. Página electrónica 29 de octubre de 2012: <http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/>.
- CoGemiR. Base informática de microRNAs. Página electrónica 29 de octubre de 2012: <http://cogemir.tigem.it/>
- Life Technologies Corporation. (2010). TaqMan MicroRNA Assays Product Overview. Consultado de la página electrónica el 11 de enero de 2013: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_068884.pdf.
- MiRanda. Base informática de microRNAs. Página electrónica 29 de octubre de 2012: <http://www.microrna.org>
- Mirbase. Base informática de microRNAs. Página electrónica 29 de octubre de 2012: <http://www.mirbase.org>.
- MirGen. Base informática de microRNAs. Página electrónica 29 de octubre de 2012: <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html>
- MiRWIP. Base informática de microRNAs. Página electrónica 29 de octubre de 2012: <http://mirtargets.org/>
- PicTar. Base informática de microRNAs. Página electrónica 29 de octubre de 2012: <http://www.pictar.org/>
- TargetScan. Base informática de microRNAs. Página electrónica 29 de octubre de 2012: <http://www.targetscan.org>