



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN LESIONES DEL CÉRVIX**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**VANESSA VILLEGAS RUÍZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE LA TESIS: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. VICENTE MADRID MARINA**  
**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**  
**DR. LUIS PADILLA NORIEGA**  
**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de abril de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **VILLEGAS RUIZ VANESSA** con número de cuenta 97218045 con la tesis titulada "PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN LESIONES DEL CÉRVIX", realizada bajo la dirección del **DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS**:

Presidente: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ  
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERON  
Secretario: DR. VICENTE MADRID MARINA  
Suplente: DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON  
Suplente: DR. LUIS PADILLA NORIEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de junio de 2015

*M. del Coro Arizmendi Arriaga*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM por brindarme las herramientas para ampliar mi capacidad académica en beneficio de mi formación de estudiante de posgrado.

A CONACYT y al IMSS por el apoyo económico recibido durante el tiempo de estudiante doctorado.

A la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas y al Instituto Nacional de Pediatría por permitirme trabajar en sus instalaciones de investigación y desarrollar con éxito este proyecto.

A los integrantes del Comité tutor por sus valiosos comentarios para el satisfactorio trabajo del proyecto de investigación.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis Padres por ser el soporte interno y mis guías a lo largo de este camino hasta ser la persona que ahora soy. Gracias mamá y papá por su eterna dedicación y amor incondicional, los amo.

A mi Hermana, por su complicidad y ayuda en los momentos difíciles, porque somos una parte de la otra. Gracias Herman.

A mi Esposo, compañero de trabajo y de vida por ser la luz de mis mañanas que hacen que cada día valga la pena seguir adelante. Y ser la mujer más afortunada de compartir esta aventura y pasión. Gracias amor.

<b>ÍNDICE</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	i
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
MICRORNAs, PEQUEÑOS TRANSCRITOS .....	3
BIOGÉNESIS DE MICRORNAs.....	4
LA REGULACIÓN DE LOS MICRORNAs.....	5
MICRORNAs Y EL CÁNCER .....	7
PERFILES DE EXPRESIÓN DE MICRORNAs EN CÁNCER.....	8
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE CÉRVIX .....	9
LOS FACTORES ETIOLÓGICOS ASOCIADOS A CACU .....	10
CACU Y MORNAs .....	11
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	14
<b>HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>OBJETIVOS</b> .....	14
OBJETIVO GENERAL .....	14
OBJETIVOS PARTICULARES .....	14
<b>ESTRATEGIA Y MÉTODOS</b> .....	15
ADQUISICIÓN DE MUESTRAS .....	16
PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS E IDENTIFICACIÓN DE LA LESIÓN .....	16
TIPIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE HPV .....	17
EXTRACCIÓN DE RNA.....	18
ENSAYO DE MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN DE MICRORNAs .....	18
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN.....	18
AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR TIEMPO REAL.....	19
IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS DE MICRORNAs.....	20
INMUNODETECCIÓN DE HOXC8 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX.....	20
<b>RESULTADOS</b> .....	21
MUESTRAS DE ESTUDIO Y TIPIFICACIÓN DE VPH .....	21
PURIFICACIÓN DE MICRORNAs .....	24
MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN DE MICRORNAs .....	25
<i>Control de calidad</i> .....	25
<i>Análisis de Expresión diferencial</i> .....	28
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ALTERADAS POR LA EXPRESIÓN DE MICRORNA ABERRANTES.....	35
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE UN GRUPO DE MICRORNAs.....	40
INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE MIR-196A .....	44
<b>DISCUSIÓN</b> .....	51
<b>CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>PESPECTIVAS</b> .....	60
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	61
<b>ANEXOS</b> .....	69
ANEXO 1. PROTOCOLO MICRORNA GENE CHIP GALAXY V 1.0, AFFYMETRIX.....	69

ANEXO 2. MICRORNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN CÉLULAS DE CÉRVIX.....	83
ANEXO 3. LISTA DE MICRORNAs DE ACUERDO A LA CLASIFICACIÓN ORIGINADA DEL <i>CLUSTER</i> JERÁRQUICO. ....	90
ANEXO 4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR LA LA PRESENCIA DE VPH .....	93
ANEXO 5. SÍMBOLOS DE VÍAS.....	94
ANEXO 6. ARTÍCULO REQUISITO .....	95

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Biogénesis de los microRNAs</i>	5
<i>Figura 2. Estudio de los microRNAs.</i>	6
<i>Figura 3. Actividades de los microRNAs en cáncer</i>	8
<i>Figura 4. Incidencia y mortalidad de los 5 tipos de cáncer más frecuentes en mujeres mexicanas</i>	10
<i>Figura 5. Clasificación histopatológica del banco de tejidos de cérvix en el estudio.</i>	22
<i>Figura 6. Tipificación de VPH en los diferentes tejidos de cérvix</i>	23
<i>Figura 7. Electroforesis capilar de RNAs</i>	24
<i>Figura 8. Histograma de fluorescencia de los controles de calidad</i>	25
<i>Figura 9. Controles de calidad internos de microarreglos de microRNAs</i>	26
<i>Figura 10. Correlación de Pearson de los controles de calidad</i>	27
<i>Figura 11. Normalización de los controles de calidad</i>	28
<i>Figura 12. Análisis de Componentes Principales (PCA)</i>	29
<i>Figura 13. Análisis de Componentes Principales (PCA) de microRNAs en células del cérvix</i>	30
<i>Figura 14. Agrupación jerárquico de microRNAs en cérvix</i>	32
<i>Figura 15. Vía de regulación de Ciclina D1 alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas</i>	36
<i>Figura 16. Vía de regulación de VEGF alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas</i>	37
<i>Figura 17. Vía de regulación de Rb alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas</i>	38
<i>Figura 18. Vía de regulación de E2F1 alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas</i>	39
<i>Figura 19. Vía de regulación de GeneGo MetaCore alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas</i>	41
<i>Figura 20. Validación de la expresión de un grupo de microRNA sobre-expresados en diferentes tejidos de cérvix y líneas celulares</i>	42
<i>Figura 21. Validación de la expresión de un grupo de microRNA suprimidos en diferentes tejidos de cérvix y líneas celulares</i>	43
<i>Figura 22. Reconstrucción de vía de regulación de miR-214</i>	45
<i>Figura 23. Vía de potenciales genes blanco de miR-196a</i>	48
<i>Figura 24. Inmunotinción de la proteína HOXC8 en CaCu</i>	49
<i>Figura 25. Diagrama de HOXC8 en cáncer de cérvix</i>	50
<i>Figura 26. Modelo de expresión de microRNAs en células del epitelio del cérvix</i>	59



## RESUMEN

En recientes años, el estudio de microRNAs asociado con procesos neoplásicos se ha incrementado notablemente. Se han identificado patrones de expresión de microRNAs específicos en diferentes estirpes tumorales; sin embargo, son poco conocidas las vías de regulación y los genes involucrados en la expresión aberrante y patrones de expresión de microRNAs resultantes en la célula neoplásica. Por lo que, la identificación de microRNAs y potenciales vías desreguladas en carcinomas de cérvix, el cual, es la segunda causa de muerte por cáncer ginecológico en nuestro país, constituyen el principal reto en el presente estudio. En este trabajo, se exploró el perfil de expresión de microRNAs celulares en tejidos y líneas celulares derivadas de CaCu, mediante el uso de microarreglos de expresión. Ciento veintitrés microRNAs se encontraron diferencialmente expresados en células tumorales, 64(52%) aumentados y 59(48%) disminuidos. De los microRNAs sobre-expresados, el miR-196a fue evaluado por PCR tiempo real. Además, mediante el uso de herramientas bioinformáticas fue posible identificar a HOXC8 como blanco potencial del miR-196a. La expresión de HOXC8 se evaluó mediante ensayo de inmunohistoquímica. No se identificó un perfil de expresión específico relacionado con la presencia de Virus de Papiloma Humano (VPH) en las muestras evaluadas. Finalmente, miR-196a fue el más sobre-expresado en células con cáncer de cérvix, mientras que se encontró la ausencia en la expresión proteica de HOXC8, por lo que sugerimos que este microRNA probablemente tenga un papel importante como oncomiR en Cáncer de Cérvix.

## **ABSTRACT**

Recently, the study of microRNAs associated with neoplastic processes has increased. microRNA expression patterns in different cell lines and different kinds of tumors have been identified; however, little is known about the alterations in regulatory pathways and genes involved in aberrant sets of microRNAs. One of the main goals of the present study was the identification of microRNAs differentially expressed in cervical cancer cells and the potentially deregulated pathways involved. In the present work, the expression profiles of cellular microRNAs in cervical cancer tissues and cell lines were explored using Affymetrix microRNA microarrays. One hundred and twenty three human microRNAs differentially expressed in tumor cells, 64 (52%) over-expressed and 59 (48%) under-expressed were observed. Among the microRNAs over-expressed, we focused on miR-196<sup>a</sup>, which is presently poorly studied in CC. The expression of this microRNA was evaluated by qRT-PCR. Expression of HOXC8 as potential target, was determined by immunohistochemistry assays. There is no specific microRNA expression profile in CC cells, nor a microRNA related to HPV presence. Furthermore, miR-196a was over-expressed, while an absence of HOXC8 expression was observed. We suggest that miR-196a could have a role as an oncomiR in CC.

## INTRODUCCIÓN

### **microRNAs, pequeños transcritos**

En la última década se ha identificado que los microRNAs, pequeños RNAs de aproximadamente 18-22 nt de tamaño, endógenos no codificantes inhibidores de la expresión de moléculas de RNA mensajero mediante la unión por complementariedad parcial o total en la región 3'UTR o 5'UTR de los RNAm [1, 2]. Los genes que codifican los microRNAs pueden localizarse dentro de regiones intrónicas, exónica o en regiones sin traducir (UTR). Participan en procesos celulares fisiológicos como diferenciación celular, desarrollo, angiogénesis, migración [2, 3] y también en procesos fisiopatológicos de diversas enfermedades humanas.

Las herramientas bioinformáticas han tenido un papel crucial en el estudio de los microRNAs, tanto para la identificación de secuencias genómicas codificantes de microRNAs como, la identificación de sus potenciales blancos. Se ha calculado que aproximadamente 4% del RNA total humano, corresponde a microRNAs y se estima que 60% de los transcritos potencialmente codificantes son regulados por microRNAs [4, 5]. Fue así que, inicialmente se estimó por métodos bioinformáticos la existencia de aproximadamente 1,000 microRNAs en el genoma humano, sin embargo, en la actualidad se han identificado 2,588 secuencias maduras 1,881 secuencias precursoras de microRNAs en el humano, incluidas en la base de datos <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences> [6]. Esta base de datos contiene un total de 35,828 microRNAs y 28,645 precursores de 223 especies, así como la nomenclatura consenso para nombrar a los microRNAs (Tabla 1).

En los últimos años, se ha incrementado la búsqueda de microRNAs y la identificación de sus funciones por medio de la predicción de blancos, mediante el uso de tecnología de análisis masivo como: microarreglos y secuenciación de nueva generación [7-12]. Eso ha permitido el desarrollo y uso de nuevas

herramientas computacionales que, permiten predecir blancos basados en la complementariedad del RNAm con la secuencia semilla del microRNA. Se sabe que esta secuencia corresponde a los nucleótidos 2 al 8 del microRNA maduro y es crucial para la estabilidad, incorporación al RISC (complejo inductor de silenciamiento de RNA, por sus siglas en inglés) y para la especificidad de los genes blancos [13, 14].

Tabla 1. Nomenclatura de microRNAs

Criterio	Descripción	Ejemplo
gen de microRNA	Se escribe con letras mayúsculas	MIR34A, MIR10B, MIR196A1
microRNA precursor	Se escribe la "r" de mir con letra minúscula. Este precursor se refiere a la estructura de tallo-horquilla	mir-34a , mir-10b, mir-196a-1
microRNA maduro	Se escribe la "R" de miR con letra mayúscula. Se refiere a el RNA de 18-22 nt.	miR-34a, miR-10b, miR-196a-1
microRNAs ortólogos	microRNAs con secuencias idénticas en diferentes especies. Se antepone la especie antes de la palabra miR	hsa-miR-34a, mm-miR-34a, rno-miR-34 a
microRNAs parálogos	Secuencia de microRNA que difiere en una o dos bases. Se les asigna una letra.	hsa-miR-10 a, miR-10b
Diferente región genómica	Un microRNA que proviene de mas de un <i>loci</i> . Se indica con un número de forma ascendente a su identificación	hsa-miR-196a-1, hsa-miR-196a-2
Corte de extremos 3' o 5'	El extremo del precursor es escindido por el extremo 5' se le asigna al final, 5p. Si es escindido por el extremo 3' se le asigna al final 3p.	hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-196a-3p

### Biogénesis de microRNAs

Los microRNAs han sido estudiados ampliamente y la evidencia ha revelado que su biogénesis, es un mecanismo complejo con funciones fisiológicas y patológicas [15]. De forma general, los microRNAs se transcriben por la RNA polimerasa tipo II generando el pri-microRNA; este precursor es de ~250 a 450 nt, presenta estructura de tallo-horquilla, cap y poli A (Figura 1). Una vez generado el pri-microRNA, es procesado por el complejo enzimático de Drosha y el cofactor DGCR8 en mamíferos o Pasha en *D. melanogaster*. El complejo procesa al pri-microRNA a un RNA de 60 a 70 nt (pre-microRNA), dejando a un grupo fosfato en 5' y un extremo colgante de 2 nt en 3' del transcrito. Posteriormente, el pre-microRNA es transportado por el complejo de exportinas, de núcleo a citoplasma donde es procesado por Dicer, liberando el

heterodúplex microRNA-microRNA\*. Finalmente, el microRNA maduro es cargado dentro del RISC para regular la expresión de su RNAm blanco por degradación o represión traduccional [15, 16]

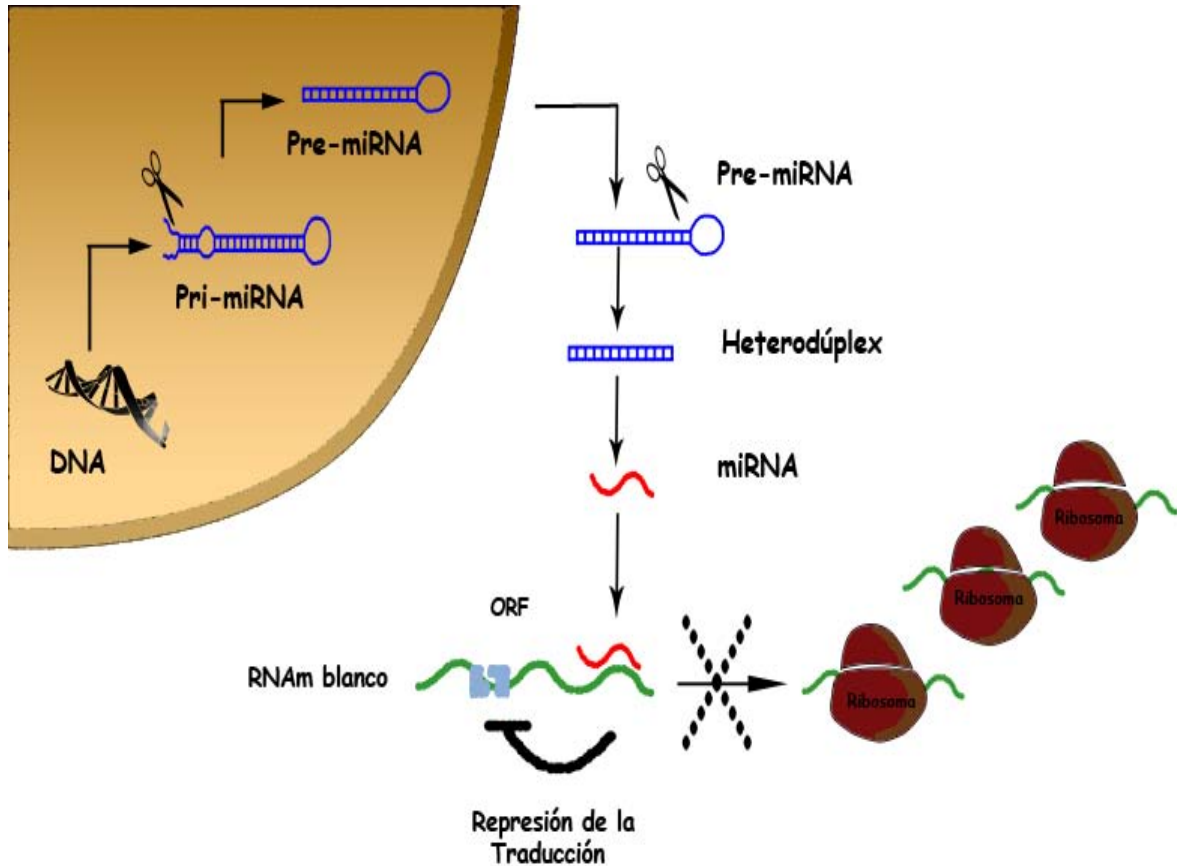
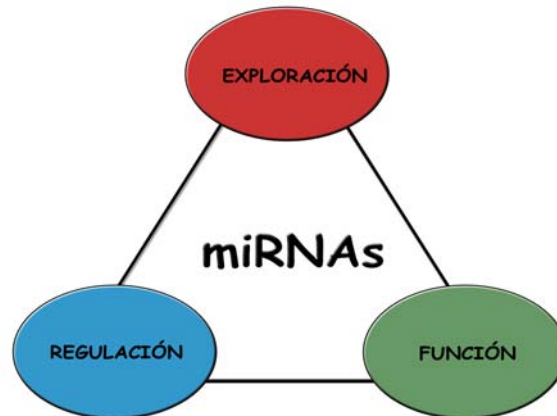


Figura 1. Biogénesis de los microRNAs

### La regulación de los microRNAs

En el universo de los microRNAs, surgen interrogantes por contestar que arman una compleja red funcional y fundamental: ¿cuáles microRNAs están presente en la diversidad de tejidos en una condición específica?, ¿cuáles son los genes blancos de cada microRNA?, ¿cuál es su función?, ¿en qué procesos celulares están implicados? y ¿cómo se regula su expresión? Muchos estudios han tratado de contestar cada una de éstas incógnitas, sin embargo, estudios recientes esta basados en la regulación de la expresión de microRNAs (Figura 2).



**Figura 2. Estudio de los microRNAs.**

En los últimos años, se ha incrementado la búsqueda de microRNAs, mediante tecnologías masivas como microarreglos y secuenciación de nueva generación; así como, sus probables funciones por medio de la predicción de blancos [17]. Esto ha impulsado el desarrollo y uso de nuevas herramientas computacionales, que permiten predecir blancos basados en la complementariedad del RNAm, con la secuencia semilla del microRNA. Se sabe que esta secuencia inicia en el nucleótido 2 al 8 del microRNA maduro y es crucial para la estabilidad, incorporación al RISC y en predicción de genes blancos [13, 14]. Una vez identificado el blanco candidato, el siguiente paso es la validación. El método más utilizado es la construcción de vectores que contengan la secuencia 3`UTR o 5`UTR del blanco candidato fusionado con luciferasa. Para confirmar la unión específica, se utiliza la secuencia blanco con diferentes sitios de mutaciones. Además, la transfección de células con ese vector más la secuencia antisentido permite examinar el RNAm endógeno y los niveles de proteína en presencia o ausencia del microRNA de estudio [18].

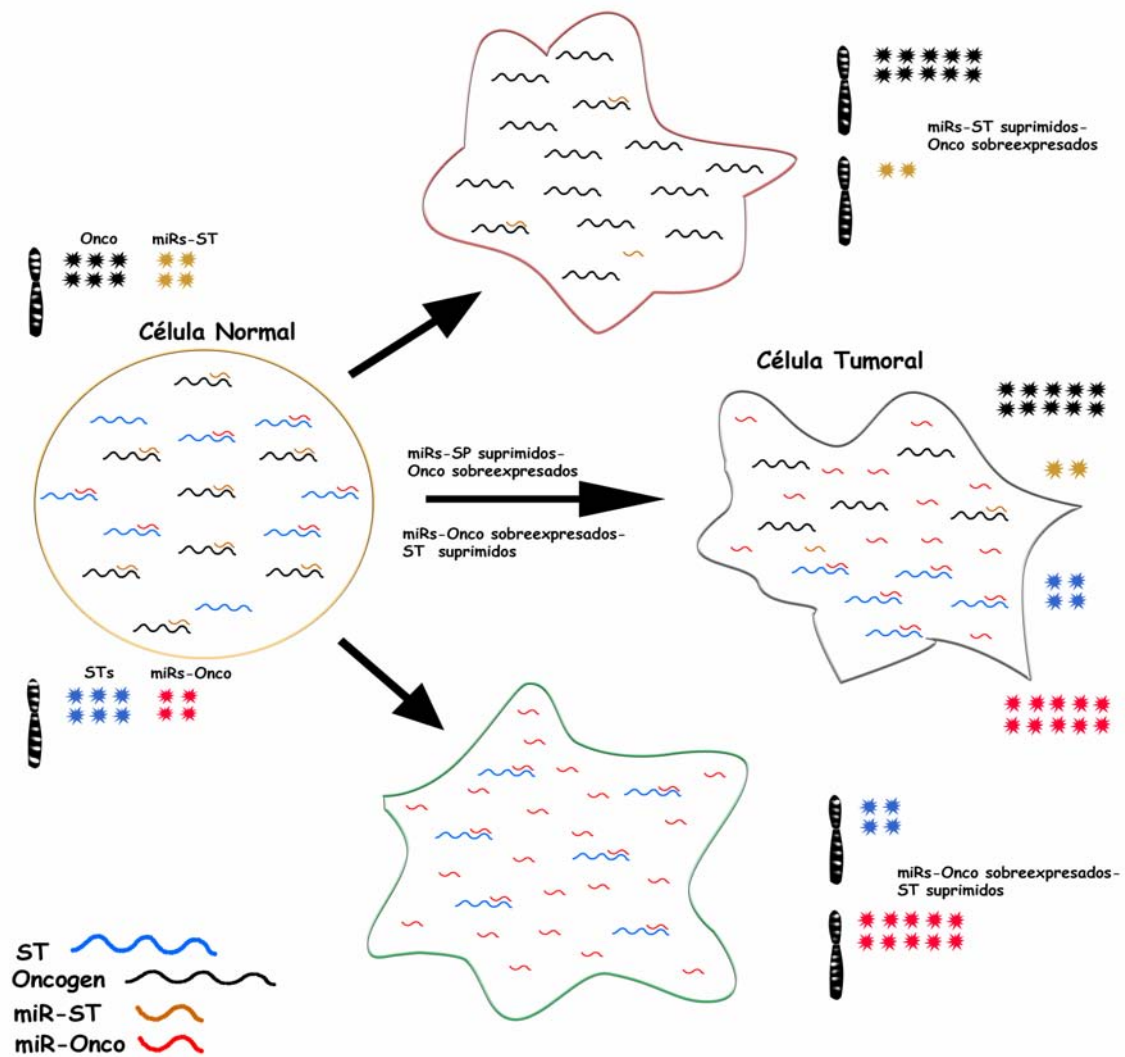
Se ha identificado que esta regulación puede ser por mecanismos epigénéticos y/o la maquinaria de biogénesis de los microRNAs [19-21]. De hecho, un estudio reciente ha confirmado el efecto de la metilación del DNA y la incorporación de marcas de histonas como H3K9me3 y H3K27me3, en el silenciamiento de la expresión de miR-125b1 en células tumorales [22].

## microRNAs y el Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades de mayor importancia en el sector salud a nivel mundial. Se ha propuesto diferentes características moleculares que distinguen a las células neoplásicas y conducen al desarrollo de un cáncer [23]. Por lo tanto, el reto es tratar de elucidar mecanismos moleculares que permitan explicar el desarrollo y progresión de esta patología. Existen evidencias donde se han demostrado la importancia de microRNAs en procesos como: proliferación celular, apoptosis, metabolismo, muerte celular, desarrollo, entre otras [3, 24-28].

Estudios funcionales de los microRNAs han logrado clasificarlos en dos grandes grupos con base a su actividad: a) microRNAs con actividad supresor de tumor; y b) microRNAs con actividad de oncogén. Los microRNAs que actúan similar a un supresor de tumor, tienen como blanco un oncogén; mientras que el microRNA que actúa similar a un oncogén, su blanco es un gen supresor de tumor (Figura 3).

La dualidad de los microRNAs dentro de una célula lleva al equilibrio dinámico dentro del ambiente celular [29, 30]. Cuando el equilibrio se rompe, se puede tener una serie de combinaciones, donde el cambio más distintivo es el incremento de microRNAs con actividad de oncogen y la disminución de microRNAs con actividad supresor de tumor, dando lugar a una célula neoplásica (Figura 3). Entre los microRNAs conocidos con potencial actividad de supresor de tumor están *let-7* y *miR-34a*. Se han demostrado que la expresión de *let-7* se encuentra suprimida en diversas extirpes tumorales [31, 32]; de manera similar, *miR-34*, al igual que su gen regulador, *p53* [33, 34]. Por otro lado, el *cluster miR-17-92* ha sido ampliamente estudiado por su potencial actividad de oncogén, encontrado un incremento de la expresión regulada positivamente con el factor de transcripción *c-myc*, el cual a su vez es regulado por *E2F*, siendo éste último el blanco de estos microRNAs [35-37]. Estos hallazgos han sugerido, la existencia de diversos “loops” de regulación de microRNAs-RNAm.



**Figura 3. Actividades de los microRNAs en cáncer.** Los microRNAs con actividad de supresor de tumor (microRNAs-ST) tienen como transcritos blancos a oncogenes (Onco); mientras que los microRNAs con actividad de oncogén (microRNAs-Onco) tienen como transcritos blancos a genes supresores de tumor (ST). En una célula normal existe un equilibrio entre microRNA-ST/microRNA-Onco. Mientras que en una célula neoplásica se puede tener un incremento de microRNA-Onco/Onco y un decremento en microRNA-ST/ST.

### Perfiles de expresión de microRNAs en cáncer

Diversos estudios han demostrado que los perfiles de expresión de microRNAs caracterizan a las células neoplásicas en cada etapa del desarrollo del cáncer [38, 39]; por lo que, estos resultados revelan que cada estirpe celular tumoral exhibe un perfil de expresión específico [40-42]. De ahí que, los perfiles de expresión de microRNAs en diferentes etapas del proceso carcinogénico, permite asignar a los microRNAs como reguladores críticos y potenciales biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y tratamiento [43, 44].



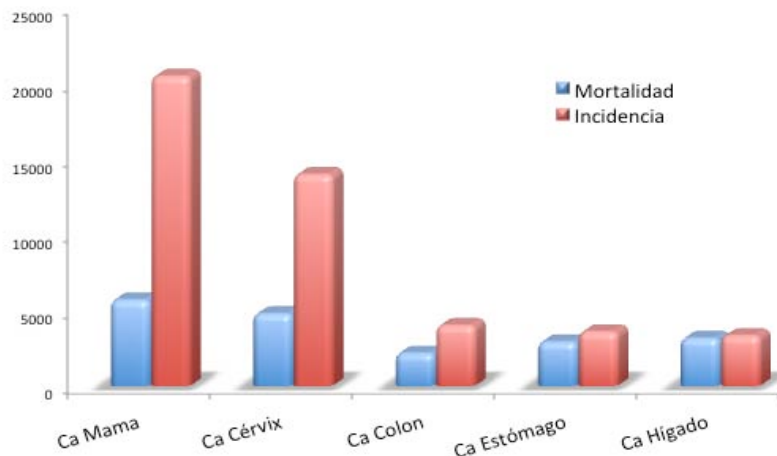
La búsqueda de perfiles de expresión de microRNAs se realiza mediante el uso de tecnologías de alto rendimiento como microarreglos y secuenciación de nueva generación [45, 46]. Por lo que, la selección de la herramienta elegida esta en función de las necesidades de la investigación, generando una gran cantidad de información entorno a los perfiles de expresión, sugiriendolos como una herramienta molecular complementaria a la clínica para el adecuado manejo del paciente oncológico [47] .

Por tal motivo, el uso de la expresión de microRNAs tiene un papel importante en dos áreas:

- a) Diagnóstico. El conocimiento de los perfiles de expresión han sido útiles para la clasificación de tumores poco diferenciados.
- b) Pronóstico. La alteración del perfil de expresión de microRNAs esta relacionado con la progresión, malignidad y supervivencia del paciente. Son pocos los estudios que hacen la asociación clínica del paciente y la progresión de la enfermedad, que podría permitir identificar los pacientes con buen o mal pronóstico.

### **Epidemiología del Cáncer de Cérvix**

El Cáncer de Cérvix (CaCu) representa un problema de salud pública a nivel mundial y en México. A nivel mundial ocupa el 2do. lugar por cáncer ginecológico, con incidencia de 527,624 casos nuevos y el 3er lugar después de mama y pulmón, con una mortalidad de 265,672 por cada 100 mil habitantes [48]. Mientras que en nuestro país, el CaCu ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad en mujeres 13,960 y 4,769, respectivamente de acuerdo al GLOBOCAN 2012 (Figura 4).



**Figura 4. Incidencia y mortalidad de los 5 tipos de cáncer más frecuentes en mujeres mexicanas.** Las barras representan las 5 tipos de neoplasias más frecuentes en la población femenina (GLOCOCAN, 2012).

A pesar de los grandes esfuerzos de las instituciones de salud por brindar un servicio diagnóstico y tratar a las mujeres con esta enfermedad, mueren aproximadamente 12 mujeres al día por CaCu. Las mujeres más afectadas se encuentran en un rango de edad de 40-49 años de edad (27 casos por cada 100 mujeres), seguido por las de 50-59 años (24 casos por cada 100). Mientras que, en grupo con la más alta tasa de morbilidad se ubican a las mujeres de 65-74 años (53 casos por cada 100 mil mujeres), seguido por las mujeres de 50-59 años (51 de cada 100 mil mujeres) [49]. De acuerdo con el Sistema Nacional de Información en Salud, las cinco entidades federativas del país con mayor índice de defunciones por CaCu son en orden decreciente: Estado de México, Veracruz, Distrito Federal, Jalisco y Chiapas [50, 51].

### **Los factores etiológicos asociados a CaCu**

El agente etiológico asociado en un 99.7 % con el desarrollo de CaCu, en países en vía de desarrollo, es el Virus del Papiloma Humano, VPH [52, 53]. En nuestro grupo se ha logrado identificar la asociación de esta neoplasia y la presencias de VPH en un 92%, siendo el tipo viral 16 y 18 los más frecuentes en lesiones invasoras en un 72.2% y 18.6 %, respectivamente. Mientras que los tipos virales 16 y 58 son los más frecuentes en lesiones precursoras de alto

grado, con un porcentaje de 42% y 18%, respectivamente [54-56]. Además, se ha visto que esta neoplasia está asociada a otros factores de riesgo como la edad (mujeres mayores de 40 años), tabaquismo, número de parejas sexuales, número de embarazos, número de partos, inicio temprano de la vida sexual [57-59]. Sin embargo, la infección por el virus o los otros factores de riesgo por sí solos no son suficientes para provocar la enfermedad. Esto sugiere que existen otros mecanismos genéticos que posiblemente tengan un papel importante en la iniciación y desarrollo del CaCu [58].

Por su parte, el desarrollo del CaCu está precedido por varios eventos morfológicos que van de un epitelio normal a un epitelio con lesión intraepitelial de bajo grado, seguida por una lesión de alto grado, hasta finalmente un cáncer invasor. Afortunadamente, solo una pequeña fracción de las lesiones intraepiteliales progresan a un cáncer invasivo, por lo que es notable la existencia de factores genéticos que juegan un papel importante en la carcinogénesis del cérvix. Sin embargo, las características genéticas y moleculares son parcialmente entendidas.

### **Cacu y miRNAs**

A la fecha, diferentes reportes de patrones de expresión de microRNAs en células de CaCu han mostrado diferencias sustanciales, en algunos casos con datos contradictorios [60-66]. En la mayoría de estos estudios, así como en otros tipos de cáncer, se ha identificado la supresión de la expresión de miR-14 [60, 63-65], resultado contrario a lo reportado por otro autor [61]. El primer estudio de expresión de microRNA en cérvix, reveló la sobre-expresión de miR-21 y supresión miR143 en tejidos y líneas celulares de CaCu [62].

A partir del 2008, se incrementaron los estudios de microRNAs en CaCu desde revisiones hasta trabajos originales, dando como resultado una diversidad de resultados, en algunos de los casos coincidentes y en otros no. Estas diferencias de microRNAs reportados entorno a esta neoplasia pudieran deberse a la variabilidad de expresión de microRNAs, diferencias en la tecnologías usadas, el número de microRNAs evaluados, criterios de inclusión de la muestra y procesamiento de la misma, entre otros.

En este contexto, el conocimiento del perfil de expresión de miRNAs en pacientes mexicanas con lesiones del cérvix abre la posibilidad para explorar acerca de la regulación de estos miRNAs implicados en esta neoplasia, así como, la búsqueda de potenciales marcadores moleculares.

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de cérvix representa la segunda neoplasia ginecológica más frecuente en el mundo. Además es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, muriendo 12 mujeres al día por esta neoplasia, lo que indica que es un problema de salud en nuestro país y a nivel mundial.

Actualmente, se han descrito mecanismos de regulación génica extremadamente finos, llevados a cabo por pequeños transcritos de RNA conocidos como microRNAs, los cuales regulan negativamente a diversos transcritos. Se ha identificado que los microRNAs juegan un papel importante en diferentes procesos celulares como proliferación celular, desarrollo, diferenciación, apoptosis y metabolismo, entre otros. Además, se han asociado a procesos carcinogénicos, ya que regulan la expresión de genes supresores de tumores u oncogenes.

En los últimos años, diferentes estudios han identificado la expresión diferencial de microRNAs en células tumorales versus células normales, lo que ha permitido establecer la clasificación de tumores poco diferenciado para el diagnóstico y el tratamiento.

Por otro lado, estudios realizados con cáncer de cérvix y su asociación con microRNAs ha sido enfocado principalmente en líneas celulares, en la maquinaria enzimática involucrada en la biogénesis de microRNAs y en la presencia del Virus del Papiloma Humano. Por tal motivo, es importante el conocimiento del perfil de expresión de microRNAs en el tejido de cérvix normal versus un tejido de cérvix con lesión, que nos permita identificar la huella molecular de microRNAs en carcinomas de cérvix, y así contribuir a la búsqueda de potenciales marcadores en esta neoplasia, así como aportar conocimiento sobre la regulación de estos microRNAs en el proceso tumoral.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los microRNAs se que expresan en lesiones neoplásicas del cérvix ?

## **HIPÓTESIS**

El perfil de expresión de microRNAs en lesiones de cérvix será diferente al perfil de expresión de microRNAs de cérvix sin lesión invasora.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

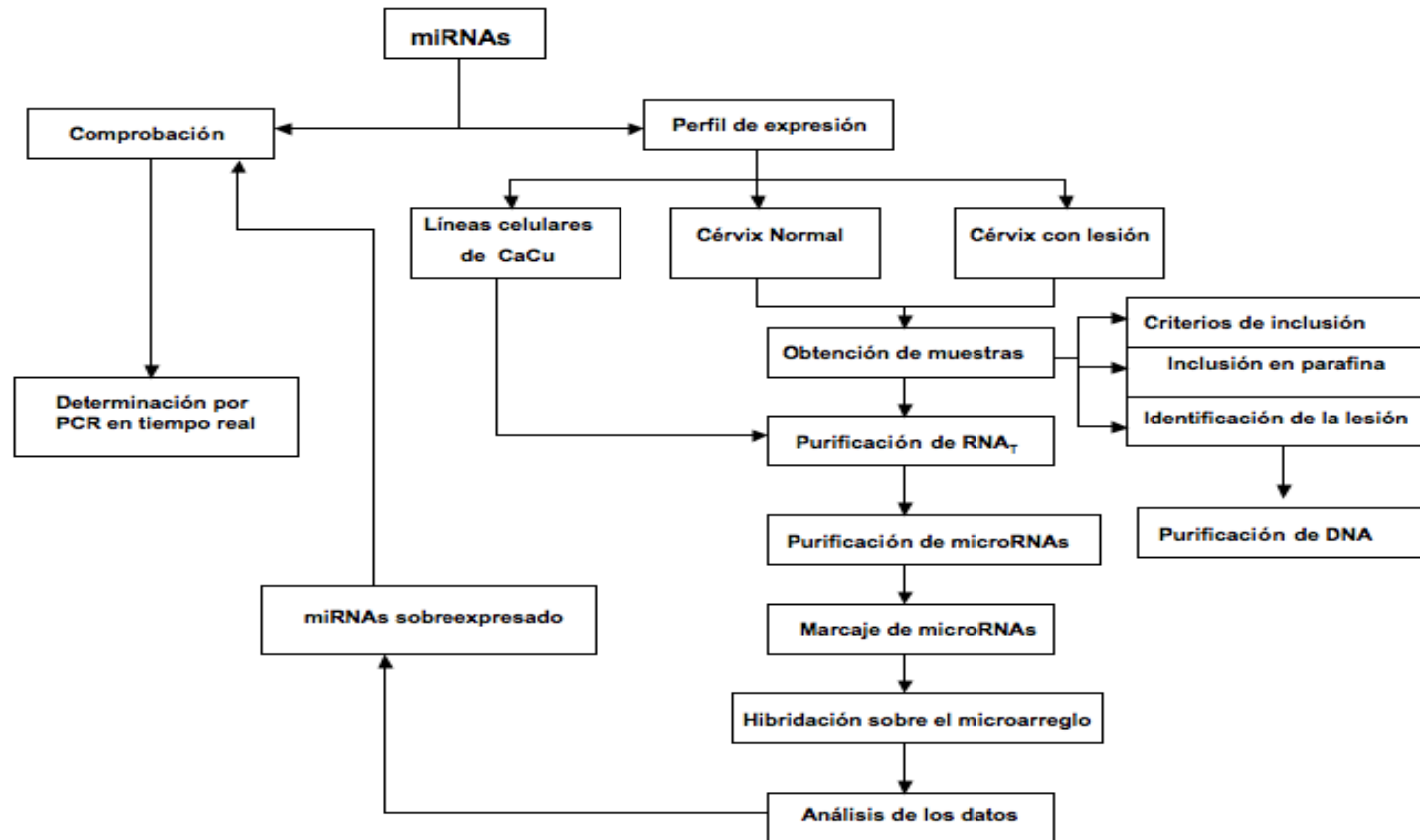
Determinar los microRNAs que se expresan diferencialmente en el tejido con cáncer de cérvix (CaCu) comparado con tejido sano.

### **Objetivos Particulares**

- Determinar los microRNAs que se expresan diferencialmente en un cérvix sin lesión y con lesión.
- Determinar los microRNAs que se expresan en líneas celulares de cáncer de cérvix.
- Comprobar la expresión de los microRNAs más representativos en cáncer de cérvix.

## ESTRATEGIA Y MÉTODOS

A continuación se describe la estrategia que se realizó para lograr los objetivos de este trabajo.



## **Adquisición de muestras**

Las muestras utilizadas en este trabajo fueron obtenidas del Hospital General de México SS. Se colectaron tejidos de cérvix de pacientes con cáncer de cérvix (CaCu) y tejidos de cérvix sin lesión. La toma de muestra fue confirmada por un estudio colposcópico de la Clínica de Displasias y por el análisis histopatológico del mismo hospital. Los tejidos sanos de cérvix fueron obtenidos de histerectomías de pacientes con diagnóstico de miomatosis, sin antecedentes previos de infección de VPH y sin algún tratamiento quirúrgico en el cuello del cérvix. Los tejidos de cérvix con lesión se consideraron los siguientes criterios de inclusión: PAP alterado, sin antecedentes previos de cáncer y sin tratamientos previos como asa diatérmica, radioterapia o quimioterapia. Las muestras utilizadas en este estudio, se manejaron bajo los principios científicos y éticos para la investigación en seres humanos de acuerdo a la Declaración del Helsinki (64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, Octubre 2013) y bajo el consentimiento informado.

En este estudio, también se trabajaron con líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino: CaSki y SiHa (HPV16); HeLa, CaLo, INBL, Rova, ViPa, C4-I, y MS-751 (HPV18); C33A, ViBo y HaCaT (VPH negativa), que amablemente fueron donadas del Laboratorio de Inmunología y Cáncer, Hospital de Oncología, UIMEO, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, a cargo del Dr. Alberto Monroy. Todas las líneas fueron cultivadas en Medio Modificado Dulbecco (Gibco, Life Technologies, Calsbad, CA USA), suplementado al 10 % de Suero Fetal Bovino (Gibco) y 1% de Penicilina-Estreptomicina (Gibco), a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Todas las líneas celulares fueron cultivadas al 70-80% de confluencia, para su extracción de RNA. Además, se cultivaron en cubreobjetos con una confluencia de 50-60% para inmuonocitoquímica.

## **Preparación de muestras biológicas e identificación de la lesión.**

Los tejidos con lesión y sin lesión fueron divididos en dos fragmentos, una parte fue colocada en un tubo con RNAlater (Qiagen, Valencia, CA, USA) para su extracción de RNA y la otra en solución fijadora para su inclusión en parafina. Las muestras en RNAlater fueron almacenadas a -70°C hasta la confirmación



de la lesión por histopatología. Mientras que, las muestras colocadas en solución fijadora fueron transferidas en un tren de solventes para su inclusión en parafina.

Se realizaron cortes de 5mm de los bloques de parafina para su tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E), posteriormente se realizó examinación histológica, realizada por la Dra. Alejandra Mantilla, en la Unidad de Patología, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI. El diagnóstico histopatológico nos permitió corroborar el diagnóstico del tejido del cérvix, la identificación de la zona de células tumorales y el porcentaje de ellas. De estos bloques también se realizó un microarreglo de tejidos.

### **Tipificación y secuenciación de HPV**

Se aisló el DNA genómico de los bloques de parafina utilizando la técnica de sacabocado, siguiendo las intrucciones de Promega Wizard Kit (Promega, Madison, WI, USA). El DNA fue cuantificado con el Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. La integridad del DNA fue revisada en gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio. Cada DNA fueron sujetos a tipificación de VPH utilizando los iniciadores E6F/E6R [67]. 100 ng de DNA fue sujeto a 40 ciclos de amplificación en las siguientes etapas: 5 min. a 94°C de pre-desnaturalización, 1 min. a 94°C, 1 min. a 44°C, 1 min. a 72°C y 5 min. a 72°C como extension final. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. Las muestras negativas para la amplificación de E6F/E6R fueron sometidos a la amplificación de GP5+/GP6+ [68]. El DNA fue sujeto a 40 ciclos de amplificación en las siguientes etapas: 5 min. a 94°C de pre-desnaturalización, 1 min. a 94°C, 1 min. a 44°C, 1 min. a 72°C y 5 min. a 72°C como extension final. Los productos de amplificación fueron purificados con Wizard SV gel y PCR Clean-up System Kit (Promega), secuenciadas por método de Sanger utilizando Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y analizadas en el secuenciador 3100 ABI PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias fueron alineadas y comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology.

## **Extracción de RNA**

Las muestras utilizadas en este estudio fueron almacenadas en RNAlater (Qiagen) a -70°C hasta la purificación de RNA. Los tejidos de cérvix sin y con lesión y líneas celulares fueron disgregadas con el TissueLyser (Qiagen). La extracción de RNA se realizó con miRVana Isolation Kit (Life Technologies), de acuerdo al protocolo ya establecido. La concentración se determinó en el NanoDrop-1000 y la integridad fue evaluada en el Bionalyzer 2100 Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Para este estudio se incluyeron los RNAs que tuvieron un valor de RIN (RNA Integrity Number) >8.

## **Ensayo de microarreglos de expresión de microRNAs**

Para el ensayo de expresión de microRNAs, se usó el GeneChip miRNA Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). El microarreglo contiene microRNAs y pre-microRNAs de la base de datos de miRBase v11, de 71 organismos incluidos: humano, ratón, rata, perro, chimpancé, entre otros. Cada arreglo contenía 45,930 sondas, de las cuales 7,788 eran sondas de microRNAs que se encontraban por cuadruplicado.

Los RNAs de las muestras de tejidos de cérvix con/sin lesión y líneas celulares que cumplieron con los criterios de inclusión fueron marcados con el FlashTag Biotin RNA Labeling Kit (Genisphere) e hibridados sobre el microarreglo microRNA Gene Chip Galaxy v. 1.0, (Affymetrix), bajo el protocolo establecido por la casa comercial (Anexo 1). De manera general, se utilizó 1 ug de RNA total, se sintetizó el cDNA, se marcó e hidridó en el chip por 17 horas a 37°C, 60 rpm en GeneChip Hybridization Oven 645, Affymetrix. Posteriormente, se lavaron los microarreglos en la estación de fluidos, Gene Fluidics Station 450, Affymetrix, siguiendo el protocolo establecido del formato del microarreglo (FS\_0004), y finalmente se escanearon en el GeneChip Scanner 7G, Affymetrix (Anexo 1).

## **Análisis de expresión**

El análisis de microarreglos fue realizado en tres etapas. En la primera etapa, se realizó el control de calidad de los microarreglos hibridados, usando el

miRNA QC Tool Software, Affymetrix. En este análisis, se realizó la corrección del ruido de fondo utilizando RMA (Robust Multi-Chip Average). Subsecuentemente, los datos fueron normalizados mediante Mediana-Polish y resumidos por Cuantiles, transformados a  $\log_2$ . En la segunda etapa, se hizo el análisis de expresión de microRNAs utilizando los archivos .CEL utilizando el Software Partek Genomic Suite v6.6. El conjunto de sondas (Probe Set) fueron resumidos mediante Mediana Polis y normalizando por Cuantiles. La corrección del ruido de fondo fue realizado mediante RMA, transformando los datos en base  $\log_2$ . Se realizó una inspección de la expresión de microRNAs usando Análisis de Componente Principales (PCA, por sus siglas en inglés). La etapa final consistió en la identificación de microRNAs expresados diferencialmente mediante Análisis de Varianza (ANOVA), utilizando los tejidos de cérvix sano referencia basal de expresión. Además, las líneas derivadas de CaCu y tumores fueron comparados con el tejido cervical sano utilizando el modelo de mínimos cuadrados. La expresión de microRNAs significativos fueron seleccionados utilizando el *Fold Change* de  $>2$ , a  $<-2$  y *False Discovery Ration* (FDR)  $<0.05$ . Finalmente, se realizó un mapa de calor de los microRNAs diferencialmente expresados, obtenidos mediante el método Euclidiano (disimilitud de muestras). Finalmente, la relación de los genes con cambios de expresión y estadísticamente significativos, fueron visualizados mediante diagramas de Venn y agrupamientos jerárquicos.

### **Amplificación por RT-PCR tiempo real**

Una vez determinado los microRNAs sobre-expresados o suprimidos, se seleccionaron los microRNAs para evaluar su expresión en RT-PCR tiempo real siguiendo los siguientes criterios: a) microRNAs expresados en más del 50% de las muestras analizadas; b) microRNAs asociados a procesos de cancer, c) microRNAs poco descritos en CaCu.

El RNA de todas las muestras fueron tratados con 1U de DNasa enzima y Buffer DNasa 1x. La reacción se incubó a 37°C por 30 min., posteriormente se agregó EDTA 5mM y se incubó a 65°C por 10 min. Finalmente, el RNA fue sujeto a PCR cuantitativa usando TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit y

miRNA Assay (hsa-miR-196a, hsa-miR-25, hsa-miR-18b, hsa-miR-424, hsa-miR-214, hsa-miR-199a, hsa-miR-199b, Applied Biosystem), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se utilizó como gen constitutivo al RNA pequeño nucleolar RNU6B. De forma breve, 7.5 uL de master mix contenía 10 ng de RNA total, 3.0 uL 5X RT primer, 1.5 uL 10X Buffer de Transcripción, 0.15 uL de 100 mM dNTPs, 1.0 uL MultiScribe Reverse Transcriptase 50U/uL, 0.19 uL Inhibidor de RNasa. La mezcla fue incubada por 30 min a 16°C, 30 min. a 42°C y 5 min. a 85°C. La reacción de PCR tiempo real fue realizada en un volumen final de 10 uL, que contenía 1.33 uL producto de la RT, 0.5 uL TaqMan Small RNA Assay 20X, 5.0 uL TaqMan Universal Master Mix con UNG y 3.17 uL de Agua libre de RNasa. La mezcla de reacción fue incubada por 2 min a 95°C, 60 seg a 60°C. La cuantificación relativa fue calculada por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = Ct_{(miR-X)} - Ct_{(RNU6B)}$  and  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(CaCu)} - \Delta Ct_{(Tejido de cérvix Sano)}$  [69].

### **Identificación de Blancos de microRNAs**

Para la predicción de genes blancos de los microRNAs aberrantes se usaron diferentes bases de datos como Diana-microT v5.0, TarBase v6.0, TargetScan v6.2, microRNA, org, PicTar y miRecords v6.0. Adicionalmente, se usó GeneGo MetaCore (Thompson Reuters, [http://www.genego.com/.](http://www.genego.com/)) para la reconstrucción de vías de señalización alteradas, identificar potenciales blancos y genes reguladores de los microRNAs. Se emplearon 50 iteraciones para generar una vía de señalización.

### **Inmunodetección de HOXC8 en células de cáncer de cérvix**

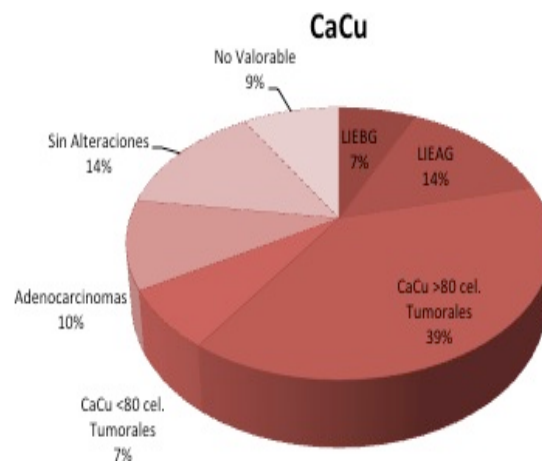
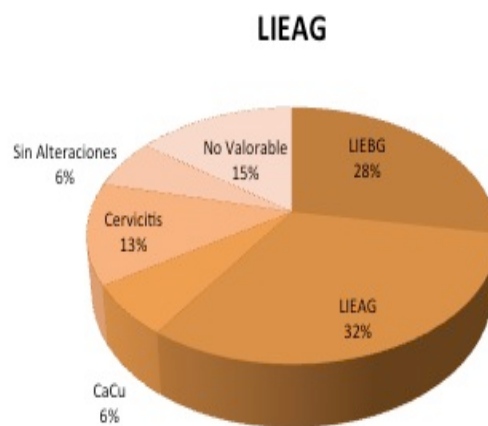
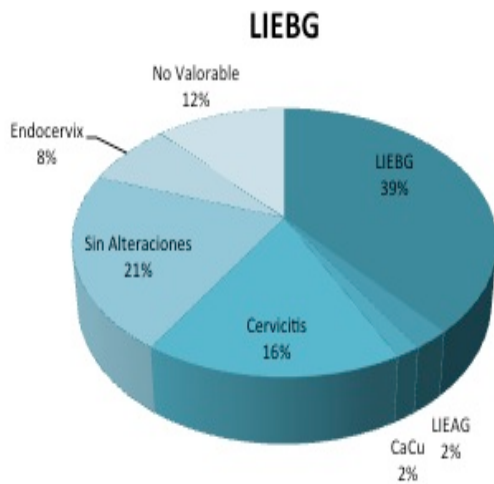
La detección de HOXC8 fue realizada en tejidos de CaCu y en líneas celulares de cérvix. Para la detección en tejido tumoral, se construyó un microarreglo de tejidos con 24 casos de CaCu y tejidos sanos de cérvix usando el microarreglador de tejidos (Chemicon Co. Bellerica, MA, USA). Las etapas de la inmunotinción fueron las siguientes: exposición de antígeno con solución de Trilogy, a 96°C por 45 min. Después del bloqueo de la peroxidasa endógena con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se incubó con Albúmina de Suero Bovino (BSA) por 30 min a temperatura ambiente. Seguido, las laminillas fueron incubadas con anticuerpo

policlonal anti-HOXC8 (ab86236, Abcam, Cambridge, MA, USA) a una dilución 1:200 en 1% BSA, toda la noche a 4°. Posteriormente, las laminillas fueron lavadas con PBS y tratadas con el Método de detección Mouse/Rabbit InmunoDetector HRP Label (Dako, Glostrup, Denmark). Para ello, se incubaron las laminillas con anticuerpo secundario (Mouse/Rabbit Immunodetection Biotin Link) durante 15 minutos. Después de tres lavados con PBS, fueron incubadas con InmunoDetector HRP Label durante 15 minutos y finalmente lavadas 3 veces con PBS. El desarrollo de la señal fue obtenida con una solución de 0.05% 3,3-diaminobencinina tetrahidroclorídico (DAB sustrato-cromógena) en 0.01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y contrateñidas con Hematoxilina. La expresión de HOXC8 fue evaluada por observación microscópica a 10X y a 40X de las muestras problemas y de los controles positivos y negativos respectivamente.

## **RESULTADOS**

### **Muestras de estudio y tipificación de VPH**

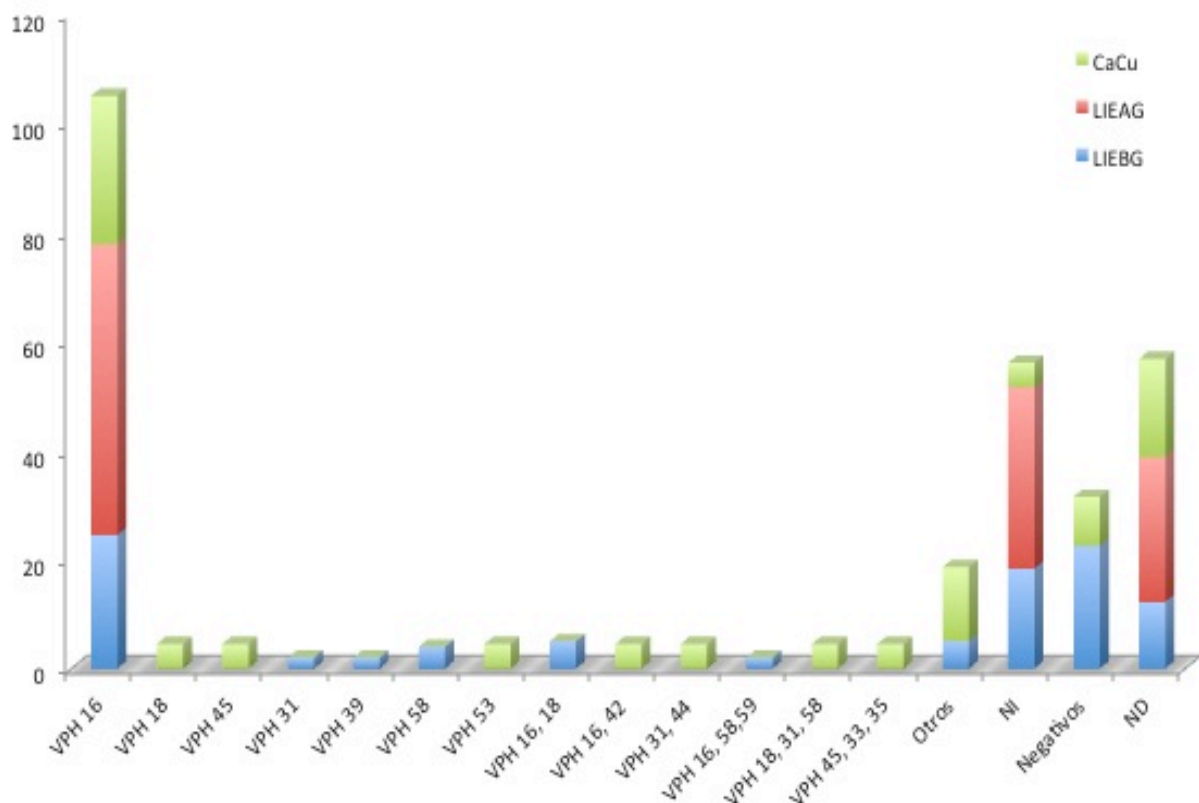
Se recolectaron un total de 238 tejidos de cervix, entre ellos: 127 Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado (LIEBG), 47 Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado (LIEAG) y 57 Tejidos de CaCu. Los tejidos que cumplieron con las características de acuerdo a su grupo de clasificación de Bethesda fueron: 22 LIEBG, 15 LIEAG y 22 carcinomas invasores epidermoides, el resto no fueron incluidos en el estudio por diferentes causas como: escaso tejido no valorable, sin alteraciones, procesos inflamatorios, lesión que no correspondía con el grupo incluido o por contener menos del 80% de células tumorales (Figura 5). Todos los tumores utilizados en este estudio fueron carcinomas invasores epidermoides, debido a su mayor incidencia (80% aproximadamente). De acuerdo a la clasificación de FIGO para la estadificación de los carcinomas invasores, el 60% correspondió a tumores en estadio IIB, 35 % IB y el 5% eran IIIB.



**Figura 5. Clasificación histopatológica del banco de tejidos de cérvix en el estudio.** En la parte superior se observa el grupo de LIEBG, en el centro el grupo LIEAG y en la parte inferior, se encuentran todos los Carcinomas invasores epidermoides clasificados por FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia).

Finalmente, las muestras fueron interrogadas para conocer la presencia de VPH, encontrándose en carcinomas epidermoides la presencia de 27.7% de VPH16 y 27.1% con infección por otro tipo viral de VPH, y un 18% de coinfección de más de un tipo viral, entre los que destaca, VPH 18, 31, 33, 35, 42, 45, 58 y 59. En las LIEAG se identificó la presencia de 53.3 % con VPH; mientras que en LIEBG y tejido de cérvix sin alteraciones se encontró la presencia de VPH en el 44.5% y 12%, respectivamente (Figura 6). Del mismo modo, se confirmó la presencia de VPH en las líneas celulares derivadas de CaCu, encontrándose positivas para VPH 16 a CasKi, SiHa, positivas para VPH18 a HeLa, CaLo, INBL, Rova, ViPa, C4-I, y MS-751 y ausencia de VPH en C33A, ViBo y HaCaT, de acuerdo a lo reportado (Figura 6).

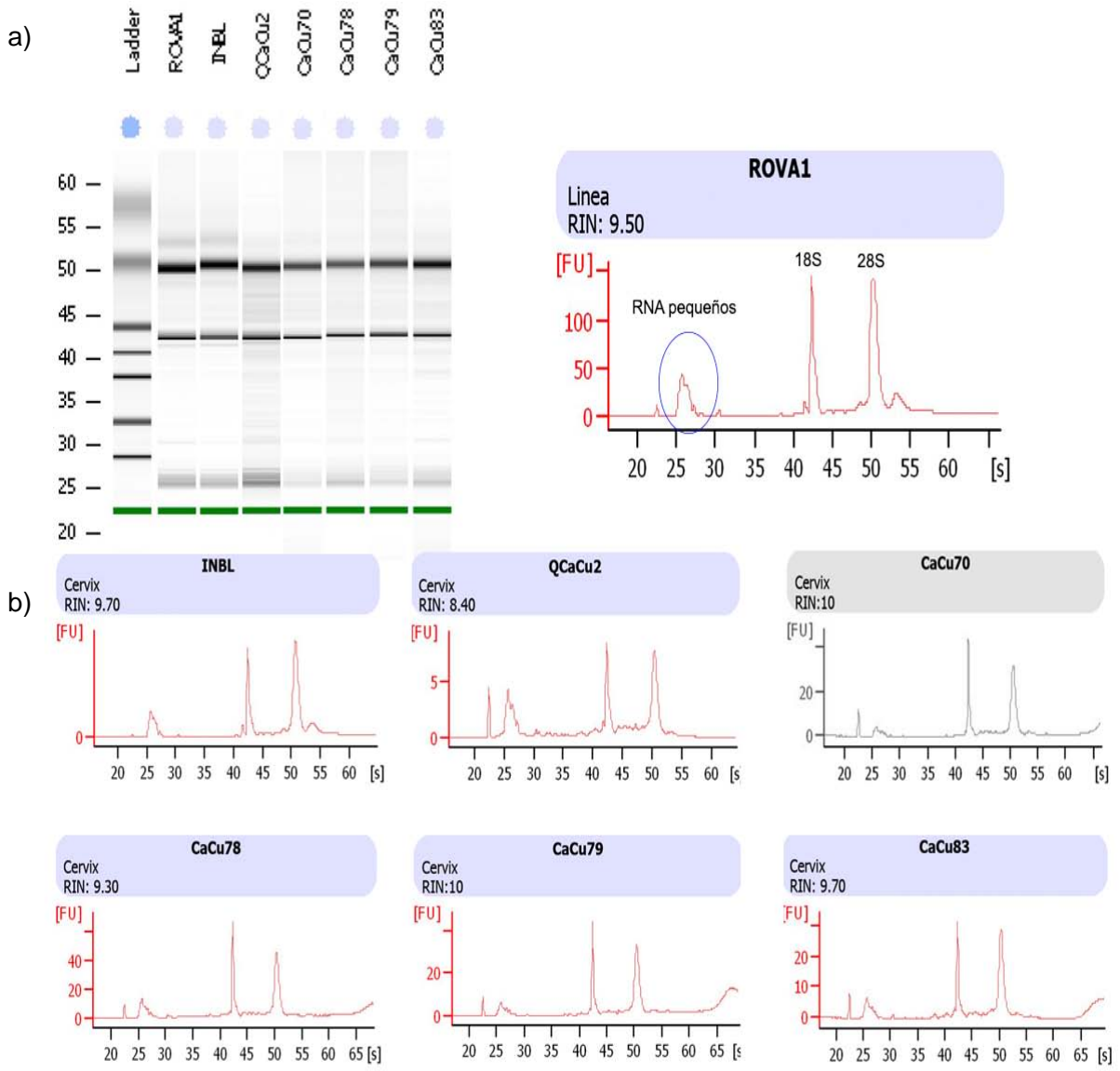
Tipos virales de VPH



**Figura 6. Tipificación de VPH en los diferentes tejidos de cérvix.** Se observa la presencia de diferentes tipos virales y coinfecciones en la mayoría de los carcinomas invasoras de cervix.

## Purificación de microRNAs

Se realizó la purificación de RNA total, obteniendo al mismo tiempo la fracción de microRNAs de todas las muestras en estudio que cumplieron los criterios de inclusión, al igual que las líneas celulares derivadas de cérvix. El RNA fue cuantificado por espectrofotometría y todas las muestras tuvieron cantidad variable (200- 1000 ng/uL). La integridad de las muestras fue evaluada en el Bionalyzer de Agilent, utilizando como parámetro de calidad el RIN (RNA Integrity Number) (Figura 7).



**Figura 7. Electroforesis capilar de RNAs.** Evaluación de la integridad del RNA total y la fracción de microRNAs en diferentes tipos de muestras de cérvix. a) Se observa el gel digital obtenidos del corrimiento de Nano600 RNA de muestras de cérvix. b) Electroferograma de diferentes muestras que indica las posiciones del la región 18S, 28S, región de RNA pequeños en la que se encuentran los microRNAs, y el valor del RIN.

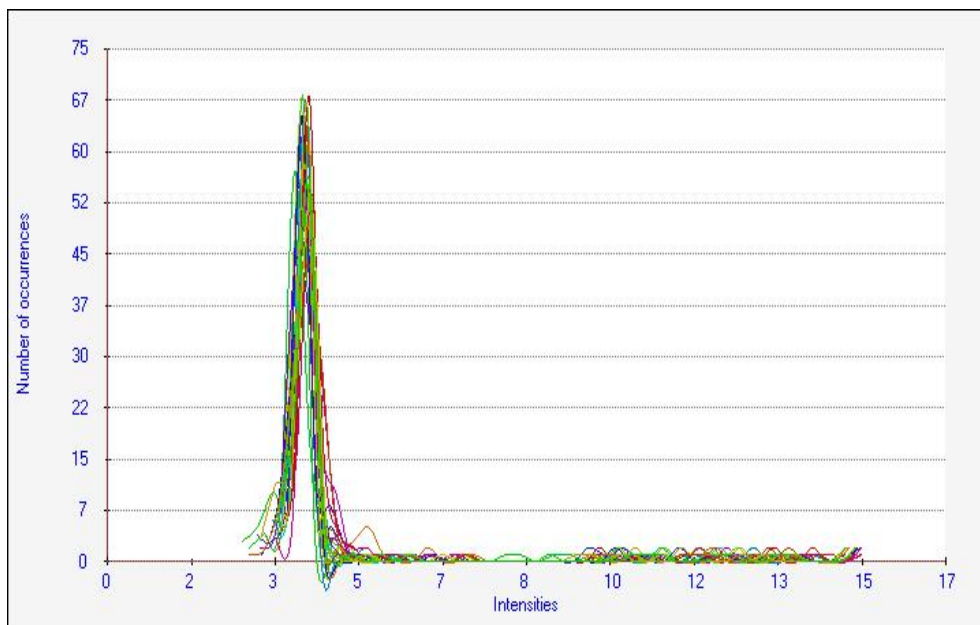


## Microarreglos de expresión de microRNAs

Un total de 30 muestras fueron hibridadas en el Genechip microRNAs 1.0, Affymetrix, de acuerdo al protocolo establecido (Anexo 1). Todos estos ensayos de microarreglos se realizaron siguiendo la guía de *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME) [70, 71]. Las muestras hibridadas fueron: 4 tejidos de cérvix sano, 3 LIEBG, 3 LIEAG, 5 CaCu y 12 Líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix (CaSki, SiHa, HeLa, CaLo, INBL, Rova, ViPa, C4-I, y MS-751, C33A, ViBo y HaCaT. Se utilizó como réplica experimental la línea celular C33A y como réplica biológica a HeLa, cultivada en la mismas condiciones pero con medio RPMI.

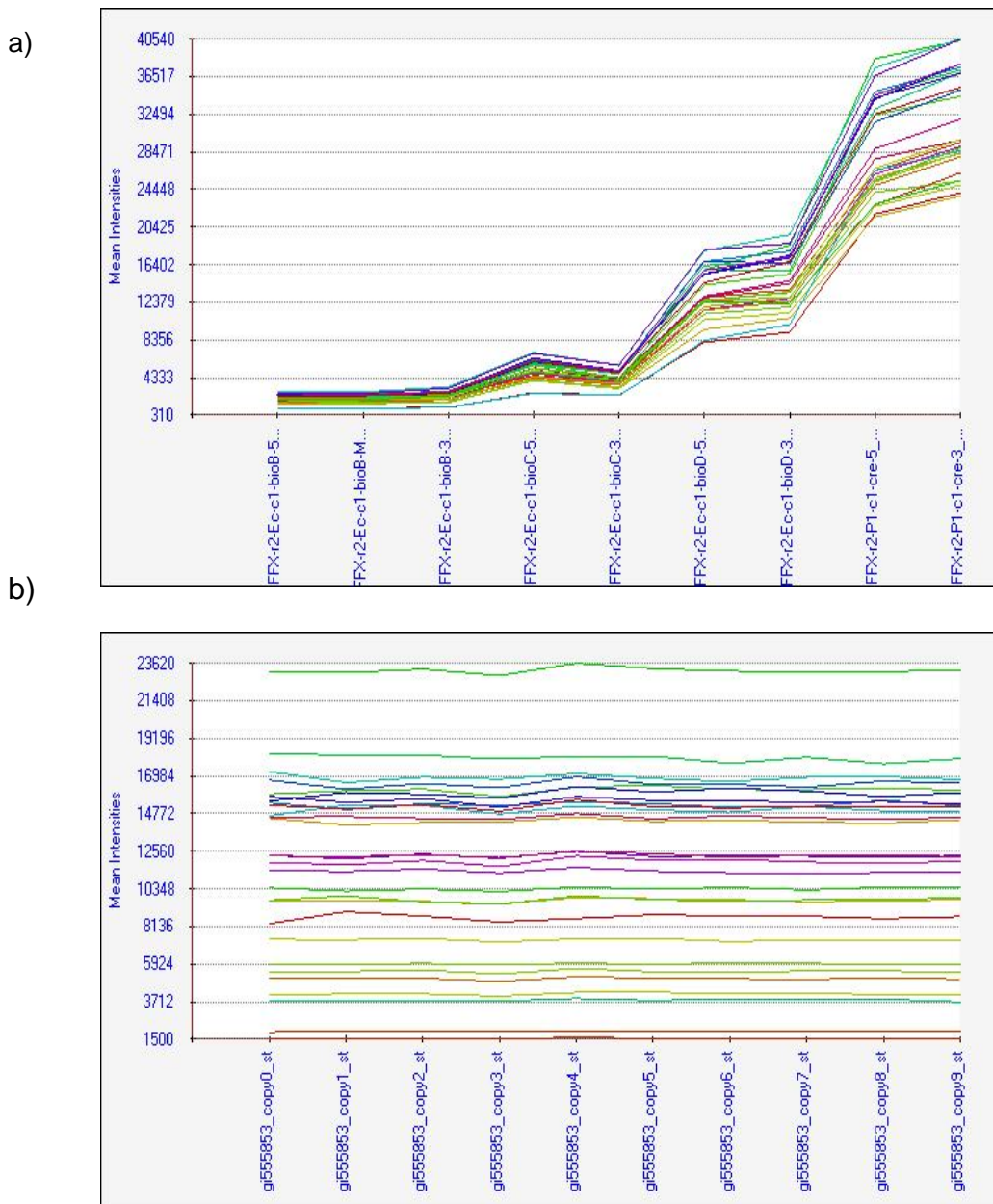
## Control de calidad

La evaluación de los controles de calidad (CC) se realizó con el programa de Affymetrix Expresión Console Software v 1.3.1 y el miRNAQCTool, disponible en la página [http://www.affymetrix.com/estore/browse/level\\_seven\\_software\\_products\\_only.jsp?productId=131414&categoryId=35623&productName=Affymetrix%26%23174%3B-Expression-Console%26%23153%3B-Software#1\\_1](http://www.affymetrix.com/estore/browse/level_seven_software_products_only.jsp?productId=131414&categoryId=35623&productName=Affymetrix%26%23174%3B-Expression-Console%26%23153%3B-Software#1_1). El análisis se realizó utilizando el algoritmo *Robust Multichip Analysis* (RMA) para expresión.



**Figura 8. Histograma de fluorescencia de los controles de calidad.** La distribución de la fluorescencia fue homogénea, cada línea de color representa un experimento de microarreglo. En el eje de las X se observa la intensidad de fluorescencia y en el eje de las Y el número de veces que se observaron los controles positivos y negativos dentro del microarreglo.

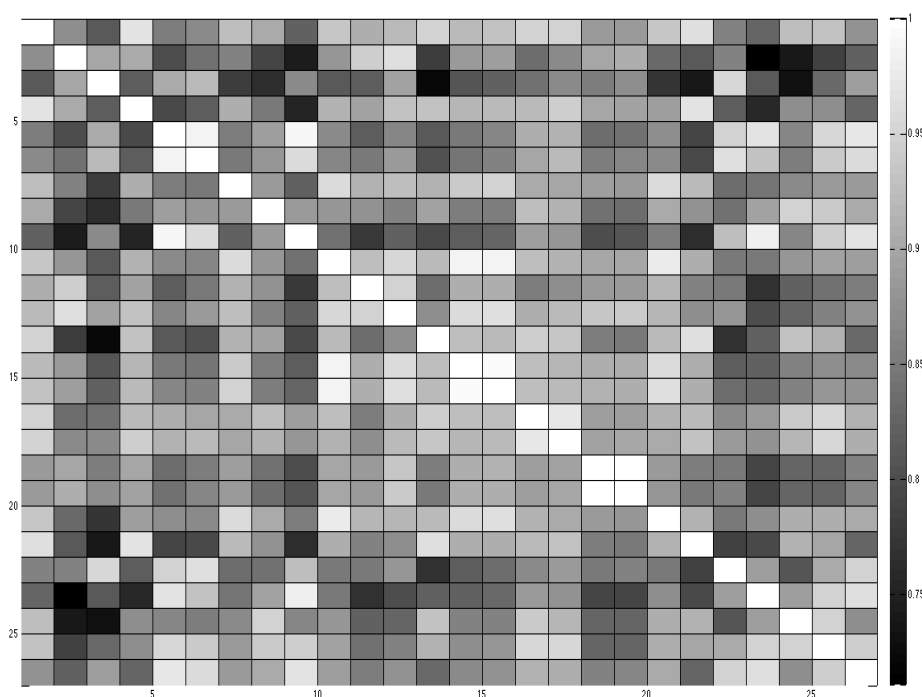
Los controles de calidad en los microarreglos presentaron un gradiente de fluorescencia adecuado a lo esperado, además se observan los controles negativos y positivos. (Figura 8). Se evaluaron los controles internos (hibridación y procesamiento) para determinar valores extremos en los experimentos (Figura 9). Se evaluaron los controles internos (hibridación y procesamiento) para determinar valores extremos en los experimentos (Figura 9).



**Figura 9. Controles de calidad internos de microarreglos de microRNAs.** En el eje Y, expresión diferencial de 9 controles de procesamiento e hibridación, eje X representa los experimentos realizados. a) Controles internos de procesamiento (copy 0 a la copy 9) cada punto en la imagen representa un control. La línea representa la variación de intensidad de fluorescencia generada en cada experimento; b) Intensidad promedio de controles de

hibridación (bio B, bioC, bioD, y cre) utilizados en diferentes concentraciones durante el experimento. Todos ellos muestran el mismo patrón homogéneo.

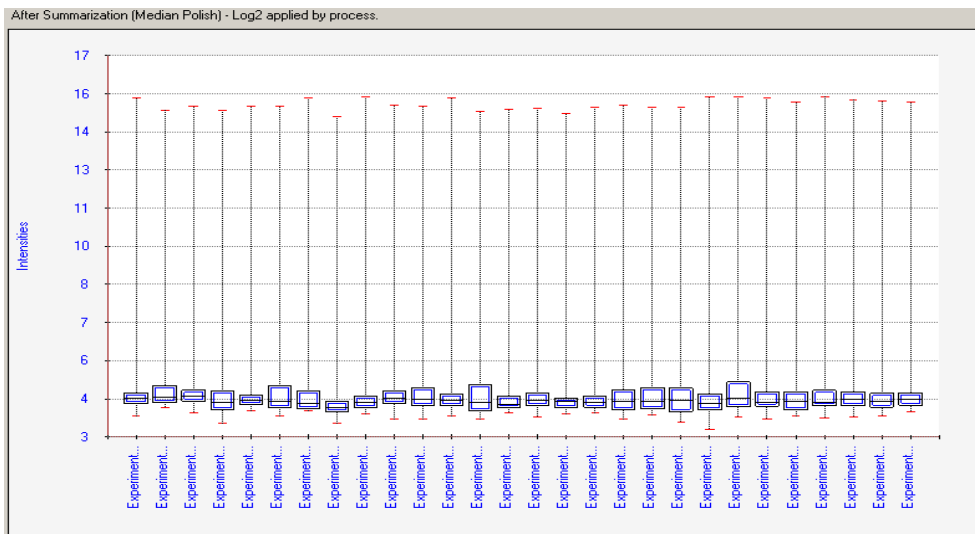
Con la finalidad de identificar las variaciones en los controles de calidad se compararon todos los arreglos, para ello se utilizó la correlación de Pearson, mostrando pocas variaciones experimentales en los controles (correlación mínima 0.809). Dos arreglos se descartaron por mostrar baja fluorescencia (defectos de lavado y fabricación).



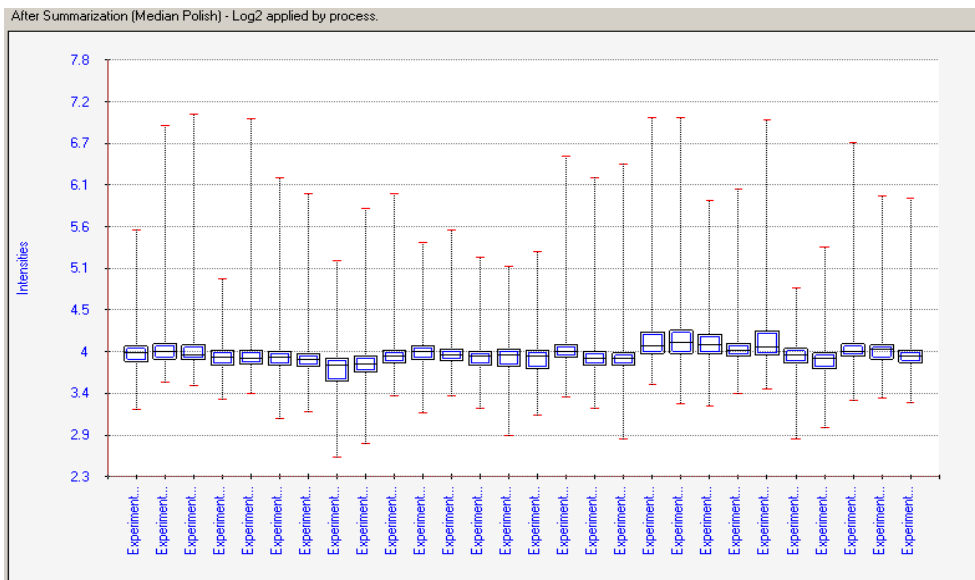
**Figura 10. Correlación de Pearson de los controles de calidad.** Correlación de los 28 microarreglos de microRNAs Galaxy 1.0. Las correlaciones observadas en los experimentos van de 1 a 0.799 en escala de grises (barra derecha). El eje de las X y Y representan los diferentes arreglos evaluados y su comparación contra todos los arreglos.

Posteriormente, se examinó la distribución de los controles de calidad en cada uno de los experimentos. De acuerdo a lo esperado, se observaron variaciones en la distribución causada por diferencias experimentales (Figura 11). Finalmente, se realizó la normalización de los controles. Con estos resultados, fue posible identificar que no existieron diferencias experimentales que pudieran afectar los resultados del análisis de expresión.

a)



b)

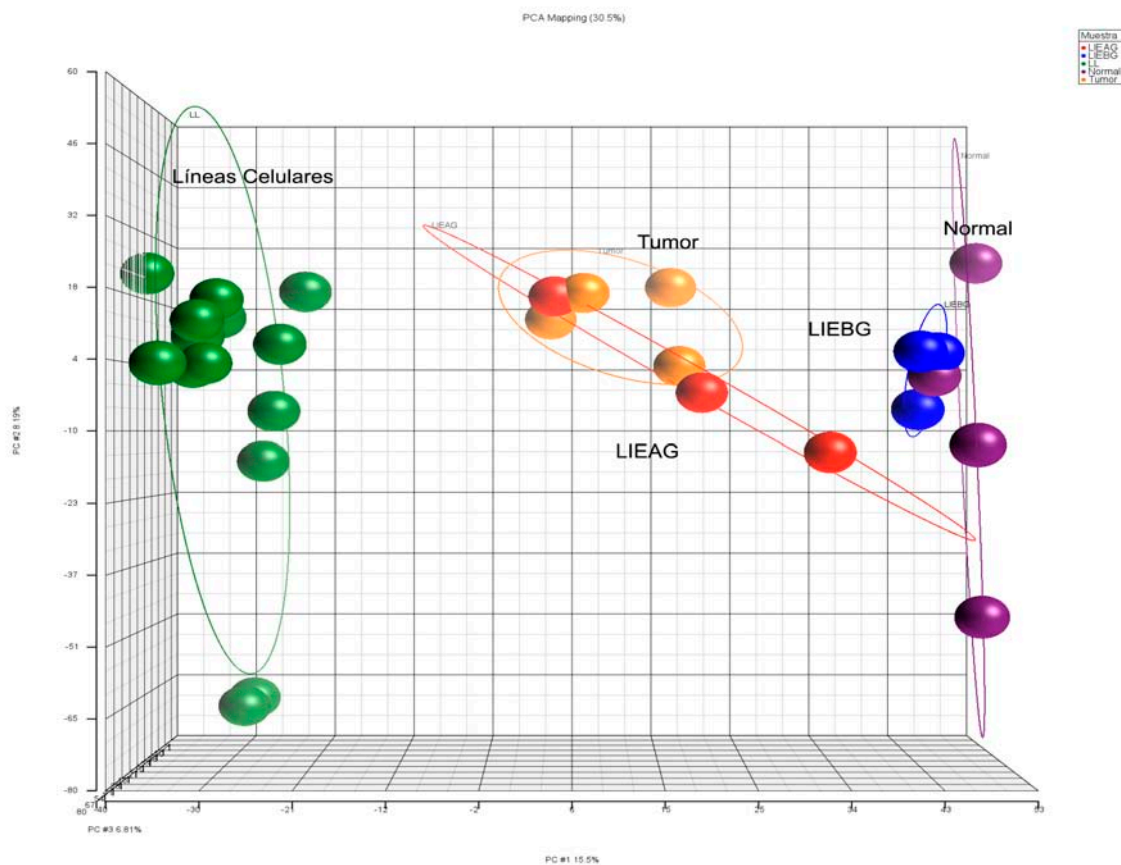


**Figura 11. Normalización de los controles de calidad.** Distribución de los controles de calidad del microarreglo miRNA 1.0. En el eje X se representan los 28 experimentos de microarreglos, y en el eje Y la intensidad de fluorescencia de los marcadores para los controles de calidad. a) Distribución de los datos crudos de los 28 microarreglos. Se observan 7 microarreglos que presentan variaciones en la distribución de las intensidades de fluorescencia en los distintos microarreglos hibridados. B) Normalización de todos los experimentos de microarreglos miRNA 1.0 basado en Media Polish, expresado en log 2. Se observa que todos los arreglos se ajustan a la misma escala de fluorescencia.

## Análisis de Expresión diferencial

Una vez que se corroboró la ausencia de errores en los controles de calidad, los datos crudos se normalizaron mediante el algoritmo de RMA, con la finalidad de eliminar el ruido intra e interarreglo. Este análisis se realizó

utilizando los archivos .CEL generados en cada experimento de microarreglo mediante el uso del software Partek Genomic Suite v 6.5. Primero, se examinó la distribución global de expresión mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA, siglas en inglés, Figura 12). En este análisis se observaron diferencias claras entre los distintos grupos (Tejido Sano, LIEBG, LIEAG, Tumores y Líneas Celulares), lo que sugirió diferencias de expresión entre los distintos grupos de estudio (Figura 12). De esta manera, se puede observar a la izquierda, las líneas celulares de cáncer de cérvix, a la derecha tejidos de cérvix sanos y LIEBG, en la región central observamos los tumores. Mientras que las LIEAG comparten características de microRNAs similares tanto al tumor como a las LIEBG y tejido sano.



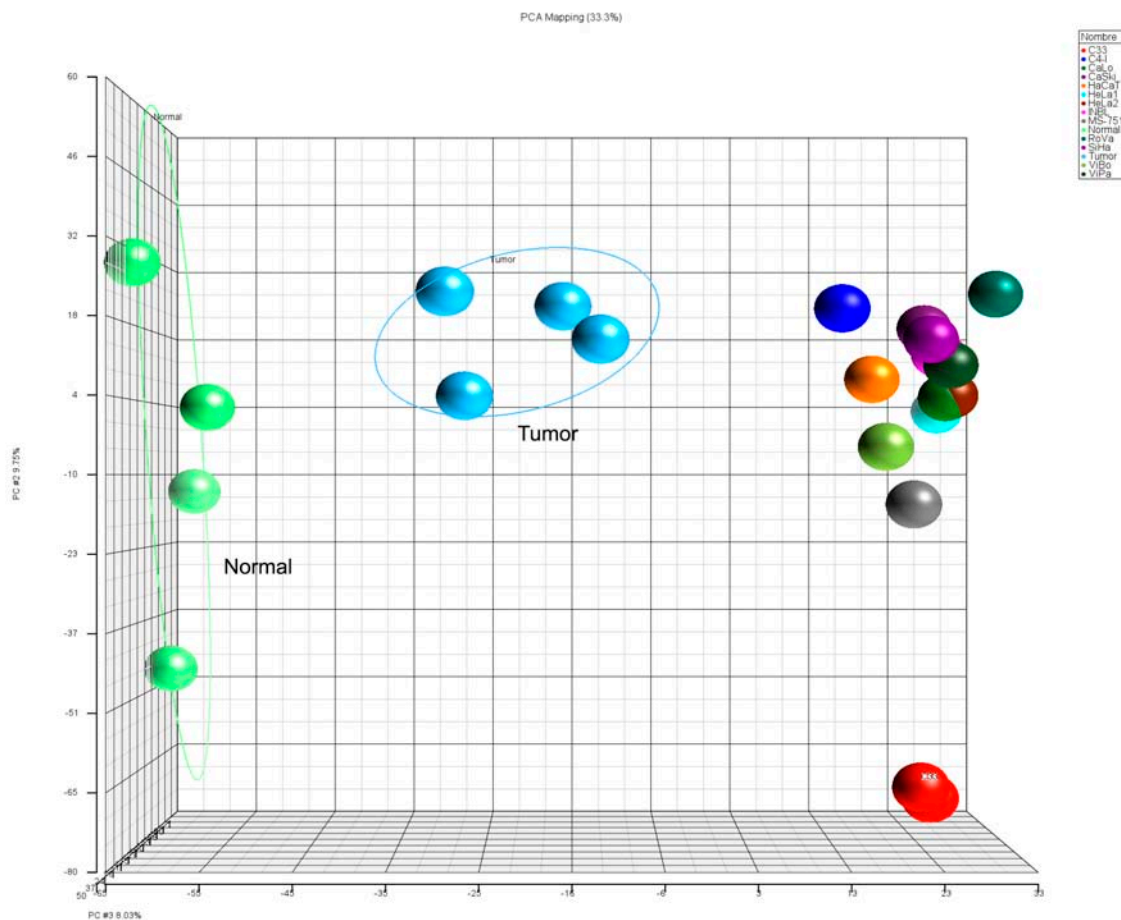
**Figura 12. Análisis de Componentes Principales (PCA).** Distribución de los tejidos de estudio basados en las características de expresión de microRNAs. Se observa la agrupación de las distintas muestras por área en el espacio (tridimensional). En la izquierda, se agrupan todas las líneas celulares (esferas verdes), en la parte derecha, se encuentran los tejidos sanos (esferas moradas) junto con las LIEBG (esferas rojas). En la parte central, se observan los tumores (esferas naranjas). Finalmente, las LIEAG (esferas rojas) comparten distribución heterogénea, desde el área de agrupación de tejidos sanos, LIEBG, tumores y en la transición.

Después, se determinaron las diferencias de expresión entre los grupos analizados, con los criterios siguientes:

a) Definir una línea basal de expresión de todos los microRNAs presentes en los tejidos sanos, como expresión diferencial, es decir, calibrador.

a) Descartar los microRNAs con intervalos de expresión entre  $-2$  a  $2$  *Fold change* y FDR 0.05.

b) Identificar los microRNAs con cambios más significativos de expresión.



**Figura 13. Análisis de Componentes Principales (PCA) de microRNAs en células del cérvix.** Las expresión global de microRNAs sugiere expresión diferencial de microRNAs en tumores y líneas celulares comparadas con tejido sano. Tejido cervical sano (esferas verdes), tejidos cervical tumoral (esferas azules) y el resto de esferas corresponde a las líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix (el resto de las esferas).

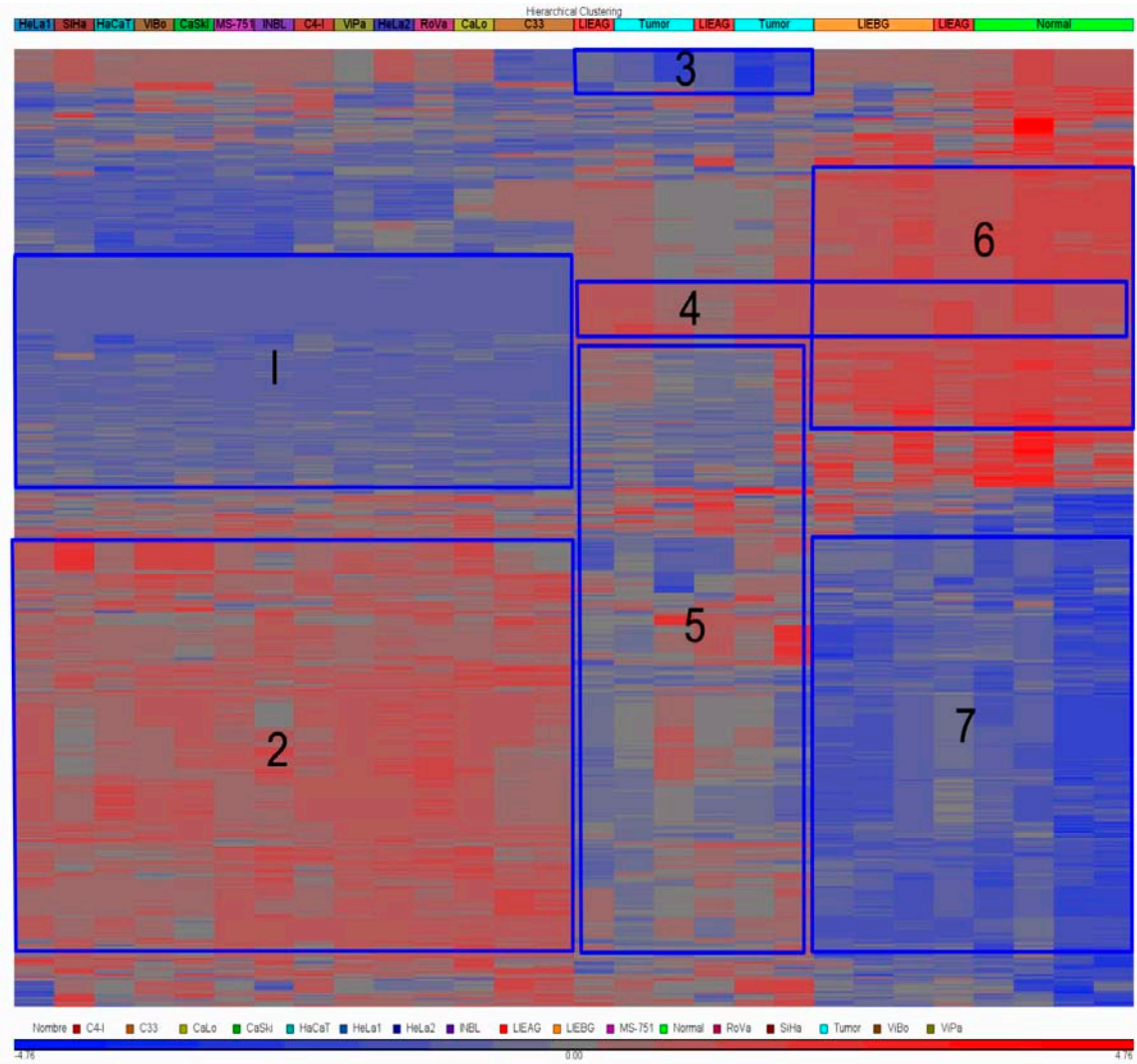
Una vez determinados los patrones de expresión específicos de cada tejido, se realizaron diversas comparaciones entre los distintos grupos (Tabla 3 y Anexo 2). De acuerdo a lo esperado, no se observaron cambios de expresión entre los

tejidos de LIEBG y sanos, sugiriendo que comparten características similares de expresión de microRNAs. Mientras que en las LIEAG, se encontraron 22 microRNAs diferencialmente expresados. En carcinomas y líneas celulares vs. sanos, se encontraron 60 y 174 microRNAs expresados diferencialmente, respectivamente. Estas diferencias de expresión fueron fácilmente identificadas al realizar el análisis de componentes principales (PCA) de las líneas celulares y tumores versus tejidos sanos (Figura 13). Interesantemente, se observó que la mayoría de las diferencias de expresión correspondieron a microRNAs sobre-expresados en cáncer, lo que podría indicar la complejidad de la transformación tumoral (Anexo 2).

Tabla 3. Expresión diferencial de microRNA por grupo

Comparación	Número de sondas	Número de hsa-microRNAs	Número de microRNAs Sobre-expresados	Número de microRNAs suprimidos
LIEBG vs. Sanos	2	0	0	0
LIEAG vs. Sanos	164	22	11	11
Tumor vs. Sano	512	60	32	28
Líneas Celulares vs. Sanos	1 247	174	98	76
Tumor & Líneas celulares vs. Sanos	942	123	64	59

Posteriormente, se realizó la agrupación jerárquica (*cluster jerárquico*) basada en la expresión diferencial de microRNAs (Figura 14). En este mapa de calor, se observa la agrupación de los tejidos sanos, LIEBG, LIEAG, tumores y líneas celulares. Como se esperaba, estos resultados fueron semejantes a los observados en el PCA. De hecho, en el *cluster* jerárquico se logró identificar a 7 grupos de microRNAs importantes en condiciones particulares (Tabla 5 y Anexo 3).



**Figura 14. Agrupación jerárquico de microRNAs en cérvix.** Agrupación de 512 microRNAs expresados diferencialmente en líneas celulares, tumores, y tejido sano de cérvix. La línea inferior representa la escala de expresión, rojo (incremento en la expresión) y azul (supresión). Se observa en ambos extremos la agrupación de dos grupos: tejidos sanos y las líneas celulares, representado por el número 1, 2, 6 y 7. Mientras, que en el área intermedia se encuentran los tumores, LIEBG y LIEAG, donde estos últimos se agrupan tanto en el grupo de las LIEBG y tumores. Finalmente, se observa en la agrupación 3 microRNAs suprimidos en tumores y LIEAG; en la agrupación 4, microRNAs que se expresan en todos los tejidos de cérvix (Sano, LIEBG, LIEAG y tumores), no así en las líneas celulares; y en la agrupación 5, se observa una expresión heterogénea de los tumores.

A continuación se muestran los microRNAs que presentaron cambios significativos de expresión, los cuales fueron conservados en más de 5 especies y han sido reportados en otros estudios (Tabla 4). Entre los microRNAs sobre-expresados estadísticamente fueron: miR-196a, -18b, -183, -500, -18a, -25, -182, -20b, -106 y -20a. Mientras que los microRNAs



estadísticamente suprimidos fueron: miR-145, -379, -214, -127-3p, -199b, -199a, -337-5p, -143, -10b, -125b. Todas las líneas celulares en este estudio fueron cultivadas en las mismas condiciones para evitar falsos positivos de expresión de microRNA. Además, se realizó una replica técnica (C33A, línea celular), en el PCA y cluster jerárquico se observa la alta reproducibilidad de los resultados.

**Table 4.** microRNAs sobre-expresados y suprimidos en tumores y líneas celulares del cérvix respecto a tejido de cérvix sano.

microRNA	Expresión en el estudio	Expresión en otros estudios
miR-196a	Sobre-expresado	Sobre <sup>+,oo</sup>
miR-18b	Sobre-expresado	--
miR-183	Sobre-expresado	Sobre <sup>+,+</sup>
miR-500	Sobre-expresado	--
miR-18a	Sobre-expresado	Sobre <sup>+,+</sup>
miR-25	Sobre-expresado	Sobre <sup>+,+,o</sup>
miR-182	Sobre-expresado	Sobre <sup>+,+</sup> , Suprimido <sup>**</sup>
miR-20b	Sobre-expresado	Suprimido <sup>+</sup>
miR-106a	Sobre-expresado	Sobre <sup>+,+</sup> , Suprimido <sup>oo</sup>
miR-20a	Sobre-expresado	Sobre <sup>+,++</sup>
miR-125b	Suprimido	Suprimido <sup>+</sup> , Sobre <sup>+,++</sup>
miR-10b	Suprimido	Suprimido <sup>+,+</sup>
miR-143	Suprimido	Suprimido <sup>+,+,++,oo</sup>
miR-337-5p	Suprimido	--
miR-199a-5p	Suprimido	Suprimido <sup>+,++,oo</sup> , Sobre <sup>o</sup>
miR-199b-3p	Suprimido	Suprimido <sup>+</sup>
miR-127-3p	Suprimido	Suprimido <sup>o</sup>
miR-214	Suprimido	Suprimido <sup>+</sup> Sobre <sup>o</sup>
miR-379	Suprimido	--
miR-145	Suprimido	Suprimido <sup>+,++,oo</sup> Sobre <sup>o</sup>

\*Lui *et al.* 2007; \*\* Muralidhar *et al.* 2007; +Martínez *et al.* 2008; ++Wang *et al.* 2008, <sup>o</sup> Lee *et al.* 2008, <sup>oo</sup> Pereira *et al.* 2010

**Tabla 5.** Algunos microRNAs característicos en cada una de las agrupaciones originadas del agrupamiento jerárquico.

Agrupación	No. Sondas	No. microRNA hsa	microRNA
1	142	17	hsa-miR-145 hsa-miR-143 hsa-miR-127-3p hsa-miR-379_st hsa-miR-199a-5p
2	301	38	hsa-miR-196a hsa-miR-25-star hsa-miR-92a-1-star hsa-miR-18b
3	38	5	hsa-miR-379 hsa-miR-497 hsa-miR-100 hsa-miR-337-5p hsa-miR-487b
4	6	1	hsa-miR-150
6	157	22	hsa-miR-145 hsa-miR-143 hsa-miR-127-3p hsa-miR-379 hsa-miR-199a-5p
7	126	23	hsa-miR-196a hsa-miR-25-star hsa-miR-92a-1-star hsa-miR-18b hsa-miR-1303

Nota: El grupo 5 observado en el *cluster* jerárquico, no fue incluido en esta tabla por presentar, microRNAs con expression heterógenea.

De manera similar, para identificar los microRNAs que estuvieran asociados a la presencia de VPH, se realizaron varios análisis. El primero de ellos consistió en realizar la comparación de líneas celulares VPH + (HPV16 y HPV18), VPH -, versus tejidos sano (Anexo 4). El segundo análisis, se compararon las líneas celulares VPH (VPH 16 y VPH18) vs. VPH negativas (C33A, HaCaT y ViBo) (Anexo 5). En ambos análisis no se identificó expresión diferencial de microRNAs.

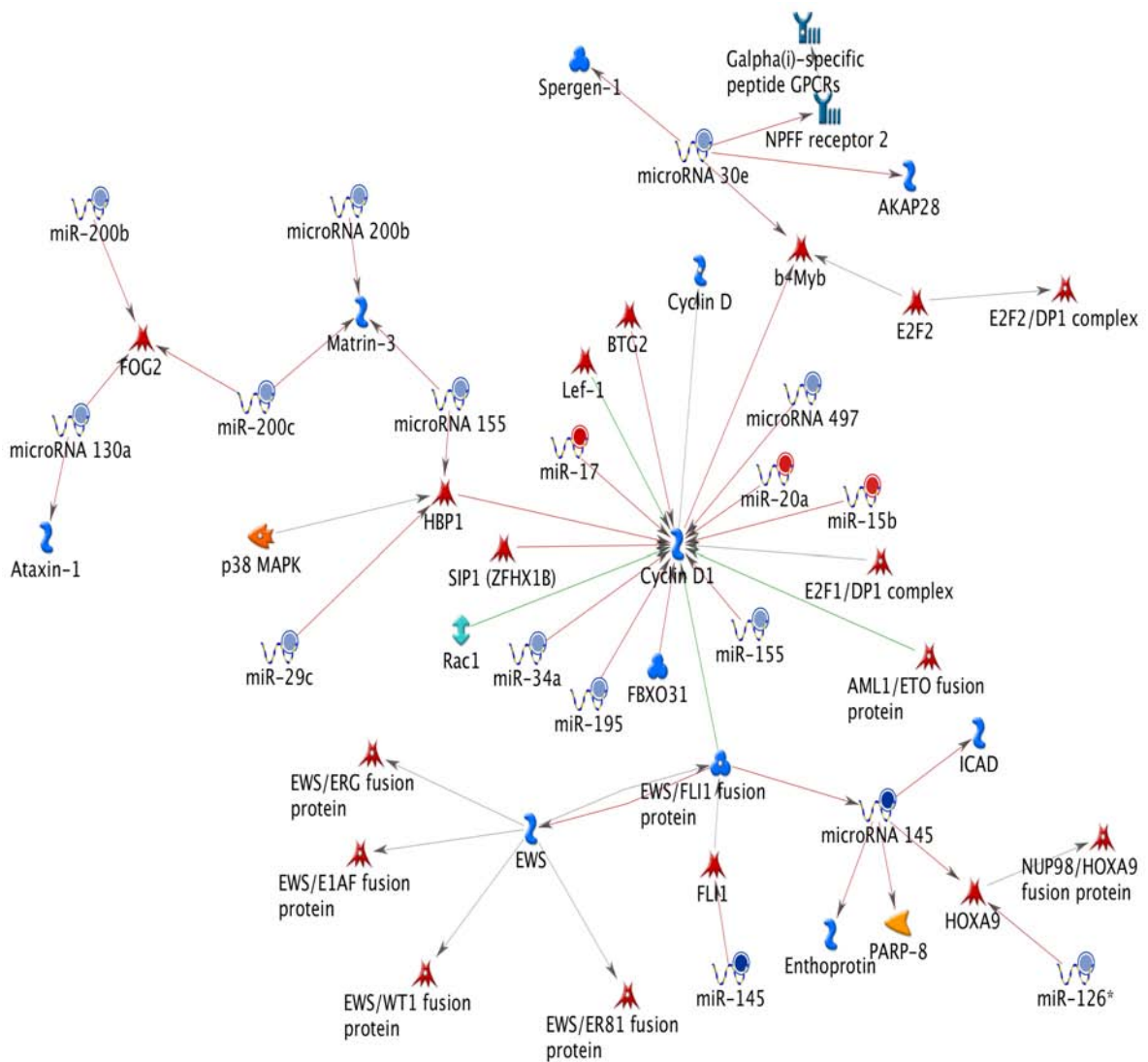
### Vías de señalización alteradas por la expresión de microRNA aberrantes

Para conocer los blancos potenciales de los microRNAs expresados diferencialmente, se realizó la reconstrucción de vías alteradas por este grupo de microRNAs. El análisis se realizó con el software GeneGo MetaCore, herramienta bioinformática que predice blancos potenciales basado en datos experimentales y bioinformáticos curados. Este análisis permitió agrupar los microRNAs en diferentes vías y asociarlos a un proceso celular, por lo tanto, se identificaron 9 vías afectadas. En la Tabla 6 se muestran, en orden descendente las vías con 50 iteraciones, número de nodos que corresponde al número de microRNAs involucrados en la vía, la ontología y el valor p.

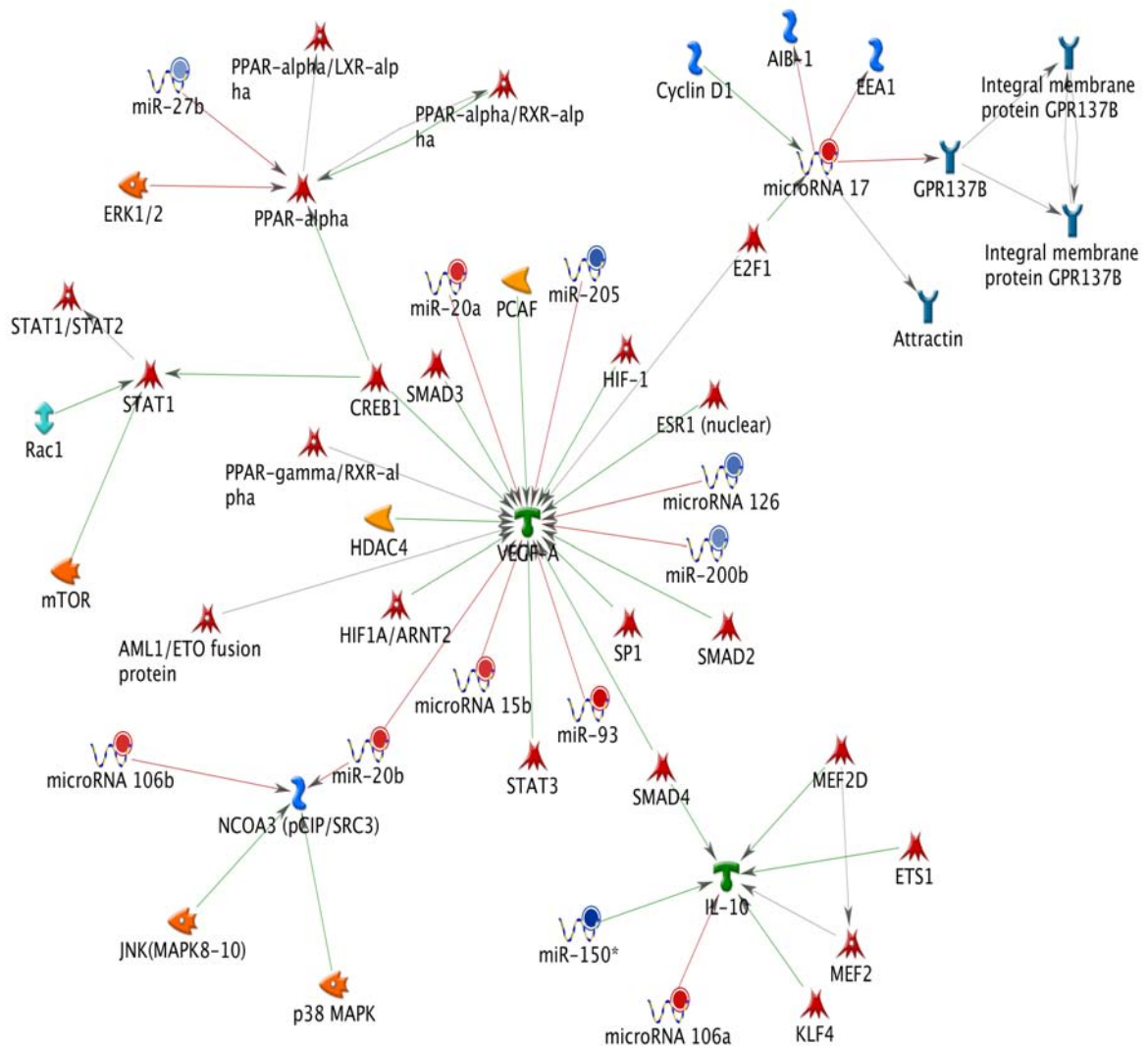
**Table 6.** Vías alteradas por la expresión de microRNAs aberrantes en CaCu

No.	Vía	Procesos GO	Número de Nodos	p-Value
1	miR-183,-20b, -145*, -214, -375	Respuesta celular a estímulo endógeno Respuesta a estímulos químicos	22	1.03e-46
2	miR-126, -143, -205, -20b, -25	Regulación negativa de apoptosis, muerte celular programada	20	1.10e-41
3	miR-145, -30e, -200c, -155, -130a	Regulación expresión génica, regulación de síntesis de macromoléculas	17	6.93e-34
4	miR-146, ILT2, -27b, -106, -20b	Regulación muerte celular, estímulo químico	15	4.83e-29
5	miR-30, -99a, -195*, -20a, -34a	Regulación de metabolismo de ácidos nucleicos	14	1.09e-26
6	miR-17, -20a, -106a, -106b, -18a	Regulación positiva en la transcripción y metabolismo de RNA génica	12	4.08e-22
7	miR-17, -20b, -15b, -200b, -106a	Regulación positiva de regulación expresión	12	2.35e-22
8	miR-20a, -106a, -2'a, -146a*, -146a	Regulación de procesos celulares	10	7.69e-18
9	miR-200c, -200b, -205, SMAD3, SMAD2	Desarrollo estructura anatómica, vías de señalización de receptores proteicos	3	1.5e-04

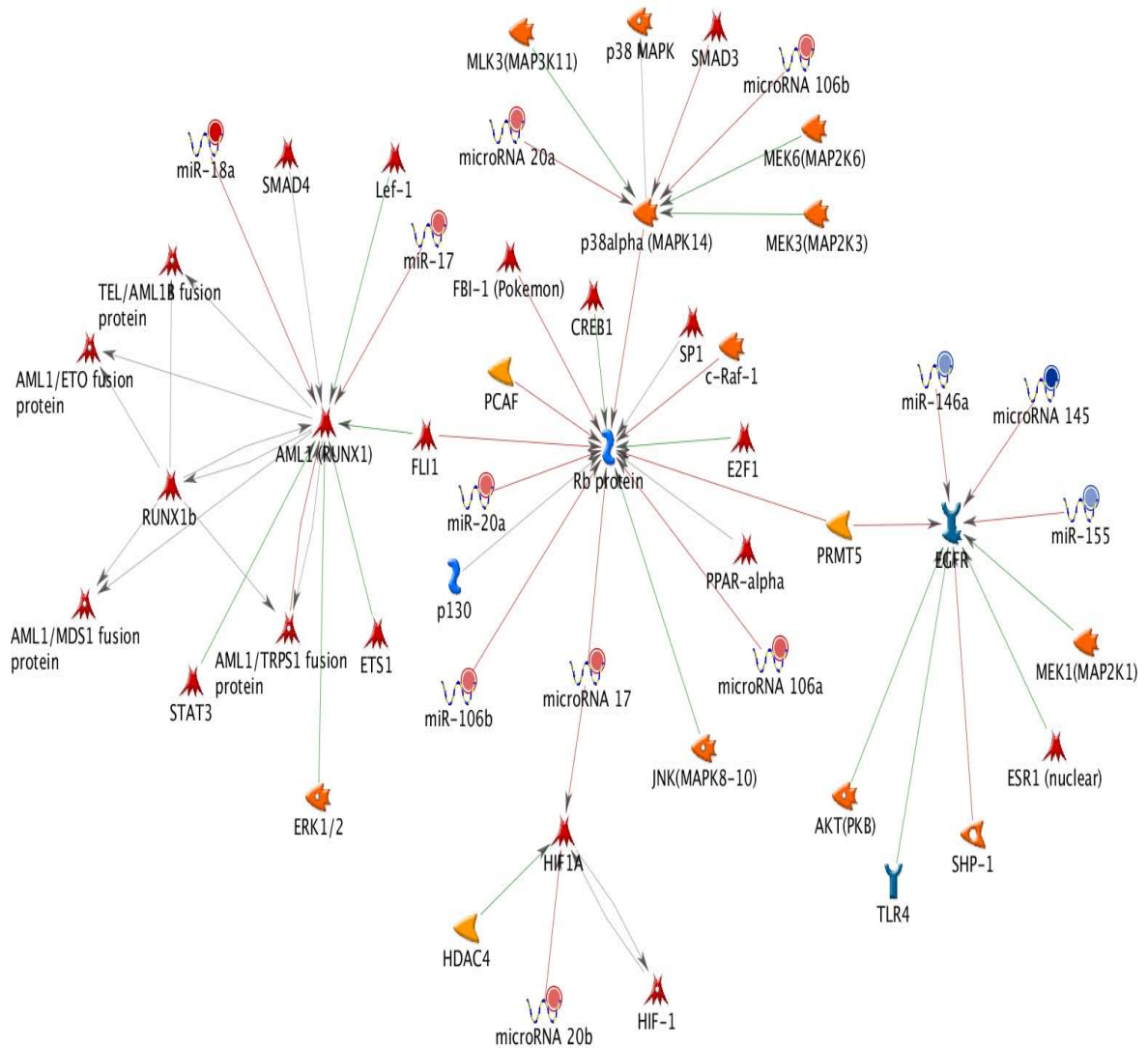
Interesantemente, las vías relacionadas a procesos de regulación de expresión génica involucran a ciclinas (Ciclina D1), factores vasculares endoteliales (VEGF), factores de transcripción involucrados en la regulación negativa de la apoptosis (E2F1 y Rb) (Figura 15).



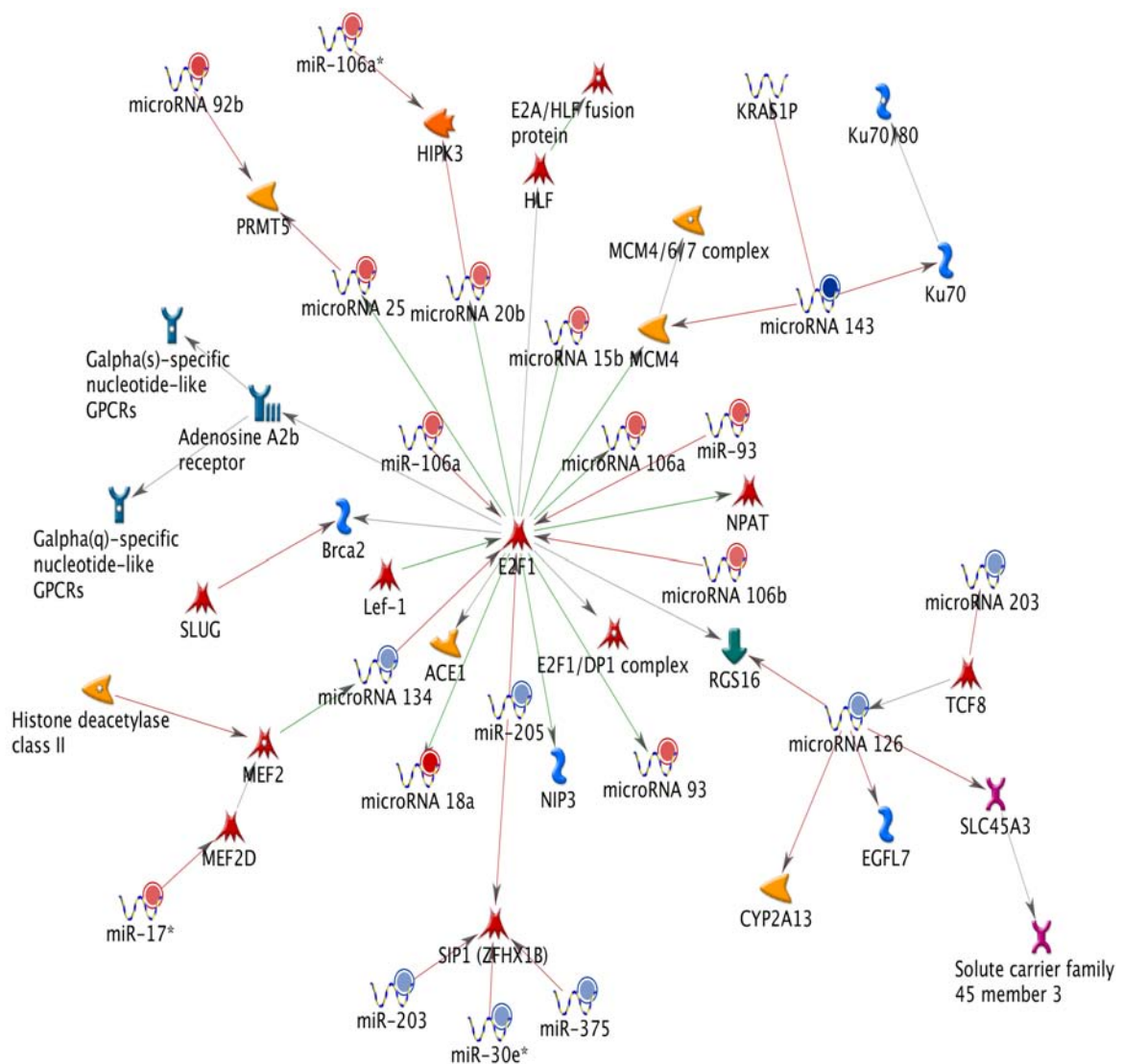
**Figura 15. Vía de regulación de Ciclina D1 alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas de cérvix.** Genes regulados y reguladores de microRNAs de la vía 3, involucrados en procesos de regulación positiva de expresión génica, con 50 iteraciones, 17 nodos y un p-value de 6.93 e-34 generado en GeneGo MetaCore, Thomson Reuters. Ver Anexo 5 para código de símbolos.



**Figura 16. Vía de regulación de VEGF alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas de cérvix.** Genes regulados y reguladores de microRNAs de la vía 7, involucrada en procesos de regulación positiva de expresión génica, con 50 iteraciones, 12 nodos y un p-value de  $2.35 \times 10^{-22}$  generada en GeneGo MetaCore, Thomson Reuters. Ver Anexo 5 para código de símbolos.



**Figura 17. Vía de regulación de Rb alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas de cérvix.** Genes regulados y reguladores de microRNAs de la vía 6, involucrada en procesos de regulación positiva de transcripción y metabolismo de RNA, con 50 iteraciones, 12 nodos y un p-value de 4.08 e-22 generada en Genego MetaCore, Thomson Reuters. Ver Anexo 5 para código de símbolos.



**Figura 18. Vía de regulación de E2F1 alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas de cérvix.** Genes regulados y reguladores de microRNAs de la vía 2, involucrada en procesos de regulación negativa de muerte celular programada y apoptosis, con 50 iteraciones, 20 nodos y un p-value de  $1.10e-41$ , generada en Genego MetaCore, Thomson Reuters. Ver Anexo 5 para código de símbolos.

Además, mediante el análisis bioinformático fue posible identificar que la vía estadísticamente más significativa fue la de Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés), mediante la inhibición del desarrollo dependiente de microRNAs. En este proceso se involucran principalmente la familia de microRNA-200 (Figura 19). Interesantemente, tanto en inhibición como inducción de EMT se observa el papel que tienen estos microRNAs.

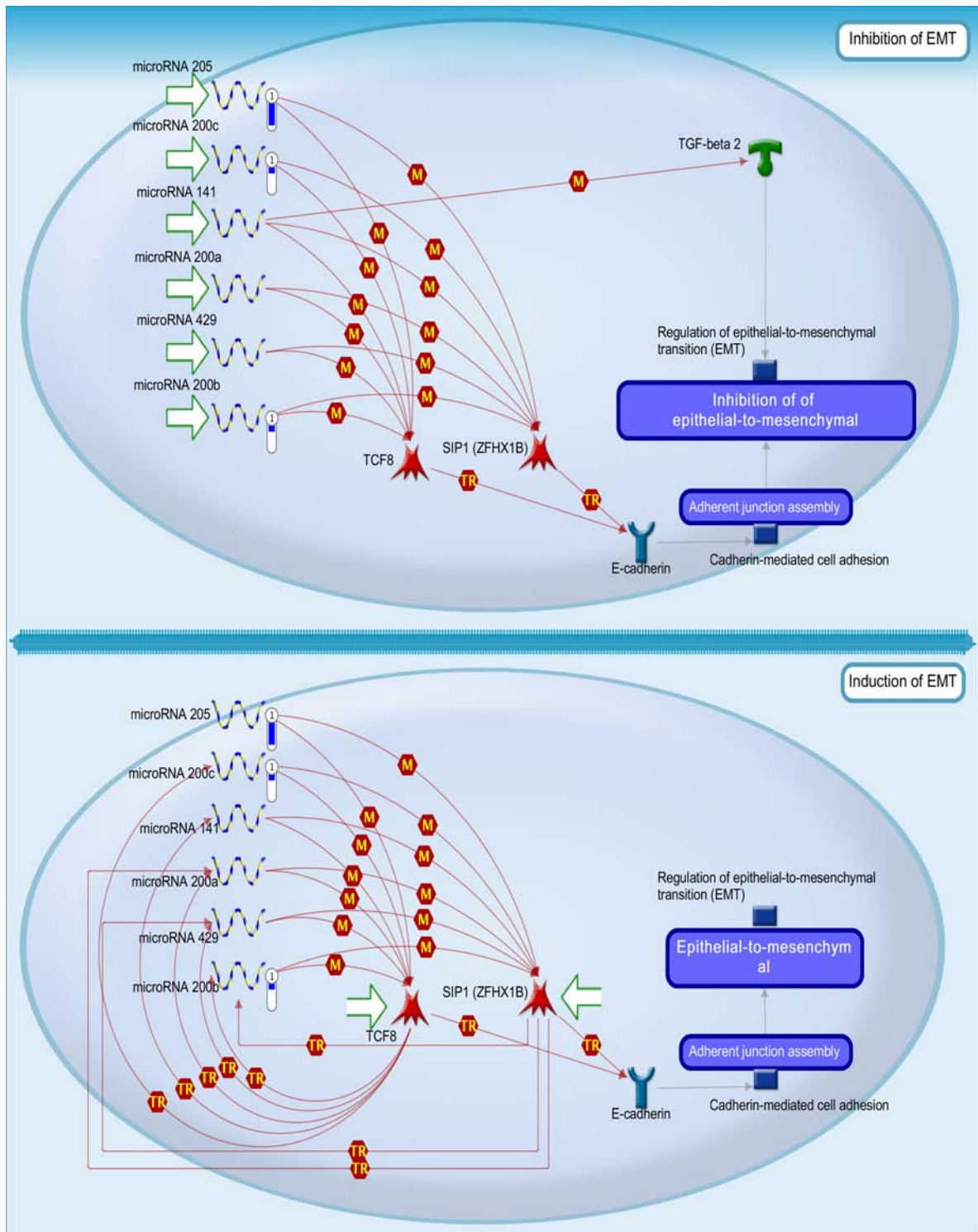
### **Expresión diferencial de un grupo de microRNAs**

Para conocer la expresión de un grupo de microRNAs involucrados en diferentes vías desreguladas, se validó la expresión en diferentes lesiones del cérvix, líneas celulares y tejido sano mediante PCR en tiempo real. La selección de los microRNAs a validar su expresión, se realizó siguiendo diferentes criterios de inclusión:

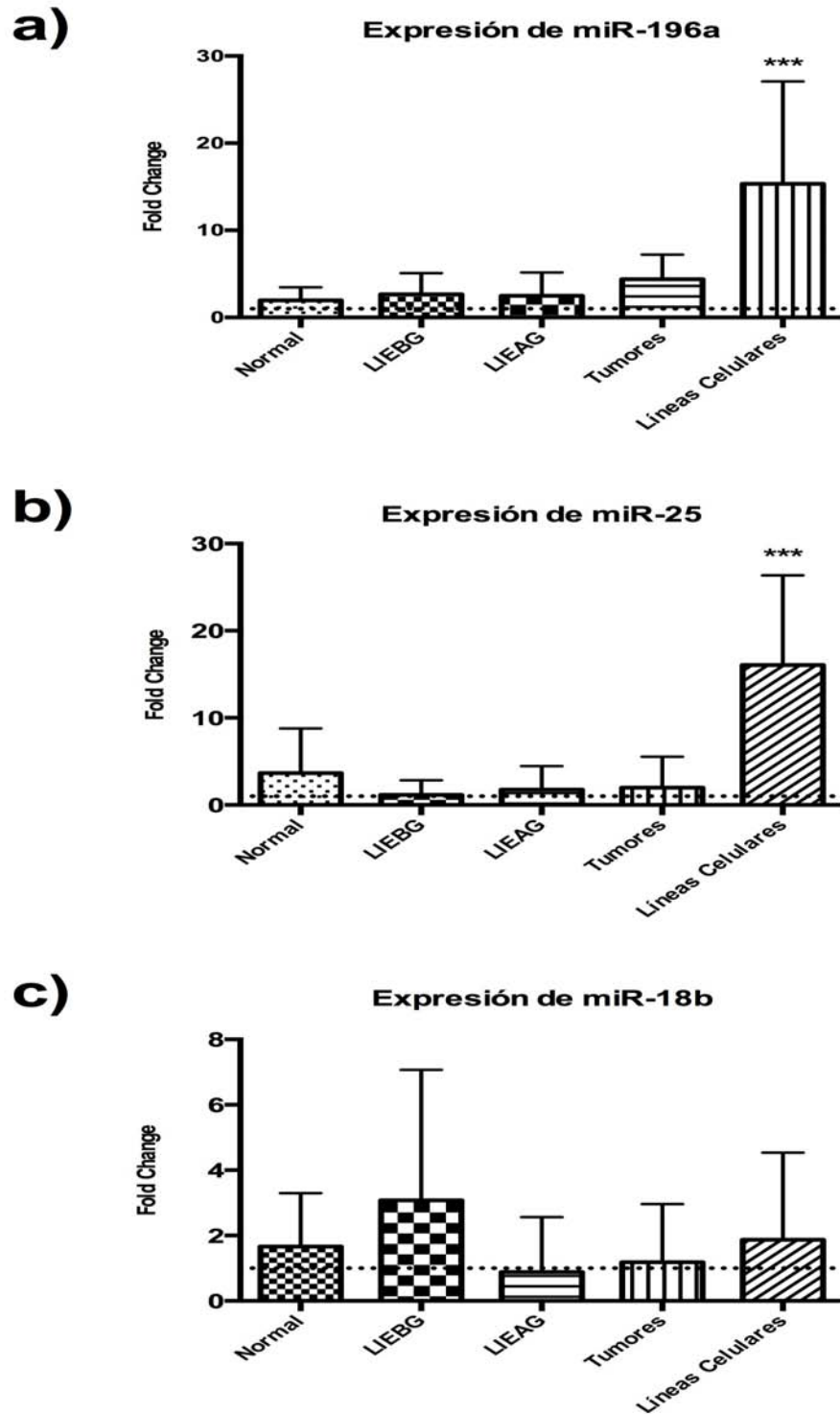
- 1) microRNAs con cambios más significativos de expresión, sobre-expresados y suprimidos.
- 2) microRNAs expresados en más de cinco especies.
- 3) microRNAs relevantes en cáncer o asociados algún proceso tumorigénico.
- 4) microRNAs poco descritos en CaCu.

De esta manera, se seleccionaron dos grupos de microRNAs por su nivel de expresión: tres microRNAs sobre-expresados (miR-196a, miR-25, miR-18b) y cuatro suprimidos (miR-214, miR-424, miR-199a, miR-199b), utilizando como gen control a RNU6B para normalizar la expresión de cada uno de los microRNAs seleccionados. La expresión de cada microRNA fue identificada en 4 grupo de muestras: LIEBG, LIEAG, tumores, líneas celulares y tejido de cérvix sin alteraciones (Figura 20 y 21).



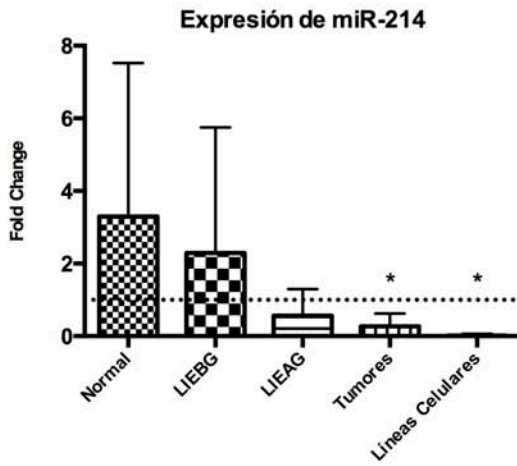


**Figura 19. Vía de regulación de GeneGo MetaCore alterada por microRNAs aberrantes en carcinomas.** La vía de regulación Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) mostró ser una vía alterada por la expresión diferencial de algunos microRNAs en tumores y líneas celulares de cervix, con p-value de 1.252e-9, generada en GeneGo MetaCore, Thomson Reuters. En la parte superior, se observa la inhibición del EMT y en la parte inferior la inducción de EMT. En ambos casos, observamos la participación de los microRNAs identificados en las dos condiciones de EMT con un decremento en la expresión. Ver Anexo 5 para código de símbolos.

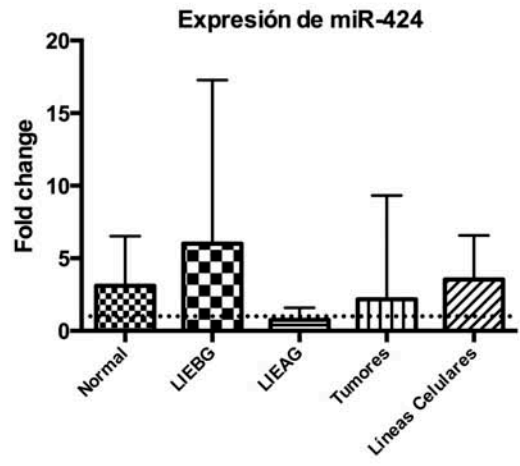


**Figura 20. Validación de la expresión de un grupo de microRNAs sobre-expresados en diferentes tejidos de cérvix y líneas celulares por RT-PCR cuantitativa.** a) Incremento en la expresión de miR-196a estadísticamente significativo en líneas celulares es observado, mientras que se muestra una tendencia de incremento de la expresión en carcinomas cervicales; b) Incremento de expresión de miR-25 estadísticamente significativo en líneas celulares de cérvix vs. tejido sano; c) LA expresión de miR-18b presenta variación independiente del tipo de lesión de cérvix.

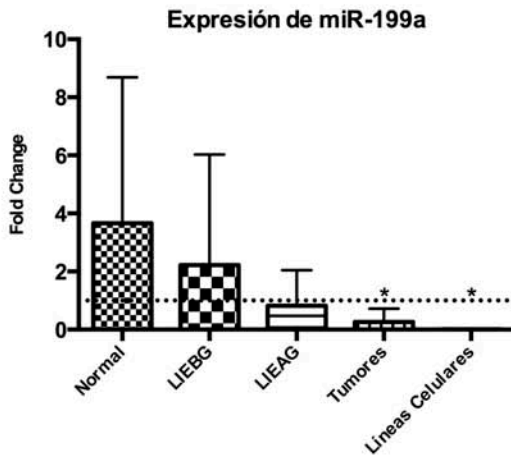
a)



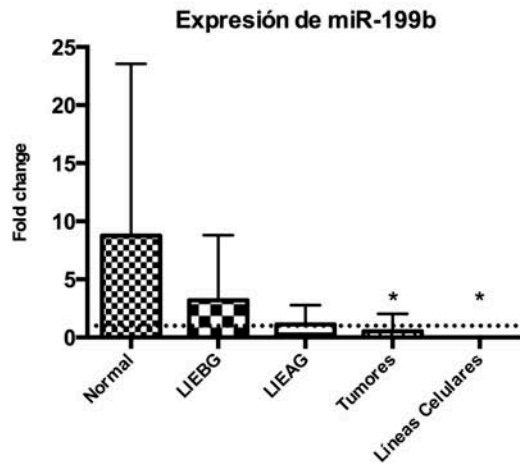
b)



c)



d)

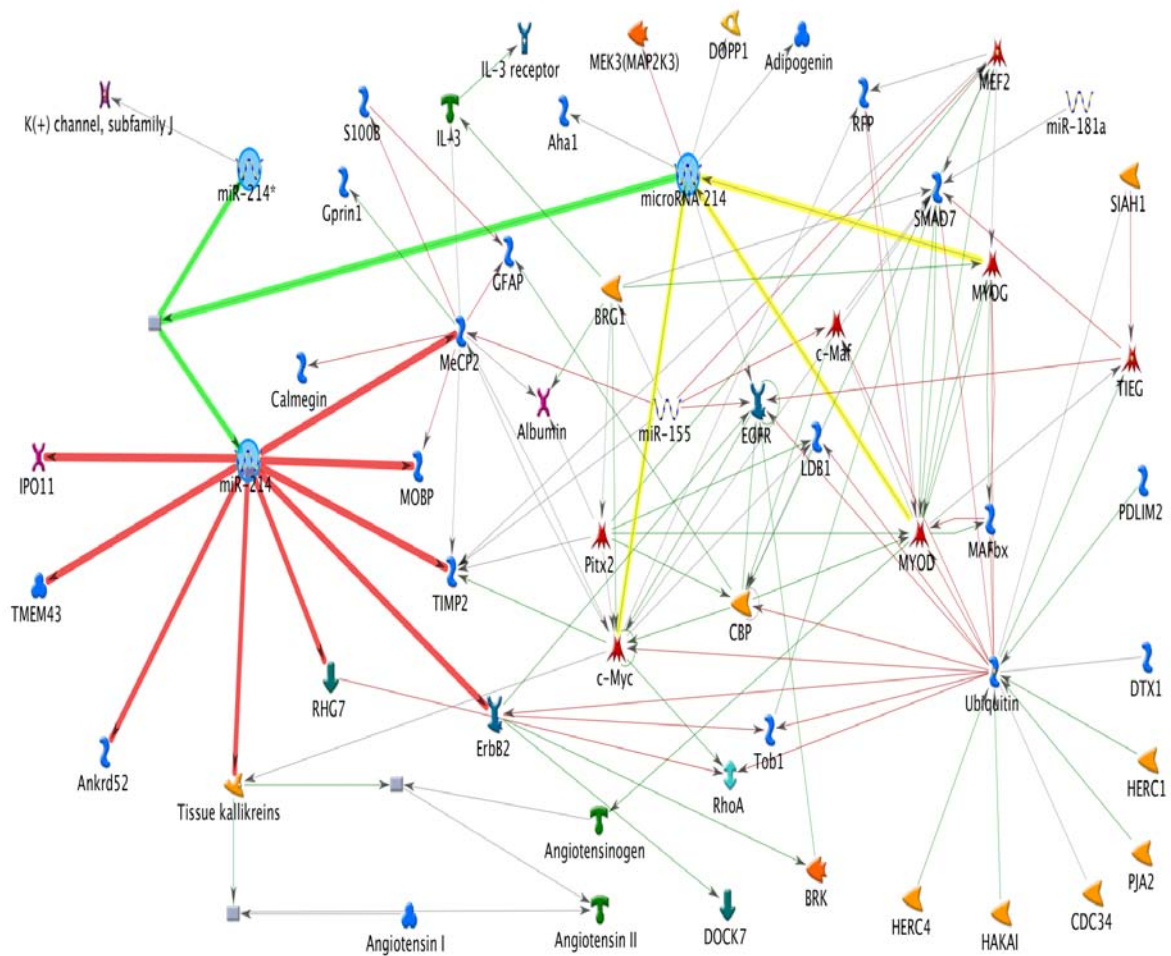


**Figura 21. Validación de la expresión de un grupo de microRNA suprimidos en diferentes tejidos de cérvix y líneas celulares por RT-PCR cuantitativa.** a) Decremento gradual de la expresión de miR-214 proporcional al grado de lesión, sin embargo, la expresión de tumores y líneas celulares comparado con tejido sano es estadísticamente significativo; b) Se observa expresión heterogénea de miR-424 en todos los tejidos de cérvix en estudio; c) y d) Se observa ausencia de expresión estadísticamente significativa en tumores y líneas celulares de miR-199a, -199b.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó un microRNA sobre-expresado y uno suprimido que presentara la menor variación de expresión dentro de cada grupo, con el fin de conocer sus potenciales genes blancos, su regulación y su potencial acción en cáncer de cérvix, se seleccionaron a el miR-196a y el miR-214. Este último microRNA, mostró una interesante disminución progresiva de la expresión, proporcional a la severidad de la lesión. Sin embargo, solo en los tumores y en líneas celulares esos cambios fueron estadísticamente significativos. Mientras que el miR-196a mostró de forma general una expresión más homogénea por grupo, a diferencia de los microRNAs evaluados. Adicionalmente, se determinó una diferencia de expresión estadísticamente significativa en líneas celulares y una tendencia al incremento de expresión en los tumores. De esta manera, se realizó el análisis bioinformático para determinar los posibles genes regulados río arriba y abajo de esos microRNAs, mediante el uso de GeneGo Metacore (Figura 22 y 23).

#### **Incremento en la expresión de miR-196a**

De esta manera, entre los microRNAs más expresados en líneas celulares y tumores fue el miR-196a en los ensayos de microarreglos ( $p=4.75 \text{ e-}04$ ,  $p=1.32 \text{ e-}07$ ), respectivamente; mientras que la validación por PCR tiempo real, la expresión de este microRNA fue estadísticamente significativa en líneas celulares derivadas de cérvix, comparada con tejido sano y con tendencia al incremento de expresión en tumores. Aunado a ello, encontramos que la expresión de miR-196a mostró un patrón más homogéneo dentro de cada grupo de muestras, es decir, los valores entre grupos de muestras no fueron tan variables. De este modo, nos dimos a la tarea de conocer los genes que son potenciales blancos del miR-196a.



**Figura 22. Reconstrucción de vía de regulación de miR-214.** Se observan los genes que regulan la expresión de miR-214 (línea amarilla) y genes regulados por este microRNA (línea roja). El gen del microRNA se encuentra representado como “microRNA”, el cual al ser transcrito y procesado por la biogénesis (cuadro gris), genera dos secuencias pequeñas (miR-214 y miR-214\*, proceso representado en línea verde). Ver Anexo 5 para código de símbolos.

Para el análisis de predicción de blancos usamos diferentes bases de datos incluidas: Diana-microT v5.0, TarBase v6.0, MirTarget2 v2, TargetScan v6.2, microRNA.org, PicTar y micRecord (Tabla 7). Además, se usó GeneGo MetaCore (Thompson Reuters) para la construcción de las vías de blancos experimentales y potenciales de miR-196a; para ello se emplearon 50 iteraciones para generar la vía (Figura 23).

Tabla 7. Genes blancos candidatos de miR-196a en diferentes bases de datos

Database	Target (10 top rank)	Score <sup>a</sup>
DIANA-microT v5.0	HOXC8 HOXA7 HOXA5 SLC9A6 ERI2 HAND1 LRP1B HOXA9 HOXB7 <sup>d</sup> GATA6	1 1 0.999927 0.999925 0.999813 0.999774 0.999064 0.998916 0.998827 0.998732
TarBase v6.0 <sup>b</sup>	HOXC8 <sup>c</sup> HOXA7 <sup>d</sup> HAND1 <sup>e</sup> CCDC47 <sup>e</sup> IGF2BP1 <sup>e</sup> ARHGAP28 <sup>e</sup> LIN28B <sup>e</sup> TSPAN12 <sup>e</sup> RP5-862P8.2 <sup>e</sup> DFFA <sup>e</sup>	1.000 1.000 1.000 0.999 0.990 0.986 0.961 0.930 0.909 0.818
MirTarget2 v2	HOXA7 HOXC8 SLC9A6 ZMYND11 CCDC47 RG9MTD2 TMX1 ERI2 PRTG DIP2A	100 99 98 97 95 94 88 86 85 84
TargetScan v6.2	HOXC8 HOXA7 SLC9A6 HOXA9 KLHL23 PHOSPHO2-KLHL23 ZMYND11 PACRGL HOXB8 MAP3K1	-1.43 -1.24 -0.88 -0.64 -0.55 -0.55 -0.51 -0.50 -0.49 -0.48
MicroRNA.org	HOXA7 HOXC8 SMC3 SLC9A6	-3.65 -3.59 -2.66 -2.46

	HOXA9	-2.35
	HMGA2	-2.31
	CTBS	-2.18
	ZMYND11	-2.10
	C1orf88	-2.07
	C3orf88	-2.06
PicTar	HOXC8	12.74
	ZMYND11	6.56
	CCNJ	5.08
	MLR2	4.77
	KIAA0685	4.64
	HMGA2	4.32
	PPP1R15B	4.27
	FLJ46247	4.20
	SLC9A6	4.18
	DDX19	4.08
miRecords	HOXC8	-
	GAN	-
	RBM26	-
	CDKN1B	-
	EPHA7	-
	ERG	-
	HOXB7	-
	CDYL	-
	ZNF385B	-
	RSPO2	-

a= valor de acuerdo a cada base (score values por sus siglas en ingles).

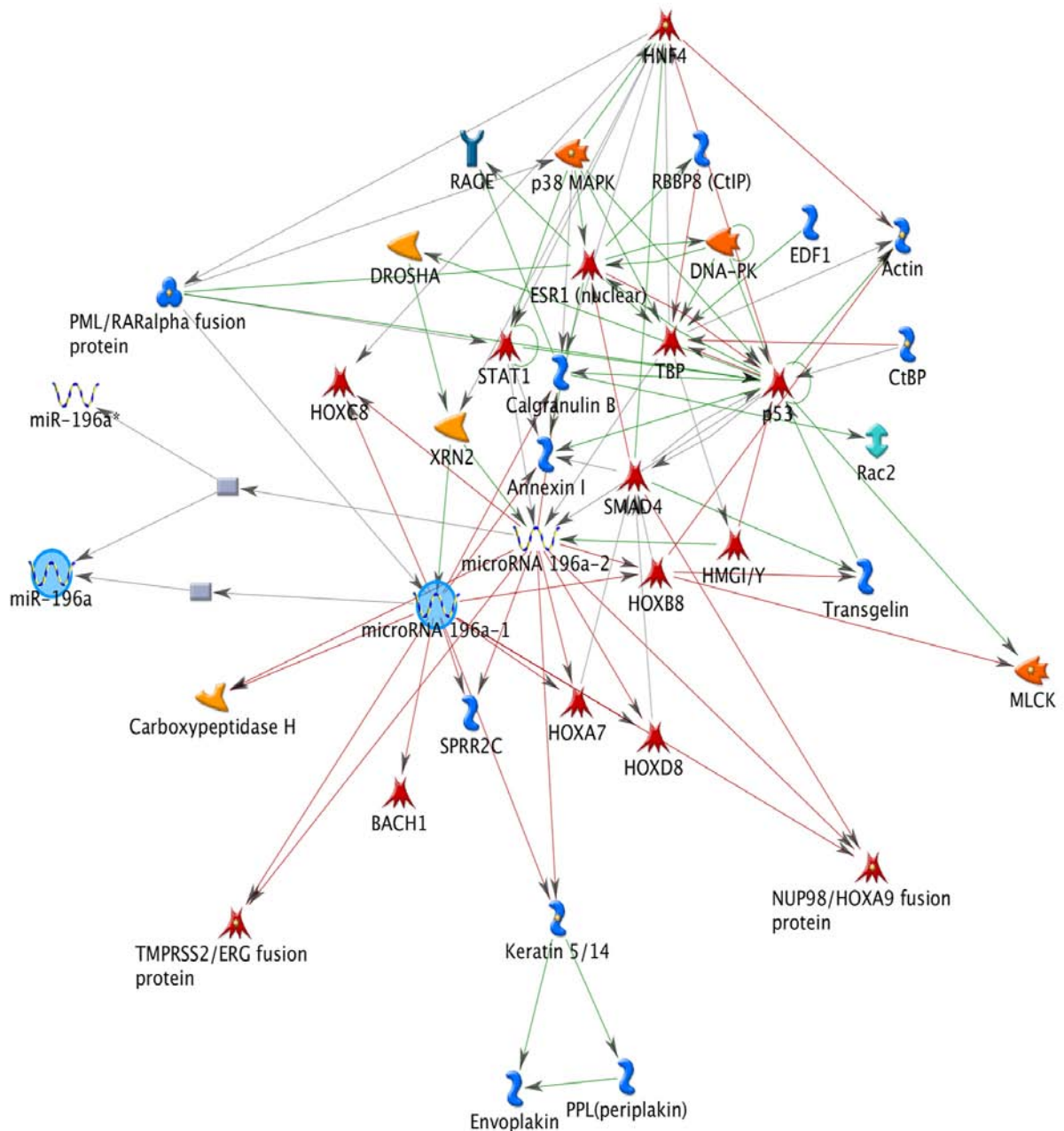
b = Base de datos con resultados curados con soporte experimental

c= Validado por Ensayo de gen Reportero, PCR tiempo real, Western Blot.

d= Validado por otras técnicas.

e= Validado por secuenciación.

En ambos análisis, identificamos a HOXC8 como potencial blanco de miR-196a. Finalmente, para buscar la probable relación de la expresión de HOXC8 en CaCu, un microarreglo de tejidos con muestras de cérvix con y sin lesión fue sometido a inmunodetección de la proteína HOXC8. Como tejido negativo de expresión de HOXC8 se usó a un tejido de vejiga sano, y como tejido positivo de expresión se utilizó tejido de riñón sano, ambos utilizados como controles de inmunotinción (Figura 24a y b). Además, se realizó inmunocitoquímica en líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix.

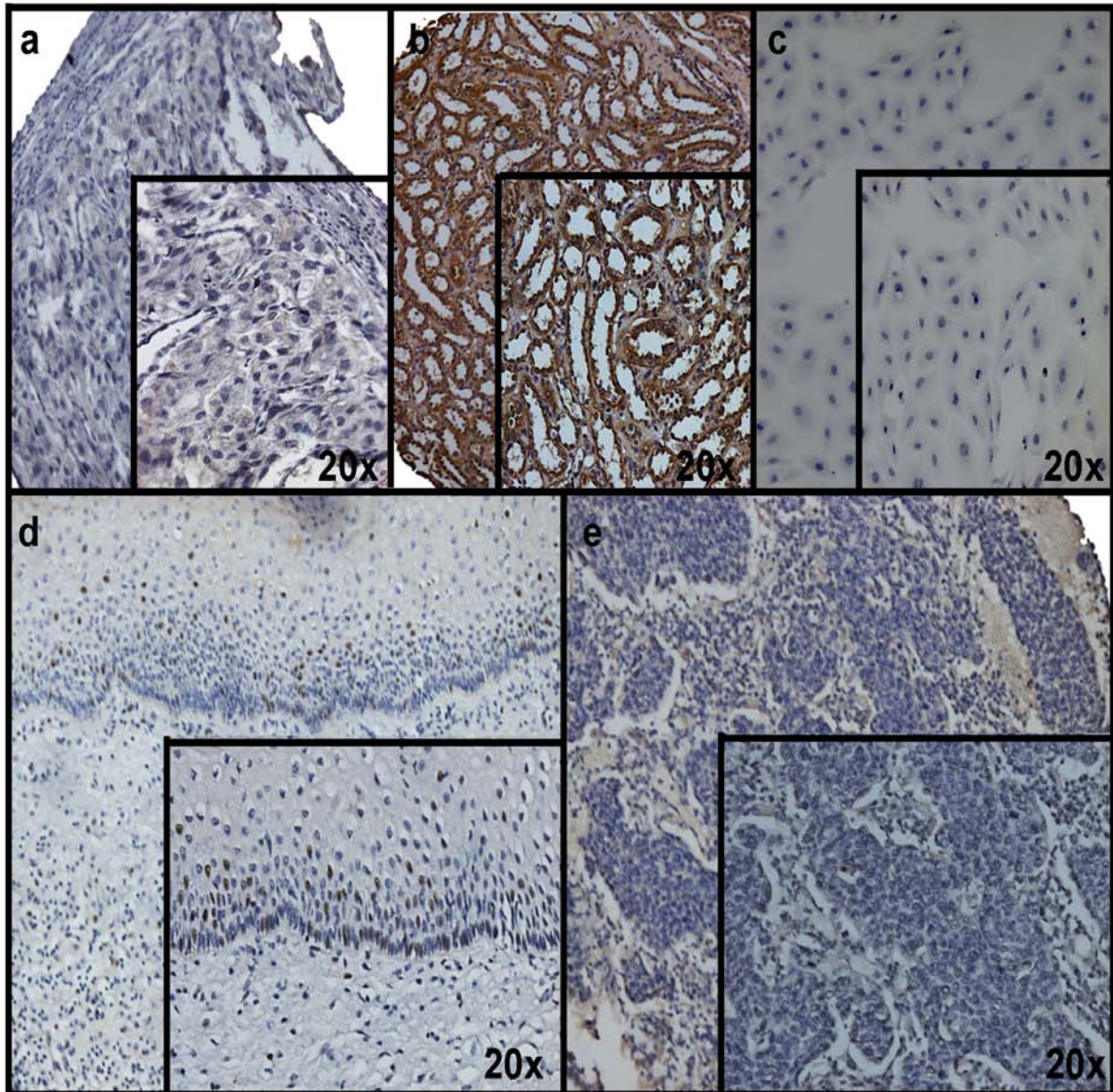


**Figura 23. Vía de potenciales genes blanco de miR-196a.** Los genes HOXC8, HOXA7, HOXD8 como blancos potenciales, usando 50 iteraciones en GeneGo MetaCore Software,  $p < 0.0005$ . Se observa los genes que regulan la expresión y genes regulados por este microRNA. El gen del microRNA se encuentra representado como “microRNA”, el cual al ser transcrito y ser procesado por la biogénesis (cuadro gris), genera dos secuencias pequeñas (miR-196a y miR-196a\*, proceso representado en líneas verde). Ver Anexo 5 para código de símbolos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó una inmunotinción positiva de HOXC8 en los núcleos de las células epiteliales, principalmente en las células de la membrana basal, en tejido sano de cérvix (Figura 24d). En



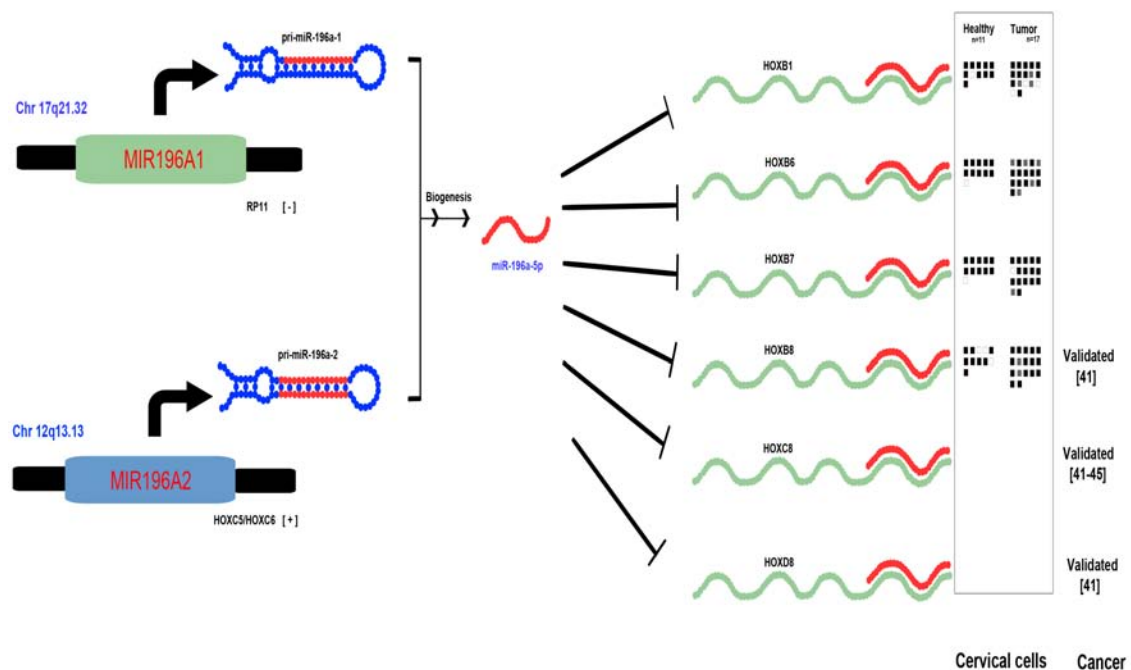
contraste, se identificó ausencia de la expresión de proteína HOXC8, en todas los tumores de cérvix evaluados y líneas celulares utilizadas en este estudio (Figura 24c y 24e).



**Figura 24. Inmunotinción de la proteína HOXC8 en CaCu.** a) Control negativo de expresión de HOXC8 corresponde a tejido de vejiga; b) Control positivo de expresión de HOXC8, tejido de riñón; c) Ausencia de expresión de HOXC8 en líneas celulares derivadas de cérvix, HeLa; d) Expresión de HOXC8 en los núcleos de células epiteliales de la membrana basal; e) Ausencia de expresión en tumores de cérvix.

Finalmente, el miR-196a es una secuencia redundante en el genoma que se encuentra localizada en dos *locis*, provenientes de dos genes, MIR196A1(17q21.32) y MIR196A2(12q13.13); ambos genes son transcritos y

procesados por la biogénesis de microRNAs para dar lugar a miR-196a (Figura 25). Entre los genes potenciales blancos están los genes HOX y de acuerdo a nuestro análisis *in silico*, el candidato estadísticamente significativo por diferentes métodos fue HOXC8. Hallazgos previos en CaCu, han reportado la ausencia de expresión diferencial a nivel de RNAm en algunos genes HOXs como HOXB1, HOXB6, HOXB7 y HOXB8, pero no se ha evaluado la expresión de HOXC8 hasta este estudio [72, 73].



**Figura 25. Diagrama de HOXC8 en cáncer de cérvix.** En la parte izquierda se muestra a miR-196a como una secuencia redundante en el genoma, localizado en el gen MIR196A y MIR196A2, transcritos y procesados por la maquinaria de biogénesis de microRNAs. De acuerdo a los resultados *in silico*, algunos de los genes candidatos fueron: HOXA9, HOXB1, HOXB6, HOXB8, HOXD8 y HOXC8. Los primeros 4 candidatos, no presentan diferencias de expresión a nivel de RNAm en tejidos tumorales de cérvix en estudios previos [72, 73]. En la parte derecha, los cuadros negros indican alta expresión de RNA, y los cuadros vacíos representan ausencia de expresión. Finalmente, algunos de esos candidatos de genes HOX como: HOXC8, HOXB7 y HOXB8 han sido validados como genes blancos de miR-196a en otro modelo de cáncer [74-76].

## **DISCUSIÓN**

El Cáncer de Cérvix (CaCu) representa un problema prioritario de salud a nivel mundial, esto se debe a que más del 80% de las pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas, lo que lleva a un pronóstico desfavorable. En México, a pesar de los grandes esfuerzos por fomentar programas de tamizaje para la detección temprana de CaCu, se diagnostican 12, 000 mujeres y el 50% muere por esta causa [77]. Es conocido que el agente etiológico relacionado al desarrollo de CaCu es la infección persistente de VPH. Un gran número de estudios se han enfocado en estudiar la relación del CaCu –VPH, desde estudios de alteraciones cromosómicas, expresión génica y actualmente estudios de proteómica [78] .

La biología molecular es una herramienta importante que ha ayudado en el entendimiento del cáncer, la cual ha permitido la búsqueda de marcadores moleculares que ofrezcan mejores herramientas para la detección temprana, diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. El cáncer es un conjunto de enfermedades con una variedad de eventos, entre ellos: inhibición de la apoptosis, proliferación descontrolada, autosuficiencia en la replicación, migración e invasión mediante la angiogenesis, inestabilidad cromosómica entre otras características [23, 79] .

Un evento que puede afectar la función de las células y en conjunto los tejidos sanos, incluso promover la transformación, es la regulación negativa de la expresión génica mediante la acción de pequeñas moléculas de RNA (microRNAs). Estos pequeños RNAs no codificantes, juegan un papel importante en diversos procesos regulatorios y celulares, los cuales se ven modificados en condiciones fisiológicas o patológicas. Por tal motivo, el conocimiento de su regulación y sus potenciales blancos han permitido conocer su función en diferentes enfermedades, incluyendo cáncer.

En el presente estudio, más de 100 microRNAs humanos se expresaron diferencialmente en tumores y líneas celulares derivadas de cáncer de cervix en comparación con tejidos sin alteración. Entre los microRNAs sobre-

expresados se encontraron miR-25, miR-106b, miR-17-92a, y miR-106a, los cuales han sido previamente reportados alterados en varias neoplasias [80-84]. A este cluster de microRNAs se le ha relacionado con crecimiento, proliferación por vía de Factor de Crecimiento Transformante (TGF- $\beta$ ), inhibición de la diferenciación, así como una sobre-expresión de miR-15b [85, 86]. Resultados similares, han sido reportados en cancer colorectal, hígado y en cáncer de páncreas, donde la sobre-expresión está correlacionada con el pronóstico [87-89]. Estos datos soportan el hecho de que éste cluster de microRNAs se encuentra comunmente alterado en cáncer, y probablemente esté asociado con el proceso de carcinogénesis. Por otro lado, se identificó el decremento de la expresión de miR-145 y miR-143, cuya expresión se encuentra abatida en varios tipos de cáncer, incluyendo el CaCu [62, 90]. Este cluster miR-145/143 está asociado a las vías de angiogénesis y metástasis [90-92]. Así que de acuerdo con nuestros resultados, y previos reportes, se sugiere que el miR-145 probablemente actuaría como un microRNA supresor en cáncer.

Asimismo, para conocer si los tumores y las líneas celulares de cérvix exhibían un comportamiento similar en términos de expresión de microRNAs, se realizó el análisis de PCA, expresión diferencial, y se identificó la agrupación de ambas muestras basada en su expresión de microRNAs. El PCA y el cluster jerárquico mostraron la agrupación de los tumores en la parte central como una entidad de transición entre líneas celulares y un tejido sin lesión, lo cual no es de sorprender, ya que se ha descrito a los tumores entidades heterogéneas [93]. Interesantemente, todas las líneas celulares fueron agrupadas en el PCA, excepto C33A (línea usada como réplica técnica). Es conocido que la línea C33A presenta mutaciones en los genes de pRb y p53. Estos eventos moleculares y seguramente otros que no se han identificado con claridad, pudieran explicar nuestros resultados.

Por otro lado, para saber si la presencia de VPH pudiera influir en la expresión celular de microRNAs, se realizó el análisis de PCA para líneas celulares VPH positivas: CasKi, SiHa, CaLo, HeLa, INBL, Rova, ViPa, C4-I, y MS-751; y VPH negativas: C33A, ViBo y HaCaT, pero no fue posible identificar agrupamiento por presencia de VPH. Sin embargo, dos de tres líneas celulares de VPH

negativas (HaCaT y ViBo) fueron agrupadas con el resto de líneas celulares VPH positivas, a excepción de la línea C33A (Anexo 4). Estos datos sugieren que la presencia de VPH no influye en la expresión celular de microRNAs, o bien, dadas las condiciones del estudio no fue posible identificarlo. Un estudio reciente, de transfección de células HaCaT con E5 de VPH16, no muestra cambios de expresión de microRNAs [94]. Por lo tanto, estos hallazgos pueden soportar parcialmente nuestros resultados.

Controversialmente, existen varios estudios donde reportan la importancia que tiene VPH en los perfiles de expresión de microRNAs utilizando modelos de líneas celulares, sin embargo, en la mayoría de ellos la línea celular de comparación es C33A, la cual como se ha mencionado muestra una diferencia de expresión con el resto de líneas celulares utilizadas en este estudio, que no necesariamente es la ausencia de VPH sino por las características propias de la línea celular [63].

Por otro lado, la reconstrucción de las vías de regulación afectadas por la expresión de microRNAs aberrantes permitió conocer que la vía de Ciclina D1, VEGF-A, pRb y E2F1 están alteradas en las células de cérvix, mientras que el proceso de regulación afectado, fue la Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés). Por lo que de forma breve abordaremos las vías de mayor interés en este estudio.

Se sabe que la vía de Ciclina D1 está regulada negativamente por el miR-34a, -195 y -155, y nuestros resultados coinciden con lo reportado. Interesantemente, Ciclina D1 es reconocida como un oncogen involucrado en la fosforilación de la proteína Rb, promoviendo la transición del ciclo celular de G1 a S [95, 96]. En estudios previos, se ha reportado a miR-155 como oncogene en varios tipos de cancer hematológicos y de origen epitelial, y a FOX3 y Ciclina D1 como potenciales blancos. Estos dos genes están estrechamente relacionados con la vía de  $\beta$ -catenina. Esta última se ha reportado que tiene múltiples papeles en el desarrollo y mantenimiento celular, y generalmente se encuentra en bajas cantidades en el citoplasma, vía degradación de ubiquitinización-proteosoma, proceso regulado por un complejo de proteínas como Axina, CDk1Alfa, APC y

GSK-3beta [97], lo que sugiere que probablemente, entre otros factores, esta pueda estar controlada por el miR-155 y la Ciclina D1 conduciendo a la progresión y crecimiento del tumor [98]. Por otro lado, estudios en CaCu han identificado la disminución en la expresión de Ciclina D1b, donde se ve alterado la acción de la ciclina D1b en el arresto de G0/G1 induciendo la apoptosis, inhibiendo la proliferación celular y la formación de colonias. Asimismo, es importante mencionar que la ciclina D1a puede unirse y activar a cinasas dependientes de ciclinas como CDK4 y 6, mediando la fosforilación de la proteína Rb. Se podría pensar en CaCu, que si la ciclina D1 está disminuida o ausente, la proteína Rb no se fosforila y no lleva a cabo sus funciones. Otros estudios han demostrado que la ciclina D1b tiene un menor impacto en la fosforilación de Rb. En CaCu, sabemos que las infecciones persistentes de VPH tienen un impacto en la patología, aunque no lo suficiente para originar la enfermedad, pero en esta condición la presencia de la expresión de proteínas virales oncogénicas es de relevancia. Es conocido que Rb es uno de los blancos importantes de E7 que inducen la proliferación celular, pero también donde Ciclina D1 muestran homología por los sitios de unión a Rb. Por lo tanto, la sobre-regulación de Ciclina D1b puede competir, inhibiendo la unión de la proteína E7 a Rb, impidiendo la replicación celular y síntesis viral. Así que, la sobre-regulación de ciclina D1b, al competir por la unión de la proteína E7 a Rb, inhibe la proliferación celular, síntesis viral, formación de colonias y promueve el arresto del ciclo celular (G0/G1), y en consecuencia la apoptosis celular [99]. Este hecho coincide con los resultados obtenidos, ya que otra de las vías alteradas fue la de Rb. En ésta, Rb está regulado negativamente por la sobre-expresión de miR-106b, miR-17, miR-20a, miR-106. Dado los antecedentes anteriores, pRb probablemente esté alterado por la presencia de VPH y por la sobre-regulación de microRNAs aberrantes en la condición de cáncer. Esta degradación de pRb resulta en la disociación de los miembros de la familia de los factores de transcripción E2F. Las proteínas libres de E2Fs promueven la entrada a la fase S, promoviendo la síntesis de DNA. Particularmente, estudios recientes han demostrado que las células infectadas con HPV 16, expresan E7, E1F1 que a su vez activa a CIP2A, y en consecuencia la desregulación de CDKs. E2F regula a la ciclina A y Cdk4 y 2, permitiendo la activación de la fase G1/S [100]. Asimismo, esta regulación está

interconectada con EGFR (Receptor del Factor del Crecimiento Epitelial, por sus siglas en inglés), el cual está altamente relacionado con el proceso de Transición epitelio-mesenquimal (EMT), la cual fue representativa en este trabajo. Otros estudios han logrado demostrar que una de las proteínas de unión a EGFR es KIAA1199 (proteína oncogénica), la cual induce su expresión por la presencia de VPH, trayendo como consecuencia final la promoción del proceso EMT [101]. Interesantemente, se ha identificado que la vía de señalización EP2/EGFR/Pi2 Akt-cinasa está alterada en CaCu, y que es inducida por citocinas pro-inflamatorias como IL-1alfa, dada la condición inflamación crónica que representa el tumor [102]. Además, es conocido que la IL-10 incrementa su expresión significativamente durante la progresión de la lesión del cérvix [103] con una relevancia clínica para su potencial uso en el diagnóstico y pronóstico del CaCu, por estar relacionado a la invasividad [104].

Finalmente, otra de las vías que se encontraron alteradas fue la de VEGF. En CaCu, se ha visto que la sobre-expresión de VEGFa se incrementa con respecto al tamaño del tumor y la invasividad del mismo [105]. Los hallazgos de nuestro estudio muestran claramente que los microRNAs involucrados en su regulación negativa son: miR-200b, miR-126 y miR-205, los cuales mostraron una disminución de expresión. Interesantemente, se identificó que VEGF está relacionada con la expresión de IL-10. En tumores de cérvix, se ha identificado que debido al ambiente inmunosupresivo que existe esta en la condición tumoral, se alteran citocinas pro-inflamatorias como: la sobre-regulación de IL-10 y el TGF-B1[106].

Estudios previos han relacionado al fenotipo Transición Epitelio-Mesenquimal importante en la progresión y metástasis del CaCu. Ante ello, se han identificado muchos factores asociados con el proceso como: proteínas relacionadas con hipoxia, citocinas, factores de transcripción y microRNAs como el cluster de miR-200, miR-361-5p, miR-155 y miR-375, entre otros [107]. Por ejemplo, se ha visto que el miR-361-5p actúa como un oncogén, activador de la proliferación celular, promoviendo la invasión y que se correlaciona su expresión de forma inversamente proporcional a la expresión de E-caderina, lo que ha sugerido a miR-361-5p como un marcador en la progresión del cáncer

de cérvix [108]. Asimismo, se ha propuesto al microRNA-375 como una molécula importante para la quimio-resistencia, ya que ésta se expresa al ser inducida por paclitaxel, inhibiendo la proliferación y el fenotipo EMT por la supresión directa de E-caderina [109].

Una vez que identificamos las vías involucradas, nos dimos a la tarea de seleccionar un conjunto de microRNAs que cumplieran los criterios antes mencionados para ser validados por qPCR en diferentes lesiones de cérvix, desde lesiones precursoras, tumores, tejido sano y líneas celulares de cérvix. Los microRNAs validados se dividieron en dos grupos: los microRNAs sobre-expresados ( miR-196a, miR-18b, miR-25) y los microRNA suprimidos (miR-214, miR-424, miR-199a y miR-199b). Dentro del primer grupo de microRNAs evaluados, el miR-196a fue el único que presentó una diferencia de expresión significativa en las líneas celulares y un incremento en los niveles de expresión. Mientras que de los microRNAs suprimidos, todos mostraron un decremento significativo en líneas celulares y tumores, a excepción del miR-424, que tuvo una expresión variable independiente del tipo de lesión evaluada. De estos tres microRNAs evaluados, se observó que el miR-199b tenía un mayor número de valores extremos, lo que se reflejó en una desviación estándar de 14.79. La alta variabilidad de la expresión es un factor importante que no es de extrañarse, ya que cada tejido evaluado es único, recordando que una LIEBG es una entidad que contiene aproximadamente un 25% de células con alteración del epitelio escamoso estratificado, una LIEAG contiene aproximadamente de un 50 al 100 % de células con alteración, y finalmente el tumor es una entidad heterogénea en la que se encuentran subgrupos de poblaciones con características diferentes importantes para la agresividad del tumor [93, 110, 111]. Aunado a ello, es importante recordar que además de considerar a las células del epitelio escamoso estratificado durante la obtención de la muestra, también existen células del estroma, por lo tanto la variabilidad es el reflejo de la expresión conjunta de las poblaciones celulares de diferentes orígenes. Un aspecto importante que se identificó en la expresión de miR-214 fue que su disminución estuvo relacionada con el aumento del nivel de la lesión, a pesar que solo fue significativo en los tumores y líneas celulares derivadas de cérvix. Por tal motivo, se realizó la reconstrucción de las vías de



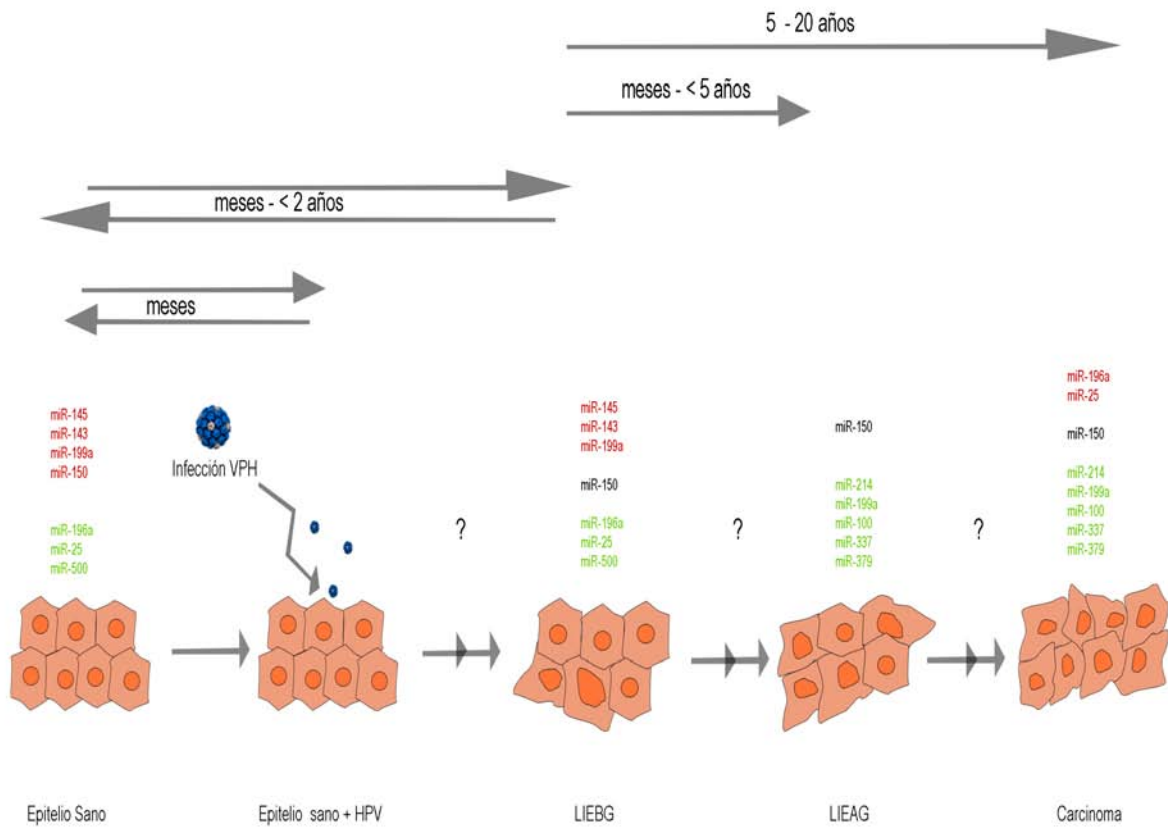
miR-214, y se encontró que su expresión está regulada por MYOG, MYOD y c-Myc. Sin embargo, existen diversas controversias de la expresión de c-Myc en CaCu, debido a que se ha reportado tanto la sobre-expresión como la supresión en tumores, donde la sobre-expresión de c-Myc puede estar asociada a las recaídas y al mal pronóstico, además que en algunos reporte el nivel de expresión ser incrementa con el grado de la lesión [112, 113]. Mientras que en este estudio al encontrarse la tendencia de decremento de la expresión de miR-214 conforme aumenta el grado de lesión en cérvix, nos sugiere que su expresión de éste no está regulada exclusivamente por c-myc, el cual probablemente no se encuentre modificado su expresión de forma significativa en los tumores analizados.

De manera similar al miR-214, se realizó la reconstrucción de las vías de regulación del miR-196a, los resultados fueron interesantes ya que se logró identificar que este microRNA se encuentra de forma redundante en el genoma. El microR-196 está codificado en los genes MIR196A1 y MIR196A2, localizado en la posición cromosómica 17a21.32 (-) (en el gen RP11) y en 12q13.13 (+) (intrón 1 de HOXC5 y HOXC6), respectivamente. Hallazgos de nuestro grupo, han determinado por hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés) la ganancia en el número de copias del gen RP11 en tejidos con CaCu. Por esto, se ha sugerido que la sobre-expresión de miR-196a probablemente pueda derivar de la amplificación del gen MIR196A1.

Estudios en la regulación de la expresión de miR-196a son escasos, sin embargo, en varios tipos de cáncer como piel, esófago, pulmón y páncreas se ha reportado su sobre-expresión [74, 114-116]. En nuestro estudio, se encontró estadísticamente significativa la sobre-expresión de miR-196a en líneas celulares derivadas de CaCu, mientras que en tejido de cérvix sano, se encontró un incremento en la expresión que no fue comparable con lo observado en líneas celulares, probablemente la disminución de la expresión en los tejidos se deba a la heterogeneidad celular que se encuentra en los tumores, LIEBG y LIEAG.

Para conocer los potenciales genes blancos de miR-196, se realizaron tres análisis principales. El primer análisis consistió en la generación de la reconstrucción de la vía de regulación de miR-196a mediante GeneGo Metacore, identificándose genes involucrados en el desarrollo embrionario y remodelamiento celular como: genes HOX (HOXC8, HOXA7; HOXD8, HOXA9, HOXB8) y Actina/Keratina. El segundo análisis consistió en el uso de herramientas bioinformáticas de siete bases de datos disponibles para predicción de blancos de microRNAs, revelando en la mayoría de ellas a HOXC8 como gen candidato de miR-196a. Finalmente, el último análisis consistió en la búsqueda de la presencia o ausencia de la expresión proteica de HOXC8 en tumores de cérvix.

Estudios recientes han observado la ausencia de la expresión de HOXC8 en algunos tumores relacionados con progresión y metástasis [75, 76, 116]. En CaCu, varios miembros de la familias de genes HOX han sido evaluados, sin embargo, entre los genes candidatos a represión por miR-196a, a HOX9, HOXB6, HOXB7 y HOXB8 han sido reportados sin cambios de expresión [72, 73]. Adicional a esto, dos estudios han reportado expresión controversial de HOXC8 a nivel de transcrito [117, 118]. De acuerdo a nuestros hallazgos bioinformáticos y a los reportes de HOXC8, se realizó el ensayo de inmunodetección de HOXC8 en tejido de cérvix sano, carcinoma y en líneas celulares. La ausencia de la expresión de proteína HOXC8 en los tumores y líneas celulares, sugiere que HOXC8 probablemente sea un gen involucrado en el proceso de cáncer de cérvix, éste hallazgo coincidió con el estudio de Alami et al. [117]. Por lo tanto, nosotros sugerimos que miR-196a puede ser un elemento oncogénico importante en las células de cáncer de cérvix, así como es de relevancia la expresión de algunos microRNAs característicos en las diferentes lesiones del cérvix que fueron identificados en este estudio (Figura 26).



**Figura 26. Modelo de expresión de microRNAs en células del epitelio del cérvix.** En la parte inferior, se observan las diferentes etapas de transición que presentan las células epiteliales hasta la formación de un tumor; el periodo entre cada etapa está indicado en la parte superior. En este estudio, en un cérvix sano debe existir expresión de miR-143, -145, -150, 199 a, no así miR-196 a- 25 y -500. Además, la expresión de miR-150 en cérvix con y sin lesión se mantiene constante. Sin embargo, el grupo de microRNAs suprimidos como miR-214, -199 a, -337 y -379 y sobre-expresados como el miR-196 y -25 son característicos de LIEAG y un CaCu.

## **CONCLUSIONES**

Los datos de este estudio mostraron la heterogeneidad de expresión de microRNAs en células de cáncer de cérvix, mostrando que las células de cáncer de cérvix exhiben eventos complejos en la regulación de microRNAs.

No fue posible identificar un perfil de expresión de microRNAs específico relacionado con la infección de VPH, sugiriendo la presencia de eventos moleculares más complejos que dan lugar a CaCu.

Finalmente, se sugiere que miR-196a puede ser un elemento oncogénico en células de cáncer de cérvix. Sin embargo, se proponen más estudios para comprobar estos resultados.

## **PESPECTIVAS**

Realizar ensayos funcionales para identificar el potencial oncogénico del miR-196a, utilizando antagoMIR y regiones 3`UTRs de los potenciales blancos asociados a luciferasa.

## LITERATURA CITADA

1. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD: **New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites.** *Genome research* 2009, **19**(7):1175-1183.
2. Mendell JT: **MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy.** *Cell cycle* 2005, **4**(9):1179-1184.
3. Fabbri M, Croce CM, Calin GA: **MicroRNAs.** *Cancer journal* 2008, **14**(1):1-6.
4. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N: **Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs.** *Nature* 2008, **455**(7209):58-63.
5. Carbonell J, Alloza E, Arce P, Borrego S, Santoyo J, Ruiz-Ferrer M, Medina I, Jimenez-Almazan J, Mendez-Vidal C, Gonzalez-Del Pozo M *et al*: **A map of human microRNA variation uncovers unexpectedly high levels of variability.** *Genome medicine* 2012, **4**(8):62.
6. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ: **miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature.** *Nucleic acids research* 2006, **34**(Database issue):D140-144.
7. Kozomara A, Griffiths-Jones S: **miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data.** *Nucleic acids research* 2014, **42**(Database issue):D68-73.
8. Eminaga S, Christodoulou DC, Vigneault F, Church GM, Seidman JG: **Quantification of microRNA expression with next-generation sequencing.** *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al]* 2013, **Chapter 4**:Unit 4 17.
9. Kim MC, Lee SW, Ryu DY, Cui FJ, Bhak J, Kim Y: **Identification and characterization of microRNAs in normal equine tissues by Next Generation Sequencing.** *PloS one* 2014, **9**(4):e93662.
10. Natarajan R, Putta S, Kato M: **MicroRNAs and diabetic complications.** *Journal of cardiovascular translational research* 2012, **5**(4):413-422.
11. Tam S, de Borja R, Tsao MS, McPherson JD: **Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2014, **94**(3):350-358.
12. Moreira FC, Assumpcao M, Hamoy IG, Darnet S, Burbano R, Khayat A, Goncalves AN, Alencar DO, Cruz A, Magalhaes L *et al*: **MiRNA expression profile for the human gastric antrum region using ultra-deep sequencing.** *PloS one* 2014, **9**(3):e92300.
13. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C: **The microRNA.org resource: targets and expression.** *Nucleic acids research* 2008, **36**(Database issue):D149-153.
14. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos GL, Hatzigeorgiou AG: **Accurate microRNA Target Prediction Using Detailed Binding Site Accessibility and Machine Learning on Proteomics Data.** *Frontiers in genetics* 2011, **2**:103.

15. Gromak N: **Intronic microRNAs: a crossroad in gene regulation.** *Biochemical Society transactions* 2012, **40**(4):759-761.
16. Ul Hussain M: **Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action.** *Cell and tissue research* 2012, **349**(2):405-413.
17. Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ: **Practical Aspects of microRNA Target Prediction.** *Current molecular medicine* 2011, **11**(2):93-109.
18. Nelson KM, Weiss GJ: **MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future.** *Molecular cancer therapeutics* 2008, **7**(12):3655-3660.
19. Fabbri M, Calin GA: **Epigenetics and miRNAs in human cancer.** *Advances in genetics* 2010, **70**:87-99.
20. Malumbres M: **miRNAs and cancer: an epigenetics view.** *Molecular aspects of medicine* 2013, **34**(4):863-874.
21. Paone A, Galli R, Fabbri M: **MicroRNAs as New Characters in the Plot between Epigenetics and Prostate Cancer.** *Frontiers in genetics* 2011, **2**:62.
22. Soto-Reyes E, Gonzalez-Barrios R, Cisneros-Soberanis F, Herrera-Goepfert R, Perez V, Cantu D, Prada D, Castro C, Recillas-Targa F, Herrera LA: **Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in gynecological cancers.** *BMC cancer* 2012, **12**:40.
23. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
24. Croce CM: **Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer.** *Nature reviews Genetics* 2009, **10**(10):704-714.
25. Iorio MV, Croce CM: **Causes and consequences of microRNA dysregulation.** *Cancer journal* 2012, **18**(3):215-222.
26. Iorio MV, Croce CM: **microRNA involvement in human cancer.** *Carcinogenesis* 2012, **33**(6):1126-1133.
27. Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, Issartel JP: **MicroRNAs: molecular features and role in cancer.** *Frontiers in bioscience* 2012, **17**:2508-2540.
28. Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ: **The role of microRNAs in cancer.** *The Yale journal of biology and medicine* 2006, **79**(3-4):131-140.
29. Krutovskikh VA, Herceg Z: **Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers.** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2010, **32**(10):894-904.
30. Tong AW, Nemunaitis J: **Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy?** *Cancer gene therapy* 2008, **15**(6):341-355.
31. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: **RAS is regulated by the let-7 microRNA family.** *Cell* 2005, **120**(5):635-647.
32. Wang X, Cao L, Wang Y, Wang X, Liu N, You Y: **Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review).** *Oncology letters* 2012, **3**(5):955-960.
33. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ *et al*: **Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis.** *Molecular cell* 2007, **26**(5):745-752.

34. Kim NH, Kim HS, Kim NG, Lee I, Choi HS, Li XY, Kang SE, Cha SY, Ryu JK, Na JM *et al*: **p53 and microRNA-34 are suppressors of canonical Wnt signaling**. *Science signaling* 2011, **4**(197):ra71.
35. Aguda BD, Kim Y, Piper-Hunter MG, Friedman A, Marsh CB: **MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92, E2F, and Myc**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(50):19678-19683.
36. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ *et al*: **A microRNA polycistron as a potential human oncogene**. *Nature* 2005, **435**(7043):828-833.
37. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT: **c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression**. *Nature* 2005, **435**(7043):839-843.
38. Dalmay T, Edwards DR: **MicroRNAs and the hallmarks of cancer**. *Oncogene* 2006, **25**(46):6170-6175.
39. Olson P, Lu J, Zhang H, Shai A, Chun MG, Wang Y, Libutti SK, Nakakura EK, Golub TR, Hanahan D: **MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer**. *Genes & development* 2009, **23**(18):2152-2165.
40. Calin GA, Croce CM: **MicroRNA signatures in human cancers**. *Nature reviews Cancer* 2006, **6**(11):857-866.
41. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA *et al*: **MicroRNA expression profiles classify human cancers**. *Nature* 2005, **435**(7043):834-838.
42. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M *et al*: **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(7):2257-2261.
43. Iorio MV, Croce CM: **MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review**. *EMBO molecular medicine* 2012, **4**(3):143-159.
44. Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JP: **Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review**. *Journal of the National Cancer Institute* 2012, **104**(7):528-540.
45. Oulas A, Karathanasis N, Louloupis A, Poirazi P: **Finding cancer-associated miRNAs: methods and tools**. *Molecular biotechnology* 2011, **49**(1):97-107.
46. Wen M, Shen Y, Shi S, Tang T: **miREvo: an integrative microRNA evolutionary analysis platform for next-generation sequencing experiments**. *BMC bioinformatics* 2012, **13**:140.
47. Sotiropoulos C, Piccart MJ: **Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care?** *Nature reviews Cancer* 2007, **7**(7):545-553.
48. Organization WH: **GLOBOCAN 2012. Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. 2012.
49. INEGI: **Instituto Nacional de Estadística y Geografía** 2013.
50. SINAIS: **Sistema Nacional de Información en Salud: Mortalidad 2000-2008**. 2011.

51. Sánchez-Barriga: **Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008.** *Gaceta Médica de México* 2012, **148**:42-51.
52. zur Hausen H: **Disrupted dichotomous intracellular control of human papillomavirus infection in cancer of the cervix.** *Lancet* 1994, **343**(8903):955-957.
53. zur Hausen H: **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(5):342-350.
54. Chan PK, Luk AC, Park JS, Smith-McCune KK, Palefsky JM, Konno R, Giovannelli L, Coutlee F, Hibbitts S, Chu TY *et al*: **Identification of human papillomavirus type 58 lineages and the distribution worldwide.** *The Journal of infectious diseases* 2011, **203**(11):1565-1573.
55. Chan PK, Zhang C, Park JS, Smith-McCune KK, Palefsky JM, Giovannelli L, Coutlee F, Hibbitts S, Konno R, Settheetham-Ishida W *et al*: **Geographical distribution and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 sequence variations.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2013, **132**(11):2528-2536.
56. Pina-Sanchez P, Hernandez-Hernandez DM, Taja-Chayeb L, Cerda-Flores RM, Gonzalez-Herrera AL, Rodea-Avila C, Apresa-Garcia T, Ostrosky-Wegman P, Vazquez-Ortiz G, Mendoza-Lorenzo P *et al*: **Polymorphism in exon 4 of TP53 gene associated to HPV 16 and 18 in Mexican women with cervical cancer.** *Medical oncology* 2011, **28**(4):1507-1513.
57. Baseman JG, Koutsky LA: **The epidemiology of human papillomavirus infections.** *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2005, **32 Suppl 1**:S16-24.
58. Narayan G, Pulido HA, Koul S, Lu XY, Harris CP, Yeh YA, Vargas H, Posso H, Terry MB, Gissmann L *et al*: **Genetic analysis identifies putative tumor suppressor sites at 2q35-q36.1 and 2q36.3-q37.1 involved in cervical cancer progression.** *Oncogene* 2003, **22**(22):3489-3499.
59. Zheng ZM, Baker CC: **Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2006, **11**:2286-2302.
60. Hu X, Schwarz JK, Lewis JS, Jr., Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, Grigsby PW, Wang X: **A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis.** *Cancer research* 2010, **70**(4):1441-1448.
61. Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, Kim WY, Kim TJ, Lee JH, Kim BG *et al*: **Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008, **14**(9):2535-2542.
62. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A: **Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer.** *Cancer research* 2007, **67**(13):6031-6043.
63. Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA: **Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells.** *Oncogene* 2008, **27**(18):2575-2582.
64. Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, Winder DM, Palmer RD, Gooding EL, Barbosa-Morais NL, Mukherjee G, Thorne NP, Roberts I *et al*: **Global**



- microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels.** *The Journal of pathology* 2007, **212**(4):368-377.
65. Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MA: **MicroRNA expression variability in human cervical tissues.** *PloS one* 2010, **5**(7):e11780.
  66. Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng ZM: **Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth.** *PloS one* 2008, **3**(7):e2557.
  67. Terris MK, Peehl DM: **Human papillomavirus detection by polymerase chain reaction in benign and malignant prostate tissue is dependent on the primer set utilized.** *Urology* 1997, **50**(1):150-156.
  68. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M: **Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers.** *Journal of clinical microbiology* 2008, **46**(3):1050-1059.
  69. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
  70. Brazma A: **Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)--successes, failures, challenges.** *TheScientificWorldJournal* 2009, **9**:420-423.
  71. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC *et al*: **Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data.** *Nature genetics* 2001, **29**(4):365-371.
  72. Lopez R, Garrido E, Vazquez G, Pina P, Perez C, Alvarado I, Salcedo M: **A subgroup of HOX Abd-B gene is differentially expressed in cervical cancer.** *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2006, **16**(3):1289-1296.
  73. Lopez R, Garrido E, Pina P, Hidalgo A, Lazos M, Ochoa R, Salcedo M: **HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma.** *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2006, **16**(1):329-335.
  74. Braig S, Mueller DW, Rothhammer T, Bosserhoff AK: **MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2010, **67**(20):3535-3548.
  75. Li Y, Zhang M, Chen H, Dong Z, Ganapathy V, Thangaraju M, Huang S: **Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis.** *Cancer research* 2010, **70**(20):7894-7904.
  76. Mueller DW, Bosserhoff AK: **MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2011, **129**(5):1064-1074.
  77. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: **Cancer statistics, 2015.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2015, **65**(1):5-29.
  78. Higareda-Almaraz JC, Enriquez-Gasca Mdel R, Hernandez-Ortiz M, Resendis-Antonio O, Encarnacion-Guevara S: **Proteomic patterns of cervical cancer cell lines, a network perspective.** *BMC systems biology* 2011, **5**:96.

79. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
80. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, Wallace TA, Liu CG, Volinia S, Calin GA *et al*: **Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer.** *Cancer research* 2008, **68**(15):6162-6170.
81. Diosdado B, van de Wiel MA, Terhaar Sive Droste JS, Mongera S, Postma C, Meijerink WJ, Carvalho B, Meijer GA: **MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression.** *British journal of cancer* 2009, **101**(4):707-714.
82. Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, Hur K, Yoo MW, Lee HJ, Yang HK *et al*: **Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer.** *Nucleic acids research* 2009, **37**(5):1672-1681.
83. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, Sugihara K, Mori M: **Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer.** *International journal of oncology* 2009, **34**(4):1069-1075.
84. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, Taccioli C, Zanesi N, Alder H, Hagan JP *et al*: **MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(35):12885-12890.
85. Jevnaker AM, Khuu C, Kjole E, Bryne M, Osmundsen H: **Expression of members of the miRNA17-92 cluster during development and in carcinogenesis.** *Journal of cellular physiology* 2011, **226**(9):2257-2266.
86. Li L, Shi JY, Zhu GQ, Shi B: **MiR-17-92 cluster regulates cell proliferation and collagen synthesis by targeting TGF $\beta$  pathway in mouse palatal mesenchymal cells.** *Journal of cellular biochemistry* 2012, **113**(4):1235-1244.
87. Miko E, Czimmerer Z, Csanky E, Boros G, Buslig J, Dezso B, Scholtz B: **Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer.** *Experimental lung research* 2009, **35**(8):646-664.
88. Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M, Ju J: **Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer.** *Biomarker insights* 2006, **2**:113-121.
89. Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, Chen C: **Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis.** *World journal of surgery* 2009, **33**(4):698-709.
90. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T: **MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers.** *Oncology reports* 2006, **16**(4):845-850.
91. Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, Naoe T, Tanigawa N, Akao Y: **Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers.** *Oncology* 2009, **77**(1):12-21.
92. Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, Chen HY, Sun XF: **Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer.** *Disease markers* 2009, **26**(1):27-34.

93. Meacham CE, Morrison SJ: **Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity.** *Nature* 2013, **501**(7467):328-337.
94. Greco D, Kivi N, Qian K, Leivonen SK, Auvinen P, Auvinen E: **Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs.** *PloS one* 2011, **6**(7):e21646.
95. Kim YT, Zhao M: **Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma.** *Yonsei medical journal* 2005, **46**(5):597-613.
96. Li Z, Wang C, Prendergast GC, Pestell RG: **Cyclin D1 functions in cell migration.** *Cell cycle* 2006, **5**(21):2440-2442.
97. Zhang P, Bill K, Liu J, Young E, Peng T, Bolshakov S, Hoffman A, Song Y, Demicco EG, Terrada DL *et al*: **MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1alpha and enhances beta-catenin signaling.** *Cancer research* 2012, **72**(7):1751-1762.
98. Manzo-Merino J, Contreras-Paredes A, Vazquez-Ulloa E, Rocha-Zavaleta L, Fuentes-Gonzalez AM, Lizano M: **The role of signaling pathways in cervical cancer and molecular therapeutic targets.** *Archives of medical research* 2014, **45**(7):525-539.
99. Wang N, Wei H, Yin D, Lu Y, Zhang Y, Jiang D, Jiang Y, Zhang S: **Cyclin D1b overexpression inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in cervical cancer cells in vitro and in vivo.** *International journal of clinical and experimental pathology* 2014, **7**(7):4016-4023.
100. Zhang W, Chen H, Chen Y, Liu J, Wang X, Yu X, Chen JJ, Zhao W: **Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A contributes to human papillomavirus oncoprotein E7-induced cell proliferation via E2F1.** *Oncotarget* 2014.
101. Shostak K, Zhang X, Hubert P, Goktuna SI, Jiang Z, Klevernic I, Hildebrand J, Roncarati P, Henny B, Ladang A *et al*: **NF-kappaB-induced KIAA1199 promotes survival through EGFR signalling.** *Nature communications* 2014, **5**:5232.
102. Adefuye AO, Sales KJ, Katz AA: **Seminal plasma induces the expression of IL-1alpha in normal and neoplastic cervical cells via EP2/EGFR/PI3K/AKT pathway.** *Journal of molecular signaling* 2014, **9**:8.
103. Fukazawa EM, Baiocchi G, Soares FA, Kumagai LY, Faloppa CC, Badiglian-Filho L, Coelho FR, Goncalves WJ, Costa RL, Goes JC: **Cox-2, EGFR, and ERBB-2 expression in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer using an automated imaging system.** *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 2014, **33**(3):225-234.
104. Li Q, Tang Y, Cheng X, Ji J, Zhang J, Zhou X: **EGFR protein expression and gene amplification in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the cervix.** *International journal of clinical and experimental pathology* 2014, **7**(2):733-741.
105. Chen B, Zhang C, Dong P, Guo Y, Mu N: **Molecular regulation of cervical cancer growth and invasion by VEGFa.** *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014, **35**(11):11587-11593.
106. Torres-Poveda K, Bahena-Roman M, Madrid-Gonzalez C, Burguete-Garcia AI, Bermudez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V: **Role of**

- IL-10 and TGF-beta1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia.** *World journal of clinical oncology* 2014, **5**(4):753-763.
107. Qureshi R, Arora H, Rizvi MA: **EMT in cervical cancer: its role in tumour progression and response to therapy.** *Cancer letters* 2015, **356**(2 Pt B):321-331.
108. Wu X, Xi X, Yan Q, Zhang Z, Cai B, Lu W, Wan X: **MicroRNA-361-5p facilitates cervical cancer progression through mediation of epithelial-to-mesenchymal transition.** *Medical oncology* 2013, **30**(4):751.
109. Shen Y, Zhou J, Li Y, Ye F, Wan X, Lu W, Xie X, Cheng X: **miR-375 mediated acquired chemo-resistance in cervical cancer by facilitating EMT.** *PloS one* 2014, **9**(10):e109299.
110. Marte B: **Tumour heterogeneity.** *Nature* 2013, **501**(7467):327.
111. Marusyk A, Polyak K: **Tumor heterogeneity: causes and consequences.** *Biochimica et biophysica acta* 2010, **1805**(1):105-117.
112. Li T, Tang L, Bian D, Jia Y, Huang X, Zhang X: **Detection of hTERT and c-MYC genes in cervical epithelial exfoliated cells for cervical cancer screening.** *International journal of molecular medicine* 2014, **33**(5):1289-1297.
113. Sowani A, Ong G, Dische S, Quinn C, White J, Soutter P, Waxman J, Sikora K: **c-myc oncogene expression and clinical outcome in carcinoma of the cervix.** *Molecular and cellular probes* 1989, **3**(2):117-123.
114. Liu XH, Lu KH, Wang KM, Sun M, Zhang EB, Yang JS, Yin DD, Liu ZL, Zhou J, Liu ZJ *et al*: **MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5.** *BMC cancer* 2012, **12**:348.
115. Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM *et al*: **MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers.** *Oncogene* 2008, **27**(52):6667-6678.
116. Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, Moehler M, Gockel I: **High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells.** *World journal of gastroenterology : WJG* 2009, **15**(17):2089-2096.
117. Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clausse N: **HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes.** *Biochemical and biophysical research communications* 1999, **257**(3):738-745.
118. Hung YC, Ueda M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, Yamaguchi H, Akise D, Ueki M: **Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells.** *Cancer science* 2003, **94**(5):437-441.

## ANEXOS

### Anexo 1. Protocolo microRNA Gene Chip Galaxy v 1.0, Affymetrix

Fecha: \_\_\_\_\_

Proyecto: \_\_\_\_\_

Experimento: \_\_\_\_\_

#### *Primer día.*

1. Limpiar el área de trabajo y micropipetas con ZAP.

#### Limites de RNA que contiene LMW RNA

**Iniciar con 1 000 ng de RNA total con microRNAs de tejido o células**

Muestra	Número	(ng/ul)	260/280	RIN
	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
	8			

2. Tomar 2 ul a una concentración de 500 ng/ul)

$$( \quad ) \text{ ng/ uL} \times 2 \text{ uL} / 500 \text{ ng/uL} = \quad \text{ uL} - 2 \text{ uL} = \quad \text{ uL H}_2\text{O}$$

Muestra	Volumen de RNA ( uL)	Volumen de H <sub>2</sub> O (uL)	Volumen total (uL)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

### 3. Cuantificar

Dil. Muestra	Cuantificación 1			Cuantificación 2		
	ng / ul	260/280	260/230	ng / ul	260/280	260/230
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						

4. Diluir el RNA si la concentración es mayor de 500 ug/ul .Tomar 1000 ng de RNA total

Muestra	Volumen de RNA (uL)	Volumen de H <sub>2</sub> O (uL)	Volumen Final (uL)
1			8
2			8
3			8
4			8
5			8
6			8
7			8
8			8

5. Transferir los 8 uL de RNA al hielo

#### I. Poly (A) Tailing

Fecha \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

1. Descongelar el **Vial 3** (ATP) y **Vial 8** (Spike Control Oligos) en **hielo**, vortex y spin. Mantenerlo en hielo.
2. Descongelar el **Vial 1** (Buffer 10X), **Vial 2** (MnCl<sub>2</sub>) a T.A, vortex y spin.
3. Sacar el **Vial 4** (PAP Enzime) y mantenerlo a -20 °C hasta su uso. Mezclar gentilmente y dar spin.
4. Adicionar a cada muestra **2 uL** RNA Spike Control Oligos (**Vial 8**)
5. Hacer a Dilución 1/500 de ATP en 1 mM de Tris-HCl

#### Dilución de ATP

\*\* Vortex y spin en cada dilución\*\*

4. Prender el termociclador.
5. Preparar el siguiente Master Mix:

No. de Dilución	Factor de Dilución	Dilución de ATP 1:500 ( 0.002)		Marcar
		ATP (uL) (vial 3)	1 mM de Tris (uL)	
1	1/50	2 uL	98 uL	Vortex
2	1/ 10	10 uL Dil 1	90 uL	Vortex

## Maxter Mix de Poly (A) Tailing

Reactivo	Volumen $\mu$ l por 1 Rxn	Vol. $\mu$ l por x Rxn	Marcar
Reaction Buffer 10X (vial 1)	1.5 uL		
MnCl <sub>2</sub> 25 mM (vial 2)	1.5 uL		
Dilución 2 del ATP	1.0 uL		
PAP Enzime (vial 4)	1.0 uL		
<b>Volumen total</b>	<b>5.0 uL</b>		

6. Colocar **5 uL** del Master Mix de Poly (A) Tailing a cada muestra. Volumen total en el tubo : **15 uL**.

7. Mezclar gentilmente **NO VORTEXEAR**. Dar un spin

8. Incubar a

- **37 °C por 15 min (No cerrar la tapa).**

Nota: Descartar cualquier cantidad de Master Mix sobrante, así como del Dilución de ATP.

## II. FlashTag Biotin HSR Ligation

1. Descongelar el **Vial 5**(FlashTag Biotin) a T.A, vortex y spin.

2. Descongelar el **Vial 6** (T4 DNA) y mantenerlo a -20 °C hasta su uso. Mezclar gentilmente y dar spin.

3. Spinear las muestras y colocarlas en hielo

4. Agregar a cada muestra lo siguiente:

**\*\*NO hacer Master Mix\*\***

Reactivo	Volumen $\mu$ l x 1 Rxn	Marcar							
		1	2	3	4	5	6	7	8
FlashTag Biotin HSR Ligation 5X (vial 5)	4 uL								
T4 DNA (vial 6)	2 uL								
Volumen Total	<b>21 uL</b>								

5. Mezclar gentilmente. **NO VORTEXEAR**. Spinear

6. Incubar a

- **25 °C por 30 min en el termociclador (No cerrar la tapa).**

7. Descongelar el **Vial 7** (HSR Stop Solution) a T.A, vortex y spin.

5. Parar la reacción adicionando **2.5 uL** de HSR Stop Solution (**vial 7**) a cada muestra.

Volumen final: 23.5 uL.

6. Mezclar y spinear los 23.5 uL de cada muestra de ligación.

7. Remover **2 uL** de los 23.5 uL de la muestra biotinilada y utilizarlo para el ensayo de ELOSA QC Assay. Volumen total para hibridar: **21.5 uL**

**NOTA:**

- Los 2 uL de muestra biotinilada pueden colocarse máximo en hielo por 6 hr, o bien, a **-20 °C** hasta 2 semanas.
- Los 21.5 uL restante de muestra biotinilada pueden ser colocada en hielo por 6 hr, o bien, a **-20 °C** hasta 2 semanas antes de la hibridación sobre el arreglo de Affymetrix GeneChip miRNA Arrays.

I. HORA en que se guarda la muestra biotinilada (21.5 uL) \_\_\_\_\_  
 Temperatura \_\_\_\_\_ °C

II. HORA de la alícuota para ensayo de ELOSA (2 uL) \_\_\_\_\_  
 Temperatura \_\_\_\_\_ °C

**III. Ensayo de ELOSA**

FECHA \_\_\_\_\_ HORA \_\_\_\_\_

**I. Sensibilización de la placa de ELOSA con ELOSA Spotting Oligos**

1. Descongela el **Vial 9** (ELOSA Spotting Oligos) a T.A, vortex y spin.
2. Hacer la Dilución los ELOSA Spotting Oligos (**Vial 9**) en 1X PBS de acuerdo a la siguiente tabla.

No. de pozos a usar	ELOSA Spotting Oligos (uL)	1X PBS (uL)	Volumen Total requerido (uL)
1	1.5	73.5	75

3. Adicionar **75 uL** del ELOSA Spotting Oligos diluido en cada pozo sobre la placa. Ubicación de Pozos a utilizar:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PBS		PBS								
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

4. Cubrir con una placa adhesiva.

5. Incubar a

- 2-8 °C minimo **16 h** (OVERNIGHT)

Hora de entrada \_\_\_\_\_ Hora de salida \_\_\_\_\_



NOTA: Las placas o pozos pueden ser guardados a **2 - 8 °C por 2 semanas** si son cubiertas con la placa adhesiva para evitar la evaporación.

**Segundo día.**

## II. Lavado y Bloqueo

Fecha \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

1. Descongelar el 5% de BSA en 1X de PBS a T.A. Mezclar gentilmente
2. Retirar los ELOSA Spotting Oligos de la placa expulsando el líquido dentro de la tarja
3. **Lavado 1:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
4. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
5. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita.
6. **Lavado 2:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
7. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
8. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita
9. Secar la placa 5 min sin movimiento.
10. Adicionar **150 uL** de 5% de BSA en 1X PBS en cada pozo.
11. Cubrir la placa con la placa adhesiva
12. Incubar a

• **Temperatura ambiente por 1 hr**

13. Descongelar el **Vial 10** (ELOSA Positive Control) en hielo. Vortex y spin Mantener en hielo.
14. Remover la solución de BSA de bloqueo expulsando el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre una sanita.

## III. Hibridación de las muestras sobre la placa de ELOSA

1. Descongelar la solución de 5X SSC, 0.05%, 0.005% BSA hasta que este transparente. Si es necesario, calentar a 42°C hasta disolver.
2. Todos los componentes para el siguiente Master Mix se vortexea y dar un spin.
3. Hacer el siguiente Master Mix :

Reactivo	Volumen µl x 1 Rxn	Volumen µl x 1 Rxn	Marcar
5X SSC, 0.05% SDS , 0.005% BSA	48 uL		
25 % Dextran Sulfate	2.5 uL		
<b>Total</b>	<b>50.5 uL</b>		

1. Agregar en cada pozo 50.5uL del Master Mix de Hibridación

2. Agregar 2 uL del (**Master Mix de Hibridación**) = Pozos PBS
3. Agregar 2 uL del (**Master Mix de Hibridación**) = Pozo Ctl –
4. Agregar 2 uL del ELOSA Positive Control (**Vial 10**) = Pozo Ctl +
5. Agregar 2 uL de biotin-labeled simple = Pozo Muestra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PBS		PBS								
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

1. Volumen final en cada Pozo = 52.5 uL
2. Cubrir los pozos con la placa adhesiva
3. Incubar a
  - **Temperatura Ambiente por 1 h**

Fecha \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

## II. Unión de SA-HRP

1. Descongelar la SA-HRP a T.A, vortex y spin.
2. Remover el cocktail de hibridación de la placa expulsando el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre una sanita
3. **Lavado 1:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
4. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
5. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita.
6. **Lavado 2:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
7. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
8. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita
9. **Lavado 3:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
10. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
11. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita
12. **Lavado 4:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
13. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
14. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita
15. Secar la placa 5 min sin movimiento
16. Hacer Dilución **1: 8000** de SA- HRP en 5% BSA in 1X PBS.

## Dilución 1:8 000

### Diluciones de SA-HRP

No. de Dilución	Factor de Dilución	Dilución de SA-HRP 1: 8 000 (0.000125)		Marcar
		SA-HRP	5% BSA in 1X PBS (uL)	
1	1/80	2 uL	158 uL	
2	1/ 10	10 uL Dil 1	90 uL	
3	1/ 10  Calculo	10 x <b>X</b> uL Dil 2	90 x <b>X</b> uL	

NOTA: **X**= no. de muestras

Después de cada dilución mezclar vigorosamente y dar spin

16. Adicionar **75 uL** de la dilución 1: 8000 de SA-HRP en cada pozo.  
Cubrir los pozos con la placa adhesiva.

17. Incubar a:

**Temperatura ambiente por 30 min**

### V. Detección de señal

1. Remover la SA-HRP expulsando el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre una sanita.
2. **Lavado 1:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
3. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
4. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita.
5. **Lavado 2:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
6. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
7. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita
8. **Lavado 3:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
9. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
10. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita
11. **Lavado 4:** Lavar con 250 uL con 1X PBS, **0.05% Tween-20** usando la micropipeta. Cubrir con una placa adhesiva.
12. Incubación de 3 min en el sheker a velocidad max (10).
13. Decantar el líquido sobre la tarja y posteriormente sobre la sanita
14. Secar la placa 5 min sin movimiento
15. Remover cualquier burbuja de los pozos con aire a presión o un dispositivo equivalente.
16. Adicionar **100 uL de TMB Sustrate** en cada pozo
17. Cubrir los pozos con una placa adhesiva y cubrir con papel aluminio.

18. Incubar a:

- Temperatura ambiente por **20 min** en oscuridad (max 30 min)

Tipo de Resultado	Cambio	Indica	Lectura (color)
Cualitativo	Color AZUL	Positivo	Foto:

**Cuantificación**

1. Remover la placa adhesiva de la placa de ELOSA.
2. Adicionar 100 **uL** de Stop **Reagent**. El sustrato cambia de azul a color a amarillo.
3. Leer la absorbancia de la placa en un espectro de placa a 450 nm

a) Lectura por arriba de 0.1 del control Negativo es considerada como Positivo
b) Una OD de <b>0.15 - 1.00</b> es considerada como un resultado <b>Positivo</b> = se trabajo adecuadamente = si marco bien Una OD de 0.1 es considerada como Positivo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**IV. Hibridación de los microarreglos**

Fecha \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

1. Tener los microarreglos a temperatura ambiente 30 minutos antes de usarlos. Etiquetarlos.
2. Descongelar a T.A los reactivos utilizados para el Cocktail de Hibridación.
3. Tener 2 termoblocks a 99 °C y 45 °C
4. Precalear el horno de hibridación a 48 °C a 60 rpm
5. Preparar el cocktail de hibridación en un tubo de 1.5 ml como se muestra en la tabla siguiente:

**FORMATO de CHIP 400. Volumen de hibridación 80 uL y 100 uL para llenar completamente**

### Cocktail de hibridación

Reactivo	Volumen μl x 1 Rxn	Volumen μl x Rxn	Marque
<b>2X Hybridization Mix</b> (de GeneChip hyb, wash and Stain Kit)	50 μl		
<b>27.5 % Formamida</b> (Vial 12 )	15 μl		
<b>DMSO</b> (de GenChip Hyb, Wash and Stain Kit)	10μl		
<b>20X Eukaryotic Hybridization Control</b>	5 μl		
<b>Control Oligonucleotide B2</b> , 3nM( de GeneChip Hyb, Wash and Stain Kit)	1.7 μl		
<b>Volumen total</b>	81.7 μl		

4. Vortexear el Cocktail de Hidridación y spin.
5. Colocar en un tubo de 1.5 mL 81.7 uL del cocktail y 21.5 uL de la muestra.
6. Incubar la mezcla (Cocktail + muestra) a 99°C por 5 min en termo block.
7. Incubar la mezcla (Cocktail + muestra) a 45°C por 5 minutos en termo block
8. Centrifugar la mezcla por 1 min a velocidad máxima.
9. Colocar una punta en el orificio superior izquierdo.
10. Inyectar a los chips **80 uL** de la mezcla (de la parte mas superficial del mix).
11. Remover la punta del orificio superior izq.
12. Cubrir el orificio o septa con las etiquetas.
13. Colocar los arreglos en una bandeja
14. Incubar los chips de microarreglos a 48°C y 60 rpm por 16 horas, mas menos 1

Microarreglo	Muestra	Hora de entrada	Hora de salida
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

1)

ID Gen Chip \_\_\_\_\_ Parte \_\_\_\_\_  
 Lote \_\_\_\_\_ Exp \_\_\_\_\_ Muestra \_\_\_\_\_ No. Chip \_\_\_\_\_

2)

ID Gen Chip \_\_\_\_\_ Parte \_\_\_\_\_  
 Lote \_\_\_\_\_ Exp \_\_\_\_\_ Muestra \_\_\_\_\_ No. Chip \_\_\_\_\_

3)

ID Gen Chip \_\_\_\_\_ Parte \_\_\_\_\_  
 Lote \_\_\_\_\_ Exp \_\_\_\_\_ Muestra \_\_\_\_\_ No. Chip \_\_\_\_\_

4)

ID Gen Chip _____ Parte _____
Lote _____ Exp _____ Muestra _____ No. Chip _____

5)

ID Gen Chip _____ Parte _____
Lote _____ Exp _____ Muestra _____ No. Chip _____

6)

ID Gen Chip _____ Parte _____
Lote _____ Exp _____ Muestra _____ No. Chip _____

7)

ID Gen Chip _____ Parte _____
Lote _____ Exp _____ Muestra _____ No. Chip _____

8)

ID Gen Chip _____ Parte _____
Lote _____ Exp _____ Muestra _____ No. Chip _____

***Tercer día.***

Fecha \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

**V. Lavado y Tinción de microarreglos**

1. Preparación de la estación de fluidos

a) Encender la estación de fluidos

b) En el Selector de AGCC, haga clic en el icono de Control de AGCC Fluidics o haga clic en el botón Inicio de Microsoft Windows y seleccione Programas → Affymetrix → Command Console → AGCC Fluidics de control

2. Registrar el microarreglo

3. Remover los Chip del horno de hibridación. Remover las etiquetas

4. Extraer el coctel de Hibridación de cada arreglo y transferirlo a un nuevo tubo o a una placa de 96 pozos de forma ordenada. Guardar el coctel de Hibridación en hielo o a -80° C.

5. Llenar con el arreglo completamente con el Array Holding Buffer

6. Dejar que los arreglos se equilibren a temperatura ambiente antes del Lavado y tinción.

- |                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Los arreglos pueden guardarse en Array Holding Buffer a 4° C por 3 hr antes de iniciar el Lavado y la Tinción</li></ul> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

7. Colocar los viales en las agujas de la estación de fluidos

No. Holder	Color del tubo	Reactivo	Volumen (uL)
1= A	Ambar	Stain Cocktail 1	600 uL
2= B	Claro	Stain Cocktail 2	600 uL
3= C	Claro	Array Holding Buffer	800 uL

8. Lavar y Teñir en la estación de Fluidos 450 usando el Fluidics Script FS450\_0003

Acción	Indicaciones
Post Hyb Wash No. 1	10 ciclos de 2 mix/ciclos con Wash Buffer a 25° C
Post Hyb Wash No. 2	8 ciclos de 15 mix/ciclo con Wash Buffer a 50 °C
1 st Stain	Teñir el arreglo de sondas por 10 min con Stain Cocktail 1 (Posición del Vial 1) a 25° C
Post Stain Wash	10 ciclos de 4 mix/ciclo con Wash Buffer a 30° C
2nd Stain	Teñir el arreglo de sondas por 10 min con Stain Cocktail 2 (Posición del Vial 2) a 25 °C
3er Stain	Teñir el arreglo de sondas por 10 min con Stain Cocktail 1 (Posición del Vial 1) a 25° C
Final Wash	15 ciclos de 4 mix/ ciclo con Wash Buffer A a 35 °C
Array Holding Buffer	Llenar el arreglo con Array Holding Buffer (Posición del vial 3)

9. Checar que no tenga burbujas los arreglos. Si hay burbujas, sacarlas manualmente llenando con más Array Holding Buffer. Si no hay burbujas, colocarles los stikers. Limpiar las superficie de vidrio del arreglo antes de meterla en el Scanner.

10. Introducir los arreglos en el carrusel del Scanner

## Soluciones

### **1 M de Tris-HCl**                  Volumen a preparar = 100 mL

1M de Tris-HCl = 1 000 mM Tris-HCl

PM = 157.56 g/mol

1 M = 1 mol Tris-HCl/ 1L x 0.1 L x 157.56 g/ 1 mol Tris-HCl = 15.79 g de Tris-HCl

- Disolver 15.75 g de Tris-HCl en agua DEPC
- Aforar a 100 mL
- Mezclar y etiquetar
- Checar el pH , pH 8.0

### **1mM de Tris-HCl**                  Volumen a preparar = 50 mL

$V = (50 \text{ mL}) (1 \text{ mM Tris-HCl}) / 1000 \text{ mM Tris-HCl} = 0.05 \text{ mL} = 50 \text{ uL}$

- Transferir Agua DEPC en un tubo falcon de 50 mL
- Quitarle 50 uL de agua DEPC
- Agregar 50 uL de 1 M Tris-HCl
- Mezclar y etiquetar

### **PBS 1X**

Utilizar el Buffer en Solución ya preparado nuevo 1X PBS

### **PBS 1X, 0.02% Tween 20**                  Volumen a preparar = 100 mL

$0.02 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 0.0002 \text{ uL} \times 100 = 0.02\% \text{ Tween-20}$

- Medir 100 mL de PBS 1X
- Quitarle 20 uL de PBS 1X
- Agregarle 20 uL Tween – 20
- Mezclar y etiquetar

### **5% BSA en 1X PBS**                  Volumen a preparar = 40 mL

Pesar 2 g de BSA

Colocar los 2g de BSA en un tubo falcon de 50 mL

Agregar lentamente PBS 1X hasta 40 mL

Vortexear

Hacer alícuotas de 5 mL en tubos falcon de 15 mL

Congelar a -20 °C



**5X SSC, 0.05% SDS, 0.005% BSA**

Volumen a preparar = 10 mL

Primero es necesario hacer 5% SDS y el 20X SSC

**I. 20X SSC pH 5.3**

- 66 g de 20X SSC disolver en 200 mL de agua DEPC
- Medir el pH 5.3 ajustar con HCl
- Llevar a un volumen de 250 mL

Entonces: Volumen a preparar = 125 mL

- 33 g de 20 X SSC disolver en 90 mL de agua DEPC
- Medir el pH 5.3, ajustar con HCl
- Llevar a un volumen de 125 mL (35 mL restantes)

**II. 5% de SDS**

Volumen a preparar = 100 mL

5g SDS / 100 mL = 5 % SDS

En un tubon falcon de 15 mL poner lo siguiente:

2.5 mL 20X SSC  
100 uL 5% SDS  
10 uL de BSA en 1X PBS

- Adicionar agua DEPC hasta 10 mL
- Mezclar
- Hacer alícuotas de 1 mL c/u
- Guardar a -20°C
- No Congelar/descongelar las alícuotas más de 2 veces
- Una vez que la alícuota se ha descongelado guardar a 4°C
- Si se forma precipitado, calentar a 42 °C hasta disolver.
- Usarlo a Temperatura ambiente

**ADICIONAL**

Para realizar diferentes soluciones de 1X PBS al 0.02%, 0.05% y 0.1% de Tween se parte haciendo una solución de 1 PBS, Tween más concentrado.

- **1X PBS, 1% Tween** Vol= 100 mL

Medir 100 mL de PBS 1X  
Quitar 1000 uL o 1 mL  
Agregar 1 mL de Tween-20

Mezclar y etiquetar

- **1x PBS, 0.02% Tween** Vol = 12 mL

Medir 12 mL 1X PBS con una pipeta

Quitar 240 uL

Agregarle 240 de 1X PBS, 1% Tween

Mezclar y etiquetar

- **1X PBS, 0.05% Tween** Vol = 12 mL

Medir 12 mL 1X PBS con una pipeta

Quitar 600 uL

Agregar 600 uL de 1X PBS, 1% Tween

Mezclar y etiquetar

- **1X PBS, 0.1% Tween** Vol= 12 mL

Medir Medir 10.8 1X PBS mL

Agregarle 1.2 mL de 1X PBS, 1% Tween

Mezclar y etiquetar

## Anexo 2. MicroRNAs diferencialmente expresados en células de cérvix.

### a) Expresión de microRNAs de LIEAG vs. tejido de cérvix sano

Probe Set ID	Fold-Change (LIEAG vs. Sano)	p-value(LIEAG vs. Sano)
hsa-miR-18b_st	6.39192	5.31E-05
hsa-miR-25-star_st	6.36145	5.03E-05
hsa-miR-106b-star_st	5.28369	6.88E-05
hsa-miR-1307_st	5.20114	1.42E-05
hsa-miR-500_st	4.93244	0.00016907
hsa-miR-93-star_st	4.20291	5.50E-05
hsa-miR-18a_st	3.5112	0.000119034
hsa-miR-93_st	2.90489	9.72E-05
hsa-miR-106a_st	2.24182	0.000168376
hsa-miR-17_st	2.21176	9.68E-05
hsa-miR-20a_st	2.10173	0.000223621
hsa-miR-424_st	-4.97752	3.93E-05
hsa-miR-337-5p_st	-7.46717	0.000198506
hsa-miR-487b_st	-7.62676	0.000935405
hsa-miR-379_st	-7.96814	0.00100313
hsa-miR-127-3p_st	-8.02683	0.000227536
hsa-miR-485-5p_st	-8.12224	5.32E-06
hsa-miR-381_st	-8.4242	2.73E-05
hsa-miR-542-5p_st	-8.86245	0.000755173
hsa-miR-411_st	-9.74888	0.000375551
hsa-miR-199b-5p_st	-9.8398	1.14E-06
hsa-miR-424-star_st	-10.6506	0.000181096

b) Expresión de microRNAs en Tumores de cérvix vs. tejido de cérvix sano

Probe Set ID	Fold-Change (Tumor vs. Sano)	p-value(Tumor Sano) vs.
hsa-miR-196a_st	13.9698	0.000475949
hsa-miR-34b_st	7.85198	0.00320197
hsa-miR-25-star_st	7.02177	9.35E-06
hsa-miR-501-5p_st	6.75483	6.21E-05
hsa-miR-18b_st	6.67902	1.46E-05
hsa-miR-378-star_st	6.23996	0.00325446
hsa-miR-1307_st	6.07997	1.29E-06
hsa-miR-500_st	5.85452	1.91E-05
hsa-miR-297_st	5.62779	2.97E-06
hsa-miR-362-5p_st	5.50761	0.00176936
hsa-miR-106b-star_st	5.2851	2.63E-05
hsa-miR-188-5p_st	5.18343	0.000317135
hsa-miR-92a-1-star_st	5.16574	0.00170602
hsa-miR-629-star_st	4.94147	0.00176884
hsa-miR-130b_st	4.88273	0.000368943
hsa-miR-25_st	4.84447	4.09E-05
hsa-miR-885-5p_st	4.83038	0.00253099
hsa-miR-20b_st	4.28206	4.70E-05
hsa-miR-637_st	4.26679	1.53E-05
hsa-miR-93-star_st	4.22303	1.98E-05
hsa-miR-1292_st	4.1417	0.002701
hsa-miR-128_st	3.97261	0.00142167
hsa-miR-15b_st	3.95784	0.000384676
hsa-miR-93_st	3.37824	6.55E-06
hsa-miR-18a_st	3.03214	0.000202381
hsa-miR-106a_st	2.91911	1.47E-06
hsa-miR-92b-star_st	2.77368	0.00276376
hsa-miR-1826_st	2.69345	0.000636612
hsa-miR-20a_st	2.64972	2.56E-06
hsa-miR-17_st	2.5971	3.11E-06
hsa-miR-181b_st	2.45279	0.0033969
hsa-let-7f-1-star_st	2.35404	0.0017335
hsa-miR-574-3p_st	-3.32416	0.00231881
hsa-miR-494_st	-3.47652	0.000698975
hsa-miR-29a_st	-3.88514	0.00153001
hsa-miR-184_st	-4.19922	0.00177853
hsa-miR-127-5p_st	-4.22963	0.000620053
hsa-miR-140-3p_st	-5.1981	0.00272988
hsa-miR-145_st	-5.37576	0.000185694
hsa-miR-424_st	-6.09509	2.73E-06
hsa-miR-30a_st	-6.75598	4.33E-05
hsa-miR-411_st	-6.98406	0.000841538
hsa-miR-485-5p_st	-7.61591	2.75E-06
hsa-miR-382_st	-7.74581	0.00229489
hsa-miR-143-star_st	-7.99887	0.000894457
hsa-miR-424-star_st	-8.90549	0.000184311
hsa-miR-134_st	-9.11366	0.00132152
hsa-miR-542-5p_st	-9.26751	0.000281541

hsa-miR-199b-5p_st	-9.3807	4.78E-07
hsa-miR-376c_st	-10.4613	0.000226503
hsa-miR-455-5p_st	-11.1427	0.000716695
hsa-miR-375_st	-11.3169	0.00110473
hsa-miR-503_st	-11.68	0.00208747
hsa-miR-381_st	-11.8878	1.12E-06
hsa-miR-127-3p_st	-12.5298	7.95E-06
hsa-miR-487b_st	-15.8157	1.15E-05
hsa-miR-100_st	-16.6546	3.30E-06
hsa-miR-337-5p_st	-16.9042	7.59E-07
hsa-miR-497_st	-20.1787	0.000108273
hsa-miR-379_st	-23.6327	2.52E-06

c) Expresión de microRNAs en Líneas celulares derivadas de cérvix vs. tejido de cérvix sano

Probe Set ID	Fold-Change(Línea Celulares vs. Sano)	p-value(Líneas Celulares vs. Sano)
hsa-miR-196a_st	48.8991	1.32E-07
hsa-miR-25-star_st	36.5213	4.28E-12
hsa-miR-181a-2-star_st	33.2598	6.39E-07
hsa-miR-92a-1-star_st	32.4784	2.50E-09
hsa-miR-18b_st	23.4994	6.73E-11
hsa-miR-1303_st	22.2782	3.49E-06
hsa-miR-1307_st	21.3166	1.49E-12
hsa-miR-550-star_st	20.5319	2.08E-08
hsa-miR-941_st	20.416	2.15E-09
hsa-miR-615-3p_st	20.2819	4.08E-08
hsa-miR-18a-star_st	18.9634	1.98E-08
hsa-miR-93-star_st	17.4377	3.06E-12
hsa-miR-1308_st	17.2653	2.83E-07
hsa-miR-30a-star_st	17.0976	4.55E-07
hsa-miR-27a-star_st	17.0638	0.00107557
hsa-miR-30c-2-star_st	15.29	9.61E-09
hsa-miR-1180_st	15.0514	7.12E-08
hsa-miR-183_st	14.7862	6.50E-05
hsa-miR-23a-star_st	14.304	0.00383232
hsa-miR-18a_st	14.1234	3.59E-12
hsa-miR-1246_st	14.1181	0.00373029
hsa-miR-501-5p_st	12.6303	3.55E-08
hsa-miR-29b-1-star_st	12.5886	3.92E-05
hsa-miR-106b-star_st	12.207	1.10E-09
hsa-miR-183-star_st	12.1783	1.35E-06
hsa-miR-105_st	12.0778	0.00564027
hsa-miR-421_st	11.3105	6.23E-08
hsa-miR-629-star_st	11.1138	8.83E-07
hsa-miR-31-star_st	9.92301	0.000323349
hsa-miR-1254_st	9.60396	2.04E-08
hsa-miR-330-3p_st	9.20885	1.02E-06
hsa-miR-760_st	8.98961	9.96E-06
hsa-miR-378-star_st	8.96801	5.88E-05
hsa-miR-33b-star_st	8.69319	5.94E-06
hsa-miR-92b_st	8.20892	8.61E-09
hsa-miR-551b-star_st	7.85116	4.45E-05
hsa-miR-769-3p_st	7.71005	5.86E-05
hsa-miR-301a_st	7.4785	7.13E-06
hsa-miR-500_st	7.40309	1.08E-07
hsa-miR-550_st	7.37226	1.66E-05
hsa-miR-720_st	7.28912	0.000506707
hsa-miR-589-star_st	7.26172	5.87E-06
hsa-miR-182_st	6.99175	7.84E-05
hsa-miR-138-1-star_st	6.74056	0.000187631
hsa-miR-128_st	6.43941	3.17E-06
hsa-miR-663b_st	6.06715	9.15E-05
hsa-miR-1292_st	6.00647	2.29E-05
hsa-miR-935_st	5.70298	0.00375866

hsa-miR-93_st	5.57934	5.09E-10
hsa-miR-629_st	5.57803	0.000102811
hsa-miR-1285_st	5.55073	0.000406812
hsa-miR-25_st	5.34091	7.95E-07
hsa-miR-296-3p_st	5.3178	0.00523237
hsa-miR-99b-star_st	5.2672	0.000104972
hsa-miR-19a_st	5.18623	0.00183988
hsa-miR-106a_st	5.13228	1.49E-11
hsa-miR-17_st	5.05857	4.78E-12
hsa-miR-181b_st	4.74861	3.32E-07
hsa-miR-1274a_st	4.62056	0.000531255
hsa-miR-92b-star_st	4.50219	2.74E-06
hsa-miR-1275_st	4.32592	5.70E-05
hsa-miR-425_st	4.21088	8.70E-06
hsa-miR-198_st	4.09805	0.00731589
hsa-miR-30e-star_st	4.08287	0.00111966
hsa-miR-20a_st	3.81525	2.46E-10
hsa-miR-7-1-star_st	3.81232	0.000640908
hsa-miR-20b_st	3.69815	1.06E-05
hsa-miR-188-5p_st	3.55113	0.000480475
hsa-miR-766_st	3.45114	0.000433616
hsa-miR-671-3p_st	3.44105	0.000695924
hsa-miR-484_st	3.43481	0.00655118
hsa-miR-106b_st	3.41757	7.75E-08
hsa-miR-423-3p_st	3.40956	1.07E-06
hsa-miR-362-5p_st	3.16983	0.00667425
hsa-miR-532-3p_st	3.09437	0.00170578
hsa-miR-339-5p_st	3.02279	0.000526927
hsa-miR-15b_st	2.99583	0.000406134
hsa-miR-744_st	2.89899	0.000160809
hsa-miR-197_st	2.84213	0.000156399
hsa-miR-331-5p_st	2.81905	0.00765256
hsa-miR-324-3p_st	2.77539	0.00412406
hsa-miR-943_st	2.74287	0.00431993
hsa-miR-130b_st	2.73742	0.00311096
hsa-miR-1304_st	2.65798	0.000463768
hsa-miR-671-5p_st	2.65608	0.0020263
hsa-miR-1260_st	2.64295	0.00723646
hsa-miR-1280_st	2.60753	0.00717227
hsa-miR-663_st	2.55782	0.00492419
hsa-miR-1226_st	2.55602	0.00524817
hsa-miR-1826_st	2.48976	0.00014808
hsa-miR-92a_st	2.39791	0.00301366
hsa-miR-324-5p_st	2.30836	0.000111111
hsa-miR-589_st	2.2504	0.007453
hsa-miR-30c_st	2.19702	0.00233222
hsa-miR-17-star_st	2.11361	0.00851187
hsa-miR-652_st	2.05925	0.0032981
hsa-miR-636_st	2.03546	0.00249744
hsa-miR-331-3p_st	2.03011	0.00690837
hsa-miR-768-5p_st	-2.18191	0.0012192

hsa-miR-654-5p_st	-2.28865	0.00720185
hsa-miR-329_st	-2.29132	0.00476088
hsa-miR-1270_st	-2.36924	0.000437115
hsa-let-7c_st	-2.51818	0.00415675
hsa-miR-27b_st	-2.53457	0.00011508
hsa-miR-377-star_st	-2.69179	0.000489515
hsa-miR-489_st	-2.71883	0.00457339
hsa-let-7f_st	-2.77582	0.00134828
hsa-miR-26a_st	-2.89228	9.15E-08
hsa-miR-504_st	-3.13252	0.000782
hsa-miR-654-3p_st	-3.23958	0.0036707
hsa-let-7g_st	-3.25317	0.000163939
hsa-miR-455-3p_st	-3.33645	0.00651012
hsa-miR-139-3p_st	-3.7586	0.00258863
hsa-miR-125b_st	-3.77887	0.000447606
hsa-miR-424-star_st	-3.79556	0.00255612
hsa-miR-299-5p_st	-3.79778	0.000107408
hsa-miR-30e_st	-3.95692	0.00194329
hsa-miR-1247_st	-3.97566	0.0040237
hsa-miR-424_st	-4.2416	2.85E-06
hsa-miR-29b-2-star_st	-4.29476	0.00251281
hsa-miR-874_st	-4.44587	0.00451622
hsa-miR-184_st	-4.79207	7.44E-05
hsa-miR-29c_st	-4.83824	0.000225958
hsa-miR-768-3p_st	-5.00724	6.00E-08
hsa-miR-409-5p_st	-5.0987	0.000115693
hsa-miR-299-3p_st	-5.22029	5.79E-05
hsa-miR-574-3p_st	-5.63678	2.85E-06
hsa-miR-154_st	-5.76997	2.12E-05
hsa-miR-370_st	-5.90846	0.000404906
hsa-miR-187_st	-6.05254	0.00836252
hsa-miR-542-5p_st	-6.0957	0.000246266
hsa-miR-664-star_st	-6.47498	2.27E-05
hsa-miR-495_st	-6.52412	2.13E-05
hsa-miR-127-5p_st	-6.54789	1.44E-06
hsa-miR-494_st	-6.608	1.61E-07
hsa-miR-432_st	-6.65061	0.000875564
hsa-miR-433_st	-7.20826	4.47E-05
hsa-miR-140-3p_st	-7.33794	4.00E-05
hsa-miR-10a_st	-7.72199	0.00316425
hsa-miR-214-star_st	-10.0567	3.59E-05
hsa-miR-455-5p_st	-11.1433	6.49E-05
hsa-miR-199b-5p_st	-12.8123	1.07E-09
hsa-miR-411_st	-15.9421	5.93E-07
hsa-miR-451_st	-16.6254	8.23E-05
hsa-miR-143-star_st	-18.7164	7.80E-07
hsa-miR-485-5p_st	-18.7798	1.02E-10
hsa-miR-486-5p_st	-21.8904	0.000525777
hsa-miR-381_st	-21.9814	5.36E-10
hsa-miR-146b-5p_st	-25.3683	3.04E-10
hsa-miR-10b_st	-25.5545	8.77E-05



hsa-miR-200b_st	-26.9662	0.00322801
hsa-miR-139-5p_st	-28.2255	3.97E-05
hsa-miR-203_st	-29.8295	0.00217501
hsa-miR-376c_st	-30.9721	4.66E-08
hsa-miR-134_st	-39.278	1.09E-07
hsa-miR-375_st	-39.6759	3.48E-07
hsa-miR-337-5p_st	-43.3341	9.31E-11
hsa-miR-382_st	-43.514	5.54E-08
hsa-miR-409-3p_st	-44.0259	7.14E-10
hsa-miR-126_st	-45.4426	6.18E-09
hsa-miR-708_st	-74.9793	7.01E-08
hsa-miR-195_st	-75.7796	6.52E-08
hsa-miR-487b_st	-84.5059	9.21E-11
hsa-miR-146a_st	-91.5235	9.41E-13
hsa-miR-150_st	-129.443	1.40E-13
hsa-miR-497_st	-150.525	1.35E-09
hsa-miR-199a-5p_st	-163.592	1.25E-06
hsa-miR-379_st	-185.739	6.31E-12
hsa-miR-127-3p_st	-357.882	2.70E-14
hsa-miR-214_st	-374.804	4.34E-07
hsa-miR-199a-3p_st	-420.249	3.94E-07
hsa-miR-199b-3p_st	-449.945	2.88E-07
hsa-miR-143_st	-2806.96	5.18E-17
hsa-miR-145_st	-3198.57	8.91E-19

**Anexo 3. Lista de microRNAs de acuerdo a la clasificación originada del *cluster* jerárquico.**

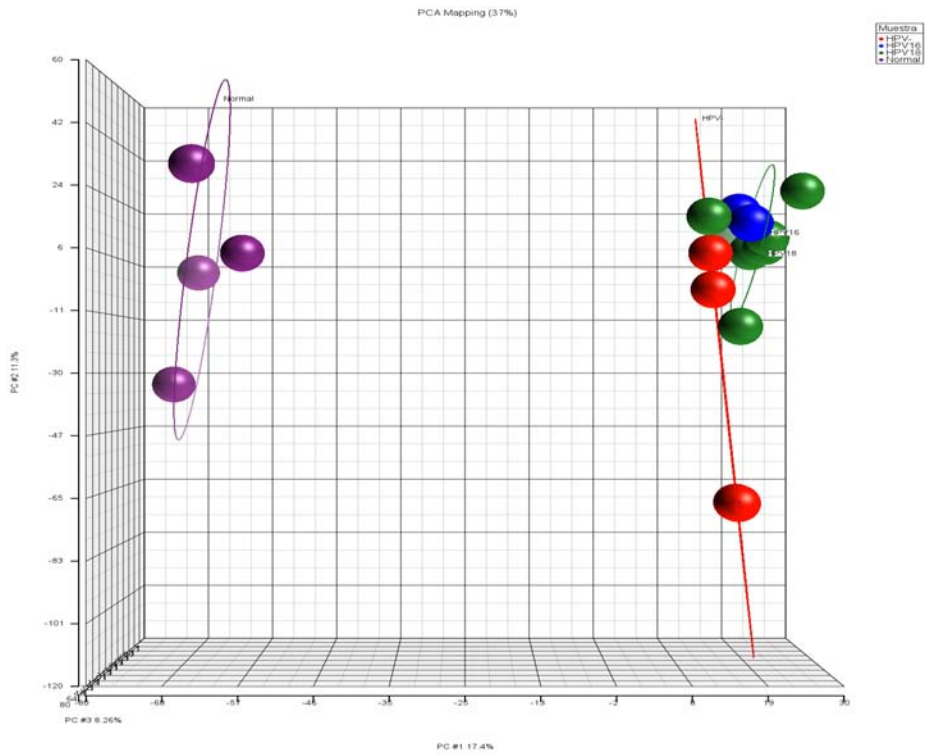
Agrupación	No. Sondas	No. microRNA hsa	microRNA
1	142	17	hsa-miR-145_st hsa-miR-143_st hsa-miR-127-3p_st hsa-miR-379_st has-miR-199a-5p_s hsa-miR-199a- 5p_st hsa-miR-497_st hsa-miR-150_st hsa-miR-487b_st hsa-miR-195_st hsa-miR-126_st hsa-miR-409-3p_st hsa-miR-337-5p_st hsa-miR-382_st hsa-miR-134_st hsa-miR-375_st hsa-miR-376c_st hsa-miR-381_st
2	301	38	hsa-miR-196a_st hsa-miR-25-star_st hsa-miR-92a-1-star_st hsa-miR-18b_st hsa-miR-1303_st hsa-miR-1307_st hsa-miR-941_st hsa-miR-550-star_st hsa-miR-615-3p_st hsa-miR-93-star_st hsa-miR-1180_st hsa-miR-18a_st hsa-miR-106b-star_st hsa-miR-501-5p_st hsa-miR-183-star_st hsa-miR-421_st hsa-miR-629-star_st hsa-miR-330-3p_st hsa-miR-378-star_st hsa-miR-92b_st hsa-miR-551b-star_st hsa-miR-500_st hsa-miR-720_st

			hsa-miR-1292_st hsa-miR-25_st hsa-miR-93_st hsa-miR-106a_st hsa-miR-181b_st hsa-miR-17_st hsa-miR-92b-star_st hsa-miR-425_st hsa-miR-20b_st hsa-miR-20a_st hsa-miR-188-5p_st hsa-miR-362-5p_st hsa-miR-130b_st hsa-miR-1826_st hsa-miR-297_st
3	38	5	hsa-miR-379_st hsa-miR-497_st hsa-miR-100_st hsa-miR-337-5p_st hsa-miR-487b_st
4	6	1	hsa-miR-150
6	157	22	hsa-miR-145_st hsa-miR-143_st hsa-miR-127-3p_st hsa-miR-379_st hsa-miR-199a-5p_st hsa-miR-497_st hsa-miR-150_st hsa-miR-487b_st hsa-miR-195_st hsa-miR-126_st hsa-miR-409-3p_st hsa-miR-337-5p_st hsa-miR-382_st hsa-miR-134_st hsa-miR-375_st hsa-miR-376c_st hsa-miR-381_st hsa-miR-485-5p_st hsa-miR-143-star_st hsa-miR-411_st hsa-miR-199b-5p_st hsa-miR-455-5p_st
7	126	23	hsa-miR-196a_st hsa-miR-25-star_st hsa-miR-92a-1-star_st

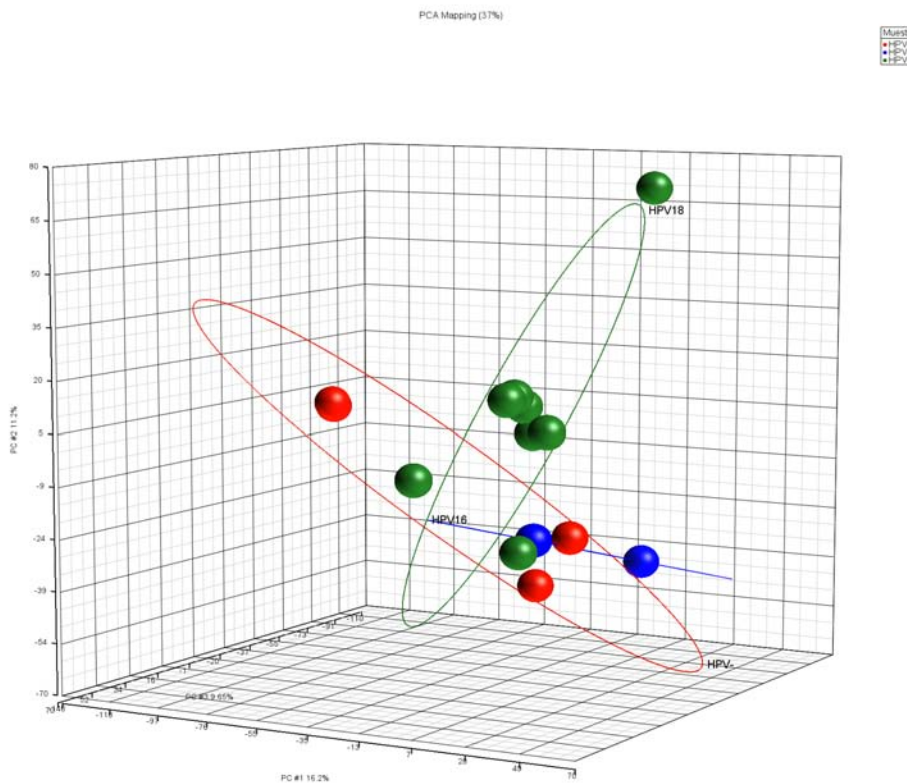
			hsa-miR-18b_st hsa-miR-1303_st hsa-miR-1307_st hsa-miR-941_st hsa-miR-550-star_st hsa-miR-615-3p_st hsa-miR-93-star_st hsa-miR-1180_st hsa-miR-18a_st hsa-miR-106b-star_st hsa-miR-501-5p_st hsa-miR-183-star_st hsa-miR-421_st hsa-miR-629-star_st hsa-miR-330-3p_st hsa-miR-378-star_st hsa-miR-92b_st hsa-miR-551b-star_st hsa-miR-500_st hsa-miR-720_st
--	--	--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## Anexo 4. Análisis de expresión por la la presencia de VPH

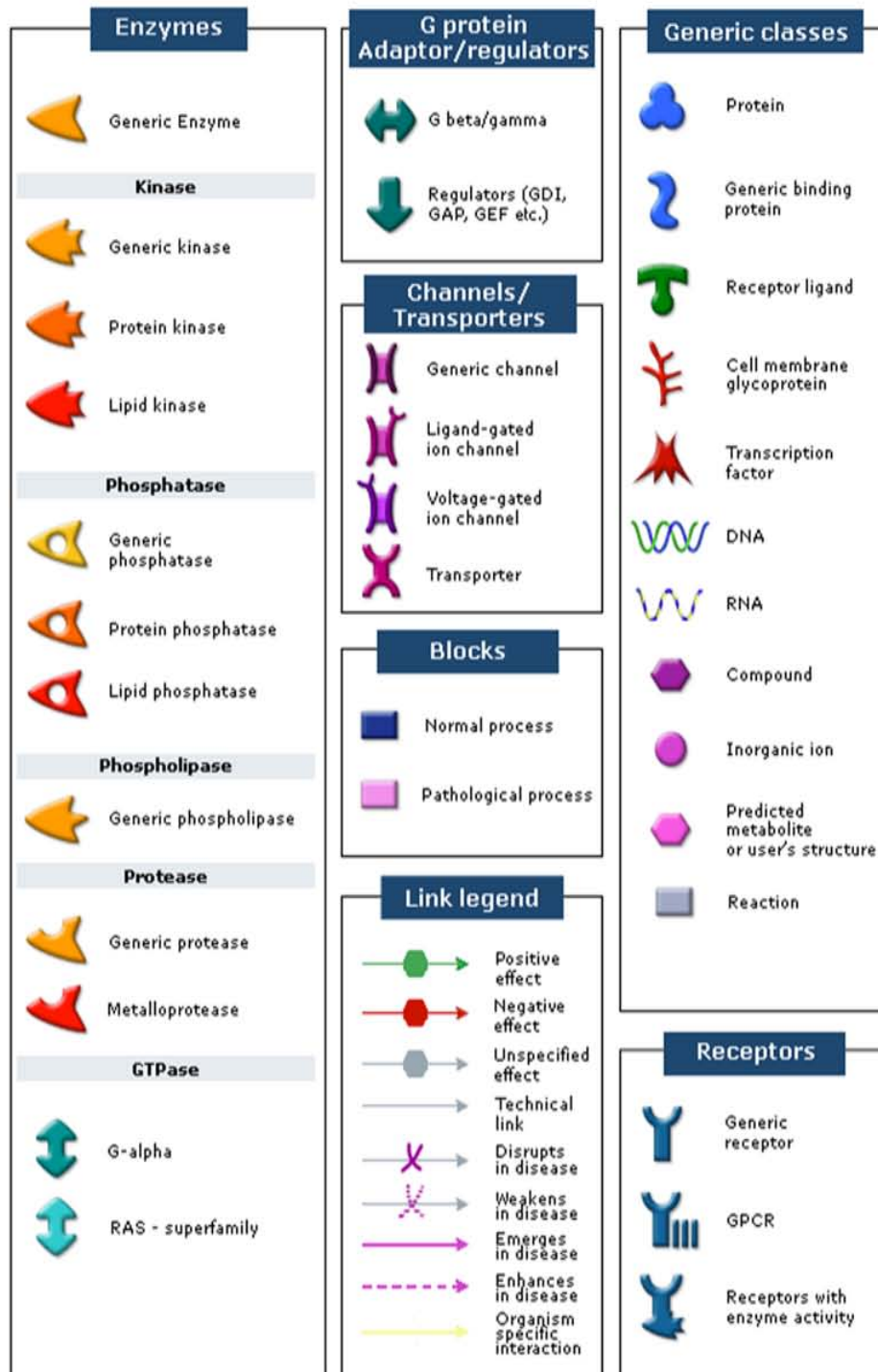
a) Análisis de Componentes Principales por la presencia de VPH en líneas celulares derivadas de cérvix vs. tejido de cervix sano.



b) Análisis de Componentes Principales por la presencia de VPH (16 y 18) en líneas celulares derivadas de cérvix vs. VPH negativas.



## Anexo 5. Símbolos de vías



## Anexo 6. Artículo Requisito

Int J Clin Exp Pathol 2014;7(4):1389-1401  
[www.ijcep.com](http://www.ijcep.com) /ISSN:1936-2625/IJCEP1401055

### Original Article

## Heterogeneity of microRNAs expression in cervical cancer cells: over-expression of miR-196a

Vanessa Villegas-Ruiz<sup>1\*</sup>, Sergio Juárez-Méndez<sup>2</sup>, Oscar A Pérez-González<sup>2</sup>, Hugo Arreola<sup>1</sup>, Lucero Paniagua-García<sup>1</sup>, Miriam Parra-Melquiadez<sup>1</sup>, Raúl Peralta-Rodríguez<sup>1</sup>, Ricardo López-Romero<sup>1</sup>, Alberto Monroy-García<sup>3</sup>, Alejandra Mantilla-Morales<sup>4</sup>, Guillermo Gómez-Gutiérrez<sup>5</sup>, Edgar Román-Bassaure<sup>6</sup>, Mauricio Salcedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Oncología Genómica, UIMEO, Hospital de Oncología, CMN-SXXI, IMSS, Mexico; <sup>2</sup>Laboratorio de Oncología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, SS, México; <sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología y Cáncer, UIMEO, Hospital de Oncología, CMN-SXXI, IMSS, Mexico; <sup>4</sup>Departamento de Patología, Hospital de Oncología, CMN-SXXI, IMSS, Mexico; <sup>5</sup>Clínica de Displasia, Unidad de Oncología, Hospital de México, SS, México; <sup>6</sup>Servicio de Oncología, Hospital General de México, SS, México. \*During this work Vanessa Villegas-Ruiz was a fellowship at Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, C.P. 044510 Coyoacán, Distrito Federal, México.

Received January 17, 2014; Accepted February 15, 2014; Epub March 15, 2014; Published April 1, 2014

**Abstract:** In recent years, the study of microRNAs associated with neoplastic processes has increased. Patterns of microRNA expression in different cell lines and different kinds of tumors have been identified; however, little is known about the alterations in regulatory pathways and genes involved in aberrant set of microRNAs. The identification of these altered microRNAs in several cervical cancer cells and potentially deregulated pathways involved constitute the principal goals of the present study. In the present work, the expression profiles of cellular microRNAs in Cervical Cancer tissues and cell lines were explored using microRNA microarray, Affymetrix. The most over-expressed was miR-196a, which was evaluated by real time PCR, and HOXC8 protein as potential target by immunohistochemistry assay. One hundred and twenty three human microRNAs differentially expressed in the cell tumor, 64 (52%) over-expressed and 59 (48%) under-expressed were observed. Among the microRNAs over-expressed, we focused on miR-196a; at present this microRNA is poorly studied in CC. The expression of this microRNA was evaluated by qRT-PCR, and HOXC8 by immunohistochemistry assay. There is not a specific microRNA expression profile in the CC cells, neither a microRNA related to HPV presence. Furthermore, the miR-196a was over-expressed, while an absence of HOXC8 expression was observed. We suggest that miR-196a could be played as oncomiR in CC.

**Keywords:** Cervical cancer, microRNAs, miR-196a, HOXC8

### Introduction

microRNAs are small non-coding RNA of 18-25 nucleotides (nt) found in the genome and are transcribed and processed by microRNA biogenesis machinery to generate the mature microRNA which is carried to its target (mRNA) [1-4]. These tiny regulators of gene expression have the ability to bind totally or partially to 3' UTR regions of mRNA [5]. In mammals, there are partial complementary between microRNA and mRNA, consequently the translation of mRNA target is repressed [1, 4-6].

At present, microRNA expression patterns have been determined in different tumors, leading to

elucidation of its role in several cellular processes in cancer research [7-10]. In addition, new approaches for molecular signature by high throughput have given coverage to the management of oncology patients in terms of diagnosis, identification of cancer of unknown primary origin, prognosis, and therapy.

Cervical cancer (CC) is one of most common cancer in women worldwide, including Mexico, with 529,409 new cases and 274,883 deaths per year, representing a major public health problem [11]. The most important factor associated to CC development is the persistent Human Papillomavirus Virus (HPV) infection. The oncogenic role of HPV oncogenes that inter-

## microRNA expression in cervical cancer

**Table 1.** Differential microRNAs among CC tissues and CC cell lines

Comparison	Number of Probe set	Number of hsa-microRNAs	Number of microRNAs Over-expressed	Number of microRNAs Under-expressed
Tumor vs. Healthy	512	60	32	28
Cell Lines vs. Healthy	1247	174	98	76
Tumor and Cell Lines vs. Healthy	942	123	64	59

act with pRb and p53 tumor suppressor proteins is widely known; however, HPV is not sufficient for CC development [12].

Currently, reports on microRNAs in CC cells have shown substantial differences with contradictory results [13-19]. For instance, under-expressed of miR-145 has been reported in many studies of cancer including CC [13, 16-18], different from an increased in miR-145 expression reported in CC by another author [14]. These differences could arise by microRNAs variability expression, technological platforms used, the number of microRNAs screened, and characteristics of sample study. In addition, the knowledge of altered regulatory pathway in CC cells has been poorly studied. In the present work, the expression profile of cellular microRNAs in CC cells was explored by means of Affymetrix GeneChip miRNA Array. The most significantly over-expressed was the miR-196a, which was evaluated by real time PCR, and HOXC8 protein was evaluated by immunohistochemistry assay.

### Material and methods

#### *Cervical cell culture*

The human cervical cancer cell lines included were as follows: CaSki and SiHa (HPV16); HeLa, CaLo, INBL, Rova, ViPa, C4-I, and MS-751 (HPV18); C33A, ViBo and keratinocyte cell line HaCaT (HPV-negative). These cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA USA) supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. All cells were cultured at 70-80% of confluence. In addition, cells were cultured in slide chamber with 50-60% of confluence for immunocytochemistry.

#### *Tissues samples*

All tissues used in this study were obtained from Gynecology and Oncology Department of

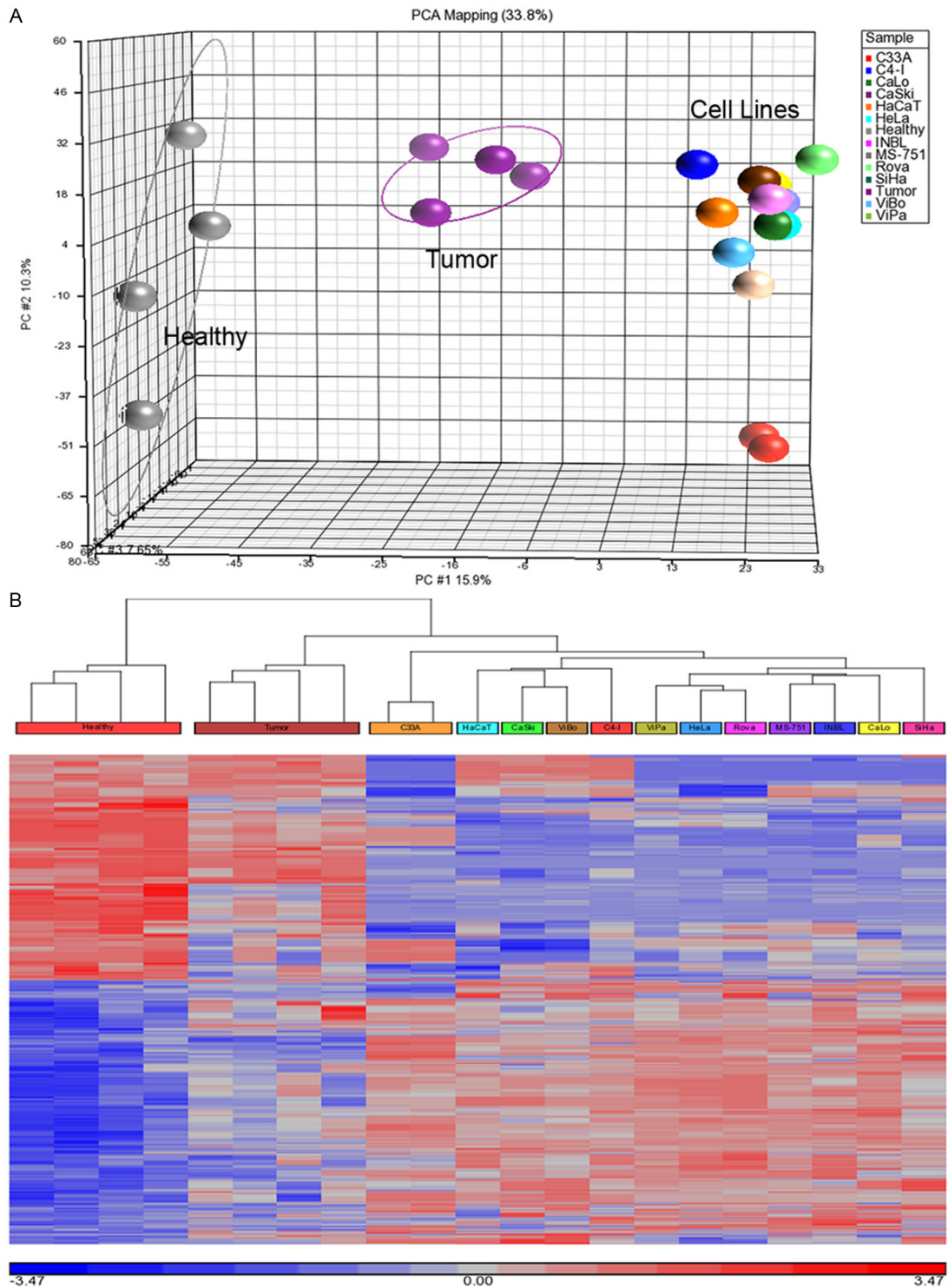
the General Hospital of Mexico, SS. Each tissue specimen obtained Ethical Committee approval and informed consent was obtained from every patient. We used healthy cervical tissue obtained from patients subjected to hysterectomy by uterine myomatosis. Inclusion criteria were as follows: no previous cervical surgery (such as the loop electrosurgical excision procedure or cone biopsy); no HPV infection; no hormonal treatment, and last three negative Pap smears. In addition, 10 Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions (LSIL), 10 High-grade Squamous Intraepithelial Lesions (HSIL) and 25 cervical carcinomas were collected and classified according FIGO nomenclature. The biopsies obtained were divided into two fragments immediately after surgery. One fragment was stored in RNAlater (Qiagen, Valencia, CA, USA) at -70°C until nucleic acids isolation. The remaining fragment was fixed in 4% formaldehyde for two days and then was paraffin-embedded. The paraffin blocks were sliced and stained with Hematoxylin-Eosin (H&E) for histological examination and construction of the tissue array.

#### *HPV typing and sequencing*

Genomic DNA was isolated from cell line and tissue samples using the Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA quantity and purity was measured with a Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. DNA integrity was checked by 1% agarose gel electrophoresis. Each DNA sample was subjected to HPV typing by PCR using GP5+/GP6+ primers [20]. 100 ng of DNA was subjected to 40 amplification cycles with the following steps: 5 min at 94°C for pre-denaturation, 1 min at 94°C, 1 min at 44°C, 1 min at 72°C, and 5 min at 72°C as final extension step. The PCR products were purified in Wizard SV gel and the PCR Clean-up System Kit (Promega). Sequencing was performed by Big Dye Terminator Kit v3.1 (Applied Biosystems,



microRNA expression in cervical cancer



**Figure 1.** Differential microRNA expressed in cervical cancer cells. A. Principal Component Analysis (PCA) of microRNAs (gray balls: healthy cervical tissues; purple balls: tumor cervical tissues; the remaining balls represent each cervical cancer cell line). MicroRNAs expression patterns suggest a differential microRNAs expression in tumor cervical tissues and cancer cell lines compared with healthy cervical tissues; B. microRNAs expression heat map depicting microRNAs differentially in cervical cancer cells with fold change  $>2$  and  $<-2$ , FDR 0.05. Red color represents over-expression and blue color under-expression.

## microRNA expression in cervical cancer

**Table 2.** miRNAs reported as over-expressed and under-expressed in cervical cells

microRNA	Expression in the present study	Expression in other studies
miR-196a	Over-expressed	Over <sup>*,+,∞</sup>
miR-18b	Over-expressed	--
miR-183	Over-expressed	Over <sup>*,+</sup>
miR-500	Over-expressed	--
miR-18a	Over-expressed	Over <sup>*,+</sup>
miR-25	Over-expressed	Over <sup>*,+,°</sup>
miR-182	Over-expressed	Over <sup>*,+,</sup> , Under <sup>**</sup>
miR-20b	Over-expressed	Under <sup>*</sup>
miR-106a	Over-expressed	Over <sup>*,+,</sup> , Under <sup>∞</sup>
miR-20a	Over-expressed	Over <sup>*,++</sup>
miR-125b	Under-expressed	Under <sup>†</sup> , Over <sup>*,++</sup>
miR-10b	Under-expressed	Under <sup>*,+</sup>
miR-143	Under-expressed	Under <sup>*,+,+,+,∞</sup>
miR-337-5p	Under-expressed	--
miR-199a-5p	Under-expressed	Under <sup>*,+,+,∞</sup> , Over <sup>°</sup>
miR-199b-3p	Under-expressed	Under <sup>†</sup>
miR-127-3p	Under-expressed	Over <sup>°</sup>
miR-214	Under-expressed	Under <sup>†</sup> Over <sup>°</sup>
miR-379	Under-expressed	--
miR-145	Under-expressed	Under <sup>*,+,+,∞</sup> Over <sup>°</sup>

\*Lui et al. 2007; \*\*Muralidhar et al. 2007; †Martínez et al. 2008; °Wang et al. 2008, †Lee et al. 2008, ∞Pereira et al. 2010.

Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and analysed in a 3100 ABI PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequences were aligned and compared with National Center for Biotechnology Information databases.

### RNA isolation and quality control

The tissue samples were disrupted with TissueLyser (Qiagen) from 1 to 3 min. Total RNA was obtained with the miRvana Isolation Kit (Ambion, Life Technologies, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity was measured using Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer and RNA quality was analysed with Agilent RNA 6000 Nano in Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). In this study, we used only total RNA with RNA Integrated Number (RIN) >8.

### Affymetrix miRNA microarray assay

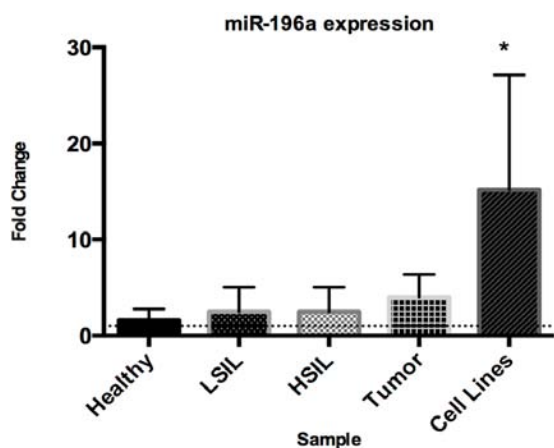
We used the GeneChip miRNA Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). This chip contains miR-

NAs and pre-miRNAs of the Sanger miRNA database v11 of 71 organisms, such as: human, mouse, rat, dog, and monkey, among others. Each array contains 45,930 probes comprising of 7,788 miRNAs probe sets as quadruplicates and remaining probes as internal controls. The assay was started with 1 µg of total RNA. Total RNA samples were first extended with the Poly (A)-Tailing Reaction followed by the Biotin Labelling Reaction employing FlashTag Biotin HSR RNA Labelling Kit (Genisphere, Hatfield, PA, USA). The labelling process was checked with Enzyme Linked Oligosorbent Assay QC (ELOSAs). Biotin-labelled total RNA samples were hybridized to the arrays, washed, and stained according to the manufacturer's instructions. Microarrays were scanned using GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). Median fluorescent intensity was obtained with Affymetrix GeneChip Command Console software through Command Console Library File miRNA-1\_0\_2Xgain.

### miRNA microarray analysis and target predictor analysis of miRNA

miRNA microarray data analysis was performed in three stages. First, the data were analysed for quality control purposes using free miRNA QC Tool software (Affymetrix). In this analysis, the background correction was adjusted by means of Robust Multi-chip Average (RMA). Subsequently, the data were log<sub>2</sub>-transformed, summarized, and normalized with Median-polish and Quantile, respectively. In the second stage, microarray analysis was achieved by means of CEL files of Partek Genomics Suite v6.6 software. Probe set were summarized by means of Median Polish, Quantile normalization. Background noises correction was performed by means of RMA, finally the data were transformed by Log<sub>2</sub>. The next step was inspection of miRNA expression by means of Principal Component Analysis (PCA). The final stage consisted of identifying differential microRNA expression in the samples by mean of Analysis of Variance (ANOVA) with the healthy cervical tissues as baseline. Moreover, CC cell lines, and CC tumors were compared also against healthy cervical tissue by geometric least squares model. The significant microRNA expressed were selected by means of cut-off based on fold change >2, <-2, and a False Discovery Ration (FDR) <0.05 (Table 1). Finally, the hierarchical cluster of significant expressed

## microRNA expression in cervical cancer



**Figure 2.** miR-196a increased expression in cervical cells. Tiny expression change of miR-196a in LSIL and HSIL with respect to healthy tissues, while a tendency of increased expression of miR-196 in cervical carcinomas was shown. As expected, a significant over-expression of miR-196a in CC cell lines was observed. X-axis corresponds to the samples, Y-axis to the fold change of miR-196a in arbitrary units. (\*) indicates that the expression of miR-196a level was significantly higher in CC cell lines.

microRNAs was obtained by means of Euclidian method (dissimilarity of samples).

For target predictor analysis of miR-196a we used different database as Diana-microT v5.0, TarBase v6.0, MirTarget2 v2, TargetScan v6.2, microRNA.org, PicTar and miRecords for predicted miRNA-196a potential target. In addition, we used GeneGo MetaCore (Thompson Reuters) to build the microRNA network to known predicted targets and regulator genes of miR-196a. We employed 50 interactions to generate a network; thus we were able to identify genes upstream and downstream of microRNA to know the features and network of specific microRNA and target microRNA. For a more detailed GeneGo MetaCore analysis, go to <http://www.genego.com/>.

### miRNA quantitative RT-PCR

mRNA was subject to quantitative PCR using the TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit and miRNA Assay (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. TaqMan microRNA assay hsa-miR-196 and small nucleoli RNU6B was used as small housekeeping RNA. These housekeeping genes not showed variations. In brief, the 7.5-mL master mix contained 10 ng of total RNA, 3.0 mL 5X RT primer, 1.5 mL 10X Reverse transcription buffer, 0.15

mL of 100 mM dNTP 1.0 mL, MultiScribe Reverse Transcriptase 50 U/mL, 0.19 mL RNAase Inhibitor 20 U/mL, and free RNase water. The mix reaction was incubated for 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, and for 5 min at 85°C. A 10-mL mix reaction of real-time PCR contained 1.33 mL RT product, 0.5 mL TaqMan Small RNA Assay (20X), 5.0 mL TaqMan Universal Master Mix II with UNG and 3.17 mL free RNase water. The mix reaction was incubated for 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 amplification cycles for 15 sec at 95°C and for 60 sec at 60°C. Relative quantification was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, where  $\Delta Ct = Ct_{(miR-196a)} - Ct_{(RNU6B)}$  and  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(Cell\ line)} - \Delta Ct_{(Average\ Normal)}$  [21].

### Immunodetection of HOXC8 in cervical cancer cells

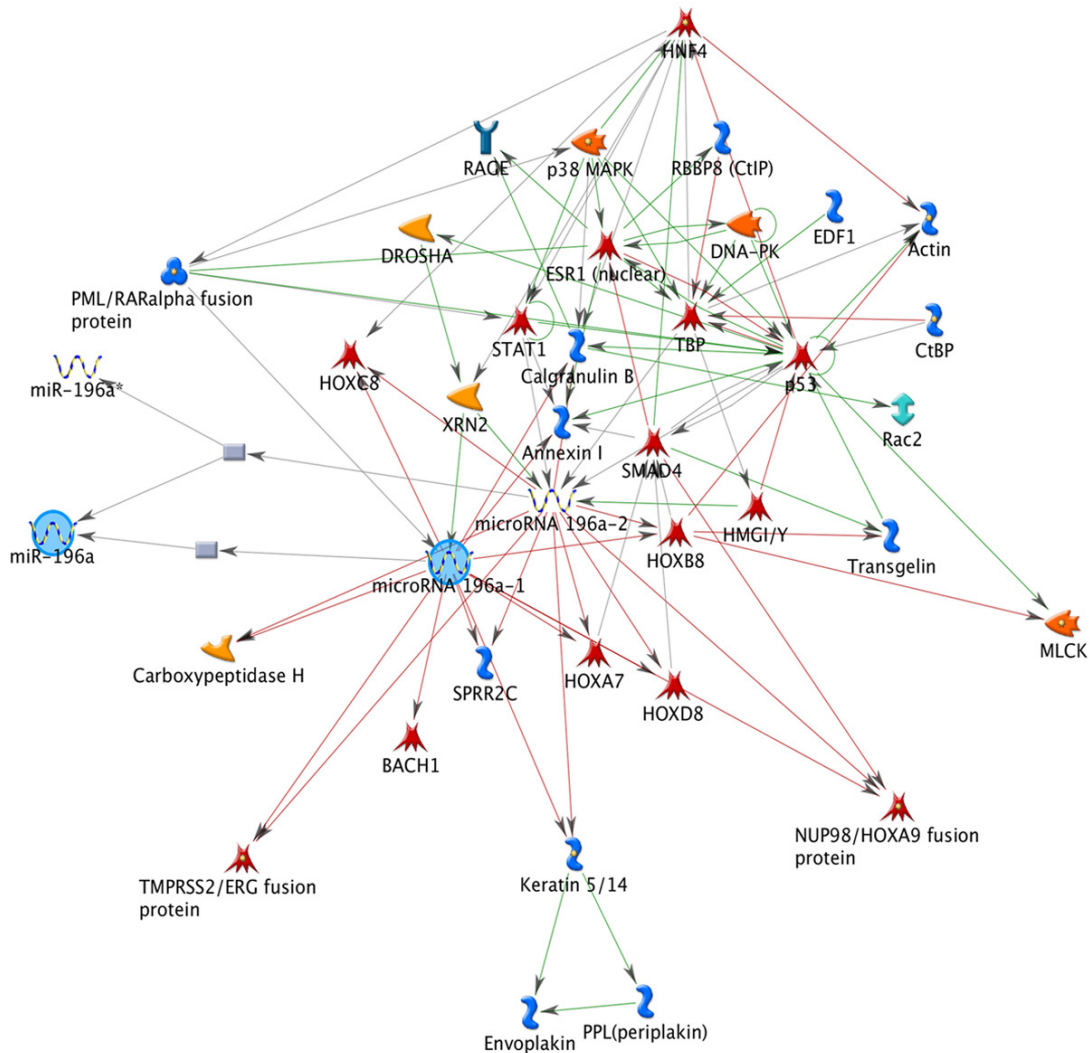
Detection of HOXC8 was performed in CC tissues and in cervical cell lines. For detection of cervical cancer tissues, a tissue microarray was constructed with 24 CC cases and normal cervical tissues by using a tissue microarrayer (Chemicon Co., Billerica, MA, USA). The immunostaining steps comprised antigen exposure with Trilogy solution, which was incubated for 45 min at 96°C. After blocking of endogenous peroxidase with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the slide was incubated with Bovine Serum Albumin (BSA) for 30 min at room temperature. Next, the slides were incubated with polyclonal anti-HOXC8 antibody (ab86236; Abcam, Cambridge, MA, USA) overnight at 4°C (1:200 dilution in 1% BSA). Later, the slides were treated with Streptavidin-Biotin Complex Peroxidase Mouse/Rabbit Method (Dako, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. Signal development was obtained with 0.05% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and counterstained with haematoxylin. HOXC8 expression was evaluated with 10X and 20X microscope as negative and positive staining. Healthy kidney or healthy bladder tissue were used as positive and negative controls, respectively.

### Results

#### Differential expression of cellular microRNAs in cervical cancer cell lines

microRNA expression was determined from 7,788 microRNAs in four healthy cervical tissues, four cervical cancer tissues and twelve

microRNA expression in cervical cancer



**Figure 3.** Upstream (regulators) and downstream (targets) genes related to miRNA-196a. HOX gene as HOXC8, HOXA7, HOXD8 such as predicted target of miR-196a, using fifty interactions in GeneGo MetaCore Software,  $p < 0.005$ .

cervical cancer cell lines using GeneChip miRNA microarray, Affymetrix. Selection of tissue for microarray study was performed using a systematic workflow as described in the methods. The overall average number of probe sets detected in the samples was 31.3% (2,439 of 7,788 for each chip) for healthy cervical tissue, 34% (2,720 of 7,788) for cervical tumor and 28.4% (2,213 of 7,788) for the 12 cell lines. Pearson correlation of 0.90-0.98 for quality controls by QC Tool was obtained. Therefore, the microarray data of healthy, tumor and cell lines were comparable for expression analysis.

The data clearly showed overall clustering of microRNA expression among the three studies group, indicating differences in microRNA expression by tumor tissues and CC cell lines compared with healthy cervical tissues (**Figure 1A**). Identification of altered microRNA in CC was carried out using one-way ANOVA, comparing tumor, CC cell lines and healthy tissues. The highest number of differentially expressed probe sets obtained was from CC cell lines with 1,247, followed by tumor tissues & CC cell lines with 942, and tumor with 512 (**Table 1**). For instance, 942 differential expression sequenc-

## microRNA expression in cervical cancer

**Table 3.** Putative target of miR-196a in different database

Database	Target (10 top rank)	Score <sup>a</sup>
DIANA-microT v5.0	HOXC8	1
	HOXA7	1
	HOXA5	0.999927
	SLC9A6	0.999925
	ERI2	0.999813
	HAND1	0.999774
	LRP1B	0.999064
	HOXA9	0.998916
	HOXB7 <sup>d</sup>	0.998827
	GATA6	0.998732
TarBase v6.0 <sup>b</sup>	HOXC8 <sup>c</sup>	1.000
	HOXA7 <sup>d</sup>	1.000
	HAND1 <sup>e</sup>	1.000
	CCDC47 <sup>e</sup>	0.999
	IGF2BP1 <sup>e</sup>	0.990
	ARHGAP28 <sup>e</sup>	0.986
	LIN28B <sup>e</sup>	0.961
	TSPAN12 <sup>e</sup>	0.930
	RP5-862P8.2 <sup>e</sup>	0.909
	DFFA <sup>e</sup>	0.818
MirTarget2 v2	HOXA7	100
	HOXC8	99
	SLC9A6	98
	ZMYND11	97
	CCDC47	95
	RG9MTD2	94
	TMX1	88
	ERI2	86
	PRTG	85
	DIP2A	84
TargetScan v6.2	HOXC8	-1.43
	HOXA7	-1.24
	SLC9A6	-0.88
	HOXA9	-0.64
	KLHL23	-0.55
	PHOSPHO2-KLHL23	-0.55
	ZMYND11	-0.51
	PACRGL	-0.50
	HOXB8	-0.49
	MAP3K1	-0.48
MicroRNA.org	HOXA7	-3.65
	HOXC8	-3.59
	SMC3	-2.66
	SLC9A6	-2.46
	HOXA9	-2.35
	HMGA2	-2.31

es were obtained out of which 518 were over-expressed and 424 under-expressed. The heat map displayed microRNA expression in the samples, where the tumor tissues showed a transition of microRNAs expression between CC cell lines and healthy tissue (**Figure 1B**). From initial list (815 microRNA sequences of 942 in total), only 123 sequences correspond to human sequences, representing 14.5% of altered expression of human microRNAs in CC cell lines. Most of these microRNA sequences are commonly found in different mammalian species such as rat, mouse, chimpanzee, gorilla, and dog, suggesting that microRNA group is highly conserved among species. **Table 2** depicts some microRNAs that were identified in more than five species, including human, in addition to their expression levels and other reports on CC.

Among the ten microRNAs, the most significantly over-expressed were: miR-196a, miR-18b, miR-183, miR-500, miR-18a, miR-25, miR-182, miR-20b, miR-106a, and miR-20a. On the other hand, among significantly under-expressed were miR-145, miR-379, miR-214, miR-127-3p, miR-199b, miR-199a, miR-337-5p, miR-143, miR-10b, and miR-125b. All cell lines were cultured under the same growth conditions to avoid positive false in microRNA expression. In addition, a technical replica of C33A cell line in Principal Component Analysis (PCA) and heat map had similar result as those of the original analysis, revealing high reproducibility of results.

### *Increased expression of miR-196a in cervical cancer cell lines and cervical tissues*

One the most expressed microRNAs in tumor tissues and CC cells was miR-196a in microarray assay ( $p=4.75E-04$ ,  $p=1.32E-07$ , respectively). To demonstrate over-expression of miR-196a, total RNA was subjected to quantitative RT-PCR assay to examine the relative expression in LSIL (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion,  $n=10$ ), HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion,  $n=10$ ), tumor tissues ( $n=15$ ) and CC cell lines ( $n=12$ ) compared with healthy cervical tissues (**Figure 2**). As expected, expression of miR-196a in LSIL and HSIL showed a tiny variation with respect to healthy tissues, whereas tumor tissues showed a slight increase in expression but not comparable to CC cell lines. Increase expression in all

## microRNA expression in cervical cancer

	CTBS	-2.18
	ZMYND11	-2.10
	C1orf88	-2.07
	C3orf88	-2.06
PicTar	HOXC8	12.74
	ZMYND11	6.56
	CCNJ	5.08
	MLR2	4.77
	KIAA0685	4.64
	HMG2	4.32
	PPP1R15B	4.27
	FLJ46247	4.20
	SLC9A6	4.18
	DDX19	4.08
miRecords	HOXC8	-
	GAN	-
	RBM26	-
	CDKN1B	-
	EPHA7	-
	ERG	-
	HOXB7	-
	CDYL	-
	ZNF385B	-
	RSP02	-

<sup>a</sup>=score values were according each database. <sup>b</sup>=Database with curated Collection of experimentally supported microRNAs targets. <sup>c</sup>=Validated by Report Gene Assay, qPCR, Sequencing; Western Blot and Other techniques. <sup>d</sup>=Validated by other techniques. <sup>e</sup>=Validated by sequencing.

CC tissues was not statistically significant, whereas in CC cell lines, the increased expression of miR-196a was statistically significant ( $p < 0.0001$ ) in comparison with healthy tissues.

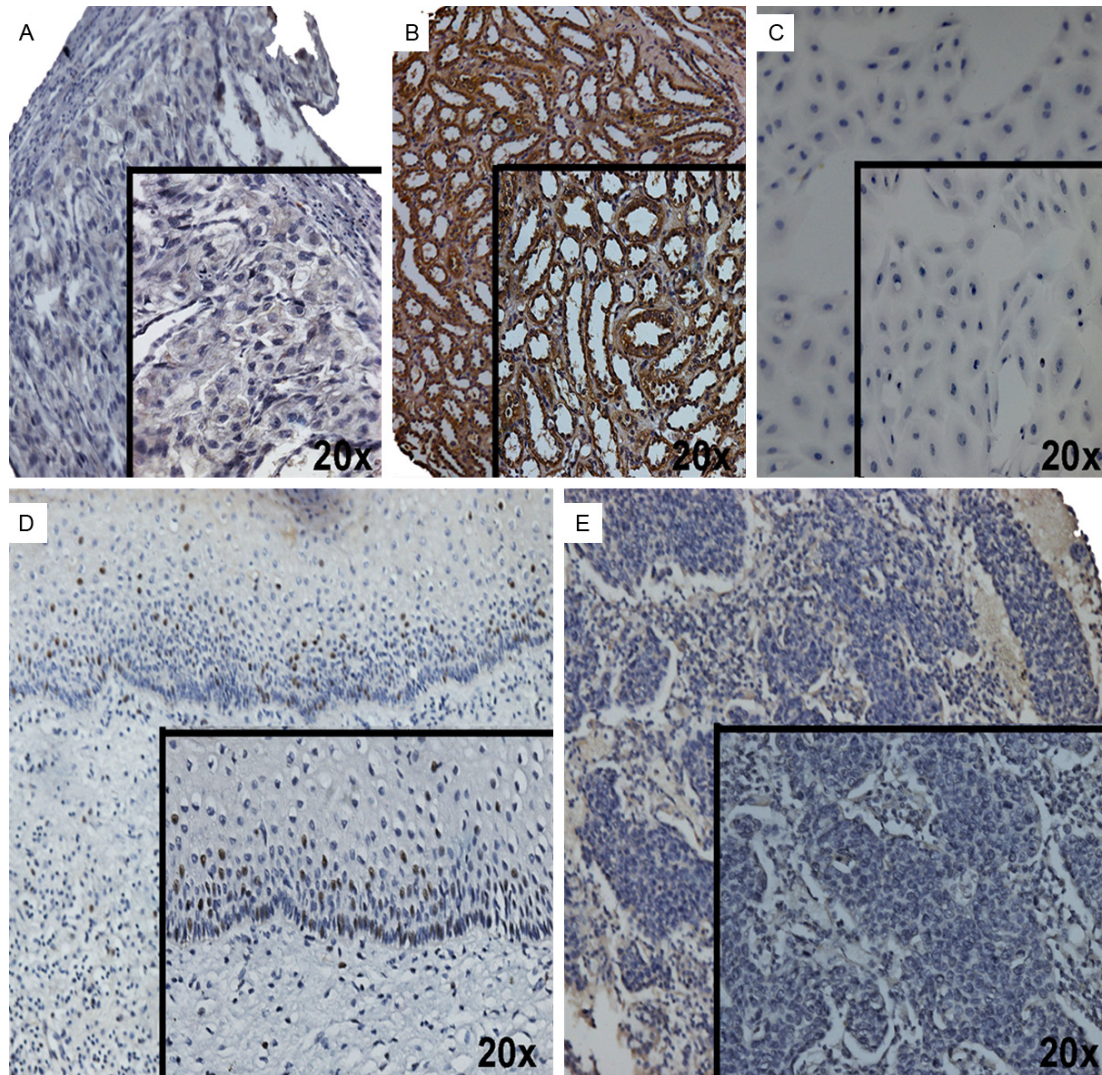
In order to find putative target genes of miR-196a, we performed bioinformatics analysis. First analysis was performed to identify miR-196a network interaction using GeneGo Metacore Suite. This analysis showed downstream and upstream interaction genes such as: embryonic development (HOX genes) and cellular remodelling (Actin/Keratin) (Figure 3). We identified indirect interaction genes such as p53 and SMAD that are associated with cell death [22]. Second, we identified miR-196a target based on experimental data and/or bioinformatics prediction such as: reporter gene assay, qPCR, western blot, sequencing, among others (Table 3). Target prediction analysis showed to HOXC8 as the best target of miR-

196a. Finally, in search of probable relationship in HOXC8 expression in CC, healthy cervical tissues and cervical carcinoma tissues on tissue microarray were subjected to immunodetection with healthy bladder (negative tissue) and healthy kidney (positive tissue) as controls (Figure 4A, 4B), as well as CC cell lines (Figure 4C). Positive immunostaining was observed in nucleus of cervical epithelium cells (Figure 4D). In contrast, a negative immunoreaction was observed in the CC tissue and cell lines (Figure 4C and 4E).

### Discussion

At present, CC is an important health problem worldwide. Despite the wide acceptance of CC screening programs in Mexico, more than 12,000 women are diagnosed with CC, and among these, 50% will die annually. It is accepted that CC is related to persistent HPV infection; however, the knowledge on cervical carcinogenesis is scarce. Most of the studies on CC are focused on HPV infection, gene expression and currently on proteomic studies, all of which shade light on multiple hits presented in transformed cell [23]. During the last decade, microRNA studies in cancer research were carried out define specific expression patterns and those associated with diagnosis and prognosis [24].

In the present study, >100 human microRNAs were differentially expressed in CC tissues and CC cell lines in comparison with healthy cervixes. Among the microRNAs over-expressed were miR-25, -106b, -17-92, and -106a clusters that have been previously reported altered in several neoplasms [25-29]. These clusters are related to growth, and proliferation via Tumor Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ), and inhibition of differentiation [30, 31]. We also observed an over-expression of miRNA-15b. Similar results have been previously reported in colorectal, lung, and pancreatic cancer [32-34], correlating this over-expression with prognosis. These data support the fact that these microRNA clusters are commonly altered in human cancer and that they are probably associated with the process of carcinogenesis. Moreover, under-expressed has also been reported in miR-143/145 cluster in several cancer types including CC [15, 35]. This cluster is associated with angiogenesis and metastasis pathways [35-37]. The agreement of our results with previous data suggests that miRNA-145 could act as microRNA suppressor regulator in cancer.

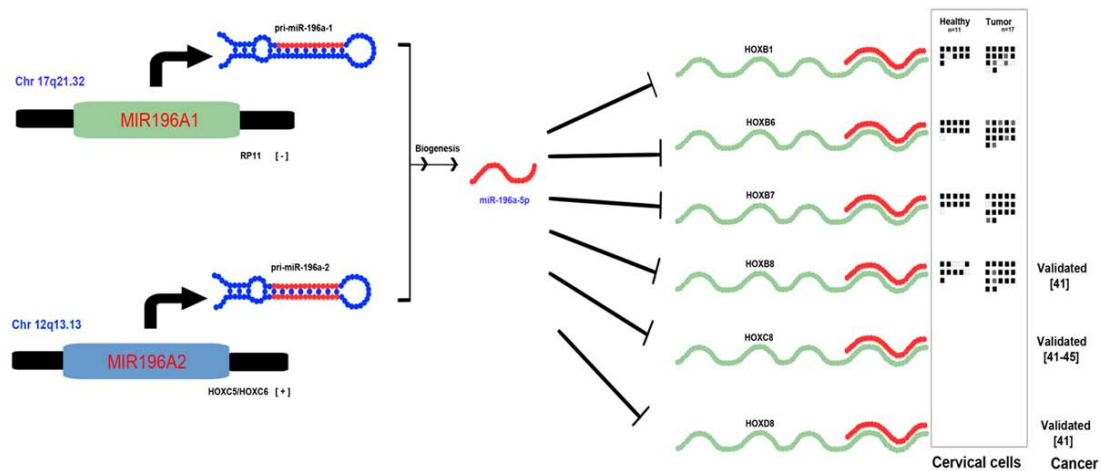


**Figure 4.** HOXC8 Immunodetection in CC. A. Negative control of HOXC8 expression (bladder tissue); B. Positive control of HOXC8 expression (kidney tissue); C. Absence HOXC8 expression in cervical cell lines (HeLa); D. HOXC8 expression in the nucleus of healthy cervical epithelium cells; E. HOXC8 expression was absence in tumor cervical tissue.

To know whether all tumor tissues and cell lines exhibited similar behaviour in terms of microRNA expression, the PCA and differential expression analysis of the cells were carried out. As expected, the samples were grouped based on miRNA expression. In addition, heat map showed a transition of microRNAs expression to tumor tissues between healthy tissue and cell lines. Interestingly, all cell lines were clustered in PCA, except C33A cell line. It is known that C33A presents mutated pRb and p53 genes. These molecular events could explain our PCA results.

In order to know whether the presence of HPV could influences cellular microRNA expression, the analysis was performed in positive HPV and negative HPV cell lines without finding any differential expression of microRNAs with regard to HPV infection. Furthermore, two of the three negative HPV cell lines (ViBo, and HaCaT cells) were clustered positive HPV. These data suggest that the presence of specific HPV do not influence cellular microRNA expression in cell lines. In a recent study of E5 HPV16-transfected HaCaT cells, it was found that the presence of E5 viral gene does not affect changes in micro-

## microRNA expression in cervical cancer



**Figure 5.** Diagram of HOXC8 in Cervical Cancer. miR-196a is a redundant sequence in the genome. MIR196A1 and MIR196A2 genes are transcribed and processed in miR-196a by microRNA biogenesis. According to the results in silico, HOX genes were candidate targets predictive for miR-196a; HOXC8 had a high score on all databases (Table 3), and it was also involved in relevant Networks. Some of the other HOX gene targets of miRNA196a have been investigated in cervical cells such as HOXA9, HOXB1, HOXB6, HOXB7 and HOXB8, and they showed no difference in mRNA expression [46, 47]; black squares indicate high expression of mRNA and empty squares indicate no expression. Finally, experimentally some of these HOX genes like HOXC8, HOXB7, HOXB8 and HOXD8 have been validated mechanistically in other models of cancer [41, 43, 45], which is indicated by the word "Validated".

RNA expression [38]. This finding could support partially the present results.

Furthermore, the most significantly over-expressed microRNA in the tumor tissues and CC cell lines was miR-196a, this microRNA is a redundant sequence in the genome. MIR196A1 and MIR196A2 genes are transcribed and processed in microRNA biogenesis pathway to generate mature miR-196a, which are located on 17q21.32 (-) (in the RP11 gene) and 12q13.13 (+) (intron 1 of the HOXC5 and HOXC6 genes) (see Figure 5). Recent findings of our group in comparative genomic hybridization analysis showed a gain of copy number of RP11 gene in CC samples (In preparation). In this situation, we hypothesize that over-expression of miR-196a could derive in part from MIR196A1 gene amplification.

At present, there is scarce knowledge on expression of this microRNA in cancer, however several studies have reported its over-expression in melanoma, oesophageal, lung, and pancreatic carcinomas [39-42]. We found statistically significant over-expression of miR-196a in CC cell lines in compared healthy tissues, whereas miR-196 expression in tumor tissues showed a slight increase but not comparable to CC cell lines, probably the low expression in CC tumors could be by cellular heterogeneity while

cell lines are clonal cells, as well as lesion pre-cancerous cervix (LSIL and HSIL).

In order to acquire some additional information on potential target, first analysis consisted in a network regulation of miR-196a based on GeneGo Metacore which showed that the potential targets of miR-196a were genes involved in embryonic development and cellular remodelling such as: HOXs (HOXC8, HOXA7, HOXD8, HOXA9, HOXB8) and Actin/Keratin. Second analysis, seven targets predictor databases were used in the first analysis with all of them depicting HOXC8 as the best target of miR-196a (Table 3), bioinformatics approaches were used and this revealed a potential regulator target of miR-196a to HOXC8. Moreover, HOXC8 has been validated as target of miR-196a in different studies [41, 43-45].

Recent works showed that the absence of HOXC8 expression in some tumors is related with progression and metastasis [43-45]. In CC, several member of the family of HOX genes have been evaluated, however did not show change in the level of expression of HOXA9, HOXB1, HOXB6, HOXB7 and HOXB8 [46, 47]. In additional, two studies has reported a controversial mRNA expression of HOXC8 [48, 49]. According to our bioinformatics finding and report Huang et al. HOXC8 immunodetection



## microRNA expression in cervical cancer

assay was performed in healthy cervical epithelium, CC tissues, and CC cell lines. The result of the assay indicated absence of HOXC8 protein in CC samples, suggesting that HOXC8 could be a gene involved in cervical cancer process. This finding is in agreement with previous study by Alami et al., [48]. We suggest that miR-196a could be an oncogenic element and an important factor in CC cells.

In summary, our present data is showing a heterogeneity microRNAs expression in CC cells, suggesting that development of cancer in cervical cells is an extremely complex event due to high complexity of microRNA expression among other factors. We could not provide a specific microRNA expression profile related with the HPV infection, which could suggest the presence of fine molecular events making to the CC as more complex disease. Finally, we also suggest that miR-196a could be another oncogenic element in cervical cancer cells. However, we suggest that more studies be carried out to ascertain the results of the present study.

### Acknowledgements

This work was supported in part by grant Fondos Sectoriales 69719 and 87244 from CONACYT Mexico. This paper constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program in PhD Biological Sciences of National Autonomous University of México (UNAM) for Villegas-Ruiz V. She acknowledges the scholarship and financial support provided by CONACYT, UNAM and IMSS. We thanks to MD J. Ortiz and H. Serna for providing samples; Miss R. Coronel for helpful ELOSA microarrays standardization. Dra P. Piña for technical help for tissue microarrays, and PhD L Padilla for his critical review of this manuscript.

### Disclosure of conflict of interest

The authors declare no interest conflicts.

**Address correspondence to:** Dr. Mauricio Salcedo, Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médicas en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Medico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av Cuauhtémoc 330, Col Doctores, Mexico, D.F, 06720. Tel: (01) 55 562 769 00 ext 2796; E-mail: maosal89@yahoo.com

### References

[1] Gregory RI and Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 3509-3512.

- [2] Meltzer PS. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature* 2005; 435: 745-746.
- [3] Mendell JT. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle* 2005; 4: 1179-1184.
- [4] Fabbri M, Croce CM and Calin GA. MicroRNAs. *Cancer J* 2008; 14: 1-6.
- [5] Lytle JR, Yario TA and Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 9667-9672.
- [6] Ouellet DL, Perron MP, Gobeil LA, Plante P and Provost P. MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol* 2006; 2006: 69616.
- [7] Calin GA and Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866.
- [8] Esquela-Kerscher A and Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269.
- [9] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR and Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838.
- [10] Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC and Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-2261.
- [11] World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>.
- [12] Moody CA and Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 550-560.
- [13] Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr, Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, Grigsby PW and Wang X. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res* 2010; 70: 1441-1448.
- [14] Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, Kim WY, Kim TJ, Lee JH, Kim BG and Bae DS. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2535-2542.
- [15] Lui WO, Pourmand N, Patterson BK and Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 6031-6043.
- [16] Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP and Khan SA. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 2008; 27: 2575-2582.

## microRNA expression in cervical cancer

- [17] Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, Winder DM, Palmer RD, Gooding EL, Barbosa-Morais NL, Mukherjee G, Thorne NP, Roberts I, Pett MR and Coleman N. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J Pathol* 2007; 212: 368-377.
- [18] Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L and Santos MA. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* 2010; 5: e11780.
- [19] Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C and Zheng ZM. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* 2008; 3: e2557.
- [20] Schmitt M, Dondog B, Waterboer T and Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1050-1059.
- [21] Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
- [22] Atfi A and Baron R. p53 brings a new twist to the Smad signaling network. *Sci Signal* 2008; 1: pe33.
- [23] Higareda-Almaraz JC, Enriquez-Gasca Mdel R, Hernandez-Ortiz M, Resendis-Antonio O and Encarnacion-Guevara S. Proteomic patterns of cervical cancer cell lines, a network perspective. *BMC Syst Biol* 2011; 5: 96.
- [24] Schoof CR, Botelho EL, Izzotti A and Vasques Ldos R. MicroRNAs in cancer treatment and prognosis. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 414-433.
- [25] Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, Wallace TA, Liu CG, Volinia S, Calin GA, Yfantis HG, Stephens RM and Croce CM. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6162-6170.
- [26] Diosdado B, van de Wiel MA, Terhaar Sive Droste JS, Mongera S, Postma C, Meijerink WJ, Carvalho B and Meijer GA. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *Br J Cancer* 2009; 101: 707-714.
- [27] Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, Hur K, Yoo MW, Lee HJ, Yang HK and Kim VN. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 1672-1681.
- [28] Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, Sugihara K and Mori M. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 2009; 34: 1069-1075.
- [29] Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, Taccioli C, Zanasi N, Alder H, Hagan JP, Munker R, Volinia S, Boccadoro M, Garzon R, Palumbo A, Aqeilan RI and Croce CM. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 12885-12890.
- [30] Jevnaker AM, Khuu C, Kjole E, Bryne M and Osmundsen H. Expression of members of the miRNA17-92 cluster during development and in carcinogenesis. *J Cell Physiol* 2011; 226: 2257-2266.
- [31] Li L, Shi JY, Zhu GQ and Shi B. MiR-17-92 cluster regulates cell proliferation and collagen synthesis by targeting TGF $\beta$  pathway in mouse palatal mesenchymal cells. *J Cell Biochem* 2012; 113: 1235-1244.
- [32] Miko E, Czimmerer Z, Csanky E, Boros G, Buslig J, Dezso B and Scholtz B. Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer. *Exp Lung Res* 2009; 35: 646-664.
- [33] Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M and Ju J. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights* 2006; 2: 113-121.
- [34] Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q and Chen C. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* 2009; 33: 698-709.
- [35] Akao Y, Nakagawa Y and Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep* 2006; 16: 845-850.
- [36] Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, Naoe T, Tanigawa N and Akao Y. Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers. *Oncology* 2009; 77: 12-21.
- [37] Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, Chen HY and Sun XF. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers* 2009; 26: 27-34.
- [38] Greco D, Kivi N, Qian K, Leivonen SK, Auvinen P and Auvinen E. Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One* 2011; 6: e21646.
- [39] Braig S, Mueller DW, Rothhammer T and Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 3535-3548.
- [40] Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM, Broaddus RR, Rashid A and Albar-

## microRNA expression in cervical cancer

- racin CT. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene* 2008; 27: 6667-6678.
- [41] Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, Moehler M and Gockel I. High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2089-2096.
- [42] Liu XH, Lu KH, Wang KM, Sun M, Zhang EB, Yang JS, Yin DD, Liu ZL, Zhou J, Liu ZJ, De W and Wang ZX. MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5. *BMC Cancer* 2012; 12: 348.
- [43] Li Y, Zhang M, Chen H, Dong Z, Ganapathy V, Thangaraju M and Huang S. Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis. *Cancer Res* 2010; 70: 7894-7904.
- [44] Mueller DW and Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOXC8 expression. *Int J Cancer* 2011; 129: 1064-1074.
- [45] Adwan H, Zhivkova-Galunska M, Georges R, Eyo E, Kleeff J, Giese NA, Friess H, Bergmann F and Berger MR. Expression of HOXC8 is inversely related to the progression and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105: 288-295.
- [46] Lopez R, Garrido E, Pina P, Hidalgo A, Lazos M, Ochoa R and Salcedo M. HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 329-335.
- [47] Lopez R, Garrido E, Vazquez G, Pina P, Perez C, Alvarado I and Salcedo M. A subgroup of HOX Abd-B gene is differentially expressed in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1289-1296.
- [48] Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D and Clausse N. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 738-745.
- [49] Hung YC, Ueda M, Terai Y, Kamagai K, Ueki K, Kanda K, Yamaguchi H, Akise D, Ueki M. Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. *Cancer Scien* 2003; 94: 437-441.