



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Análisis de la regulación ejercida por miR-26a en los
mensajeros de los genes *APC* y *Rb1* asociados a
cáncer colorrectal.**

TESIS

Que para obtener el título de:

Biólogo

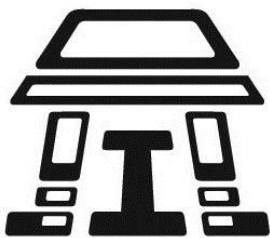
Presenta:

Carlos Manuel Contreras Romero

Director de Tesis: Dr. Eduardo López Urrutia

Los Reyes Iztacala., Edo. De México

2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mis padres, sin ellos esto no hubiese sido posible, gracias por su apoyo incondicional.

A mis hermanos, Leonardo, Jossimar, Osvaldo, Pablo, Luisma, Rebe, Karlita, Richi, Karencita, por sus ánimos, por esos buenos y malos momentos, porque en este caso la familia no tiene nada que ver con el parentesco.

A Iza, la mujer que me ha sabido apoyar y comprender.

Al doctor Carlos por darme la oportunidad de realizar este trabajo y aprender de él.

A Verito por enseñarme como hacer las cosas... y por regañarme tanto hahaha.

Al doctor Lalo por compartir su conocimiento y su experiencia, sobre todo por tener una respuesta a cada pregunta, aunque fuera “no lo sé” o “¿eso qué?”.

A todos mis amigos por convivir y compartir momentos increíbles durante toda la carrera, a pesar de los altibajos fue una etapa inolvidable la cual no cambiaría por nada.

A todo aquel que ha tocado mi vida gracias, porque la han formado aun sin quererlo.

“Quería aprender el nombre del viento. Quería dominar el fuego y el rayo. Quería respuestas a diez mil preguntas.”

“Si vamos a contar una historia contémosla bien.”

“Un fantasma busca venganza, un demonio quiere tu alma, un engendro tiene hambre y frío... Las cosas que entendemos podemos intentar controlarlas.”

“Todos nos contamos una historia sobre nosotros mismos. Siempre. Continuamente. Esa historia es lo que nos convierte en lo que somos. Nos construimos a nosotros mismos a partir de esa historia.”

Patrick Rothfuss

1 CONTENIDO

2	RESUMEN	8
3	INTRODUCCIÓN	9
3.1	El cáncer y su impacto en la población.	9
3.2	El Cáncer desde una perspectiva biológica.	13
3.3	Factores etiológicos del CCR.	15
3.4	Desarrollo del cáncer colorrectal.	16
3.5	microRNAs como reguladores de la expresión genética.....	20
4	HIPÓTESIS.....	23
5	OBJETIVOS	23
5.1	Objetivo General	23
5.2	Objetivos Particulares	23
6	MATERIALES Y MÉTODO	24
6.1	Análisis bioinformático.....	24
6.2	Amplificación de las regiones 3'UTR.....	24
6.3	Generación de construcciones.....	25
6.4	Secuenciación.....	26
6.5	Transfección	27
6.6	Ensayo de luciferasa.....	28
6.7	Análisis bioinformático de las regiones 3'UTR.....	29
7	RESULTADOS	29
8	DISCUSIÓN.....	39
9	CONCLUSIONES.....	43
10	REFERENCIAS.....	44

FIGURAS

<i>Figura 1. Incidencia mundial estimada de cancer en ambos sexos GLOBOCAN (Ferlay et al, 2012).</i>	10
<i>Figura 2. Grafica representativa de los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial GLOBOCAN (Ferlay et al, 2012).</i>	11
<i>Figura 3. Grafica de mortalidad e incidencia que incluye América del norte (Ferlay et al, 2012).</i>	12
<i>Figura 4. Mapa que muestra un índice de mortalidad de CCR en México (SINAVE 2011).</i>	13
<i>Figura 5. Características distintivas de las células tumorales (Hanahan y Weinberg, 2011).</i>	14
<i>Figura 6. Modelo de progresión del cáncer colorrectal propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990</i>	17
<i>Figura 7. Posibles escenarios en la vía de señalización Wnt/ β- Catenina</i>	18
<i>Figura 8. Esquema funcional de pRb durante el ciclo celular.</i>	19
<i>Figura 9. Modelo de biogénesis de microRNAs.</i>	20
<i>Figura 10. Estructura del complejo RISC y microRNA interactuando con la región 3'UTR del mensajero blanco.</i>	21
<i>Figura 11. Análisis bioinformático donde se muestran la región de hibridación de APC y Rb1 con miR-26 tomado de microrna.org.</i>	23
<i>Figura 12. Alineamiento de los primers generados para la región 3'UTR del mensajero de Rb1.</i>	30
<i>Figura 13. Alineamiento de los primers generados para la región 3'UTR del mensajero de APC.</i>	30
<i>Figura 14. Amplificación de las regiones 3'UTR</i>	31
<i>Figura 15. Gel al 1% de agarosa donde se muestran los amplicones digeridos con las enzimas de restricción.</i>	32
<i>Figura 16. Gel al 1% de agarosa representativo de la verificación por restricción de los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con la construcción de APC.</i>	33
<i>Figura 17. Gel al 1% de agarosa representativo de la verificación por restricción de los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con la construcción de Rb1.</i>	34
<i>Figura 18. Alineamientos que se realizaron con los resultados de la secuenciación y sus respectivas 3'UTR</i>	35
<i>Figura 19. Actividad de luciferasa de Rb1.</i>	36
<i>Figura 20. Actividad de luciferasa de APC.</i>	37
<i>Figura 21. Representación gráfica de la región 3'UTR de Rb.</i>	38
<i>Figura 22. Representación gráfica de la región 3'UTR completa de APC.</i>	39

TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de reactivos requeridas para las reacciones de PCR.	25
Tabla 2. Concentraciones de reactivos requeridas para la transfección de las construcciones en células HCT116 derivadas de cáncer colorrectal.	28

ABREVIACIONES

1. APC: Adenomatous polyposis coli
2. CCR: Cáncer colorrectal
3. IARC: International Agency for Research on Cancer
4. KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
5. miRNA: microRNA's
6. MLH1: MutL Homolog 1
7. MMP: Matrix Metalloproteinase
8. MMR: MisMatch Repair
9. MSH2: MutS Homolog 2
10. MYC: Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
11. PCRpf: Polymerase Chain Reaction
12. Rb1: Retinoblastoma 1
13. RPMI: Roswell Park Memorial Institute
14. TCF/LEF: T-cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor

2 RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) se refiere a cualquier neoplasia en los tejidos del colon, recto y apéndice. Este tipo de cáncer ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad. La mayoría de los tumores colorrectales tienen mutaciones en genes supresores de tumores tales como el gen Adenomatous polyposis coli (APC) y el gen Retinoblastoma 1 (Rb1). APC regula las funciones tales como la adhesión celular y juega un papel importante en la vía de señalización / Wnt β -catenina, mientras que Rb1 un regulador clave para la transición del ciclo celular en las fase G1-S. La desregulación de estos genes conduce a la formación y progresión de la neoplasia. Una parte importante de esta desregulación se debe a los microRNAs, que son pequeñas moléculas de RNA no codificante de 20 nucleótidos de longitud, con procesamiento nuclear y maduración citoplasmática, los cuales ejercen una regulación negativa post-transcripcional en sus mensajeros blanco. En este trabajo hemos examinado si existe una regulación de miR26a en los mensajeros de los genes APC y Rb1 en un modelo *in vitro*. La longitud completa de las regiones 3'UTR de los mensajeros de Rb1 y APC fueron amplificadas y posteriormente se ligaron al vector de expresión pMIR-REPORT para los ensayos del sistema reportero de luciferasa. La actividad de luciferasa disminuyó significativamente en el caso del gen RB1, mientras que para APC no observó regulación. A través del análisis bioinformático de las regiones 3'UTR, encontramos que la región de interacción de miR-26a de la 3'UTR Rb1 tiene más nucleótidos disponibles para la hibridación en comparación con la región 3'UTR de APC. Este trabajo aporta nueva información sobre los factores que influyen en la regulación estricta ejercida sobre los genes APC y Rb durante el desarrollo de CCR y elucidar más sobre los mecanismos de este tipo de cáncer.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 *El cáncer y su impacto en la población.*

Se conoce como cáncer al proceso de crecimiento y propagación descontrolado de células anormales en el cuerpo provocando la formación de tumores.

Muchos tipos de cáncer son curables cuando se logra una detección temprana (Tsai et al., 2016), además también se cuenta con diversos tipos de tratamientos contra el mismo como las quimioterapias, radioterapias y cirugías, aun con estas prevenciones y estos tipos de tratamiento, el cáncer sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, como podemos ver en la figura 1 en donde observamos la incidencia aproximada en ambos sexos en cada país en el mundo, además de ser una de las principales causas de muerte, atribuyéndosele más de 8.2 millones de defunciones ocurridas tan solo en 2012 (Ferlay, 2013). Se prevé que el número de nuevos casos aumente en un aproximado del 70% en los próximos 20 años (OMS, 2014).

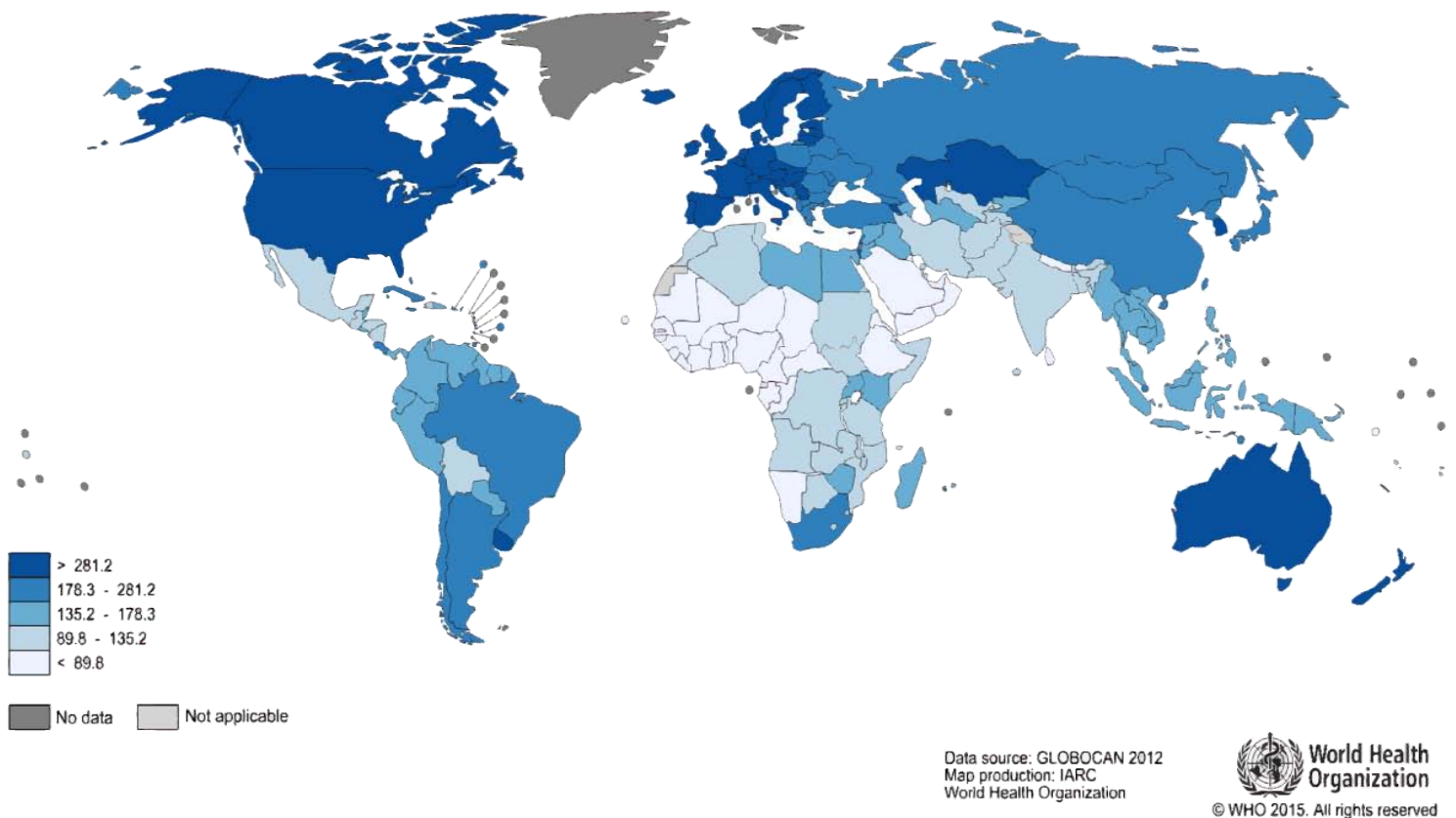


Figura 1. Incidencia mundial estimada de cancer en ambos sexos por cada 100 000 habitantes,este estadístico se muestra de acuerdo a cada pais, tomada de GLOBOCAN (Ferlay et al, 2012).

En la actualidad los tipos de cáncer que presentan mayor incidencia en la población mundial, tanto en hombres como en mujeres son: el cáncer de mama, próstata, pulmón y colorrectal (Fig. 2), siendo el cáncer de pulmón el que mayor índice de mortalidad presenta (Ferlay, 2013).

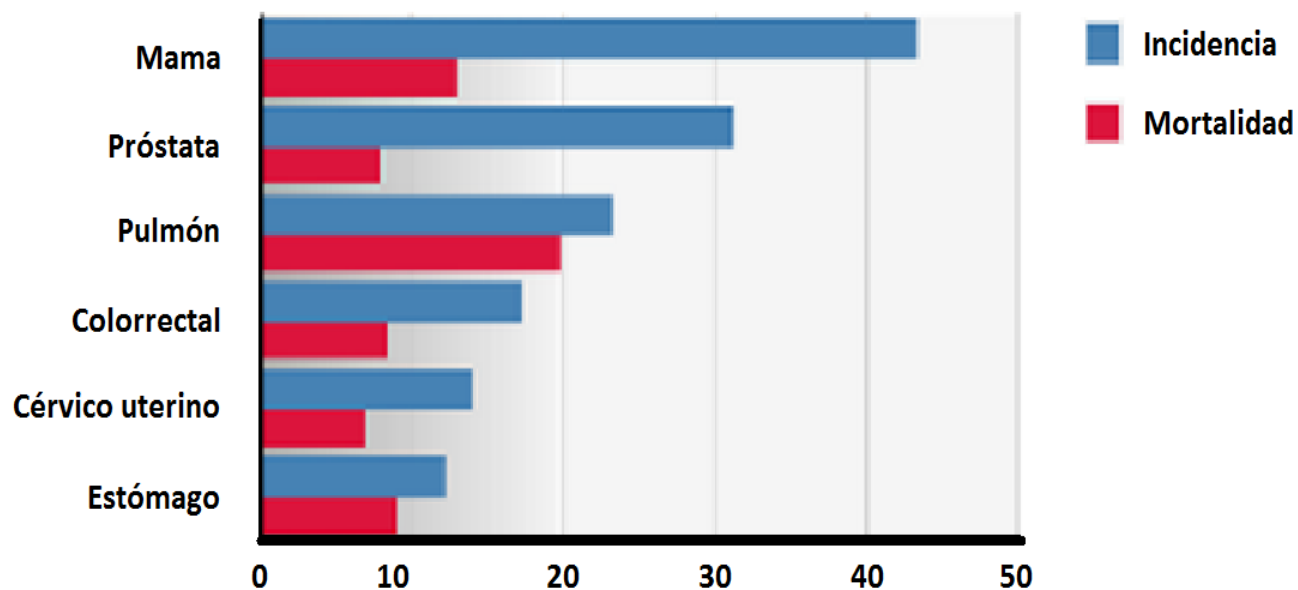


Figura 2. Grafica representativa de los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial por cada 100 000 habitantes, imagen tomada GLOBOCAN (Ferlay et al, 2012).

Según el International Agency for Research on Cancer (IARC) el Cáncer Colorrectal (CCR) ocupa el cuarto lugar en cuanto al índice de mortalidad relacionado al cáncer en ambos sexos en todo el mundo. En el 2012 se registraron 1,360,206 casos de CCR de los cuales 693,881 fueron decesos. De acuerdo con estas cifras es el tercer lugar entre los tipos de cáncer más común a nivel mundial.

Las cifras más altas en cuanto a incidencia se reportaron en Australia, mientras que el índice de mortalidad más alto se reportó en Europa del Sur (Fig. 3).

A su vez, en América fueron reportados 245,643 casos, de los cuales la incidencia es de 23% por cada 100,000 hombres y 18% por cada 100,000 mujeres con una mortalidad de 9.8% y 7.4% por cada 100,000 hombres y mujeres respectivamente (Ferlay, 2013).

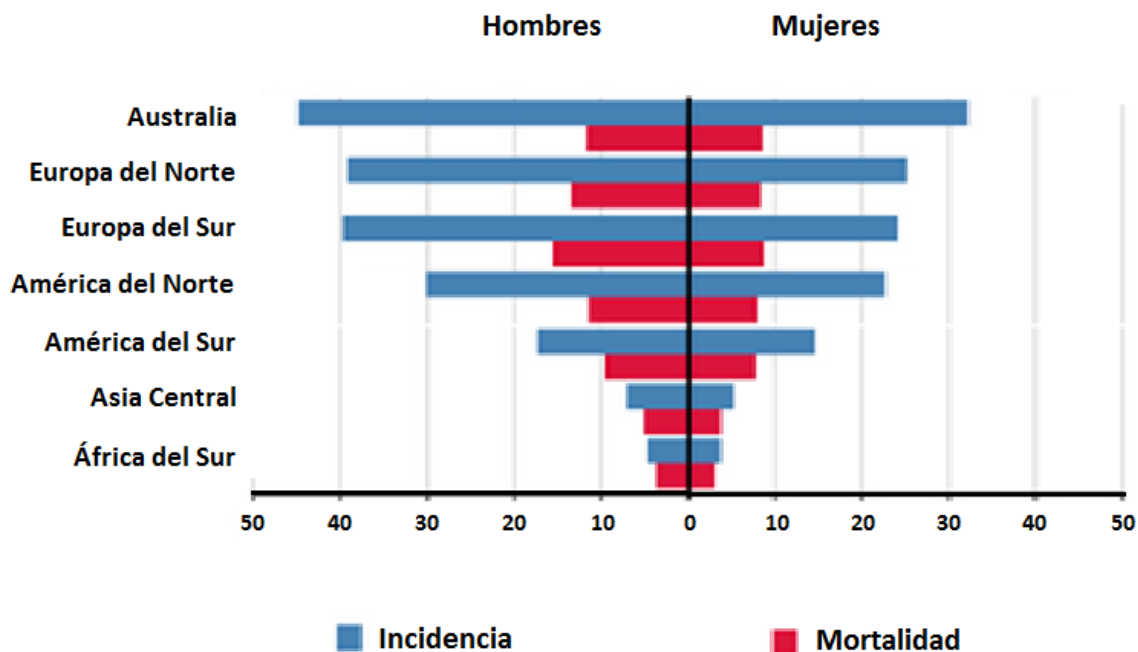


Figura 3. Gráfica de mortalidad e incidencia que incluye América del norte, tasa tomada por cada 100 000 habitantes (Ferlay et al, 2012).

En México, el CCR ocupa el cuarto lugar en cuanto a incidencia y mortalidad afectando de igual manera a hombres y mujeres, tan solo en 2012 se reportaron 8651 casos nuevos en la población, de los cuales 4694 fueron decesos (SINAVE 2011).

El riesgo de adquirir este tipo de cáncer aumenta a partir de los 35 años de edad con máximo a los 65 años, sin embargo este tipo de neoplasia es detectada cada vez más frecuentemente en adultos menores de 50 años (Inra & Syngal, 2014). El CCR ha dejado de ser un padecimiento raro en la población desde las últimas décadas, como se puede observar en la figura 4, se ha situado entre las primeras 10 causas de muerte en estados de la República Mexicana como Sonora, Baja California Sur, Chihuahua y la Ciudad de México con un índice de mortalidad mayor al 4% de las

muertes relacionadas a cáncer, siendo estos estados los que presentan un índice de mortalidad más alto (SINAVE 2011).



Figura 4. Mapa que muestra un índice de mortalidad de CCR en México, se pueden apreciar la tasa de mortalidad en los distintos estados de la República Mexicana. El código de colores indica el porcentaje respecto al total de defunciones asociadas al cáncer (SINAVE 2011).

3.2 El Cáncer desde una perspectiva biológica.

Se conoce como cáncer al conjunto de alteraciones celulares que tienen como consecuencia la proliferación descontrolada de células, provocando la formación de tumores. Esto puede lograrlo por su capacidad de rápida multiplicación celular (Gonda & Ramsay, 2015). Las células tumorales cuentan con características distintivas obtenidas paulatinamente (Fig. 5) que les permiten proliferar más rápidamente que las células normales, además de conferirles la facilidad de invasión a otros tejidos y de hacerse prácticamente inmortales, haciendo de esta una enfermedad multifacética (Hanahan y Weinberg, 2011).

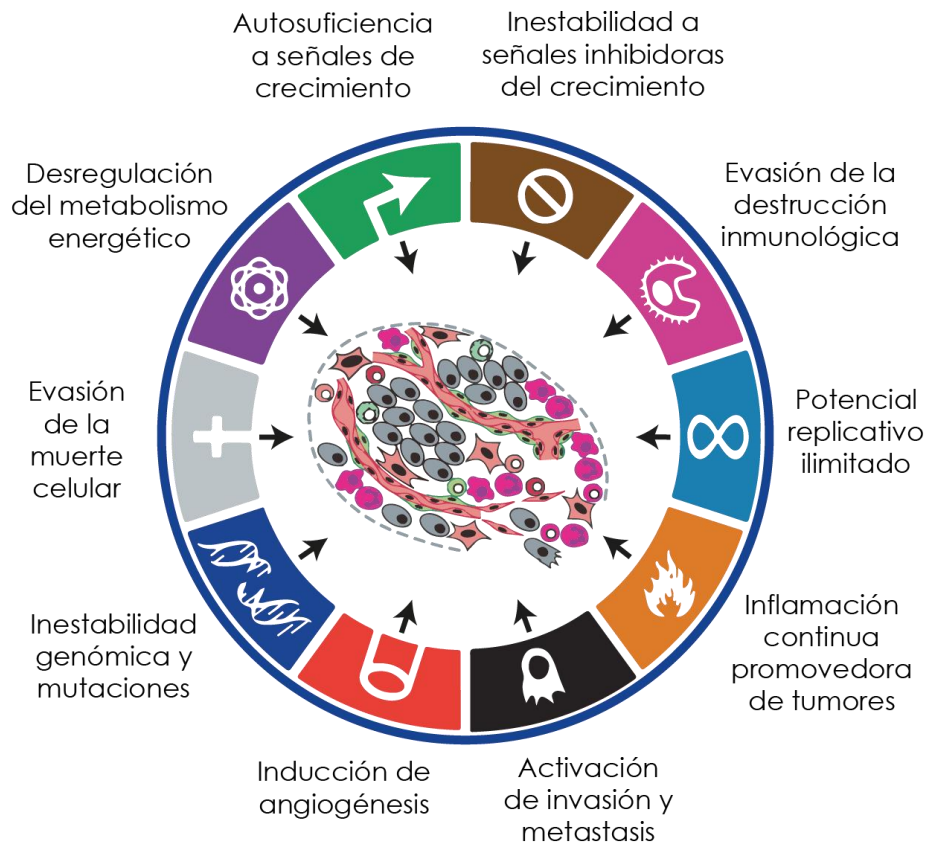


Figura 5. Características distintivas de las células tumorales, las cuales les confieren distintas funciones, entre ellas, migración, proliferación y evasión de la apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011).

Estas características distintivas de las células tumorales son consecuencia de mutaciones que no son reparadas durante el ciclo celular, ocasionando que dichas células obtengan ganancia de funciones que conllevan a la formación o progresión de neoplasias (Hanahan & Weinberg, 2011). El desarrollo neoplásico puede ser consecuencia de la sobre expresión de oncogenes, los cuales son genes que promueven procesos dirigidos hacia la supervivencia y proliferación celular (Polsky & Cordon-Cardo, 2003) y a la desregulación de genes supresores de tumor que vigilan la secuencia normal de acontecimientos que permiten la adecuada proliferación y diferenciación de la célula (Indovina et al., 2015).

El CCR incluye cualquier neoplasia en tejidos del colon, recto y apéndice. Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo de CCR, el alto índice de este tipo de neoplasia en los países desarrollados se puede atribuir al aumento en el promedio de vida de la población, los hábitos dietéticos modernos y desfavorables. Factores como el tabaquismo, la baja actividad física y obesidad pueden ocasionar desordenes como la colitis ulcerativa (Kuipers et al., 2015), de manera contradictoria el 75% de los tumores malignos de colon han sido reportados en pacientes sin factores de riesgo (Morgan Villela, Silva Uribe, & Sat Muñoz, 2008).

3.3 Factores etiológicos del CCR.

Existen dos tipos de factores de riesgo asociados al CCR, los factores ambientales y los factores genéticos.

Entre los ambientales podemos mencionar algunos como el alcoholismo, tabaquismo, sedentarismo y una dieta alta en grasas e irritantes, así como algunos padecimientos como enfermedades inflamatorias intestinales que pueden aumentar el riesgo de desarrollar este tipo de neoplasias (SINAVE 2011).

Se han descrito diversos factores de predisposición hereditaria los cuales están relacionados con polimorfismos proteicos tales como el CRR no poliposo, también llamado síndrome de Lynch, que es una condición hereditaria en la cual se presentan mutaciones en los genes MSH2 y MLH1, que codifican proteínas que forman parte del complejo MisMatch Repair (MMR, por sus siglas en ingles) el cual está encargado de la identificación y reparación de daño a DNA.

En las personas que presentan este síndrome existe un error en la maquinaria de reparación post replicativa del DNA, no se reconocen los apareamientos erróneos entre las bases nitrogenadas producto de la replicación, esta condición es conocida como inestabilidad microsatelite y conlleva a la acumulación de mutaciones en células somáticas, la pérdida de la actividad del complejo MMR hace a la célula sensible a efectos tóxicos de diversos compuestos que son capaces de causar daños en el DNA (Lynch et al., 2009).

El síndrome de Poliposis Adenomatosa Familiar, que representa solo el 1% del CCR y se asocia a una mutación germinal en el gen *APC* (Adenomatous Polyposis Coli por sus siglas en inglés) la cual es heredada de forma autosómica dominante, se caracteriza por presentar cientos de pólipos que al no ser removidos quirúrgicamente conllevan al desarrollo del CCR. (Boman & Fields, 2013).

3.4 Desarrollo del cáncer colorrectal.

Bert Vogelstein ha propuesto un modelo de desarrollo del CCR (Fig. 6) el cual comienza con una alteración en el brazo largo del cromosoma 5, donde se localiza *APC*, esto hace a que las células del epitelio de colon tengan una mayor proliferación dando lugar a la formación de pólipos, criptas aberrantes y adenomas menores a 1cm. La hipometilación del DNA favorece la expresión de oncogenes como *K-ras*, que codifica proteínas transductoras de señales de supervivencia y evasión de apoptosis. Subsecuentemente el adenoma se transforma en carcinoma invasivo debido a la delección de *p53* y alteraciones posteriores en el gen Retinoblastoma 1 (*Rb1* por sus siglas en inglés) (Fearon & Vogelstein, 1990).

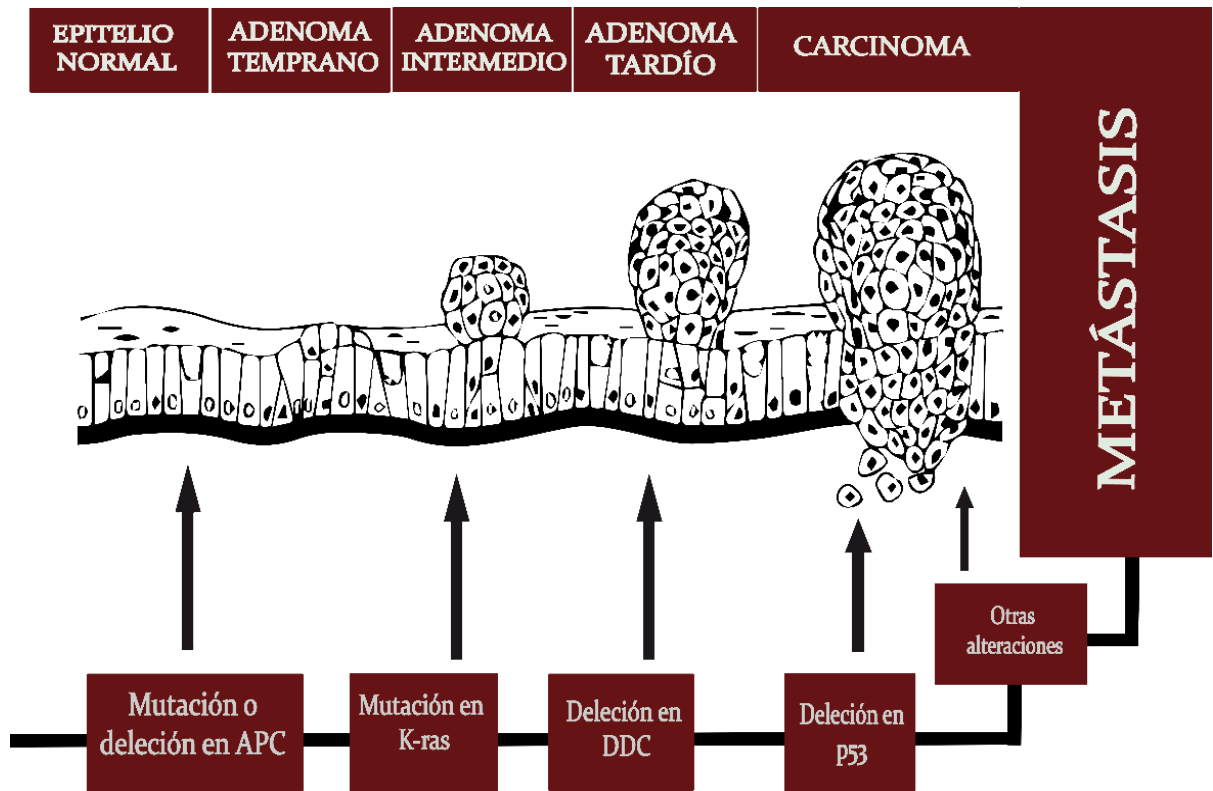


Figura 6. Modelo de progresión del cáncer colorrectal propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990 en donde se señalan los eventos moleculares que dan lugar a la progresión del CCR. Modificado de Fearon y Vogelstein en 1990.

En la mayoría de los tumores de colon han sido detectadas mutaciones en importantes genes supresores de tumor tales como *APC*, encargado de funciones como: transducción de señales en la vía Wnt y adhesión intercelular (Fearnhead, et al., 2001), más específicamente es parte del complejo de ubiquitinación de β -catenina para su posterior degradación por vía del proteosoma. Si alguno de los componentes de este importante complejo proteico falta o es disfuncional, ya sea porque el gen en el que se encuentra codificado contiene alguna mutación o bien porque alguna otra molécula está regulando su expresión, β -catenina se acumula en el citoplasma y comienza a traslocarse al núcleo en donde funge como coactivador de factores de transcripción de la familia T-cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF), los cuales se encargan de transcribir oncogenes como

Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (MYC, por sus siglas en inglés), Ciclina D1, Matrix Metalloproteinase (MMP) (Bienz, 2002; Wong & Pignatelli, 2002).

Existe evidencia de que la pérdida de función de APC en tejido de colon y recto es responsable de cambios tanto moleculares como histológicos, esto desencadena la expansión clonal en células neoplásicas generando inestabilidad genómica (Fodde, 2002).

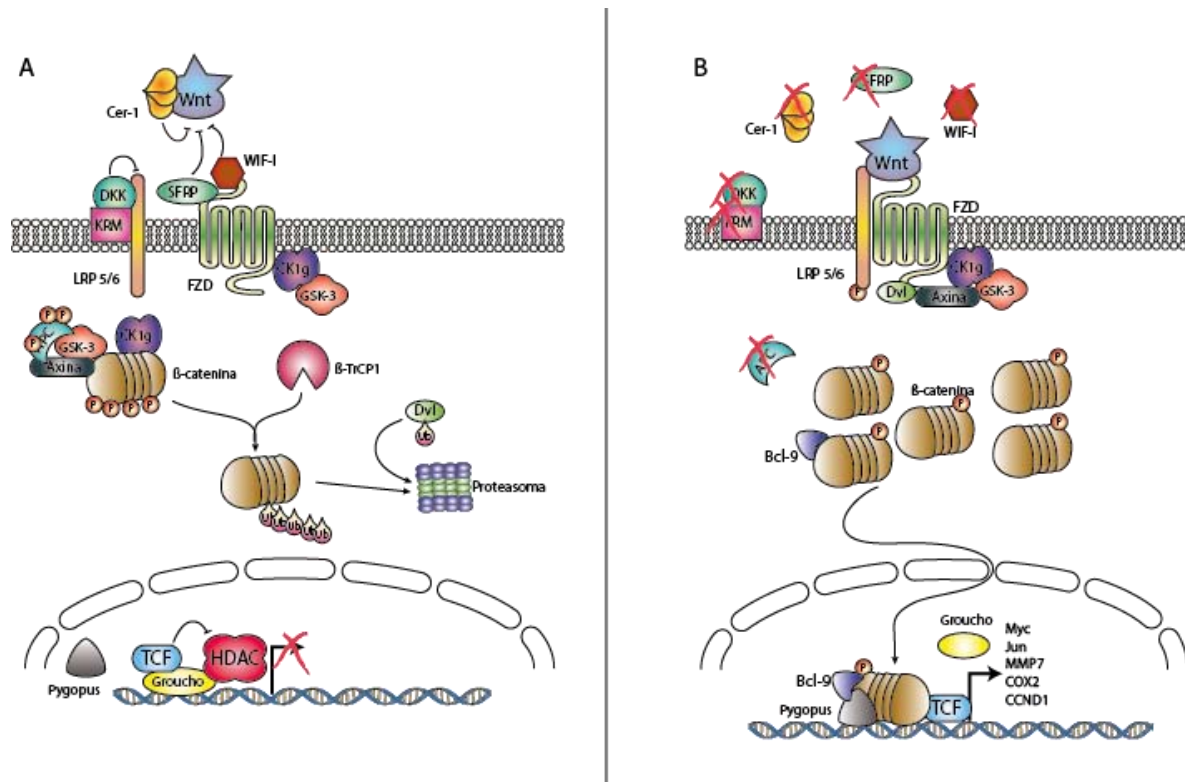


Figura 7. Posibles escenarios en la vía de señalización Wnt/β-Catenina dependiendo de la funcionalidad de APC, A) Cuando APC es funcional, la vía de señalización opera de manera normal teniendo como resultado la degradación de β-Catenina. B) Cuando existen alteraciones en APC, no se forma el complejo de ubiquitinación, resultando en la acumulación de β-Catenina en el citoplasma y su posterior translocación al núcleo.

El gen *Rb1* es otro gen supresor de tumores que interactúa con la familia de factores de transcripción E2F y es un regulador clave para el comienzo de la división celular, promueve la transición de G0 – G1 cuando esta fosforilado por CDK3/Ciclina-C y detiene el ciclo celular si el DNA se encuentra dañado, evitando la multiplicación de

estas células, por tanto, tiene un papel muy importante como regulador proliferativo (Fig. 8). La desregulación de estos genes supresores de tumores puede desencadenar que la célula adquiera diversas características distintivas de una célula tumoral, esto conlleva a la formación o progresión de la neoplasia (Dimaras et al., 2015).

Además de la funcionalidad de estos genes y sus productos, existen distintas moléculas que tienen un papel clave en la regulación de la expresión génica, un ejemplo son los factores de transcripción o algunas moléculas de RNA no codificante como los microRNAs, los cuales se encuentran desregulados en diversos tipos de cáncer (Calin & Croce, 2006).

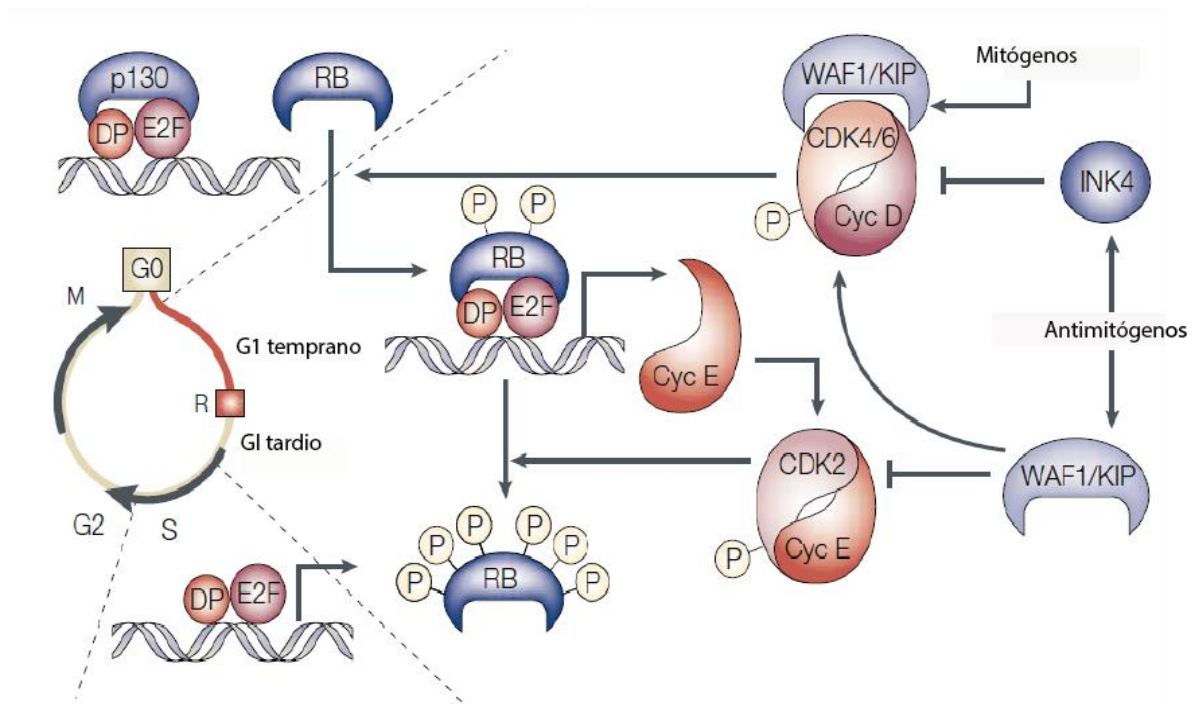


Figura 8. Esquema funcional de pRb durante el ciclo celular. La funcionalidad de este regulador de ciclo celular está determinada por su estado de fosforilación. Alteraciones en este regulador dan como resultado la progresión del ciclo celular aun cuando se encuentren mutaciones o daños en el genoma.

3.5 *microRNAs como reguladores de la expresión genética.*

Un mecanismo de regulación de la expresión genética son los microRNA's (miRNA), los cuales son moléculas pequeñas de RNA de aproximadamente 20 nucleótidos no codificantes, son transcritas por la RNAPol II, tienen procesamiento nuclear y maduración citoplasmática por medio de diversos complejos enzimáticos que dan como resultado un microRNA maduro funcional (Fig. 9) (Lin & Gregory, 2015).

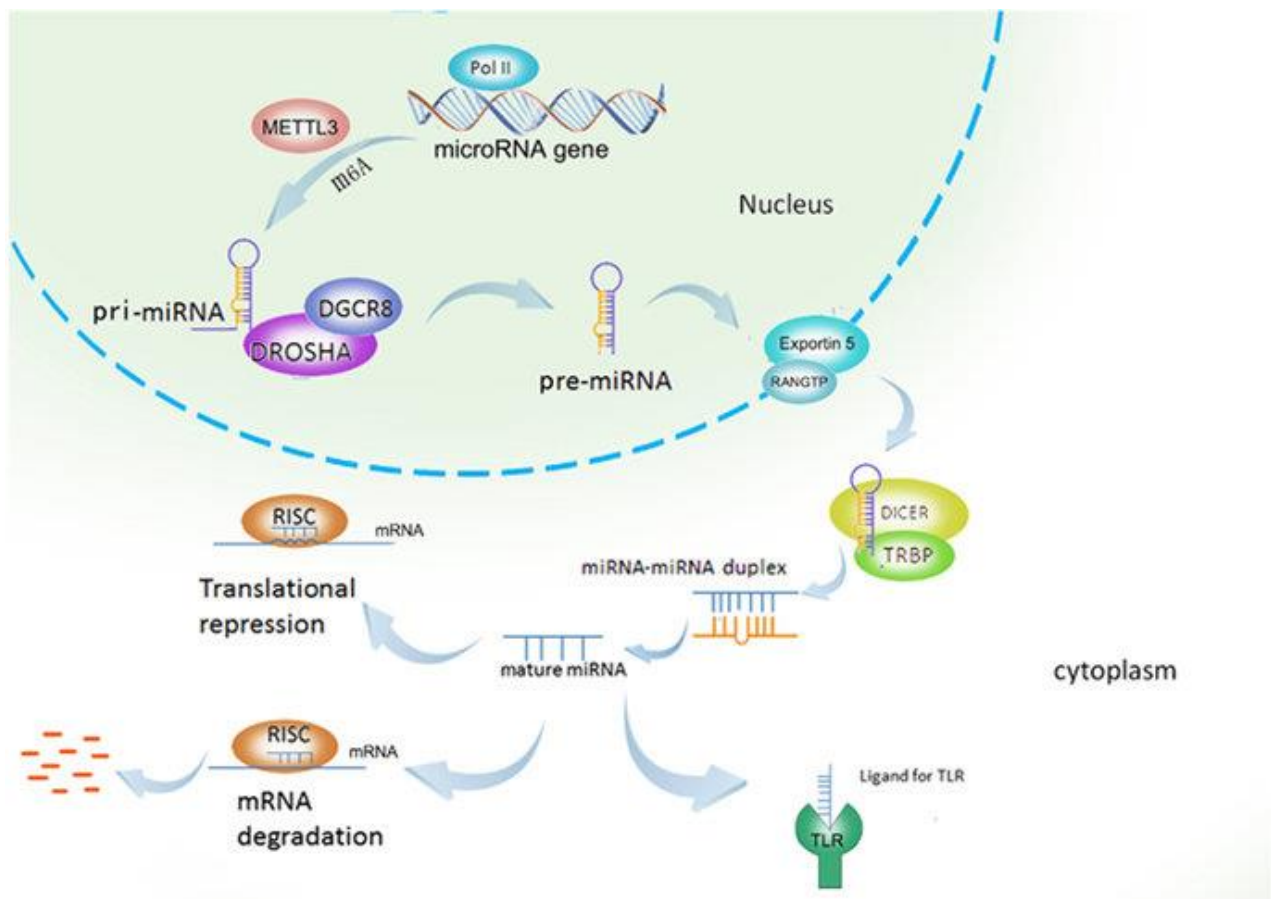


Figura 9. Modelo de biogénesis de microRNAs, transcripción, procesamiento nuclear por el complejo DGCR8/DROSHA, exportación del transcrito al citoplasma para su maduración e incorporación al complejo RISC, finalmente sus dos posibles escenarios en cuanto a la regulación de su mensajero blanco, ya sea represión traduccional o degradación del mensajero blanco.

Estos RNAs no codificantes son capaces de reconocer una parte de la región 3'UTR de su mensajero blanco y unirse a ella por complementariedad de bases (Fig. 10), el resultado de esta unión es el silenciamiento de dicho mensajero (Jiang, Chen, Alattar, Wei, & Liu, 2015). De esta manera estos microRNAs funcionan como reguladores de la expresión genética a nivel traduccional, por tanto, las variaciones en el nivel de expresión de estos microRNAs conlleva a cambios fenotípicos celulares por las variaciones en los niveles de proteína (Bentwich et al., 2005).

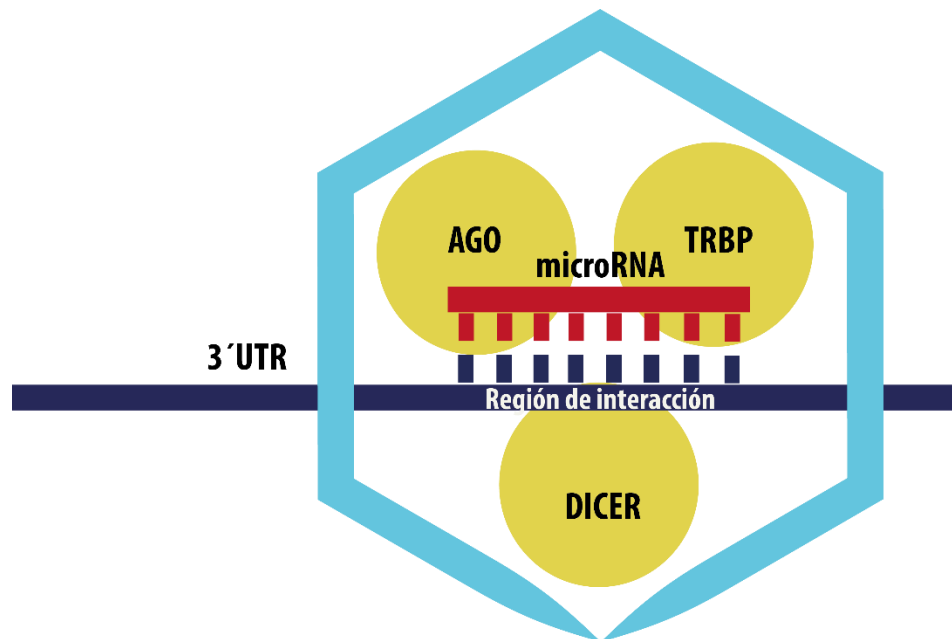


Figura 10. Estructura del complejo RISC y microRNA interactuando con la región 3'UTR del mensajero blanco.

Existe evidencia que demuestra que la expresión de microRNAs se encuentra desregulada en la mayoría de los tipos de cáncer, por este motivo pueden funcionar como oncogenes o supresores de tumor, se ha visto que esta desregulación repercute directamente en las características distintivas de las células tumorales, incluidas el mantenimiento de señales proliferativas, evasión de la supresión de crecimiento y resistencia a la muerte celular programada (Apoptosis) (Peng & Croce, 2016).

Teniendo en cuenta el contexto anterior, si los mensajeros blanco de estas pequeñas moléculas de RNA son genes supresores de tumor, como por ejemplo p53, Rb1, APC, PTEN, esta interacción tendrá como resultado una baja expresión de estos genes y a la posible formación o progresión del cáncer.

Un importante estudio, y de hecho, el primero que se realizó de estas moléculas de RNA en CCR se debe a Michael y colaboradores (2003) en donde determinaron que los microRNAs miR-145 y miR-143 son factores potenciales en la tumorigénesis de colon. Tres años más tarde en un estudio realizado por Xi *et al.*, (2006) se encontró la sobre expresión significativa de miR-191 y miR-200 que tienen como blanco predicho a p53 en células HCT116 derivadas de cáncer de colon, también se determinó la desregulación de 10 microRNAs (miR-30, miR-181, let-7g, miR-26aa, let-7b, miR-15, miR-27a, miR-200c, miR-191 y miR-30c).

En nuestro grupo de trabajo se ha detectado en un modelo de cáncer CCR en ratón una relación inversa entre los niveles de expresión de miR-26a y los genes supresores de tumor *APC* y *Rb1*.

Con base en estos datos y en un análisis bioinformático preliminar en el cual pudimos encontrar regiones de interacción entre miR-26a y los mensajeros de los genes *APC* y *Rb1* (Fig.11) podemos especular que hay una regulación directa de miR-26a hacia los mensajeros de *APC* y *Rb1* en CCR.

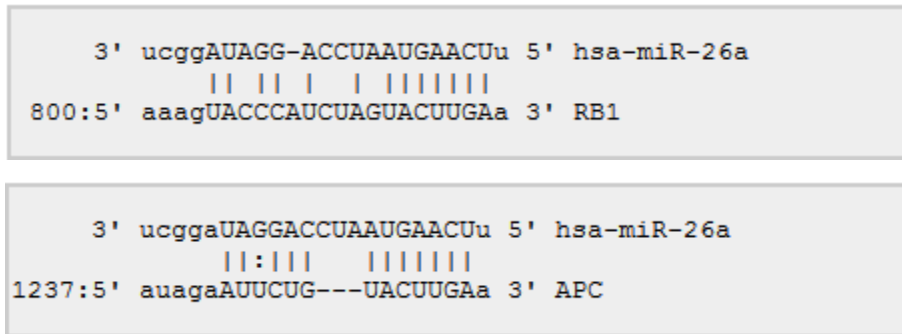


Figura 11. Análisis bioinformático donde se muestran la región de hibridación de APC y Rb1 con miR-26a, las líneas verticales indican los nucleótidos complementarios entre el miRNA y la región de hibridación del mensajero blanco, tomado de *microna.org*.

4 HIPÓTESIS

- miR-26a regula negativamente la expresión de los genes APC y Rb1 en cáncer colorrectal

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Analizar la regulación ejercida por miR-26a en los mensajeros de los genes APC y Rb1, asociados a cáncer colorrectal.

5.2 Objetivos Particulares

- Analizar *in silico* la región 3' no traducida (UTR) de los genes APC y RB1 para determinar su posible interacción con miR-26a.
- Clonar la región 3'UTR de los mensajeros de APC y RB1.
- Determinar el efecto de miR-26a en los niveles de expresión de APC y RB1 mediante actividad de luciferasa en células HCT116.

6 MATERIALES Y MÉTODO

Para realizar el ensayo de luciferasa, fue necesaria la generación de diversas herramientas de trabajo descritas a continuación.

6.1 *Análisis bioinformático*

Se realizó obteniendo las secuencias de las regiones 3'UTR de los mensajeros de los genes *APC* (NM_001127511) y *Rb1* (NM_000321) de la base de datos GeneBank, para generar secuencias de primers, los cuales contienen sitios de restricción para las enzimas BcuI(SpeI) y MluI Thermo Scientific, se utilizaron los programas bioinformáticos CLC Sequence Viewer7® y Oligo Calculator version 3.26.

6.2 *Amplificación de las regiones 3'UTR*

Para obtener las regiones 3'UTR de los mensajeros de *APC* y *Rb1*, a partir de RNA de células CRL-1790 derivadas de epitelio de colon ATCC® se generó cDNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa Retrotranscriptasa (RT-PCR por sus siglas en inglés) utilizando la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega®) y primers Oligo(dT) incubandolo 60 min. a 42°C, las concentraciones se indican en la Tabla 1A. Utilizando dicho cDNA se realizó la amplificación de las regiones mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCRpf. por sus siglas en inglés). Para el caso de la región del mensajero del gen *APC* se utilizó el kit Herc II Fusion DNA Polymerases (Agilent Technologies®) especializada en amplificación de fragmentos largos (ver Tabla1) y se establecieron las condiciones de amplificación con una temperatura de alineamiento (Tm) de 54° y 2 minutos de tiempo de elongación. Para la región del mensajero del gen *Rb1*, se utilizó el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation) (ver Tabla1). con 58° de Tm y 2min. de elongación.

RT-PCR	
Reactivo	Concentración Final
M-MLV 5X Reaction Buffer	1X
Templado de RNA	2µl
Oligo (dT)	1µl
dNTP's	10mM cada uno
M-MLV RT	200 unidades
Volumen final 25ml	

Rb1	
Reactivos	Concentración final
GoTaq R.Buffer	1x
dNTP's	0.2nM cada uno
Primers (ambos)	0.1µm cada uno
GoTaq DNA Pol.	1.25 unidades
Templado de DNA	250ng
Volumen final 50µl.	

APC	
Reactivos	Concentracion Final
Herculase R. buffer	1X
Herc. II DNA Pol.	1 unidad
dNTP's	400µm cada uno
Primers (ambos)	0.25µm
Templado de DNA	250ng
DMSO	4% vol. final
Volumen final 50µl.	

Tabla 1. Concentraciones de reactivos requeridas para las reacciones de PCR; A) Retrotranscriptasa B) PCRpf para amplificar la región 3'UTR de Rb1 C) PCRpf para amplificar la región 3'UTR de APC.

6.3 Generación de construcciones

Las construcciones para realizar el ensayo de luciferasa se generaron utilizando metodologías estándar en ingeniería genética (Feinbaum & Feinbaum, 2001). Posterior a la amplificación se purificaron los productos de PCR obtenidos mediante el kit Invitrogen PureLink® y se digirieron, tanto las regiones amplificadas como el vector de expresión pMIR-REPORT (Ambion®) con las enzimas de restricción MluI y

BcuI(SpeI) (© 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.) durante 2hrs. con una concentración de Buffer Tango1X, 1µl [4 unidades] de BcuI (SpeI), 2µl [8 unidades] de MluI y 1µg de amplicon purificado, en un volumen final de 20µl para generar los sitios protruyentes de ligación de las regiones amplificadas al vector de expresión.

La ligación de la región 3'UTR de *APC* y *RB1* se llevó a cabo en vector pMIR-REPORT (Ambion®) que forma parte del sistema reportero de luciferasa y contiene el gen de selección para antibiótico Ampicilina. Ligar estas regiones se logró utilizando 1U de la enzima T4 DNA Ligasa (Thermo Fisher Scientific Inc.), T4 DNA Ligase buffer 1X, 40ng pMIR REPORT (Ambion®), 160ng de ambas regiones 3'UTR, H₂O libre de nucleasas en un volumen final de 20µl.

Posterior a la ligación se transformaron bacterias XL Gold ultracompetentes obtenidas en el laboratorio de Oncogenómica (L-11 UBIMED, FESI), se aislaron las colonias que contuvieran dicha construcción identificándolas por su crecimiento en el medio Luria Bertani (LB) agar con antibiótico de selección que en este caso fue Ampicilina (A9393 Sigma). Cada colonia aislada se incubo para su crecimiento en 3ml de medio LB liquido durante 24 horas. Se procedió a extraer el plásmido mediante el kit Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.).

6.4 Secuenciación

Una vez extraído el plásmido de las bacterias transformadas, se verifico la presencia de los insertos (*APC* y *Rb1*) utilizando las enzimas de restricción empleadas para generar las construcciones (BcuI(SpeI) y MluI) y se secuenciaron utilizando el kit Big Dye Terminator Ready Kit (Perkin Elmer) y se analizaron en un secuenciador ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems).

6.5 Transfección

Para poder realizar los ensayos de luciferasa se transfectaron células HCT116 (ATCC® CCL-228™) derivadas de carcinoma de colon obtenidas del laboratorio de Oncogenómica (L-11 UBIMED, FESI) que fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI por sus siglas en inglés, Glibco®) suplementado con 10% de suero fetal bobino (SFB, Bio WEST) bajo condiciones de CO₂ de 5% a una temperatura de 37° en cajas de 6 pozos.

Se transfectaron 500 000 células por pozo utilizando el agente de transfección

Siport Transfection Agent (Ambion®) que se emplea para transfección de moléculas pequeñas, en este caso el Mimic miR-26a (Ambion®). Para la construcción de *APC* y *Rb1* en el vector de expresión pMIR_REPORT se utilizó el agente de transfección Lipofectamine® 2000 reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) el cual es empleado para la transfección de moléculas grandes. Tanto para el Mimic miR-26a, como para las construcciones de los genes, se generaron primero los liposomas (Mix1, ver tabla2), y posteriormente se incorporaron los correspondientes ácidos nucleicos a dichos liposomas (Mix2, ver tabla 2). Las células se mantuvieron a 37°C con medio RPMI con 2% de SFB bajo condiciones de 5% de CO₂ durante 48 horas.

A		B	
Transfección con siPORT		Transfección con Lipofectamina	
MIX1		MIX1	
siPORT	10µl	Lipofectamina	10µl
Optimem	290µl	Plus Reagent	4µl
MIX2		MIX2	
miR-26a Mimic	100nmol	Plásmido	250ng
Optimem	290µl	P. Galactosa	500ng
		Optimem	X para 250µl

Tabla 2. Concentraciones de reactivos requeridas para la transfección de las construcciones; A) Reactivos y concentraciones requeridos para transfectar Mimic miR-26a con el agente de transfección siPORT B) Reactivos y concentraciones requeridos para transfectar las construcciones de ambos genes con el agente de transfección Lipofectamina.

6.6 Ensayo de luciferasa

48 horas postransfección se realizó el ensayo del sistema reportero de luciferasa de acuerdo con el protocolo de Applied Biosystem- Dual-Light®, System Chemiluminescent Reporter Gene Assay System for the Combined Detection of Firefly Luciferase and β -Galactosidase. Se aislaron las proteínas mediante un lisado de células con la solución de lisis incluida en el Kit para posteriormente realizar el ensayo de detección de quimioluminiscencia. La detección de la actividad de luciferasa se realizó empleando cajas Greiner para luminómetro de 96 pozos y agregando a un luminómetro GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega Corporation) los sustratos para la reacción (Luciferina y β -Galactosidasa).

Los valores obtenidos de quimioluminiscencia fueron graficados con el software GraphPad Prism 5.

6.7 Análisis bioinformático de las regiones 3'UTR

Para analizar gráficamente las posibilidades de hibridación de miR-26a con las 3'UTR de los mensajeros de *APC* y *Rb1* Se analizaron las estructuras probables de las regiones 3'UTR mediante el software mfold web server University at Albany (Zuker, 2003).

7 RESULTADOS

Con las secuencias obtenidas mediante el análisis bioinformático se generaron los siguientes primers; **APC** Fw:5'-ACT AGT AA GAGA GGA AGA ATG AAA CT-3' que hibrida del nucleótido 8692 al 8711, Rv:5'-ACG CGT TGC TAT CTC CAT TGT TT-3' que hibrida del nucleótido 10785 al 10798 (Fig. 13), **Rb1** Fw:5'-ACT AGT GGA TCT CAG GAC CTT GGT GG-3' que hibrida del nucleótido 2954 al 2973, Rv:5'-ACG CGT TTA AGA CTC TTA ACA ACT AAT TT-3' que hibrida del nucleótido 4750 al 4772(Fig. 12). Estos primers permiten amplificar las regiones 3'UTR de ambos mensajeros, como se muestra en las figuras 12 y 13.

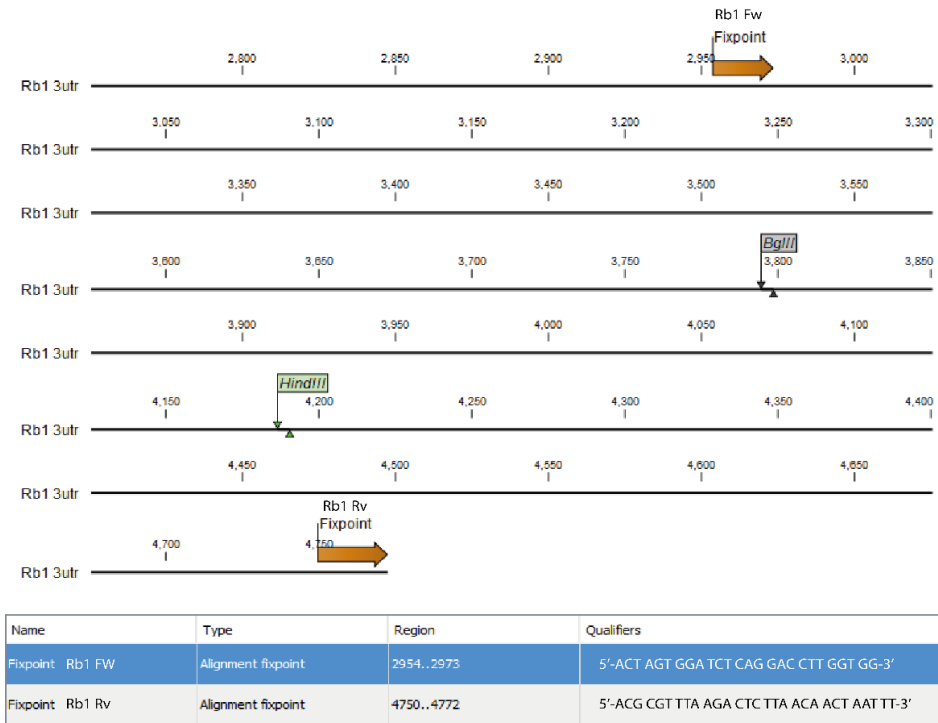


Figura 12. Alineamiento de los primers generados para la región 3'UTR del mensajero de Rb1. Se muestra la región de hibridación de cada primer y su secuencia de nucleótidos tomados de GeneBank secuencia NM_000321.

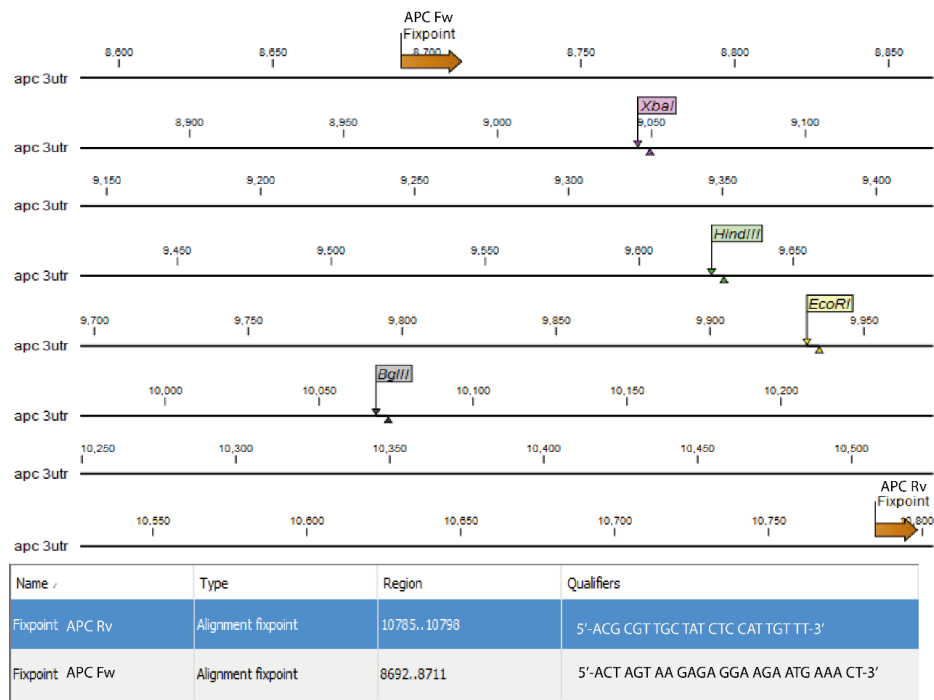


Figura 13. Alineamiento de los primers generados para la región 3'UTR del mensajero de APC. Se muestra la región de hibridación de cada primer y su secuencia de nucleótidos tomado de GeneBank secuencia NM_001127511.

Con los primers diseñados se amplificaron las regiones 3'UTR de los mensajeros de los genes *APC* y *Rb1* por medio de PCRpf. Las bandas reveladas en el gel de agarosa de la figura 14 muestran dichas regiones en sus respectivos tamaños en pares de bases, posteriormente digeridos con las enzimas de restricción (Fig. 15).

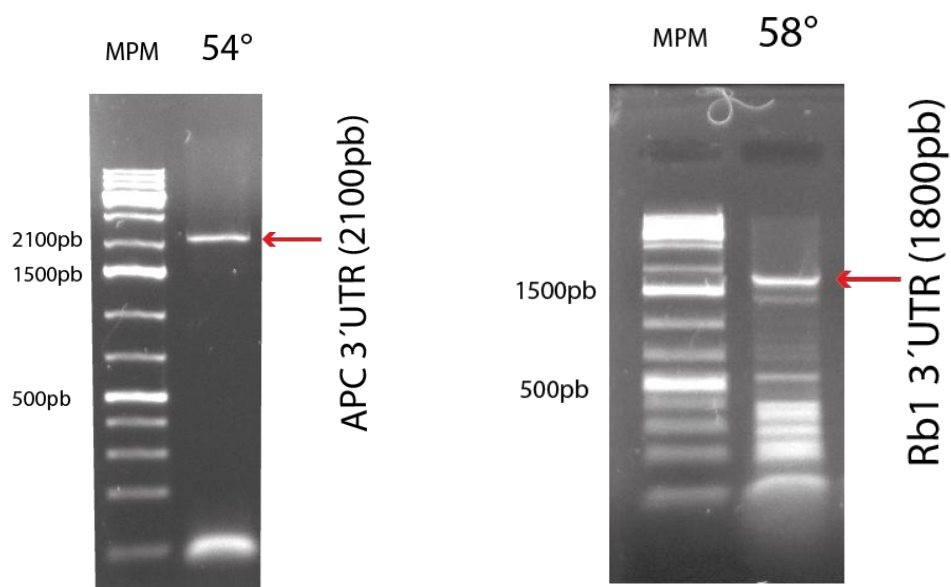


Figura 14. Amplificación de las regiones 3'UTR donde se muestra en un gel al 1% de agarosa las bandas correspondientes a cada amplicón con referencia en el marcador de peso molecular (MPM).

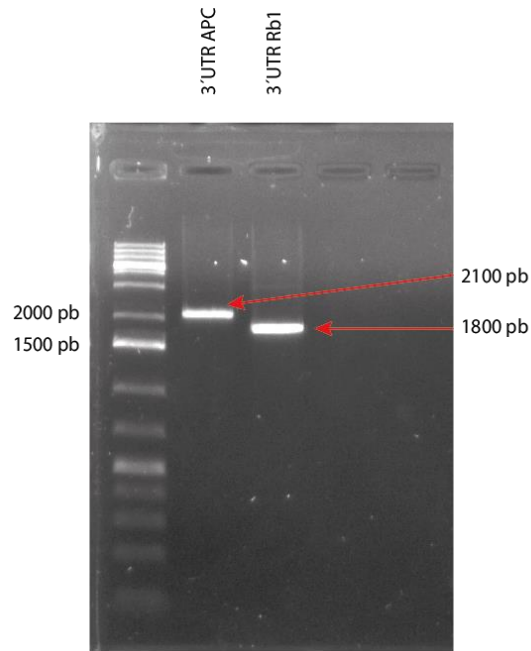


Figura 15. Gel al 1% de agarosa donde se muestran los amplicones digeridos con las enzimas de restricción *BcuI*(*SpeI*) y *MluI* de APC y *Rb1*, las bandas coinciden en su peso con respecto al marcador de peso molecular.

Una vez generados los sitios de restricción y ligadas las regiones 3'UTR de ambos genes al vector de expresión, se realizó la transformación de dichas construcciones. Se aislaron y analizaron, para el caso de APC 25 colonias de bacterias extrayendo el plásmido. De las 25 colonias solamente una de ellas presumiblemente contenía la construcción requerida, como puede verse en el gel de la figura 16, donde se observa en un gel de agarosa, las digestiones realizadas por medio de enzimas de restricción, en el carril 6, la colonia número 5 se muestra el inserto que en este caso es la 3'UTR de APC liberada del vector de expresión.

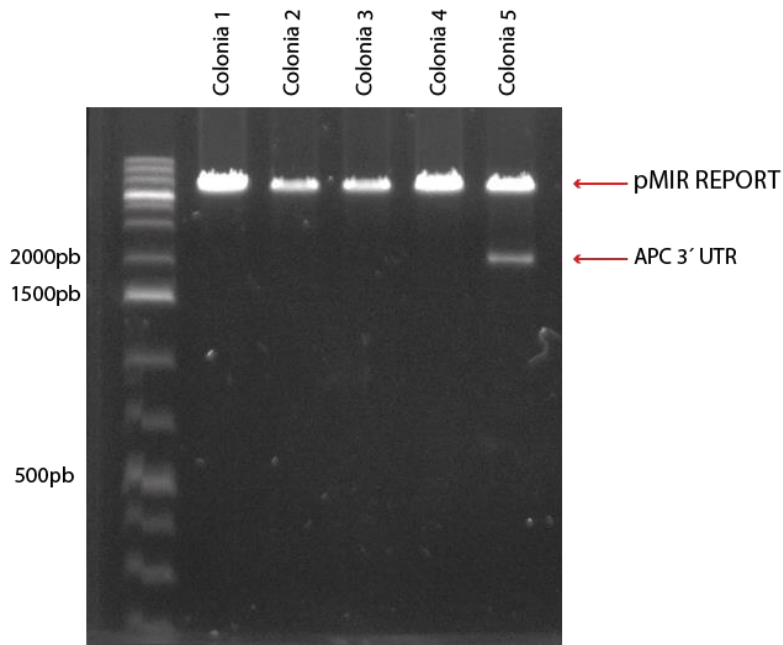


Figura 16. Gel al 1% de agarosa representativo de la verificación por restricción de los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con la construcción de APC, donde se muestran 5 de las 25 colonias aisladas, de acuerdo a la verificación por restricción, solamente la colonia 5 contiene el inserto requerido en la construcción.

Para el caso de Rb1, se aislaron y analizaron 25 colonias extrayendo el plásmido. De las colonias aisladas, 6 fueron las que presumiblemente contenían la región requerida para la construcción como se puede observar en la figura 17, donde se muestra un gel al 1% de agarosa con las verificaciones por restricción de las colonias, de las cuales solamente las numero 1,3,5,7,8 y 11 contenían la región requerida para la construcción

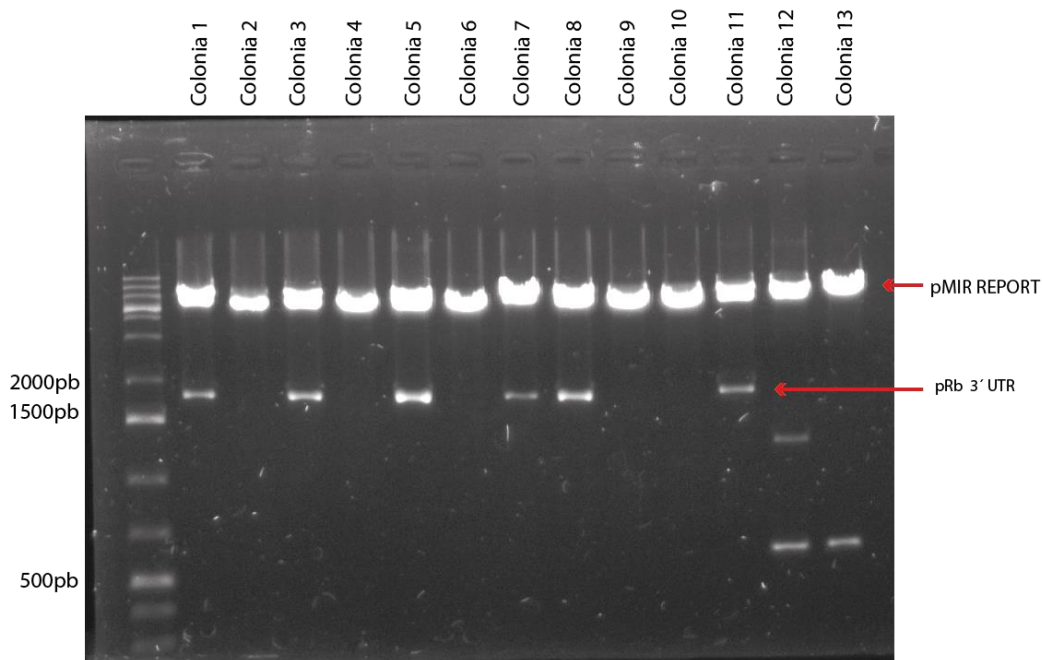


Figura 17. Gel al 1% de agarosa representativo de la verificación por restricción de los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con la construcción de Rb1, se muestran 13 de las 25 colonias aisladas, de acuerdo a la verificación por restricción, solamente las colonias 1,3,5,7,8 y 11 contienen el inserto requerido en la construcción.

El plásmido obtenido de las colonias se secuenció mediante el método de secuenciación Sanger y corroboramos que las construcciones tuvieran las regiones correspondientes a APC y Rb1 (Fig. 18).

Una vez corroborada la secuencia de las construcciones, se transfectaron células HCT116 derivadas de cáncer de colon en las que se realizaron los ensayos de luciferasa.

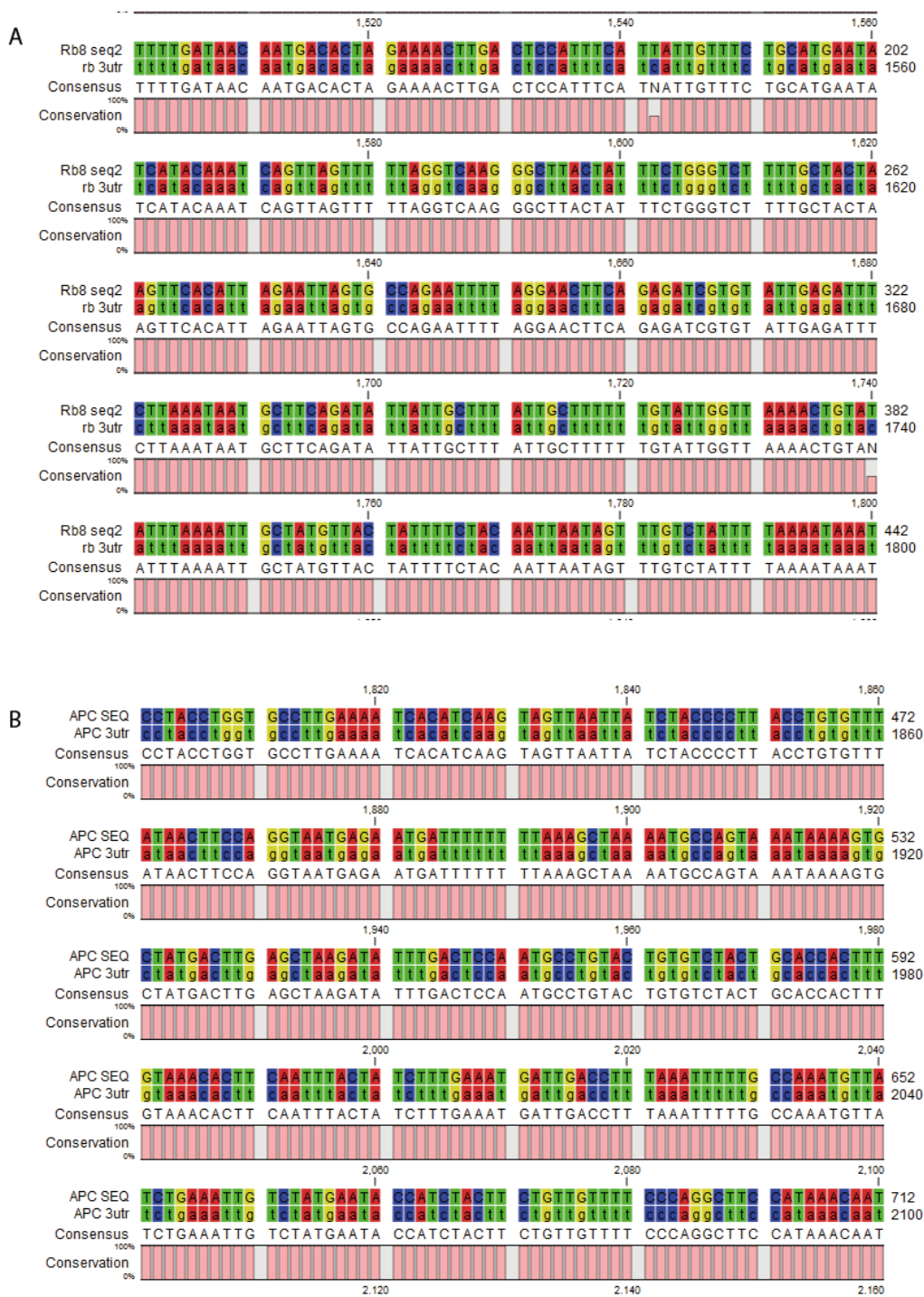


Figura 18. La imagen muestra parte de los alineamientos que se realizaron con los resultados de la secuenciación y sus respectivas 3'UTR; A) se muestra el resultado de la secuenciación de Rb1 y el alineamiento con la secuencia obtenida en la base de datos GeneBank. B) resultado de la secuenciación de APC y el alineamiento con la secuencia obtenida en la base de datos GeneBank. Cada nucleótido, indicado con un color distinto para distinguir la semejanza de las secuencias.

La actividad relativa de luciferasa en el caso de *Rb1* muestra una disminución en comparación al grupo control (plásmido vacío) logrando observar la regulación que ejerce miR-26a sobre el mensajero de este gen (Figura 19 A).

En un ensayo previo realizado por nuestro grupo de trabajo en células HCT116 derivadas de cáncer colorrectal, empleando solamente la región de interacción con miR-26a de la región 3'UTR de *Rb1* (figura 19 B) se puede observar una reducción similar en la actividad de luciferasa tanto con la región completa como con la región semilla.

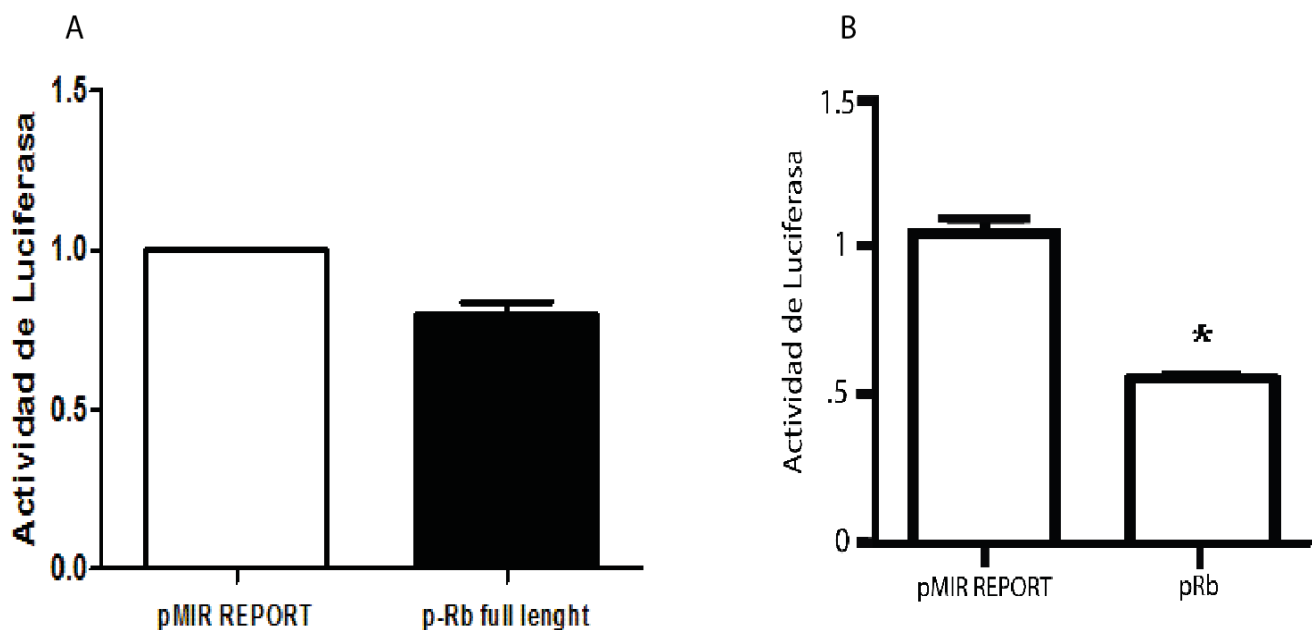


Figura 19. Actividad de luciferasa, A) región 3'UTR completa del mensajero de *Rb1*, B) región de interacción para miR-26a de la región 3'UTR del mensajero de *Rb1*, se observa una tendencia similar en ambos casos.

En la figura 20 se muestran los ensayos de luciferasa realizados con la región 3'UTR del gen *APC*. En el ensayo con la región de interacción, miR-26a ejerce su efecto

regulatorio y se observa una disminución en la actividad de la luciferasa en comparación al grupo control (Figura 20 B). Mientras que el ensayo en el que se evaluó la región 3'UTR completa, el resultado fue contrastante; incluso, se observó un aumento en la actividad de luciferasa (Fig. 20 A).

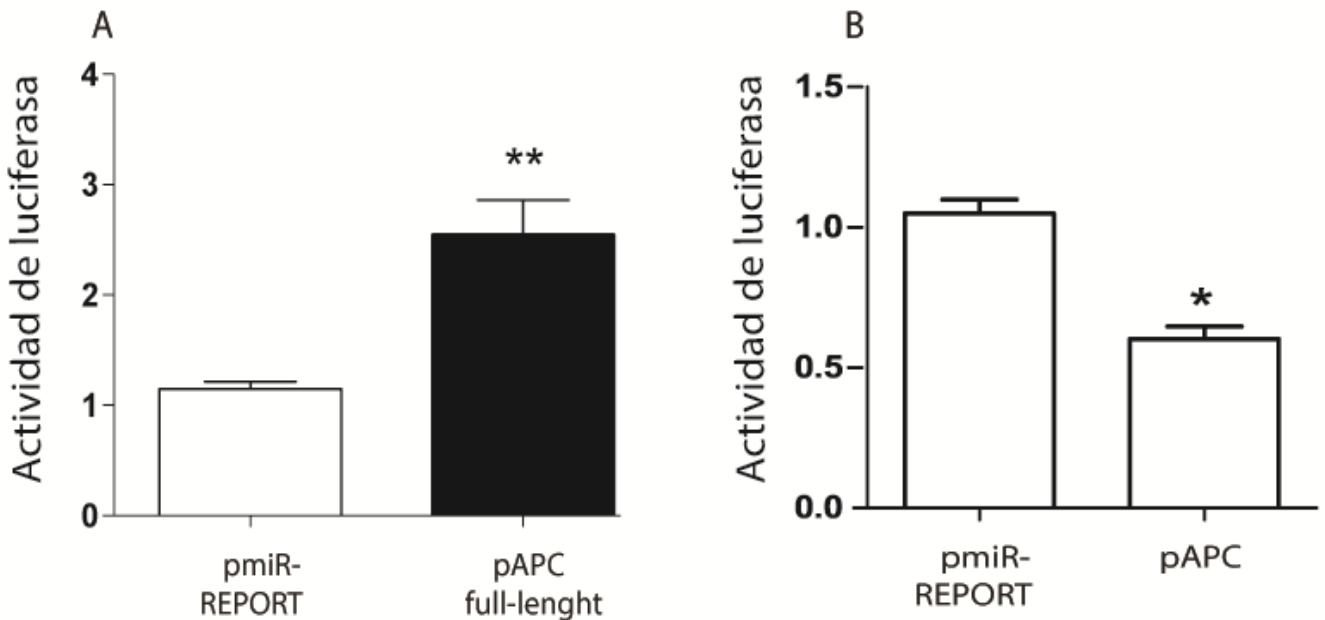


Figura 20. Actividad de luciferasa, A) región 3'UTR completa del mensajero de APC, B) región de interacción para miR-26a de la región 3'UTR del mensajero de APC, se observan tendencias distintas entre ambos, en el caso de pAPC full-length no se muestra una regulación por miR-26a.

Las diferencias obtenidas con la región 3'UTR completa y la región de interacción, pueden deberse a la disponibilidad de nucleótidos en la región de interacción en el contexto de la estructura secundaria que forma el transcrito completo. Como una aproximación inicial a la explicación de este fenómeno, se analizó *in silico* la probable estructura secundaria de la región 3'UTR de los mensajeros de APC y Rb1 mediante el software de University at Albany (Zuker, 2003), tomando la estructura que el software indicó que tenía la mayor probabilidad de generarse, con una $\Delta G = -495.40$ kcal/mol, podemos observar las predicciones de estructuras secundarias que puede adoptar la región 3'UTR completa de los mensajeros (Fig. 21 y 22).

En el caso de Rb1 (Fig. 21) la región de hibridación de miR-26a se encuentra en una estructura con 2 bucles y un tallo, la predicción de la estructura secundaria sugiere

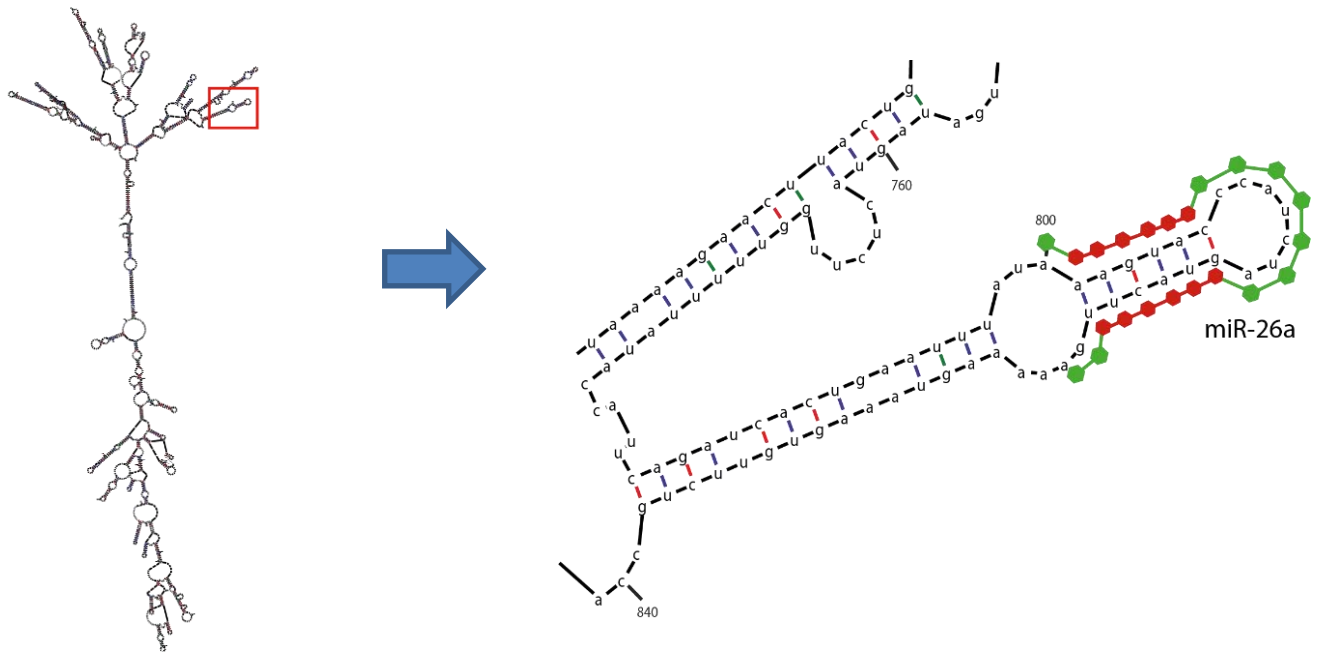


Figura 21. Representación gráfica de la región 3'UTR de Rb1, a la izquierda se puede observar esta región completa y en rojo señalada la región de hibridación de miR-26a, a la derecha se muestra una ampliación de la región de hibridación, los nucleótidos marcados en verde son los que se encuentran disponibles para la hibridación, los nucleótidos marcados con rojo, están hibridados y no se encuentran disponibles.

que los nucleótidos marcados en rojo no presentan disponibilidad de hibridación con miR-26a, ya que se encuentran hibridados entre sí, solo los nucleótidos marcados en verde son los que podrían estar disponibles para que miR-26a pueda hibridar en esta región.

Analizando la región 3'UTR completa de APC, encontramos que la predicción de la estructura secundaria sugiere que la unión a la región semilla de miR-26a es aún menos probable, por la posible estructura que forma, como se puede apreciar en la figura 22.

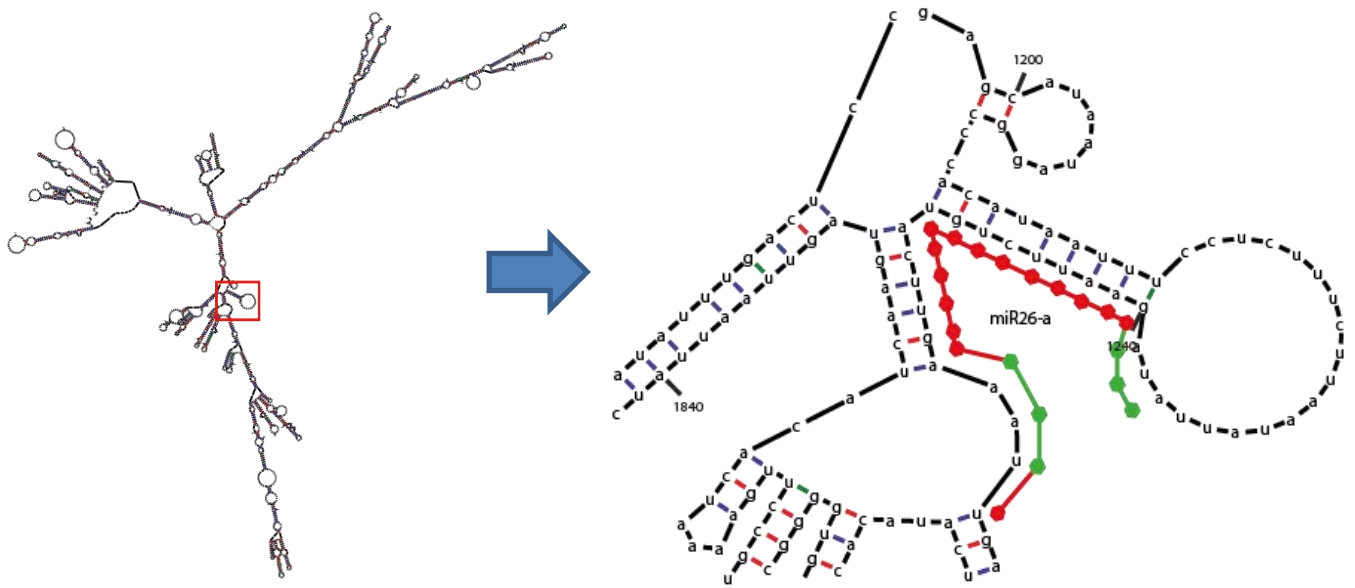


Figura 22. A la izquierda se observa la región 3'UTR completa de APC con el sitio de hibridación señalado en rojo, a la derecha una ampliación de la región y el sitio de hibridación marcado, los nucleótidos marcados en verde son los que se encuentran disponibles para la hibridación, los nucleótidos marcados con rojo están hibridados y no se encuentran disponibles.

8 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de actividad relativa de la luciferasa mostraron que miR-26a es capaz de regular al mensajero de *Rb1* mediante la hibridación a su región 3'UTR, mientras en el mismo ensayo, el mensajero de *APC*, no muestra una disminución, sino un aumento en la actividad relativa de la luciferasa. En los ensayos realizados con la región de interacción para miR-26a de estos mensajeros se pudo observar regulación negativa tanto en *APC* como en *Rb1* reflejada en la disminución de la actividad de luciferasa. Sin embargo, debemos recordar que en un sistema biológico, los mRNA maduros de *APC* y *Rb1* no contienen únicamente la región de interacción con miR-26a en su extremo 3'UTR, sino que encontramos las regiones 3'UTR completas; si tenemos en cuenta la longitud de estas regiones y las estructuras de segundo orden que pueden formar, la región de

interacción puede o no estar disponible. En este caso los resultados indican que no es así; pensamos que miR-26a no ejerce regulación alguna sobre el mensajero de APC por motivos estructurales de la región 3'UTR.

Existe evidencia de que el hecho de que se encuentren regiones de interacción, no necesariamente implica que exista una regulación de un miRNA sobre su mensajero blanco. Masuda y colaboradores en 2014 encontraron que a pesar de que miR-340 tenía como blancos predictivos a *RPE65*, *RLBP1*, *SOX9*, *OTX2*, y *Lhx2* con dos sitios de unión cada uno, no mostro ningún efecto regulatorio sobre los mensajeros de estos genes. Zeng en 2015 halló sitios de interacción en los mensajeros de los genes *BMPR-2*, *Bmpr1a*, *Smad5*, y *Smad4* para miR-322, pero solamente *Bmpr1a* y *Smad5* mostraron ser reprimidos, es decir, no hubo efecto regulatorio alguno de miR-322 sobre *Smad4* y *BMPR-2*.

Este fenómeno se presenta también en otros organismos como *D. rerio*, en el que Fuller-Carter y colaboradores en 2015 evaluaron la regulación ejercida por miR-233 sobre los mensajeros de los genes *smoc1*, *SB: cb252*, *Irm3* y *si:ch211-51a6 2*, encontrando que regulaba negativamente únicamente a *smoc1* y *SB: cb252*. Estas evidencias nos muestran que el que se encuentre un sitio de interacción no quiere decir que la regulación sea real, los resultados encontrados por Fuller-Carter y Zeng lo aclaran, sin embargo estos investigadores solamente tomaron en cuenta la región semilla de estos mensajeros demostrando así que aun estando presente la región de interacción, esta no se lleva a cabo. Masuda y colaboradores por su parte, utilizaron para sus experimentos las regiones 3'UTR completas, esto nos indica que aun siendo un blanco predicho un mensajero para un microRNA la regulación está sujeta a la disponibilidad de la región de interacción y ésta, de la configuración estructural de la región 3'UTR. Es de suma importancia considerar la región 3'UTR completa para

analizar la regulación ejercida por los microRNAs en sus mensajeros blanco, ya que este modelo se asemeja más a lo encontrado en un sistema biológico.

En este caso nuestros resultados de los ensayos de luciferasa sugieren que miR26a no regula al mensajero de *APC*, y nuestros datos bioinformáticos indican que este fenómeno sucede por motivos estructurales del mensajero de *APC*, es decir, sugieren que la configuración estructural limita la disponibilidad de la región de interacción. Este fenómeno ha sido observado anteriormente, por ejemplo; Lin y Bundschuh en 2015 mencionaron que, para permitir que la regulación postranscripcional de un mRNA se lleve a cabo, debe haber una sinergia, tanto del microRNA como mRNA y que esta cooperatividad puede ser mediada a través de estructuras secundarias, ya que afectan directamente la accesibilidad a los sitios de unión. Además, los autores encontraron que esta cooperatividad está determinada por las secuencias UTR, mientras que consideran que las regiones codificantes son irrelevantes para esta regulación.

Otros trabajos se enfocan en el tamaño que adquiere la región 3'UTR por distintas modificaciones postranscripcionales y la importancia de estas modificaciones, tal es el caso de Miura y colaboradores en 2014, que descubrieron que en las células neuronales la escisión y poliadenilación alternativa puede diversificar las regiones no codificantes a través de la pérdida o ganancia de elementos reguladores, los cuales están involucrados en la unión de proteínas o miRNAs, pueden influir en la eficiencia de la traducción. Esto enfatiza la importancia de la accesibilidad y de las regiones de interacción en las 3'UTR, además de su presencia.

La configuración que puede adoptar la región 3'UTR y la disponibilidad de sitios específicos para la interacción de reguladores traduccionales ha sido explorado por Janowski y colaboradores, que en 2016 encontraron que la proteína de unión a RNA

Roquin, reconoce una estructura exalooop rica en uracilo. De manera interesante, Roquin regula negativamente al mensajero de *OX40* por reconocimiento de una variante de esta estructura la cual se encuentra en la 3'UTR del mensajero de *OX40*. Estos datos corroboran que las estructuras de segundo orden que se presentan en las regiones 3'UTR tienen un papel clave en la regulación de la traducción, por lo que es razonable concluir que el mensajero de *APC* no está sujeto a la regulación por miR-26a debido a su configuración estructural.

Por su parte, el mensajero de *Rb1* muestra una regulación negativa, usando tanto la región completa como solamente el sitio de interacción con miR-26a. Esta interacción corresponde con el modelo canónico de regulación por miRNAs (Hausser & Zavolan, 2014). Con estos resultados concluimos que la regulación de un mensajero por la acción de un microRNA se lleva a cabo cuando la región de interacción se encuentra accesible.

Confirmamos que en cáncer colorrectal el mensajero de *Rb1* es regulado negativamente por miR-26a, de esta forma podría favorecerse la progresión a través de la fase G1-S del ciclo celular. A pesar de las predicciones hechas con el mensajero de *APC*, los datos obtenidos muestran que esta regulación no se lleva a cabo en CCR. Hacen falta más estudios para dilucidar si *APC* es regulado por microRNAs en este tipo de cáncer, ya que esto es uno de los primeros eventos para el desarrollo del mismo.

9 CONCLUSIONES

miR-26a se une a la región 3'UTR del mensajero de *Rb1* regulándolo negativamente.

miR-26a tiene como blanco predicho al mensajero de *APC*, sin embargo, no ejerce una regulación directa sobre el mismo.

El hecho de que exista una región de interacción de un mensajero con un microRNA, no quiere decir que esta interacción ocurra *in vivo*.

10 REFERENCIAS

- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., ... Bentwich, Z. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature Genetics*, 37(7), 766–770. <http://doi.org/10.1038/ng1590>
- Bienz, M. (2002). The subcellular destinations of apc proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), 328–338. <http://doi.org/10.1038/nrm806>
- Boman, B. M., & Fields, J. Z. (2013). An APC:WNT counter-current-like mechanism regulates cell division along the human colonic crypt axis: a mechanism that explains how APC mutations induce proliferative abnormalities that drive colon cancer development. *Cancer Genetics*, 3, 244. <http://doi.org/10.3389/fonc.2013.00244>
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 857–866. <http://doi.org/10.1038/nrc1997>
- Dimaras, H., Corson, T. W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F. L., ... Gallie, B. L. (2015). Retinoblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15021. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2015.21>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](http://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
- Feinbaum, R., & Feinbaum, R. (2001). Introduction to Plasmid Biology. In *Current Protocols in Molecular Biology* (pp. 1.5.1–1.5.17). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/0471142727.mb0105s41>
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer
- Fuller-Carter, P. I., Carter, K. W., Anderson, D., Harvey, A. R., Giles, K. M., & Rodger, J. (2015). Integrated analyses of zebrafish miRNA and mRNA expression profiles identify miR-29b and miR-223 as potential regulators of optic nerve regeneration. *BMC Genomics*, 16(1).
- Gonda, T. J., & Ramsay, R. G. (2015). Directly targeting transcriptional dysregulation in cancer. *Nat Rev Cancer*, 15(11), 686–694. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrc4018>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hausser, J., & Zavolan, M. (2014). Identification and consequences of miRNA-target interactions [mdash] beyond repression of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 599–612. <http://doi.org/10.1038/nrg3765>

- Indovina, P., Pentimalli, F., Casini, N., Vocca, I., Giordano, A., Indovina, P., ... Giordano, A. (2015). RB1 dual role in proliferation and apoptosis: cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget*, *6*(20), 17873–17890. Retrieved from <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=4286>
- Inra, J. A., & Syngal, S. (2014). Colorectal Cancer in Young Adults. *Digestive Diseases and Sciences*, *60*(3), 722–733. <http://doi.org/10.1007/s10620-014-3464-0>
- Jiang, C., Chen, X., Alattar, M., Wei, J., & Liu, H. (2015). MicroRNAs in tumorigenesis, metastasis, diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Cancer Gene Ther*, *22*(6), 291–301.
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., ... Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*, 15065. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *15*(6), 321–333. <http://doi.org/10.1038/nrc3932>
- Lin, Y.-H., & Bundschuh, R. (2015). RNA structure generates natural cooperativity between single-stranded RNA binding proteins targeting 5' and 3'UTRs. *Nucleic Acids Research*, *43*(2), 1160–1169.
- Lynch, H., Lynch, P., Lanspa, S., Snyder, C., Lynch, J., & Boland, C. (2009). Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics*, *76*(1), 1–18. <http://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x>
- Masuda, T., Wahlin, K., Wan, J., Hu, J., Maruotti, J., Yang, X., ... Esumi, N. (2014). Transcription Factor SOX9 Plays a Key Role in the Regulation of Visual Cycle Gene Expression in the Retinal Pigment Epithelium. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(18), 12908.
- Morgan Villela, G., Silva Uribe, A. M., & Sat Muñoz, D. (2008). Factores de riesgo para el cáncer colorrectal. *Gaceta Mexicana de Oncología*, *7*, 12–15. Retrieved from <http://biblat.unam.mx/es/revista/gaceta-mexicana-de-oncologia/articulo/factores-de-riesgo-para-el-cancer-colorrectal>
- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *1*, 15004. <http://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Polsky, D., & Cordon-Cardo, C. (2003). Oncogenes in melanoma. *Oncogene*, *22*(20), 3087–3091. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1206449>
- SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD. (2011). Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. SECRETARÍA DE SALUD.
- Tsai, M.-M., Wang, C.-S., Tsai, C.-Y., Huang, H.-W., Chi, H.-C., Lin, Y.-H., ... Lin, K.-H. (2016). Potential Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Targets of MicroRNAs in Human Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 945.

- Wong, N. A. C. S., & Pignatelli, M. (2002). β -Catenin—A Linchpin in Colorectal Carcinogenesis? *The American Journal of Pathology*, *160*(2), 389. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1850660/>
- Zeng, Y., Liu, H., Kang, K., Wang, Z., Hui, G., Zhang, X., ... Gou, D. (2015). Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of miR-322: potential role in proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Scientific Reports*, *5*.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3406.