



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFEECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA LIGASA DE UBIQUITINA
RNF189 POR EL microRNA-7 EN LA ACTIVIDAD DEL SUPRESOR
DE TUMORES P53**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA

Biol. Erick Israel Pérez García

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva
Instituto de Biotecnología - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Susana López Charreton (IBT-UNAM)
Dr. Mario Enrique Zurita Ortega (IBT-UNAM)

Cuernavaca, Morelos. Noviembre 2017



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.

Visto Bueno del Tutor
Revisión de tesis de Maestría.

31 / Octubre / 2017

Subcomité Académico

Yo Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva
Tutor (asesor de tesis) del estudiante: Erick Israel Pérez García

Manifiesto haber leído, revisado y corregido el manuscrito de tesis que lleva como título:

Efecto de la inhibición de la ligasa de ubiquitina RNF189 por el microRNA-7, en la actividad del supresor de tumores p53.

Por lo que autorizo a que sea entregado para su revisión a los sinodales que el Subcomité Académico asigne para la obtención del grado de Maestro en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente



Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva
Tutor

ERICK ISRAEL PEREZ GARCIA

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del día 20 de junio del 2017 el Subcomité Académico acordó nombrar el siguiente jurado para Examen de Maestría en Ciencias, con **No.de cuenta 305325037** con la tesis titulada, **"Efecto de la inhibición de la ligasa de ubiquitina RNF189 por el microRNA.7, en la actividad del supresor de tumores p53"** dirigida por el **Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva.**

Presidente	Dr.	Luis Fernando Covarrubias Robles
Secretario	Dr.	José Luis Reyes Taboada
Vocal	Dra.	María de Lourdes Gutiérrez Xicotencaltl
Vocal	Dr.	Sergio Encarnación Guevara
Vocal	Dr.	Tomás David López Díaz

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 22 de junio de 2017



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz
Coordinadora de Docencia

En un plazo máximo de tres semanas, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva en el Laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca Morelos).

Agradezco al Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT 212316 y PAPIIT IN213316) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 154542 Y CONACYT 155290). Así mismo le agradezco a esta institución la beca otorgada para la realización de este proyecto (Numero de becario 575163).

Agradezco en gran manera la Doctora Susana López Charreton y al Doctor Mario Enrique Zurita Ortega del Instituto de Biotecnología de la UNAM por formar parte del comité tutorial y por su disposición al abrirme las puertas de sus laboratorios para la realización de distintos experimentos. También les agradezco a los miembros del jurado por su ayuda y observaciones para con este proyecto.

Finalmente, le agradezco al Sr. Oswaldo López Gutiérrez por su invaluable guía y por toda la ayuda que me brindó durante la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

*Por sobre todas las cosas le agradezco a **DIOS** por todo lo que me ha permitido vivir hasta este punto de mi vida y ser lo que soy y tener lo que tengo. No cabe duda que a lo largo de esta experiencia Tú me has bendecido en gran manera, me guardaste de todo peligro, me sostuviste en fe y valentía, me has bendecido con personas hermosas quienes se han preocupado por mí y siempre verán por mi seguridad y felicidad. Pero, sobre todo es gracias a Ti que me has hecho madurar y adquirir cosas eternas. Me he dado cuenta que no hay nada que no podamos lograr en Tú nombre, que Tú siempre estás conmigo como poderoso gigante, que tus alas me han cubierto y que todas las cosas nos ayuda para bien.*

*Jamás podré dejar de agradecerle a las personas más amorosas, sabias y maravillosas de este mundo...a mis padres, mis ejemplos a seguir ya que "Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes". **Fide, Rebe**, ustedes han sido lo mejor para mí, ustedes han sido la bendición más grande que he tenido. Mi corazón siempre estará agradecido por estar a su lado, no podrán imaginar el gran amor que siento por ustedes y toda la gratitud que les tengo. Muchísimas gracias por su amor incondicional, por el apoyo tan grande que me han brindado, por toda la sabiduría, los consejos y todo el cuidado que han tenido para conmigo durante toda mi vida. Gracias por darme siempre lo mejor y pensar en mí antes que nada. Las palabras no me alcanzan para describir lo importante que son para mí y lo agradecido que estoy con ustedes... Me siento orgulloso poder decir que soy su hijo.*

*No puedo dejar de agradecerle a mi hermanita, **Alba**, quien "en medio de cada tormenta me ha prestado su paraguas y después me ha llevado a ver el arcoíris". Me siento inmensamente feliz por tenerte a mi lado. Ha sido hermoso crecer y compartir todo con una persona que a lo largo del tiempo me demostró que estaría conmigo en todo momento, en los momentos más dulces e incluso cuando más lo necesite. Muchísimas gracias por las sonrisas, las risas, los ánimos, los abrazos, la diversión, los malos consejos y todas las hermosas palabras. Eres inteligente, humilde, cariñosa y noble. Tus hermosas acciones hablan por ti y me inspiran a ser una mejor persona. No podía haberme tocado una hermana mejor que tú, **Albita** hermosa te amo con todo mi corazón.*

*En mi corazón siempre habrá un lugar especial para ti, porque a ti te pertenece y porque tú te lo has ganado día a día ya que a lo largo de estos 7 años me has demostrado un amor verdadero, único, paciente, especial y sobre todo incondicional. **Iliana**, mi osita, llegaste a mí como siempre llegan las cosas buenas, de repente y sin esperar y desde el primer día me has cuidado, aconsejado, ayudado, jamás me dejaste caer, y siempre has sido esa estrella que no ha dejado de iluminar mi vida y que ha brillado intensamente en tiempos de duda y necesidad. Gracias por todos los momentos tan hermosos que hemos vivido, por toda la felicidad que me has regalado, por todo el apoyo, el consuelo que me has brindado, por la paciencia que has tenido al esperarme y sobre todo, gracias por luchar a mi lado y mantener este amor a lo largo de todo este tiempo. Quiero que sepas lo especial, valiosa e importante que eres para mí. Jamás dejaré de amarte, cuidarte y apoyarte... Juntos por siempre y para siempre. Señora Mary, Señor Enrique, les agradezco todo el cariño, los consejos y el apoyo que me brindaron todo este tiempo. Gracias por siempre procurar mi bien y seguridad.*

*No hay nada mejor que llegar a casa y ser recibido con mucho amor. Quiero agradecerle a nuestra mamá quien siempre nos ha cuidado, apapachado y procurado lo mejor para todos nosotros. **Güicha**, muchísimas gracias por el amor tan grande que me has dado jamás dejaré de agradecer todo el amor, abrazos, sonrisas y las cálidas bienvenidas que me has brindado y todas las oraciones que me has dedicado... nunca olvides que siempre estarás en mi corazón.*

***Doctor Gustavo**, mi maestro y mentor. Sin lugar a dudas este logro no hubiera sido posible sin usted. Las palabras no me alcanzarían para agradecerle todo lo que ha hecho por mí. Usted me ha obsequiado algo invaluable y que muy pocos puede ofrecer. Con sus enseñanzas, sus consejos, su apoyo, su guía, y sobre todo sus palabras de ánimo y la disposición que tuvo no importando las dificultades usted me ayudó a crecer mentalmente, académicamente y emocionalmente ya que como usted dijo alguna vez: "uno aprende y madura mucho más cuando falla que cuando todo le sale bien". Jamás dejaré de agradecer toda la ayuda que me brindó sin dudarle, toda la experiencia que me permitió adquirir, toda la confianza que ha puesto en mí y*

todos los buenos momentos que pudimos disfrutar. Doctor, solamente me resta decirle que le estaré eternamente agradecido por lo que ha hecho por mí. ¡Honor a quien honor merece!

*Finalmente, en el Instituto de Biotecnología siempre estuve rodeado de personas hermosas, respetuosas, solidarias, sinceras y sumamente divertidas dentro y fuera del laboratorio. Primeramente, estoy sumamente agradecido con todas las personas que forman parte del **Laboratorio de Neuroinmunobiología** a quienes considero una familia quienes además de recibirme con los brazos abiertos, siempre estuvieron ahí para ayudarme y animarme en todo momento y que hicieron de la investigación algo diferente, único, llegando en algunas ocasiones a hacer del trabajo literalmente un juego. También le agradezco a mis compañeros de generación y a las personas que conocí dentro del IBT, quienes también estuvieron conmigo ayudándome día a día y haciendo del posgrado algo mucho más fácil, divertido y llevadero. Ahora se sin lugar a dudas que si uno quiere hacer grandes cosas en la vida, jamás podrá hacerlo solo.*

...Life Goes On...

Erick Israel-2017

INDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
I.I microRNAs.....	3
I.II Biogénesis de los microRNAs.....	4
I.III Regulación de la biogénesis de los microRNAs.....	5
I.IV Cáncer.....	9
I.V Asociación de los microRNAs con el cáncer.....	10
I.VI Ubiquitina y mecanismo de ubiquitinación.....	12
I.VII Regulación del mecanismo de ubiquitinación y su asociación con el cáncer.....	14
I.VIII <i>Ring Finger Protein 189 (RNF189)</i>	15
I.IX TP 53 “El guardián del genoma”.....	17
II. ANTECEDENTES/JUSTIFICACIÓN.....	22
III. HIPÓTESIS.....	25
IV. OBJETIVOS.....	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
V.I Líneas celulares.....	26
V.II Criopreservación celular.....	26
V.III Plásmidos.....	27
V.IV Anticuerpos.....	27
V.V Análisis bioinformático.....	27
V.VI Transfección transitoria con el microRNA-7 para medir los niveles de RNF189 y evaluar proteínas que controlan la apoptosis por medio de cinéticas a tiempos cortos.....	28
V.VII Transfección transitoria con el microRNA-7 y conteos celulares.....	29
V.VIII Tratamiento con luz Ultravioleta.....	29
V.IX Extracción de proteína total.....	30
V.X Western Blot.....	30
V.XI Determinación de los niveles del microRNA-7 por medio de PCR en tiempo real.....	31
V.XII Análisis estadísticos.....	32
VI. RESULTADOS.....	34
VI.I Las ligasas de ubiquitina identificadas como blancos del microRNA-7 mediante <i>pull down</i> se encargan de regular diferentes procesos celulares relacionados con el proceso de transformación celular.....	34
VI.II La 3’UTR de la ligasa de ubiquitina RNF189 tiene sitios de unión para el microRNA-7.....	34

VI.III	La sobre-expresión del microRNA-7 inhibe la proliferación de la línea celular CaSki.....	37
VI.IV	La sobre-expresión del microRNA-7 promueve apoptosis de la línea celular CaSki dentro de las primeras 24 horas post-transfección.....	39
VI.V	La apoptosis resultante de la sobre-expresión del microRNA-7 no involucra un aumento en los niveles de p53 o de JNK.....	42
VI.VI	La muerte celular provocada por la sobre-expresión del microRNA-7 es específica de la línea celular CaSki.....	44
VII.	DISCUSIÓN.....	48
VIII.	CONCLUSIONES.....	62
IX.	PERSPECTIVAS.....	63
X.	INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	64
X.I	Oligonucleótidos utilizados para determinar los niveles del microRNA-7 en las distintas líneas celulares por medio de PCR en tiempo real.....	64
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	65

RESUMEN

Los microRNAs son RNAs pequeños que regulan finamente la expresión génica de manera post-transcripcional a través de impedir la traducción de sus RNAs mensajeros blanco, por lo que controlan múltiples procesos biológicos como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. La desregulación de la expresión del microRNA-7 puede favorecer al desarrollo de cáncer, ya que dependiendo del contexto celular, éste microRNA puede tener efectos oncogénicos (“oncomiR”) o anti-oncogénicos (“supresor de tumores”). Entre los múltiples blancos de este microRNA se han identificado diferentes ligasas de ubiquitina, de estas la sobre-expresión de la ligasa RNF189 se ha asociado con el desarrollo de cáncer ya que regula procesos fundamentales como la migración, la supervivencia, la proliferación y la muerte celular degradando proteínas como TNFR1, caspasas 8 y 10 y el supresor de tumores p53.

Dado que las células tumorales humanas de cérvix CaSki muestran niveles reducidos del microRNA-7 pero niveles elevados de RNF189, que esta ligasa es un proto-oncogen y que es un blanco potencial del microRNA-7 evaluamos si la función de supresora de tumores del microRNA-7 en cérvix resulta de su capacidad de regular los niveles de expresión de RNF189 y por consecuencia favorecer la muerte de células transformadas.

De acuerdo con esta hipótesis, nuestros resultados muestran que un incremento en la expresión del microRNA-7 en la línea celular CaSki correlaciona con la disminución de los niveles proteicos de RNF189, y que esto es dependiente del contexto celular ya que esto no ocurrió en línea celular A549, donde previamente mostramos que el microRNA-7 funciona como “oncomiR”. De acuerdo con la función anti-apoptótica de RNF189, el aumento en la expresión del microRNA-7 promovió muerte celular en células CaSki, en cambio indujo proliferación en células A549. La muerte de las células CaSki resultante de la expresión del microRNA-7 es independiente de p53 y de JNK, pero involucra la activación de caspasa 3, de acuerdo con esto, la muerte de las células CasKi que se previno cuando se usó el inhibidor de caspasas, z-vad.

De manera interesante, observamos que la muerte producida por la sobre-expresión del microRNA-7 es específico de la línea celular CaSki ya que un aumento en la expresión este microRNA en las líneas

celulares positivas para VPH: HeLa (VPH 18), CaLo (VPH 18) Y SiHa (VPH 16) y C33A (VPH-), no alteró su viabilidad.

En conjunto, estos resultados indican que el microRNA-7 tiene la capacidad de regular de manera negativa los niveles proteicos de la ligasa de ubiquitina RNF189, y que su sobre-expresión tiene un efecto “supresor de tumores”, específicamente en la línea celular CaSki, el cual que podría ser mediado a través de promover la apoptosis mediada por la vía extrínseca.

I. INTRODUCCIÓN

I.I *microRNAs*

Los microRNAs (miRNAs), descritos inicialmente por Victor Ambros y sus colegas Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum¹ son RNAs de cadena sencilla cuyo tamaño varía entre 19 y 22 nucleótidos (nt). De estos, el 70% se transcriben a partir de regiones intergénicas, ya sea de manera individual o en grupos de varios microRNAs que se encuentran contenidos en un solo transcrito, mientras que el 30% restante se transcriben a partir de regiones intrónicas², comprendiendo así, entre el 1 – 5% del genoma total^{3,4}. Dentro de la secuencia de los microRNAs maduros, los nucleótidos que comprenden de la posición 2 a la 8 del extremo 5' forman la “región semilla”, la cual es complementaria a secuencias localizadas en la región no traducida del extremo 3' (3 UTR) del RNA mensajero (mRNA) blanco, lo que confiere especificidad⁵ mientras que los nucleótidos restantes le confieren estabilidad a esta interacción⁶. Generalmente en mamíferos, la complementariedad microRNA-mRNA se produce de manera imperfecta, resultando en la inhibición traduccional del mRNA⁷, aunque de manera interesante, en pocas ocasiones esta interacción también puede darse de manera perfecta provocando el corte y degradación del mRNA⁸. Algunos microRNAs se expresan de manera ubicua, mientras otros lo hacen de manera tejido-específica e incluso temporal, dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la célula o tejido⁹.

Los microRNAs son considerados reguladores clave de la expresión genética ya que de los aproximadamente 1400 microRNAs descritos actualmente en humano se ha estimado que son capaces de regular entre el 30 al 60 % de los genes codificados en el genoma¹⁰. Además, como resultado de la interacción imperfecta que presenta el dúplex microRNA-mRNA, cada microRNA puede tener decenas de mRNAs blanco, lo que genera la formación de redes de regulación muy complejas. Esto sugiere que una gran proporción del transcriptoma se encuentra sujeto a regulación por microRNAs^{9, 11, 12}.

Por tanto, no es sorprendente que los microRNAs regulen una gran cantidad de procesos fundamentales para la célula, entre los que se pueden mencionar proliferación, diferenciación, migración/invasión celular, muerte celular programada (apoptosis), angiogénesis, metabolismo, respuesta a estrés, señalización endócrina, respuesta inmune, desarrollo entre otros^{2, 13-18}.

I.II Biogénesis de los *microRNAs*

La biogénesis de los *microRNAs* comienza en el núcleo, donde la RNA polimerasa (RNA pol) II o III se encarga de transcribir los genes que codifican los *microRNAs*. En el caso de la RNA pol II, se originan transcritos primarios (pri-miRNAs) de longitudes mayores a 1 Kilobase (Kb) que presentan un capuchón 7-metil-guanosina en su extremo 5' y una cola poli-adenilada en su extremo 3'. Posteriormente, el pri-miRNA es reconocido y procesado por el complejo microprocesador, conformado por la RNAsa de tipo III Drosha y su cofactor; la proteína *DiGeorge síndrome critical región gene 8* (DGCR8)^{11, 14}.

Al momento de procesar el pri-miRNA, DGCR8 reconoce la estructura “tallo-asa” mientras que Drosha se une a la doble cadena cortando algunas bases de los extremos 3' y 5' del pri-miRNA. Este corte produce estructuras tipo “tallo-asa” (*stem-loop*) de 60 a 70 nt de longitud (estructuras características de la biogénesis de los *microRNAs*) las cuales se conocen como pre-miRNAs^{13, 19, 20}.

A continuación el pre-miRNA es exportado del núcleo al citoplasma por acción de la Exportina-5 con ayuda de la GTPasa Ran como cofactor. Este complejo previene la degradación nuclear del pre-miRNA y facilita su translocación al citoplasma². Cuando el pre-miRNA se encuentra en el citoplasma es procesado por la RNAsa tipo III Dicer junto con proteínas que poseen un dominio de unión al dsRNA (*double-stranded RNA*), provocando la remoción del asa terminal y originando un RNA de doble cadena (*double-stranded RNA*). Este RNA de doble cadena de aproximadamente 21 pares de base (pb) contiene el *microRNA* maduro y un *microRNA* estrella (miRNA*) el cual generalmente es transitorio ya que es degradado¹⁹.

Posteriormente, el RNA de doble cadena se une a la proteína Argonauta (Ago) para ser reclutado en el complejo RISC (*RNA induced silencing complex*). En este complejo, el *microRNA** es degradado, resultado en un *microRNA* maduro, estable y completamente funcional. El complejo RISC (considerado el efector del silenciamiento de los RNAs mensajeros) reconoce el mRNA blanco y se encarga de transportar el *microRNA* maduro permitiendo que este controle la expresión de proteínas mediante la inhibición del proceso traduccional.

Al momento del reconocimiento, el grado y naturaleza de la complementariedad que se presenta entre el *microRNA* y la 3'UTR de su mRNA blanco determina el mecanismo de silenciamiento. En el

caso de mamíferos, cuando la complementariedad es parcial se propicia la represión traduccional del mRNA en la iniciación, elongación y/o terminación prematura de la proteína¹³, sin embargo en muy pocas ocasiones ocurre una complementariedad perfecta y en estos casos el mRNA blanco es escindido y degradado^{3, 19, 21, 22} (**Figura 1**).

I.III Regulación de la biogénesis de los microRNAs

Los microRNAs se encuentran presentes en una gran cantidad de especies (desde nematodos, mamíferos e incluso en plantas) regulando procesos importantes con el fin de asegurar el funcionamiento de los organismos. Esto sugiere que los microRNAs han jugado un papel determinante durante la evolución²⁰ y debido al papel que juegan en la regulación de la expresión génica, su biogénesis se encuentra controlada en distintos puntos clave, tanto transcripcional como post-transcripcional^{10, 23, 24}.

Los microRNAs se encuentran codificados en diversas regiones del genoma, incluyendo regiones codificantes y no codificantes. Aproximadamente el 60 % de los microRNAs se derivan de transcritos de RNA no codificante y un 30% adicional se pueden transcribir de regiones intrónicas^{9, 12, 14}.

La transcripción es uno de los pasos regulatorios más importantes en la biosíntesis de los microRNAs debido a que la mayoría de los microRNAs se transcriben por acción de la RNA polimerasa II por lo que sus transcritos (al igual que todos los genes transcritos por esta polimerasa) sufren poliadenilaciones del extremo 3', además de presentar un capuchón de 7-metil-guanosina en su extremo 5'^{19, 25, 26}. Se ha observado que los promotores que presentan los microRNAs pueden contener islas CpG, cajas TATA y elementos de iniciación lo que indica que la transcripción puede controlarse por Factores de Transcripción (TF) por lo que supresores de tumores, oncogenes, elementos de respuesta, enhancers, elementos silenciadores y modificadores de cromatina pueden influir en la transcripción de microRNAs determinados^{3, 19, 26, 27}. También se ha observado que la transcripción es controlada mediante la identificación de factores de crecimiento y en respuesta a exposición a factores estresantes como la luz ultravioleta, falta de nutrientes, hipoxia, entre otros²⁸⁻³⁰. Finalmente, se ha observado que los mecanismos epigenéticos que regulan la transcripción de genes codificantes para proteínas, como la metilación, acetilación o modificación de histonas, también pueden ejercer un control sobre la transcripción de los microRNAs^{3, 25, 31}.

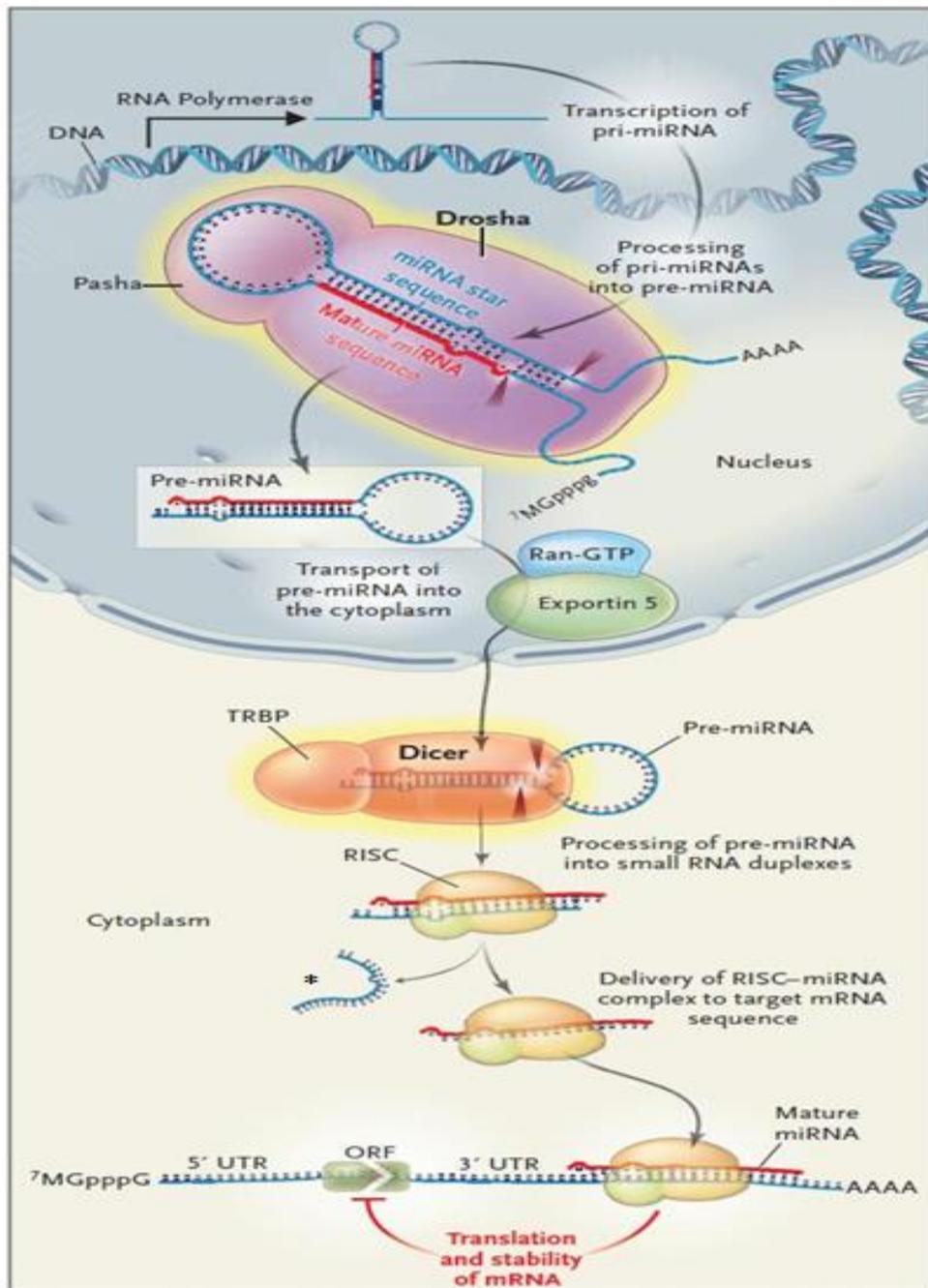


Figura 1: Biogénesis de los microRNAs. La maduración canónica inicia en el núcleo con la transcripción de los genes que contienen las secuencias de los miRNAs por la RNA polimerasa II o III generando así un transcrito primario (pri-miRNA) de longitudes mayores a 1 Kb. A continuación estos pri-miRNA es procesado por el complejo microprocesador por la proteína Drosha y su cofactor DGCR8 generando estructuras cortas de 70 nt de longitud en forma de tallo-asa (stem-loop) conocidas como miRNA precursor (pre-miRNA). Estas estructuras son exportadas al citoplasma por medio de la Exportina 5 y su cofactor la GTPasa Ran para ser de nuevo procesados por Dicer quien se encarga de eliminar el asa y generando así un dúplex conformado por dos cadenas de aproximadamente 21 nt de longitud (microRNA-microRNA*). Cuando este dúplex se forma, es reconocido por el complejo RISC y procesado por la proteína Argonata que se encarga de degradar el microRNA* generando un microRNA completamente maduro y funcional. Cuando el complejo RISC es activado, lleva al microRNA y lo une al mRNA blanco. Dependiendo del grado de complementariedad puede regular de manera negativa la traducción de proteínas o la degradación del mRNA (Tomado y modificado de Libri, 2013²⁰).

A nivel post-transcripcional la biogénesis de los microRNAs presenta diversos mecanismos de control con el fin de regular su expresión. El procesamiento de los pri-miRNAs por el complejo microprocesador (Drosha/DGCR8) representa el primer punto de control a nivel post-transcripcional^{19, 23, 26}. Se ha observado que DGCR8 presenta un efecto estabilizador en Drosha al unirse a un dominio ubicado en la región central y a su vez, Drosha controla la expresión de DGCR8 mediante el corte de estructuras “tallo-asa” presentes en la región 5'UTR de los mRNAs de DGCR8, provocando la degradación del transcrito de DGCR8^{10, 27, 32}. Se ha postulado que este *loop* regulatorio es crítico para promover un balance adecuado entre los niveles del complejo microprocesador y sus sustratos blanco^{10, 20, 23, 26}.

Además, las modificaciones post-traduccionales de todas las proteínas que conforman el complejo microprocesador pueden regular la estabilidad, localización y actividad de este complejo proteico. Drosha puede ser fosforilada para permitir su translocación al núcleo, mientras que la acetilación inhibe su degradación y permite su estabilización. La desacetilación promueve un aumento en la afinidad de Drosha hacia los pri-miRNAs. Por otra parte, la estabilidad de DGCR8 depende de fosforilación^{10, 27, 32}. Por último se ha observado que proteínas como supresores de tumores pueden controlar los niveles de Drosha en respuesta a un estímulo adverso para permitir la expresión de microRNAs determinados. Un ejemplo es el supresor de tumores p53 quien en respuesta a un estímulo adverso induce el aumento de los niveles de expresión del microRNA-34 para promover la detención del ciclo celular o la inducción de apoptosis³³⁻³⁵.

Otro punto de regulación a considerar es el que se lleva a cabo durante el transporte de los pre-miRNAs del núcleo al citoplasma por acción de la Exportina 5. Se ha observado que la GTPasa Ran al hidrolizar GTP provoca el desensamble con la Exportina 5 promoviendo la inhibición del proceso de exporte²³. Además, se ha observado que en respuesta a un daño al DNA, la cinasa ATM es capaz de activar a AKT resultando en el incremento de la afinidad de la exportina con los poros nucleares provocando que el proceso de exporte se amplifique en general^{26, 32}. También se cuenta con evidencias que indican que la Exportina 5 es capaz de interactuar con el mRNA de la RNasa de tipo III Dicer por lo que si existen niveles altos de pre-miRNAs puede ocasionar la acumulación del mRNA de Dicer en el núcleo^{32, 36}.

El procesamiento de los pre-miRNAs por Dicer constituye el tercer punto de control a nivel post-transcripcional durante la biogénesis de los microRNAs. Se ha observado que proteínas de unión a

RNA como TRBP o PACT son capaces de formar complejos de procesamiento capaces de estabilizar a Dicer provocando el aumento en el procesamiento hacia microRNAs^{23, 32, 37}. Por otro lado, existen reportes que muestran que el mRNA de Dicer puede ser regulado por microRNAs que son producto del procesamiento de esta RNAsa (un ejemplo es let-7 y lin-28) lo que constituye un *loop* autorregulatorio de los niveles de Dicer^{20, 24, 36}. Además, la actividad de Dicer puede ser regulada por medio de modificaciones post-traduccionales como la metilación que inhibe el procesamiento y la fosforilación que aumenta la actividad de Dicer^{18, 32}.

De manera global, la actividad de los microRNAs depende de la disponibilidad de Argonauta activa en el citoplasma. Como consecuencia la actividad de esta proteína se encuentra sujeta a regulación post-traducciona. Se ha observado que la fosforilación de su serina 387 inhibe su actividad, por otro lado una poli-4-hidroxilación provoca su estabilización, relocalización y almacenamiento en los cuerpos-P. Además, se ha observado que acetilación o metilación juegan un papel muy importante en la modulación de los niveles de Argonauta^{9, 20, 38}. Finalmente Argonauta puede degradarse por medio de poliubiquitinación^{16, 39}.

Por otro lado, la expresión de los microRNAs maduros se encuentra controlada de manera estricta en respuesta a distintas señales y/o a la activación de supresores de tumores. Un ejemplo es el eje p53-microRNA-34 ya que en respuesta a distintos factores (como el daño al DNA, la presencia de factores pro-apoptóticos o la hipoxia), p53 es activado para promover la inhibición del ciclo celular y de manera simultánea, promueve un aumento en la expresión del microRNA-34 permitiendo así un aumento en la muerte celular^{30, 33, 34, 40}.

Se tienen evidencias de que la expresión de un microRNA determinado puede regularse por acción de otro microRNA. Ejemplos de eso son el microRNA-29 quien controla simultáneamente los niveles de proteínas que se encargan de regular los niveles de los microRNAs 34 y 449. Otro ejemplo es el microRNA-22 quien al identificar daño al DNA, provoca la disminución de sus niveles promoviendo el aumento de los niveles de los microRNAs-34 y 449⁴¹. Además, se ha observado que el microRNA-370 que regula la expresión del microRNA-122 para controlar la acumulación de triglicéridos por medio de la regulación de SREBP-1, DGAT2 y Cpt1a⁴².

También, se ha observado que la función de los microRNAs maduros puede estar sujeta a regulación por otra clase de RNAs, denominados RNAs circulares (CircRNAs) los cuales se expresan a partir de

diversas regiones genómicas (exones, intrones, regiones intergénicas o de transcritos antisentido de 3' y 5' UTR) y se caracterizan por contener uno o más sitios de unión hacia diferentes microRNAs lo cual permite “secuestrar” al microRNA, neutralizando así la inhibición del mRNA blanco^{8, 43, 44}. Además, la función de los microRNAs puede ser inhibida por la acción de RNAs anti-sentido (creados artificialmente) quienes actúan por complementariedad de bases, uniéndose a los microRNAs maduros y con ello provocar la inhibición de sus efectos^{8, 45, 46}.

Finalmente, en una población celular específica, la función de algunos microRNAs puede regularse de manera temporal por lo que se ha observado que los mismos microRNAs pueden presentar variaciones en su vida media que van de unas pocas horas a varios días.

I.IV Cáncer

Normalmente, la integridad y función de un tejido determinado se promueve por la acción de proteínas clave, llamadas “supresores de tumores” que se encargan de controlar procesos tan importantes como la proliferación y la supervivencia celular, eliminando células que se encuentran senescentes o dañadas, evitando así su propagación. A su vez, también existen diversas proteínas denominadas “proto-oncogenes” que contrario a la acción de los “supresores de tumores” se encargan de promover la proliferación y la supervivencia celular cuando es necesario el reemplazo de células. Por la acción coordinada de “proto-oncogenes” y “supresores de tumores” se mantiene un número constante de células en dicho tejido. Los “proto-oncogenes” se encuentran regulados de manera muy estricta por diversos factores con el fin de evitar una desregulación en los programas celulares, que pudiese provocar el desarrollo de enfermedades como el cáncer^{31, 37, 47-49}.

El cáncer se caracteriza por presentar un crecimiento celular descontrolado, provocado por la acumulación progresiva de mutaciones. Esto promueve el establecimiento de una población celular anormal, caracterizada por presentar alteraciones en los programas de control del ciclo celular, muerte y migración celular provocando el aumento de la proliferación y la disminución de la apoptosis, así como un aumento en la capacidad de migrar e invadir otros tejidos al diseminarse a través del sistema linfático y sanguíneo mediante el proceso de metástasis⁵⁰⁻⁵³.

El proceso de transformación celular se puede dividir en 5 o 6 etapas entre las que se encuentran A) iniciación donde una o varias células presentan un número considerable de mutaciones, B) promoción

donde las mutaciones inhiben proteínas que promuevan la regulación de la proliferación y la inducción de muerte celular, C) transformación donde las células han adquirido un estado autónomo, D) progresión donde se establece una población celular transformada, la cual es completamente distinta al entorno celular, E) formación tumoral cuando se promueve la formación de una masa tumoral y en el 10% de los casos, F) metástasis cuando las células del tumor primario viajan y colonizan órganos distantes⁵⁰⁻⁵² (**Figura 2, Panel A**).

El concepto de que el desarrollo y progresión del cáncer se promueve debido a las ventajas que la célula adquiere a lo largo del tiempo, aumentando así la sobrevivencia y proliferación dentro de un ambiente tumorigénico se ha asociado primeramente a la inestabilidad genómica producida por una acumulación excesiva de mutaciones al azar, la cual es considerada una característica fundamental de la biología del cáncer⁵⁴⁻⁵⁶. Dicha inestabilidad provoca la alteración de la expresión de genes que se encuentran involucrados en la regulación de programas celulares fundamentales con el fin de conferir ventajas que contribuyen a la iniciación y progresión del cáncer. Estas características son la proliferación sostenida, la capacidad de eludir los programas de inhibición de la proliferación mediada por supresores de tumores, la evasión de señales iniciadoras de la apoptosis, la adquisición de un potencial de replicación ilimitado, una estimulación de angiogénesis sostenida, la creación de un ambiente pro-inflamatorio dentro de una población tumoral, una reprogramación del gasto y formación de la energía metabólica, la evasión del sistema inmunológico y la colonización de tejidos lejanos (metástasis)⁵⁵ (**Figura 2, Panel B**).

I.V Asociación de los microRNAs con el cáncer

En condiciones normales, los microRNAs que funcionan como supresores de tumores se encargan de regular negativamente la expresión de diversos “proto-oncogenes”^{37, 57}. De este modo, los microRNAs que controlan los niveles de proteínas implicadas en el aumento de la proliferación, migración y/o supervivencia celular se pueden considerar “supresores de tumores”. De manera contraria, un aumento en los niveles de microRNAs cuyos blancos son supresores de tumores reciben el nombre de “oncomiRs”³⁷.

Existen evidencias que muestran que algunos microRNAs juegan un papel determinante en el aumento de la migración celular, propiciando la inducción de metástasis. Este fenotipo celular es diferente al que presentan las células que forman tumores primarios, lo que sugiere que dentro del

grupo de “oncomiRs” existe un sub-conjunto de microRNAs que contribuyen en la alteración de distintas vías de señalización que regulan la transición epitelio-mesénquima (EMT), la adhesión/migración/invasión, la apoptosis y la angiogénesis, para propiciar la metástasis. Estos microRNAs reciben el nombre de “metastamiRs”^{37, 58} (Figura 3).

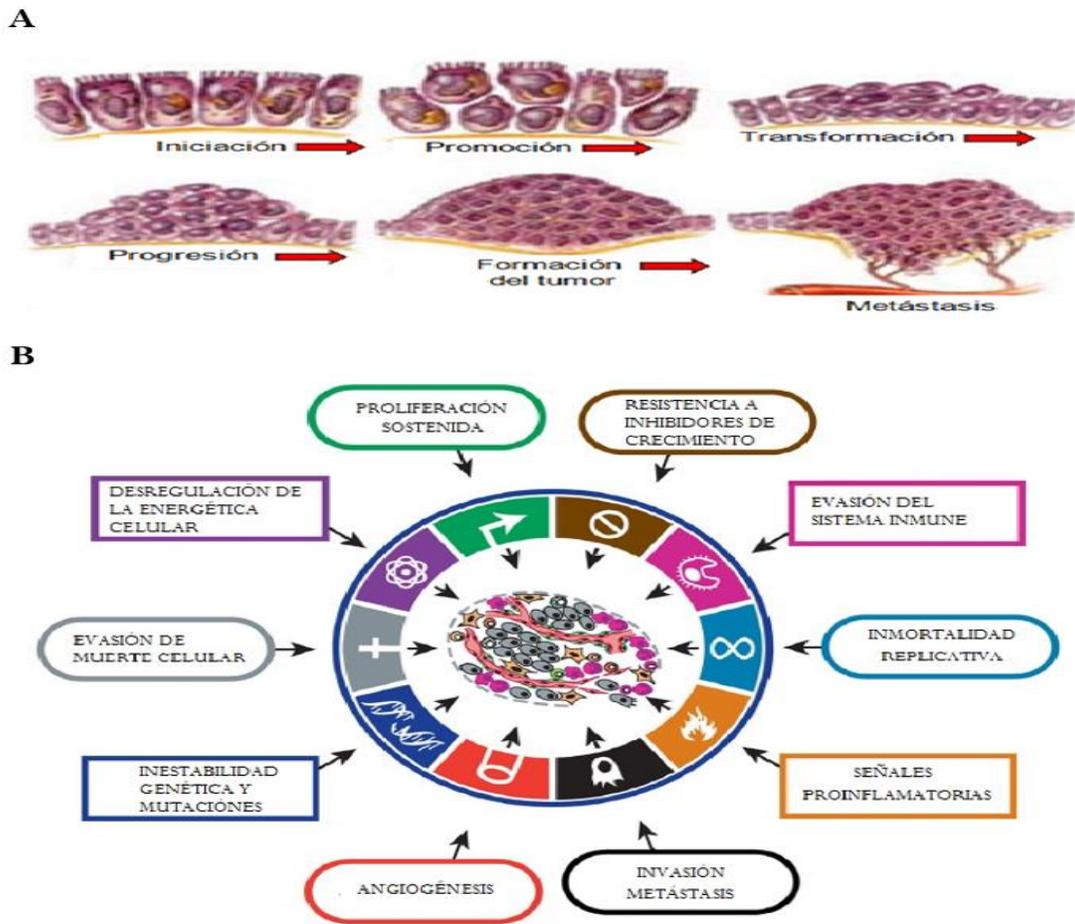


Figura 2: Fases del desarrollo del cáncer y las características principales de una célula transformada. **A)** Representación esquemática de las fases de desarrollo del cáncer. **B)** Características adquiridas por las células durante la fase de progresión del cáncer (Tomado y modificado de Hannahan y Weinberg, 2011⁵⁵).

Con base en esto se puede afirmar que las alteraciones que reduzcan los niveles de expresión de microRNAs “supresores de tumores” o que aumenten la expresión de “oncomiRs” pueden provocar el desarrollo y progresión del cáncer.

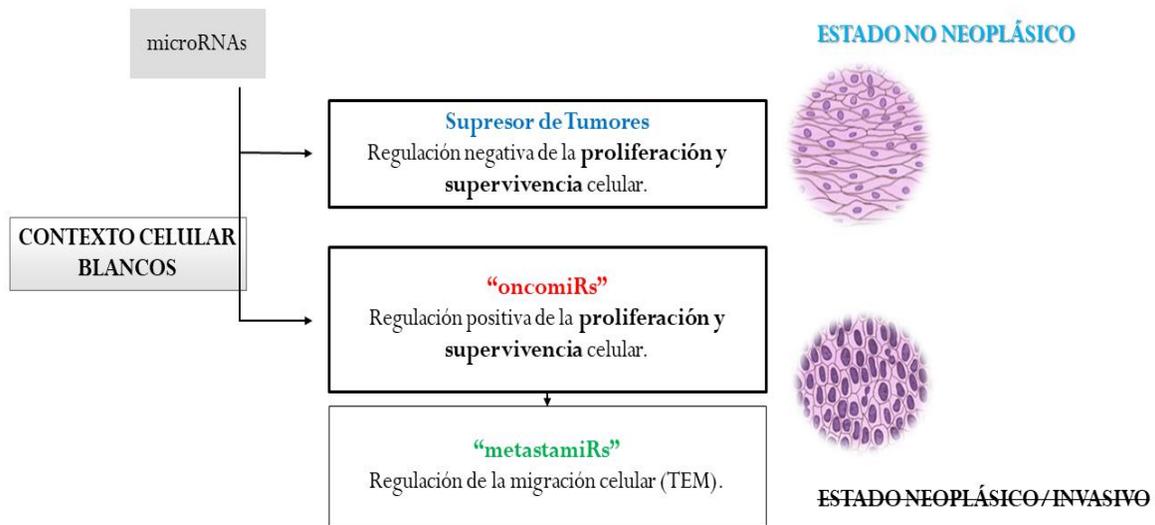


Figura 3: Clasificación de los microRNAs dentro del proceso de transformación celular. Dependiendo del contexto celular, los microRNAs “supresores de tumores” regulan negativamente la expresión de distintos “Oncogenes” inhibiendo la proliferación, migración y supervivencia celular. Por otro lado los “OncomiRs” promueven el proceso de transformación celular aumentando la proliferación y supervivencia celular. Dentro de los “OncomiRs” existe un sub-grupo de microRNAs que aumentan la migración promoviendo así la inducción de metástasis, estos se conocen como “metastamiRs”.

I.VI Ubiquitina y mecanismo de ubiquitinación

Las células regulan la expresión de sus genes a distintos niveles, desde la expresión del mRNA hasta la modificación y vida media de las proteínas. A nivel post-traduccional las proteínas pueden sufrir una gran variedad de modificaciones entre las que se encuentra la unión covalente de ácidos grasos, unión de carbohidratos o glicosilación, fosforilación, acetilación, metilación, la sumoilación y la ubiquitinación^{59, 60}.

La ubiquitina es una proteína pequeña de 76 aminoácidos altamente conservada a lo largo de la evolución. En su extremo C-terminal presenta dos glicinas consecutivas, siendo la última la que puede unirse a residuos específicos mediante un enlace isopeptídico. También presenta varios residuos internos de lisina, de los cuáles el más importante se ubica en la posición 48 (K48) ya que a su extremo N-terminal se pueden unir otras moléculas de ubiquitina formando así una cadena de poliubiquitina^{60, 61}.

Normalmente, el mecanismo de ubiquitinación de una proteína blanco consta de 3 reacciones consecutivas, llevadas a cabo por 3 complejos enzimáticos: E1 (activación), E2 (conjugación) y E3

(ligación)^{62, 63}. Primeramente, una molécula de ubiquitina (Ub) se activa mediante la formación de un enlace covalente en un residuo de glicina de su extremo C-terminal, donde existe el motivo Leu-Arg-Gly-Gly. La glicina final se adenila (por una reacción dependiente de ATP), provocando la activación de la molécula de ubiquitina. La ubiquitina activada se une a un residuo de cisteína del extremo N-terminal del complejo E1 formando el complejo E1-Ub. Después, el complejo E1-Ub interactúa con un residuo de cisteína del complejo E2, disociándose de E1 y de manera simultánea formando el complejo E2-Ub. Finalmente el complejo E3 se une a la proteína blanco e interactúa con el complejo E2-Ub, disociando E2 de la ubiquitina activada y uniendo esta última a residuos de lisina específicos de la proteína blanco mediante un enlace isopeptídico^{59, 60, 62-64} (**Figura 4**).

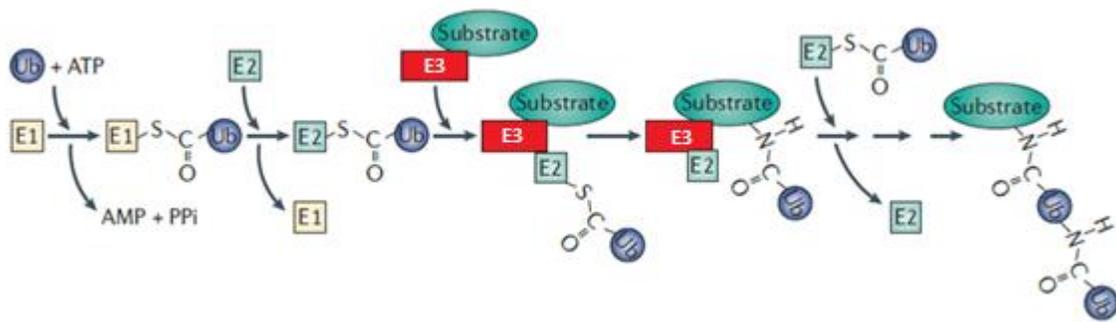


Figura 4: Mecanismo de ubiquitinación. El mecanismo de ubiquitinación consta de 3 enzimas: de tipo E1 (activadora), de tipo E2 (conjugativa) y de tipo E3 (de ligación). Una molécula de ubiquitina se activa y se une a una proteína determinada por un proceso de tres reacciones consecutivas llevadas a cabo por las enzimas E1, E2 y E3. (Tomado y modificado de Lipkowitz, 2011⁶³).

Inicialmente la función de la ubiquitinación se describió como una marca para la degradación selectiva de proteínas, especialmente para las proteínas de vida media-corta. Sin embargo, se ha descubierto que el mecanismo de ubiquitinación es un proceso versátil ya que dependiendo del acomodo de las moléculas de ubiquitina (desde una sola molécula hasta complejas cadenas poliméricas) se producen diferentes efectos, además de la degradación proteica^{64, 65}.

Generalmente, los residuos Met1, Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 y Lys63 son los principales aminoácidos que pueden sufrir ubiquitinación por lo que las diferentes combinaciones en estos residuos provoca la existencia de un código de ubiquitinación.

Las proteínas pueden sufrir monoubiquitinación o multi-monoubiquitinación lo que produce la relocalización de las proteínas dentro de la célula, sufran una inhibición temporal o sean retenidas en

el citoplasma^{61, 66} por lo que estas modificaciones se encargan de regular el tráfico vesicular, la transducción de señales, endocitosis y reparación de DNA⁶⁷. Por otro lado, las proteínas también pueden sufrir poli-ubiquitinación homogénea y heterogénea o poli-ubiquitinación ramificada homogénea o heterogénea principalmente en sus residuos Lys48 y Lys63⁶⁸. Se ha reportado que la presencia de una cadena de ubiquitina en el residuo Lys48 promueve la degradación de la proteína blanco por medio del proteosoma, en cambio si la cadena de ubiquitina se encuentra en el residuo Lys63, la proteína blanco sufre una relocalización a distintos organelos para contribuir con la reparación del DNA, regular la señalización celular o el tráfico vesicular^{66, 68}. En algunos casos la formación de la cadena de poliubiquitina requiere la actividad adicional de factores de elongación, llamados complejos de ubiquitina E4 quienes funcionan como andenes y permiten que la cadena de poliubiquitina se estabilice⁶⁹.

I.VII Regulación del mecanismo de ubiquitinación y su asociación con el cáncer

En la célula, la actividad de las ligasas de ubiquitina se encuentra estrictamente controlada a diversos niveles. La regulación a nivel transcripcional es fundamental para el control de la expresión de las ligasas de ubiquitina. Sus mRNAs (de igual manera que con todos los transcritos producidos) son poliadenilados en el extremo 3' y presentan un capuchón de 7-metil-guanosina en su extremo 5' y los genes correspondientes pueden ser regulados por factores de transcripción y supresores de tumores^{10, 19, 61, 70}, además de ser regulados por mecanismos epigenéticos⁷¹. Por otra parte, los niveles y eficiencia de la actividad de las ligasas de ubiquitina pueden ser reguladas mediante reacomodos de las regiones 3' y 5'UTR de sus mRNAs provocados por el proceso de *splicing* alternativo^{13, 25}.

A nivel post-transcripcional, las ligasas de ubiquitina pueden regularse por diversos mecanismos. Dentro de estos se encuentra la fosforilación, la auto-ubiquitinación, la inhibición por la interacción con proteínas inhibitoras, la unión de pequeños ligandos en la región catalítica de las ligasas, la eliminación de las moléculas de ubiquitina por la acción de desubiquitininas, además de una regulación espacio-temporal mediante el acomodo de las moléculas de ubiquitina en las proteínas blanco y una regulación mediada por proteínas activadoras y/o accesorias ya que se ha observado que algunas ligasas de ubiquitina no tienen actividad por si solas, sino que requieren su asociación con otros elementos para realizar sus funciones^{59, 60, 66, 72}.

Ya que las ligasas de ubiquitina presentan un papel fundamental en la degradación selectiva de proteínas, con el paso del tiempo se ha incrementado el número de reportes que demuestran que una desregulación en los niveles de estas proteínas se ha asociado con el desarrollo del cáncer^{63, 70}. Algunos ejemplos son la ligasa de ubiquitina MARCH7 que se sobre-expresada en cáncer de ovario y cuya inhibición provoca la disminución de la proliferación, la migración y la invasión celular⁷³. Por otro lado, una desregulación en los niveles de la ligasa de ubiquitina Cullina-7 se ha asociado con el desarrollo de cáncer pulmonar y su inhibición permite la disminución de la proliferación, además de elevar los niveles de p21, p27 y p53⁷⁴. También se ha observado que los niveles de expresión de RNF13 se encuentran aumentados en muestras de pacientes con cáncer pancreático⁷⁵. A su vez, la sobre-expresión de MDM2 resulta en una mayor inhibición de la actividad de p53, permitiendo el desarrollo de diversos tipos de cáncer por medio de la progresión ininterrumpida del ciclo celular y la evasión de los programas de muerte celular⁷⁶⁻⁷⁸.

I.VIII Ring Finger Protein 189 (RNF189)

Identificado en el 2004 por McDonald y colaboradores⁷⁹, la ligasa de ubiquitina *Ring Finger Protein 189* (RNF189), también llamada RFFL, CARPS2, Rififilina o Sakura, es una proteína cuyo gen se encuentra localizado en el cromosoma 17 (17q12). El gen de esta ligasa se constituye por 7 exones que por medio de *splicing* alternativo genera 3 isoformas proteicas, la primera (expresada mayoritariamente) tiene una longitud de 363 aminoácidos y un peso de 43 kDa, la segunda presenta una longitud de 355 aminoácidos (carece de los aminoácidos 296 – 303) y tiene un peso de 39 kDa y la tercera con una longitud de 327 aminoácidos (careciendo de las regiones que van de los 197 – 244 y de los 296 – 303 aminoácidos) pesa 36 kDa⁸⁰⁻⁸².

La principal isoforma de RNF189 contiene 3 dominios estructurales. En su extremo amino terminal (N-) presenta un dominio FYVE (*four FYVE-containing proteins, Fab1p, YOTB, Vac1p and EEA1*, residuos 39 – 88) el cual se encuentra altamente conservado y permite a RNF189 interactuar con el Fosfatidil Inositol 3-fosfato (PI3P)⁸¹. El segundo dominio que presenta es un dominio CID (*Caspase 8/10 Interacting Domain*, residuos 238 – 289), el cual permite interactuar con las caspasas 8 y 10 para poliubiquitarlas para ser degradadas⁷⁹⁻⁸¹. Finalmente en el extremo carboxilo terminal (C-) RNF189 presenta un dominio RING (*Really Interesting New Gene*, residuos 302 – 363) el cual le confiere actividad de ligasa de ubiquitina permitiendo la eliminación de proteínas de vida media-corta por

medio de su poliubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma 26S^{80, 81, 83} (**Figura 5**). Cabe mencionar que las isoformas de esta ligasa de ubiquitina difieren únicamente en la estructura del dominio RING, por lo que solo la isoforma de 363 aminoácidos de longitud funciona como ligasa de ubiquitina.

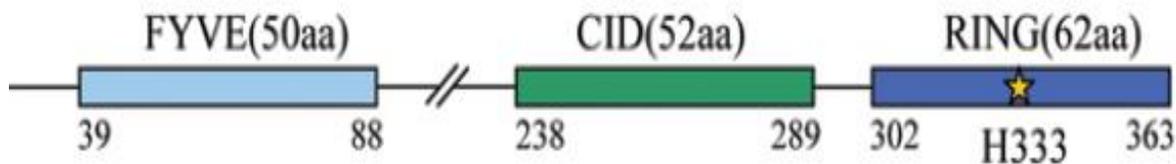


Figura 5: Estructura de RNF189. La ligasa de ubiquitina RNF189 presenta en su extremo amino terminal (N-) presenta un dominio FYVE (*four FYVE-containing proteins, Fab1p, YOTB, Vac1p and EEAI*), seguido de un dominio CID (*Caspase 8/10 Interacting Domain*) (residuos 238 – 289) y en el extremo carboxilo terminal (C-) presenta un dominio RING (*Really Interesting New Gen*) (residuos 302 – 363). (Tomado de Wensheng Yang 2007⁸¹)

La presencia de estos tres dominios estructurales le confiere a RNF189 la capacidad de regular varios procesos importantes para la célula. Se ha observado que RNF189 se encuentra involucrada en la regulación negativa del proceso de endocitosis⁸⁴, puede aumentar la supervivencia, mantener la organización del citoesqueleto e inhibir la migración celular mediante la degradación del inhibidor del complejo mTORC2, PRR5L^{81, 85}. También se ha observado que puede regular positivamente la migración mediante la degradación de PKC delta^{81, 85} e inhibir el proceso de apoptosis por la vía extrínseca mediante la degradación de las caspasas 8 y 10^{79, 81, 82}. Además, RNF189 promueve la proliferación celular mediante la degradación del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR1) provocando el aumento de NF-KB⁸⁶ y a su vez, existen reportes donde se ha observado que RNF189, por medio de su asociación a la ligasa de ubiquitina MDM2, se encarga de aumentar la degradación de p53 de manera sinérgica^{80, 81, 83, 87}.

Ya que RNF189 es una proteína que se encuentra implicada en diversos procesos importantes para la célula, ésta (al igual que todas las ligasas de ubiquitina) es regulada de manera muy estricta tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional y por esa razón el aumento de sus niveles en el citoplasma se ha asociado con el proceso de transformación celular.

La ligasa de ubiquitina RNF189 puede ser considerada un proto-oncogén ya que se ha encontrado sobre-expresada en diversas líneas celulares tumorigénicas además de muchos tejidos tumorales como

ovario, cérvix, útero, mama y testículo⁸¹. En estos, se ha descrito que la inhibición de los niveles de esta ligasa por medio de *small interfering RNAs* (siRNAs) o *short hairpin RNAs* (shRNAs), aumentan la sensibilidad de estos tumores a sufrir muerte celular por agentes quimioterapéuticos^{79, 88}. Por el contrario, también se ha demostrado que la sobre-expresión de esta ligasa en células transformadas promueve la supervivencia celular⁸⁰.

Estos resultados muestran que la desregulación de los niveles de RNF189 contribuyen con el desarrollo, progresión y en algunos casos con la resistencia hacia diversos tratamientos, en especial con los que promueven la muerte celular, desafortunadamente el conocimiento que se tiene sobre la relación entre esta ligasa de ubiquitina y el proceso de transformación celular aún es poco. Por otra parte, se ha observado que el aumento de los niveles de RNF189 se ha asociado con la disminución de los niveles de p53, el cual es considerado un regulador maestro, implicado en procesos vitales como la reparación del DNA, la salida del ciclo celular y en última instancia la inducción de muerte celular, provocando así el desarrollo y/o progresión del proceso de transformación celular.

I.IX TP 53 “El guardián del genoma”

El gen TP53 se localiza en el cromosoma 17 (17p.13) y codifica para una fosfoproteína de 393 aminoácidos. La proteína p53 está conformada por 5 regiones estructurales. El dominio amino terminal (N-) presenta dos subdominios transcripcionales de activación denominados TAD1 (residuos 1-40) y TAD2 (residuos 41 – 60), además de un dominio rico en prolina (PRR), necesario para llevar a cabo la actividad apoptótica (residuos 62 – 94). El dominio central se constituye por un dominio de unión al DNA el cual contiene un átomo de zinc y varios residuos de arginina (residuos 95 – 292). Finalmente, el dominio carboxilo (C-) terminal presenta un dominio de tetramerización que es esencial para la actividad de p53 (residuos 325 – 356) y un dominio multifuncional involucrado en la regulación de la unión al DNA (residuos 537 – 393)⁸⁹⁻⁹¹ (**Figura 6**).

Conocido como el “guardián del genoma”, p53 es un supresor de tumores que actúa como un efector de la respuesta celular ante diversos factores, tales como el daño al DNA por radiación ultravioleta o radiación iónica, errores en la replicación, el acortamiento de los telómeros, la identificación de señales hiperproliferativas, la disminución de la concentración de ribonucleótidos, hipoxia, estrés oxidativo y falta de nutrientes⁹²⁻⁹⁵.

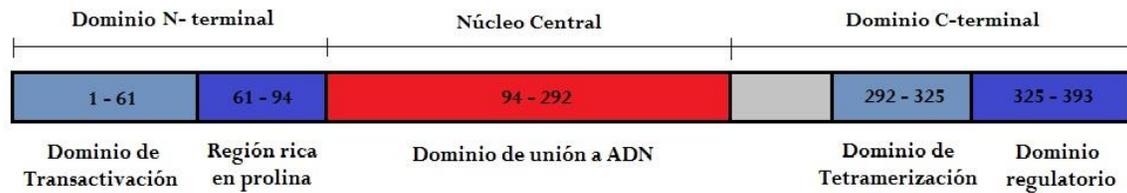


Figura 6: Estructura de p53. P53 está constituido por un dominio amino terminal (N-) que contiene dominios de transactivación TAD1 y TAD2, una región rica en prolina (PRR), un dominio de unión a ADN y un dominio carboxilo terminal (C-) que contiene un dominio de tetramerización y un dominio regulatorio.

Al identificar cualquiera de estas señales, p53 orquesta la activación de diversas vías de señalización controlando en primera instancia la reparación del DNA, arresto del ciclo celular e incluso activando el proceso de senescencia celular o en última instancia promoviendo la muerte celular programada. Además, p53 está involucrada en la regulación del desarrollo, la autofagia, la reprogramación del metabolismo celular, el control del destino celular y el control de la migración^{89, 91, 96, 97} (**Figura 7**).

Ya que p53 es una proteína fundamental en el control de procesos tan importantes, su actividad se encuentra regulada de manera muy precisa. Las modificaciones post-traduccionales juegan un papel crítico en la regulación de los niveles, la estabilización y el aumento/disminución de la actividad de las proteínas. Entre estas modificaciones se encuentran la fosforilación, acetilación, sumoilación, metilación, nedilación, glicosilación y ubiquitinación^{40, 91, 98-100}.

En el citoplasma de una célula sana, p53 se encuentra expresado de manera constitutiva pero a una concentración muy baja, además de que se encuentra transcripcionalmente inactivo y tiene una vida media de 15 a 20 minutos^{89, 101, 102}. El regulador principal de la concentración de p53 en la célula es el complejo conformado por las ligasas de ubiquitina de tipo E3, MDM2/MDM4 (*murine doble minute 2/murine doble minute 4*). Este complejo interactúa directamente con los dominios de transactivación (TAD 1 y 2) enmascarándolos para evitar la activación de p53 por medio de la interacción con sus diversos activadores y estabilizadores. De manera simultánea, este complejo se encarga de poli-ubiquitinar el dominio C-terminal de p53 en seis residuos de lisina específicos (K370, K372, K373,

K381, K382 y K383) resultando en el aumento de la degradación de esta proteína por medio del proteosoma^{35, 87, 94, 103-105}. Por otro lado, MDM2 en ausencia de MDM4 puede poli-monoubiquitinar a p53, reteniéndolo en el citoplasma e impidiendo su importe al núcleo.

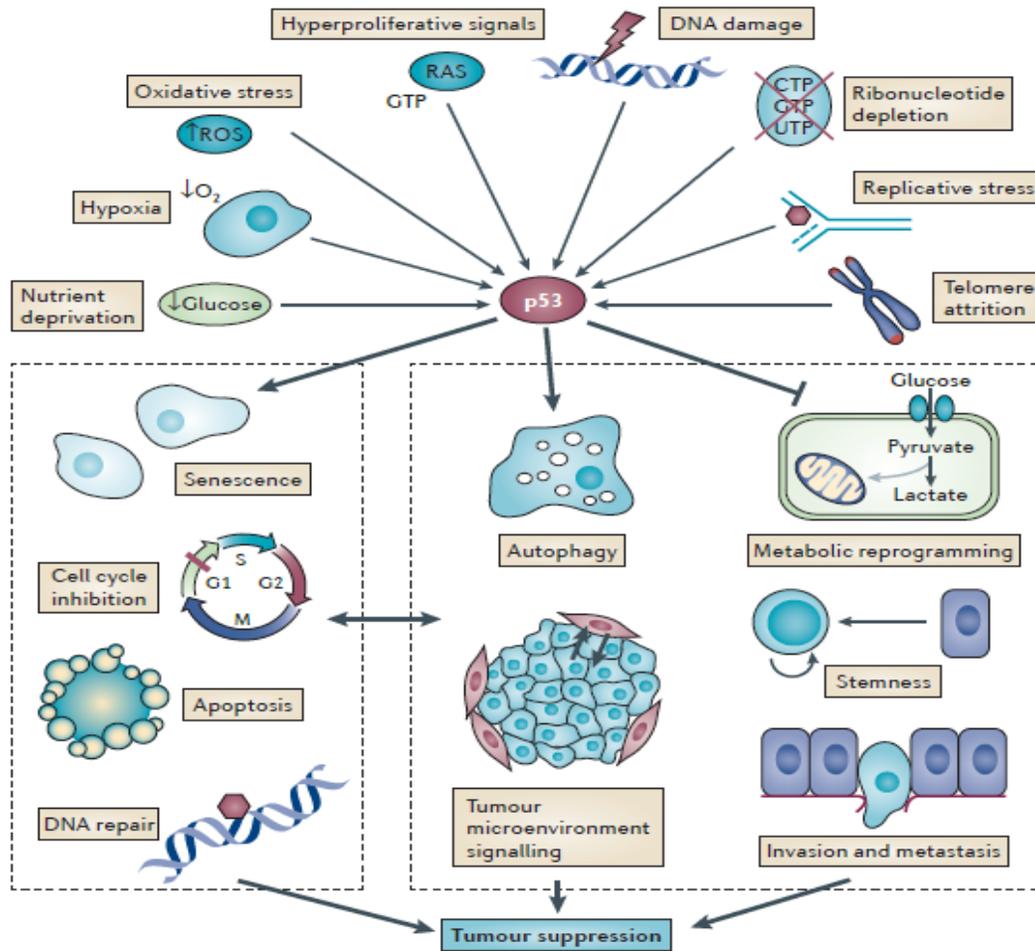


Figura 7: Funciones de p53 dentro de la célula. El supresor de tumores p53 se activa en respuesta a señales de daño al ADN, acortamiento de telómeros, estrés replicativo, la disminución de la concentración de ribonucleótidos, señales hiperproliferativas, estrés oxidativo, hipoxia y falta de nutrientes. Dependiendo del insulto, p53 aumentará la transcripción de genes relacionados a la reparación del material genético, el arresto del ciclo celular, la senescencia y en última instancia la muerte celular programada, además de otras características como la regulación de la utofagia o la inhibición de las señales desupervivencia dentro de un microambiente tumoral, entre otras. (Tomado y Modificado de Biegging, 2014)

Para responder ante los daños que una célula puede sufrir, existe una gran variedad de proteínas que actúan como sensores de daño. Estas se pueden dividir en dos grandes grupos: las proteínas pertenecientes a la familia de las MAP cinasas como JNK 1-3, ERK 1-2 y p38, o proteínas cinasas como ATR, ATM, CHK1, CHK2, DNA-PK, CAK y TP53RK. Todos estos sensores se encargan de

identificar daños tanto extrínsecos como intrínsecos, entre los que se encuentran las alteraciones en la membrana plasmática, la presencia de estrés oxidativo u osmótico, hipoxia, aumento de señales hiperproliferativas, falta de nutrientes, daños al DNA, errores de replicación, acortamiento de telómeros y la disminución de la concentración de ribonucleótidos^{35, 89, 95, 106}.

En respuesta a algún insulto, estos sensores activan p53 por medio de una fosforilación conjunta de las serinas 15, 20 y la treonina 81, ubicadas en su dominio N-terminal provocando su estabilización y el aumento de la afinidad por el DNA además del aumento en su vida media (pasando de 20 minutos a 5-6 horas aproximadamente)^{35, 78, 94, 107}. De manera simultánea, las ligasas MDM2 y MDM4 sufren una fosforilación que provoca la disociación de p53 y el inicio de un ciclo de auto-poliubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma^{104, 108}. Después de ser fosforilado, p53 se heptameriza y cada subunidad sufre una acetilación en las lisinas K320, K372 y K382 ubicadas en su extremo C-terminal. Esta acetilación la pueden realizar diversas acetiltransferasas como pCAF, CBP, p300, Tip60, MOF y MOZ provocando la exposición de su dominio de unión al DNA y el aumento en su afinidad hacia este^{98, 99, 107, 109, 110}. Una vez fosforilado y acetilado, el heptámero p53 es introducido al núcleo y comienza su función como elemento de respuesta al iniciar la transcripción de secuencias específicas del DNA denominados “elementos de respuesta” o RE, lo que provoca el aumento de la expresión de genes involucrados en la reparación del DNA, el arresto del ciclo celular, la inducción de senescencia o apoptosis, la regulación del metabolismo, autofagia o migración celular^{95, 99, 111, 112} (**Figura 8**)

En conjunto, estos datos indican que p53 juega un papel crítico en el mantenimiento de la integridad celular y es por eso que se ha demostrado que la disminución en los niveles o la pérdida de la función de p53 se ha asociado con el proceso de transformación celular^{92, 99, 113-116}. P53 se ha consolidado como el supresor de tumores más alterado en el cáncer humano ya que se estima que entre el 30% y el 80% de los cánceres son provocados por la inactivación de este supresor de tumores⁹¹.

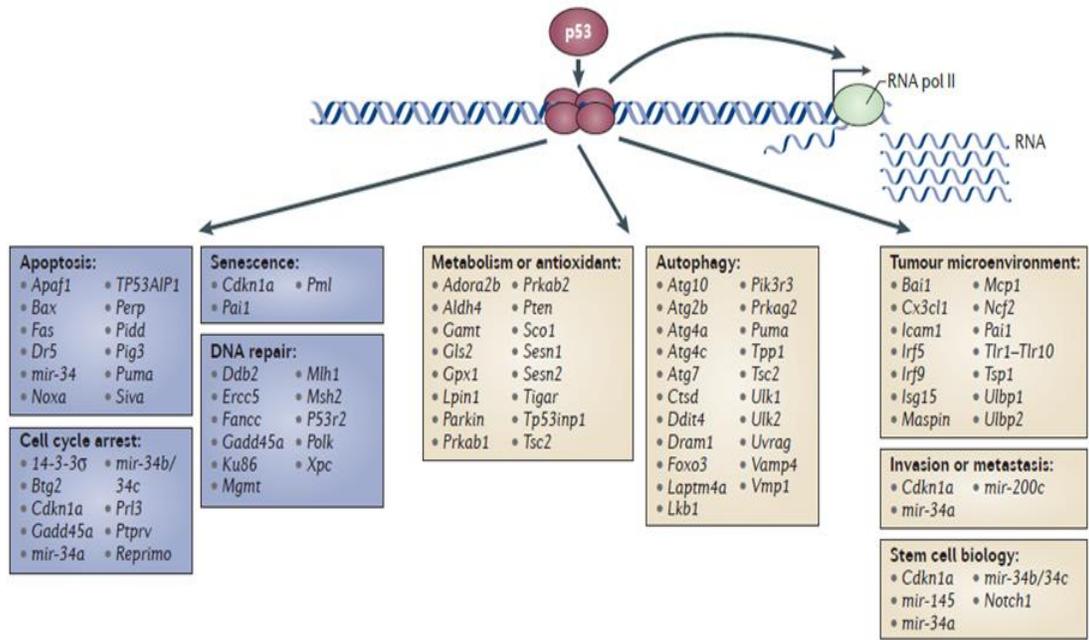


Figura 8: Blancos de p53. En respuesta a un insulto, p53 se encarga de aumentar la transcripción de genes que regulan la reparación del ADN, el arresto del ciclo celular, la senescencia, la inducción de apoptosis. Además es capaz de regular el metabolismo, la autofagia y la inhibición de la migración/invasión celular. (Tomado y modificado de Bieging, 2014⁹⁵)

II. ANTECEDENTES / JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que dependiendo del contexto celular el microRNA-7 puede funcionar como un “supresor de tumores” disminuyendo proliferación, supervivencia y migración celular en cáncer de ovario¹¹⁷, cáncer gástrico¹¹⁸, cáncer de mama¹¹⁹ y cáncer cervical¹²⁰. Por otro lado, diferentes evidencias indican que su sobre-expresión se ha asociado con un potencial oncogénico en carcinoma renal¹²¹ y cáncer de pulmón^{122, 123}.

De acuerdo con esto, previamente en nuestro grupo de investigación se evaluó el potencial oncogénico del microRNA-7 en un contexto pulmonar, en donde se mostró que la sobre-expresión del microRNA-7 aumentó la proliferación celular, la migración celular y promovió la formación de tumores en ratones nu/nu¹²⁴.

Ya que los microRNAs regulan la expresión de una gran cantidad de proteínas involucradas en el control de procesos fundamentales para la homeostasis celular, para entender la función de un microRNA en un contexto celular específico es necesario identificar los blancos que regula, por lo que para conocer como el microRNA-7 promueve el proceso de transformación celular en un contexto pulmonar, se identificaron los blancos de este microRNA en la línea celular A549 mediante la técnica de *pull down*.

Esta técnica se basa en la incorporación de una molécula de biotina (Bi) al microRNA de estudio (Bi-miR-7) para posteriormente transfectar este microRNA modificado en la línea celular de interés (A549). Después de 24 horas, las células transfectadas se lisaron para liberar su contenido y con ayuda de perlas recubiertas con estreptavidina, los complejos RISC que contienen dúplex Bi-miR-7/mRNA se separaron del RNA total. A continuación, los RNAs que se lograron aislar son secuenciados para identificar los blancos potenciales que tiene el microRNA-7 en el contexto celular evaluado (Meza-Sosa, en preparación). Finalmente, para confirmar los blancos se necesitan realizar ensayos bioquímicos como la evaluación de la actividad de luciferasa.

Mediante este análisis experimental se identificaron 435 blancos potenciales que podrían estar sujetos a regulación directa por el microRNA-7 y de todos estos blancos se buscaron proteínas que estuvieran implicadas en la regulación de procesos que se encontraran alterados durante el proceso de

transformación celular. Las proteínas identificadas se relacionaron con la apoptosis, la migración, la supervivencia, la proliferación, la regulación del ciclo celular, además de que se encontraron distintas ligasas de ubiquitina (**Tabla 1**).

Angiogénesis	Apoptosis	Migración	Supervivencia	Proliferación	Ciclo celular	Ligasas
VAV3	BCL2 TMEM219 PIM1 GRINA BAD PSME3 BMF NOD1 CASP9 GRINA	PIK3CD MGLL PAK1 LYPD3 CRK PIK3CB ZNF580 GIT1 SMAGP JOSD1 PIK3R2 TTLL11 41883 PFN2 ZYG PAK1	RAF1 PIM1 ARMC10 PAK1 RELA RELB	PIK3CD ST3GAL5 PIM1 PAK1 BCL3 PIK3CB MPP2 ZNF580 MAPK7 PIK3R2 EPS15 MAPK7 NF2	SPDYE8 SPDYE3 PIM1	RNF5 RNF38 TRIM8 RNF189 RNF144A CBL UBE3C DCAF17

Tabla 1: Blancos posibles del microRNA-7 obtenidos por medio de ensayos de *pull down*, los cuales se encuentran relacionados con algunas características que las células adquieren durante el proceso de transformación celular.

La desregulación, ya sea un aumento o disminución de los niveles de una ligasa de ubiquitina específica puede contribuir con el desarrollo de cáncer al promover la proliferación, supervivencia o migración. En el caso de las ligasas identificadas mediante el *pull down* se cuenta con evidencias experimentales que muestran que el aumento o disminución en sus niveles inducen o revierte el proceso de transformación celular por lo que su estudio puede contribuir de manera significativa al entendimiento de los mecanismos que se encuentran desregulados dentro de un estado neoplásico.

Con base en un análisis literario más detallado de las funciones reportadas para cada una de estas ligasas de ubiquitina, nos enfocamos específicamente en el estudio de la ligasa de ubiquitina RNF189 ya que como se mencionó anteriormente, esta ligasa de ubiquitina se ha visto sobre-expresada en diversas líneas celulares tumorigénicas además de muchos tejidos tumorales como ovario, cervix, útero, mama y testículo^{80,81} contribuyendo con el proceso de transformación celular y que la reducción de sus niveles mediante *small interfering RNAs* (siRNAs) o *short hairpin RNAs* (shRNAs), aumentan la sensibilidad de estos tumores a sufrir muerte celular por agentes quimioterapéuticos^{79, 88} además de

que este análisis bioinformático mostró que, a nivel post-transcripcional, RNF189 podría ser regulada por acción del microRNA-7.

Teniendo en cuenta que: 1) la desregulación de las ligasas de ubiquitina se ha asociado con el proceso de transformación celular, específicamente que la ligasa de ubiquitina RNF189 se sobre-expresa en tumores derivados de diferentes contextos celulares y que regula los niveles del supresor de tumores p53, 2) que el microRNA-7 puede actuar como un “supresores de tumores” dependiendo del contexto celular y 3) que el análisis bioinformático identificó que RNF189 puede ser blanco directo del microRNA-7, proponemos que la función “supresora de tumores” del microRNA-7 se da en parte al regular de manera negativa los niveles proteicos de RNF189, propiciando un aumento de los niveles de p53.

III. HIPÓTESIS

La función de supresor de tumores del microRNA-7 involucra prevenir la degradación de p53 mediada por la ligasa de ubiquitina RNF189.

IV. OBJETIVOS

IV.I General

Demostrar que la inhibición de la ligasa de ubiquitina RNF189 por el microRNA-7, aumenta la actividad del supresor de tumores p53.

IV.II Particulares

- A) Confirmar que la ligasa de ubiquitina RNF189 es blanco directo del microRNA-7.
- B) Determinar si la sobre-expresión del microRNA-7 inhibe la proliferación celular.
- C) Evaluar si la sobre-expresión del microRNA-7 aumenta la muerte celular de manera dependiente de p53.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.I Líneas Celulares

Como modelo *in vitro* se utilizaron las líneas celulares positivas para el Virus del Papiloma Humano CaSki y SiHa (ambas con subtipo 16), HeLa y CaLo (ambas con subtipo 18), además de la línea celular C33A derivada de un carcinoma cervical no positiva para VPH y la línea celular A549 que es un adenocarcinoma de células basales epiteliales alveolares humanas.

Las líneas CaSki, SiHa, HeLa, CaLo y C33A se mantuvieron en medio RPMI Advanced (*Roswell Park Memorial Institute Advanced*), mientras que la línea A549 se mantuvo en medio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*). Ambos fueron suplementados con Penicilina 50 unidades/mililitro (U/mL), Estreptomina 50 miligramos/mililitro (mg/mL) y Glutamina 2 milimolar (mM), además de Suero Fetal Bovino (SFB) al 1 y 5%, respectivamente. Las células se mantuvieron en una atmósfera de CO₂ al 5%, 37 °C con 90% de humedad.

Para mantener los cultivos, a las cajas que contenían las células se les retiró el medio, se lavaron dos veces con PBS 1X, se les agregó tripsina (0.05 %) y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. Después de esto y con ayuda de una micropipeta, las células se despegaron completamente del fondo de la caja, se adicionó medio de cultivo suplementado en relación 1:1 con respecto a la tripsina para inactivar la acción peptidasa y finalmente tomar el volumen necesario y colocarlo en otra caja que ya contenía medio nuevo, logrando una dilución determinada.

V.II Criopreservación celular

Las líneas celulares en cultivo se lavaron dos veces con PBS 1X, se retiró y se agregó tripsina (0.05 %) para luego incubarse durante 5 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo, las células se despegaron del fondo de la caja con ayuda de una micropipeta y se les agregó medio suplementado (relación 1:1 con respecto a la tripsina) para detener la acción peptidasa de la tripsina. El medio se transfirió a tubos de fondo cónico de 15 mL de capacidad. A continuación estos tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 revoluciones por minuto (rpm).

Finalmente, el medio se retiró del tubo y la pastilla celular se resuspendió en 1 mililitro (mL) de SFB con 8 % de dimetil sulfóxido (DMSO) y se colocó en un vial de congelación para ser guardado a -70 °C.

V.III Plásmidos

Para los experimentos se utilizó el vector de clonación pcDNA 3.1 (Invitrogen) y el vector pcDNA 3.1 al que se le insertó la secuencia del microRNA-7 de *Mus musculus* (pcDNA/miR-7), el cuál fue generado previamente en el laboratorio ¹²³.

V.IV Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para los ensayos de Western Blot fueron: anti-Actina (I-19): sc-1616, adquirido de *Santa Cruz Biotechnology*, el anticuerpo anti-RNF189 GTX117832 adquirido de GeneTex y el anticuerpo anti-pSAPK/JNK (Thr183/Tyr185) #9251 adquirido de Cell Signaling.

El anticuerpo anti-p53 (pab 204): sc-99 de *Santa Cruz Biotechnology* fue proporcionado por el Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales (Instituto Nacional de Salud Pública) y el anticuerpo anti-caspasa 3 procesada #9662 de *Cell Signalling*, proporcionado por el Dr. Tomás David López Díaz (Instituto de Biotecnología, UNAM).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron rabbit anti-mouse IgG-HRP: sc-358920, mouse anti-goat IgG-HRP: sc-2354 y donkey anti-rabbit IgG-HRP: sc-2317 de Santa Cruz Biotechnology.

V.V Análisis bioinformático

Primeramente, de la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org>) se obtuvo la secuencia de la región 3'UTR de la ligasa de ubiquitina RNF189 y E6-AP de humano, además de la secuencia del microRNA-7 maduro de la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org>). Para predecir si la 3'UTR de la ligasa de ubiquitina RNF189 presenta sitios de unión potenciales para miR-7 se utilizaron los programas PITA (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction), *RNAHybrid* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) y miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/getGeneForm.do>).

Para conocer la conservación de la ligasa de ubiquitina RNF189 entre distintas especies se realizó un Alineamiento de secuencias (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y para evaluar la conservación de los sitios de unión predichos para miR-7, se realizó un Alineamiento de secuencias múltiple (Clustal Omega) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>).

Finalmente, para observar los blancos y las redes de interacción de las distintas ligasas de ubiquitina se utilizó el software *PCViz Pathway Commons Network Visualizer* (<http://www.pathwaycommons.org/pcviz>).

V.VI Transfección transitoria con el microRNA-7 para medir los niveles de RNF189 y evaluar proteínas que controlan la apoptosis por medio de cinéticas a tiempos cortos

En cajas de 60 mm se sembraron 500,000 células pertenecientes a la línea celular CaSki y A549, a las cuales, al tener un 80% de confluencia se les substituyó el medio RPMI *Advanced* suplementado por medio de transfección (RPMI *Advanced* sin suplementar).

Posteriormente, las células se transfectaron con 500, 1000 y 2000 nanogramos (ng) del vector pcDNA/miR-7, utilizando células transfectadas con 1000 ng del vector pcDNA vacío como control para evaluar los niveles de expresión de la proteína RNF189 (43 kDa) y Actina (43 kDa) como control de carga por medio de Western blot después de 48 horas.

Por otro lado, células CaSki se transfectaron con 1000 ng del vector pcDNA/miR-7 y 1000 ng del vector pcDNA vacío y se dejaron incubar durante 4 horas. Transcurrido el tiempo, a las células se les colocó medio RPMI *Advanced* suplementado al 1% con Suero Fetal Bovino y se obtuvieron imágenes fotográficas, además de cosecharse a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas post transfección para observar la viabilidad celular y posteriormente conocer los niveles de p53 (53 kDa), pJNK (46 y 53 kDa) y caspasa 3 (17 kDa) mediante Western Blot, utilizando como control de carga Actina (43 kDa).

V.VII Transfección transitoria con el microRNA-7 y conteos celulares

En cajas de 24 pozos se sembraron 100,000 células de las líneas CaSki, SiHa, HeLa, CaLo, C33A y A549 por pozo y se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Después, las células se transfectaron con 1000 ng del vector pcDNA/miR-7, 1000 ng de pcDNA 3.1, transfectadas únicamente con lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) y células no tratadas. Cuatro horas después el medio de transfección se reemplazó por medio RPMI suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (*ByProducts*) y el número de células se determinó a las 24, 48 y 72 horas post-transfección.

De igual forma, células CaSki transfectadas con 1000 ng de pcDNA/miR-7 y 1000 ng del vector pcDNA 3.1 vacío fueron tratadas con el inhibidor de caspasa 3, z-vad (Calbiochem) a una concentración de 100 μ M diluido en DMSO, pcDNA + inhibidor, miR-7 + inhibidor, con los controles respectivos: células no transfectadas en presencia del inhibidor o de DMSO) para finalmente evaluar el número celular 24 horas post-transfección por medio de la cámara de Neubauer.

Para determinar el número celular, las células se despegaron con tripsina y se tomaron 20 microlitros (μ L) de suspensión celular, se colocaron en un tubo de polipropileno que contenía 20 μ L de azul de tripano y se mezclaron. Posteriormente se tomaron 10 μ L de la mezcla y se colocaron en una cámara de Neubauer.

El procedimiento con el que se calculó el número de células fue el siguiente: se sumaron las células de los 4 cuadrantes exteriores, el total se dividió entre el número de cuadrantes (4), el resultado se multiplicó por el factor de dilución que fue 2 (1:1) y el total se multiplicó por 10^4 células, lo que resulta en el número de células por ml.

V.VIII Tratamiento con luz Ultravioleta

En cajas de 60 mm se sembraron 500,000 células pertenecientes a la línea celular CaSki y se dejaron incubar durante 24 horas. Hecho esto a las células se les retiró el medio de cultivo, se lavaron dos veces con PBS 1X y se les colocaron 2 mL de PBS 1X. A continuación las células fueron irradiadas con 10 Joules/m² (j/m²) durante 30 segundos. Terminado el tratamiento las células se lavaron nuevamente con PBS 1X y se cosecharon a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas post-irradiación. Finalmente, por

medio de Western blot se evaluaron los niveles proteicos de pJNK (46 y 53 kDa) utilizando Actina como control de carga (43 kDa)

V.IX Extracción de proteína total

Para obtener extractos proteicos totales, a cada caja de 60 mm de diámetro se le retiró el medio de cultivo, se lavó dos veces con PBS 1X y se agregaron 100 µL de buffer de lisis TBL (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 137 ó 250 mM (dependiendo del experimento), beta glicerolfosfato 25 mM, pirofosfato de sodio (PPiNa) 2 mM, EDTA 2 mM pH 7.4, Triton X-100 1%, Glicerol (10%) con inhibidores de proteasas (Pepstatina 5 µg/mL, Leupeptina 5 µg/mL, Antipaina 5 µg/mL, Aproptinina 5 µg/mL, PMSF 1 mM), un inhibidor de fosfatasas (Na₃VO₄, 1 µM) y un agente reductor (DTT 0.5 mM).

Posteriormente, las células se rasparon y se recuperó el buffer, el cual se colocó en tubos de polipropileno de 1.5 mL, se incubó en hielo por 15 minutos y se centrifugaron a 4 °C, durante 10 minutos a 15.000 rpm. Terminado el tiempo de centrifugación, el sobrenadante se colocó en tubos de polipropileno que se almacenaron a -70 °C.

V.X Western Blot

La concentración proteica de las distintas muestras experimentales se determinó mediante el método de Bradford ¹²⁵. Cuarenta microgramos de proteína se desnaturalizaron en 30 microlitros de buffer de muestra 1X (375 mM Tris-HCL (pH 6.8), SDS al 6%, glicerol al 4%, 2-mercaptoetanol al 2% y azul de bromofenol al 0.03%) por ebullición durante 5 minutos y se almacenaron a 4°C.

Las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10 ó 12.5% el cual se corrió a 30 microAmperes (mA) durante 1:30 horas. Posteriormente, las proteínas ya separadas por peso molecular en el gel, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE-Healthcare) a un voltaje constante de 100 milivolts (mV) durante 90 o 45 minutos dependiendo del peso molecular de la proteína de interés.

A continuación, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau 0.1 % (Sigma) para observar el patrón de las proteínas. La membrana se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se bloqueó durante 1 hora con leche descremada al 5 % diluida en TBS-Tween-20 (TBS: 10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl y Tween-20: al 0.05%) (Sigma). Después se agregaron los anticuerpos primarios

diluidos en TBS-tween 20 (0.05 %), conforme las especificaciones del proveedor durante una noche a 4 °C con agitación constante.

Cumplido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween-20, un lavado de 5 minutos con TBS-Tween 20 Alto en Sal (500 mM) y un lavado de 5 minutos con TBS-Tween 20 y se agregó el anticuerpo secundario correspondiente (dependiendo del anticuerpo primario utilizado) diluido conforme las especificaciones del proveedor. Las membranas con el anticuerpo secundario se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y con agitación constante para después hacer dos lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween-20, un lavado de 5 minutos con TBS-Tween 20 alto en cloruro de sodio (500 mM) y un lavado de 5 minutos con TBS-Tween 20.

Para observar la inmunoreactividad de los anticuerpos, estos fueron detectados por quimioluminiscencia mediante un equipo c-Digit con el software Image Studio Lite Software donde se adquirieron las imágenes finales. Con este mismo software se obtuvieron los valores densitométricos de cada ensayo de Western Blot.

Finalmente, para probar la misma membrana con un anticuerpo diferente, se removieron los anticuerpos utilizados anteriormente haciendo dos lavados de 20 minutos cada uno con solución desnudante (Glicina 200 mM, NaCl 500 mM, pH 2.5), seguido de dos lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween 20 Alto en Sal y dos lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween 20. Después se agregaron los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en TBS-Tween 20 conforme las especificaciones del proveedor durante una noche a 4 °C con agitación constante para continuar el protocolo como se describió anteriormente.

V.XI Determinación de los niveles del microRNA-7 por medio de PCR en tiempo real

El RNA total se extrajo conforme al método de Chomczynski y Sacchi¹²⁶. La concentración de RNA se cuantificó en un NanoDrop (Thermo Scientific). Los oligonucleótidos utilizados para retrotranscribir y amplificar el microRNA-7, se diseñaron según lo reportado por Varkonyi-Gasic¹²⁷ y Chen¹²⁸. Los oligonucleótidos (Información suplementaria) se analizaron para calcular la Tm y evitar la formación de dímeros mediante el programa Perl Primer.

La transcripción reversa se realizó de acuerdo con Varkonyi-Gasic¹²⁷, utilizando la transcriptasa reversa termoestable M-MLV (0.25 μ l). La mezcla de reacción se realizó utilizando Buffer First Strand 5X (4 μ l), (DTT 0.1 M (2 μ l), dNTP 10 μ M (0.5 μ l), oligo reverso U6 1 μ M (1.5 μ l), oligo RT stem-loop miRNA 1 μ M (1 μ l) en agua DEPC en un volumen final de 20 μ l por reacción. En todos los casos se utilizaron 100 ng de RNA total. Se incluyeron como controles negativos de la RT, una reacción sin enzima y otra sin RNA. El cDNA obtenido se congeló a -20°C hasta su uso en reacciones de qPCR.

Para evaluar los niveles de expresión del microRNA-7 en las muestras se adicionó 1 μ l de cDNA por duplicado en la siguiente mezcla de reacción para PCR en tiempo real para 10 μ l: Platinum Sybr qPCR 2X 5 μ l; oligo Fw qPCR mir-7(10 μ M) 1 μ l; Universal qPCR Primer (10 μ M) y H₂O libre de nucleasa 2 μ l. El snRNA U6 se utilizó como control de gen de referencia y para este caso en la mezcla de reacción se utilizaron dos pares de oligos específicos Fw qPCR U6 (2.5 μ M) y Rev qPCR U6 (2.5 μ M). Las muestras se corrieron en un equipo de PCR tiempo real (Applied Biosystem) con los siguientes parámetros: 95°C, 10 minutos; ciclo 1-40 (95°C 15 segundos, 60°C 10 segundos); ciclo 41 95°C, 15 segundos, 60°C, 1 minuto; 95°C, 15 segundos. La T_m del microRNA-7 y la del snRNA U6 es de 60°C.

Posteriormente, para cuantificar los niveles del microRNA-7 en todas las muestras se obtuvo el valor $\Delta\Delta$ CT y los valores se normalizaron con respecto al control (células transfectadas con el vector pcDNA vacío).

V.XII *Análisis estadísticos*

Los niveles de RNF189 en las líneas celulares CaSki y A549 se hicieron por triplicado. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. Para medir la significancia estadística de cada uno de los experimentos se realizaron pruebas de T de Student.

Los ensayos de proliferación de las líneas celulares CaSki, SiHa, HeLa, CaLo, C33A y A549 se realizaron por triplicado y cada condición se realizó con triplicados técnicos. En el caso de los conteos en células CaSki, utilizando el inhibidor de caspasa 3 se realizaron triplicados y cada condición se realizó con duplicados técnicos. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. Para medir

la significancia estadística de cada uno de los experimentos se realizaron pruebas ANOVA seguida de Tukey.

Los niveles del microRNA-7 se obtuvieron a partir de *pools* en cada una de las condiciones. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. Para medir la significancia estadística de cada uno de los experimentos se realizaron pruebas de T de Student.

Todos los valores fueron normalizados con respecto a las condiciones control y el valor p obtenido a partir de estas pruebas fue definido como ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05.

VI. RESULTADOS

VI.I Las ligasas de ubiquitina identificadas como blancos del microRNA-7 mediante el pull down se encargan de regular diferentes procesos celulares relacionados con el proceso de transformación celular

La información experimental obtenida a partir del ensayo de *pull down*, indica que los blancos del microRNA-7 incluyen 8 ligasas de ubiquitina: CBL, UBE3C, TRIM8, DCAF17, RNF5, RNF38, RNF144A Y RNF189. Estas ligasas se encargan de regular diversos procesos celulares fundamentales mediante el control de los niveles (por degradación) o la actividad (inhibiendo o modificando la localización) de un gran número de blancos y es por esta razón que la célula cuenta con diferentes mecanismos encargados de controlar tanto la expresión como la actividad de estas proteínas con el propósito de mantener el funcionamiento adecuado de los diferentes sistemas celulares^{10, 13, 19, 25, 59, 60, 61, 66, 70-72}.

De estas ocho ligasas, se cuenta con evidencias de que el aumento en los niveles de RNF189 promueve la proliferación, supervivencia e incluso incrementa la resistencia a tratamientos anti-tumorales en cáncer de ovario, cervix, mama, útero y testículo por lo que RNF189 se puede considerar como una “ligasa oncogénica”^{80, 81, 88}. Por tanto RNF189 es una candidata ideal para evaluar el efecto de la disminución de sus niveles por acción del microRNA-7, en células tumorales. Por lo que el siguiente paso fue confirmar que RNF189 es blanco directo de este microRNA.

VI.II La 3'UTR de la ligasa de ubiquitina RNF189 tiene sitios de unión para el microRNA-7

De acuerdo a los datos que sugieren que la ligasa de ubiquitina RNF189 puede ser blanco directo del microRNA-7, el análisis bioinformático mostró que en su 3'UTR existen 010 sitios de unión potenciales para este microRNA (**Figura 9, panel A**). De estos, los sitios localizados en las posiciones 299 - 306 y 400 - 407 son los mejores candidatos con base en el valor $\Delta\Delta G$, parámetro termodinámico que indica que tan alta es la probabilidad de interacción microRNA-mRNA (de -6.48 y -8.62 respectivamente), la complementariedad de la región semilla, determinante para la

especificidad de interacción la cual es 8/8 nucleótidos para el primer sitio de unión y 7/8 para el segundo y con base a la conservación de esta secuencia en distintas especies ambos sitios se encuentran en distintas especies de homínidos entre los que se encuentran *Homo sapiens*, *Pan troglodytes* y *gorilla gorilla* (Figura 9, Panel B).

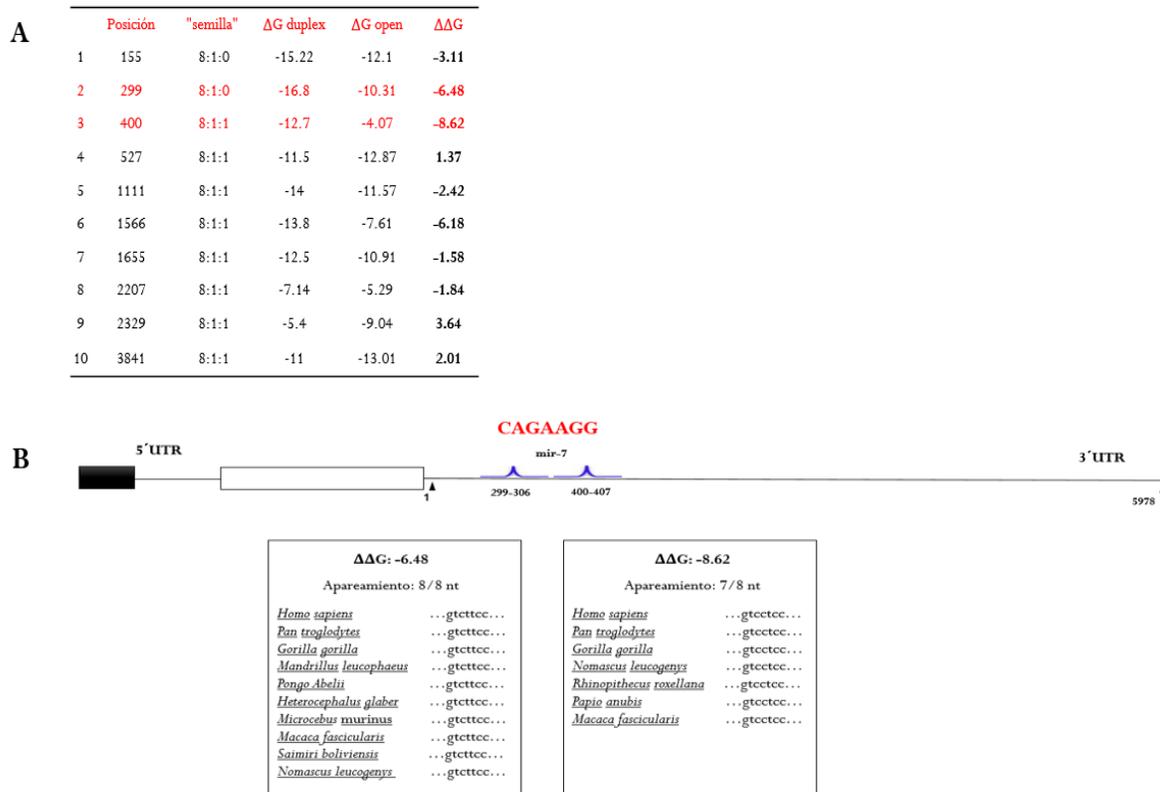


Figura 9: La 3'UTR de la ligasa de ubiquitina RNF189 presenta sitios de unión para el microRNA-7 **A)** Análisis bioinformático hecho con el programa PITA que muestra los sitios de unión del microRNA-7 en la 3'UTR de RNF189. **B)** Esquema donde se muestran los sitios ubicados en las posiciones 299 – 306 y 400 – 407 quien presenta el mejor valor termodinámico ($\Delta\Delta G$) además de la complementariedad de su región semilla y la conservación del sitio entre distintas especies.

El modelo *in vitro* elegido para evaluar la función supresora de tumores del microRNA-7 fue la línea celular CaSki, la cual pertenece a un contexto de cáncer cervical provocado por el Virus del Papiloma Humano (VPH), subtipo 16. Esta línea reúne varias características importantes ya que se ha observado que el supresor de tumores p53 no presenta mutaciones aunque se debe recalcar que sus niveles se encuentran disminuidos por la acción de la ligasa UB3A, necesaria durante el ciclo de infección del VPH^{33, 111, 129, 130, 131, 132}, además de que en este contexto se tienen evidencias que el microRNA-7 actúa

como “supresor de tumores”^{117, 119, 133, 134} y que en esta línea celular se ha asociado un aumento en los niveles de RNF189 con el inicio y/o progresión del proceso de transformación celular^{80, 83, 81}.

Para determinar que existe una interacción directa entre la región 3'UTR de RNF189 y el microRNA-7, se evaluó si el aumento en la expresión de este microRNA provoca la disminución de los niveles proteicos de RNF189. Para eso, células CaSki y A549 fueron transfectadas con 1000 ng del vector de expresión pcDNA que codifica para la secuencia del pre-miR-7 (pcDNA/miR-7) o 1000 ng del vector de expresión pcDNA vacío (pcDNAv), 48 horas después evaluamos los niveles de RNF189 por medio de western blot.

Al transfectar la línea celular CaSki con el microRNA-7, se observó una disminución del 40% en los niveles proteicos de RNF189 al compararse con las células transfectadas únicamente con el vector pcDNAv (**Figura 10, Panel A y B**). En contraste, la expresión del microRNA-7 en células A549 no disminuyó los niveles proteicos de RNF189 (**Figura 10, Panel A y B**). Los cambios en los niveles de RNF189 no se deben a diferencias en la cantidad de proteína ya que los niveles de actina fueron similares (**Figura 10, Panel A y B**). Para descartar la posibilidad de que las diferencias en los niveles proteicos de RNF189 se debieron a un mecanismo independiente de la sobre-expresión del microRNA en las células CaSki, los niveles de expresión del microRNA-7 se determinaron por medio de PCR en tiempo real. Al transfectar la línea celular CaSki con el vector pcDNA/miR-7 se observó un aumento de los niveles del microRNA-7 de aproximadamente 0.5 veces sobre los niveles de células transfectadas con el vector pcDNAv, sin embargo, la variabilidad tan alta en los niveles del microRNA de las células transfectadas no permitió observar diferencias significativas entre los niveles de expresión de células transfectadas con el microRNA y con el vector pcDNAv (**Figura 10, Panel C**). En cambio, en la línea celular A549, al ser transfectadas con el vector pcDNA/miR-7 se logró aumentar tres veces los niveles de este microRNA a comparación de los niveles de células transfectadas con el vector pcDNAv (**Figura 10, Panel C**), sin embargo, dado que la línea celular A549 se observaron niveles considerablemente elevados de RNF189, nuestros datos sugieren que en estos experimentos, 1000 ng del microRNA-7 no son suficientes para disminuir los niveles proteicos de RNF189.

Aunque no se lograron observar diferencias significativas en los niveles proteicos de RNF189 y los niveles del microRNA-7 en la línea celular CaSki, observamos una correlación inversa por lo que

nuestros datos sugieren que la ligasa de ubiquitina RNF189 puede ser regulada por acción del microRNA en este contexto celular, además de que en la línea celular A549 a pesar de que se logró sobre-expresar los niveles del microRNA-7, no fue suficiente para disminuir de manera significativa los niveles de RNF189.

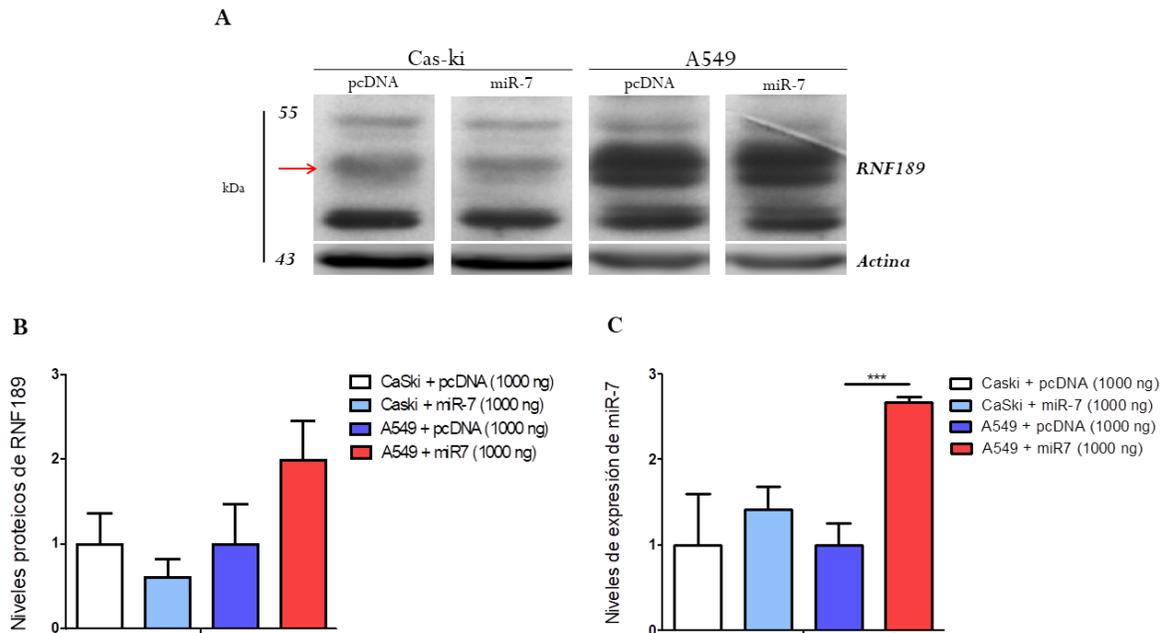


Figura 10: La ligasa de ubiquitina RNF189 es blanco directo del microRNA-7 **A)** Las líneas celulares CaSki y A549 fueron transfectadas con 1000 ng del vector de expresión pcDNA/miR-7 y el vector pcDNA vacío. Terminada la transfección las células se dejaron incubar durante 48 horas. Después de este tiempo se midieron los niveles de RNF189 (43 kDa) y Actina (43 kDa) como control de carga por medio de Western Blot. **B)** Densitometría del Western Blot. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes (+ desviación estándar). **C)** Se preparó RNA total y por medio de q-PCR se midió la expresión del microRNA-7, utilizando el snRNA U6 como control de carga. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba T de Student.*** $p < 0.005$, * $p < 0.05$ vs pcDNA.

VI.III La sobre-expresión del microRNA-7 inhibe la proliferación celular de la línea celular CaSki

Para evaluar la posibilidad de que la función de supresora de tumores del microRNA-7 sea mediado a través de promover la disminución de los niveles de RNF189, permitiendo que los niveles de p53 aumenten, controlando así el proceso de transformación en este contexto celular, evaluamos el efecto de la sobre-expresión de este microRNA sobre la proliferación. Para esto las células CaSki se transfectaron con 1000 ng del vector pcDNA/miR-7 o 1000 ng del vector de expresión pcDNAv y el número de células se cuantificó a las 24, 48 y 72 horas post-transfección.

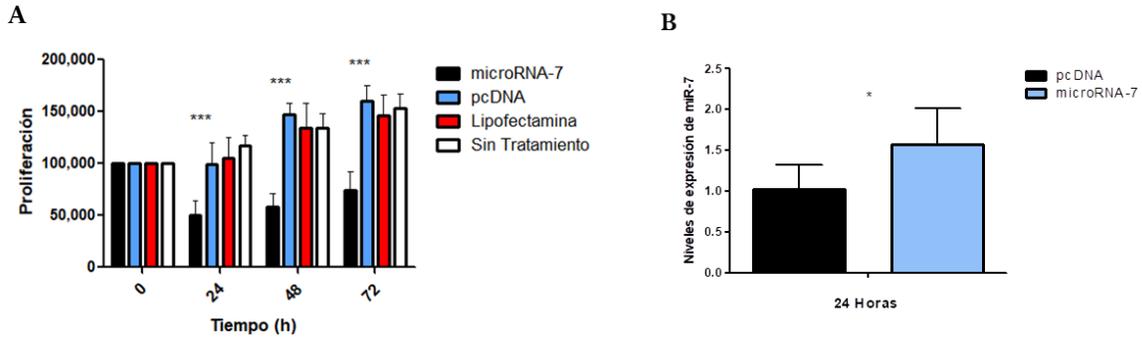
Desde las 24 horas se observó una disminución del 50% en el número de células que fueron transfectadas con el vector de expresión pcDNA/miR-7, aunque el número de células presenta un ligero aumento a las 48 y a las 72 horas donde se registraron 70,000 células, este fue significativamente menor que el observado en las células transfectadas con el vector vacío (**Figura 11, panel A y B**). Esto sugiere que un aumento en los niveles del microRNA-7 provoca muerte dentro de las primeras 24 horas post-transfección, además de que a las 48 y 72 horas las células restantes presentaron una reducción considerable en la proliferación celular. En contraste, las células transfectadas con el vector pcDNA_v mostraron una proliferación significativamente mayor a partir de las 48 horas, el procedimiento de transfección con lipofectamina sin DNA tampoco afectó la capacidad proliferativa de las células ya que se obtuvieron números similares los de los cultivos no tratados (**Figura 11, panel A y B**).

Para confirmar que el efecto de la sobre-expresión del microRNA-7 sobre la proliferación o sobrevivencia celular depende del contexto molecular, el cual es particular de cada línea celular, se sobre-expresó el microRNA-7 en la línea celular A549. Acorde a los resultados reportados previamente en nuestro grupo de investigación^{123, 135}, la expresión del microRNA-7 en las células A549 indujo un aumento significativo en la proliferación desde las 24 y hasta las 72 horas al compararse con células transfectadas con el vector pcDNA vacío (**Figura 11, Panel C y D**).

Los efectos observados muestran que la función de un microRNA se encuentra determinada por los blancos que este regula en un contexto molecular determinado (característico de cada línea celular) ya que en CaSki un aumento en los niveles del microRNA-7 promovió la disminución del número celular dentro de las primeras 24 horas post-transfección en tanto que en la línea celular A549 ocurre el efecto contrario. Lo cual también podría correlaciona con que el microRNA-7 reduce los niveles de RNF189 en las células CaSki y no en las células A549.

Estos resultados indican que la sobre-expresión del microRNA-7 promueve la disminución del número celular en un contexto de cáncer cervical (CaSki) y por el contrario, dicha sobre-expresión promueve el aumento de la proliferación en un contexto pulmonar (A549), por lo cual, el siguiente paso fue determinar el tiempo al que inicia la disminución del número celular después de la expresión del microRNA-7 y si esto es debido a la inducción de muerte celular.

Línea celular CaSki



Línea celular A549

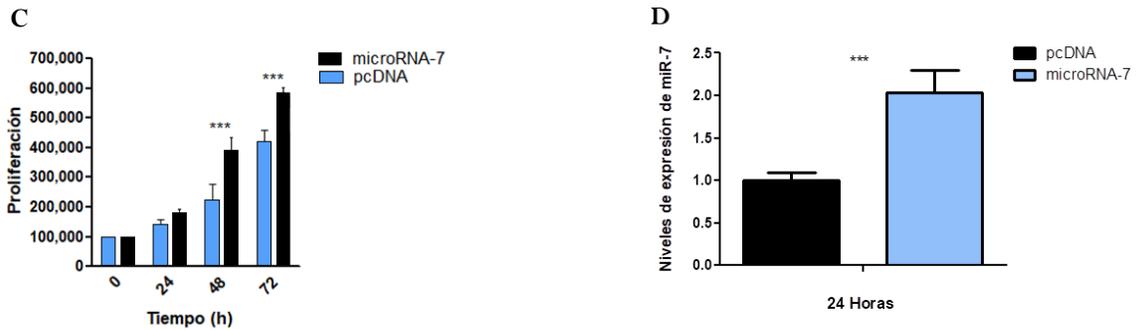


Figura 11: La sobre-expresión de microRNA-7 inhibe la proliferación celular la línea CaSki. **A y C)** Se sembraron 100,000 células CaSki y A549 transfectadas con 1000 ng del vector de expresión pcDNA/miR-7, con 1000 ng del vector pcDNAv, transfectadas únicamente con lipofectamina y células sin tratar y se contaron a las 24, 48 y 72 horas. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con triplicados de cada uno (+ desviación estándar). **B y D)** Se preparó RNA total y por medio de q-PCR se midió la expresión del microRNA-7, utilizando el snRNA U6 como control de carga. Cada valor representa el promedio de un “pool” realizado (+ desviación estándar). En el caso de los conteos celulares, el análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA Tukey y en el caso de la medición de los niveles del microRNA-7, se realizó una prueba T de Student. * $p < 0.05$ vs pcDNA y *** $p < 0.001$ vs pcDNA, lipofectamina y sin tratamiento.

VI.IV La sobre-expresión del microRNA-7 promueve apoptosis de la línea celular CaSki dentro de las primeras 24 horas post-transfección

Diferentes evidencias indican que un aumento en los niveles del microRNA-7 produce un efecto “supresor de tumores” en distintos contextos celulares mediante la inducción de muerte celular¹¹⁷⁻¹²⁰. Por tanto evaluamos si la sobre-expresión del microRNA-7 induce apoptosis y para esto nuevamente se realizaron transfecciones con 1000 ng del vector pcDNA/miR-7, 1000 ng del vector pcDNAv en la línea celular CaSki y se monitorearon a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas.

La expresión del microRNA-7 en células CaSki provocó un aumento en el número de células no adherentes a partir de las 4 horas post-transfección, comparado con lo observado en las células transfectadas con el vector pcDNAv, el cual se mantuvo a lo largo del experimento (**Figura 12, Panel A**). Consistente con esto, las células transfectadas con el microRNA-7 solo alcanzaron el 40% de confluencia 24 horas después de la transfección (**Figura 12, Panel A**). En cambio las células transfectadas con el vector pcDNAv presentaban un número menor de células no adheridas y alcanzaron la confluencia 24 horas después de la transfección (**Figura 12, Panel A**). Dado que las células en proceso de apoptosis se desprenden de la superficie de adhesión, evaluamos si la expresión del microRNA-7 promueve la muerte celular por apoptosis.

Ya que la activación de caspasa 3 es indispensable para que la célula muera por apoptosis^{109, 136-139}, evaluamos los niveles de caspasa 3 activa (la principal caspasa “efectora”) mediante Western Blot.

La expresión del microRNA-7 indujo un aumento progresivo en los niveles de caspasa 3 activa desde las 2 y hasta las 24 horas, en cambio en las células transfectadas con el vector pcDNAv los niveles de caspasa 3 activa se detectaron con un retraso de 10 horas, ya que sus niveles fueron evidentes a partir de las 12 horas post-transfección y se mantuvieron hasta las 24 horas (**Figura 12, Panel B y C**). Esto sugiere que la activación de caspasa 3 promueve la muerte celular desde tiempos muy tempranos. Consistente con esta idea, la muerte resultante de la sobre-expresión del microRNA-7 se previno al incubar las células en presencia de 100 μ m del inhibidor de caspasa, z-vad (**Figura 12, Panel D**), además de que, al evaluar los niveles de expresión de este microRNA no se observaron diferencias significativas entre las células tratadas con el microRNA y células tratadas con el microRNA y el inhibidor (**Figura 12, Panel E**).

Estos resultados confirman que la expresión del microRNA-7 promueve apoptosis durante las primeras 24 horas post-transfección por lo que el siguiente paso fue conocer si esto depende del supresor de tumores p53.

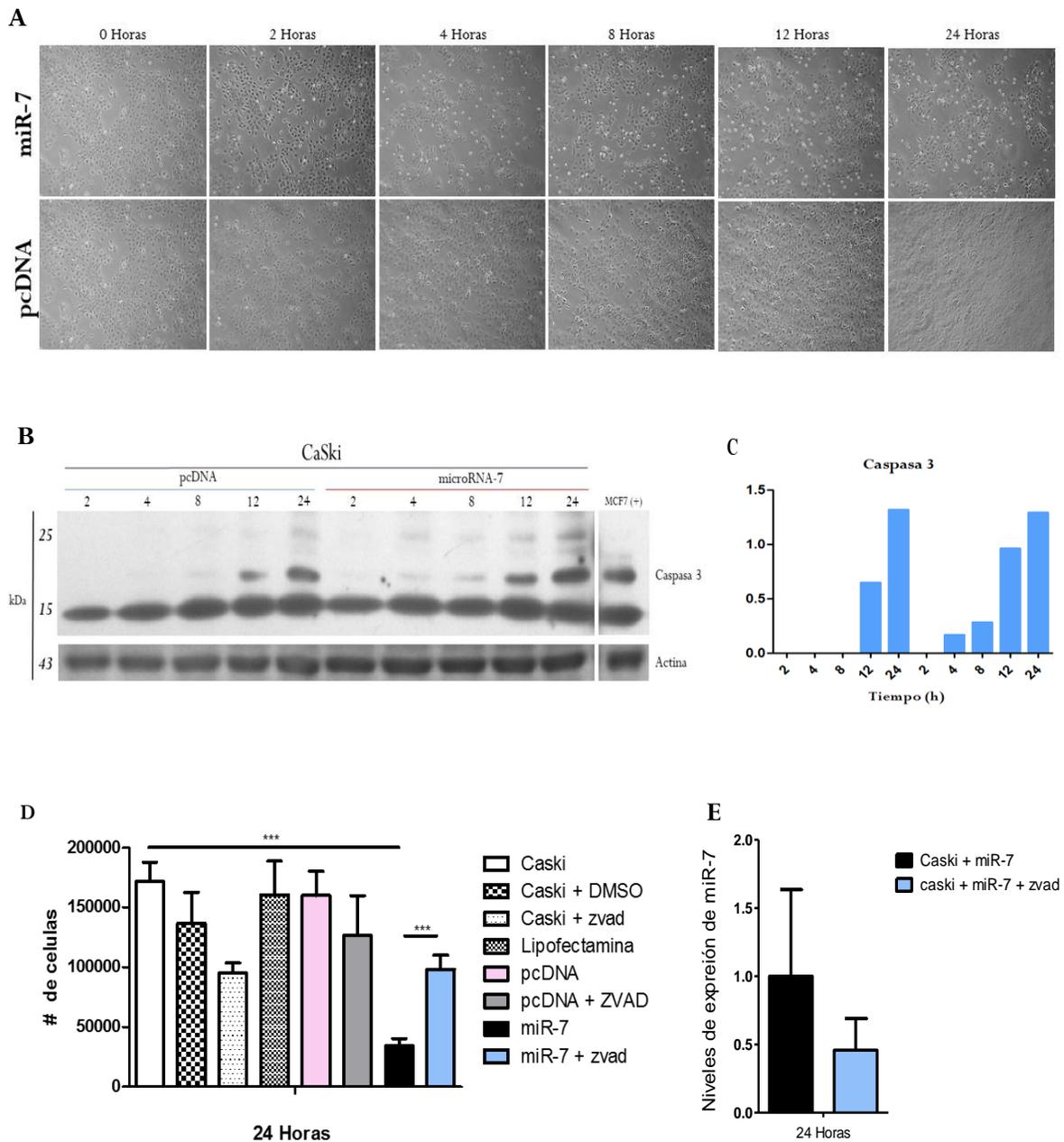


Figura 12: La sobre-expresión de microRNA-7 induce apoptosis en la línea celular CaSki. Se sembraron 500,000 células CaSki en cajas de 60mm y 4 horas después fueron transfectadas con 1000 ng del vector pcDNA/miR-7 y 1000 ng del vector pcDNA vacío para **A)** obtener fotografías y **B)** extractos celulares a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas para evaluar los niveles de Caspasa 3 (17 kDa) utilizando Actina (43 kDa) como control de carga. **C)** Densitometría del Western Blot. **D)** Se sembraron 100,000 células Ca-ski transfectadas con 1000 ng del vector de expresión pcDNA/miR-7, con 1000 ng del vector de clonación pcDNA3.1 y se les administraron 100 micromolar del inhibidor de caspasa 3 z-vad y se contaron 24 horas después de la transfección. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con duplicados técnicos de cada uno (+ desviación estándar). **E)** Se preparó RNA total y por medio de q-PCR se midió la expresión del microRNA-7, utilizando el snRNA U6 como control de carga. Cada valor representa el promedio de un "pool" realizado (+ desviación estándar). El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA Tukey *** $p < 0.001$ vs Caski, +DMSO. + zvad, lipofectamina, pcDNA, pcDNA + zvad y miR-7 + zvad. Por otro lado, en el caso de los niveles del microRNA, cada valor representa el promedio del "pool" (+ desviación estándar). El análisis estadístico se realizó con la prueba T de Student.

VI.V La apoptosis resultante de la sobre-expresión del microRNA-7 no involucra un aumento en los niveles de p53 o de JNK

Ya que nuestros datos mostraron que la expresión del microRNA-7 promueve apoptosis desde tiempos muy tempranos probablemente al reducir los niveles de RNF189, nos preguntamos si esta reducción provocaría que los niveles de p53 incrementaran permitiendo que la muerte celular se produjera. P53 fue el mejor candidato debido a que este supresor de tumores se considera una proteína fundamental para el correcto funcionamiento de varios sistemas de control con que la célula cuenta para responder de manera adecuada ante diferentes estímulos adversos provocando la inhibición del ciclo celular, la reparación del DNA la senescencia o en última instancia la inducción de apoptosis^{89, 90-97}, con esto, medimos los niveles de p53 en células CaSki a diferentes tiempos después de aumentar los niveles basales del microRNA-7.

Al evaluar los niveles proteicos de p53 en células CaSki a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de transfectar con 1000 ng del microRNA-7 y pcDNAv, no observamos algún incremento en los niveles de p53 (55 kDa) (**Figura 13, Panel A**). De acuerdo con la literatura, durante el ciclo de infección del virus del VPH, se expresa el oncogén E6 quien mediante la asociación con la ligasa de ubiquitina UBI3A (E6-AP) promueve la poliubiquitinación y degradación de p53 por el proteosoma por lo que en las líneas celulares positivas para este virus, p53 se presente en niveles casi indetectables^{33, 131, 140-144} por lo que esta puede ser la razón por la cual no se detectó un aumento en los niveles de p53 como respuesta a la expresión del microRNA-7 (**Figura 13, Panel A**), sin embargo el hecho de que la expresión del microRNA-7 en células CaSki promueva muerte celular aun cuando los niveles de p53 son muy bajos, nos puede sugerir que la muerte también podría ser provocada por un mecanismo alternativo a p53.

Debido a que se tienen reportes de que la activación de la cinasa JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), puede promover la muerte celular en respuesta a diferentes estímulos de manera independiente a p53¹⁴⁵⁻¹⁴⁷, evaluamos los niveles de fosforilación de JNK (que es un indicio de su activación) pero tampoco observamos un aumento o alguna variación en los niveles de pJNK (46 y 54 kDa) a los tiempos evaluados después de la transfección de las células con el vector de expresión del microRNA-7 (**Figura 13, Panel B**). Sin embargo, en células expuesta a radiación UV observamos un incremento de en los niveles de JNK fosforilado, lo que descarta la posibilidad de alguna falla el anticuerpo

(Figura 13, Panel C) además de que nos indica que en la línea celular CaSki, JNK aún puede ser modulado en respuesta a un estímulo adverso como la radiación UV.

Estos resultados indican que la muerte provocada por la sobre-expresión del microRNA-7 no es por medio de algún mecanismo efector de p53 o por un mecanismo alternativo como la muerte dependiente de JNK.

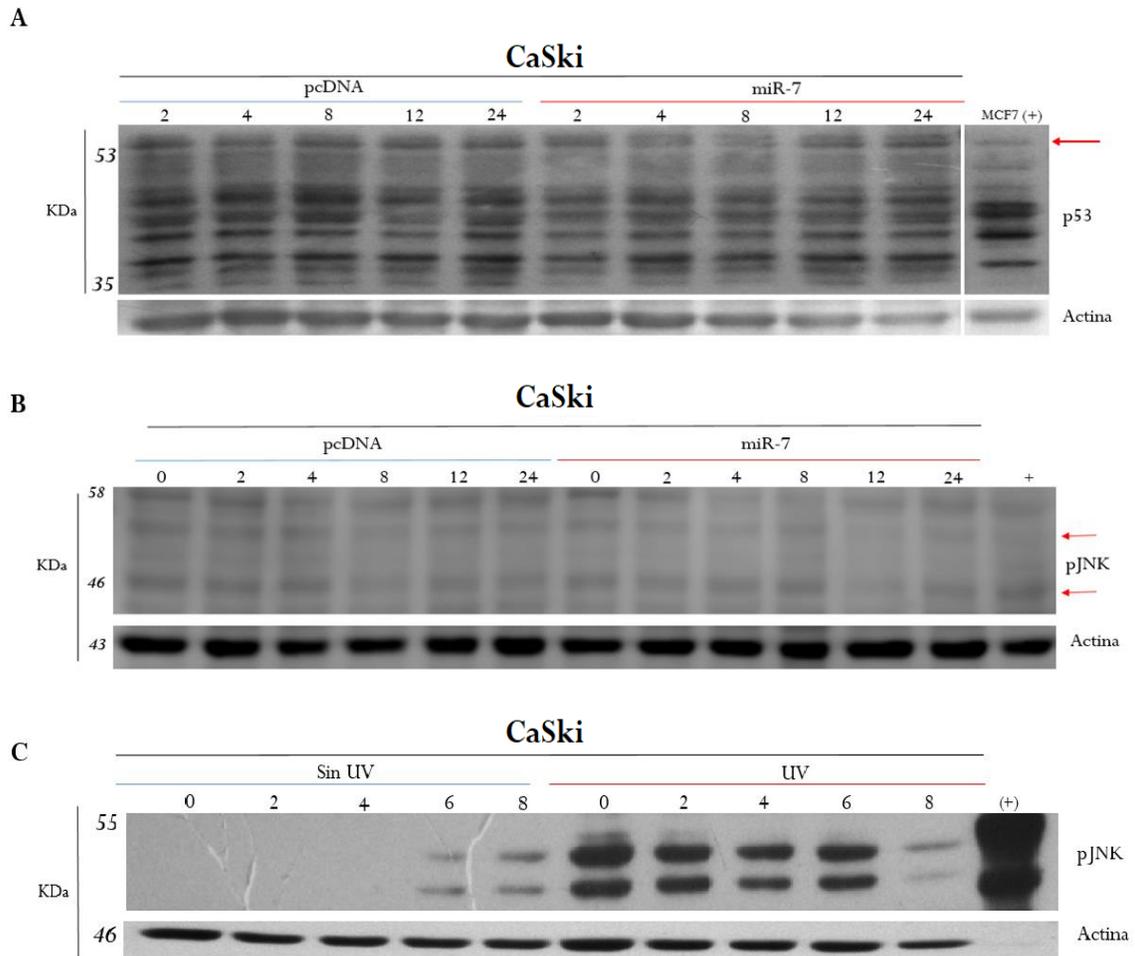


Figura 13: La apoptosis inducida por la sobre-expresión del microRNA-7 no es dependiente de p53 o pJNK. Se sembraron 500,000 células CaSki en cajas de 60mm y 4 horas después fueron transfectadas con 1000 ng del vector pcDNA/miR-7 y 1000 ng del vector pcDNA vacío para obtener extractos celulares a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas para evaluar los niveles de **A)** p53 (53 kDa), utilizando como control células MCF7 y **B)** pJNK (46 y 54 kDa), utilizando como control células cosechadas 8 horas después de ser radiadas con luz UV (10 J/m^2). **C)** Se sembraron 500,000 células CaSki en cajas de 60mm y 24 horas después fueron tratadas con luz UV a una intensidad de 10 J/m^2 para obtener extractos celulares a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas y evaluar los niveles de pJNK. En todos los experimentos se utilizó Actina (43 kDa) como control de carga. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Las flechas indica el peso esperado para p53 y pJNK.

VI.VI La muerte celular provocada por la sobre-expresión del microRNA-7 es específica de la línea celular CaSki

Ya que la línea celular CaSki es positiva para el Virus del Papiloma Humano, subtipo 16, nos preguntamos si el efecto de la sobre-expresión del microRNA-7 podría reproducirse en otras líneas celulares también positivas para este virus como HeLa (VPH 18), CaLo (VPH 18) Y SiHa (VPH 16), además de la línea neoplásica C33A, (negativa para VPH) que se usó como control (**Figura 14**).

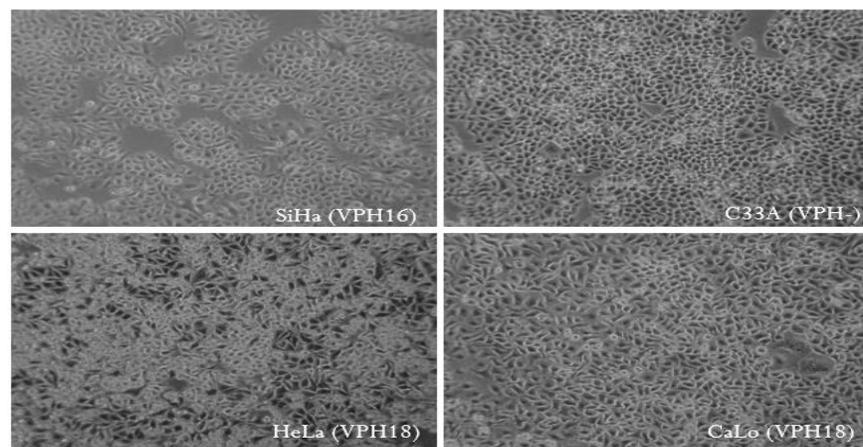


Figura 14: Líneas celulares obtenidas para evaluar los efectos de la sobre-expresión del microRNA-7.

Primeramente se evaluó el efecto de la sobre-expresión del microRNA-7 sobre la proliferación la línea celular HeLa, positiva para VPH subtipo 18 utilizando las mismas condiciones al evaluar las células CaSki. Contrario a los efectos de la expresión del microRNA-7 en células CaSki, en células HeLa no se observó efecto en la proliferación ya que el número de células aumento de manera consecutiva a las 24, 48 y 72 horas en todas las condiciones experimentales (células transfectadas con el vector pcDNA/miR-7, transfectadas con el vector pcDNA vacío, células transfectadas únicamente con lipofectamina y células no tratadas) (**Figura 15, Panel A, lado izquierdo**), a pesar de que el microRNA-7 se sobre-expresó aproximadamente 8 veces sobre los niveles de las células transfectadas con el vector pcDNAv (**Figura 15, Panel A, lado derecho**).

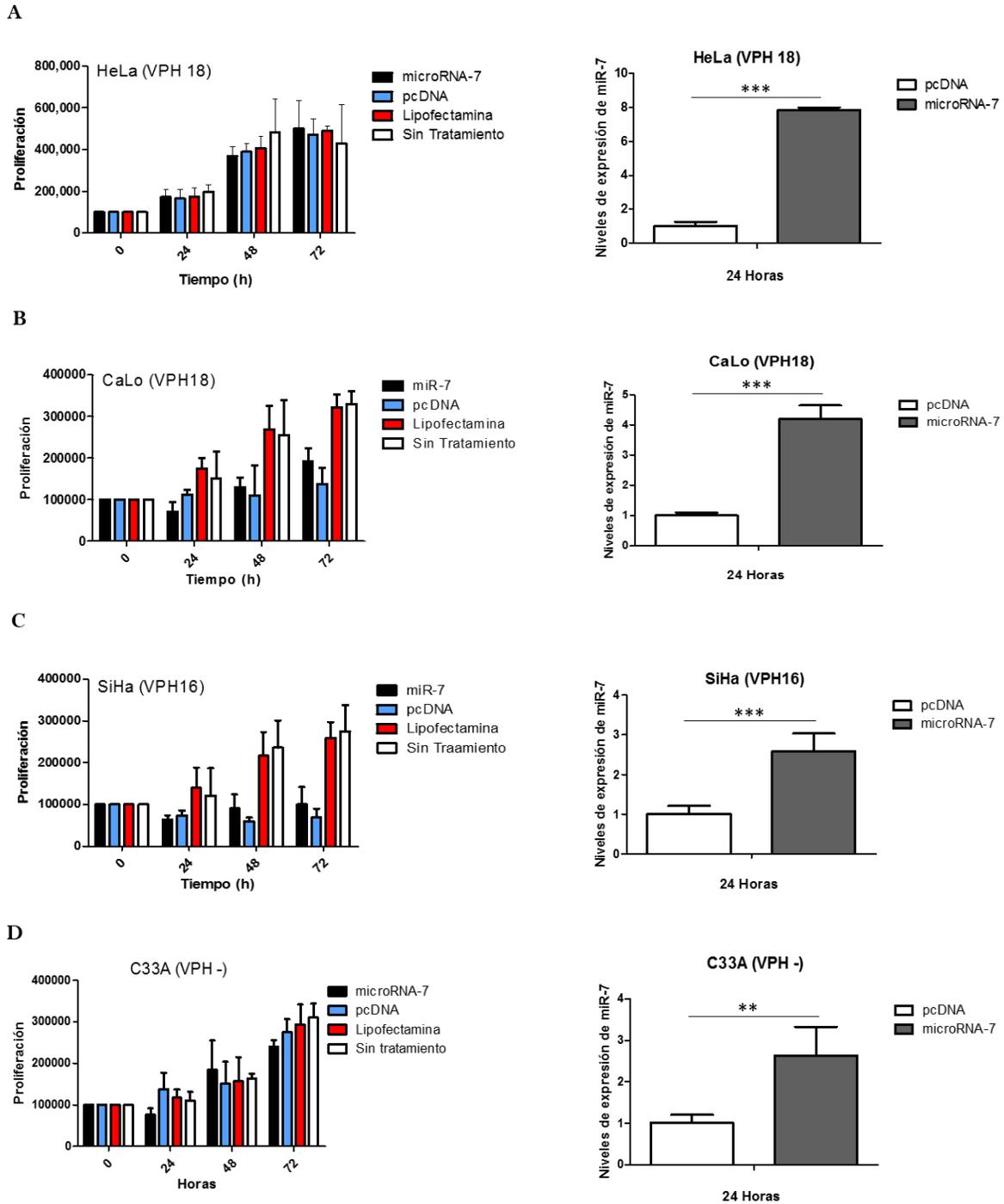


Figura 15: El efecto provocado por la sobre-expresión del microRNA-7 no se presenta en las líneas celulares HeLa, CaLo, SiHa y C33A. Se sembraron 100,000 células de cada línea celular y se transfectaron con 1000 ng del vector de expresión pcDNA/miR-7, con 1000 ng del vector de clonación pcDNA3.1, transfectadas únicamente con lipofectamina y células sin tratar y se contaron en los tiempos indicados (Gráficas de la izquierda). El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA Tukey. Por otro lado, se preparó RNA total y por medio de q-PCR se midió la expresión del microRNA-7 a las 24 horas de haber transfectado el vector pcDNA/miR-7, utilizando el snRNA U6 como control de carga (Gráficas de la derecha). En el caso de los conteos celulares, cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con triplicados de cada uno (+ desviación estándar). En el caso de los niveles del microRNA-7, cada valor representa un el promedio de un "pool". El análisis estadístico se realizó con la prueba T de Student. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs pcDNA, Lipofectamina, Sin tratamiento.

En la línea celular CaLo (también positiva para VPH subtipo 18), aunque la expresión del microRNA-7 previno la proliferación celular comparado con la observada en las células tratadas con lipofectamina o células no tratadas (**Figura 15, Panel B, lado izquierdo**) no observamos diferencia estadísticamente significativas en el número de células entre las células transfectadas con el vector pcDNAv y aquellas transfectadas con el vector de expresión pcDNA/miR-7, independientemente del tiempo y de los niveles de sobre-expresión del microRNA-7 (**Figura 15, Panel B, lado derecho**).

Similar a los resultados obtenidos con células CaLo, en las células SiHa (positiva para VPH subtipo 16) la sola introducción del vector pcDNA vacío provoca la reducción del número celular a los tiempos evaluados, a comparación de las células transfectadas únicamente con lipofectamina y las células no tratadas (**Figura 15, Panel C, lado izquierdo**), independientemente del tiempo y de los niveles de sobre-expresión del microRNA-7 (**Figura 15, Panel C, lado derecho**).

En el caso de la línea celular C33A, que es una línea de cáncer cervical que contrario a las demás, no es positiva para el VPH, además de que es nula para p53 debido a una mutación puntual en su dominio de transactivación, la expresión del microRNA-7 tampoco afectó su proliferación ya que el número de células aumentó de manera consecutiva a los tiempos evaluados en las distintas condiciones experimentales (**Figura 15, Panel D, lado izquierdo**), independientemente del tiempo y de los niveles de sobre-expresión del microRNA-7 (**Figura 15, Panel D, lado derecho**).

Con estos datos, podemos concluir que la inducción de apoptosis como resultado del aumento en los niveles del microRNA-7 ocurre específicamente en la línea celular CaSki.

Al evaluar los niveles basales del micro-RNA 7 en estas líneas celulares mediante PCR en tiempo real, observamos que las células HeLa tienen los niveles más altos, seguido de las líneas celulares SiHa y CaLo (**Figura 16**). De manera muy interesante, la línea celular CaSki, al igual que la línea C33A son las células que presentan los niveles más bajos de este microRNA (**Figura 16**). Esto nos sugiere que en la línea celular CaSki, al presentar niveles considerablemente más bajos del microRNA-7, un aumento (aunque sea sutil) podría ocasionar los efectos observados en la proliferación celular, lo que evidentemente también depende del contexto celular, dado que esto no se observó en la línea C33A. Además de esto, podemos observar que los niveles basales del microRNA-7 en la línea celular A549 son parecidos a los que presenta la línea celular CaSki, lo que nos reafirma que la función de un microRNA determinado (en este caso el microRNA-7) se encuentra influenciado por el contexto

molecular de una población celular específica, ya que un aumento en estas dos líneas celulares provoca tanto la inducción de la proliferación (A549) como la inducción de apoptosis (CaSki).

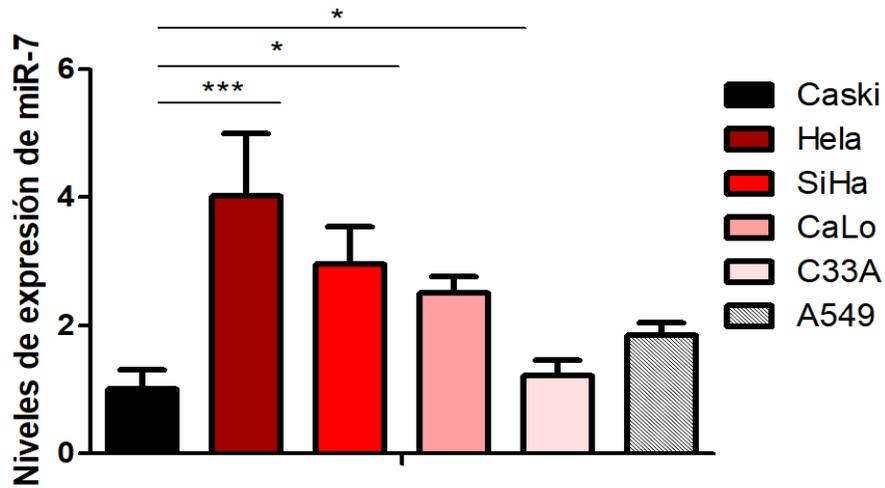


Figura 16: Las líneas celulares *CaSki*, *HeLa*, *SiHa*, *CaLo* y *C33A* presentan diferentes niveles basales del microRNA-7. Se preparó RNA total y por medio de q-PCR se midió la expresión del microRNA-7, utilizando el snRNA U6 como control de carga. Cada valor representa el promedio de un “pool” realizado (+ desviación estándar). Para evaluar la significancia estadística, se realizó una prueba t de Student. * $p < 0.05$ vs pcDNA y *** $p < 0.001$ vs das distintas líneas celulares.

VII. DISCUSIÓN

Debido a que cada microRNA puede regular decenas de blancos de manera simultánea, formando redes de regulación sumamente complejas para controlar de la expresión de genes involucrados en la regulación de procesos fundamentales para que la célula funcione de manera correcta, la regulación por acción de los microRNAs se ha considerado una maquinaria primordial de control.

Sin embargo, para entender de mejor manera cuál es la función de un microRNA determinado se deben conocer los blancos que regula dentro de un contexto celular específico. La predicción mediante el uso de algoritmos generalmente arroja cientos de blancos potenciales, desafortunadamente, una gran parte de los microRNAs predichos no siempre son blancos *bona fide*, además de que algunos análisis ignoran blancos relevantes para una función determinada. Por otra parte un análisis donde se sobre-exprese un microRNA se identifican tanto los genes que son regulados de manera directa como aquellos regulados de manera indirecta, además que es preciso descartar los blancos inespecíficos *off-targets* que solo pueden identificarse cuando se exacerbaban los niveles de un microRNA determinado. Sin embargo, con la utilización de métodos bioquímicos se ha encontrado una manera más directa para identificar los blancos de un microRNA específico debido a que se logra capturar el complejo RISC con el microRNA de interés unido a uno o varios de sus mRNA blancos.

El análisis realizado a partir del *pull down* mostró que el microRNA-7 tiene como blancos potenciales diversas proteínas que se encargan de regular procesos fundamentales como la angiogénesis, apoptosis, migración, supervivencia, proliferación, el ciclo celular y que, cuya desregulación (ya sea un aumento o una disminución) se encuentra asociada con la biología del cáncer (**Tabla 1**). Además de esto y de acuerdo a la información obtenida, entre estos blancos también se identificaron 8 ligasas de ubiquitina (CBL, UBE3C, TRIM8, DCAF17, RNF5, RNF38, RNF144A Y RNF1889).

Mediante el software online *PCViz Pathway Commons Network Visualizer* se realizó un interactoma donde se puede observar que las 8 ligasas de ubiquitina se encargan de orquestar una intrincada red de regulación mediante el control de los niveles (por degradación) o la actividad (inhibiendo o modificando la localización) de una gran cantidad de blancos (**Figura 17**). Con base en la información bibliográfica, validaciones experimentales y correlaciones tomando en cuenta distintas bases de datos,

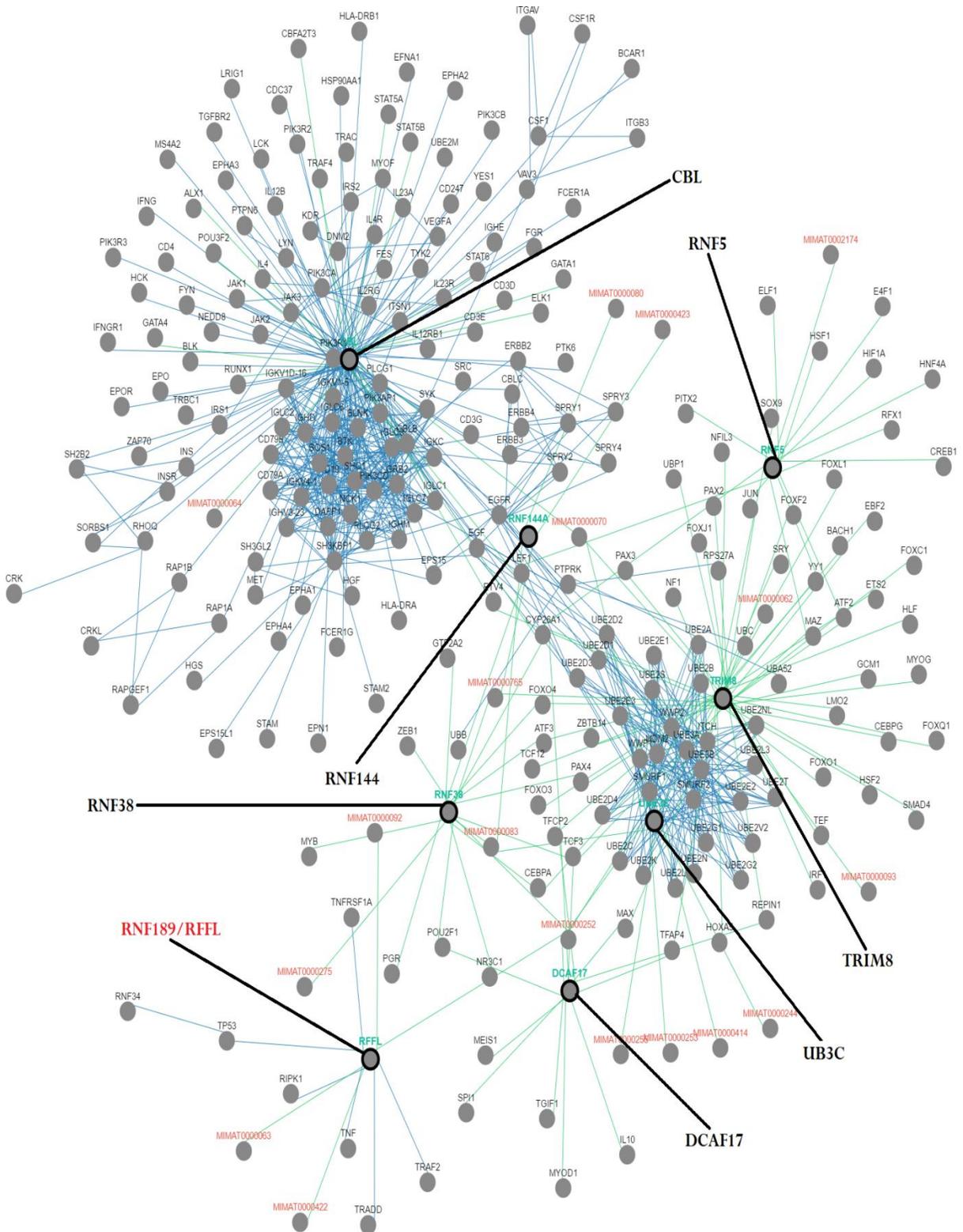


Figura 17: Las ligasas de ubiquitina identificadas mediante el pull down regulan una gran cantidad de blancos. Mediante el software PCViz Pathway Commons Network Visualizer (<http://www.pathwaycommons.org/pcviz>) se obtuvo la red de regulación de las ligasas de ubiquitina CBL, UBE3C, TRIM8, DCAF17, RNF5, RNF38 y RNF144 (remarcadas en negro). Las líneas verdes indican un control sobre la actividad de la molécula blanco, las líneas azules indican un control sobre la expresión, las moléculas no identificadas se encuentran en color rojo y RNF189 (RFFL) se encuentra resaltada en color rojo.

este software estableció las interacciones entre las ligasas de ubiquitina y todas sus moléculas blanco.

Como se sabe, la alteración (ya sea el aumento o la disminución) de los niveles de una ligasa de ubiquitina específica puede contribuir con la iniciación o progresión del proceso de transformación celular, promoviendo proliferación, supervivencia, migración y/o metástasis^{63, 70, 148} y en el caso de CBL, TRIM8, RNF5, RNF144A y RNF189 se cuenta con evidencias experimentales que muestran que el aumento o la disminución de sus niveles provoca la modificación de los patrones de expresión de sus diferentes blancos promoviendo así un mayor estado cancerígeno por lo que su estudio puede contribuir de manera significativa al entendimiento de los mecanismos que se encuentran desregulados dentro de un estado neoplásico.

La ligasa de ubiquitina CBL (*Casitas B-lineage Lymphoma*) representa un nodo fundamental en la regulación (mediante la degradación de diferentes blancos) de distintas vías de señalización que se desencadenan en respuesta a la activación de receptores celulares. Se ha visto que esta ligasa, descrita como un proto-oncogen, controla la migración, la adhesión y la remodelación del citoesqueleto por medio de la degradación de la integrina $\alpha 5$, paxilina, talina, Rap1, FAK y WAVE2^{149, 150}, además se ha observado que el aumento de esta ligasa promueve la proliferación y la supervivencia mediante la interacción con EGFR, FAK, PKC alfa y PI3K en varios tipos de cáncer como páncreas, gástrico, melanoma, pulmón, próstata, riñón, testículo y corazón^{149, 151, 152 153}.

Por otra parte, la ligasa TRIM8 (*Tripartite motif 8 o Glioblastoma-expressed RING finger protein*), expresada de manera ubicua se ha visto expresada a niveles casi indetectables en cáncer de laringe y glioblastoma. Se ha observado que en estos tipos de cáncer, esta ligasa se encarga de degradar al supresor de tumores SOCS1 que se induce por la activación de NFkB, además se ha observado que regula los niveles de PIAS3, el inhibidor de STAT3 dependiente de IL-6, además de que recientemente se ha comprobado que un aumento en sus niveles provoca el aumento en los niveles del supresor de tumores p53^{154, 155}.

Normalmente, la ligasa de ubiquitina RNF5 quien se encuentra expresada en una gran cantidad de tipos celulares, se encarga de regular la migración mediante la degradación de los niveles de Paxilina por lo que su disminución se ha relacionado con un aumento de la capacidad motriz de las células. En contraste, un aumento de sus niveles provoca la disminución de la supervivencia celular en cáncer de pulmón por la inhibición de la GTPasas Rho y la tirosina kinasa Src^{156, 157}.

Aunque no se cuenta con mucha información se ha observado que en respuesta a un daño al ADN, el supresor de tumores p53 promueve el aumento en los niveles de RNF144A ocasionando el incremento del proceso apoptótico mediante la regulación de la actividad de la cinasa DNA-PK¹⁵⁸.

Finalmente, se ha observado que la ligasa de ubiquitina RNF189 ocasiona un aumento sinérgico de la degradación de p53 al asociarse con MDM2 quien es considerada como la principal reguladora de los niveles de este supresor de tumores. También se ha observado que puede regular los niveles de PRR5L, quien controla la supervivencia y la organización del citoesqueleto mediante una asociación con el complejo mTORC2. Por otra parte, RNF189 por medio de la disminución de CRAF y BRAF promueve la sobre activación de PKC delta resultando en un aumento de la migración celular, además, es capaz de disminuir los niveles de las caspasas 8 y 10 por su degradación, evitando así la muerte celular, en tanto que se ha observado que esta ligasa es capaz de regular los niveles de NFκB mediante la degradación del receptor TNFR1 quien regula a su activador, TNF⁷⁹⁻⁸⁷

Al conocer los blancos y el efecto que ocasiona la reducción de los niveles proteicos de TRIM8 y RNF5 y RNF144A, podemos sugerir que estas funcionan como “ligasas supresoras de tumores” al controlar la proliferación, supervivencia y migración celular. De manera contraria, observamos que, un aumento en los niveles de expresión de las ligasas de ubiquitina CBL y RNF189 promueven la proliferación, supervivencia y migración (en el caso de CBL) e incluso incrementa la resistencia a tratamientos en cáncer de ovario, cérvix, mama, útero y testículo (en el caso de RNF189) por lo que se pueden considerar como “ligasas oncogénicas”, sin embargo, al conocer que la línea celular CaSki (utilizada como modelo *in vitro*) expresa niveles muy bajos de la ligasa de ubiquitina CBL, concluimos que RNF189 es la candidata ideal para evaluar el efecto de la disminución de sus niveles por el microRNA-7 en esta línea celular.

Ya que uno de los objetivos de este proyecto fue validar si la ligasa de ubiquitina RNF189 es blanco directo del microRNA-7, el siguiente paso fue realizar un análisis bioinformático con la finalidad de conocer si la 3'UTR del mRNA de RNF189 presentaba sitios de unión hacia el microRNA-7.

Mediante este análisis bioinformático observamos que de los 10 sitios de unión localizados dentro de la 3'UTR de RNF189, únicamente los sitios ubicados en las posiciones 299 - 306 y 400 - 407 presentan los mejores valores $\Delta\Delta G$ (de -6.48 y -8.62 respectivamente) lo que indica una

probabilidad de interacción alta entre el microRNA-7 con la región 3'UTR de RNF189 ya que mientras más negativo este valor termodinámico, hay mayor probabilidad de interacción. Además, al observar las secuencias complementarias de los sitios de unión se observa que el sitio 299 – 306 presenta 10/21 nt con complementariedad perfecta y el sitio 400 – 407 presenta 12/21 nt de complementariedad, sin embargo al observar las secuencias semilla de ambos sitios se observa que el primer sitio tiene una complementariedad de 8/8 y el segundo 7/8. Estos datos pueden correlacionar con los valores $\Delta\Delta G$ obtenidos para cada sitio de unión.

Por otra parte se sabe que el sistema de proteosoma se encuentra conservado a lo largo de la evolución, desde bacterias hasta mamíferos por lo que al investigar, observamos que RNF189 se encuentra conservada en distintas especies como *Felis catus*, *Pteropus vampyrus*, *Heterocephalus glaber*, *Equus przewalskii*, *Tarsius syrichta*, *Microcebus murinus*, *Saimiri boliviensis*, *Rhinopithecus roxellana*, *Nomascus leucogeny*, *Macaca fascicularis*, *Papio anubis*, *Gorilla gorilla*, *Pan troglodytes* y *Homo sapiens*, lo que puede indicar que las funciones que realiza esta ligasa presentan una importancia evolutiva. Sin embargo, de manera interesante los sitios de unión que se encuentran dentro de la 3'UTR de RNF189 para el microRNA-7 únicamente se encontraron en homínidos (*Macaca fascicularis*, *Papio anubis*, *Gorilla gorilla*, *Pan troglodytes* y *Homo sapiens*) lo que indica que durante la evolución esta ligasa obtuvo un nuevo nivel de regulación al adquirir la capacidad de ser regulado a nivel post-transcripcional.

Aunado a esta idea, el hecho de que un incremento de los niveles de expresión de esta ligasa se encuentre asociado con el aumento de la proliferación y supervivencia celular y por ende con el proceso de transformación celular podría correlacionar con que en homínidos la necesidad de controlar de manera más precisa los niveles de expresión de RNF189 haya favorecido su regulación por la acción de microRNAs y en específico del microRNA-7. Estos datos apoyan la idea de que RNF189 es un blanco directo del microRNA-7 en este contexto celular donde se tienen evidencias que un aumento en los niveles de este microRNA tiene un efecto “supresor de tumores”.

A pesar de que no encontramos diferencias significativas entre los niveles del microRNA-7 en células transfectadas con el vector pcDNA/miR-7 y células transfectadas con el vector pcDNA_v, observamos una correlación inversa con los niveles proteicos de RNF189, lo que sugiere que los niveles proteicos de RNF189 pueden ser regulados de manera negativa por la acción del microRNA-7 y que ligeras variaciones en los niveles basales de este microRNA son suficiente para disminuir los niveles proteicos

de RNF189. Sin embargo, es necesario corroborar esta interacción por medio de otras aproximaciones experimentales como la clonación de estos sitios de unión en un vector de expresión, la co-transfección de este vector junto con el microRNA-7 para realizar ensayos de actividad de luciferasa y también realizar nuevos experimentos de transfección en esta línea celular o en otra distinta.

De manera contraria como ya se mencionó, en la línea celular A549 no se observó disminución de los niveles de RNF189 lo que sugiere en primer lugar que ni 1000 e incluso 2000 nanogramos (datos no mostrados) del microRNA-7 son suficientes para reducir los niveles proteicos de RNF189, lo cual puede deberse en parte a que las células A549 presentan niveles basales de RNF189 considerablemente mayores que los encontrados en las células CaSki. Otra posibilidad es que en las células A549, la región UTR 3' de RNF189 presente mutaciones en la secuencia de interacción con el miR-7 lo que provoca una resistencia hacia los efectos de este microRNA.

Al utilizar un exceso en la concentración de un microRNA introducido de manera exógena se puede propiciar la desregulación y/o saturación de los mecanismos de biogénesis de miRNAs o silenciamiento de mRNAs tanto *in vitro* como *in vivo* gracias a que provoca competencia por el reclutamiento en el complejo RISC o para la interacción con un mRNA blanco específico. Esto puede respaldar el hecho de que la línea celular A549 presenta niveles del microRNA-7 endógenos mayores que la línea celular CaSki por lo que es posible que en células A549 al utilizar 500 ng de este miRNA se lograra observar una ligera reducción en los niveles proteicos (datos no mostrados), efecto que se pierde al usar concentraciones más altas. También se debe tener en cuenta que los microRNAs son moléculas con un funcionamiento muy complejo ya que pueden ejercer control sobre decenas de blancos al mismo tiempo por lo que no se descarta que al ser transfectado en estas líneas celulares estos hayan interactuado con más de una UTR y no solo con la de RNF189.

Finalmente, es interesante el hecho de que exista una correlación entre los niveles tan altos de RNF189 que expresa la línea A549 y el grado de agresividad que se puede observar al evaluar la proliferación y migración celular por lo que en este contexto celular RNF189 también puede estar funcionando como ligasa “oncogénica”. Nuestros resultados representan un claro ejemplo de la gran complejidad que se presenta al estudiar la regulación de un microRNA determinado en un contexto celular específico.

Debido a que el microRNA-7 en un contexto cervical se ha descrito como un “supresor de tumores” ya que se ha encontrado una correlación entre niveles de expresión reducidos y un aumento en la transformación celular, al evaluar el efecto del incremento de su expresión sobre la proliferación de células CaSki se observó un decremento en el número celular del 50% a las 24 horas.

Nuestros resultados sugieren que un ligero aumento en los niveles de este microRNA en las células recién transfectadas fue suficiente para provocar la inducción de apoptosis probablemente mediante la inhibición de genes codificantes para supervivencia y la inducción de genes que promueven la muerte celular ya que las células transfectadas únicamente con el vector pcDNAv, tratadas únicamente con lipofectamina o células no transfectadas proliferaron de manera normal, lo que indica que este efecto fue únicamente por la introducción del microRNA y no como artefacto de la metodología experimental utilizada.

Al observar que estas células presentan niveles basales disminuidos del microRNA-7, proponemos que si se logran aumentaran aún más sus niveles, podríamos observar una reducción mayor de la proliferación, sin embargo, este efecto se perdería progresivamente debido a que la disponibilidad del microRNA iría disminuyendo a lo largo del tiempo. Por otro lado, también podemos sugerir que si se llega a introducir una cantidad considerable del microRNA, podríamos observar la ausencia de algún efecto ya que como se indicó anteriormente, la introducción de manera exógena de altas concentraciones de uno o varios microRNAs puede propiciar la desregulación y/o saturación de los mecanismos de biogénesis de microRNAs o silenciamiento de mRNAs.

Algo importante a notar es que a las 48 y 72 horas las células transfectadas con el microRNA-7 tuvieron una proliferación muy lenta, lo que sugiere que las células que lograron sobrevivir a este estímulo de muerte se encontraron bajo condiciones de estrés muy grande y por eso hayan sido obligadas a inhibir el ciclo celular, mientras que en las otras condiciones experimentales se observó una proliferación normal. Aunado a esta idea, se debe tener en cuenta que conforme pasó el tiempo y de manera progresiva, los nutrientes, factores de crecimiento y el pH disminuyeron mientras que los desechos celulares aumentaron por lo que las células utilizadas como control tuvieron una ligera disminución de la proliferación entre las 48 y 72 horas. Además, al observar un mínimo aumento en el número de células transfectadas con el microRNA-7 a tiempos más largos, podemos sugerir que al

presentar una inhibición en el ciclo celular, los nutrientes y factores de crecimiento se utilizaron en cantidades reducidas^{159, 160}.

Así mismo, aunque propusimos que similar a lo observado en células CaSki, el aumento en los niveles del microRNA-7 promovería apoptosis en las líneas celulares HeLa, CaLo, SiHa y C33A, nuestros datos mostraron que el efecto “supresor de tumores” del microRNA-7 es específico de células CaSki ya que observamos comportamientos diferentes en cada línea celular al evaluar la proliferación.

Sin embargo es necesario considerar el hecho de que aunque todas estas líneas celulares pertenecen a un contexto cervical, cada una presenta características únicas y distintivas. Un claro ejemplo son los niveles basales del microRNA-7 tan diferentes que se encontraron en estas líneas (a excepción de las líneas CaSki y C33A que presentan niveles de expresión parecidos de este microRNA).

Aunque se ha reportado que al introducir 10,000 nanogramos del microRNA-7 en células HeLa se promueve apoptosis 24 horas después de ser transfectadas^{134 165 120}, nosotros no observamos el mismo efecto. Esta disparidad de efectos se debe probablemente a la cantidad de microRNA que se transfectó, ya que en nuestras manos 1000 ng del vector de expresión pcDNA/miR-7 no fue suficiente para lograr un efecto sobre la proliferación por lo que es necesario transfectar concentraciones mayores (10,000 ng) ya que como sabemos esta línea celular se encuentra en una etapa de transformación muy avanzada por lo que se necesita un estímulo de muerte muy grande para lograr la inducción de apoptosis.

Al evaluar la proliferación tanto de la línea celular SiHa como de la línea CaLo, observamos que la sola introducción del vector pcDNA vacío (1000 ng) fue suficiente para promover la disminución de la proliferación celular. Esto sugiere que la introducción de material genético ajeno pudo ser identificado como un agente estresor promoviendo la detención del ciclo celular y/o inducción de apoptosis. Por tanto podemos afirmar que en estas líneas celulares el microRNA-7 no tiene un efecto “supresor de tumores”.

De manera interesante y al igual que la línea celular HeLa, la expresión del microRNA-7 no afectó la proliferación de las células C33A. Esto es importante ya que a pesar de ser negativas para VPH, estas células expresan una versión mutante de p53 no funcional (substitución de arginina por cisteína en el dominio de transactivación). Si tomamos en cuenta esta observación, podemos sugerir que la muerte

observada en las células CaSki aún podría ser mediada a través de p53, sin embargo, para validar esta hipótesis es necesario encontrar una estrategia que nos permita evaluar un posible aumento de los niveles de p53 en este contexto celular, donde, en primera instancia, los niveles de este supresor de tumores se encuentran disminuidos por acción del oncogén E6, necesario durante el ciclo de infección del Virus del Papiloma Humano. También podemos proponer que si al transfectar cantidades mucho mayores de este microRNA se logra inducir muerte celular sin un incremento evidente de los niveles de p53, podría significar en parte, que p53 no es el responsable del efecto observado en la línea celular CaSki.

Dado que desconocemos si las líneas celulares HeLa, SiHa, CaLo y C33A, en nuestras condiciones de cultivo expresan RNF189, no podemos descartar la posibilidad de que la sobre-expresión del microRNA-7 no haya tenido efectos sobre la proliferación en las líneas celulares se deba a esta razón o a que la región UTR 3' de RNF189 de estas líneas celulares presente mutaciones en la secuencia de interacción con el miR-7 lo que provoca una resistencia hacia los efectos de este microRNA. Por tanto es necesario conocer los niveles de expresión de RNF189 en estas líneas celulares, además de las secuencias de sus 3'UTR para tener información del estado de sus sitios de unión con el microRNA-7.

A pesar de que el supresor de tumores p53 era el principal candidato para mediar el efecto pro apoptótico del microRNA-7, por ser blanco de RNF189, no observamos un incremento en los niveles de p53 después de la sobre-expresión del microRNA-7. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, dado que la línea celular CaSki es positiva para el Virus del Papiloma Humano, p53 se expresa en niveles sumamente bajos debido a la acción del oncogén E6, quien mediante la asociación con la ligasa de ubiquitina UB3A (E6-AP) promueve la poliubiquitinación y degradación de p53 por el proteosoma^{33, 131, 140-144}, y otras moléculas (**Figura 18**), lo que explicaría porque no detectamos un aumento en los niveles de p53. Esto a pesar de que un análisis bioinformático indica que la ligasa de ubiquitina E6-AP presenta en su región 3'UTR 16 sitios de unión potenciales para el microRNA-7, de los cuales las posiciones 19-25, 396-402, 699-675, 2351-2357 y 3448-3454 presentan los mejores valores $\Delta\Delta G$ (**Tabla 2**). Por tanto, a pesar de que bioinformáticamente la ligasa de ubiquitina E6-AP es un blanco potencial del microRNA-7, el hecho de que la sobre-expresión de este microRNA no resulte en el incremento de p53, sugiere que este no es el caso o que las células positivas para VPH han desarrollado algún mecanismo que inhibe la interacción del microRNA-7 con los mensajeros que codifican para E6-AP y RNF189.

Como ya se mencionó, el proceso de apoptosis se puede iniciar tanto de manera intrínseca como de manera extrínseca, dependiendo del estímulo de muerte y cada vía tiene sus propios componentes y características distintivas. La vía intrínseca que se activa en respuesta a un amplia variedad de estímulos que se dan dentro de la célula tiene como característica distintiva la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9. Por otro lado, en la vía extrínseca que es mediada por la activación de receptores en la superficie celular se activa el complejo DISC quien activa la caspasa 8. Sin embargo ambas vías convergen en la activación de caspasa 3, la principal “caspasa efectora” por acción tanto de caspasa 9 como de caspasa 8^{137, 161-163}. Con esto en mente como primera aproximación se podrían evaluar los niveles de estas caspasas e incluso utilizar inhibidores específicos de las caspasas responsables de cada vía (8 para la extrínseca y 9 para la intrínseca), o inhibidores de la formación de los complejos DISC o apoptosoma.

	Posición	"semilla"	ΔG duplex	ΔG open	$\Delta\Delta G$
1	19	8:1:0	-7.4	-0.96	-6.43
2	70	8:1:1	-3.6	-3.26	-0.33
3	396	8:1:1	-13.1	-3.49	-9.60
4	679	8:1:1	-8.2	-2.76	-5.43
5	693	8:1:0	-6.24	-1.97	-4.26
6	699	8:0:0	-9.51	-1.19	-8.31
7	1339	8:1:1	-8.8	-8.31	-0.48
8	1475	8:1:1	-14.9	-9.01	-5.88
9	2074	8:1:1	-1.2	-1.78	0.58
10	2351	8:1:1	-6.36	-13.12	6.76
11	2448	8:0:1	-10.2	-4.23	-5.96
12	2590	8:1:1	-3.2	-4.60	1.40
13	3448	8:1:0	-9.51	-3.18	-6.32
14	4138	8:1:0	-6.81	-4.65	-2.15
15	4141	8:1:0	-9.1	-3.92	-5.17
16	4609	8:0:1	-13.63	-10.08	-3.54

Tabla 2: La 3'UTR de la ligasa de ubiquitina E6-AP presenta sitios de unión para el microRNA-7 A) Análisis bioinformático hecho con el programa PITA que muestra los sitios de unión del microRNA-7 en la 3'UTR de la ligasa de ubiquitina E6-AP

Como consecuencia de presentar niveles altos de RNF189, la línea CaSki podría presentar niveles bajos de caspasa 8 (caspasa necesaria para la inducción de apoptosis por la vía extrínseca) así que al incrementar los niveles de expresión del microRNA-7 provocaría la disminución de RNF189,

permitiendo que los niveles de caspasa 8 aumenten y si consideramos que durante el desarrollo y progresión del cáncer las células en proceso de transformación aún conservan la capacidad de enviar al medio extracelular factores de muerte, se puede sugerir que el aumento en los niveles de caspasa 8 produce que la vía extrínseca sea capaz de inducir apoptosis al identificar señales extracelulares enviadas por otras células y completar su papel efector al activar e incrementar los niveles de caspasa 3 activa. El concepto de que durante la progresión de cáncer para promover un estado tumorigénico, la población celular anormal va adquiriendo características que les confieren ventajas adaptativas como la capacidad de evadir señales iniciadoras de apoptosis⁵⁵ se podría asociar al hecho de que RNF189 además de degradar p53, puede disminuir los niveles de la caspasa 8 mediante su degradación gracias a la presencia de su dominio CID (*Caspase 8/10 Interacting Domain*)⁸¹.

Al observar el mapa de interacción de RNF189 (**Figura 19**) también podríamos sugerir, que la muerte celular podría provocarse al incrementar los niveles de TRADD y TRAF2, ya que se sabe que la interacción entre estos dos adaptadores promueve la activación de caspasa-8 y la inducción de la vía extrínseca que culmina con la activación de caspasa 3¹⁶⁴. Por otro lado, si el aumento en esta caspasa o en TRADD/TRAF2 no fuera suficiente para eliminar las células, el microRNA-7 podría promover el proceso apoptótico mediante la disminución de los blancos que el *pull down* arrojó relacionados con el control de la apoptosis y la supervivencia celular (**Tabla 1**) como BCL2, TMEM219, PIM1, PSME3 y ARMC10 quienes son considerados factores anti-apoptóticos y cuya disminución puede promover muerte celular. Sin embargo, entre los blancos identificados por el *pull down* también se encuentran factores pro-apoptóticos (BAD, NOD1, BMF, GRINA y caspasa 9) quienes se encargan de promover muerte celular en respuesta a diversos factores.

Aunque es evidente que un aumento en los niveles del microRNA-7 puede producir la disminución de moléculas que funcionan como factores anti-apoptóticos también se debe considerar que factores pro-apoptóticos sufrirían dicha disminución, sin embargo, es importante mencionar que en la célula siempre existe un balance constante entre factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos y solamente cuando este balance se rompe, la célula puede promover apoptosis (al identificar mayores niveles de factores pro-apoptóticos) o inducir supervivencia (cuando hay más factores anti-apoptóticos)^{161, 136, 137}.

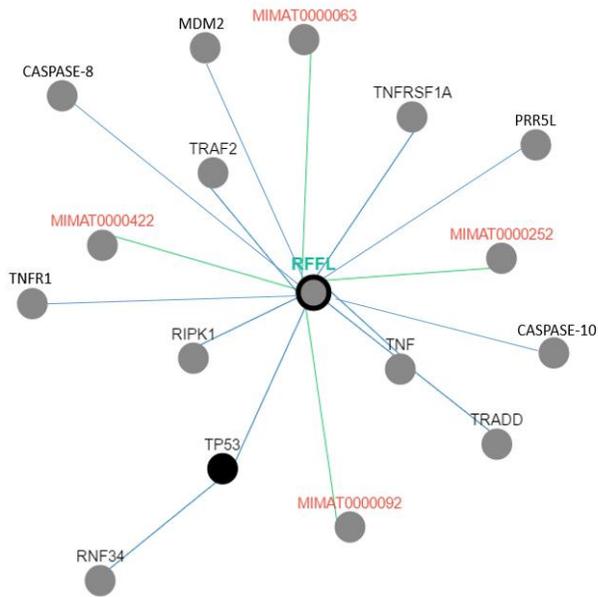


Figura 19: *Interactoma de la ligasa de ubiquitina RNF189 (RFFL).* Mediante el software PCViz Pathway Commons Network Visualizer (<http://www.pathwaycommons.org/pcviz>) se obtuvo la red de regulación de la ligasa de ubiquitina RNF189 (remarcada en negro). Las líneas verdes indican un control sobre la actividad de la molécula blanco, las líneas azules indican un control sobre la expresión, las moléculas no identificadas se encuentran en color rojo.

Durante el ciclo de infección del Virus del Papiloma Humano, la acción conjunta de los oncogenes E6 y E7 se encargan de promover el proceso de transformación celular de las células cervicales principalmente mediante la inhibición de p53 y Rb quienes son fundamentales en el control de la supervivencia, la proliferación y la regulación del ciclo celular^{33, 131, 140-144, 166}, sin embargo, el oncogén E5, el oncogén menos estudiado de la biología del VPH presenta un papel igual o más importante ya que se ha observado que se encarga de aumentar la eficiencia de los oncogenes E6 y E7¹⁶⁶, además de que la expresión de los oncogenes E1 y E4 dependen en gran manera de la presencia de E5¹⁶⁷. También se ha reportado que E5 es el transcrito más abundante de las primeras etapas del proceso de transformación y mientras la infección transcurre, E5 es eliminado. A pesar de eso se sabe que en algunas lesiones cancerígenas producidas por el VPH subtipo 16, E5 se encuentra altamente expresado^{168, 169}.

De acuerdo con esto, se tienen evidencias que indican que el oncogén E5 puede promover la transformación celular de varias maneras. Primeramente mediante la inhibición de los receptores de muerte Fas y TRAIL inhibiendo así la formación del complejo DISC (característico de la vía extrínseca de la apoptosis)¹⁶⁶. Por otro lado, es capaz de inhibir la apoptosis mediante la inhibición del factor pro-apoptótico BAX y estimular varias vías de señalización mediante la activación de EGFR, VEGF y BCL2¹⁶⁷.

De manera muy interesante, se sabe que existen diferentes clases de oncogenes E5 y que además, se ha visto que diferentes líneas celulares expresan diferentes niveles de este oncogén, lo que provoca diferencias en la agresividad del cáncer producido¹⁶⁹ y en nuestro caso particular, solo la línea celular CaSki presenta niveles considerablemente altos de este oncogén¹⁷⁰.

Considerando la gran relevancia que el oncogén E5 presenta durante el ciclo de infección del Virus del Papiloma Humano dado su capacidad de inhibir la muerte celular extrínseca y que la sobreexpresión del microRNA-7 promovió apoptosis en células CaSki, que es la única línea celular de las evaluadas que presenta niveles considerablemente altos de este oncogén¹⁷⁰, podemos sugerir que el efecto “supresor de tumores” del microRNA-7 podría llevarse a cabo mediante la interrupción de las funciones de este oncogén por varios mecanismos: a) mediante la regulación directa del mRNA del oncogén por el microRNA-7 o b) que RNF189 y E5 actúen conjuntamente para inhibir la vía extrínseca de la apoptosis (RNF189 inhibiendo la caspasa iniciadora 8 y E5 inhibiendo la formación del complejo DISC), por lo que si el microRNA-7 disminuye los niveles ya sea de se podría estar induciendo nuevamente la vía extrínseca.

VIII. CONCLUSIONES

- A) En la línea celular CaSki, la expresión del microRNA-7 disminuye los niveles proteicos de la ligasa de ubiquitina RNF189.

- B) En la línea celular CaSki, el aumento de los niveles del microRNA-7 induce muerte celular.

- C) El efecto de la sobre-expresión del microRNA-7 en la línea celular CaSki no depende del aumento en los niveles de p53 o pJNK.

- D) La sobre-expresión del microRNA-7 no tiene efectos en las líneas celulares HeLa, SiHa, CaLo y C33A.

IX. PERSPECTIVAS

- A) Corroborar por medio de otras aproximaciones experimentales como ensayos de actividad de luciferasa la interacción entre la ligasa de ubiquitina RNF189 y el microRNA-7.

- B) Confirmar por otras aproximaciones experimentales que la sobreexpresión del microRNA-7 induce apoptosis en la línea celular Caski.

- C) Conocer si la muerte celular inducida por la sobre-expresión del microRNA-7 es por un mecanismo dependiente o independiente del supresor de tumores p53.

- D) Establecer la participación del oncogén E5 en la inducción de muerte celular en la línea celular CaSki y determinar su estatus en las distintas líneas celulares.

- E) Confirmar que la ligasa de ubiquitina UB3A (E6-AP) es blanco directo del microRNA-7.

X. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

X.I Secuencia de oligonucleótidos utilizados para determinar los niveles del *microRNA-7* en las distintas líneas celulares por medio de PCR en tiempo real.

microRNA-7 (<i>Mus musculus</i> & <i>Homo sapiens</i>)	
Secuencia	uggaagacuagugauuuuguugu
Forward primer	gggaggtggaagactagtgatt
Universal Reverse primer	gtgcagggtccgaggt
Secuencia para PCR en tiempo real	tggaagactagtgattttgtgt
Secuencia para RT stem loop	gtcgtatccagtgagggtccgaggtattcgactggatacgacacaaca

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Ambros, V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* **107**, 823–6 (2001).
2. Regina, C., Schoof, G., Leite, E., Izzotti, A. & Reis, L. MicroRNAs in cancer treatment and prognosis. *Cancer Res.* **2**, 414–433 (2012).
3. MacFarlane, L.-A. & Murphy, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr. Genomics* **11**, 537–61 (2010).
4. Mohr, A. M. & Mott, J. L. Overview of microRNA biology. *Semin. Liver Dis.* **35**, 3–11 (2015).
5. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
6. Bartel, D. P. MicroRNAs Target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233 (2013).
7. Flores, F., Martínez, M. Á., Arenas, C., Covarrubias, A. & Reyes, J. L. ‘¡Silencio mensajeros! Qué son y cómo actúan los microRNAs’. *REB* **26**, 135–141 (2007).
8. Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S. & Kauppinen, S. Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence* **3**, 1 (2012).
9. Bartel, D. P. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
10. Davis-Dusenbery, B. N. & Hata, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J. Biochem.* **148**, 381–92 (2010).
11. Tran, N. & Hutvagner, G. Biogenesis and the regulation of the maturation of miRNAs. *Essays Biochem.* **54**, 17–28 (2013).
12. Murchison, E. P. & Hannon, G. J. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 223–9 (2004).
13. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9–14 (2008).
14. Gregory, R. I. & Shiekhattar, R. MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Res.* **65**, 3509–3512 (2005).
15. Xia, M. & Hu, M. The Role of MicroRNA in Tumor Invasion and Metastasis. *J. Cancer Mol.* **5**, 33–39 (2010).
16. Gu, S. & Kay, M. A. How do miRNAs mediate translational repression? *Silence* **1**, 11 (2010).
17. Marco, A., Macpherson, J. I., Ronshaugen, M. & Griffiths-Jones, S. MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. *Silence* **3**, 8 (2012).
18. Cuellar, T. L. & McManus, M. T. MicroRNAs and endocrine biology. *J. Endocrinol.* **187**, 327–332 (2005).
19. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA

- biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228–34 (2009).
20. Libri, V., Miesen, P., van Rij, R. P. & Buck, A. H. Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3525–44 (2013).
 21. Stroynowska-Czerwinska, A., Fiszer, A. & Krzyzosiak, W. J. The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2253–2270 (2014).
 22. Millar, A. A. & Waterhouse, P. M. Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Funct. Integr. Genomics* **5**, 129–35 (2005).
 23. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, C. M. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev.* **10**, 126–139 (2009).
 24. Chapman, E. J. & Carrington, J. C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 884–96 (2007).
 25. Cai, Y., Yu, X., Hu, S. & Yu, J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **7**, 147–154 (2009).
 26. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
 27. Davis, B. N. & Hata, A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun. Signal.* **7**, 18 (2009).
 28. Rokavec, M., Li, H., Jiang, L. & Hermeking, H. The p 53 / miR- 34 axis in development and disease. *J. Mol. Cell Biol.* **0**, 1–17 (2014).
 29. Reisman, D., Takahashi, P., Polson, A. & Boggs, K. Transcriptional Regulation of the p53 Tumor Suppressor Gene in S-Phase of the Cell-Cycle and the Cellular Response to DNA Damage. *Biochem. Res. Int.* **2012**, 808934 (2012).
 30. Leung, A. K. L. & Sharp, P. A. MicroRNA Functions in Stress Responses. *Mol. Cell* **40**, 205–215 (2010).
 31. Ruan, K., Fang, X. & Ouyang, G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.* **285**, 116–26 (2009).
 32. Kim, Y.-K., Kim, B. & Kim, V. N. Re-evaluation of the roles of *DROSHA* , *Exportin 5* , and *DICER* in microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E1881–E1889 (2016).
 33. Chen, J. & Zhao, K.-N. HPV-p53-miR-34a axis in HPV-associated cancers. *Ann. Transl. Med.* **3**, 331 (2015).
 34. Feng, Z., Zhang, C., Wu, R. & Hu, W. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 44–50 (2011).
 35. Harris, S. L. & Levine, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899–908 (2005).
 36. Lund, E. & Dahlberg, J. E. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 59–66 (2006).
 37. Krutovskikh, V. a. & Herceg, Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer

- biomarkers. *BioEssays* **32**, 894–904 (2010).
38. Lugo-trampe, Á. & Trujillo-murillo, Carmen, K. MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Med. Univ.* **11**, 187–192 (2009).
 39. Johnston, M. & Hutvagner, G. Posttranslational modification of Argonautes and their role in small RNA-mediated gene regulation. *Silence* **2**, 5 (2011).
 40. Prives, C. & Hall, P. A. The p53 pathway. *J. Pathol.* **126**, 112–126 (1999).
 41. Niu, M. *et al.* MiR-29c regulates the expression of miR-34c and miR-449a by targeting DNA methyltransferase 3a and 3b in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* **16**, 218 (2016).
 42. Iliopoulos, D., Drosatos, K., Hiyama, Y., Goldberg, I. J. & Zannis, V. I. MicroRNA-370 controls the expression of MicroRNA-122 and Cpt1 and affects lipid metabolism. *J. Lipid Res.* **51**, 1513–1523 (2010).
 43. Gulyaeva, L. F. & Kushlinskiy, N. E. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J. Transl. Med.* **14**, 143 (2016).
 44. Luengo Gil, G., Arroyo Rodriguez, A., Carmona-Bayona, A. & Ayala de la Peña, F. CircRNAs: Esponjas moleculares de microRNAs, ¿Futuro terapéutico en Cáncer? *Investig. contra el Cáncer* 1–12 (2013).
 45. Torres, A. G., Fabani, M. M., Vigorito, E. & Gait, M. J. MicroRNA fate upon targeting with anti-miRNA oligonucleotides as revealed by an improved Northern-blot-based method for miRNA detection. *RNA* **17**, 933–943 (2011).
 46. Singh, R. & Mo, Y. Role of microRNAs in breast cancer. *Cancer Biol. Med.* **14**, 201–212 (2013).
 47. Vincent, K., Pichler, M., Lee, G.-W. & Ling, H. MicroRNAs, genomic instability and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 14475–91 (2014).
 48. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* **302**, 1–12 (2007).
 49. Branislav, K., Mraz, M., Mayer, J. & Pospisilova, S. MicroRNA BIOGENESIS , FUNCTIONALITY AND CANCER RELEVANCE. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* **150**, 205–215 (2006).
 50. Sherr, C. J. Principles of Tumor Suppression. *Cell* **116**, 235–246 (2004).
 51. Balmain, A., Gray, J. & Ponder, B. The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.* **33**, 238–44 (2003).
 52. Hornberg, J. J., Bruggeman, F. J., Westerhoff, H. V. & Lankelma, J. Cancer: a Systems Biology disease. *Biosystems.* **83**, 81–90 (2006).
 53. Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Lengauer, C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* **9**, M57-60 (1999).
 54. Visvader, J. E. Cells of origin in cancer. *Nature* **469**, 314–22 (2011).
 55. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).

56. Alazzouzi, H. La inestabilidad genómica en cáncer. *Tesis Dr.* (2006).
57. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–8 (2005).
58. Aigner, A. MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *J. Mol. Med.* **89**, 445–57 (2011).
59. Hernandez-Fernandez, R. La vía ubiquitina-proteasoma ¿ destruir o construir ? ese es el dilema. *Rev. Habanera Ciencias Médicas* **12**, 22–34 (2013).
60. Zamudio-arroyo, J. M., Peña-Rangel, M. & Riesgo- Escovar, R. A ubiquitinación : un sistema de regulación dinámico de los organismos. *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* **15**, 133–141 (2012).
61. Voutsadakis, I. a. The ubiquitin-proteasome system and signal transduction pathways regulating Epithelial Mesenchymal transition of cancer. *J. Biomed. Sci.* **19**, 67 (2012).
62. Lipkowitz, S. The role of the ubiquitination – proteasome pathway in breast cancer Ubiquitin mediated degradation of growth factor receptors in the pathogenesis and treatment of cancer. *Breast Cancer Res.* **5**, (2003).
63. Lipkowitz, S. & Weissman, A. M. RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 629–43 (2011).
64. Hershko, A. & Ciechanover, A. The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–279 (1998).
65. Komander, D. & Rape, M. The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–29 (2012).
66. Swatek, K. N. & Komander, D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **26**, 399–422 (2016).
67. Hoeller, D. *et al.* Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat. Cell Biol.* **8**, 163–169 (2006).
68. Li, W. & Ye, Y. Polyubiquitin chains: Functions, structures, and mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2397–2406 (2008).
69. Hoppe, T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: ‘one size’ doesn’t fit all. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 183–7 (2005).
70. Qi, J. & Ronai, Z. A. Dysregulation of ubiquitin ligases in cancer. *Drug Resist.* **1848**, 3047–3054 (2016).
71. Suvà, M. L., Riggi, N. & Bernstein, B. E. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science (80-.)*. **339**, 1567–70 (2013).
72. Dikic, I. & Robertson, M. Ubiquitin ligases and beyond. *BMC Biol.* **10**, 22–24 (2012).
73. Hu, J., Meng, Y., Yu, T., Hu, L. & Mao, M. Ubiquitin E3 Ligase MARCH7 promotes ovarian tumor growth. *Oncotarget* 1–14 (2015).
74. Men, X., Wang, L., Yu, W. & Ju, Y. Cullin7 Is Required for Lung Cancer Cell Proliferation and Is Overexpressed in Lung Cancer. *Oncol. Res.* **22**, 123–128 (2015).
75. Zhang, Q., Meng, Y., Zhang, L., Chen, J. & Zhu, D. RNF13: a novel RING-type ubiquitin ligase over-expressed in pancreatic cancer. *Cell Res.* **19**, 348–57 (2009).

76. Girardini, J. E., Walerych, D. & Sal, G. Del. *Mutant p53 and MDM2 in Cancer*. **85**, (Springer Netherlands, 2014).
77. Vaughan, C., Pearsall, I., Yeudall, A., Deb, S. P. & Deb, S. *Mutant p53 and MDM2 in Cancer*. **85**, (Springer Netherlands, 2014).
78. Alarcon-vargas, D. & Ronai, Z. p53 – Mdm2 — the affair that never ends. *Carcinogenesis* **23**, 541–547 (2002).
79. Iii, E. R. M. & El-deiry, W. S. Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth. *PNAS* **101**, 6170–6175 (2004).
80. Yang, W. *et al.* CARPs are ubiquitin ligases that promote MDM2-independent p53 and phospho-p53ser20 degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 3273–81 (2007).
81. Yang, W. & El-Deiry, W. S. CARPs are E3 ligases that target apical caspases and p53. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 1676–1683 (2014).
82. Tibbetts, M. D. *et al.* Crystal Structure of a FYVE-Type Zinc Finger Domain from the Caspase Regulator CARP2. *Structure* **12**, 2257–2263 (2004).
83. Yang, W., Dicker, D. T., Chen, J. & El-Deiry, W. S. CARPs enhance p53 turnover by degrading 14-3-3 σ and stabilizing MDM2. *Cell Cycle* **7**, 670–682 (2014).
84. Coumailleau, F. *et al.* Over-Expression of Rififylin , a New RING Finger and FYVE-like Domain-containing Protein , Inhibits Recycling from the Endocytic Recycling Compartment. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4444–4456 (2004).
85. Gan, X. *et al.* PRR5L degradation promotes MTORC2-mediated PKC δ phosphorylation and cell migration downstream of G α 12 Xiaoqing. *Nat. Cell Biol.* **14**, 686–696 (2013).
86. Liao, W. *et al.* CARP-2 is an endosome-associated ubiquitin protein ligase for RIP and regulates TNF-induced NF- κ B activation. *Curr. Biol.* **18**, 641–649 (2009).
87. Chao, C. C.-K. Mechanisms of p53 degradation. *Clin. Chim. acta* **438**, 139–47 (2015).
88. Lin, M. *et al.* Destabilization of CARP mRNAs by Aloe-Emodin Contributes to Caspase-8-Mediated p53-Independent Apoptosis of Human Carcinoma Cells. *J. Cel. Biochem.* **1191**, 1176–1191 (2011).
89. Vousden, K. H. & Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**, 413–31 (2009).
90. Caspari, T. Checkpoints : How to activate p53. *Curr. Biol.* **18**, 315–317 (2000).
91. Joerger, A. C. & Fersht, A. R. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 557–82 (2008).
92. Bai, L. & Zhu, W. p53 : Structure , Function and Therapeutic Applications. *Cancer Mol* **2**, 141–153 (2006).
93. Joerger, A. C. & Fersht, A. R. The Tumor Suppressor p53 : From Structures to Drug Discovery. *Cold Spring Harb. Lab. Press* 1–20 (2010).
94. Pflaum, J., Schlosser, S. & Müller, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front.*

- Oncol.* **4**, 285 (2014).
95. Biegging, K. T., Mello, S. S. & Attardi, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 359–70 (2014).
 96. Speidel, D. The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch. Toxicol.* **89**, 501–17 (2015).
 97. Laptenko, O. & Prives, C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* **13**, 951–61 (2006).
 98. Reed, S. M. & Quelle, D. E. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers (Basel)*. **7**, 30–69 (2014).
 99. Meek, D. W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem. J.* **469**, 325–46 (2015).
 100. Brooks, C. L. & Gu, W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 164–171 (2003).
 101. Pant, V. & Lozano, G. Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway. *Genes Dev.* **28**, 1739–1751 (2012).
 102. Lee, J. T. & Gu, W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ.* **17**, 86–92 (2010).
 103. Lakin, N. D. & Jackson, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* **18**, 7644–55 (1999).
 104. Perry, M. E. Response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb. Lab. Press* **2**, 1–11 (2010).
 105. Pham, N. H. The Structures of Full-length p53 Monomer and Tetramer when Unbound to DNA and Structural Domain Determination in p53. *Tesis Maest. en Ciencias Químicas* (2011).
 106. Menon, V. & Povirk, L. Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks: Multifaceted roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ). *Subcell Biochem* **85**, 321–336 (2014).
 107. Marcel, V., Catez, F. & Diaz, J.-J. P53, a Translational Regulator: Contribution To Its Tumour-Suppressor Activity. *Oncogene* 1–11 (2015). doi:10.1038/onc.2015.25
 108. Hoffman, Y., Bublik, D. R., Pilpel, Y. & Oren, M. miR-661 downregulates both Mdm2 and Mdm4 to activate p53. *Cell Death Differ.* **21**, 302–9 (2014).
 109. Fridman, J. S. & Lowe, S. W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030–40 (2003).
 110. Ballesteros-Catañeda, D., Paula Andrea, G., Riascos Ortega, M. R. & Zambrano Torres, H. I. Protein p53 : Signaling Pathways and Role in Carcinogenesis : a Review. *Rev. Clin. Traumatol.* **5458**, 37–54 (2007).
 111. Moro, F. *et al.* p53 Expression in normal versus transformed mammalian cells. *Carcinogenesis* **16**, 2435–2440 (1995).
 112. Sidransky, D. & Hollstein, M. Clinical implications of the p53 gene. *Annu. Rev. Med.* **47**, 285–301 (1996).

113. Vijayakumaran, R., Tan, K. H., Miranda, P. J., Haupt, S. & Haupt, Y. Regulation of Mutant p53 Protein Expression. *Front. Oncol.* **5**, 284 (2015).
114. Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins , Consequences , and Clinical Use. *Cold Spring Harb. Lab. Press* **10**, 1–17 (2010).
115. Powell, E., Piwnica-worms, D. & Piwnica-worms, H. Contribution of p53 to metastasis. *NIH Public Acces* **4 (4)**, 405–414 (2014).
116. Berglind, H., Pawitan, Y., Kato, S., Ishioka, C. & Soussi, T. Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines : a paradigm for cell line cross- contamination. *Cancer Biol. Ther.* **4047**, 1555 (2016).
117. Zhou, X. *et al.* MicroRNA-7 Inhibits Tumor Metastasis and Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition through AKT/ERK1/2 Inactivation by Targeting EGFR in Epithelial Ovarian Cancer. *PLoS One* **9**, e96718 (2014).
118. Xie, J. *et al.* miR-7 inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer cells by suppressing epidermal growth factor receptor expression. *Oncol. Rep.* **31**, 1715–22 (2014).
119. Okuda, H. *et al.* miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer Res.* **73**, 1434–1444 (2014).
120. Liu, S. *et al.* MicroRNA-7 downregulates XIAP expression to suppress cell growth and promote apoptosis in cervical cancer cells. *FEBS Lett.* **587**, 2247–53 (2013).
121. Yu, Z. *et al.* Identification of miR-7 as an oncogene in renal cell carcinoma. *J. Mol. Histol.* **44**, 669–77 (2013).
122. Chou, Y.-T. *et al.* EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Cancer Res.* **70**, 8822–31 (2010).
123. Meza-Sosa, K. F. *et al.* MiR-7 promotes epithelial cell transformation by targeting the tumor suppressor KLF4. *PLoS One* **9**, e103987 (2014).
124. Pérez-García, E. Efecto de la inhibición del supresor de tumores ‘Merlín’ por medio de la sobre-expresión de los microRNAs 7 y 146a, durante el proceso de transformación celular. *Tesis de Licenciatura* 95
125. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–54 (1976).
126. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
127. Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F. & Hellens, R. P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* **3**, 12 (2007).
128. Chen, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **33**, e179 (2005).
129. Shai, A., Pitot, H. C. & Lambert, P. F. E6-associated protein is required for human papillomavirus type 16 E6 to cause cervical cancer in mice. *Cancer Res.* **70**, 5064–5073 (2010).
130. Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C. & Howley, P. M. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 5523–5527 (1991).

131. Yim, E. & Park, J. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res.* **37**, 319–324 (2005).
132. Soussi, T. HANDBOOK OF p53 MUTATION IN CELL LINES. (2007).
133. Huynh, F. C. & Jones, F. E. MicroRNA-7 inhibits multiple oncogenic pathways to suppress HER2 Δ 16 mediated breast tumorigenesis and reverse trastuzumab resistance. *PLoS One* **9**, e114419 (2014).
134. Hao, Z. *et al.* MicroRNA-7 inhibits metastasis and invasion through targeting focal adhesion kinase in cervical cancer. *Int Clin Exp Med* **8**, 480–487 (2015).
135. Pérez-García, E. I. *et al.* Merlin negative regulation by miR-146a promotes cell transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1–7 (2015). doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.156
136. Jin, Z. & El-Deiry, W. S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 147–171 (2014).
137. Dubin, M. & Stoppani, A. O. M. Muerte celular o apoptosis. *Med. (Buenos Aires)* **60**, 375–386 (2000).
138. Maddika, S. *et al.* Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* **10**, 13–29 (2007).
139. Dhanasekaran, D. N. & Premkumar, Reddy, E. JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245–6251 (2011).
140. Williams, V. M., Filippova, M., Soto1, U. & Duerksen-Hughes, P. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* **6**, 45–57 (2011).
141. Riethdorf, S., Riethdorf, L., Milde-Langosch, K., Park, T. W. & Löning, T. Differences in HPV 16- and HPV 18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinomas of the cervix uteri. *Virchows Arch.* **437**, 491–500 (2000).
142. Mortensen, F. *et al.* Role of ubiquitin and the HPV E6 oncoprotein in E6AP-mediated ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 9872–9877 (2015).
143. Martinez-zapien, D. *et al.* Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV- mediated degradation of p53. *Nature* **529**, 541–545 (2016).
144. Beaudenon, S. & Huibregtse, J. M. HPV E6, E6AP and cervical cancer. *BMC Biochem.* **9**, S4 (2008).
145. Picco, V. & Pagès, G. Linking JNK Activity to the DNA Damage Response. *Genes Cancer* **4**, 360–8 (2013).
146. Villicaña, C., Cruz, G. & Zurita, M. The genetic depletion or the triptolide inhibition of TFIIF in p53-deficient cells induces a JNK-dependent cell death in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **126**, 2502–15 (2013).
147. Fuchs, S. Y., Adler, V., Pincus, M. R. & Ronai, Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 10541–10546 (1998).
148. Satija, Y. K., Bhardwaj, A. & Das, S. A portrayal of E3 ubiquitin ligases and deubiquitylases in cancer. *Int. J. cancer* **133**, 2759–68 (2013).
149. Nihal, M., Wood, G. S., Nihal, M. & Wood, G. S. c-CBL regulates melanoma proliferation, migration, invasion and the FAK-SRC-GRB2 nexus. *Oncotarget* **5**, (2016).

150. Huang, C. Roles of E3 ubiquitin ligases in cell adhesion and migration. *Cell Adh. Migr.* **4**, 10–18 (2014).
151. Wei, T.-T. *et al.* Induction of c-Cbl contributes to anti-cancer effects of HDAC inhibitor in lung cancer. *Oncotarget* **6**, 12481–92 (2015).
152. Lai, A. Z., Durrant, M., Zuo, D., Ratcliffe, C. D. H. & Park, M. Met kinase-dependent loss of the E3 ligase Cbl in gastric cancer. *J. Biol. Chem.* **287**, 8048–8059 (2012).
153. Brian E. Kadera¹, Paul A. Toste¹, Nanping Wu¹, Luyi Li¹, Andrew H. Nguyen¹, D. W. & Dawson^{2, 4}, and Timothy R. Donahue^{1, 3, 4}. Low expression of the E3 Ubiquitin Ligase CBL Confers Chemoresistance in Human Pancreatic Cancer and is Targeted by Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition. *Clin. Cancer Res.* **21**, 157–165 (2016).
154. Hatakeyama, S. TRIM proteins and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 792–804 (2011).
155. Ozato, K., Shin, D., Chang, T. & Morse, H. TRIM Family Proteins and Their Emerging Roles in Innate Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 849–860 (2012).
156. Didier, C. *et al.* RNF5, a RING Finger Protein That Regulates Cell Motility by Targeting Paxillin Ubiquitination and Altered Localization. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5331–5345 (2003).
157. Bromberg, K. D. *et al.* Increased Expression of the E3 Ubiquitin Ligase RNF5 Is Associated with Decreased Survival in Breast Cancer. *Cancer Res.* **67**, 8172–8179 (2010).
158. Ho, S.-R., Mahanic, C. S., Lee, Y.-J. & Lin, W.-C. RNF144A, an E3 ubiquitin ligase for DNA-PKcs, promotes apoptosis during DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E2646–E2655 (2014).
159. Taylor, A. C. Responses to cells to pH changes in the medium. *J. Cell Biol.* **15**, 201–209 (1962).
160. Ryan, J. A. *Corning Guide for Identifying and Correcting Common Cell Growth Problems. Technical Bulletin* (2008).
161. Adolfo Elena, G. Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Rev. Argentina Anestesiología*. 391–401 (2002).
162. Vermeulen, K., Berneman, Z. N. & Bockstaele, D. R. Van. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* **36**, 165–175 (2003).
163. Rojas, M., Salmen, S. & Berrueta, L. Muerte celular programada: Activación y mecanismos de regulación. *Rev. Médica la Extensión Port.* **4**, 92–106 (2009).
164. Pobezińska, Y. L. & Liu, Z. The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle* **11**, 871–876 (2012).
165. Pereira, P. M., Marques, J. P., Soares, A. R., Carreto, L. & Santos, M. a S. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* **5**, e11780 (2010).
166. Sur, T. The Role of HPV 16 E5 Protein and Its Interacting Partners in Cervical Cancer Cases. *J. Tumor* **2**, 179–186 (2014).
167. Müller, M., Prescott, E. L., Wasson, C. W. & Macdonald, A. Human papillomavirus E5 oncoprotein: function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virol.* **10**, 27–39 (2015).
168. Paolini, F. *et al.* HPV 16 E5 oncoprotein is expressed in early stage carcinogenesis and can be a target

- of immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* 13, 291–297 (2017).
169. de Freitas, A. C., de Oliveira, T. H. A., Barros, M. R. & Venuti, A. hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 36, 71 (2017).
170. Sahab, Z. *et al.* Quantitative Measurement of Human Papillomavirus Type 16 E5 Oncoprotein Levels in Epithelial Cell Lines by Mass Spectrometry. *J. Virol.* 86, 9465–9473 (2012).

