



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE VARIANTES DE RNA  
MENSAJERO GENERADAS POR *SPLICING* ALTERNATIVO DEL ANTÍGENO NUCLEAR  
DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA)**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MARCO ANTONIO FONSECA MONTAÑO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
**DR. FABIÁN JESÚS ARECHAVALETA VELASCO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018



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.





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE VARIANTES DE RNA  
MENSAJERO GENERADAS POR *SPLICING* ALTERNATIVO DEL ANTÍGENO NUCLEAR  
DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA)**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MARCO ANTONIO FONSECA MONTAÑO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**DR. FABIÁN JESÚS ARECHAULETA VELASCO**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **FONSECA MONTAÑO MARCO ANTONIO** con número de cuenta **307179977**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE VARIANTES DE RNA MENSAJERO GENERADAS POR SPLICING ALTERNATIVO DEL ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA)"**, realizada bajo la dirección del **DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ**:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
Vocal: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO  
Secretario: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
Suplente: DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO  
Suplente: DR. FABIÁN JESÚS ARECHAVALTA VELASCO

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 07 de diciembre de 2017

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



C.P. AGUSTIN MERCADO

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de maestría y contribuir en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida (CVU 708515) durante mi periodo como estudiante y al Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS) por el financiamiento de los proyectos 243233 y 272633. Agradezco también a Recursos Fiscales de Presupuesto Federal para Investigación del Instituto Nacional de Pediatría (INP) con número de registro 060/2016.

A mi tutor principal, el Dr. Sergio Juárez Méndez y a los integrantes de mi Comité Tutor, el Dr. Alejandro Zentella Dehesa y el Dr. Fabián Jesús Arechavaleta Velasco por sus valiosas críticas, sugerencias y apoyo otorgado para el desarrollo de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A mis padres, Laura y Antonio, por su amor incondicional, apoyo y paciencia. Gracias por sus consejos certeros y por enseñarme que cada meta propuesta siempre se logra con dedicación y esfuerzo.

A mi tía Evangelina y a mi hermano Mauricio, por su apoyo y tolerancia cuando más lo necesité.

A mis primos Sachiél, Camila, Esperanza y Sheila por apoyarme y estar conmigo en este camino.

A la Dra. Rosa Angélica Castillo Rodríguez, del Laboratorio de Oncología Experimental del INP, por su asesoría para la realización y análisis de las inmunofluorescencias. Agradezco también sus comentarios a esta investigación, y desde luego su amistad y apoyo.

Al M. en C. José Luis Ventura Gallegos, de la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zúbirán, por su asesoría en el desarrollo de las técnicas de *western blot*, citometría de flujo, cultivo celular y transfección. Así como en el análisis de los datos generados de las mismas.

A la Biol. María de Lourdes Escobedo Sánchez, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, por su apoyo en el diseño y obtención del constructo empleado en este trabajo.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, a la Dra. Leda Carolina Torres Maldonado y a la Dra. Elena Aréchaga Ocampo por formar parte del jurado revisor de este trabajo; sus comentarios y sugerencias fueron valiosas para la última versión.

A mis profesores y compañeros del Posgrado en Ciencias Biológicas.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	iii
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Cáncer	3
3.2. Leucemia	4
3.2.1. Leucemia linfoblástica aguda de células B	5
3.3. <i>Splicing</i>	7
3.3.1. Ensamblaje del espliceosoma y catálisis	8
3.4. <i>Splicing</i> alternativo	10
3.4.1. Regulación del <i>splicing</i> alternativo	10
3.4.2. <i>Splicing</i> alternativo y cáncer	13
3.4.3. Desregulación de los factores de <i>splicing</i> alternativo en cáncer	14
3.4.4. Expresión de variantes alternativas en cáncer	15
3.5. Antígeno nuclear de proliferación celular	20
3.5.1. Estructura genómica	20
3.5.2. Estructura proteica	21
3.5.3. Interacciones de PCNA con proteínas	23
3.5.4. Funciones	24
3.5.4.1. Replicación del DNA	24
3.5.4.2. Reparación de DNA dañado	25
3.5.4.3. Supervivencia y control del ciclo celular	26
3.5.5. Modificaciones postraduccionales	27
3.5.6. <i>Splicing</i> alternativo en PCNA	29
4. JUSTIFICACIÓN	31
5. OBJETIVOS	32
6. METODOLOGÍA	33
6.1. Cultivos celulares	33
6.2. Extracción de RNA total	33
6.3. Transcripción reversa (3' <i>RACE</i> )	33
6.4. PCR punto final (3' <i>RACE</i> y 3' <i>RACE</i> anidado)	34

6.5. Purificación y secuenciación	35
6.6. Líneas celulares	36
6.7. Muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B	37
6.8. Transcripción reversa	37
6.9. PCR cuantitativa	37
6.10. Estimulación mitogénica de linfocitos de sangre periférica	39
6.11. Análisis bioinformático	39
6.12. Constructo PCNA-3/DDK	40
6.13. Transfección transitoria en células HEK-293	42
6.14. Extracción de proteína total y <i>western blot</i>	42
6.15. Inmunofluorescencia	43
6.16. Ensayo de proliferación celular	44
6.17. Análisis estadístico	44
7. RESULTADOS	45
7.1. Caracterización de secuencias nucleotídicas de PCNA-3 y PCNA-4	45
7.2. Análisis bioinformático de PCNA-3 y PCNA-4	46
7.3. PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 se expresan diferencialmente en líneas celulares	48
7.4. PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 se expresan en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B	50
7.5. PCNA-3 y PCNA-4 se relacionan con la proliferación celular	51
7.6. Estructura <i>in silico</i> y modificaciones postraduccionales de la proteína PCNA-3	52
7.7. Expresión <i>in vitro</i> de la proteína recombinante PCNA-3/DDK, localización y relación con la proliferación en la línea celular HEK-293	56
8. DISCUSIÓN	60
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVAS	66
11. LITERATURA CITADA	67
12. ANEXO	79
Anexo 1. Curvas estándar y gráficas <i>melting</i> obtenidas por RT-qPCR	79
Anexo 2. Validación de la construcción PCNA-3/DDK.	80
Anexo 3. Evaluación de la eficiencia de transfección mediante citometría de flujo	81

## ABREVIATURAS

**AMO:** Aspirado de médula ósea

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BER:** Reparación por escisión de bases (*base excision repair*)

**BPS:** Secuencia de ramificación (*branch-point sequence*)

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario (*complementary deoxyribonucleic acid*)

**CPP:** Codón de paro prematuro

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

**G:** Guanina

**hnRNP:** Ribonucleoproteína nuclear heterogénea (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*)

**LLA:** Leucemia linfoblástica aguda

**LLA-B:** Leucemia linfoblástica aguda de células B

**LLA-T:** Leucemia linfoblástica aguda de células T

**MMR:** Reparación por desapareamiento (*mismatch repair*)

**MPT:** Modificación postraducciona

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero (*messenger ribonucleic acid*)

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**NER:** Reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*)

**NES:** Secuencia de exporte nuclear (*nuclear export sequence*)

**NES-1:** Secuencia de exporte nuclear 1 (*nuclear export sequence-1*)

**NES-2:** Secuencia de exporte nuclear 2 (*nuclear export sequence-2*)

**NMD:** *Nonsense-Mediated Decay*

**PCNA:** Antígeno nuclear de proliferación celular (*proliferating cell nuclear antigen*)

**PCNA-AS1:** Antígeno nuclear de proliferación celular, antisentido 1 (*proliferating cell nuclear antigen antisense 1*)

**PCNA-1:** Antígeno nuclear de proliferación celular, variante 1

**PCNA-2:** Antígeno nuclear de proliferación celular, variante 2

**PCNA-3:** Antígeno nuclear de proliferación celular, variante 3

**PCNA-4:** Antígeno nuclear de proliferación celular, variante 4

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PPT:** Tramo de polipirimidinas (*polypyrimidine tract*)

**pre-mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero precursor (*precursor-messenger ribonucleic acid*)

**PSE:** Potenciador de *splicing* exónico

**PSI:** Potenciador de *splicing* intrónico

**PTB:** Proteína de unión al tramo de polipirimidinas (*polypyrimidine tract-binding protein*)

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RFC:** Factor de replicación C (*replication factor C*)

**RNA:** Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

**lncRNA:** Ácido ribonucleico largo no codificante (*long non-coding ribonucleic acid*)

**RT-PCR:** Transcripción reversa-PCR

**SA:** *Splicing* alternativo

**SC:** *Splicing* constitutivo

**snRNP:** Ribonucleoproteína pequeña nuclear (*small nuclear ribonucleoprotein*)

**SR:** Serinas y argininas

**SRSF:** Factor de *splicing* rico en serinas y argininas (*serine-arginine rich splicing factor*)

**SS:** Sitio de *splicing*

**SS 3':** Sitio de *splicing* 3'

**SS 5':** Sitio de *splicing* 5'

**SSE:** Silenciador de *splicing* exónico

**SSI:** Silenciador de *splicing* intrónico

**TEM:** Transición epitelio-mesénquima

**tGFP:** Proteína verde fluorescente turbo

**TLS:** Síntesis de translesión (*translesion synthesis*)

**U:** Uracilo

**UTR:** Región no traducida (*untranslated region*)

**3' RACE:** 3' *Rapid Amplification of cDNA Ends*

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Bases genéticas y moleculares de la LLA-B.
- Figura 2. Ensamblaje del espliceosoma y eventos catalíticos del *splicing*.
- Figura 3. Modelo regulador del *splicing* alternativo.
- Figura 4. Patrones de *splicing* alternativo más comunes en los mRNAs.
- Figura 5. Cooperación y competencia de factores de *splicing* en la regulación del *splicing* alternativo.
- Figura 6. Características del cáncer y *splicing* alternativo.
- Figura 7. Producción de variantes alternativas en cáncer.
- Figura 8. Localización del gen *PCNA*.
- Figura 9. Estructura monomérica de PCNA de humano.
- Figura 10. Estructura cuaternaria de PCNA homotrimérica.
- Figura 11. PCNA regula diversos procesos celulares relacionados con el DNA.
- Figura 12. PCNA en el control del ciclo celular.
- Figura 13. Modificaciones postraduccionales de PCNA.
- Figura 14. Variantes alternativas de mRNA de *PCNA* reportadas en el NCBI.
- Figura 15. Expresión diferencial de exones en PCNA.
- Figura 16. Patrones de *splicing* alternativo de nuevas variantes de *PCNA*.
- Figura 17. Amplicones de PCNA-3 y PCNA-4 3'RACE anidado.
- Figura 18. Electroferogramas de PCNA-3 y PCNA-4 3' RACE anidado.
- Figura 19. Comparación de los valores de traducción de secuencias nucleotídicas de RNAs no codificantes y RNAs codificantes.
- Figura 20. Comparación entre los valores de traducción agrupados de secuencias nucleotídicas de RNAs no codificantes y RNAs codificantes.
- Figura 21. Expresión relativa de PCNA-2 en 26 líneas celulares.
- Figura 22. Expresión relativa de PCNA-3 en 26 líneas celulares.
- Figura 23. Expresión relativa de PCNA-4 en 26 líneas celulares.
- Figura 24. Expresión relativa de PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B.
- Figura 25. Expresión relativa de PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 en linfocitos de sangre periférica estimulados con compuestos mitogénicos (ionomicina y PMA).
- Figura 26. Alineamiento múltiple entre la secuencia de aminoácidos de PCNA y PCNA-3.
- Figura 27. Modelado *in silico* de la estructura terciaria de PCNA-3.

Figura 28. Potenciales modificaciones postraduccionales de PCNA-3.

Figura 29. Transfección transitoria de células HEK-293.

Figura 30. Detección de PCNA-3/DDK por *western blot*.

Figura 31. Localización subcelular de PCNA-3/DDK en células HEK-293 mediante inmunofluorescencia.

Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de PCNA-3/DDK en la proliferación celular de HEK-293.

Tabla 1. Factores de *splicing* alternativo desregulados en cáncer.

Tabla 2. Variantes alternativas que funcionan como marcadores moleculares en cáncer.

Tabla 3. Proteínas que interaccionan con PCNA.

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la PCR punto final 3' *RACE* y 3' *RACE* anidado.

Tabla 5. Líneas celulares.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos empleados para RT-qPCR.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la obtención y secuenciación del constructo PCNA-3/DDK.

Anexo 1. Curvas estándar y gráficas *melting* obtenidas por RT-qPCR.

Anexo 2. Validación de la construcción PCNA-3/DDK.

Anexo 3. Evaluación de la eficiencia de transfección mediante citometría de flujo.

## 1. RESUMEN

El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) pertenece a la familia de proteínas de abrazaderas deslizantes del DNA. En su conformación homotrimérica, PCNA funciona como plataforma de reclutamiento de otras proteínas para regular distintos procesos celulares, tales como: replicación del DNA, reparación de DNA dañado, control del ciclo celular, proliferación celular, entre otros. Diversas investigaciones han indicado que la sobreexpresión de PCNA está relacionada con la proliferación celular y agresividad en varios tipos de cáncer. Por esta razón, PCNA ha sido propuesto como marcador molecular pronóstico y diagnóstico.

Estudios enfocados en el *splicing* alternativo han demostrado que la expresión de variantes alternativas juega un papel importante en distintos procesos celulares normales. En condiciones aberrantes, el *splicing* alternativo influye negativamente en la salud y contribuye en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. De acuerdo a datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), en seres humanos sólo se han reportado dos variantes alternativas de mRNA de *PCNA*: PCNA-1 y PCNA-2. Resultados previos en nuestro grupo de investigación revelaron la presencia de dos nuevos transcritos alternativos de *PCNA*: PCNA-3 (con la omisión de los exones 3 y 4) y PCNA-4 (con un sitio de *splicing* alternativo 5' en el exón 2). En el presente trabajo se caracterizaron dichas variantes y se evaluó su expresión en cáncer. Los resultados sugieren que PCNA-3 podría ser un RNA codificante que traduce una proteína de 80 aminoácidos y PCNA-4 un RNA no codificante. Mediante RT-qPCR se demostró que PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 se expresan diferencialmente en 26 líneas celulares de distintos tipos de cáncer y en muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda de células B. También se identificó que el incremento de la expresión de los transcritos PCNA-3 y PCNA-4 se relaciona con la proliferación celular de linfocitos de sangre periférica estimulados con compuestos mitogénicos. Finalmente, se demostró en un modelo *in vitro*, que la proteína recombinante PCNA-3/DDK se localiza tanto en citoplasma como en núcleo; sin embargo, su sobreexpresión no aumentó la proliferación de células HEK-293.

## 2. ABSTRACT

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) belongs to DNA sliding clamps protein family. Homotrimeric PCNA functions as a platform for recruiting other proteins to regulate different cellular processes like DNA replication, DNA damage repair, cell cycle control, cellular proliferation, among others. It has been demonstrated that PCNA overexpression is related to cell proliferation and aggressiveness in various types of cancer. For this reason, PCNA has been proposed as a molecular prognostic and diagnostic biomarker.

Several studies of alternative splicing have shown that the expression of splice variants plays an important role in different normal cellular processes. In aberrant conditions, alternative splicing has a negative effect on health and contribute to the development of many diseases like cancer. According to the National Biotechnology Information Center, in humans only two mRNA alternative variants of *PCNA* have been reported: PCNA-1 and PCNA-2. Previous results in our group revealed the presence of two new PCNA alternative transcripts: PCNA-3 (skipping of exon 3 and 4) and PCNA-4 (alternative 5' splice site on exon 2). In the present study, we characterize these variants and evaluate their expression in cancer. Our results suggest that PCNA-3 could be a coding RNA that translates a protein of 80 aminoacids and PCNA-4 could be a non-coding RNA. Using RT-qPCR, we demonstrated that PCNA-2, PCNA-3 and PCNA-4 are differentially expressed in 26 cell lines of different types of cancer and in samples from pediatric patients diagnosed with B-cell acute lymphoblastic leukemia. We also identified that the increase in the expression of the transcripts PCNA-3 and PCNA-4 was related to cell proliferation of peripheral blood lymphocytes stimulated with mitogenic compounds. Finally, we demonstrated *in vitro* that PCNA-3/DDK recombinant protein is located in cytoplasm and nucleus. However, its overexpression does not increase the proliferation of HEK-293 cells.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales caracterizadas por la proliferación desregulada de células y por su diseminación hacia otros tejidos y órganos, causando fallas funcionales en el organismo e incluso la muerte del paciente, si éste no recibe un diagnóstico y tratamiento temprano (Tabassum & Polyak, 2015; NCI, 2017; OMS 2017). El cáncer puede originarse en casi cualquier parte del cuerpo humano y se clasifica dependiendo del órgano, tejido y tipo celular afectado. Según Luz et al. (2016), el cáncer resulta de alteraciones genéticas y epigenéticas, cuyas consecuencias involucran la desregulación de la expresión génica a nivel pretranscripcional, transcripcional, traduccional y postraduccional. Generalmente, estas alteraciones permiten la activación de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores tumorales, favoreciendo la transformación celular (Sarkar et al., 2013). Diversos estudios han demostrado que las células cancerosas tienen diez características esenciales, las cuales son: mantenimiento de señales proliferativas, insensibilidad ante supresores de crecimiento, potencial de replicación ilimitado, inducción de angiogénesis, evasión de la apoptosis, desregulación metabólica, evasión del sistema inmune, presencia de inflamación, inestabilidad genómica, invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

A nivel mundial, el cáncer representa un gran problema de salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, registrándose 8.8 millones de defunciones y 14 millones de nuevos casos en 2015. De acuerdo con el *National Cancer Institute*, se prevé que el número de casos nuevos aumente en un 70% en los próximos 20 años. Mundialmente, los tipos de cáncer comúnmente diagnosticados son: pulmón, mama, colon-rectal, próstata, estómago y leucemias. La frecuencia de cada tipo de cáncer varía dependiendo del sexo, edad y región geográfica (NCI, 2017; OMS 2017). Por ejemplo, a nivel mundial, la leucemia es predominante en la población pediátrica (Harrison, 2013; Rose-Inman & Kuehl, 2014).

### 3.2. Leucemia

La leucemia se considera como un tipo de cáncer hematológico heterogéneo que comienza en la médula ósea, se caracteriza por la proliferación descontrolada de leucocitos y su eventual diseminación en la sangre periférica, causando alteraciones en la hematopoyesis. La leucemia puede desarrollarse a partir de linajes celulares linfoides o mieloides y se clasifica, como: aguda o crónica según sea la velocidad de proliferación de las células leucémicas. La leucemia aguda progresa con gran rapidez, en tanto que la crónica lo hace con lentitud. La distinción principal entre ambos tipos de leucemia se encuentra en el estado de diferenciación celular. Por ejemplo, la leucemia aguda tiende a originarse en células menos diferenciadas, mientras que la crónica lo hace en células de mayor diferenciación. Se distinguen cuatro tipos principales: leucemia mieloblástica crónica, leucemia linfoblástica crónica, leucemia mieloblástica aguda y leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Ribera, 2010; Rivera, 2010).

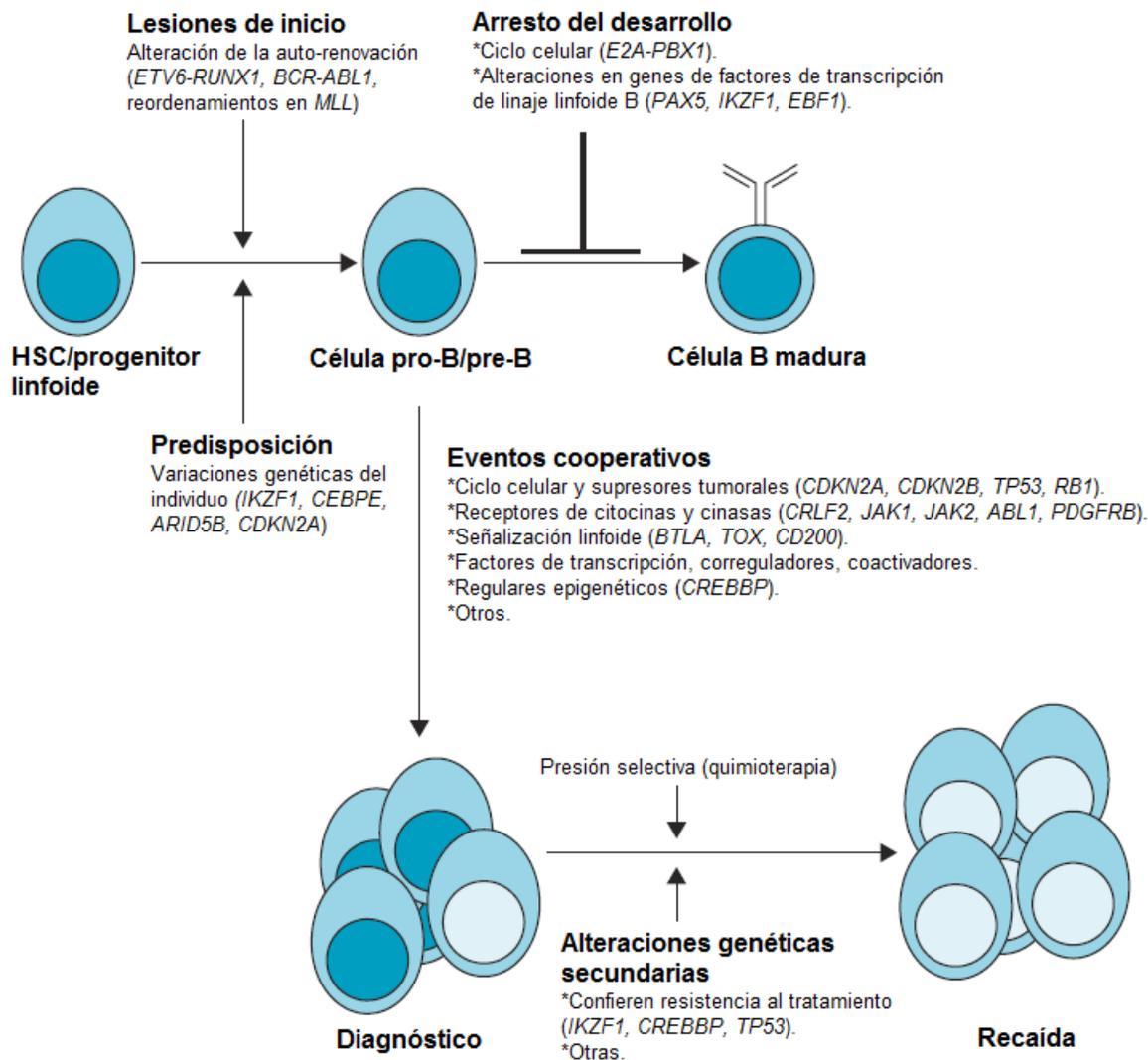
A nivel mundial, la leucemia es predominante en niños y adolescentes menores de 15 años, representando cerca del 30% del total de las neoplasias pediátricas diagnosticadas y la segunda causa de muerte en esta población. La LLA representa aproximadamente el 80% del total de las leucemias diagnosticadas con una incidencia media de 4 por cada 100,000 niños (con una ligera predominancia en individuos de sexo masculino) y con un pico principal entre los 2 a 5 años (Harrison, 2011; Ju et al., 2014; OMS, 2014; Cooper & Brown, 2015). De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Cancerología, en México la LLA representa el 77% de todos los casos de leucemia y su incidencia es mayor a la reportada en otras partes del mundo, con tasas de hasta 12 por cada 100,000 niños (Rivera, 2010; INCan, 2017).

La LLA se divide en dos subtipos: LLA de células B (LLA-B) y LLA de células T (LLA-T). La LLA-B representa el 85% de las LLA diagnosticadas, mientras que el 15% restante corresponde a la LLA-T (Harrison, 2013; Rose-Inman & Kuehl, 2014). Debido a que la LLA-B es el tipo de cáncer predominante en la población pediátrica, se mencionarán sus principales características.

### 3.2.1. Leucemia linfoblástica aguda de células B

La LLA-B es de origen monoclonal y de carácter multifactorial, por lo que su fisiopatología es compleja e involucra la participación de factores de susceptibilidad genética (polimorfismos, síndrome de Down, entre otros), así como la exposición a agentes exógenos y endógenos, los cuales pueden dar lugar a distintas alteraciones en los procesos de desarrollo y maduración celular, favoreciendo así el arresto en los primeros estadios de diferenciación y la proliferación descontrolada de las células leucémicas. Se ha demostrado que varias de las lesiones de inicio, en las células progenitoras hematopoyéticas, tienen un origen *in utero* y que eventos de daño adicionales tienen lugar después del nacimiento (Inaba et al., 2013; Mejía-Arangure, 2013; Bhatla et al., 2014; Marshall et al., 2014).

Diversos estudios han señalado que más de 120 genes pueden ser alterados durante la linfogénesis de las células B y eventualmente favorecer la progresión de la LLA-B. Por ejemplo, se han identificado deleciones en *IKZF1*, *PAX5* y *CDKN2A/B*, y translocaciones en *MML*, *E2A*, *ETV6-RUNX1* y *BCR-ABL* (Mullighan, 2010; Gramatges & Rabin, 2013; Pui & Evans, 2013; Marshall et al., 2014; Zuckerman & Rowe, 2014). Otras alteraciones génicas incluyen mutaciones y amplificaciones en genes involucrados en el desarrollo de las células B (*EBF1*, *ERG*, *IKZF2*, *RAG1*, *RAG2*), cinasas (*JAK1*, *JAK2*), acetilación de histonas (*CREBBP*), metilación (*PRMT2*, *EZH2*, *CTCF*), supresores de tumores (*TP53*, *RB1*), apoptosis (*BTG1*, *BTG2*, *BIRC5*, *HRK*), reparación del DNA (*PTTG1*, *MSH6*), metabolismo de purinas (*WSHC1*, *USH2A*, *NT5C1B*), regulación del ciclo celular (*DUSP6*, *UBE2V1*, *FR2*, *PCNA*) y resistencia a fármacos (*TYMS*, *RAB5C*) (Pui et al., 2012; Harrison, 2013; Mejía-Arangure, 2013; Teachey & Hunger, 2013; Bhatla et al., 2014). Algunos autores han indicado que durante la progresión y tratamiento de la LLA-B ocurre la acumulación de múltiples eventos cooperativos y alteraciones genéticas-moleculares *de novo*, que con el paso del tiempo favorecen la selección de clonas leucémicas; y por tanto, una eventual resistencia al tratamiento e incremento en la agresividad de la enfermedad (Figura 1) (Inaba et al., 2013; Jan & Majeti, 2013).



**Figura 1. Bases genéticas y moleculares de la LLA-B.** La presencia de distintas alteraciones (aneuploidias, translocaciones cromosómicas, mutaciones puntuales, duplicaciones y deleciones de material genético) durante la linfogénesis B tiene un gran impacto en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular; y son las responsables de la progresión de la LLA-B. Además, la acumulación de múltiples eventos cooperativos y alteraciones *de novo* están relacionadas con la resistencia al tratamiento y al incremento de la agresividad de la LLA-B (modificado de Inaba et al., 2013).

Por otra parte, varias investigaciones han demostrado que la desregulación de mecanismos cotranscripcionales como el *splicing* alternativo (SA) favorece el desarrollo y progresión de la leucemia (Chen & Weiss, 2014). Por ejemplo, el SA de *BMF* favorece la expresión de las isoformas anti-apoptóticas BMF-II y BMF-III, que permiten la proliferación y supervivencia de células B leucémicas (Morales et al., 2004). Por otro lado, el SA de *IKAROS* permite la expresión de IK6, una variante con función dominante negativa que interfiere con la identidad del linaje y arresta la diferenciación de los linfoblastos leucémicos en la fase pre-B en pacientes

diagnosticados con LLA-B (Klein et al., 2006). Otros estudios han señalado que en pacientes con LLA-B, positivos para *BCR-ABL1*, se produce el SA aberrante de diversos genes involucrados en la diferenciación, proliferación, y migración de las células B, por ejemplo: *SLP65* (Jumaa et al., 2003) y *BTK* (Feldhahn et al., 2005).

### **3.3. Splicing**

La transcripción de genes por la RNA polimerasa II da lugar a los pre-mRNAs, los cuales están constituidos por exones, intrones, regiones 3' UTR y 5' UTR. Los pre-mRNAs requieren ser procesados para favorecer su maduración y desempeñar funciones biológicas importantes en la célula. Esta maduración ocurre de forma cotranscripcional y requiere de la adición del capuchón 7-metilguanosina en el extremo 5' terminal, la escisión de los intrones y ligación de los exones por *splicing* y de la poliadenilación del extremo 3' terminal (Bentley, 2014; Morris & Mattick, 2014).

Particularmente, el *splicing* es un mecanismo que regula la expresión génica, de forma cotranscripcional, y resulta esencial para el procesamiento de los pre-mRNAs de seres humanos. El *splicing* se clasifica en: a) *splicing* constitutivo (SC) que consiste en la remoción de todos los intrones y la ligación de los exones, y b) SA que promueve la inclusión alternativa de exones e intrones, produciendo diversas isoformas de mRNAs maduros a partir de un solo gen (Le et al., 2015; Lee & Abdel-Wahab, 2016).

El *splicing* de los pre-mRNAs es llevado a cabo por el espliceosoma: un complejo molecular compuesto de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) y de aproximadamente 170 factores proteicos auxiliares (Wang & Cooper, 2007; Keren et al., 2010; Le et al., 2015; Lee & Abdel-Wahab, 2016). Existen dos tipos de espliceosoma: 1) el espliceosoma mayor, el cual se encarga del procesamiento de los intrones de tipo U2 y consiste de cinco snRNPs (U1, U2, U4, U5 y U6). Este tipo de espliceosoma cataliza la escisión del 98% de los intrones de los pre-mRNAs en humano. Cada snRNP está compuesta de un RNA pequeño nuclear, o dos en el caso de U4/U6, y un número variable de proteínas accesorias. 2) El espliceosoma menor, el cual procesa el 2% de los intrones restantes y está conformado por las snRNPs U5, U11, U12, U4atac y U6atac, las cuales son análogas de las snRNPs del espliceosoma mayor (Wahl et al., 2009; Turunen et al., 2013).

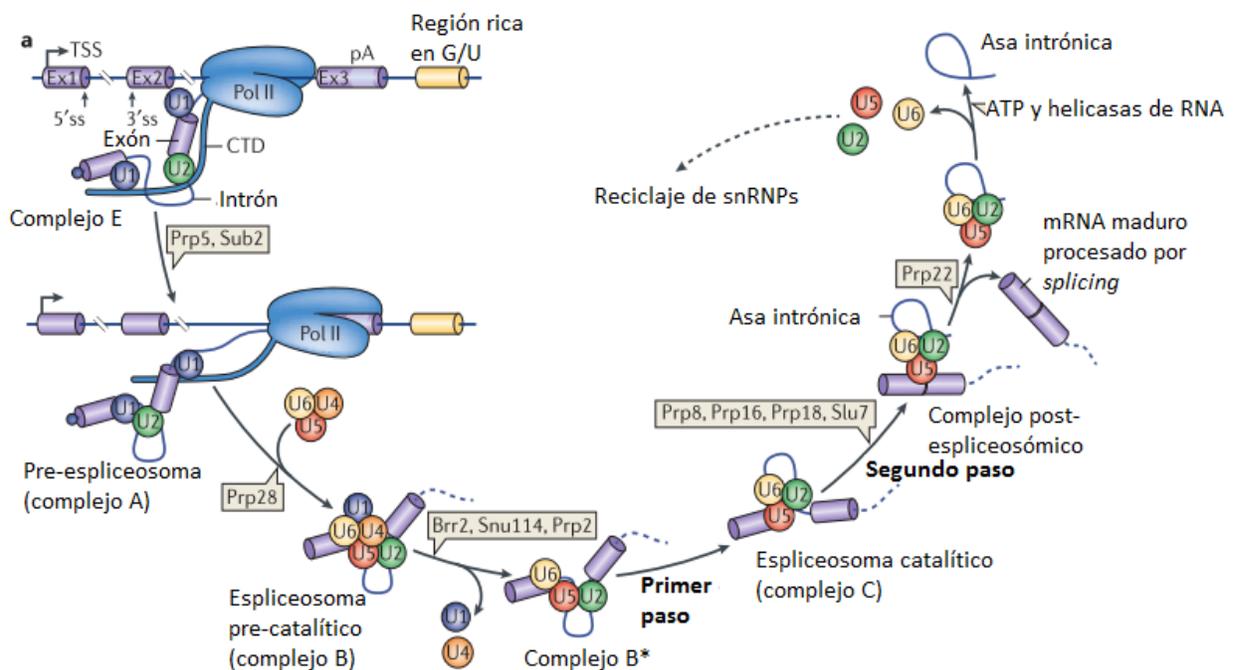
El procesamiento de los exones e intrones, por el espliceosoma, se realiza por el reconocimiento de cuatro secuencias o sitios de *splicing* (SS) presentes en el pre-mRNA: el límite entre el intrón y exón río arriba (SS 5'), el límite entre el intrón y exón río abajo (SS 3'), la secuencia de ramificación (BPS) y el tramo de polipirimidinas (PPT). El correcto reconocimiento de los SS, por el espliceosoma, requiere de interacciones de tipo RNA-RNA, RNA-proteína y proteína-proteína (Matera & Wang, 2014).

### **3.3.1. Ensamblaje del espliceosoma y catálisis**

En Metazoarios, los intrones pueden presentar estructuras secundarias y/o terciarias, que funcionan como sitios de anclaje para una gran variedad de elementos proteicos del espliceosoma (Wahl et al., 2009). Durante el *splicing*, el espliceosoma debe realizar: el correcto reconocimiento y apareamiento de los SS para llevar a cabo las reacciones de transesterificación. Esto requiere de la participación de una gran variedad de proteínas y snRNPs que tienen como sustrato al pre-mRNA (Chen & Manley, 2009; Wahl et al., 2009; David & Manley, 2010; Turunen et al., 2013).

El ensamblaje del espliceosoma ocurre de forma cotranscripcional (Figura 2) e inicia con el reclutamiento de U1 snRNP al pre-mRNA. U1 snRNP se une por complementariedad de bases al dinucleótido GU en el SS 5'. De manera simultánea, el factor de *splicing* SF1/BPP se une a la BPS del intrón, los factores U2AF65 al PPT, y U2AF35 al dinucleótido AG del SS 3'. En conjunto, estas interacciones moleculares permiten la formación del complejo E (Matlin et al., 2005; Nieto-Moreno et al., 2015; Chabot & Shkreta, 2016; Sahebi et al., 2016). Después, U2 snRNP desplaza al factor SF1/BPP y se une a la BPS, dando lugar al complejo A o pre-espliceosoma (Wahl et al., 2009). Posteriormente, ocurre la formación del complejo B o espliceosoma pre-catalítico con la incorporación de U4/U6 y U5 snRNPs, donde U5 se une al SS 5' y U6 a U2. Esto ocasiona que U1 y U4 sean liberadas, permitiendo que U5 cambie al SS 3' y que U6 se una al SS 5'. Tales cambios favorecen la formación del complejo B\*, el cual cataliza la primera reacción de transesterificación de tipo  $S_N2$ : el extremo terminal 5' del intrón se liga a la adenina de la BPS, generando un asa intrónica. De esta manera, se produce la formación del complejo C o espliceosoma catalítico maduro (Matera & Wang, 2014).

Luego, U5 cataliza la segunda reacción de trans-esterificación que escinde el SS 5' para separar al exón del asa intrónica, ligando covalentemente los exones (proceso dependiente de ATP). Posteriormente, U5 se une a U6/U2 para formar un heterotrímero que permanecerá unido al asa intrónica y al mRNA por un corto tiempo, constituyendo así el complejo post-espliceosómico. Finalmente, se favorece la liberación del mRNA maduro y la separación del asa intrónica de U2, U5 y U6. La disociación de tales snRNPs permite su eventual reciclaje y participación en siguientes rondas de *splicing* en otros pre-mRNAs (Wahl et al., 2009; Matera & Wang, 2014).



**Figura 2. Ensamblaje del espliceosoma y eventos catalíticos del *splicing*.** El ensamblaje del espliceosoma requiere de la unión específica-secuencial de snRNPs y distintos factores proteicos auxiliares a los SS de los pre-mRNAs. Los complejos espliceosómicos B\* y C catalizan, por trans-esterificación, la escisión de los intrones y ligación de los exones para generar mRNAs maduros. Estos eventos requieren de interacciones de tipo RNA-RNA, RNA-proteína y proteína-proteína (modificado de Matera & Wang, 2014).

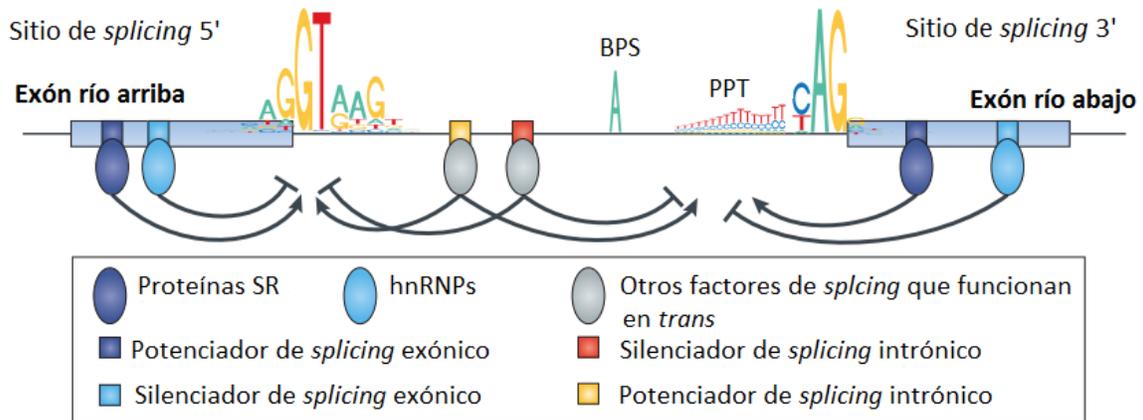
### 3.4. *Splicing* alternativo

El SA es un evento que ocurre en más del 90% de los pre-mRNAs de humano. En este mecanismo, sucede la inclusión total o parcial de distintos exones e intrones, produciendo distintas isoformas de mRNAs maduros a partir de un solo gen. Es relevante destacar que el SA, confiere versatilidad al transcriptoma y proteoma de los eucariontes superiores. Además, se ha demostrado que el SA es muy importante en distintos procesos celulares, tales como: maduración tisular, auto-renovación celular, diferenciación de células troncales, entre otros (Le et al., 2015).

#### 3.4.1. Regulación del *splicing* alternativo

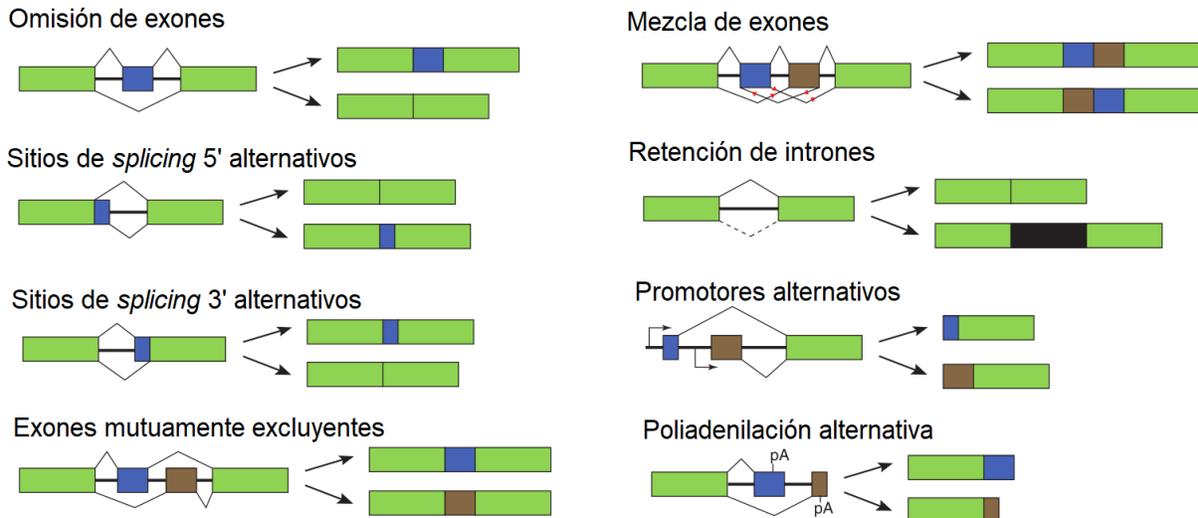
El reclutamiento eficiente de las proteínas del espliceosoma a los SS alternativos depende de la interacción de factores proteicos que actúan en *trans* con secuencias en *cis* (dentro del pre-mRNA). Estudios recientes han sugerido la existencia de más de 100 secuencias y motivos en *cis* que contribuyen a la regulación del SA. Las secuencias en *cis* involucran a las cuatro señales clásicas del SC (SS 3', SS 5', BPS y PPT), y adicionalmente, a los potenciadores y silenciadores de *splicing* exónico (PSE, SSE) e intrónico (PSI, SSI) (Wang & Burge, 2008; Chen & Manley, 2009; Fu & Ares, 2014). Los potenciadores y silenciadores de *splicing* interactúan con una gran variedad de proteínas en *trans* de unión a RNA, tales como: las proteínas ricas en serinas/argininas (SR) y las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) (Figura 3) (Singh & Valcárcel, 2005; Long & Cáceres, 2009; Zhou & Fu, 2013; Fu & Ares, 2014).

Convencionalmente, las proteínas SR promueven y las hnRNPs reprimen el SA. Sin embargo, estudios recientes han demostrado variaciones en tales funciones. Por ejemplo, las proteínas SR pueden promover o reprimir el SA, dependiendo de la región a la cual se unen en el pre-mRNA. Algunas hnRNPs funcionan principalmente como represoras del SA, mientras que las proteínas PTB favorecen la inclusión de los exones. Las proteínas SR y hnRNPs regulan el SA de manera variada y compleja, por ejemplo: facilitando el reclutamiento de U1 y U2 snRNPs, bloqueando SS, generando bucles exónicos, entre otros. Las funciones reguladoras de las proteínas SR y hnRNPs dependen del contexto celular (Wang & Burge, 2008; Kornblihtt et al., 2013; Fu & Ares, 2014).



**Figura 3. Modelo regulador del *splicing* alternativo.** Las cuatro secuencias esenciales que gobiernan el *splicing* y que permiten el reconocimiento de los pre-mRNAs y el ensamblaje del espliceosoma son: los SS 5', los SS 3', la BPS y el PPT. La producción de mRNAs alternativos está regulada por un complejo sistema de factores proteicos que actúan en *trans* y que interactúan con secuencias en *cis* en el pre-mRNA. Las secuencias en *cis* involucran a las cuatro señales clásicas de SC (SS 5', SS 3', BPS y PPT) y a los PSE, PSI, SSE y SSI. Además, los elementos proteicos que actúan en *trans* incluyen: proteínas SR, hnRNPs y otras proteínas de unión a RNA. Las proteínas SR, generalmente actúan como reguladoras positivas o promotoras del SA; mientras que las hnRNPs están involucradas en la regulación negativa o inhibición del SA (modificado de Dvinge et al., 2016).

Las interacciones de las proteínas SR y hnRNPs con potenciadores y silenciadores de *splicing* (PSE, PSI, SSE y SSI) dan lugar a diferentes patrones de SA en los mRNAs maduros. Dependiendo de la estructura y composición exónica e intrónica de los mRNAs maduros, los patrones de SA se clasifican en: omisión de exones, exones mutuamente excluyentes, sitios de *splicing* alternativos 3' y 5', retención de intrones, entre otros (Figura 4). Todos estos patrones generan una gran variedad de transcritos alternativos con diferencias en: secuencias nucleotídicas, marcos de lectura, extremos 3' UTR y 5' UTR, estabilidad, función, entre otros (Kalsotra & Cooper, 2011; Chen et al., 2012; Chen & Weiss, 2014; Fu & Ares, 2014; Necseulea & Kaessmann, 2014).

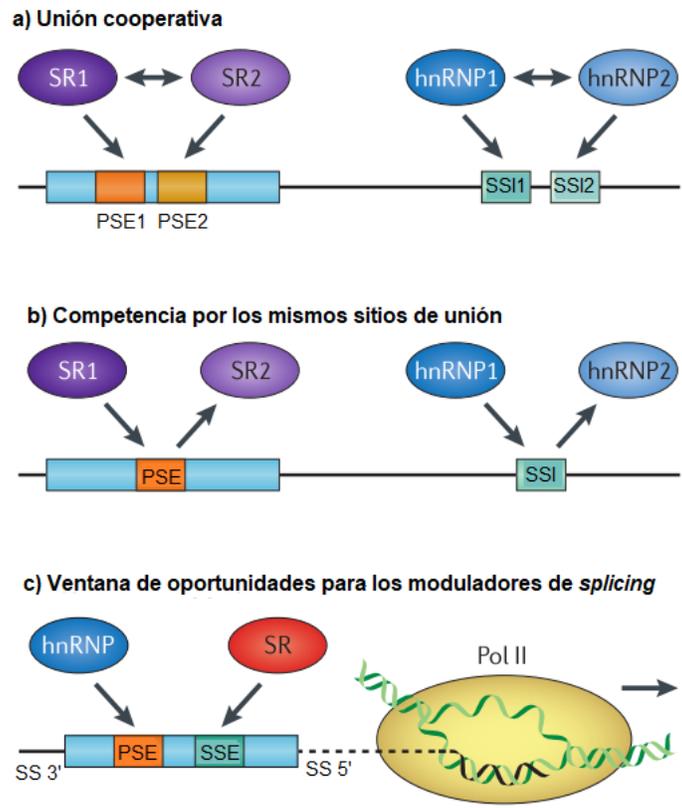


**Figura 4. Patrones de *splicing* alternativo más comunes en los mRNAs.** En Metazoarios, la omisión de exones representa cerca del 40% de los eventos de SA, los sitios de *splicing* alternativos 3' y 5' representan el 26% de los eventos de SA. Patrones menos frecuentes, tales como: la retención de intrones, exones mutuamente excluyentes, mezcla de exones, promotores alternativos y poliadenilación alternativa constituyen el 34% de los eventos restantes (modificado de Chen & Weiss, 2014).

Diversos estudios han demostrado que, otras proteínas de unión a RNA son capaces de modular el SA, por ejemplo: CUGBP, CELF, MBNL, RBFOX, STAR, NOVA, ESRP, TIA-1, TIAL1, entre otras. Investigaciones recientes han estimado que cientos de proteínas adicionales podrían estar involucradas en la regulación del SA (Nilsen & Graveley, 2010; Saltzman et al., 2011; Dasgupta & Ladd, 2012; Konieczny et al., 2014). Cabe resaltar que la actividad de los factores proteicos que actúan en *trans* y las secuencias en *cis* están coordinadas con el espliceosoma para definir los SS funcionales, y modular la selección diferencial de los SS mediante cuatro reglas: 1) el umbral de reconocimiento de los SS, 2) los efectos de las proteínas SR y hnRNPs, 3) los efectos dependientes de la posición y 4) la competencia entre los SS (Fu & Ares, 2014). Estas cuatro reglas desembocan en la cooperación y competencia de los elementos reguladores del SA (Figura 5).

Aproximadamente del 30% al 50% de los eventos de SA son tejido-específicos. Se ha demostrado que la mayoría de estos eventos contribuyen en la evolución de la complejidad fenotípica en mamíferos. Evidencias de la regulación del SA tejido-específico, provienen de la comparación de frecuencias de inclusión de los exones específicos de un gen que son incluidos en el mRNA maduro y expresados en cada tejido en comparación con otros. Estos análisis han resultado en la identificación de más de 22,000 transcritos alternativos tejido-específicos, con funciones particulares en humanos (Le et al., 2015). Por ejemplo, la expresión

de las variantes alternativas NOVA1, NOVA2 y RBFOX1 es exclusiva del tejido cerebral, y regulan el desarrollo de las neuronas motoras y la homeostasis eléctrica neuronal (Kalsotra & Cooper, 2011).

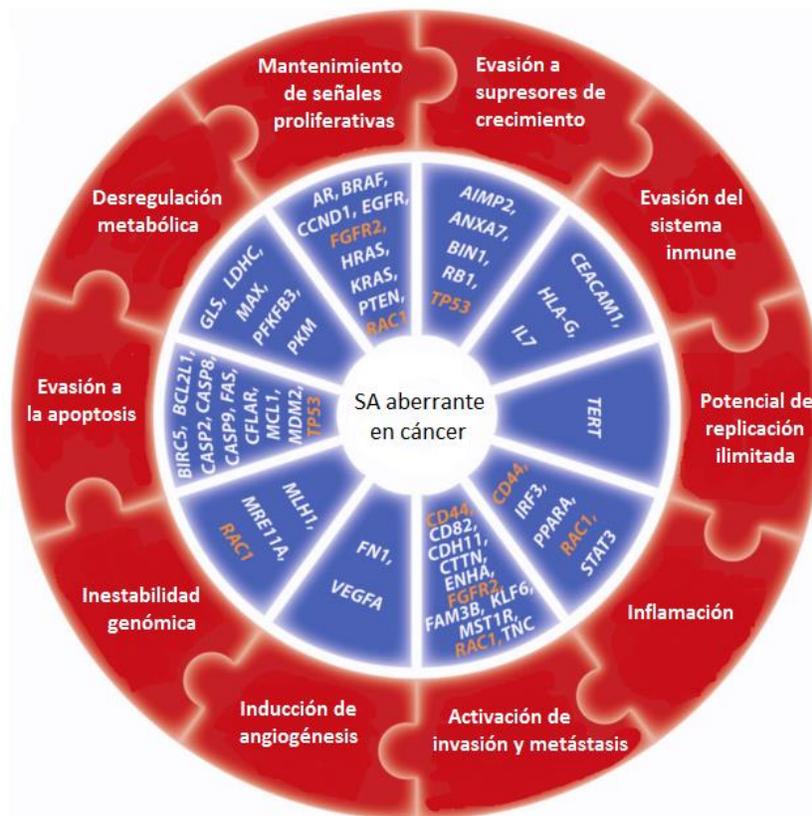


**Figura 5. Cooperación y competencia de factores de *splicing* en la regulación del *splicing* alternativo.** a) Distintos elementos proteicos que actúan en *trans* pueden actuar de modo cooperativo, mediante interacciones RNA-proteína y proteína-proteína. b) Las secuencias en *cis* que están localizadas en los intrones y exones del pre-mRNA pueden ser reconocidas por reguladores proteicos semejantes, resultando en la competencia entre reguladores. c) La velocidad de elongación de la RNA polimerasa II influye en la selección de los SS, creando una ventana de oportunidades para que las proteínas SR y las hnRNPs reconozcan, cotranscripcionalmente, los sitios de unión al pre-mRNA (modificado de Fu & Ares, 2014).

### 3.4.2. *Splicing* alternativo y cáncer

Se ha demostrado que distintas alteraciones en el SA están relacionadas con el desarrollo de múltiples enfermedades en humanos, por ejemplo: diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Le et al., 2015). Actualmente, se conoce que el SA regula la expresión de oncogenes y genes supresores tumorales, produciendo la expresión de transcritos y proteínas alternativas que favorecen el desarrollo del cáncer. Estas variantes están vinculadas en la desregulación de las diez características del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Lo anterior ha llevado a proponer que el SA aberrante es una característica

adicional de dicha enfermedad (Figura 6) (Ladomery, 2013; Sveen et al., 2015). Diversos estudios han señalado que el SA de las células cancerosas es muy diferente al de las células normales mostrando, por ejemplo, la expresión de un alto número de transcritos alternativos con codones de paro prematuros (CPP) que traducen proteínas truncas (Lee & Abdel-Wahab, 2016).



**Figura 6. Características del cáncer y *splicing* alternativo.** El SA de genes importantes (en azul) ha sido relacionado con la desregulación de las diez características del cáncer (en rojo). Otros genes (en naranja) están implicados en varias características del cáncer (modificado de Sveen et al., 2015).

### 3.4.3. Desregulación de los factores de *splicing* alternativo en cáncer

Actualmente se ha reportado que las proteínas SR, hnRNPs y otras, tienen funciones de oncoproteínas o supresoras tumorales (Tabla 1) (David & Manley, 2010; Zhang & Manley, 2013). Por ejemplo, el factor de *splicing* SRSF1 funciona como oncoproteína y está sobreexpresado en cáncer de mama, colon y pulmón. SRSF1 induce la transformación celular a través de: 1) la producción de las variantes alternativas MNK2 y RPS6KB1, 2) la activación de la vía mTOR y 3) la producción de isoformas anti-apoptóticas de *BIM* y *BIN1*. SRSF3 y SRSF6 también funcionan como oncoproteínas cuando se encuentran sobreexpresadas.

Algunas investigaciones han demostrado que cuando SRSF3 está subexpresado puede funcionar como supresor tumoral, promoviendo la expresión de la isoforma p53 $\beta$  y activando la senescencia celular en cáncer (Dvinge et al., 2016).

Otros estudios han relacionado a las hnRNPs en procesos pro-tumorigénicos y anti-tumorigénicos. Por ejemplo, la sobreexpresión de MYC mediada por hnRNP-A1, hnRNP-A2 y PTB resulta en la omisión del exón 9 de *PKM*, promoviendo así la expresión de la isoforma embrionaria PKM2, asociada a la glucólisis aeróbica en gliomas. La expresión de la isoforma EGFRvIII favorece la sobreexpresión de hnRNP-A1 y  $\delta$ MAX, las cuales promueven la expresión de diversos genes de la vía glucolítica y la estimulación de la proliferación celular. Otro ejemplo es hnRNP-A2/B1, la cual se encuentra sobreexpresada en gliomas y favorece la transformación celular, mostrando correlación con el mal pronóstico en pacientes (Dvinge et al., 2016).

QK1 es otro factor de SA que participa como supresor tumoral y se encuentra subexpresado en cáncer de pulmón. La sobreexpresión de QK1 inhibe la proliferación celular en cáncer de pulmón, mediante la regulación del SA de *NUMB*. Otros factores de SA como RBM5, RBM6 y RBM10 muestran alteraciones en cáncer. Se ha demostrado que RBM4 está subexpresado en varios tipos de cáncer y funciona como supresor tumoral al regular el SA de *BCLX* y al antagonizar la actividad pro-tumoral de SRSF1. Por otra parte, ESRP1 y ESRP2 promueven el SA de genes relacionados con funciones epiteliales en cáncer de mama, mientras que RBFOX2 favorece el SA de genes relacionados con funciones mesenquimales en el mismo tipo de cáncer. Esto muestra la complejidad de la desregulación del SA asociado a cáncer (Moumen et al., 2005; Wang et al., 2014; Gallardo et al., 2015).

#### **3.4.4. Expresión de variantes alternativas en cáncer**

Diversas investigaciones han identificado la expresión de transcritos y proteínas alternativas que favorecen el desarrollo del cáncer (Figura 7). Por ejemplo, el SA de *BCLX* produce dos isoformas con funciones opuestas: BCL-XL (anti-apoptótica) y BCL-XS (pro-apoptótica). La sobreexpresión de BCL-XL está relacionada con resistencia quimioterapéutica y pronóstico desfavorable en cáncer de mama, prostata, hepatocarcinomas y leucemia mieloide aguda. Por otra parte, BCL-XS está subexpresada en cáncer de hígado, riñón, mama y próstata en comparación con células no transformadas, en las cuales se observa una alta expresión de

BCL-XL (Figura 7) (Paronetto et al., 2016).

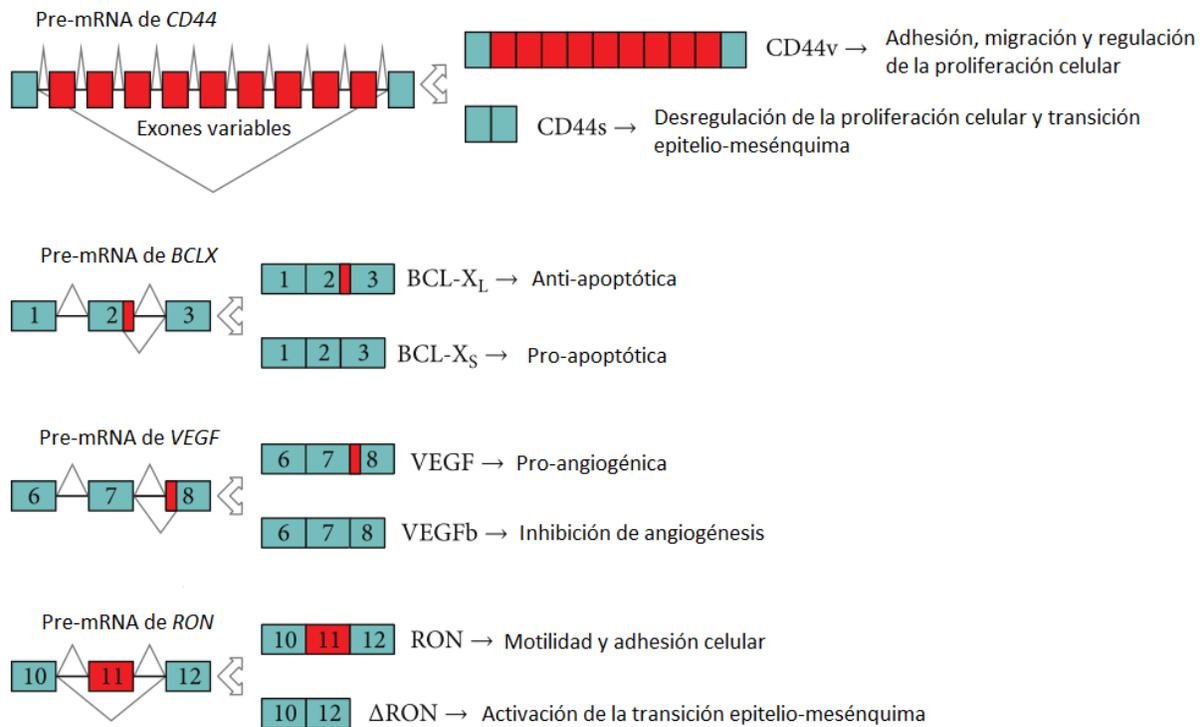
Otro ejemplo, es la variante alternativa CD44s, derivada del gen *CD44*, que juega un papel importante durante la transición epitelio-mesénquima (TEM). La expresión de esta isoforma es controlada por hnRNP-M durante la metástasis. hnRNP-M está asociada con cáncer de mama agresivo y correlaciona con el incremento de expresión de CD44s en pacientes. Otros eventos de SA importantes durante la TEM, en tumores metastásicos, involucran al gen *RON*. Las variantes alternativas de *RON* están relacionadas con la motilidad celular, adhesión, proliferación y apoptosis. En este caso, la expresión de las variantes alternativas RON155 y RON165 son favorecidas por SRSF2, resultando en alteraciones de la morfología celular que permiten la activación de la TEM y motilidad celular (Figura 7) (Pagliarini et al., 2015; Luz et al., 2016).

Eventos de SA del gen *VEGFA* muestran una relación importante con la angiogénesis. Las variantes alternativas de *VEGFA* son producidas por la selección de SS distales o proximales del exón 8, resultando en la expresión de VEGF165 (pro-angiogénica) y VEG165b (anti-angiogénica). La variante VEG165b muestra una expresión dominante en tejidos no angiogénicos como el colon normal, mientras que VEGF165 es dominante en cáncer de piel, colon y neuroblastoma (Figura 7) (Ladomery, 2013).

El SA de *EGFR* en cáncer de próstata, ovario y gliomas, permite la expresión de la variante alternativa de4-EGFR (carente del exón 4). Dicha variante favorece la traducción de un receptor cinasa de tirosinas que permanece constitutivamente activo, promoviendo la proliferación de células cancerosas (Oltean & Bates, 2013).

Otro ejemplo es la expresión anormal de variantes alternativas de *TP53*, las cuales están involucradas en la apoptosis y proliferación celular en diversos tipos de cáncer. Actualmente se han descrito 12 variantes alternativas de *TP53* en cáncer (p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 40p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 133p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 160p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 160p53 $\beta$  y  $\Delta$ 160p53 $\gamma$ ). Por ejemplo, p53 $\beta$  favorece la apoptosis mediante el incremento de la actividad transcripcional de p21. Por otra parte,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  actúa como una dominante negativa que afecta la función de p53 $\alpha$ , interfiriendo con su actividad transcripcional. Además, las interacciones entre  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  y p53 $\alpha$  permiten el arresto del ciclo celular en la fase G1, senescencia y evasión de la apoptosis, favoreciendo la metástasis y migración celular en cáncer (Kim & An, 2016).

Como se indica anteriormente, la expresión específica de variantes alternativas está fuertemente asociada con tipos particulares de cáncer y esto ha mostrado su potencial uso como marcadores moleculares diagnóstico, pronóstico y blancos terapéuticos (Tabla 2). Además, se ha demostrado que una gran cantidad de variantes alternativas contribuyen a la adquisición de resistencia terapéutica y al incremento de las capacidades adaptativas de las células cancerosas (Pagliarini et al., 2015).



**Figura 7. Producción de variantes alternativas en cáncer.** Las cajas verdes y rojas indican exones constitutivos y alternativos, respectivamente. Las líneas negras muestran las secuencias intrónicas. Los transcritos y proteínas alternativas varían en cuanto a su función celular (modificado de Pagliarini et al., 2015).

**Tabla 1.** Factores de *splicing* alternativo desregulados en cáncer.

Factor de <i>splicing</i>	Desregulación río abajo de isoformas funcionales vinculadas a cáncer
ESRP1 y ESRP2	Promueve programas de <i>splicing</i> epitelial para regular la TEM.
hnRNP-A1	Contribuye a la glucólisis aeróbica en cáncer al promover la expresión de las isoformas alternativas PKM2 y $\delta$ MAX.
hnRNP-A2	Contribuye a la glucólisis aeróbica en cáncer al promover la expresión de la variante alternativa PKM2. Incrementa la invasión en cáncer de mama mediante la expresión de la isoforma TP53INP2.
hnRNP-A2/B1	Funciona como un conductor oncogénico en glioblastoma al regular el SA de distintos genes supresores tumorales y oncogenes, por ejemplo <i>RON</i> .
hnRNP-H	Contribuye a la supervivencia de los gliomas y favorece la invasión a través de la producción de isoformas alternativas de <i>IG20</i> y <i>RON</i> .
hnRNP-K	Actúa como supresor tumoral en leucemias. Su inhibición está vinculada a una expresión aberrante de p21 y C/BEP.
hnRNP-M	Favorece la TEM en cáncer de mama e incrementa la metástasis mediante la producción de la isoforma alternativa CD44s.
PRPF6	Promueve la proliferación celular en cáncer de colon por la alteración del <i>splicing</i> de genes asociados a la regulación de crecimiento celular, como <i>ZAK</i> .
QK1	Actúa como supresor tumoral al regular el SA de <i>NUMB</i> en cáncer de pulmón.
RBFOX2	Funciona como supresor tumoral al promover programas de <i>splicing</i> mesenquimales que regulan la TEM.
SRSF1	Promueve la producción de la isoforma MNK2, la cual induce la fosforilación de eIF4E. En cáncer de mama, la sobreexpresión de SRSF1 favorece el SA de <i>BIM</i> y <i>BIN1</i> , las cuales promueven la expresión de variantes carentes de funciones pro-apoptóticas.
SRSF3	Regula el SA de <i>TP53</i> y promueve la expresión de la variante p53 $\beta$ que activa la senescencia celular.
SRSF6	Promueve la expresión de isoformas alternativas de <i>TN-C</i> que favorecen la hiperplasia epitelial, invasión y metástasis en cáncer de piel.
SRSF10	Favorece la proliferación celular y la formación de colonias <i>in vitro</i> .

**Tabla 2.** Variantes alternativas que funcionan como marcadores moleculares en cáncer.

<b>Gen</b>	<b>Variantes alternativas que funcionan como marcadores moleculares en cáncer</b>
<i>AIMP2</i>	AIMP2-DX2 está asociada con la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón.
<i>AR</i>	AR-V7 está relacionada con la resistencia a fármacos en cáncer de próstata.
<i>BIRC5</i>	BIRC-2B está asociada con la resistencia farmacológica en cáncer de ovario.
<i>CASP3</i>	Asociada con la sensibilidad a neoadyuvantes quimioterapéuticos en cáncer de mama.
<i>CD44</i>	Diversas variantes funcionan como marcadores moleculares y blancos terapéuticos en distintos tipos de cáncer.
<i>CDH17</i>	Asociada con la supervivencia de pacientes con hepatocarcinoma celular.
<i>CEACAM1/7</i>	Asociada con la supervivencia de pacientes con melanoma avanzado.
<i>CPE</i>	Asociada con la metástasis en distintos tipos de cáncer.
<i>CXCL12</i>	Vinculada con la supervivencia de pacientes con cáncer de mama.
<i>EGFR</i>	EGFRvIII está relacionada con la resistencia a radiación en glioblastomas y resistencia a inhibidores de cinasas de tirosina en cáncer de pulmón.
<i>FAS</i>	Relacionada con la supervivencia de pacientes con malignidades ginecológicas.
<i>FPGS</i>	Resistencia a folato en leucemias.
<i>IKZF1</i>	Resistencia a inhibidores de cinasas de tirosina en LLA.
<i>KLF6</i>	Asociado con la supervivencia de pacientes con cáncer de páncreas.
<i>MDM2</i>	Relacionada con la supervivencia en pacientes con cáncer de mama y osteosarcomas.
<i>MET</i>	Confiere sensibilidad a inhibidores de TEM en múltiples tipos de tumores.
<i>VEGFA</i>	VEGFA-165 está asociada con la mejora de pacientes con cáncer colon-rectal metastásico tratados con bevacizumab.
<i>WFDC2</i>	Asociada con la supervivencia de pacientes con cáncer endometrial.

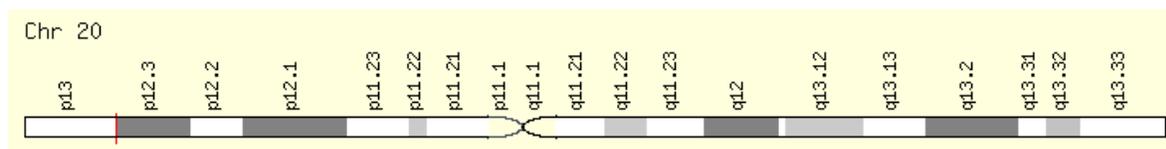
La desregulación del SA en cáncer afecta a muchos genes involucrados en la proliferación celular, entre ellos *PCNA* (Ladomery, 2013; Oltean & Bates, 2013; Sveen et al., 2015). Dicho gen cuenta con dos variantes alternativas de mRNA (*PCNA-1* y *PCNA-2*) que traducen la misma proteína (Stoimenov & Helleday, 2009; Park et al., 2016; NCBI, 2017). Diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de *PCNA* está relacionada con la proliferación celular y agresividad en cáncer de mama, colon, próstata, hepatocarcinoma, melanoma, linfomas y leucemias. Por esta razón, se ha propuesto a *PCNA* como un marcador molecular pronóstico y diagnóstico de algunos tipos de cáncer. Incluso la modulación por fármacos, que alteran las interacciones de *PCNA* con varias proteínas, se ha considerado como una estrategia viable contra el cáncer (Stoimenov and Helleday, 2009; Wang, 2014; Mathews, 2015).

### 3.5. Antígeno nuclear de proliferación celular

En 1978 Miyachi y colaboradores reportaron la presencia de “antígenos” involucrados en el ciclo celular de células HEP-2, derivadas de carcinoma de laringe. Estos “antígenos” fueron identificados en pacientes japonesas con lupus eritematoso sistémico, denominándolos “Ne”. Después, se demostró que este antígeno estaba altamente expresado en linfocitos en proliferación, por esta razón se nombró “antígeno nuclear blastogénico”. Estudios posteriores mostraron que este “antígeno” estaba altamente expresado en el núcleo de una gran variedad de líneas celulares y tejidos, así se denominó PCNA. Posteriormente, basados en estudios bioquímicos del ciclo celular, se le nombró PCNA/ciclina. En 1987 Bravo y colaboradores identificaron a PCNA como un factor de procesividad de la DNA polimerasa  $\delta$ , denominándolo PFDP $\delta$ , el cual forma parte de un complejo multiproteico con forma de anillo, implicado en la replicación y reparación del DNA. No obstante, el nombre de PCNA persiste hasta la fecha (Mahler et al., 2012).

#### 3.5.1. Estructura genómica

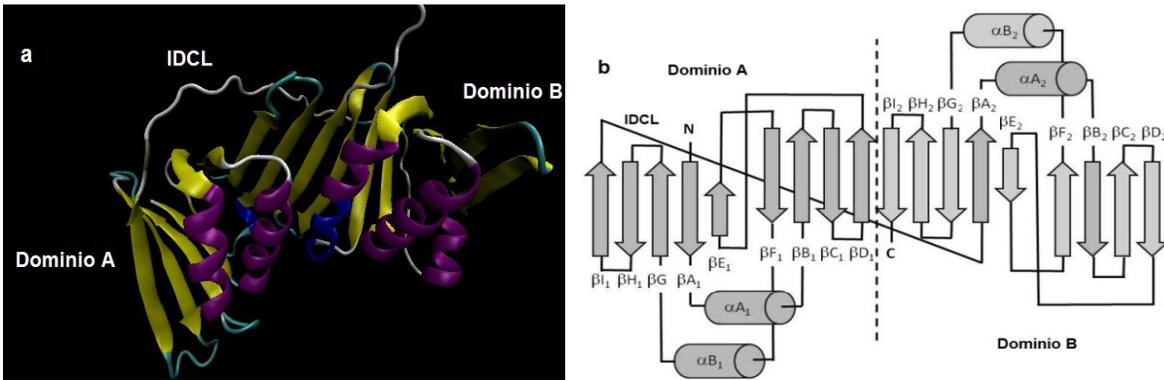
En seres humanos, el gen *PCNA* se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 20 en la región p12.3 de la cadena antisentido (Figura 8), tiene una extensión de 11,673 pb y cuenta con 7 exones (GeneCards, 2017; UCSC Genome Browser, 2017). La expresión de *PCNA* está regulada, principalmente, por los factores de transcripción E2F, CREB, p300 y CREBBP (Mahler et al., 2012; Witko-Sarsat & Ohayon, 2016).



**Figura 8. Localización del gen *PCNA*.** *PCNA* se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 20 en la región p12.3 y cuenta con una extensión de 11,673 pb (GeneCards, 2017).

### 3.5.2. Estructura proteica

En seres humanos, PCNA monomérica tiene una extensión de 261 aminoácidos y un peso molecular de 29.26 kDa (NCBI, 2017; UniProt, 2017). Esta proteína consta de dos dominios globulares estructuralmente similares: dominio A o N-terminal (residuos 1-117) y dominio B o C-terminal (residuos 135-261), unidos mediante un asa de conexión interdominio IDCL (residuos 118-134) (Kamada, 2012). De acuerdo con Bouayad et al. (2012), PCNA tiene dos secuencias de exporte nuclear (NES): ILKKVLEALKDLI en el dominio A (residuos 11-23) y LDVEQLGI en el asa IDCL (residuos 121-128). Topológicamente, los dominios A y B constan de 2 hélices- $\alpha$  y 9 láminas- $\beta$  cada uno, dando un total de 4 hélices- $\alpha$  y 18 láminas- $\beta$  por monómero (Figura 9).

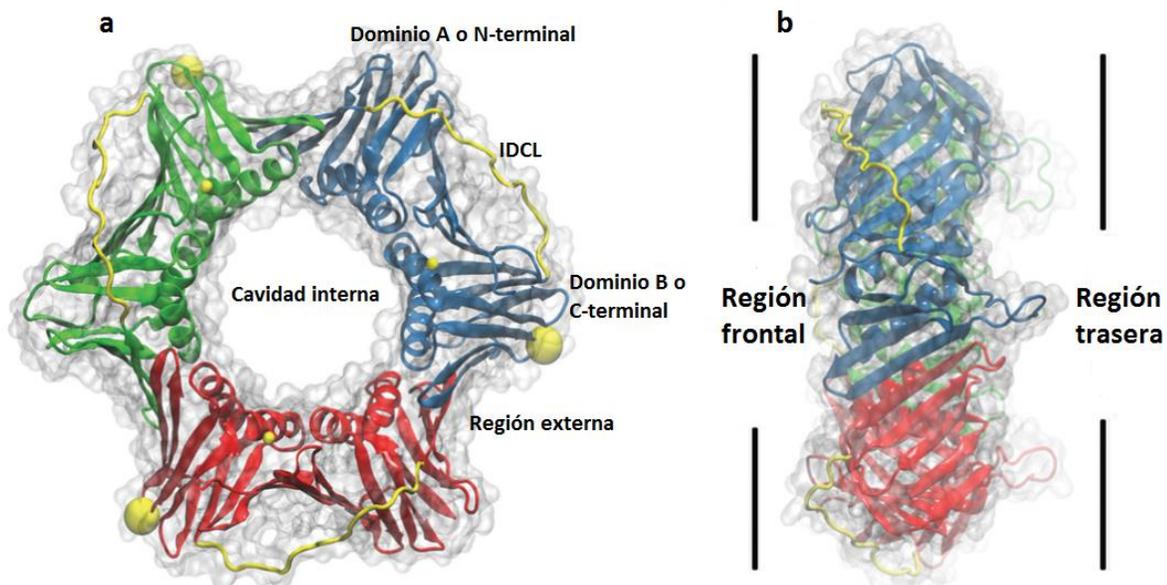


**Figura 9. Estructura monomérica de PCNA de humano.** a) PCNA monomérica tridimensional. b) Esquema topológico que muestra la estructura secundaria y terciaria (ID 1W60, Protein Data Bank, 2017).

PCNA pertenece a la familia de proteínas de abrazaderas deslizantes del DNA, un grupo de proteínas multiméricas (altamente conservado en arqueas, procariontes y eucariontes) con estructura de tipo anillo y simetría pseudo-hexagonal que encierran el dúplex de DNA para luego deslizarse a lo largo de éste (Strzalka & Ziemienowicz, 2011; MacNeill, 2016). En seres humanos, se requieren de tres monómeros de PCNA para formar una estructura cuaternaria homotrimérica. Éstos se ensamblan al interior del núcleo celular, alrededor del DNA, en forma de cabeza a cola (*head-to-tail manner*) mediante el dominio A de un monómero que interactúa con el dominio B de otro monómero adyacente. Esta unión entre monómeros de PCNA se estabiliza, inicialmente, a través de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y polares. Finalmente, dicha unión se completa por la formación de láminas- $\beta$  extendidas que están compuestas de las láminas  $\beta$  del dominio A de un monómero y las láminas  $\beta$  del dominio B del

monómero adyacente (Naryzhny, 2008; De Biasio & Blanco, 2013; Witko-Sarsat & Ohayon, 2016).

En su forma cuaternaria homotrimérica, se distinguen dos regiones de PCNA: una frontal y una trasera. La frontal está involucrada en las interacciones con distintas proteínas y la trasera está relacionada con las modificaciones postraduccionales (MPT) de PCNA (Figura 10) (Stoimenov & Helleday, 2009; Kamada, 2012).



**Figura 10. Estructura cuaternaria de PCNA homotrimérica.** a) Vista frontal de la estructura tridimensional de PCNA de humano; cada uno de los tres monómeros está en color verde, azul y rojo; el asa IDCL se muestra en color amarillo. b) Vista lateral de PCNA que muestra una región frontal lisa y una región trasera con protrusiones notorias (modificado de Stoimenov & Helleday, 2009).

La región externa del anillo tiene un diámetro de 80 Å. Presenta carga negativa y contiene 54 láminas-β y 3 IDCLs para las interacciones proteína-proteína. La cavidad interna tiene un diámetro de 35 Å y está formada por 12 hélices-α cargadas positivamente, debido a la presencia abundante de argininas y lisinas. Esta cavidad interactúa con las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA, facilitando el desplazamiento bidireccional de PCNA a lo largo del DNA (Stoimenov & Helleday, 2009; Park et al., 2016).

### 3.5.3. Interacciones de PCNA con proteínas

PCNA homotrimérica actúa como una plataforma de reclutamiento de distintas proteínas para regular diversos procesos celulares: replicación del DNA, recombinación, reparación de DNA dañado, ensamblaje y remodelación de la cromatina, cohesión de cromátidas hermanas, control del ciclo celular, apoptosis, proliferación celular, entre otros (Stoimenov & Helleday, 2009; Park *et al.*, 2016). Dado lo anterior, PCNA interactúa con muchas proteínas de manera espacio-temporal. Estas proteínas pueden presentar uno de los cuatro motivos de unión a PCNA, los cuales son: a) PIP box [Q-X-X-(I/L/M)-X-X-(F/Y)-(F/Y)], b) KA box [K-A-(A/L/I)-(A/L/I)-X-X-(L/V)], c) APIM [(K/R)-(F/Y/W)-(L/I/V/A)-(L/I/V/A)-(K/R)], y d) PIP degron [Q-X-X-(I/L/M)-X-T-D-X-(F/Y)-(F/Y)]. Estos motivos han sido identificados en más de 200 proteínas nucleares y citoplasmáticas (Tabla 3). Dichas proteínas interactúan con una región hidrofóbica de PCNA, cercana al asa IDCL (Stoimenov & Helleday, 2009; Naryzhny & Lee, 2010; Witko-Sarsat *et al.*, 2010; De Biasio & Blanco, 2013; Müller *et al.*, 2013; Cox, 2015; Yin *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016).

**Tabla 3.** Proteínas que interactúan con PCNA.

Funciones	Proteínas
<b>Nucleares</b>	
Replicación del DNA	Helicasas, ATPasas, DNA polimerasas (Pol $\delta$ , Pol $\epsilon$ , Pol $\beta$ , Pol $\gamma$ , Pol $\zeta$ , Pol $\kappa$ , Pol $\eta$ , Pol $\iota$ ), RFC (RFC140, RFC40, RFC38, RFC-36, RFC-37), endonucleasas Flap (FEN1, DNA ligasa 1, proteína de replicación Ap70), DNA topoisomerasas 1 y 2, p66, p12, DUP, RF-A, TNFAIP1-like protein, Lamina A/C, Lamina-B1, HmMCM10.
Reparación de DNA y evasión de DNA dañado	Proteínas reparadoras <i>mismatch</i> (MSH2, MSH3, MSH6, Mlh1), EXO1, PARP-1, UDG2, MPG, NTHL1, hMYH, APE1, APE2, XRCC1, XRCC6, XPG, PARP- 1, WRN, BLM, RECQ5, BLM, RECQ5; SHPRH, HLTF, RNF8, REV1, RAD5, RAD18, RAD51B, FANCC, ADPG, DNPk1, helicasa SRS2, DNPk1, GADD45 $\alpha$ , GADD45 $\beta$ , GADD45 $\gamma$ , DNA nucleotidil-exotransferasa, hMYH.
Ubiquitinación y sumoilación	Rad18, Rad15, Ubc9, RNF7, UHFR1.
Transcripción	RPC1, subunidad p65 de NF $\kappa$ B, CBF-A, proteína de interacción a TBP, NDHII, NMT55, DDX17, p14.
Supervivencia y control del ciclo celular	p21 (CIP1/WAF1), p27, p57, ciclina A1, ciclina A2, ciclina B1, ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3 CDC25C, MCL1, P15, ING1b, CDK1, CDK2, CDC6, CDK5 Gadd45, MyD118, CR6, p33, p53,

	p57, MDM2, EGFR, hRAD9, RAD1, RAD17, hHUS1, hREV7, PP-1G.
Ensamblaje de la cromatina, modificación de histonas y cohesión de cromátidas hermanas	Chaperonas de histonas (CAF1), acetiltransferasas de histonas (p300), desacetiltransferasas (HDAC1), DNMT1, p18, p160, factores de remodelación de la cromatina (WSTF), TRF2, ESCO1, ESCO2, EFO1, ECO1, Chl1, DCC1, hWALP2, CTF8, CTF18/CHL12, SETD8, PTMA, PIF1.
<b>Citoplasmáticas</b>	
Apoptosis	Procaspasas 3, 8 y 9, Mcl-1, DDX42, Gadd45, p53, ING1b, caspasa 9.
Glucólisis	FBA A, TI, G-3-PD.
MAP cinasas	Vía ERK (MST4, ERK2), FAK1, GSK3 $\beta$ , STK10, PAK1, NF- $\kappa$ B, NEMO, reguladores ras (NF1).
Tráfico vesicular	EXOC2, EXOC8, MICAL3, SCAMP1, TSG101, p200 RhoGAP.
Regulación de citocinas	EMAP-II, caspasa-1.
<b>Otras</b>	Membrana (anexina A2, EPB4.1), traducción de proteínas (eEF1A-1, rRNA metiltransferasa, eIF1b), respuesta inmune (IKK-E, antígenos B8 y Cw4 del MHC clase I), proteólisis (CUL2, TRAF6), glucólisis (GADPH), cáncer (MCC), transporte de iones (Treacle, HBK5), otros (CSK22, KCID, SHMT, CBS, RHA).

### 3.5.4. Funciones

#### 3.5.4.1. Replicación del DNA

Una de las funciones mejor estudiadas de PCNA es su papel durante la replicación del DNA (Figura 11a). En mamíferos la replicación inicia con la fosforilación del complejo proteico que se encarga de reconocer y procesar los sitios de inicio de la replicación del DNA. Luego, la primasa o polimerasa  $\alpha$  sintetiza un oligonucleótido de 20 pares de bases en los sitios de inicio de la replicación. Una vez completada la síntesis, se requiere de la actividad de las polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  (Stoimenov & Helleday, 2009).

El anillo de PCNA permanece como un homotrímero en solución, al interior del núcleo celular, que no puede encerrar al DNA por sí mismo. En eucariontes, PCNA es ensamblada alrededor del DNA por el complejo proteico RFC. Esto se logra por el rompimiento temporal de las interacciones entre los monómeros que conforman el anillo de PCNA. Luego, estos

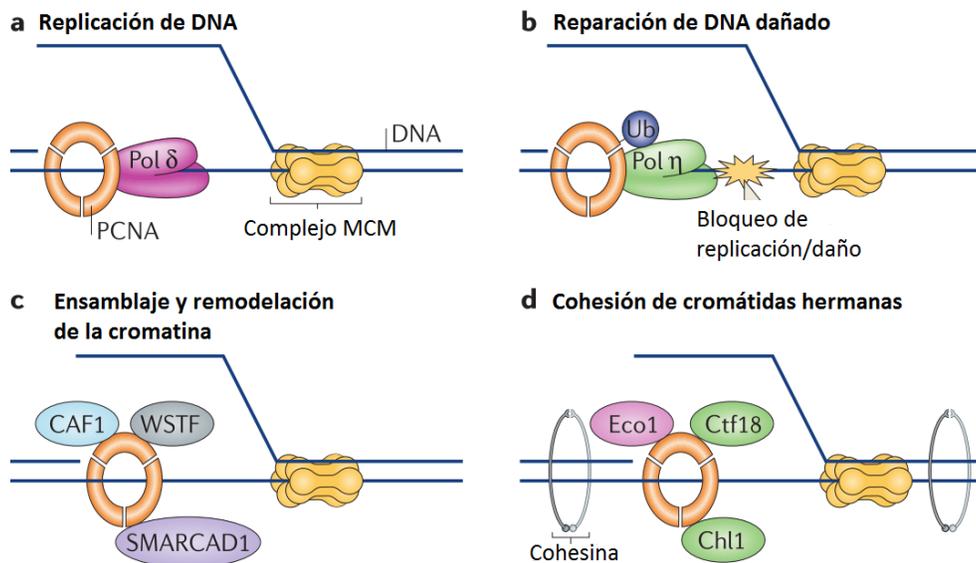
monómeros son re-ensamblados a su estructura homotrimérica alrededor del DNA. Las tres subunidades de RFC (hRFC140, hRFC36 y hRFC40) interactúan con la región frontal de PCNA. Así, el complejo PCNA/RFC es reclutado al DNA, en los oligonucleótidos sintetizados por la polimerasa  $\alpha$ . De esta manera, PCNA/RFC desplaza a la polimerasa  $\alpha$  de las hebras adelantada y rezagada. A pesar de esto, la región frontal de PCNA permanece ocupada por RFC. Un cambio conformacional en RFC, mediado por la hidrólisis de ATP, facilita la separación de RFC de PCNA. Así, PCNA queda libre, reclutando a la polimerasa  $\epsilon$  en la hebra adelantada y a la polimerasa  $\delta$  en la hebra rezagada. Eventualmente, FEN1 y LIG1 son reclutadas a la hebra rezagada para el procesamiento y maduración de los fragmentos de Okazaki. Los problemas topológicos acumulados (concatenación y super-enrollamiento), durante la replicación del DNA, son resueltos por la acción de las topoisomerasas I y II, las cuales tienen la capacidad de unión a PCNA (Mailand et al., 2013; Park et al., 2016).

#### **3.5.4.2. Reparación de DNA dañado**

Actualmente se conocen tres vías de reparación de DNA dañado en mamíferos: reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación por escisión de bases (BER) y reparación por desapareamiento (MMR). El DNA puede ser dañado por agentes químicos y radiación UV, resultando en lesiones voluminosas que serán reparadas por la vía NER. Durante este proceso, PCNA interacciona con la endonucleasa XPG, la cual facilita la re-síntesis de un nuevo fragmento de DNA. Se ha demostrado que PCNA es ensamblado en los sitios de mayor actividad de corte por XPG en el extremo 3' de la hebra de DNA, sitios que denotan eventos de reparación. La vía BER sustituye nucleótidos que presentan bases nitrogenadas con alteraciones químicas en el DNA, formando estructuras parecidas a un parche. En este caso, PCNA participa en la reparación de segmentos largos de DNA, mediante la interacción con las polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$ . Además, se ha demostrado que varias proteínas de la vía de BER (APE-1, APE-2, UNG2, MPG y XRCC1) se unen a PCNA durante la reparación (Figura 11b) (Gary et al., 1997; Naryzhny, 2008).

Por otra parte, la vía de MMR está relacionada con la incorporación inadecuada de bases, produciendo pequeñas inserciones/deleciones y errores en la función de las polimerasas durante los procesos de recombinación y replicación de DNA. Aquí, PCNA sólo es ensamblado hacia el extremo terminal 3' de la cadena hija de DNA e interactúa con Msh3, Msh6, Mlh1 y EXO1. Luego, las exonucleasas escinden los nucleótidos que fueron incorrectamente

incorporados en la hebra en síntesis con dirección 5' a 3' (Stoimenov & Helleday, 2009). La monoubiquitinación de PCNA activa la vía de reparación de DNA *error-prone* a través de la síntesis de translesión (TLS). Por otra parte, la poliubiquitinación de PCNA es necesaria para la activación de la vía de reparación *error-free*. Las polimerasas de TLS ( $\zeta$ ,  $\kappa$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ) sólo interaccionan con PCNA ubiquitinado. Además, estas enzimas pueden ser monoubiquitinadas para prevenir su interacción con PCNA, dando lugar a un mecanismo de regulación en el que las polimerasas de TLS sólo puedan unirse a PCNA cuando se requiera reparar DNA dañado (Naryzhny, 2008).



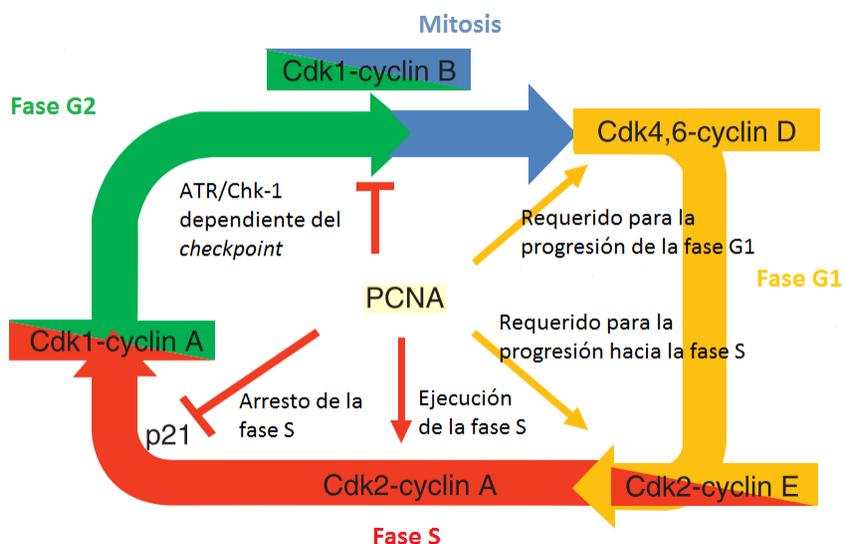
**Figura 11. PCNA regula diversos procesos celulares relacionados con el DNA.** a) Replicación de DNA. b) Reparación de DNA dañado. c) Ensamblaje y remodelación de la cromatina. d) Cohesión de cromátidas hermanas (modificado de Mailand et al., 2013). Ub, ubiquitinación.

### 3.5.4.3. Supervivencia y control del ciclo celular

La expresión de PCNA oscila durante el ciclo celular y esto se relaciona con su participación en el control del ciclo celular (Figura 12). Estas funciones están mediadas por la interacción de PCNA con ciclinas y CDKs. Dichas interacciones podrían ser independientes de la maquinaria de replicación (produciendo un complejo cuaternario de PCNA-CDK-p21-ciclina D) o estar localmente acopladas al replisoma (como es el caso de la CDK2-ciclina A, específico de la fase S del ciclo celular). PCNA actúa como un conector entre CDK2 y sus sustratos para favorecer su fosforilación. Adicionalmente, se ha demostrado que PCNA interactúa con el inhibidor p21/waf, resultando en la inhibición de la replicación del DNA (Xiong et al., 1992;

Koundrioukoff et al., 2000). También se ha señalado que la interacción de PCNA con la ciclina D1 regula de forma negativa el ciclo celular. La ciclina D1 se localiza normalmente en el núcleo, pero desaparece durante la fase S. Se ha demostrado que la unión de la ciclina D1 a PCNA, previene la unión de PCNA al complejo de replicación. Otro mecanismo que explica la regulación del ciclo celular, a nivel transcripcional, es a través de la unión de PCNA con p53 y Mdm2 (Naryzhny, 2008).

Otro proceso vinculado al control del ciclo celular es la apoptosis. Se ha confirmado que PCNA puede inducir la apoptosis mediante la estimulación de algunas proteínas que inhiben el crecimiento como ING1b o por la inhibición de proteínas anti-apoptóticas como GADD45, CR6 y MyD118 (De Biasio & Blanco, 2013; Witko-Sarsat & Ohayon, 2016).



**Figura 12. PCNA en el control del ciclo celular.** Modelo de las interacciones de PCNA con proteínas que regulan el ciclo celular (modificado de Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

### 3.5.5. Modificaciones postraduccionales

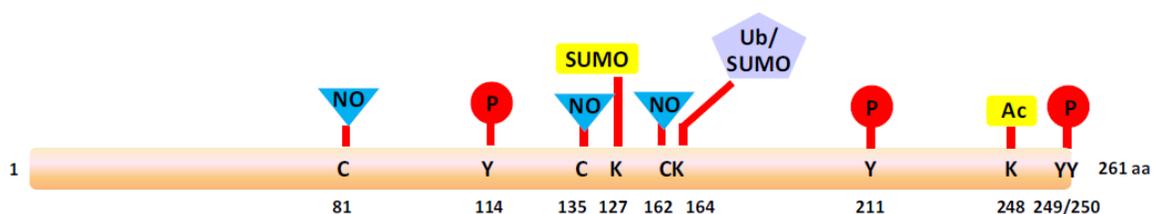
Las MPTs regulan la actividad proteómica de forma compleja y jerárquica, siendo cruciales para la función de células eucariontes. Las funciones de PCNA están reguladas por varios tipos de MPTs: ubiquitinación, sumoilación, acetilación, S-nitrosilación, fosforilación y metilación (Figura 13).

Una de las MPTs mejor estudiadas de PCNA es la ubiquitinación. En mamíferos, la ubiquitinación se lleva a cabo en la lisina 164 y se divide en: monoubiquitinación y poliubiquitinación. La monoubiquitinación resulta en la activación de la vía de reparación *error-*

*prone* de DNA dañado al favorecer el cambio de proteínas de interacción a PCNA, ocurriendo el cambio de las DNA polimerasas clásicas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ) por DNA polimerasas de TLS ( $\zeta$ ,  $\kappa$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ). Cuando las lisinas 127 y 164 se monoubiquitinan simultáneamente, se favorece la recombinación homóloga. Por otra parte, la poliubiquitinación, resulta en la activación de la vía de reparación de DNA *error-free* (Stoimenov & Helleday, 2009; Strzalka & Ziemienowicz, 2011; Wang, 2014).

Otra MPT de PCNA es la sumoilación de la lisina 127. Se ha sugerido que esta MPT podría actuar como un “*switch* de reinicio” para favorecer la separación de las proteínas que están unidas a PCNA. Por otra parte, la acetilación de PCNA en la lisina 248 ha sido descrita por participar en la replicación del DNA. Actualmente, se reconocen formas acetiladas e hiperacetiladas de PCNA en la cromatina y la localización de formas no acetiladas en el nucleoplasma, sugiriendo que la translocación dinámica de PCNA es dependiente del estado de acetilación (Ulrich, 2009; Mailand et al., 2013).

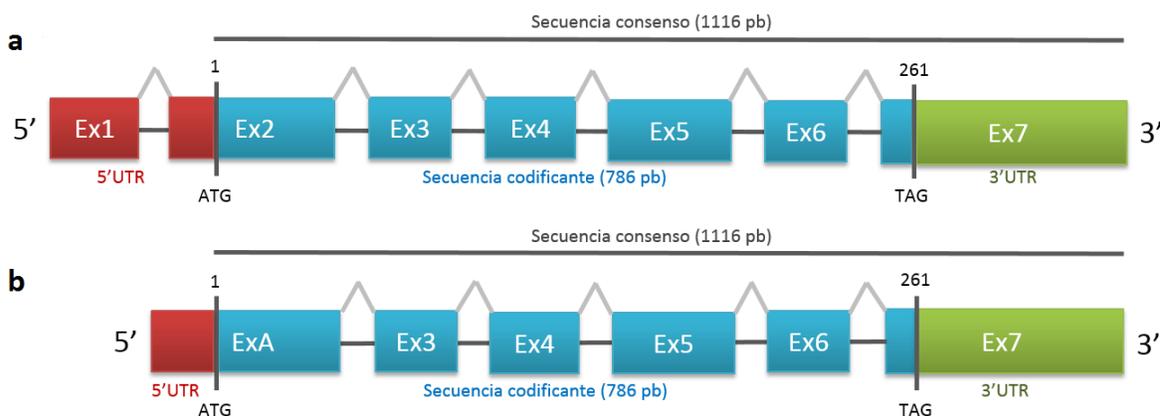
Además, la fosforilación de las tirosinas 114, 211, 249 y 250 está involucrada en la protección de PCNA contra la degradación vía proteosoma (Ulrich & Takahashi, 2013). Por otra parte, la S-nitrosilación de la cisteína 81 de PCNA citoplasmática afecta la interacción entre PCNA y la caspasa 9, potenciando la apoptosis en células SH-SY5Y (Komatsubara et al., 2012). Finalmente, la metil-esterificación de ácidos aspárticos y ácidos glutámicos de PCNA parece estar asociada sólo a cáncer de mama, próstata y adenocarcinoma esofágico (Park et al., 2016; Witko-Sarsat & Ohayon, 2016).



**Figura 13. Modificaciones postraduccionales de PCNA.** La monoubiquitinación, poliubiquitinación y sumoilación se producen en las lisinas 127 y 164; la acetilación se lleva a cabo en la lisina 248; la fosforilación en las tirosinas 114, 211, 249 y 250; y la S-nitrosilación ocurre en las cisteínas 81, 135 y 162. Ac, acetilación; NO, S-nitrosilación; P, fosforilación; SUMO, sumoilación; Ub, ubiquitinación; C, cisteína; K, lisina; Y, tirosina (modificado de Wang, 2014).

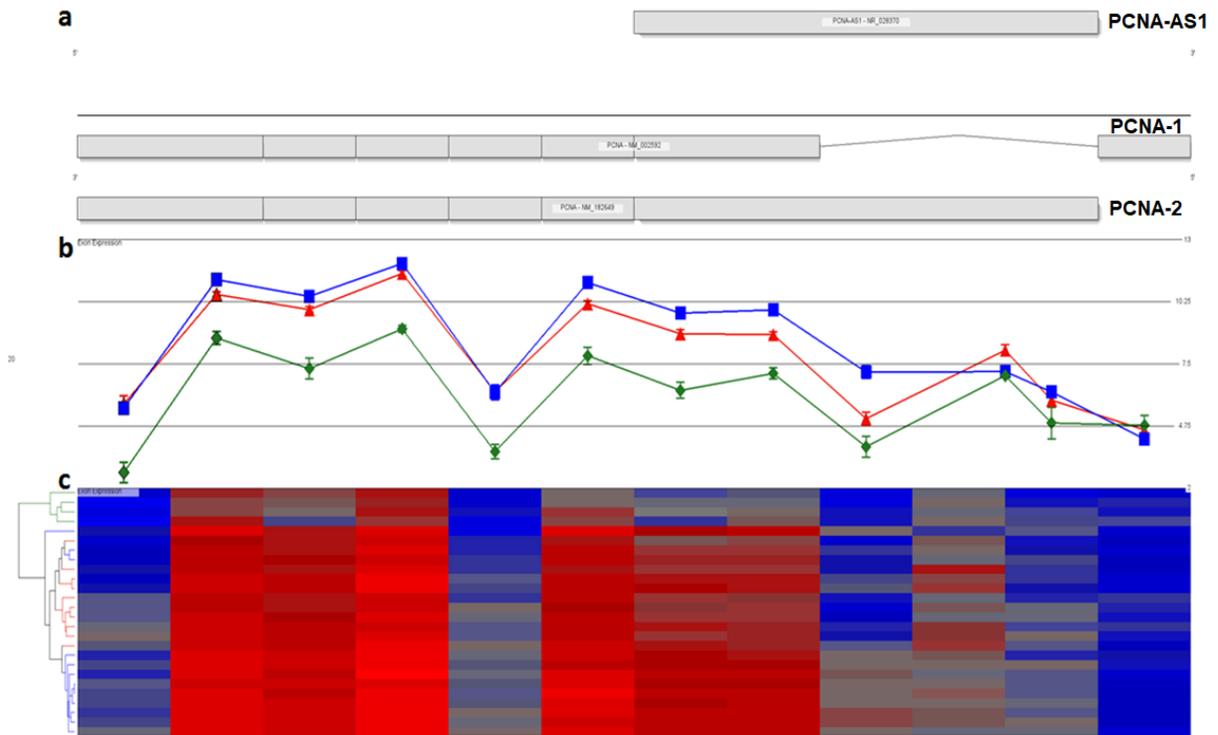
### 3.5.6. *Splicing* alternativo en *PCNA*

De acuerdo con el NCBI, en seres humanos solamente se han reportado dos variantes alternativas de mRNA del gen *PCNA*, las cuales son: *PCNA*-1 (NM\_002592.2) que tiene una extensión de 1355 pb y está compuesta de 7 exones, de los cuales 6 contienen la secuencia codificante. La traducción inicia en la adenina 240 del exón 2 y termina en la guanina 1025 del exón 7 (Figura 14a). *PCNA*-2 (NM\_182649.1) que cuenta con una longitud de 1319 pb y está conformada de 6 exones que contienen la secuencia codificante. La traducción inicia en la adenina 204 del primer exón y termina en la guanina 989 del exón 7 (Figura 14b). Ambos transcritos traducen la misma proteína, responsable de las funciones anteriormente mencionadas (NCBI, 2017).

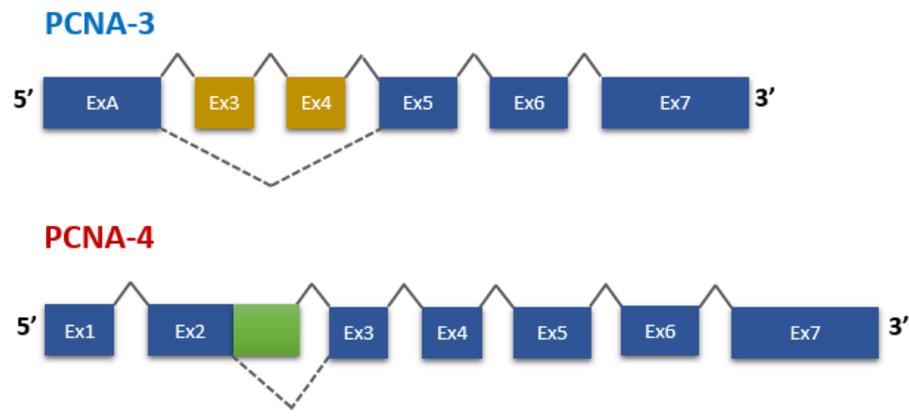


**Figura 14. Variantes alternativas de mRNA de *PCNA* reportadas en el NCBI.** a) *PCNA*-1 (NM\_002592.2) y b) *PCNA*-2 (NM\_182649.1) comparten una secuencia consenso de 1116 pb (línea negra). Las regiones 5' UTR y 3' UTR se muestran en color rojo y verde, respectivamente.

Análisis previos en nuestro grupo de investigación, utilizando microarreglos de alta densidad, revelaron variaciones en la expresión de exones en *PCNA*, sugiriendo la presencia de potenciales transcritos alternativos en muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B, líneas celulares derivadas de leucemia y en linfocitos de sangre periférica de individuos sanos (Figura 15). Los resultados obtenidos fueron validados mediante RT-PCR punto final y secuenciación Sanger. De esta forma, fue evidenciada la expresión de dos nuevos transcritos alternativos de *PCNA*, denominados como: *PCNA*-3 (con la omisión de los exones 3 y 4) y *PCNA*-4 (con un sitio de *splicing* alternativo 5' en el exón 2) (Figura 16) (Fonseca, 2015). Sin embargo, se desconoce la secuencia completa y la función de dichos transcritos.



**Figura 15. Expresión diferencial de exones en PCNA.** a) Variantes alternativas de mRNA reportadas de *PCNA* (PCNA-1, PCNA-2). PCNA-AS1 es un RNA largo no codificante presente en la cadena sentido, opuesta al gen *PCNA*. b) Gráfica de los niveles individuales de expresión exónica en LLA-B (rojo), líneas celulares derivadas de leucemia (LC, azul marino), y células B normales (CBN, verde); cada uno de los puntos representan marcadores que reconocen regiones individuales por exón de *PCNA*. c) Mapa de calor de cada pico que contiene las muestras individuales; azul denota baja expresión, gris indica expresión intermedia y rojo muestra alta expresión (Fonseca, 2015).



**Figura 16. Patrones de *splicing* alternativo de nuevas variantes de *PCNA*.** a) PCNA-3 presenta la omisión de los exones 3 y 4. b) PCNA-4 tiene un sitio de *splicing* alternativo 5' en el exón 2.

## 4. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el cáncer representa un gran problema de salud pública. De los todos los tipos de cáncer diagnosticados, la leucemia es predominante en la población pediátrica y constituye la segunda causa de muerte. En México, la LLA representa el 77% de todos los casos de leucemia pediátrica y su incidencia es mayor a la reportada en otras partes del mundo; siendo la LLA-B el tipo más frecuente. Diversos estudios han demostrado que la desregulación de mecanismos cotranscripcionales como el SA, promueve la expresión específica de variantes alternativas que contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer. Actualmente, varios transcritos y proteínas alternativas son utilizados como marcadores moleculares y blancos terapéuticos en diversos tipos de cáncer.

PCNA funciona como una plataforma de reclutamiento proteico que regula distintos procesos, por ejemplo: replicación del DNA, reparación de DNA dañado, proliferación y control del ciclo celular. *PCNA* cuenta con dos variantes alternativas de mRNA (*PCNA-1* y *PCNA-2*) que codifican para la misma proteína. La desregulación de *PCNA* se asocia con la proliferación celular y agresividad en cáncer de mama, colon, próstata, hepatocarcinoma, melanoma, linfomas y leucemias. Estudios previos en nuestro grupo de investigación, utilizando muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B, líneas celulares derivadas de leucemia y en linfocitos de sangre periférica de individuos sanos, revelaron la presencia de dos nuevos transcritos alternativos de *PCNA*: *PCNA-3* (con la omisión de los exones 3 y 4) y *PCNA-4* (con un sitio de *splicing* alternativo 5' en el exón 2). Sin embargo, se desconoce la secuencia completa y la función de dichos transcritos. Por ello, la caracterización estructural y funcional de las nuevas variantes alternativas de *PCNA* será importante para conocer su papel biológico en la célula.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Caracterizar las secuencias nucleotídicas y la función de los nuevos transcritos alternativos de *PCNA*.

### **5.2. Objetivos particulares**

1. Caracterizar las secuencias nucleotídicas de los transcritos *PCNA-3* y *PCNA-4*.
2. Cuantificar la expresión de los transcritos *PCNA-3* y *PCNA-4*, en comparación con *PCNA-2*, en líneas celulares de distintos tipos de cáncer y en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B.
3. Evaluar la función de *PCNA-3* y *PCNA-4*.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Cultivos celulares

Se cultivó la línea celular RS4 en medio RPMI-1640 (Gibco, USA) y la línea HEK-293 en medio DMEM (Gibco, USA). Los medios fueron suplementados con suero fetal bovino inactivado (SFB) al 10% y antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycin 10 µg/mL). Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> con humedad relativa del 85%.

### 6.2. Extracción de RNA total

Se utilizaron cultivos celulares de RS4 y HEK-293 con una confluencia al 70% para la extracción del RNA total. Los cultivos celulares se lavaron tres veces con PBS pH 7.4. Después, fueron homogeneizados por pipeteo en 1 mL de *TRIzol Reagent* (Invitrogen, USA) e incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Enseguida, se agregaron 200 µL de cloroformo por cada mL de *TRIzol Reagent* y se agitaron en vórtex por 15 segundos e incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos; las muestras fueron centrifugadas a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa resultante fue transferida a tubos eppendorf nuevos, se adicionaron 500 µL de isopropanol y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 g por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante resultante fue eliminado. El botón de RNA obtenido fue resuspendido en 1 mL de etanol frío al 75%, se agitó en vórtex por 15 segundos y se centrifugó a 7,500 g por 5 minutos a 4°C. Se retiró el etanol y se dejó secar el botón de RNA para finalmente resuspenderlo en 30 µL de agua libre de nucleasas. Las muestras fueron cuantificadas mediante espectrofotometría en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA). La concentración total fue determinada a 260 nm, mientras que la pureza se obtuvo a partir de los valores de los cocientes de  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ . La integridad del RNA total se obtuvo mediante el análisis de presencia de las subunidades ribosomales 28S y 18S, por electroforesis en gel de agarosa al 1% (g/v) con bromuro de etidio 0.005% (v/v).

### 6.3. Transcripción reversa (3' RACE)

Para la síntesis de los cDNAs se empleó el kit *3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen, USA), utilizando 5000 ng de RNA total por muestra. Luego, se les adicionó

1  $\mu\text{L}$  de *Adapter Primer* (10  $\mu\text{M}$ ), llevándolos a un volumen de reacción de 11  $\mu\text{L}$  en agua libre de nucleasas. Las reacciones se incubaron a 70°C por 10 minutos y luego en hielo por 1 minuto. Enseguida, se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de *PCR buffer* (10X), 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM) y 2  $\mu\text{L}$  de DTT (0.1 M); las reacciones se incubaron a 42°C por 5 minutos. Después, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de *SuperScript II RT* (Invitrogen, USA) y se incubó a 42°C por 50 minutos y luego a 70°C por 15 minutos. Posteriormente, se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de *RNase H* y se incubó a 37°C por 20 minutos. Finalmente, todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

#### **6.4. PCR punto final (3' RACE y 3' RACE anidado)**

Para la primera ronda de PCR punto final 3' RACE se utilizaron 25 ng de templado por muestra. Después, se agregaron 7.5  $\mu\text{L}$  de *KAPA2G Fast HotStar Ready Mix* (2X) (Kapa Biosystems, USA), 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido *forward 3' RACE* (5  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 4), 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido *reverse AUAP* (5  $\mu\text{M}$ ) (Invitrogen, USA) y se llevaron a un volumen de reacción final de 15  $\mu\text{L}$  en agua libre de nucleasas. El programa de amplificación consistió en: 95°C por 3 minutos y 35 ciclos a 95°C por 3 segundos, 60.5°C por 15 segundos y 72°C por 10 segundos; y una extensión final a 72°C por 15 minutos. Finalmente, se realizaron diluciones 1:100 en agua libre de nucleasas. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador *ProFlex PCR System* (Applied Biosystems, USA).

Luego se realizó la segunda ronda de PCR punto final (3' RACE anidado), para estas reacciones: se adicionaron 1  $\mu\text{L}$  de las diluciones 1:100, 7.5  $\mu\text{L}$  de *KAPA2G Fast HotStar Ready Mix* (2X) (Kapa Biosystems, USA), 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido *forward 3' RACE anidado* (5  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 4), 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido *reverse AUAP* (5  $\mu\text{M}$ ) (Invitrogen, USA), llevándolas a un volumen de reacción final de 15  $\mu\text{L}$  en agua libre de nucleasas. El programa de amplificación consistió en: 95°C por 3 minutos y 28 ciclos a 95°C por 3 segundos, 60°C por 15 segundos y 72°C por 10 segundos; y una extensión final a 72°C por 15 minutos. Los productos resultantes fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.1% (g/v) con bromuro de etidio 0.005% (v/v) a 85 volts por 90 minutos en solución TBE al 0.5%.

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos empleados para la PCR punto final 3' RACE y 3' RACE anidado.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm	Tamaño del amplicón
<b>PCNA-3 3' RACE</b>	<i>Forward:</i> 5'-AAC CTC ACC AGG AAC AGG AGT AC-3' <i>Reverse AUAP:</i> 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'	60.5°C	740 pb
<b>PCNA-3 3' RACE anidado</b>	<i>Forward:</i> 5'-GCT GTG TAG TAA AGA TGC CTT CTG G-3' <i>Reverse AUAP:</i> 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'	60°C	716 pb
<b>PCNA-4 3' RACE</b>	<i>Forward:</i> 5'-GCT CCA TCC TCA AGA AGT ATG TCC AA-3' <i>Reverse AUAP:</i> 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'	60.5°C	912 pb
<b>PCNA-4 3' RACE anidado</b>	<i>Forward:</i> 5'-ATA CTA AAA TGC GCC GGC AAT GAA-3' <i>Reverse AUAP:</i> 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'	60°C	885 pb

## 6.5. Purificación y secuenciación

Los productos de PCR punto final 3' RACE anidado fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, extraídos y purificados mediante el *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron cuantificados mediante espectrofotometría a 260 nm en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) y su pureza se obtuvo a partir de los valores de los cocientes de  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ .

Posteriormente, mediante el *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, USA) se realizó el marcaje para secuenciación Sanger de los productos purificados de PCR punto final 3' RACE anidado bajo las siguientes condiciones: 20 ng de templado, 3.5  $\mu$ L de *BigDye Terminator Sequencing Buffer* (5X), 0.5  $\mu$ L de oligonucleótido *forward 3' RACE* anidado o *reverse AUAP* (5  $\mu$ M) (Tabla 4), 0.5  $\mu$ L de enzima *BigDye Terminator* y agua libre de nucleasas para tener un volumen de reacción final de 10  $\mu$ L. Las reacciones se incubaron con el siguiente programa: 25 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos y 60°C por 4 minutos.

Los productos marcados fueron purificados con el kit *CENTRI-SEP Spin Columns* (Princeton Separations, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras fueron secuenciadas y los electroferogramas obtenidos fueron analizados con el programa *UGENE* v1.26.3. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el programa *Clustal Omega* de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para identificar la similitud e identidad entre las secuencias obtenidas y las secuencias esperadas.

## 6.6. Líneas celulares

Para la síntesis de los cDNAs y la determinación de la expresión relativa de los transcritos alternativos de *PCNA*, se utilizaron los RNAs de 26 líneas celulares disponibles en nuestro laboratorio (Tabla 5).

**Tabla 5.** Líneas celulares.

Línea celular	Tipo de cáncer u origen tisular
RS4	Leucemia linfoblástica aguda
Reh	Leucemia linfoblástica aguda
SUP-B15	Leucemia linfoblástica aguda de células B
Jurkat	Leucemia linfoblástica aguda de células T
K-562	Leucemia mieloblástica crónica
TOV-21G	Cáncer de ovario
TOV-112D	Cáncer de ovario
ES-2	Cáncer de ovario
SK-OV-3	Cáncer de ovario
CaLo	Cáncer cervical
VIPA	Cáncer cervical
INBL	Cáncer cervical
SiHa	Cáncer cervical
ROVA	Cáncer cervical
C-33A	Cáncer cervical
ViBo	Cáncer cervical
HeLa	Cáncer cervical
Ca Ski	Cáncer cervical
MS751	Cáncer cervical
MCF7	Adenocarcinoma de glándula mamaria
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de glándula mamaria

Daoy	Meduloblastoma cerebelar desmoplásico
HEp-2	Carcinoma epidermoide de laringe
SJCRH30	Rabdomiosarcoma
HTR-8/Svneo	Trofoblastos invasivos de placenta
HEK-293	Riñón embrionario

### 6.7. Muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B

Para el presente estudio se obtuvieron aspirados de médula ósea (AMO) de 34 pacientes de cualquier sexo, con edad de entre 1 a 15 años y con el diagnóstico de LLA-B. La extracción de los AMO requirió de cartas de consentimiento y asentimiento informado. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría. Posteriormente, se realizó la extracción de RNA total, siguiendo el protocolo antes mencionado.

### 6.8. Transcripción reversa

Para la síntesis de los cDNAs se utilizaron 5000 ng de RNA total por muestra. Después, se adicionó 1 µL de amortiguador para DNAsa (1X), 1 µL de DNAsa I (1 U/µl) y agua libre de nucleasas, llevándolos a un volumen de reacción final de 10 µL. Las reacciones se incubaron por 30 minutos a 37°C. Luego, se les agregó 1 µL de EDTA (25 mM) y se incubaron por 10 minutos a 65°C. Después, se añadieron 4 µL de *First Strand Buffer* (5X), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de *Random Primers* (50 ng/µL), 2 µL de DTT (0.1 M), 1 µL de inhibidor de RNAsa (40 U/µL) y 1 µL de enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (200 U/µL) (Invitrogen, USA). Por último, las reacciones fueron incubadas a 37°C por 5 minutos, 25°C por 10 minutos, 37°C por 60 minutos y 70°C por 10 minutos. Finalmente, todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### 6.9. PCR cuantitativa

Para las RT-PCRs cuantitativas (RT-qPCR) se utilizaron 10 ng de templado por muestra y se les adicionaron: 5 µL de *KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Universal* (2X) (Kapa Biosystems, USA), 0.2 µL de oligonucleótido *forward* (10 µM), 0.2 µL de oligonucleótido *reverse* (10 µM) (Tabla 6), 0.2 µL de *ROX High Reference Dye* (50X) (Kapa Biosystems, USA), llevándolas a un volumen de reacción final de 10 µL en agua libre de nucleasas. El programa de amplificación consistió en: 95°C por 3 minutos y 30 ciclos a 95°C por 3 segundos y 60°C

por 30 segundos. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador *StepOne Real-Time PCR System 48-well plate* (Applied Biosystems, USA).

Se realizaron curvas estándar, para todos los oligonucleótidos, de cinco puntos a una dilución 1:5, empleando 50 ng de templado de la línea celular RS4 para el punto de mayor concentración. *RPS18* fue empleado como gen normalizador. Sólo las curvas estándar con eficiencias de entre 90 a 110% y con una  $R^2 \geq 0.99$  fueron utilizadas para la validación (Anexo 1). Para estas validaciones se construyeron curvas de rango dinámico para los blancos específicos (PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4) y el gen normalizador (*RPS18*), obteniendo el valor de  $\Delta C_T$  para cada uno de los puntos. Finalmente, los valores de  $\Delta C_T$  resultantes fueron graficados contra el Log de la concentración de cada uno de los puntos de la curva estándar. Las líneas obtenidas de estas gráficas tuvieron pendientes de 0.1 a -0.1. Una vez validados los blancos específicos, la expresión de cada variante de *PCNA* fue determinada mediante cuantificación relativa (Pfaffl, 2006).

**Tabla 6.** Secuencias de oligonucleótidos empleados para RT-qPCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm	Tamaño del amplicón
<b>RPS18</b>	Forward: 5'-CAG CCA GGT CCT AGC CAA TG-3' Reverse: 5'-CCC TCT ATG GGC CCG AAT CT-3'	60°C	82 pb
<b>PCNA-2</b>	Forward: 5'-CAT TAA ACG GTT GCA GGC GTA GC-3' Reverse: 5'-CAA CAA CGC CGC TAC AGG CA-3'	60°C	148 pb
<b>PCNA-3</b>	Forward: 5'-GGG ATA TTA GCT CCA GCG GTG T-3' Reverse: 5'-GTA CTC CTG TTC CTG GTG AGG TT-3'	60°C	151 pb
<b>PCNA-4</b>	Forward: 5'-TAG ACT TTC CTC CTT CCC GCC TG-3' Reverse: 5'-TTG GAC ATA CTT CTT GAG GAT GGA GC-3'	60°C	105 pb

## 6.10. Estimulación mitogénica de linfocitos de sangre periférica

Para este ensayo se realizó la extracción de 12 mL de sangre periférica, en tubos BD Vacutainer con heparina (Becton Dickinson, USA), de cuatro individuos con edades de 24 a 36 años, catalogados como clínicamente sanos. Después, se realizó la separación de los linfocitos de sangre periférica mediante el gradiente de densidad *Ficoll-Hypaque*. Por cada 3 mL de sangre periférica se adicionaron 2 mL de PSB pH 7.4 y se resuspendieron suavemente. Luego, se adicionaron 3 mL de *Lymphoprep* (StemCell Technologies, USA), centrifugándolos a 1500 rpm por 30 minutos a 20°C. Además, se realizó la extracción de la fase blanca que contiene los linfocitos. Éstos se lavaron en 6 mL de PSB pH 7.4 y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos a 20°C. Se realizó el conteo celular por cámara de Neubauer y se resuspendieron los linfocitos, a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL, en medio RPMI-1640 sin antibióticos (Gibco, USA) suplementado al 10% con SFB.

Posteriormente, la suspensión celular de cada individuo fue separada, en placas de cultivo de 48 pozos, en dos porciones iguales: una para la condición sin estímulo y la otra para la estimulación mitogénica con ionomicina (Sigma-Aldrich, USA) y PMA (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración final de 1 µg/mL y 10 ng/mL, respectivamente. Las células fueron incubadas a 37°C por 4 horas en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> con humedad relativa del 85%. Al finalizar el periodo de incubación, se realizó la extracción del RNA total y la síntesis de cDNA mediante los métodos previamente mencionados.

## 6.11. Análisis bioinformático

La identificación de los marcos de lectura, los productos proteicos y los valores de confiabilidad de traducción de cada transcrito alternativo de *PCNA*, de los RNAs codificantes y de los RNAs no codificantes fueron analizados en el programa *ATGpr* del *Helix Reseach Institute* (<http://atgpr.dbcls.jp/>). Las secuencias nucleotídicas de las variantes de RNAs no codificantes (BACE1-AS, PCGEM1, HOTTIP, GAS5, MALAT1, PANDAR, AIRN, ANRIL, MEG3, HULC, XIST, HOTAIR, SRA1 y TUG1) y RNAs codificantes (PARP1, CTCF, CASP9, RPL4, α-Tubulina, RPS18, TERT, HIF3α, PCNA-1, PCNA-2, GAPDH, AGO2, TGFβ1 y β-Actina) fueron obtenidas de la base de datos *Nucleotide* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>).

La predicción *in silico* de la estructura terciaria de PCNA-3 fue realizada en el programa *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelly et al., 2015) y el archivo resultante fue visualizado en el programa *Visual Molecular Dynamics* v1.9.2. Los sitios de MPTs de PCNA-3 fueron determinados en el programa *CBS Prediction Servers* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>).

## 6.12. Constructo PCNA-3/DDK

El marco de lectura de la variante PCNA-3 fue sintetizado, eligiendo como sitios de restricción *AsiSI* en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3', en el vector *pIDT Blue* con resistencia a ampicilina (Integrated DNA Technologies, USA). Luego, se realizó una PCR punto final con las siguientes condiciones: 10 ng del vector *pIDT Blue/PCNA-3* como templado, 7.5  $\mu$ L de *KAPA2G Fast HotStar Ready Mix (2X)* (Kapa Biosystems, USA), 1  $\mu$ L de oligonucleótido *forward* (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de oligonucleótido *reverse* (10  $\mu$ M) (Tabla 7), llevándolos a un volumen de reacción final de 15  $\mu$ L en agua libre de nucleasas. El programa de amplificación consistió en: 95°C por 3 minutos y 35 ciclos a 95°C por 3 segundos, 69.5°C por 15 segundos y 72°C por 10 segundos; y una extensión final a 72°C por 15 minutos.

Después, se corroboró el tamaño del producto de PCR resultante por electroforesis en un gel de agarosa al 1.1% (g/v) con bromuro de etidio 0.005% (v/v). La banda de interés resultante fue extraída y purificada del gel mediante el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA).

Posteriormente, se realizó una digestión enzimática doble del producto de PCR purificado y del vector de expresión con resistencia a ampicilina *pCMV6-AC-IRES-GFP-Puro* (#Cat. PS100059 Origene, USA) de forma independiente. Para estas reacciones se utilizaron 1000 ng de templado, 3  $\mu$ L de *Tango Buffer* (10X), 1  $\mu$ L de enzima *AsiSI* (10 U/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de enzima *XhoI* (10 U/ $\mu$ L) (Thermo Scientific, USA), llevándolos a un volumen de reacción final de 30  $\mu$ L en agua libre de nucleasas. Estas reacciones fueron incubadas a 37°C por 60 minutos. Finalmente, los productos resultantes fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.1% (g/v) con bromuro de etidio 0.005% (v/v). Las bandas de interés resultantes fueron extraídas y purificadas del gel mediante el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la reacción de ligación del fragmento de PCR de PCNA-3, en el vector de expresión, se adicionaron: 2  $\mu$ L de *Ligase Reaction Buffer* (5X), 20 ng del producto de PCR digerido, 30 ng del vector de expresión digerido, 0.5  $\mu$ L de *T4 DNA Ligase* (5 U/ $\mu$ L) (Invitrogen, USA) y se llevaron a un volumen de reacción final de 10  $\mu$ L en agua libre de nucleasas. La reacción fue incubada a 23°C por 60 minutos. Al finalizar, se transformaron por choque térmico 50  $\mu$ L de bacterias calcio-competentes *E. coli* TOP10 con 2.5  $\mu$ L de la reacción de ligación. Después, la reacción de transformación fue cultivada en placas LB-agar suplementadas a 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. Las placas fueron incubadas a 37°C por 14 horas.

Se seleccionaron y aislaron 6 colonias bacterianas para crecerlas de manera independiente en 3 mL de medio LB líquido suplementado a 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. Estos cultivos fueron incubados a 37°C por 12 horas. Al finalizar, se realizó la extracción de plásmidos mediante el *QIAprep Miniprep Kit* (Qiagen, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La presencia del inserto (PCNA-3), en el vector de expresión, fue corroborada mediante una reacción de digestión enzimática doble (con *AsiSI* y *XhoI*) y secuenciación Sanger (Anexo 2) (Tabla 7), siguiendo los protocolos anteriormente señalados. Una vez identificada la colonia bacteriana con el vector de interés (PCNA-3/DDK), se realizó la amplificación y extracción del vector mediante el *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, el vector PCNA-3/DDK fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA); su pureza se obtuvo a partir de los valores de los cocientes de  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ .

**Tabla 7.** Oligonucleótidos empleados para la obtención y secuenciación del constructo PCNA-3/DDK.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm	Tamaño del amplicón
<b><i>p</i>IDT Blue/PCNA-3</b>	<i>Forward:</i> 5'-ATT GCG ATC GCC ATG TTC GAG GCG C -3' <i>Reverse:</i> 5'-CAC GGG TCG CAG CAC AGC TCG C-3'	69°C	262 pb
<b>Secuenciación del constructo PCNA-3/DDK</b>	<i>Forward CMV:</i> 5'-ACG GGA CTT TCC AAA ATG TCG TAA T-3' <i>Reverse IRES:</i> 5'- GAG GGA GAG GGG CGG AA -3'	-----	-----

### 6.13. Transfección transitoria en células HEK-293

Se sembraron células HEK-293 en cajas de cultivo de 6 pozos (Costar, USA) a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células por pozo. La transfección se realizó con el kit *Lipofectamine 3000 Reagent* (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, y empleando 2500 ng de vector de expresión (vacío tGFP o PCNA-3/DDK). Las células fueron incubadas en medio Opti-Mem (Gibco, USA) a 37°C por 12 horas en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> con humedad relativa del 85%. Al finalizar, a cada pozo se le reemplazó el medio anterior por medio DMEM (Gibco, USA) suplementado al 10% con SFB y con antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL). Las células continuaron con una incubación a 37°C por 36 horas en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> con humedad relativa del 85%.

Una vez transcurridas las 48 horas, la transfección fue evaluada mediante epifluorescencia en un microscopio *Zeiss Axiovert 200* (Zeiss, Alemania) con el objetivo 10X. La eficiencia de la transfección transitoria fue determinada mediante citometría de flujo (Anexo 3) en el equipo *BD FACScan System 82919* (BD Biosciences, USA). Para cada condición experimental se evaluaron 10,000 eventos por triplicado. Los datos de citometría fueron analizados en el programa *BD CellQuest* (BD Biosciences, USA).

### 6.14. Extracción de proteína total y *western blot*

Para la extracción de proteína total se utilizaron cultivos celulares con una confluencia al 70% en cajas Petri de 60 x 15 mm<sup>2</sup> (Corning, USA). Los cultivos se lavaron dos veces con 4 mL de PBS pH 7.4 y se añadieron 200 µL de amortiguador de lisis (0.5 mL de PBS, 0.5 mL de RIPA, 40 µL de *Complete* 25X, 10 µL de PMSF 100 mM, 10 µL de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200 mM y 10 µL de NaF), y se dejaron incubar en hielo por 3 minutos. Después, se colectaron los lisados celulares, con ayuda de un *scraper*, en tubos eppendorf y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por espectrofotometría a 595 nm mediante el método de Bradford, empleando como referencia una curva de albúmina de concentraciones conocidas. Los extractos de proteína total se almacenaron en *buffer* Laemmli (1X) a -20°C.

Para el *western blot*, se utilizaron 10 µg de proteína total para realizar la electroforesis en geles concentradores de acrilamida al 4% y separadores de 10%-15% (SDS-PAGE), a 85 volts en

*buffer* de corrida 1X pH 8.3. Luego, se removió el gel concentrador y se realizó la transferencia húmeda de proteínas de los geles separadores a membranas de PVDF (Millipore, USA) a 37 volts toda la noche a 4°C en el equipo *Trans-Blot Transfer Cell* (Bio-Rad, USA). Las membranas fueron cortadas, separadas y bloqueadas con leche en polvo Svelty 5% (g/v) en TBS-Tween 0.1% (v/v) en agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo, se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0.1%. Los anticuerpos primarios se prepararon en TBS-Tween 0.1%-albúmina 1%, las diluciones para cada blanco fueron las siguientes: anti-PCNA 1:1000 (#Cat. GTX20029 Genetex, USA), anti-tGFP 1: 10,000 (#Cat. TA150041 Origene, USA), anti-DDK 1:1000 (#Cat. TA50011-1 Origene, USA) y anti- $\alpha$ -Tubulina 1:4000 (#Cat. sc-32293 Santa Cruz, USA). Las membranas fueron incubadas con las respectivas diluciones de anticuerpo primario en agitación toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario anti-ratón (Santa Cruz, USA) se preparó en TBS-Tween 0.1%-leche 5% a una dilución 1:10,000. Las membranas fueron incubadas con la dilución de anticuerpo secundario en agitación por 45 minutos a temperatura ambiente. Y luego, se realizaron cuatro lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0.1% y un último lavado con TBS por 5 minutos. La inmunodetección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia con el kit *SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate* (Thermo Scientific, USA). Todas las membranas fueron reveladas en placas Kodak (Kodak, USA).

### **6.15. Inmunofluorescencia**

Las células fueron sembradas y transfectadas con *Lipofectamine 3000 Reagent* (Invitrogen, USA) en placas de 8 pozos *Chamber Slides Lab-Tek Glass* (Thermo Scientific, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez transcurridas 48 horas, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% por 20 minutos. Se realizaron tres lavados de 3 minutos con PBS 1X pH 7.4/tritón 0.1%. Luego, se realizó el bloqueo con PBS 1X-BSA 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS 1X-tritón 0.1% durante 3 minutos. El anticuerpo primario anti-DDK (#Cat. TA50011-1 Origene, USA) se preparó en PBS-tritón 0.1%-BSA 0.1% a una dilución 1:1000. La placa fue incubada toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 5 minutos con PBS 1X/tritón 0.1%, se agregó el anticuerpo secundario *Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (H+L)* (#Cat. A11032 Invitrogen, USA) a una dilución 1:200. Se incubó en oscuridad durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS 1X, se adicionó *Hoescht 33342* (Thermo Scientific, USA) a una dilución 1:400 (1  $\mu$ M) en PBS 1X y se incubó en oscuridad durante 5 minutos a temperatura

ambiente. Al finalizar, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se montó un cubreobjetos con *Vectashield* (Vector Laboratories, USA). Las laminillas se visualizaron mediante microscopia confocal en el equipo *Olympus IX81* (Olympus, Japón). Las fotografías fueron tomadas con el objetivo 40X y procesadas con el programa *Olympus Fluoview v4.0*.

### **6.16. Ensayo de proliferación celular**

En este ensayo, se sembraron células HEK-293 silvestres y HEK-293 transfectadas (vacío tGFP y tGFP + PCNA-3/DDK) en cajas de cultivo de 48 pozos (Costar, USA) a una densidad de  $7.5 \times 10^3$  células por pozo y por triplicado. Las células fueron sembradas en medio DMEM (Gibco, USA) suplementado al 10% con SFB y con antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100  $\mu$ g/mL) e incubadas a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> con humedad relativa del 85%. Se evaluó la proliferación celular a las 24, 48 y 72 horas. Las células fueron tratadas con solución fijadora (DMEM-SFB 2%-glutaraldehído 1%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se retiró dicha solución y se adicionaron a cada pozo 500  $\mu$ L de PBS 1X pH 7.4. Posteriormente, se retiró el PBS, las placas se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Después, a cada pozo se le añadieron 300  $\mu$ L de solución de cristal violeta al 0.1% y se incubaron en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución, las placas se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Además, se adicionaron a cada pozo 500  $\mu$ L de ácido acético al 10% y se incubaron en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la lectura por espectrofotometría a 595 nm en el equipo *Multiskan GO Microplate Spectrophotometer* (Thermo Scientific, USA).

### **6.17. Análisis estadístico**

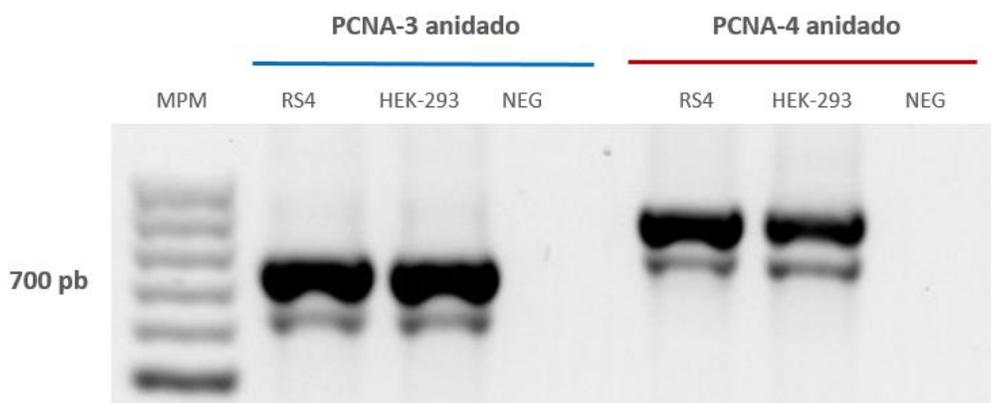
Los análisis estadísticos se realizaron en el programa *GraphPad Prism 7*. Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para el análisis de los datos de expresión de linfocitos estimulados de sangre periférica y para la comparación entre los valores de confiabilidad de traducción de los RNAs codificantes y RNAs no codificantes. El \* representa el valor de significancia estadística entre grupos ( $p < 0.05$ ). Los datos de proliferación celular fueron analizados con la prueba de ANOVA de dos vías seguida por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, donde \* representa el valor de significancia estadística entre grupos ( $p < 0.05$ ). Los resultados son presentados como la media de triplicados con su desviación estándar.

## 7. RESULTADOS

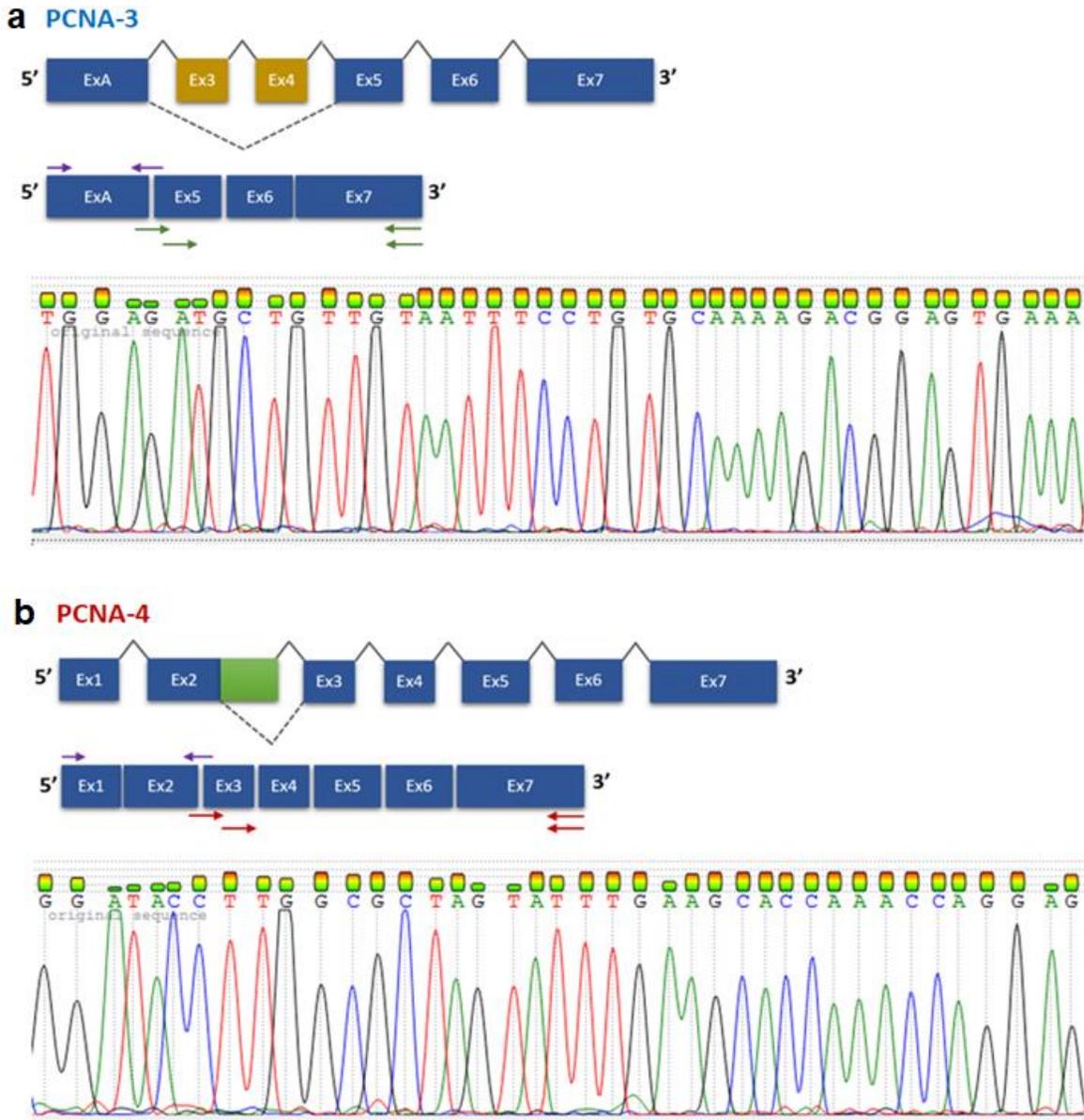
### 7.1. Caracterización de secuencias nucleotídicas de PCNA-3 y PCNA-4

Estudios previos en nuestro grupo de investigación, utilizando microarreglos de alta densidad, RT-PCR punto final y secuenciación Sanger, demostraron la presencia de dos nuevos transcritos alternativos coexpresados en muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B, líneas celulares derivadas de leucemia y en linfocitos de sangre periférica de individuos sanos, denominados: PCNA-3 (con la omisión de los exones 3 y 4) y PCNA-4 (con un sitio de *splicing* alternativo 5' en el exón 2). Sin embargo, se desconocía su secuencia nucleotídica completa.

Con el objetivo de determinar la secuencia nucleotídica de PCNA-3 y PCNA-4, se realizó RT-PCR punto final 3' *RACE* anidado con RNA de las líneas celulares RS4 y HEK-293. La electroforesis en gel de agarosa, de los productos resultantes, mostró la presencia de dos amplicones para cada variante. Sin embargo, sólo los amplicones de ~716 pb y ~885 pb fueron purificados y secuenciados (Figura 17). En base a los resultados previos de nuestro laboratorio (enfocados en el extremo 5') y a las secuencias resultantes del 3' *RACE* anidado de este trabajo, se puede señalar lo siguiente: 1) PCNA-3 tiene una extensión de ~1153 pb y está compuesta de 4 exones, y 2) PCNA-4 cuenta con una longitud de ~1179 pb y está conformada por 7 exones (Figura 18).



**Figura 17. Amplicones de PCNA-3 y PCNA-4 3' *RACE* anidado.** a) Gel de agarosa que corresponde a la RT-PCR punto final 3' *RACE* anidado de PCNA-3 (segmento azul) y PCNA-4 (segmento rojo) en las líneas celulares RS4 y HEK-293. El tamaño del amplicón esperado para PCNA-3 es de ~716 pb y para PCNA-4 es de ~885 pb. MPM, marcador de tamaño molecular; NEG, negativo.

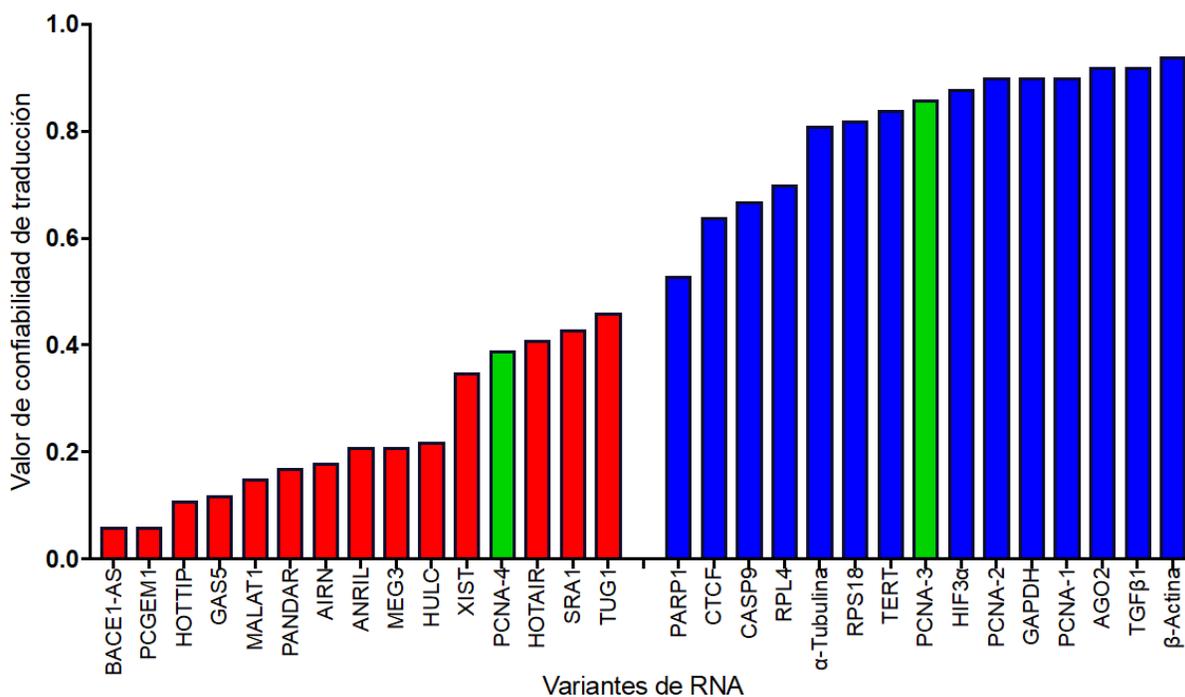


**Figura 18. Electroferogramas de PCNA-3 y PCNA-4 3' RACE anidado.** Esquemas que muestran las regiones de PCNA-3 (a, flechas verdes) y PCNA-4 (b, flechas rojas) amplificadas mediante 3' RACE anidado. Las flechas moradas corresponden a regiones previamente analizadas por nuestro grupo de investigación. Debajo de cada esquema se muestra una secuencia representativa de los electroferogramas obtenidos de PCNA-3 y PCNA-4 por 3' RACE anidado.

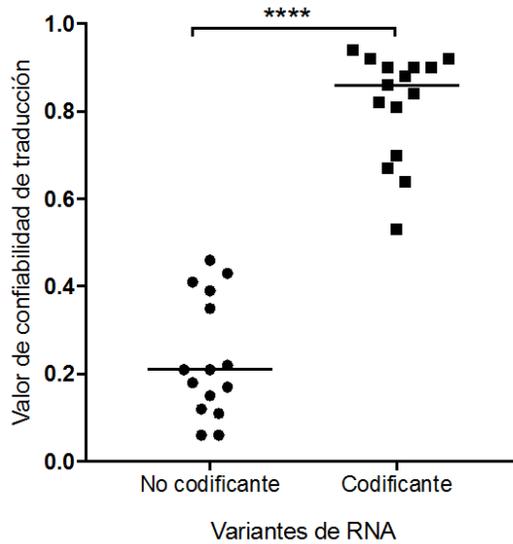
## 7.2. Análisis bioinformático de PCNA-3 y PCNA-4

Una vez caracterizadas las secuencias nucleotídicas de PCNA-3 y PCNA-4, nos preguntamos si dichas variantes podrían tratarse de RNAs codificantes o RNAs no codificantes. Para responder lo anterior, las secuencias de PCNA-3 y PCNA-4 fueron analizadas en el programa

*ATGpr*. De esta manera, se compararon los valores de confiabilidad de traducción otorgados para cada variante con los valores asignados para secuencias nucleotídicas de 14 RNAs codificantes (PARP1, CTCF, CASP9, RPL4,  $\alpha$ -Tubulina, RPS18, TERT, HIF3 $\alpha$ , PCNA-1, PCNA-2, GAPDH, AGO2, TGF $\beta$ 1 y  $\beta$ -Actina) y 14 RNAs no codificantes (BACE1-AS, PCGEM1, HOTTIP, GAS5, MALAT1, PANDAR, AIRN, ANRIL, MEG3, HULC, XIST, HOTAIR, SRA1 y TUG1) ya reportadas en la literatura. Los resultados de este análisis, indicaron que el valor de confiabilidad de traducción asignado para PCNA-3 fue de 0.86, mientras que el valor de PCNA-4 fue de 0.39. Al graficar todos los valores, PCNA-4 quedó ubicado en el grupo de los RNAs no codificantes (con valores de 0.06 a 0.46) y PCNA-3 en los RNAs codificantes (con valores de 0.53 a 0.94) (Figura 19). Además, se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de RNAs codificantes y RNAs no codificantes (Figura 20). Este análisis sugirió que PCNA-4 podría tratarse de un RNA no codificante, mientras que PCNA-3 podría ser un RNA codificante. Esta última con la posible capacidad de traducir una proteína de 80 aminoácidos.



**Figura 19. Comparación de los valores de traducción de secuencias nucleotídicas de RNAs no codificantes y RNAs codificantes.** Las barras rojas representan los valores de confiabilidad de traducción de las secuencias de RNAs no codificantes (0.06 a 0.46), mientras que las barras azules corresponden a los valores de secuencias de RNAs codificantes (0.53 a 0.94). Las barras verdes muestran los valores asignados para PCNA-3 (0.86) y PCNA-4 (0.39).

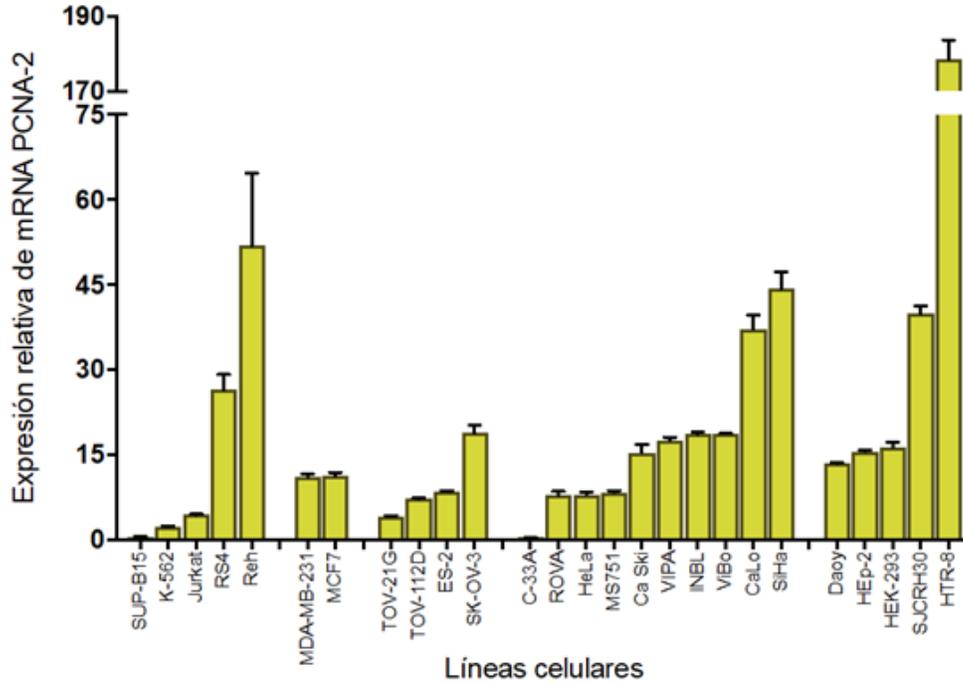


**Figura 20. Comparación entre los valores de traducción agrupados de secuencias nucleotídicas de RNAs no codificantes y RNAs codificantes.** Las líneas representan la mediana de los datos. La prueba de Mann-Whitney mostró significancia estadística ( $p < 0.0001$ , \* indica diferencia significativa).

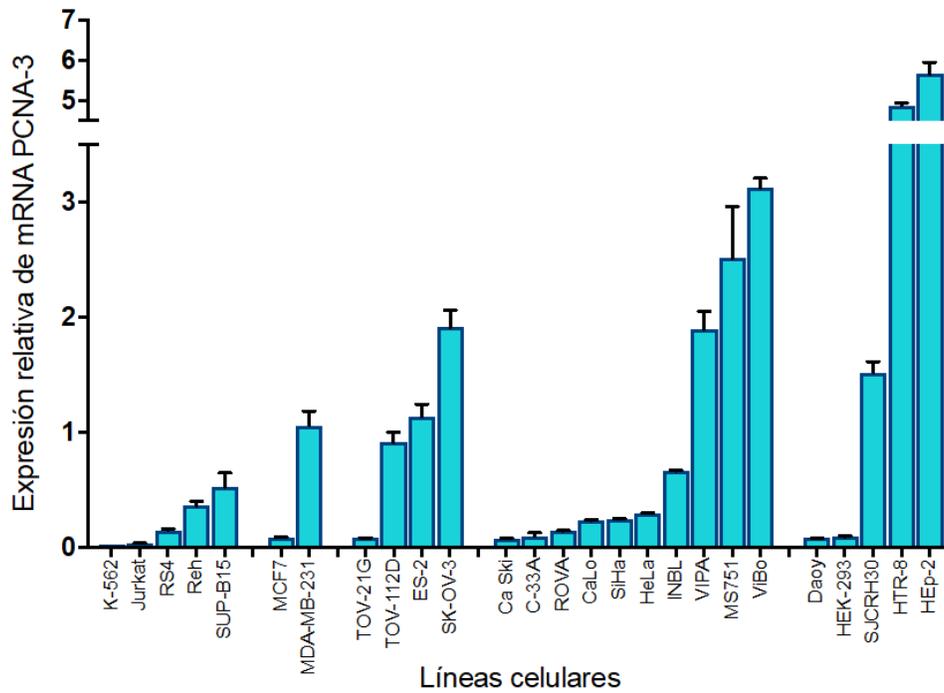
### 7.3. PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 se expresan diferencialmente en líneas celulares

Teniendo en cuenta que PCNA-3 podría ser un RNA codificante y PCNA-4 un RNA no codificante, nos preguntamos cómo es su expresión en cáncer. Para responder lo anterior, se cuantificó por RT-qPCR la expresión de PCNA-3 y PCNA-4, comparándolas con PCNA-2, en 26 líneas celulares. Éstas fueron clasificadas en cinco grupos: leucemias (RS4, Reh, SUP-B15, Jurkat y K-562), cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231), cáncer de ovario (TOV-21G, TOV-112D, ES-2 y SK-OV-3), cáncer cervical (CaLo, VIPA, INBL, SiHa, Ca Ski, MS751, ROVA, ViBo y C-33A) y otros (Daoy, HEp-2, SJCRH30, HEK-293 y HTR-8/SVneo).

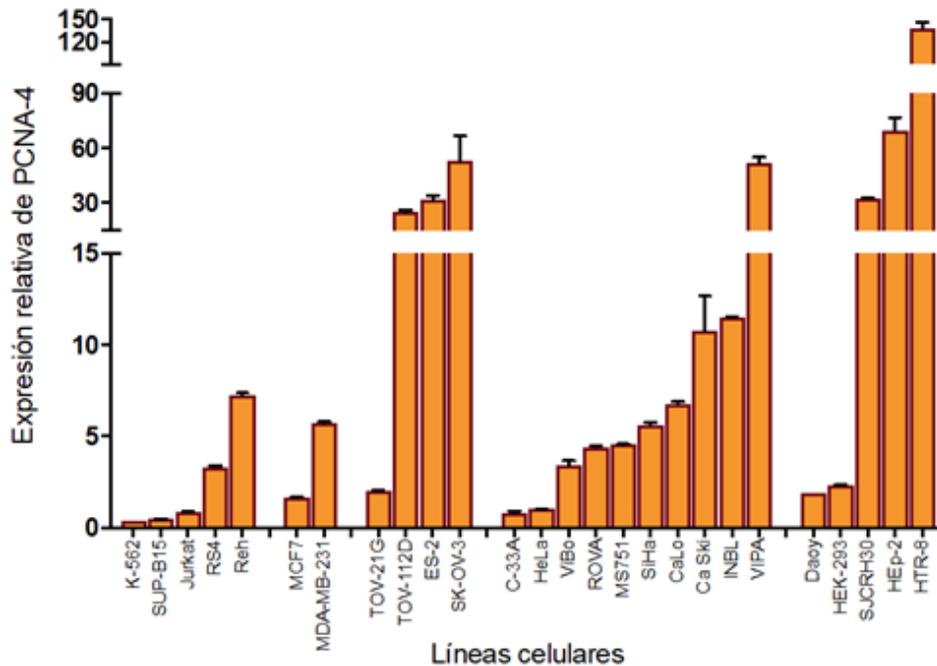
Los resultados mostraron que la expresión de las tres variantes fue detectada en todas las líneas celulares. La expresión de PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 tuvieron rangos que van de 0.39 a 178.60, 0.01 a 5.65 y 0.36 a 137.89, respectivamente (Figura 21, 22 y 23). Con base en lo anterior, se concluyó que PCNA-3 es una variante de baja expresión, en comparación con PCNA-2 y PCNA-4 que son de alta expresión. Las líneas celulares que mostraron mayor expresión de PCNA-2 fueron SiHa, Reh y HTR-8/SVneo; mientras que la alta expresión de PCNA-3 fue identificada en ViBo, HTR-8/SVneo y HEp-2. Por otra parte, PCNA-4 tuvo mayor expresión en SK-OV-3, HEp-2 y HTR-8/SVneo.



**Figura 21. Expresión relativa de PCNA-2 en 26 líneas celulares.** Los niveles de mRNA de PCNA-2 fueron normalizados con respecto a los niveles de expresión de RPS18. Cada barra representa la media de triplicados con su desviación estándar.



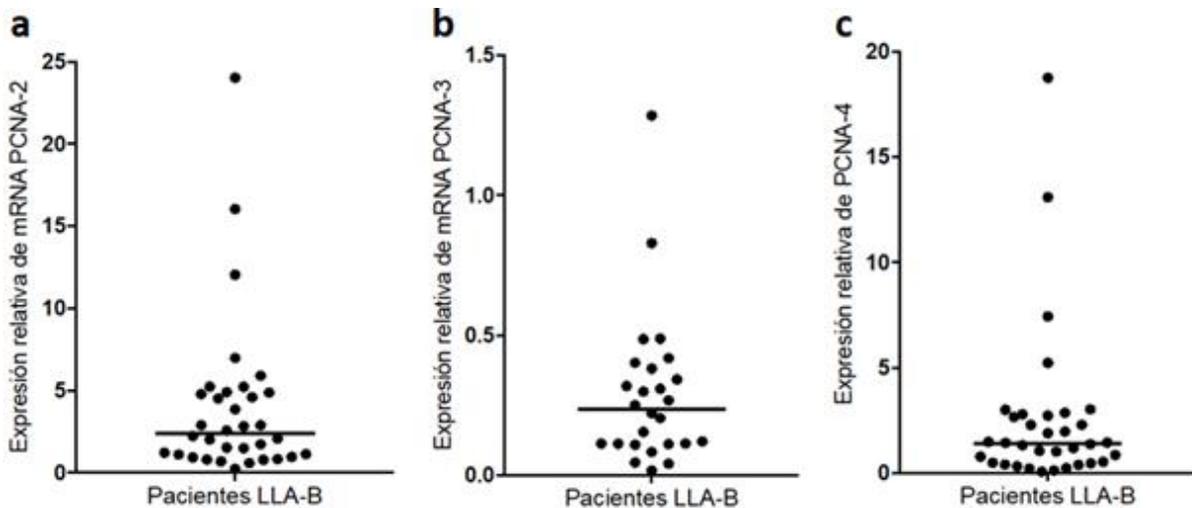
**Figura 22. Expresión relativa de PCNA-3 en 26 líneas celulares.** Los niveles de mRNA de PCNA-3 fueron normalizados con respecto a los niveles de expresión de RPS18. Cada barra representa la media de triplicados con su desviación estándar.



**Figura 23. Expresión relativa de PCNA-4 en 26 líneas celulares.** Los niveles de PCNA-4 fueron normalizados con respecto a los niveles de expresión de RPS18. Cada barra representa la media de triplicados con su desviación estándar.

#### 7.4. PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 se expresan en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B

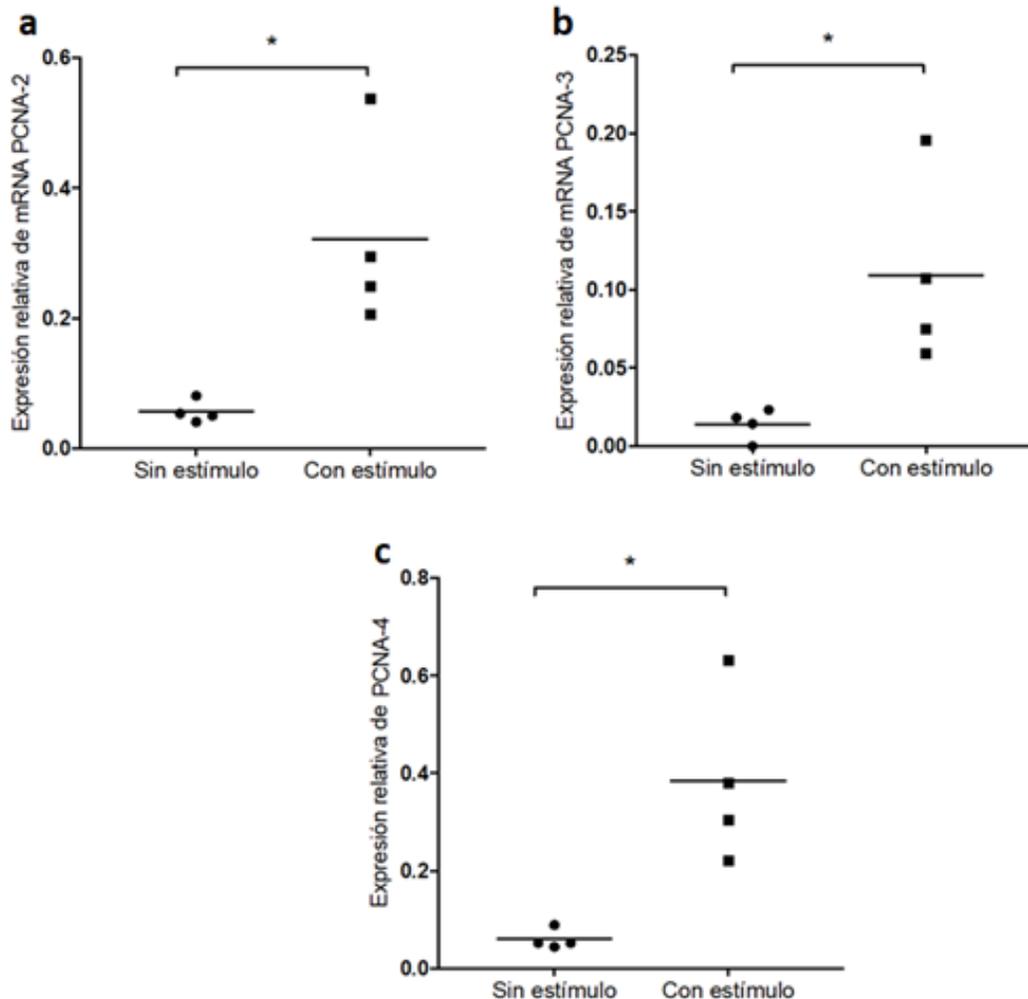
Debido a que PCNA-3 y PCNA-4 fueron inicialmente identificadas en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B, se evaluó por RT-qPCR la prevalencia de expresión, comparándolas con PCNA-2, en 34 muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B. Los resultados demostraron que la expresión de PCNA-2 y PCNA-4 fue detectada en el 100% de los pacientes (34 de 34 muestras) (Figura 24a y 24b). Por otra parte, PCNA-3 se expresó en el 76.5% de los pacientes (26 de 34 muestras) (Figura 24c). De forma similar al resultado de expresión en líneas celulares, se identificó que PCNA-2 y PCNA-4 son variantes de alta expresión, mientras que PCNA-3 es de baja expresión.



**Figura 24. Expresión relativa de PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B.** La prevalencia de expresión de PCNA-2 (a) y PCNA-4 (c) en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B fue de 100% (34 de 34 muestras), mientras que la prevalencia de expresión de PCNA-3 en tales pacientes fue de 76.5% (26 de 34 muestras). Cada punto representa la media de triplicados y la línea corresponde a la mediana de los datos.

### 7.5. PCNA-3 y PCNA-4 se relacionan con la proliferación celular

Una vez determinada la expresión de PCNA-3 y PCNA-4 en líneas celulares, y en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B, nos preguntamos si tales variantes están relacionadas con la proliferación celular. Para responder lo anterior, se realizó la estimulación mitogénica de linfocitos de sangre periférica con ionomicina y PMA. Posteriormente, se cuantificó la expresión de PCNA-3 y PCNA-4 mediante RT-qPCR; contrastándolas con PCNA-2, la cual muestra mayor expresión en células en proliferación. Los resultados, como era esperado, mostraron que la expresión de PCNA-2 fue mayor en la condición con estímulo mitogénico respecto a las que no fueron estimuladas, confirmando así la relación de PCNA-2 en células proliferantes. De igual manera, se determinó que la expresión de PCNA-3 y PCNA-4 fue mayor con el estímulo mitogénico, mostrando diferencias estadísticamente significativas (Figura 25). Lo anterior sugiere que los transcritos PCNA-3 y PCNA-4 se relacionan con la proliferación celular.



**Figura 25. Expresión relativa de PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 en linfocitos de sangre periférica estimulados con compuestos mitogénicos (ionomicina y PMA).** (a) Expresión relativa de PCNA-2, (b) PCNA-3 y (c) PCNA-4. Cada punto representa la media de triplicados y la línea corresponde a la media de los datos. La prueba de Mann-Whitney mostró significancia estadística ( $p = 0.0286$ , \* indica diferencia significativa).

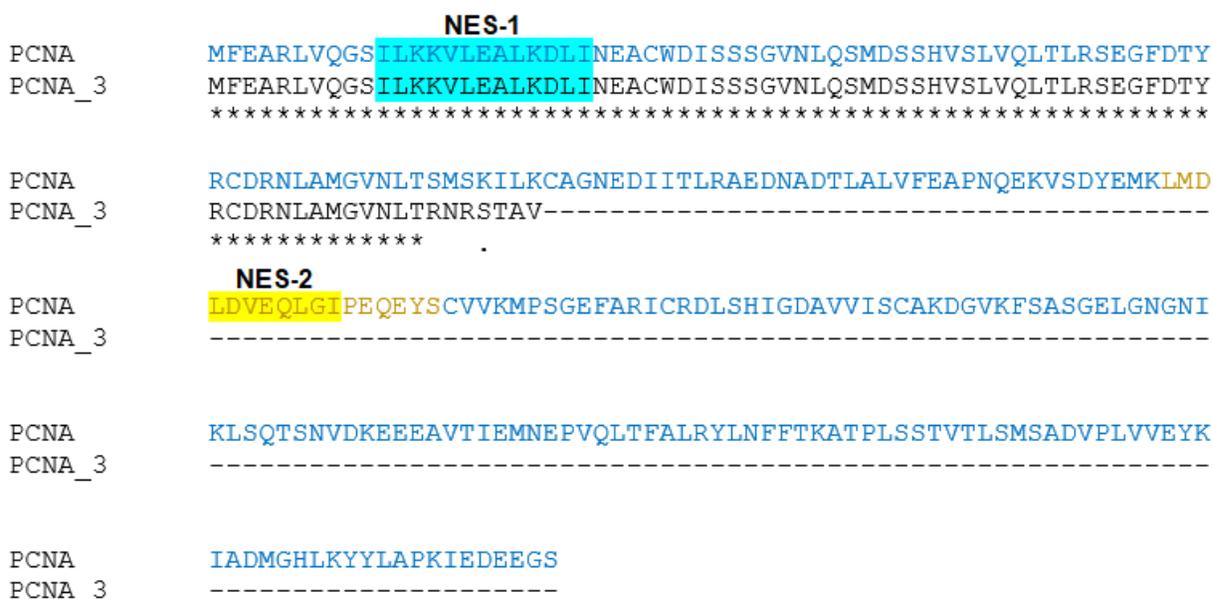
### 7.6. Estructura *in silico* y modificaciones postraduccionales de la proteína PCNA-3

Debido a que PCNA-3 es un RNA codificante que podría generar una proteína de 80 aminoácidos, se realizó un alineamiento múltiple en el programa *Clustal Omega* donde se comparó la secuencia de aminoácidos de PCNA-3 con la secuencia de la proteína PCNA canónica reportada en la literatura. Estos resultados mostraron que PCNA-3 tiene un porcentaje de identidad del 91.25% con respecto a PCNA canónica. También se identificó que PCNA-3 conserva sólo los primeros 73 aminoácidos que corresponden al dominio A o N-terminal de PCNA canónica, mostrando diferencias en los últimos 7 aminoácidos. Lo anterior

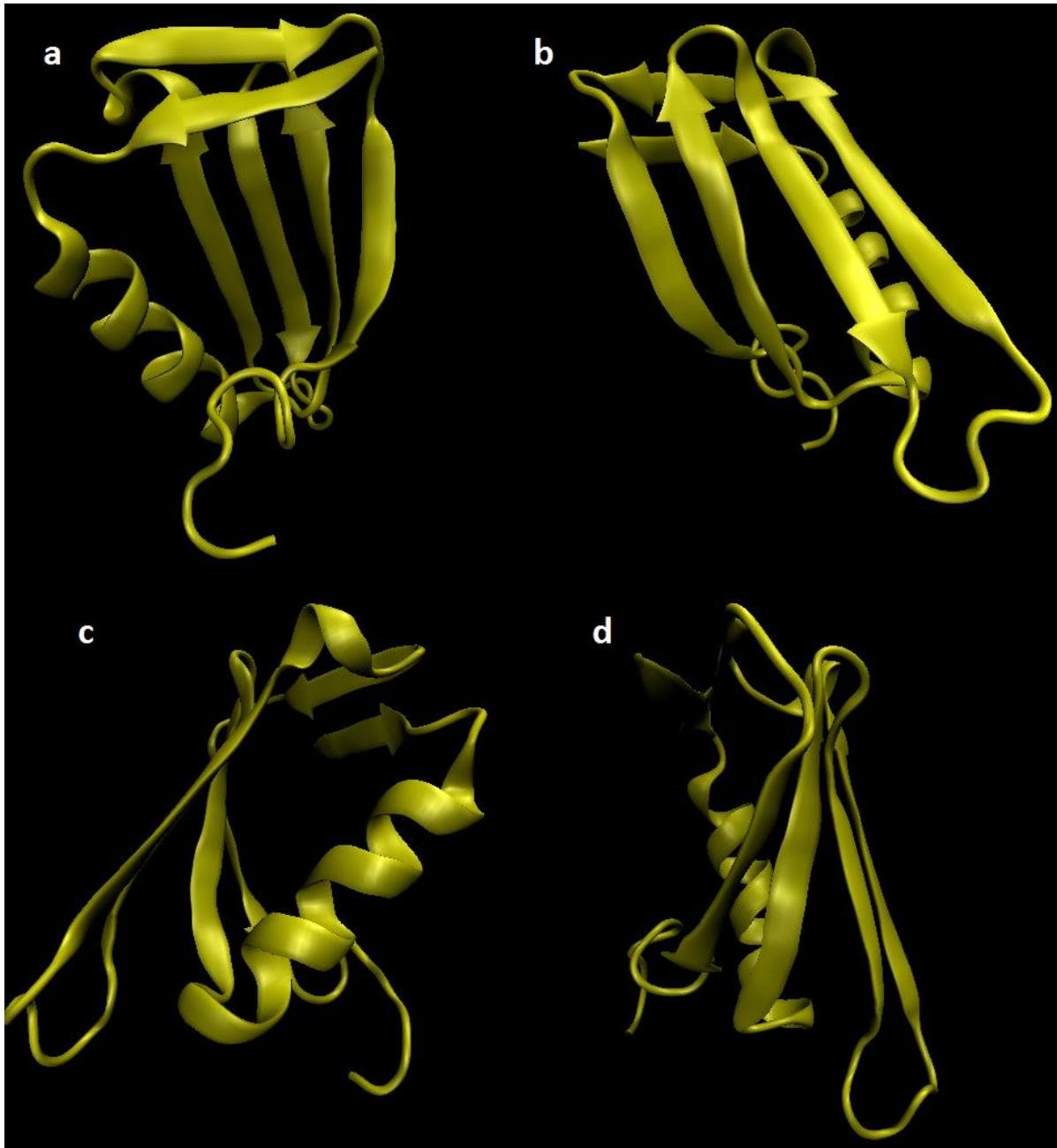
muestra que PCNA-3 es 69.54% más pequeña que PCNA canónica. Además, PCNA-3 conserva la secuencia de exporte nuclear-1 (NES-1) (ILKKVLEALKDLI, residuos 11 a 23), lo que indica que dicha variante podría localizarse en el núcleo y/o citoplasma (Figura 26).

Adicionalmente, se realizó el modelado *in silico*, por homología de secuencia, de la estructura terciaria correspondiente a PCNA-3 en el programa *Phyre2*. De esta manera, se identificó un hélice- $\alpha$  (motivo de unión a DNA) y 6 láminas- $\beta$  en PCNA-3 (Figura 27). Esto sugiere que PCNA-3 no podría formar una estructura cuaternaria homotrimérica similar al anillo clásico de PCNA.

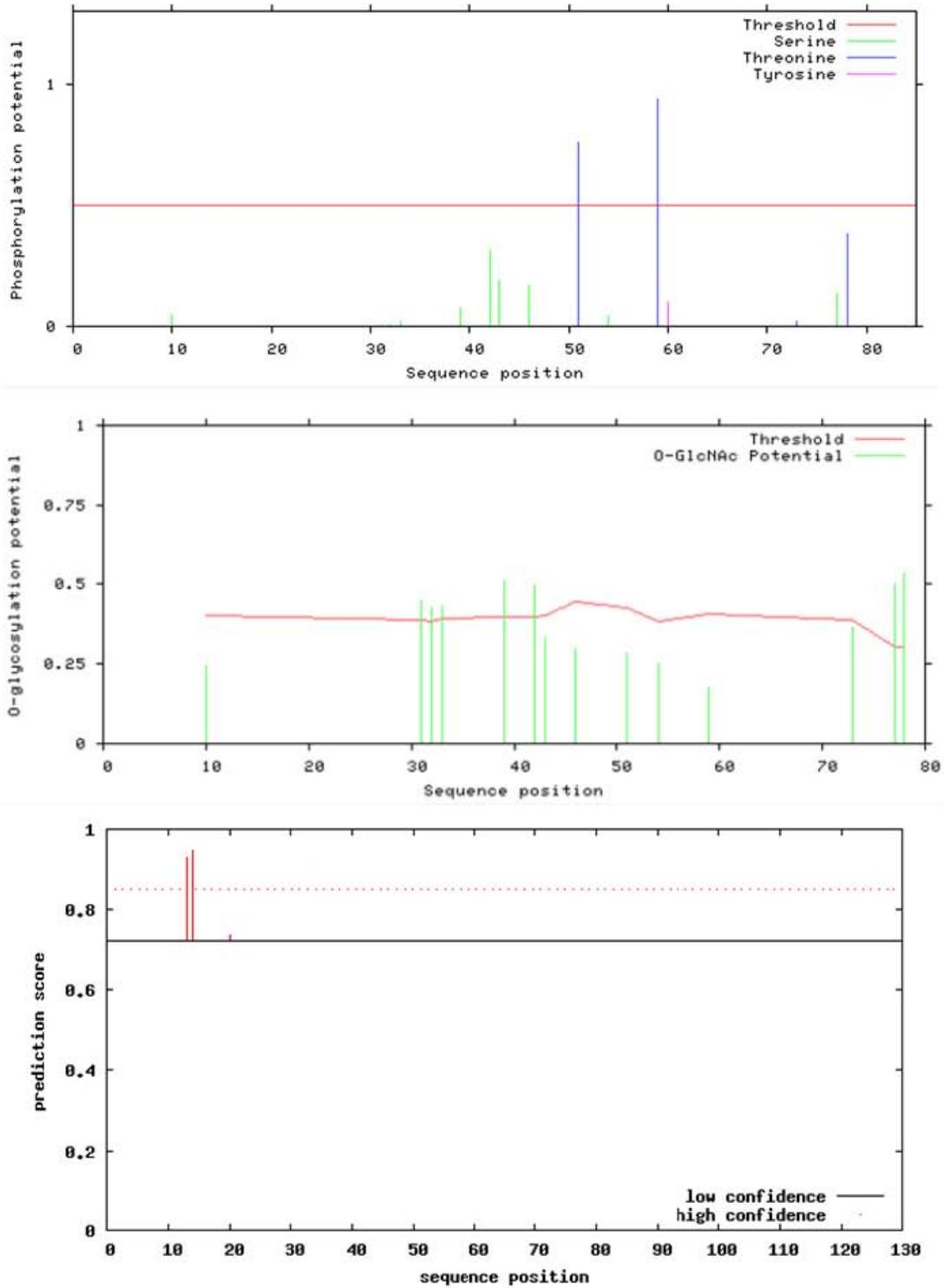
Finalmente, se determinaron las potenciales MPTs que podría tener PCNA-3 en el programa *CBS Prediction Servers*, y se identificaron 2 sitios de fosforilación (treoninas 51 y 59), 7 sitios de O-glucosilación (serinas 31, 32, 33, 39, 42, 77 y 78) y 2 sitios de ubiquitinación (lisinas 13 y 14) (Figura 28). Estos resultados permiten sugerir que PCNA-3 podría ser regulada mediante MPTs.



**Figura 26. Alineamiento múltiple entre la secuencia de aminoácidos de PCNA y PCNA-3.** PCNA-3 tiene un porcentaje de identidad del 91.25% y es un 69.54% más pequeña con respecto a PCNA. En azul se muestran las secuencias correspondientes a los dominios A y B. En amarillo se indica la secuencia del asa IDCL. Las secuencias sombreadas muestran la NES-1 y NES-2.



**Figura 27. Modelado *in silico* de la estructura terciaria de PCNA-3.** Las figuras a, b, c y d corresponden a distintas áreas de la estructura terciaria de PCNA-3, la cual presenta un hélice- $\alpha$  (motivo de unión a DNA) y 6 láminas- $\beta$ .



**Figura 28. Potenciales modificaciones postraduccionales de PCNA-3.** En la gráfica superior se muestran 2 sitios de fosforilación en las treoninas 51 y 59. La gráfica central indica 7 sitios de O-glicosilación en las serinas 31, 32, 33, 39, 42, 77 y 78. La gráfica inferior muestra 2 sitios de ubiquitinación en las lisinas 13 y 14.

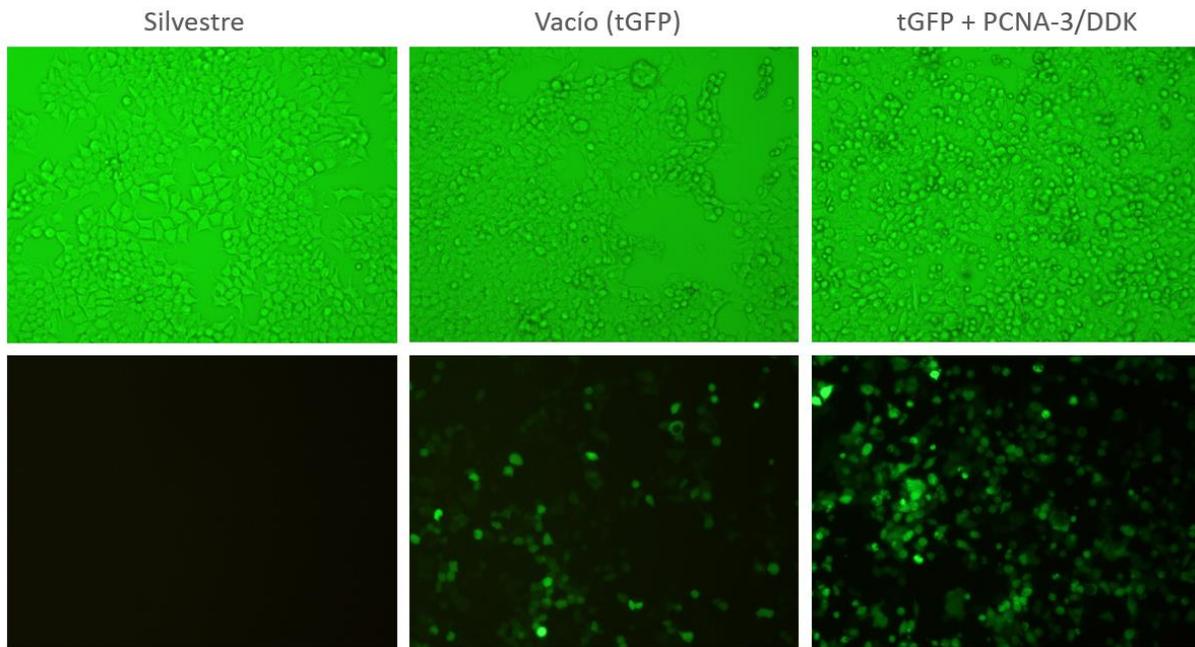
### **7.7. Expresión *in vitro* de la proteína recombinante PCNA-3/DDK, localización y relación con la proliferación en la línea celular HEK-293**

Dado que varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de la proteína PCNA canónica se relaciona con la proliferación celular, nos preguntamos si la proteína PCNA-3, se relaciona también con la proliferación. Nuestros resultados anteriores sugieren que el transcrito PCNA-3 podría traducir una proteína de 80 aminoácidos. Sin embargo, no existen anticuerpos comerciales que permitan identificar, específicamente, a la proteína PCNA-3. Por esta razón, se decidió clonar el marco de lectura de dicha variante en un vector expresión (Anexo 2), para generar una proteína recombinante fusionada a una marca de Myc/DDK. De esta manera, se analizó en un modelo *in vitro*, el efecto de la sobreexpresión de la proteína recombinante PCNA-3/DDK en la proliferación celular. El vector empleado en este trabajo expresa de forma independiente la proteína tGFP como reportero de transfección (Anexo 2). Después, se eligió como modelo de estudio a la línea celular HEK-293, debido a la baja expresión del transcrito PCNA-3 (Figura 21). Para este ensayo se trabajaron tres grupos experimentales de células HEK-293: 1) no transfectadas (silvestre), 2) transfectadas con el vector carente del marco de lectura de PCNA-3 (vacío tGFP) y 3) transfectadas con el vector que incluye el marco de lectura de PCNA-3 (tGFP + PCNA-3/DDK) (Figura 29). Al término de 48 horas de transfección, se identificaron por *western blot* la presencia de PCNA (29 kDa), tGFP (26 kDa) y PCNA-3 fusionada a Myc/DDK (12 kDa). Como control de carga empleamos  $\alpha$ -Tubulina (55 kDa) (Figura 30).

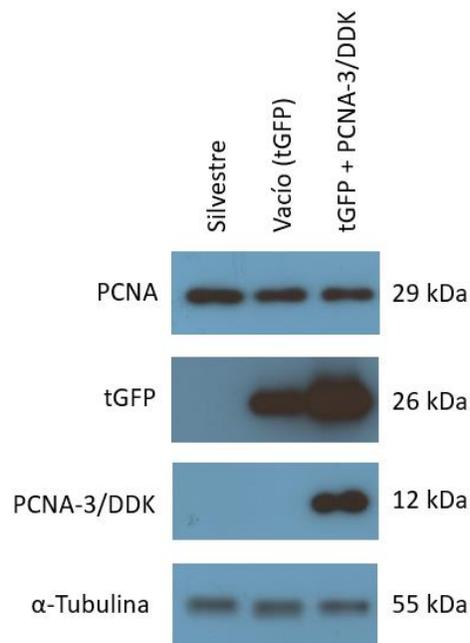
Teniendo en cuenta que PCNA canónica tiene localización predominantemente nuclear, nos preguntamos si la proteína recombinante PCNA-3/DDK comparte la misma localización subcelular. Por esta razón, se identificó su localización mediante inmunofluorescencia. Los resultados muestran que la proteína recombinante PCNA-3/DDK se localiza en el citoplasma y núcleo celular (señal roja) (Figura 31).

Posteriormente, se evaluó la proliferación celular a las 24, 48 y 72 horas de los grupos silvestre, vacío (tGFP), y tGFP + PCNA-3/DDK. Solamente se identificaron diferencias significativas a las 72 horas entre el grupo silvestre con los grupos vacío (tGFP) y tGFP + PCNA-3/DDK (Figura 32). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos vacío (tGFP) y tGFP + PCNA-3/DDK. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de la proteína recombinante PCNA-3/DDK no incrementa, significativamente,

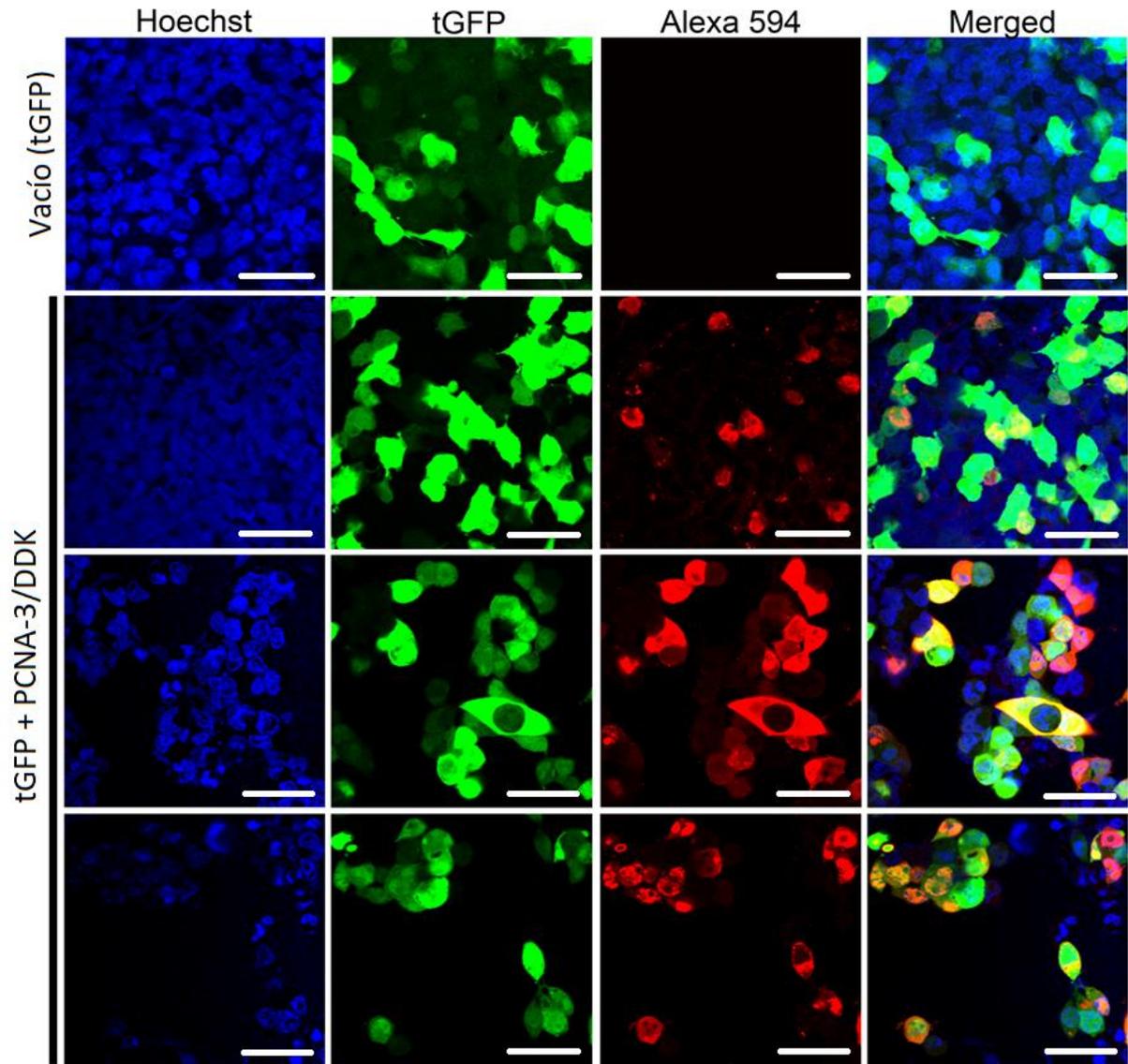
la proliferación en la línea celular HEK-293.



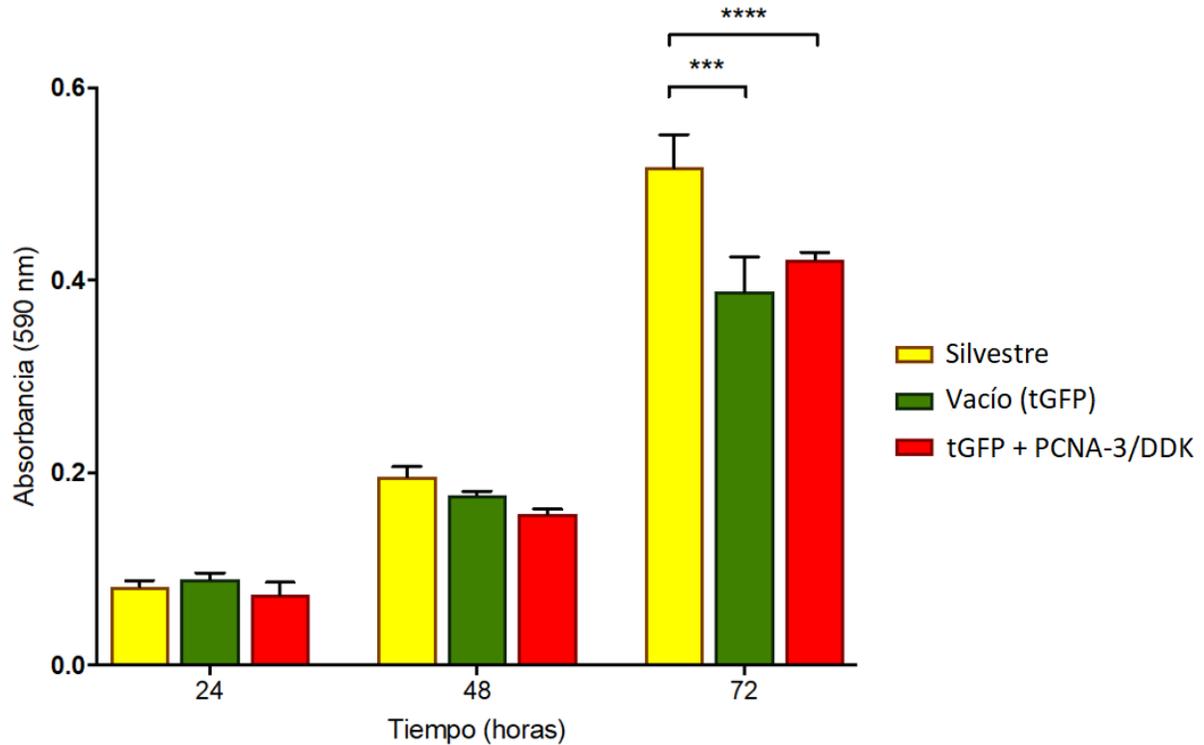
**Figura 29. Transfección transitoria de células HEK-293.** a) Células HEK-293 silvestres sin transfectar (panel izquierdo), células HEK-293 transfectadas con el vector vacío (panel central, vacío tGFP) y células HEK-293 transfectadas con el vector que incluye el marco de lectura de PCNA-3 fusionado a la marca Myc/DDK (tGFP + PCNA-3/DDK, panel derecho). En la parte superior se muestran las imágenes tomadas en campo claro y en la parte inferior las imágenes tomadas con fluorescencia a 10X. Cada imagen es representativa de experimentos por triplicado.



**Figura 30. Detección de PCNA-3/DDK por western blot.** En la membrana se muestra la presencia de PCNA (29 kDa), tGFP (26 kDa), PCNA-3 fusionada a Myc/DDK (12 kDa) y  $\alpha$ -Tubulina (55 kDa).



**Figura 31. Localización subcelular de PCNA-3/DDK en células HEK-293 mediante inmunofluorescencia.** a) Núcleos celulares contrateñidos con *Hoescht 33342* (marca azul, panel izquierdo), expresión de tGFP (marca verde, segundo panel), PCNA-3/DDK revelado con Alexa Fluor 594 (marca roja, tercer panel) y *merged* de los tres grupos anteriores (panel derecho) en los que el color amarillo y blanco indican colocalización subcelular. Barra de calibración = 50 micrómetros.



**Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de PCNA-3/DDK en la proliferación celular de HEK-293.** Análisis por cristal violeta de la proliferación celular de HEK-293 de los grupos silvestre (amarillo), vacío tGFP (verde) y tGFP + PCNA-3/DDK (rojo). Cada barra representa la media de triplicados con su desviación estándar. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Tukey mostró significancia estadística ( $p < 0.05$ , \* indica diferencia significativa).

## 8. DISCUSIÓN

La mayoría de las investigaciones sobre PCNA en cáncer se han enfocado en analizar su expresión a nivel de proteína. Se ha demostrado, mediante inmunohistoquímica y *western blot*, que la expresión de PCNA incrementa en relación al estadio del cáncer oral (Poosarla et al., 2015) y cervical en pacientes (Kim et al., 2015). Por otra parte, una mayor expresión de dicha proteína está relacionada con el acortamiento de supervivencia en pacientes con leucemia linfocítica crónica (Faderl et al., 2002) y hepatocarcinoma (Ma et al., 2016). En conjunto, se ha indicado que la sobreexpresión de la proteína PCNA está relacionada con la proliferación celular y agresividad en varios tipos de cáncer. Por esta razón, se ha sugerido a PCNA como marcador molecular pronóstico y diagnóstico de algunos tipos de cáncer (Malkas et al., 2006; Wang, 2014; Li et al., 2015; Lv et al., 2015; Mathews, 2015; Juríkova et al., 2016). A pesar de estos avances, pocos estudios han evaluado la expresión de mRNA de *PCNA* (Iwatani et al., 1999; Hao et al., 2008). Además, ninguno de ellos ha comparado dicha expresión en cáncer, y mucho menos la caracterización de nuevas variantes alternativas de *PCNA*. En este contexto, nuestro estudio es el primero en caracterizar nuevas variantes alternativas de *PCNA* y en evaluar su expresión en distintos tipos celulares de cáncer.

Investigaciones recientes han demostrado que la desregulación de proteínas que participan en el SA, como las SRSF, favorecen la expresión diferencial de variantes alternativas, dependiendo del tipo de cáncer (Dvigne et al., 2016). La sobreexpresión de SRSF2 induce la omisión del exón 11 del pre-mRNA de *RON*, promoviendo la producción de la variante  $\Delta$ RON, implicada en la TEM e invasión en cáncer de hígado, riñón y pulmón (Zhang & Manley, 2013). Por otra parte, la sobreexpresión de SRSF6 en cáncer de piel, permite la selección de exones alternativos del pre-mRNA de *TN-C*, favoreciendo la expresión diferencial de múltiples variantes de *TN-C* en relación al grado de invasividad y metástasis (da Silva et al. 2015). En este trabajo se mostró que PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 se expresan diferencialmente en distintas líneas celulares de cáncer y en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B, destacando en ambos casos, que PCNA-2 y PCNA-4 son variantes de alta expresión, en comparación con PCNA-3 que es de baja expresión. Es posible que algunas proteínas SRSF estén involucradas en la expresión diferencial de dichas variantes, tal como sucede con *RON* y *TN-C*. Reportes previos han demostrado que PCNA-2 traduce la proteína PCNA canónica, la cual se sobreexpresa en distintos tipos de cáncer y está asociada con su agresividad y proliferación celular (Stoimenov & Helleday, 2009; Wang, 2014; Park et al., 2016; Ensembl,

2017, NCBI, 2017). Lo anterior resulta relevante porque PCNA-2 podría ser un referente de la importancia biológica de PCNA-3 y PCNA-4 en cáncer. Sin embargo, investigaciones futuras tendrán que determinar si PCNA-3 y PCNA-4 podrían ser empleadas como marcadores moleculares diagnóstico, pronóstico o terapéutico en algunos tipos de cáncer, tal como ocurre con las variantes alternativas de *BRAF*, *MDM2*, *TP53*, *RON*, *KRAS* y *PTEN* (Ladomery, 2013; Oltean & Bates, 2013; Sveen et al., 2015).

Diversos estudios han demostrado que variantes alternativas de un mismo gen pueden tener funciones antagónicas, tal como ocurre con *RON*, *BCL-X*, *VEGF* y *CD44* (Zhang & Manley, 2013; Chen & Weiss, 2014; Pagliarini et al., 2015). En esta investigación se demostró que PCNA-3 y PCNA-4, se relacionan con la proliferación celular, al igual que PCNA-2 en linfocitos estimulados con compuestos mitogénicos. Ejemplos de variantes con funciones parecidas ha sido demostrado en *MDM2*, *TERT*, *BRAF* y *KRAS* (Moumen et al., 2005; David & Manley, 2010; Wang et al., 2014; Gallardo et al., 2015; Luz et al., 2016; Paronetto et al., 2016). Actualmente se conoce que las células cancerosas tienen una proliferación desregulada, implicando en algunos casos la expresión de variantes alternativas que afectan a vías de señalización reguladoras de la proliferación celular. El SA aberrante de *ARAF* y *BRAF* en cáncer permite la expresión de las variantes *ARAF-FL* y *V600E*, que inducen la activación constitutiva de la vía *RAS-MAPK-ERK* y, por lo tanto, el incremento en la proliferación celular (Pagliarini et al., 2015). Por otra parte, el SA de *PTEN* y *RON* influye en la desregulación de la vía *PI3K-AKT-mTOR*, favoreciendo la proliferación de células cancerosas. Algunos reportes en cáncer, han relacionado indirectamente a PCNA con las vías de señalización *RAS-MAPK-ERK* y *PI3K-AKT-mTOR* (Jiang et al., 2015; Yu & Cui, 2016). En este contexto, podría ser posible que la expresión de PCNA-3 y PCNA-4 esté vinculada con alguna de las vías antes mencionadas. Además, la coexpresión de PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 en líneas celulares y en pacientes con LLA-B pudiera sugerir un papel sinérgico de tales variantes en la proliferación celular.

Algunos autores han empleado el programa *ATGpr* para determinar el potencial codificante y los posibles productos proteicos resultantes de distintos transcritos. Dicho programa, analiza probabilísticamente la presencia de los codones de inicio de la traducción y marcos de lectura en base a la secuencia Kozak, que sólo está presente en RNAs codificantes y participa en la traducción de proteínas en células eucariontes. Un valor de confiabilidad traduccional alto asignado a un transcrito sugiere que podría tratarse de un RNA codificante, mientras que un

valor de confiabilidad traduccional bajo sería un indicativo de un RNA no codificante (Nishikawa et al., 2002; Chen et al., 2003; Nadershahi et al., 2004; Otsuki et al., 2005). Con base en lo anterior, los resultados sugieren que PCNA-3 podría ser un RNA codificante y PCNA-4 un RNA no codificante. Particularmente, se propone que PCNA-4 sería un RNA largo no codificante (lncRNA). Los lncRNAs son un tipo de transcritos que tienen un tamaño mayor a 200 nucleótidos y desempeñan una gran variedad de funciones biológicas, tales como: regulación epigenética, remodelación de la cromatina, modulación de la expresión génica, SA y diferenciación celular. Los lncRNAs representan el 80% de los RNAs no codificantes y su expresión depende del tejido y contexto celular. Sin embargo, sólo el 2% de los lncRNAs han sido caracterizados. Diversos estudios han demostrado que la desregulación de los lncRNAs favorece el desarrollo de distintas enfermedades, entre ellas el cáncer (Ryan & Faupel-Badger, 2016; Deng et al., 2017; Hosseini et al., 2017; Salehi et al., 2017). Por ejemplo, MALAT1 promueve la proliferación celular, migración e invasión; y su sobreexpresión ha sido detectada en cáncer de mama, ovario, próstata, leucemia mieloide y linfoma de Burkitt. Por otra parte, la sobreexpresión de PCGEM1 favorece la proliferación celular y quimioresistencia en cáncer de próstata. Otros lncRNAs con funciones oncogénicas incluyen a KRASP, HULC, HOTAIR, HOTTIP, ANRIL, PANDAR y RICTOR. Actualmente, varios lncRNAs son utilizados como marcadores moleculares y blancos terapéuticos en diversos tipos de cáncer (Zhang et al., 2014; Bhan et al., 2017; Schmitt & Chang, 2017). Recientemente, Yuan et al. (2014) demostraron la existencia de PCNA-AS1, un lncRNA localizado en la hebra opuesta al gen *PCNA*. PCNA-AS1 se encuentra sobreexpresado en hepatocarcinoma y promueve el crecimiento tumoral *in vivo* e *in vitro*. Además, PCNA-AS1 incrementa la estabilidad del mRNA de *PCNA* mediante interacciones de tipo RNA-RNA, contribuyendo con la progresión del hepatocarcinoma. En este contexto, es posible que PCNA-4 funcione de forma similar a PCNA-AS1. Sin embargo, estudios posteriores, basados en RNAs interferentes y en la evaluación de interacciones RNA-RNA o RNA-proteína, serán necesarios para aclarar la función exacta de PCNA-4.

Por otra parte, los resultados de este trabajo sugieren que PCNA-3 podría ser un RNA codificante que traduce una proteína de 80 aminoácidos. En comparación a trabajos previos, se ha demostrado que PCNA-1 y PCNA-2 traducen la misma proteína de 261 aminoácidos, PCNA canónica que regula sus funciones sólo en su conformación de anillo homotrimérico (Stoimenov & Helleday, 2009; Park et al., 2016; Ensembl, 2017, NCBI, 2017). Cada monómero de PCNA canónica consta de 4 hélices- $\alpha$  (motivos de unión a DNA) y 18 láminas- $\beta$ , que

conforman los dominios A o N-terminal (residuos 1-117), el asa de interacción IDCL (residuos 118-134) y el dominio B o C-terminal (residuos 135-261) (Bouayad et al., 2012). En comparación con los resultados obtenidos en este trabajo, la proteína PCNA-3 tiene un porcentaje de identidad del 91.25% y es 69.54% más pequeña que PCNA canónica. Además, la estructura *in silico* de PCNA-3 muestra la presencia de un hélice- $\alpha$ , 6 láminas- $\beta$ , y la carencia del dominio B y asa IDCL. Esto permite proponer lo siguiente: a) dado que PCNA-3 conserva una hélice- $\alpha$ , es probable que interactúe con el DNA, b) la carencia del dominio B y del asa IDCL sugiere que PCNA-3 es incapaz de formar una estructura cuaternaria e interactuar con las más de 200 proteínas de unión a PCNA canónica (Witko-Sarsat et al., 2010; De Biasio & Blanco, 2013; Mailand et al., 2013), c) que al conservar los primeros 73 aminoácidos del dominio A, es posible que PCNA-3 se una al dominio B de los monómeros de PCNA canónica, o d) que PCNA-3 funcione de manera independiente como monómero, ejemplos de proteínas funcionales iguales o menores a 80 aminoácidos incluyen a Motilina, Neuropéptido Y, Calcitonina, Glucagón, Ubiquitina, entre otras (GeneBank, 2017; UniProt; 2017).

Estudios recientes han demostrado que PCNA monomérica desempeña funciones citoplásmicas, en comparación a su versión homotrimérica que tiene funciones nucleares. Actualmente, se han identificado proteínas citoplásmicas de unión a PCNA monomérica. Sin embargo, se conoce poco sobre las funciones de dicha proteína en el citoplasma (Naryzhny & Lee, 2010; Witko-Sarsat et al., 2010; Müller et al., 2013; Yin et al., 2015; Park et al., 2016). En 2012, Bouayad y colaboradores demostraron que PCNA monomérica inhibe la apoptosis en neutrófilos maduros, mediante el secuestro de las pro-caspasas 8 y 9 que se localizan en el citoplasma. Se ha mostrado que cada monómero de PCNA canónica tiene dos NES, las cuales son esenciales para su translocación del núcleo al citoplasma o viceversa (Walmsley et al., 2008; Bouayad et al., 2012; Park et al., 2016). En el presente trabajo se mostró que la proteína PCNA-3 cuenta con la NES-1, sugiriendo que dicha proteína podría localizarse en el núcleo y/o citoplasma. Lo anterior fue corroborado por inmunofluorescencia, en donde se detectó que la proteína recombinante PCNA-3/DDK se localiza en el núcleo y citoplasma de células HEK-293. Estudios previos han demostrado que la presencia de una sola NES no interfiere con la translocación de los monómeros de PCNA canónica, lo cual apoya nuestro resultado (Bouayad et al., 2012). Por otra parte, se ha indicado que altos niveles de PCNA citoplásmica se relacionan con la supervivencia de células derivadas de glioblastoma y mieloma múltiple (Komatsubara et al., 2012). Sin embargo, se desconoce si la localización subcelular de la proteína PCNA-3 pudiera estar relacionada a tipos particulares de cáncer.

Es importante mencionar que la sobreexpresión de la proteína recombinante PCNA-3/DDK no incrementó, significativamente, la proliferación de células HEK-293. Sin embargo, dicho resultado se contrapone con lo obtenido en el experimento de linfocitos estimulados de sangre periférica; el cual indica que una mayor de expresión de mRNA de PCNA-3 se relaciona con la proliferación celular. Tales diferencias podrían deberse a alguno de los siguientes factores:

1. La etiqueta de 26 aminoácidos de Myc/DDK que está fusionada al extremo C-terminal de PCNA-3 podría estar interfiriendo con la función de dicha variante, cuyo tamaño es de 80 aminoácidos. La detección de nuevas proteínas alternativas se encuentra limitada por la falta de anticuerpos comerciales que permitan su identificación específica (Morales et al., 2004; Iacobucci et al., 2010; Chakedis et al., 2016). Por esta razón, se recurre generalmente al uso de proteínas recombinantes que permitan analizar, *in vitro*, la función de nuevas variantes proteicas, en nuestro caso PCNA-3.
2. PCNA-3 podría estar regulada por MPTs. Las MPTs regulan de forma compleja la actividad de las proteínas, influyendo en su función, especificidad tisular y localización celular (Keskin et al., 2016). En este sentido, PCNA canónica está regulada por ubiquitinación, sumoilación, fosforilación, acetilación, S-nitrosilación y metil-esterificación. La ubiquitinación de PCNA canónica ocurre en las lisinas 127/164 y están vinculadas con la regulación de la replicación del DNA, reparación de DNA dañado y recombinación homóloga (Ulrich, 2009; Mailand et al., 2013). En comparación, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la ubiquitinación de PCNA-3 ocurriría en las lisinas 13 y 14. Por otra parte, la fosforilación de las tirosinas 114, 211, 249 y 250 está involucrada en la protección de PCNA canónica contra la degradación vía proteosoma (Ulrich & Takahashi, 2013), mientras que los resultados de esta investigación muestran que PCNA-3 podría tener fosforilación en las treoninas 51 y 59. Estas diferencias en los sitios de MPTs implicarían funciones reguladoras distintas en PCNA-3. Adicionalmente, se mostró que PCNA-3 podría ser regulada por O-glucosilación, un tipo de MPT que no ha sido reportada en PCNA canónica. Se ha demostrado que la O-glucosilación consiste en la adición de carbohidratos en serinas/treoninas y es crucial en la función de proteínas de membrana, secreción y matriz extracelular (Dutta et al., 2017; Gabius, 2017).

3. PCNA-3 podría ser una variante trunca. A nivel de mRNA, PCNA-3 se caracteriza por la omisión de los exones 3-4, los cuales corresponden a exones no simétricos, que también forman parte del marco de lectura en PCNA-1 y PCNA-2. Reportes previos han demostrado que aproximadamente el 30% de los transcritos producidos por SA cuentan con modificaciones en los marcos de lectura que favorecen la aparición de CPPs, debido a la omisión de exones no simétricos (Kim et al., 2008). La expresión de este tipo de transcritos es común en células cancerosas (Lee & Abdel-Wahab, 2016). Diversos estudios han demostrado que la mayoría de los mRNAs que tienen CPPs presentan el patrón de SA omisión de exones, el cual está presente en PCNA-3. En este caso, es posible sugerir que PCNA-3 podría ser un transcrito que codifica una proteína trunca. Algunos transcritos con CPPs pueden ser degradados mediante *Nonsense-Mediated Decay* (NMD), mientras que otros evaden dicho mecanismo y dan lugar a proteínas truncas con pérdida de dominios que pueden: a) ser dominantes negativas, b) ganar nuevas funciones, o c) carecer de función. Muchos transcritos y proteínas truncas son indicadores de fallos celulares importantes y contribuyen en características exclusivas del cáncer (Fackenthal & Godley, 2008; Kim et al., 2008; David & Manley, 2010). Por ejemplo, los transcritos alternativos de *DNMT3B* (*DNMT3B4*, *DNMT3B5*, *DNMT3B7* y  $\Delta$ *DNMT3B*) traducen proteínas truncas que favorecen patrones anormales de metilación en el DNA de células cancerosas. Otros genes que dan lugar a transcritos y proteínas truncas importantes en cáncer incluyen a *KLF6*, *TIA-1*, *BRAF*, *TP53*, *Hoxa9*, *SNM*, *GATA1*, *BRCA1*, entre otros (Fackenthal & Godley, 2008; Chen & Weiss, 2014; Kim & An, 2016). Por esta razón, se ha propuesto su uso como marcadores moleculares diagnóstico, pronóstico y terapéutico del cáncer (Fackenthal & Godley, 2008; Zhang & Manley, 2013; Luo et al., 2015).

En los últimos años, se ha demostrado que la desregulación del SA promueve la expresión aberrante de transcritos y proteínas alternativas que contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer; sin embargo, aún se conoce poco sobre su diversidad y función. Por ello, la caracterización de nuevas variantes ayudaría a un mejor entendimiento sobre la biología del cáncer, y por lo tanto al diseño de estrategias terapéuticas alternativas. Además, preguntas sobre cómo la maquinaria del SA favorece la expresión de variantes específicas en contextos particulares y cómo se relacionan con los procesos adaptativos de la célula tendrán que ser respondidas en un futuro próximo.

## 9. CONCLUSIONES

1. PCNA-3 podría ser un RNA codificante y PCNA-4 un RNA no codificante.
2. PCNA-2, PCNA-3 y PCNA-4 se expresaron diferencialmente en líneas celulares de distintos tipos de cáncer y en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B. En ambos casos, PCNA-2 y PCNA-4 son variantes de alta expresión, mientras que PCNA-3 es de baja expresión.
3. Una mayor expresión de los transcritos PCNA-3 y PCNA-4 se relaciona con la proliferación de linfocitos de sangre periférica estimulados con compuestos mitogénicos.
4. *In vitro*, la proteína recombinante PCNA-3/DDK se localiza en el citoplasma y núcleo celular, y su sobreexpresión no incrementó, significativamente, la proliferación de células HEK-293.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Realizar un estudio, con un mayor número de muestras, en el cual se evalúe y compare la expresión de PCNA-3 y PCNA-4 en cáncer y tejido sano para determinar si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones. De ser así, investigaciones futuras podrían tomar un enfoque clínico para conocer si PCNA-3 y PCNA-4 podrían ser o no empleadas como marcadores moleculares en algunos tipos de cáncer.
2. Producir anticuerpos que detecten específicamente la proteína PCNA-3.
3. Aclarar la función exacta de PCNA-4 mediante ensayos basados en RNAs interferentes y en la evaluación de interacciones RNA-RNA o RNA-proteína.

## 11. LITERATURA CITADA

- Abramowski, P., Ogrodowczyk, C., Martin, R., & Pongs, O. (2014). A truncation variant of the cation channel P2RX5 is upregulated during T cell activation. *PLoS ONE*, 9(9), 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104692>
- Bhatla, T., Jones, C. L., Meyer, J. A., Vitanza, N. A., Raetz, E. A., & Carroll, W. L. (2014). The biology of relapsed acute lymphoblastic leukemia: opportunities for therapeutic interventions. *Journal of Pediatric Hematology/oncology*, 36(6), 413–8. Available at: <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000179>
- Bechtel, P. E., Hickey, R. J., Schnaper, L., Sekowski, J. W., Long, B. J., Freund, R., Liu, N., Rodriguez-Valenzuela, C., & Malkas, L. H. (1998). A unique form of proliferating cell nuclear antigen is present in malignant breast cells. *Cancer Research*, 73060(410), 3264–3269.
- Bentley, D. L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Reviews. Genetics*, 15 VN-r(3), 163–175. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg3662>
- Bhan, A., Soleimani, M., & Mandal, S. S. (2017). Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm. *Cancer Research*, 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634>
- Bolha, L., Ravnik-Glavač, M., & Glavač, D. (2017). Long noncoding RNAs as biomarkers in cancer. *Disease Markers*, 2017, 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1155/2017/7243968>
- Bouayad, D., Pederzoli-Ribeil, M., Mocek, J., Candalh, C., Arlet, J. B., Hermine, O., Reuter, N., Davezac, N., & Witko-Sarsat, V. (2012). Nuclear-to-cytoplasmic relocalization of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) during differentiation involves a chromosome region maintenance 1 (CRM1)-dependent export and is a prerequisite for PCNA antiapoptotic activity in mature neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), 33812–33825. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367839>
- Brown, P. J., Ashe, S. L., Leich, E., Burek, C., Barrans, S., Fenton, J. A., Jack, A. S., Pulford, K., Rosenwald, A., & Banham, A. H. (2008). Potentially oncogenic B-cell activation induced smaller isoforms of FOXP1 are highly expressed in the activated B cell like subtype of DLBCL. *Blood*, 111(5), 2816–2824. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-115113>
- Carmo, A. M., Moreira Mafalda Santos, A., Leal, R., de Almeida, S. F., da Glória, V. G., Martins de Araújo, M., & Moreira, A. (2016). SRSF1 splicing by transcription dynamics and T cell activation regulates CD6 alternative T cell activation regulates CD6 alternative splicing by transcription dynamics and SRSF1. *June J Immunol Material SupplementaryDCSupplemental.html*, 193(8), 391–399. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400038>
- Chabot, B., & Shkreta, L. (2016). Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *Journal of Cell Biology*, 212(1), 13–27. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201510032>
- Chakedis, J., French, R., Babicky, M., Jaquish, D., Howard, H., Mose, E., Lam, R., Holman, P., Miyamoto, J., Walterscheid, Z., & Lowy, M. (2015). A novel protein isoform of the RON tyrosine

- kinase receptor transforms human pancreatic duct epithelial cells. *Oncogene*, 6(February 2014), 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2015.384>
- Chen, J., & Weiss, W. A. (2014). Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene*, 34(October 2013), 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.570>
- Chen, L., Tovar-Corona, J., & Urrutia, A. (2012). Alternative splicing: a potential source of functional innovation in the eukaryotic genome. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012, 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/596274>
- Chen, M., & Manley, J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(11), 741–54. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2777>
- Chen, T., Wu, S., Wan, P., Du, C., Li, J., Li, D., Wei, G. Z., Li, B., Wang, Z. S., Xue, X. F., Zhu, Y. P. & He, F. C. (2003). Gene prediction and function research of SARS-CoV(BJ01). *Acta Genetica Sinica*, 30(8), 773-780.
- Cooper, S. L., & Brown, P. A. (2015). Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), 61–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.006>
- Cox, L. S. (2015). PCNA tightens its hold on the nucleus. *Cell Cycle*, 14(17), 2727–2728. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1064699>
- da Silva, M. R., Moreira, G. A., Gonçalves da Silva, R. A., de Almeida Alves Barbosa, É., Pais Siqueira, Teixeira, R. R., Almeida M. R., Júnior, A. S., Rangel Fietto, J. L. & Bressan, G. C. (2015). Splicing regulators and their roles in cancer biology and therapy. *BioMed Research International*, 2015, 1-12. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/150514>
- Dasgupta, T., & Ladd, A. N. (2012). The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(1), 104–121. Available at: <https://doi.org/10.1002/wrna.107>
- David, C. J., & Manley, J. L. (2010). Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes and Development*, 24(21), 2343–2364. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1973010>
- De Biasio, A., & Blanco, F. J. (2013). Proliferating cell nuclear antigen structure and interactions: too many partners for one dancer? *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 91). *Elsevier Inc.* Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411637-5.00001-9>
- Deng, H., Wang, J. M., Li, M., Tang, R., Tang, K., Su, Y., Hou, Y., & Zhang, J. (2017). Long non-coding RNAs: new biomarkers for prognosis and diagnosis of colon cancer. *Tumor Biology*, 39(6), 101042831770633. Available at: <https://doi.org/10.1177/1010428317706332>
- Dutta, D., Mandal, C., & Mandal, C. (2017). Unusual glycosylation of proteins: beyond the universal sequon and other amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.025>

- Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O., & Bradley, R. K. (2016). RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nature Reviews Cancer*, 16(7), 413–430. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.51>
- Fackenthal, J. D., & Godley, L. A. (2008). Aberrant RNA splicing and its functional consequences in cancer cells. *Disease Models & Mechanisms*, 1(1), 37–42. Available at: <https://doi.org/10.1242/dmm.000331>
- Faderl, S., Keating, M. J., Do, K. a, Liang, S. Y., Kantarjian, H. M., O'Brien, S., García-Manero, G., Manshouri, T., & Albitar, M. (2002). Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia*, 16(6), 1045–1052. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj/leu/2402540>
- Feldhahn, N., Klein, F., Mooster, J. L., Hadweh, P., Sprangers, M., Wartenberg, M., Bekhite, M., Hofmann, W. K., Herzog, S., Jumaa, H., Rowley, J. D., & Müschen, M. (2005). Mimicry of a constitutively active pre-B cell receptor in acute lymphoblastic leukemia cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(11), 1837–1852. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20042101>
- Fonseca, M. (2015). Evaluación de variantes de mRNA del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en leucemia linfoblástica aguda. *Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias*. 76 pp. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2015/abril/307179977/Index.html>
- Fu, X. D., & Ares Jr., M. (2014). Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature Reviews. Genetics*, 15(10), 689–701. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg3778>
- Gabius, H. J. (2017). The sugar code: why glycans are so important. *BioSystems*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.07.003>
- Gallardo, M., Lee, H. J., Zhang, X., Bueso-Ramos, C., Pagoon, L. R., McArthur, M., Multani, A., Nazha, A., Manshouri, T., Parker-Thornburg, J., Rapado, I., Quintas-Cardama, A., Kornblau, S., Martinez-Lopez, J., & Post, S. M. (2015). HnRNP K is a haploinsufficient tumor suppressor that regulates proliferation and differentiation programs in hematologic malignancies. *Cancer Cell*, 28(4), 486–499. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.001>
- Gary, R., Ludwig, D. L., Cornelius, H. L., MacInnes, M. A., & Park, M. S. (1997). The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24522–24529. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24522>
- GeneCards: The Human Gene Database. Available at: <http://www.genecards.org> [Accessed: June, 2017]
- Gramatges, M. M., & Rabin, K. R. (2013). The adolescent and young adult with cancer: state of the art - acute leukemias. *Current Oncology Reports*, 15(4), 317–324. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11912-013-0325-5>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hao, H., Xin, T., Nancai, Y., Yanxia, W., Qian, L., Wei, M., Yandong, Y., & Hanju, H. (2008). Short-interfering RNA-mediated silencing of proliferating cell nuclear antigen inhibit proliferation and induce apoptosis in HeLa cells. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18(1), 36–42. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.00955.x>
- Harrison, C. (2013). Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *ASH Education Program Book*, 118–125. Available at: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2013/1/118.short>
- Harrison, C. J. (2011). Acute lymphoblastic leukemia. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(4), 631–647. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2011.08.016>
- Hosseini, E. S., Meryet-Figuire, M., Sabzalipoor, H., Kashani, H. H., Nikzad, H., & Asemi, Z. (2017). Dysregulated expression of long noncoding RNAs in gynecologic cancers. *Molecular Cancer*, 16(1), 1-13. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0671-2>
- Iacobucci, I., Lonetti, A., Messa, F., Ferrari, A., Cilloni, D., Soverini, S., Paoloni, F., Ottaviani, E., Chiaretti, S., Messina, M., Vignetti, M., Papayannidis, C., Vitale, A., Pane, F., Pccaluga, P., Paolini, S., Berton, G., Baruzzi, A., Saglio, G., Baccarani, M., Foa, R., & Martinelli, G. (2010). Different isoforms of the B-cell mutator activation-induced cytidine deaminase are aberrantly expressed in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia*, 24(1), 66–73. Available at: <https://doi.org/10.1038/leu.2009.197>
- Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 381(9881), 1943–1955. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)
- Instituto Nacional de Cancerología. Disponible en: <http://www.incan.salud.gob.mx> [Fecha de acceso: junio, 2017]
- Iwatani, Y., Kamigaki, T., Suzuki, S., Ohno, M., Nakamura, T., & Kuroda, Y. (1999). Proliferating cell nuclear antigen as a predictor of therapeutic effect of continuous 5-fluorouracil administration in gastric cancer. *International Journal of Oncology*, 14(5), 965–970. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200349>
- Jan, M., & Majeti, R. (2013). Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene*, 32(2), 135–140. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.48>
- Jiang, A., Lu, H., Zhang, D., Zhang, L., & Gao, X. (2015). Short hairpin RNA targeting AKT1 and PI3K/p85 suppresses the proliferation and self-renewal of lung cancer stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 363–370. Available at: <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3393>
- Ju, H. Y., Hong, C. R., & Shin, H. Y. (2014). Advancements in the treatment of pediatric acute leukemia and brain tumor - Continuous efforts for 100% cure. *Korean Journal of Pediatrics*, 57(10), 425-430. Available at: <https://doi.org/10.3345/kjp.2014.57.10.425>

- Jumaa H., Bossaller L., Portugal K., Storch B., Lotz M. and Flemming A. (2003). Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 423, 452-456. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01608>
- Juríková, M., Danihel, L., Polák, Š., & Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochemica*, 118(5), 544-552. doi:10.1016/j.acthis.2016.05.002
- Kalsotra, A., & Cooper, T. A. (2011). Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nature Reviews Genetics*, 12(10), 715–729. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg3052>
- Kamada, K. (2012). The eukaryotic replisome: a guide to protein structure and function. *Subcellular Biochemistry*, 62, 135–156. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8>
- Kelly, L. A., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M., & Sternberg, M. (2015). The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>
- Keren, H., Lev-Maor, G., & Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature Reviews. Genetics*, 11(5), 345–355. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg2776>
- Keskin, O., Tuncbag, N., & Gursoy, A. (2016). Predicting protein-protein interactions from the molecular to the proteome level. *Chemical Reviews*, 116(8), 4884–4909. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00683>
- Kim, E., Goren, A., & Ast, G. (2008). Alternative splicing: current perspectives. *BioEssays*, 30(1), 38–47. Available at: <https://doi.org/10.1002/bies.20692>
- Kim, T. H., Han, J. H., Shin, E., Noh, J. H., Kim, H. S., & Song, Y. S. (2015). Clinical Implication of p16, Ki-67, and proliferating cell nuclear antigen expression in cervical neoplasia: improvement of diagnostic accuracy for high-grade squamous intraepithelial lesion and prediction of resection margin involvement on conization specimen. *Journal of Cancer Prevention*, 20(1), 70–7. Available at: <https://doi.org/10.15430/JCP.2015.20.1.70>
- Kim, S., & An, S. S. A. (2016). Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine*, 95(26), e3993. Available at: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003993>
- Klein, F., Feldhahn, N., Herzog, S., Sprangers, M., Mooster, J. L., Jumaa, H., & Müschen, M. (2006). BCR-ABL1 induces aberrant splicing of IKAROS and lineage infidelity in pre-B lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene*, 25(October), 1118–1124. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209133>
- Komatsubara, A. T., Asano, T., Tsumoto, H., Shimizu, K., Nishiuchi, T., Yoshizumi, M., & Ozawa, K. (2012). Proteomic analysis of S-nitrosylation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). *Proteome Science*, 10(1), 1-7. Available at: <https://doi.org/10.1186/1477-5956-10-74>
- Konieczny, P., Stepniak-Konieczna, E., & Sobczak, K. (2014). MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Research*, 42(17), 10873–10887. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gku767>

- Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., & Muñoz, M. J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(3), 153–65. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3525>
- Koundrioukoff, S., Jónsson, Z. O., Hasan, S., De Jong, R. N., Van Der Vliet, P. C., Hottiger, M. O., & Hübscher, U. (2000). A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 22882–22887. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M001850200>
- La Porta, J., Matus-Nicodemus, R., Valentín-Acevedo, A., & Covey, L. R. (2016). The RNA-binding protein, polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1) is a key regulator of CD4 T cell activation. *PLoS ONE*, 11(8), 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158708>
- Ladomery, M. (2013). Aberrant alternative splicing is another hallmark of cancer. *International Journal of Cell Biology*, 2013, 1-6. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/463786>
- Le, K. Q., Prabhakar, B. S., Hong, W. J., & Li, L. C. (2015). Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(10), 1212–8. Available at: <https://doi.org/10.1038/aps.2015.43>
- Lee, S. C.-W., & Abdel-Wahab, O. (2016). Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nature Medicine*, 22(9), 976–986. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4165>
- Lingeman, R. G., Hickey, R. J., & Malkas, L. H. (2014). Expression of a novel peptide derived from PCNA damages DNA and reverses cisplatin resistance. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(5), 981–993. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2574-x>
- Long, J. C., & Caceres, J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochemical Journal*, 417(1), 15–27. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20081501>
- Luo, Z. L., Cheng, S. Q., Shi, J., Zhang, H. L., Zhang, C. Z., Chen, H. Y., Qiu, B. J., Tang, L., Hu, C. L., Wang, H. Y., & Li, Z. (2015). A splicing variant of Merlin promotes metastasis in hepatocellular carcinoma. *Nature Communications*, 6, 8457, 1-11. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms9457>
- Luz, F. A. C., Brígido, P. C., Moraes, A. S., & Silva, M. J. B. (2016). Aberrant splicing in cancer: mediators of malignant progression through an imperfect splice program shift. *Oncology (Switzerland)*, 1-6. Available at: <https://doi.org/10.1159/000450650>
- Lv, Q., Zhang, J., Yi, Y., Huang, Y., Wang, Y., Wang, Y., & Zhang, W. (2015). Proliferating cell nuclear antigen has an association with prognosis and risks factors of cancer patients: a systematic review. *Molecular Neurobiology*, (238), 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9525-3>
- Lynch, K. W., & Weiss, A. (2000). A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Molecular and Cellular Biology*, 20(1), 70–80. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.20.1.70-80.2000>

- Ma, S., Yang, J., Li, J., & Song, J. (2016). The clinical utility of the proliferating cell nuclear antigen expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, 37(6), 7405–7412. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4582-9>
- MacNeill, S. A. (2016). PCNA-binding proteins in the archaea: novel functionality beyond the conserved core. *Current Genetics*, 62(3), 527–532. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0577-3>
- Mahler, M., Miyachi, K., Peebles, C., & Fritzler, M. J. (2012). The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Autoimmunity Reviews*, 11(10), 771–775. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.02.012>
- Mailand, N., Gibbs-Seymour, I., & Bekker-Jensen, S. (2013). Regulation of PCNA–protein interactions for genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 269–282. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3562>
- Malkas, L. H., Herbert, B. S., Abdel-Aziz, W., Dobrolecki, L. E., Liu, Y., Agarwal, B., Hoelz, D., Badve, S., Schnaper, L., Arnorld, R. J., Mechref, Y., Novotny, M., Loehnrer, P., Goulet, R. J., & Hickey, R. J. (2006). A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19472–19477. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0604614103>
- Marshall, G. M., Carter, D. R., Cheung, B. B., Liu, T., Mateos, M. K., Meyerowitz, J. G., & Weiss, W. A. (2014). The prenatal origins of cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 14(4), 277–289. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc3679>
- Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 108–121. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
- Mathews, C. K. (2015). Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 528–539. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc3981>
- Matlin, A. J., Clark, F., & Smith, C. W. J. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(5), 386–398. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm1645>
- Mejía-Arangure, J. (2013). Model for identifying the etiology of acute lymphoblastic leukemia in children, 3–18. Available at: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44040.pdf>
- Meseure, D., Alsibai, K. D., Nicolas, A., Bieche, I., & Morillon, A. (2015). Long noncoding RNAs as new architects in cancer epigenetics, prognostic biomarkers, and potential therapeutic targets. *BioMed Research International*, 2015, 1-14. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/320214>
- Morales, A. A., Olsson, A., Celsing, F., Osterborg, A., Jondal, M., & Osorio, L. M. (2004). Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 18(1), 41–47. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403183>
- Morris, K. V., & Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews. Genetics*, 15(6), 423–437. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg3722>

- Moumen, A., Masterson, P., O'Connor, M. J., & Jackson, S. P. (2005). hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell*, 123(6), 1065–1078. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.032>
- Müller, R., Misund, K., Holien, T., Bachke, S., Gilljam, K. M., Våtsveen, T. K., Ro, T. B., Bellacchio, E., Sundan, A., & Otterlei, M. (2013). Targeting proliferating cell nuclear antigen and its protein interactions induces apoptosis in multiple myeloma cells. *PLoS ONE*, 8(7), 1-12. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070430>
- Mullighan, C. G. (2010). Genetic variation and the risk of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*, 34(10), 1269–1270. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.05.013>
- Nadershahi, A., Fahrenkrug, S. C., & Ellis, L. B. M. (2004). Comparison of computational methods for identifying translation initiation sites in EST data. *BMC Bioinformatics*, 5, 14, 1-10. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-14>
- Naryzhny, S. N. (2008). Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(23), 3789–3808. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8305-x>
- Naryzhny, S. N., & Lee, H. (2007). Characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) isoforms in normal and cancer cells: there is no cancer-associated form of PCNA. *FEBS Letters*, 581(25), 4917–4920. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.09.022>
- National Cancer Institute. Available at: <https://www.cancer.gov> [Accessed: August, 2017]
- National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Accessed: June, 2017]
- Necsulea, A., & Kaessmann, H. (2014). Evolutionary dynamics of coding and non-coding transcriptomes. *Nature Reviews. Genetics*, 15(11), 734–748. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg3802>
- Nilsen, T. W., & Graveley, B. R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463(7280), 457–463. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08909>
- Nieto-Moreno, N., Giono, L. E., Cambindo-Botto, A. E., Muñoz, M. J., & Kornblihtt, A. R. (2015). Chromatin, DNA structure and alternative splicing. *FEBS Letters*, 589(22), 3370–3378. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.002>
- Nishikawa, T., Ota, T., Kawai, Y., Ishii, S., Saito, K., Yamamoto, J., Wakamatsu, A., Ozawa, M., Susuki, Y., Sugano, S., & Isogai, T. (2002). Database and analysis system for cDNA clones obtained from full-length enriched cDNA libraries. *In Silico Biology*, 2(1), 5-18.
- Olaisen, C., Müller, R., Nedal, A., & Otterlei, M. (2015). PCNA-interacting peptides reduce Akt phosphorylation and TLR-mediated cytokine secretion suggesting a role of PCNA in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 27(7), 1478–1487. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.03.009>
- Oltean, S., & Bates, D. O. (2013). Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene*, (November), 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.533>
- Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <http://www.who.int/es> [Fecha de acceso: agosto, 2017]

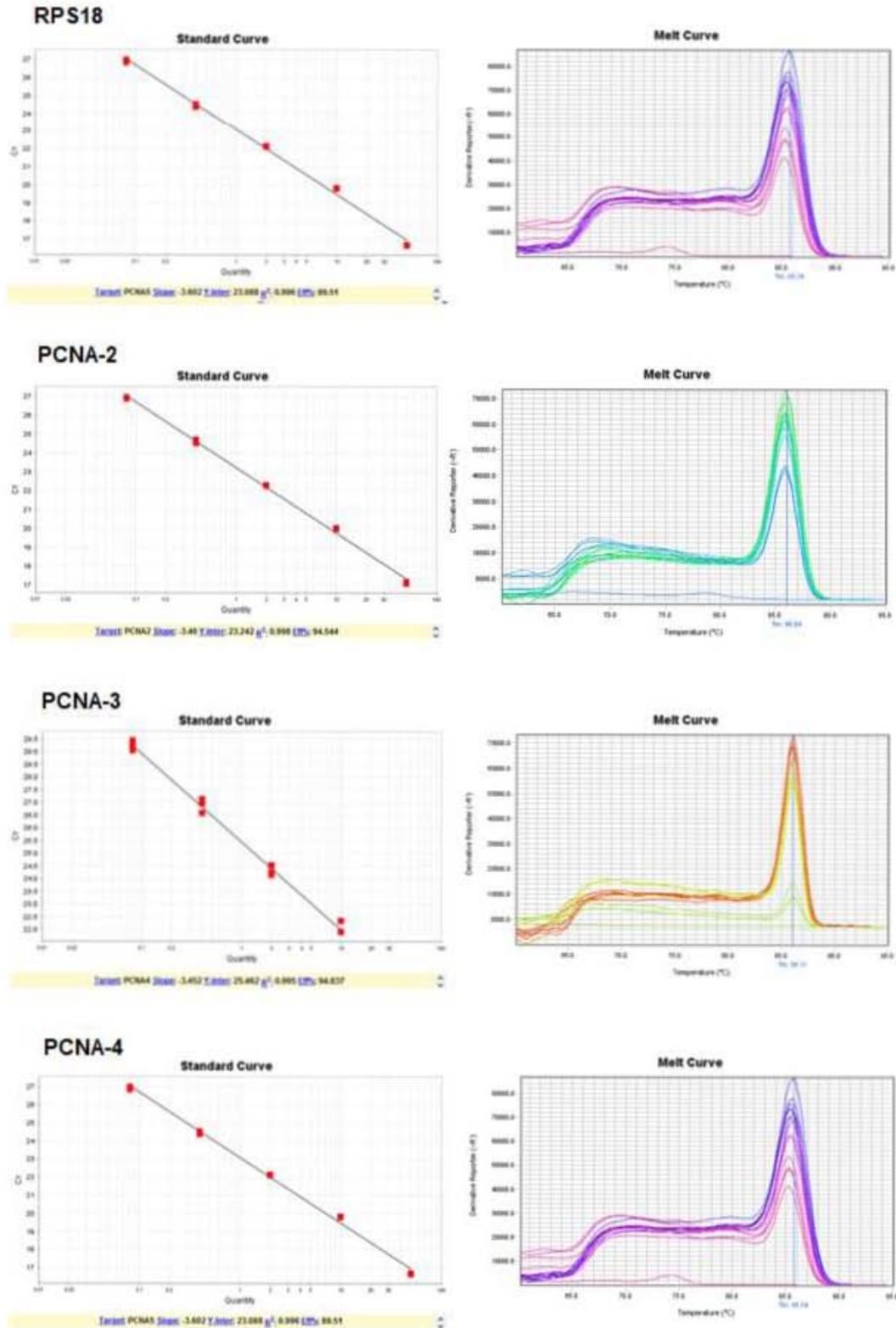
- Otsuki, T., Ota, T., Nishikawa, T., Hayashi, K., Suzuki, Y., Yamamoto, J. I., Wakamatsu, A., Kimura, K., Sakamoto, K., Hatano, N., Kawai, Y., Ishii, S., Saito, K., Kojima, S., Sugiyama, T., Ono, T., Yoshikawa, Y., Aotsuka, S., Sasaki, N., Hattori, A., Okumura, K., Nagai, K., Sugano, S., & Isogai, T. (2005). Signal sequence and keyword trap in silico for selection of full-length human cDNAs encoding secretion or membrane proteins from oligo-capped cDNA libraries. *DNA Research*, 12(2), 117–126. Available at: <https://doi.org/10.1093/dnares/12.2.117>
- Pagliarini, V., Naro, C., & Sette, C. (2015). Splicing regulation: a molecular device to enhance cancer cell adaptation. *BioMed Research International*, 2015, 1-13. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/543067>
- Park, S. Y., Mi, S. J., Chang, W. H., Hak, S. Y., & Se, B. (2016). Structural and functional insight into proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 637–647. Available at: <https://doi.org/10.4014/jmb.1509.09051>
- Paronetto, M. P., Passacantilli, I., & Sette, C. (2016). Alternative splicing and cell survival: from tissue homeostasis to disease. *Cell Death and Differentiation*, 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.91>
- Plaffl, M. W. (2006). Relative quantification. In: Dorak, T. (Ed.), *Real-time PCR*. (pp. 63-82). *Taylor & Francis Group*.
- Poosarla, C., Ramesh, M., Ramesh, K., Gudiseva, S., Bala, S., & Sundar, M. (2015). Proliferating cell nuclear antigen in premalignancy and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(6), ZC39-41. Available at: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12645.6094>
- Pui, C. H., & Evans, W. E. (2013). A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology*, 50(3), 185–196. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.06.007>
- Pui, C., Mullighan, C. G., Evans, W. E., & Relling, M. V. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?, 120(6), 1–3. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-378943>.
- Ribera, J.-M. (2011). Advances in acute lymphoblastic leukemia in adults. *Current Opinion in Oncology*, 23(6), 692–699. Available at: <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32834bb854>
- Rivera L. (2010). Generalidades del cáncer infantil. En: Rivera L. (Ed.), *Protocolos técnicos en cáncer en niños*. (pp.1-8). México: Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia.
- Rivera L. (2010). Leucemia aguda linfoblástica de alto riesgo. En: Rivera L. (Ed.), *Protocolos técnicos en cáncer en niños*. (pp.31-43). México: Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia.
- Rose-Inman, H., & Kuehl, D. (2014). Acute leukemia. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32(3), 579–596. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.emc.2014.04.004>

- Ryan, B. M., & Faupel-Badger, J. M. (2016). The hallmarks of premalignant conditions: a molecular basis for cancer prevention. *Seminars in Oncology*, 43(1), 22–35. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.09.007>
- Sahebi, M., Hanafi, M. M., van Wijnen, A. J., Azizi, P., Abiri, R., Ashkani, S., & Taheri, S. (2016). Towards understanding pre-mRNA splicing mechanisms and the role of SR proteins. *Gene*, 587(2), 107–119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.057>
- Salehi, S., Taheri, M. N., Azarpira, N., Zare, A., & Behzad-Behbahani, A. (2017). State of the art technologies to explore long non-coding RNAs in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, XX(X), 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13238>
- Saltzman, A. L., Pan, Q., & Blencowe, B. J. (2011). Regulation of alternative splicing by the core spliceosomal machinery. *Genes and Development*, 25(4), 373–384. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.2004811>
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 21087–21113. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>
- Schmitt, A. M., & Chang, H. Y. (2017). Long noncoding RNAs: at the intersection of cancer and chromatin biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 1-16. doi: 10.1101/cshperspect.a026492
- Shen, F., Kirmani, K. Z., Xiao, Z., Thirlby, B. H., Hickey, R. J., & Malkas, L. H. (2011). Nuclear protein isoforms: implications for cancer diagnosis and therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(3), 756–760. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.23002>
- Singh, R., & Valcárcel, J. (2005). Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(8), 645–653. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb961>
- Smirnova, A. S., Ferreira-Silva, K. C., Mine, K. L., Andrade-Oliveira, V., Shulzhenko, N., Gerbase-DeLima, M., & Morgun, A. (2008). Differential expression of new LTA splice variants upon lymphocyte activation. *Molecular Immunology*, 45(1), 295–300. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.04.012>
- Smith, S. J., Hickey, R. J., & Malkas, L. H. (2016). Validating the disruption of proliferating cell nuclear antigen interactions in the development of targeted cancer therapeutics. *Cancer Biology & Therapy*, 17(3), 310–319. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1139247>
- Stoimenov, I., & Helleday, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 3), 605–613. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST0370605>
- Strzalka, W., & Ziemienowicz, A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*, 107(7), 1127–1140. Available at: <https://doi.org/10.1093/aob/mcq243>
- Sveen, A., Kilpinen, S., Ruusulehto, A., Lothe, R., & Skotheim, R. (2015). Aberrant RNA splicing in cancer: expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene*, 35(424), 2413–2427. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2015.318>

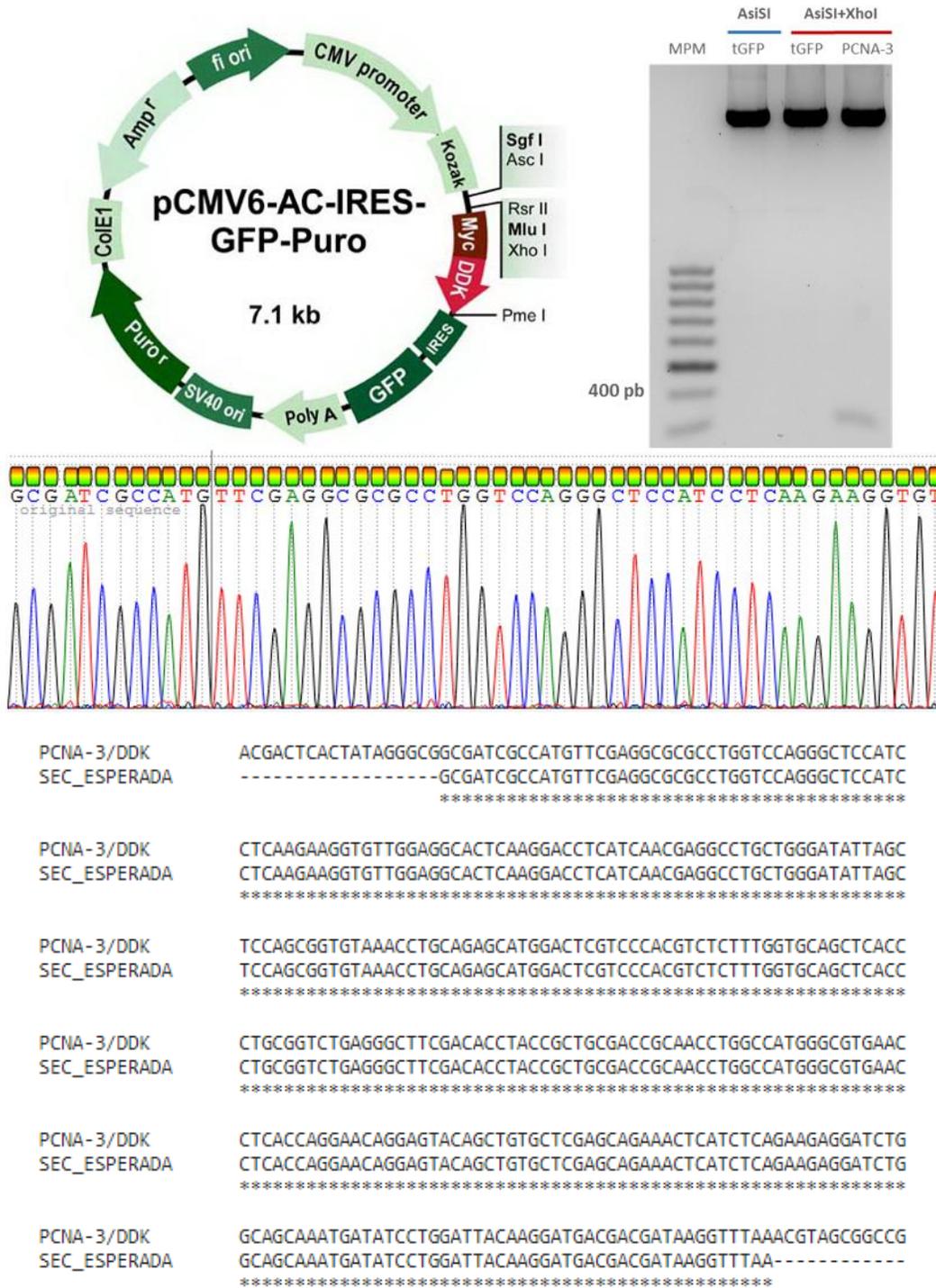
- Tabassum, D. P., & Polyak, K. (2015). Tumorigenesis: it takes a village. *Nature Reviews Cancer*, 15(8), 473–483. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc3971>
- Teachey, D. T., & Hunger, S. P. (2013). Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 162(5), 606–620. Available at: <https://doi.org/10.1111/bjh.12442>
- Turunen, J. J., Niemelä, E. H., Verma, B., & Frilander, M. J. (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(1), 61–76. Available at: <https://doi.org/10.1002/wrna.1141>
- UCSC Genome Browser. Available at: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> [Accessed: June, 2017]
- Ulrich, H. D. (2009). Regulating post-translational modifications of the eukaryotic replication clamp PCNA. *DNA Repair*, 8(4), 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.01.006>
- Ulrich, H. D., & Takahashi, T. (2013). Readers of PCNA modifications. *Chromosoma*, 122(4), 259–274. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0410-4>
- UniProt. Available at: <http://www.uniprot.org> [Accessed: June, 2017]
- Wahl, M. C., Will, C. L., & Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136(4), 701–718. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>
- Walmsley, S. R., McGovern, N. N., Whyte, M. K. B., & Chilvers, E. R. (2008). The HIF/VHL pathway: from oxygen sensing to innate immunity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(3), 251–255. Available at: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0331TR>
- Wang, G. S., & Cooper, T. A. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Reviews. Genetics*, 8(October), 749–761. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg2164>
- Wang, S. C. (2014). PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(4), 178–186. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.02.004>
- Wang, Y., Chen, D., Qian, H., Tsai, Y. S., Shao, S., Liu, Q., Dominguez, D., & Wang, Z. (2014). The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression. *Cancer Cell*, 26(3), 374–389. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.010>
- Wang, Z., & Burge, C. B. (2008). Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, 14(617), 802–813. Available at: <https://doi.org/10.1261/rna.876308.802>
- Witko-Sarsat, V., & Ohayon, D. (2016). Proliferating cell nuclear antigen in neutrophil fate. *Immunological Reviews*, 273(1), 344–356. Available at: <https://doi.org/10.1111/imr.12449>
- Xiong, Y., Zhang, H., & Beach, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*, 71(3), 505–514. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90518-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90518-H)

- Yin, L., Xie, Y., Yin, S., Lv, X., Zhang, J., Gu, Z., Sun, H., & Liu, S. (2015). The S-nitrosylation status of PCNA localized in cytosol impacts the apoptotic pathway in a Parkinson's disease paradigm. *PLoS ONE*, 10(2), 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117546>
- Yu, J. S. L., & Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*, 143(17), 3050–3060. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.137075>
- Yuan, S. X., Tao, Q. F., Wang, J., Yang, F., Liu, L., Wang, L. L., Zhang, J., Yang, Y., Liu, H., Wang, F., Sun, S. H., & Zhou, W. P. (2014). Antisense long non-coding RNA PCNA-AS1 promotes tumor growth by regulating proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 349(1), 87–94. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.029>
- Zhang, J., & Manley, J. L. (2013). Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discovery*, 3(11), 1228–1237. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0253>
- Zhang, A., Xu, M., & Mo, Y. Y. (2014). Role of the lncRNA-p53 regulatory network in cancer. *Journal of Molecular Cell Biology*, 6(3), 181–191. Available at: <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju013>
- Zhou, Z., & Fu, X. D. (2013). Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma*, 122(3), 191–207. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0407-z>
- Zuckerman, T., & Rowe, J. M. (2014). Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000prime Reports*, 6(59), 1-5. Available at: <https://doi.org/10.12703/P6-59>

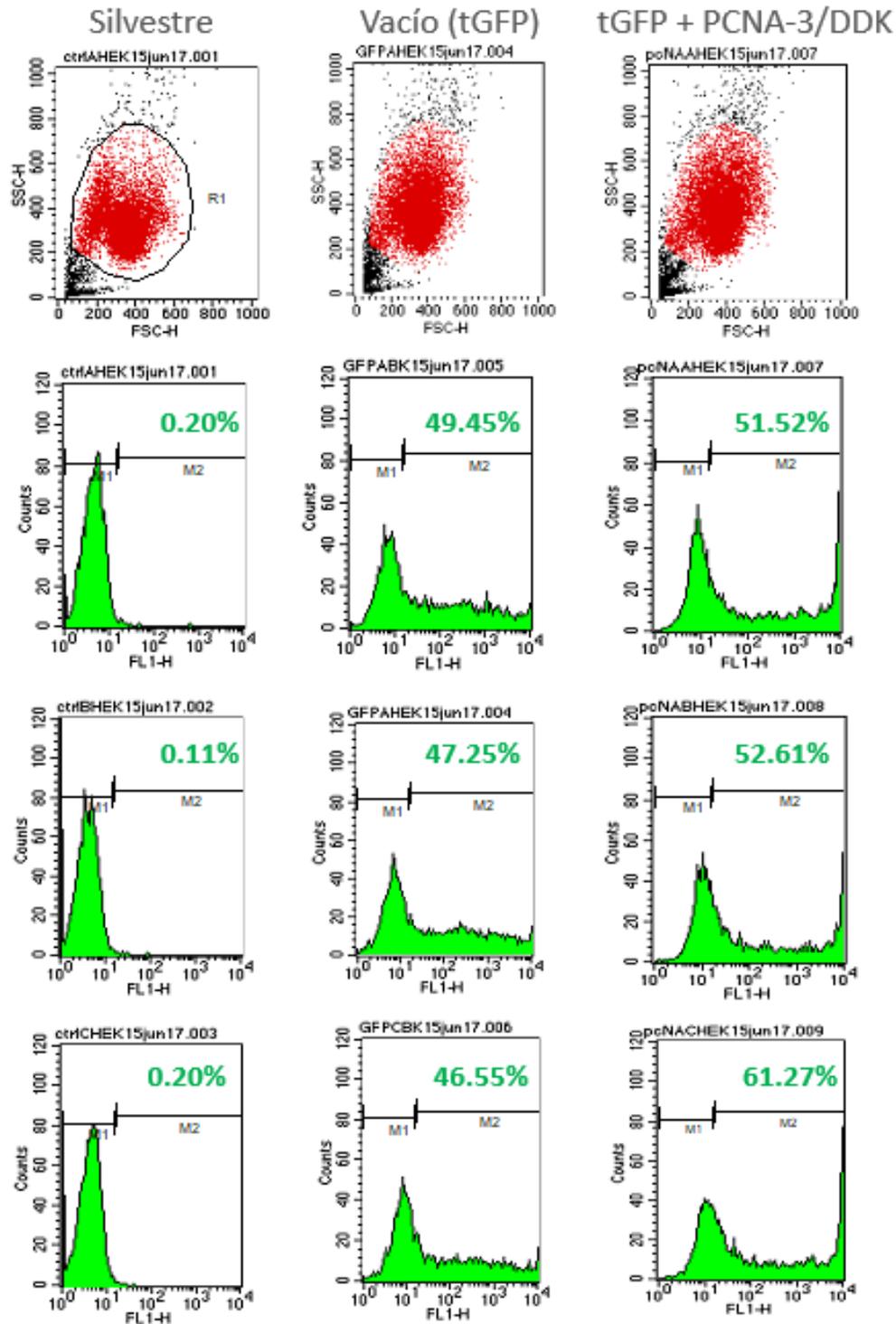
## 12. ANEXO



Anexo 1. Curvas estándar y gráficas *melting* obtenidas por RT-qPCR.



**Anexo 2. Validación de la construcción PCNA-3/DDK.** En la parte superior izquierda se señala el mapa del vector de expresión *pCMV6-AC-IRES-GFP-Puro* (#Cat. PS100059 Origene, USA) empleado en este estudio. En la parte superior derecha se muestra el gel de agarosa con la digestión enzimática (AsiSI + XhoI) del constructo PCNA-3/DDK que presenta un fragmento de 330 pb. En la parte inferior se muestra un segmento representativo del electroferograma obtenido de la secuenciación del constructo PCNA-3/DDK y el alineamiento múltiple que corrobora un porcentaje de identidad del 100% entre el marco de lectura de PCNA-3 fusionado a la marca Myc/DDK y la secuencia esperada. MPM, marcador de tamaño molecular.



**Anexo 3. Evaluación de la eficiencia de transfección mediante citometría de flujo.** Para cada grupo experimental se evaluaron 10,000 eventos por triplicado. Las eficiencias de transfección para cada grupo se señalan en porcentaje (color verde).