



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Caracterización de lncRNAs expresados  
diferencialmente durante la interacción entre  
células troncales derivadas del tejido adiposo y  
células de cáncer cérvico uterino**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**Victor Hugo Rosales Gallegos**



**Directora de tesis:  
M. en C. María del Rosario Castro Oropeza**

**Ciudad Universitaria  
Ciudad de México, 2019**



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.

1. Datos del alumno

Rosales  
Gallegos  
Victor Hugo  
246 651 04  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
311018723

2. Datos del tutor

M. en C.  
María del Rosario  
Castro Oropeza

3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Julio Isael  
Pérez  
Carreón

4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Víctor Julián  
Valdés  
Rodríguez

5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Karla Itzel  
Vázquez  
Santillán

6. Datos del sinodal 4

Dr.  
Ernesto  
Soto Reyes  
Solís

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de lncRNAs expresados diferencialmente durante la interacción entre células troncales derivadas del tejido adiposo y células de cáncer cérvico uterino.  
66 p  
2019

## **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Agradezco a la Dra. Vilma Maldonado Lagunas la oportunidad de estar en el laboratorio de Epigenética y todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Agradezco a mi tutora, la M. en C. María del Rosario Castro Oropeza, toda la dedicación, tesón y esfuerzo puestos en el desarrollo de este proyecto de tesis, así como por su mentoría y por todas las enseñanzas que me ha dejado.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo, por sus comentarios y por la orientación brindada:

Dr. Julio Isael Pérez Carreón	Instituto Nacional de Medicina Genómica
Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. Karla Itzel Vázquez Santillán	Instituto Nacional de Medicina Genómica
Dr. Ernesto Soto Reyes Solís	Universidad Autónoma Metropolitana.

Al Dr. Jorge Meléndez Zajgla por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo, así como por la ayuda otorgada a través de la beca de ayudante de investigador del CONACYT.

Al taller, Bases Moleculares de la Medicina Genómica y sus Aplicaciones, por abrirme las puertas del INMEGEN, así como a las investigadoras y alumnos del laboratorio de Epigenética por su acompañamiento, orientación y ayuda constantes.

«I may be choosing the laboratory, but my subject of research is governed by a patient»

«Patients tell stories to describe illness; doctors tell stories to understand it.  
Science tells its own story to explain diseases»

--Siddhartha Mukherjee

# Contenido

- Abreviaturas importantes ..... 5**
- I. Resumen ..... 6**
- II. Introducción..... 8**
  - II.I Cáncer ..... 8**
  - II.II Cáncer cérvico uterino ..... 10**
  - II.III Obesidad y cáncer..... 14**
  - II.IV Células troncales derivadas del tejido adiposo y su relación con el cáncer ..... 17**
  - II.V lncRNAs y cáncer..... 19**
- III. Antecedentes..... 25**
- IV. Justificación..... 28**
- V. Hipótesis ..... 28**
- VI. Objetivos ..... 28**
- VII. Material y métodos ..... 29**
- VIII. Resultados..... 35**
- IX. Discusión ..... 50**
- X. Conclusiones ..... 56**
- XI. Perspectivas ..... 57**
- XII. Referencias ..... 58**

## Abreviaturas importantes

<b>ADSC</b>	Células troncales derivadas del tejido adiposo (por sus iniciales en inglés)
<b>CaCU</b>	Cáncer cérvico uterino
<b>ddPCR</b>	droplet digital PCR (PCR digital en gotas)
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino (por sus iniciales en inglés)
<b>GDC</b>	Genomic Data Commons
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer
<b>IL6</b>	Interleucina 6
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IκBa</b>	Inhibidor α de NF-κB
<b>lncRNA</b>	RNA largo no codificante (por sus iniciales en inglés)
<b>MC</b>	Medio condicionado
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NIC</b>	Neoplasia intraepitelial cervical
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales (por sus iniciales en inglés)
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleíco
<b>RNA-seq</b>	Secuenciación masiva de RNA (por sus iniciales en inglés)
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativo en tiempo real
<b>TCGA</b>	The Cancer Genome Atlas

## I. Resumen

**Introducción:** En años recientes se ha identificado una relación entre el sobrepeso y la obesidad con el desarrollo de cáncer cérvico uterino (CaCU), existiendo un riesgo dos veces mayor de padecer CaCU en estas condiciones.

El sobrepeso y la obesidad se caracterizan por el incremento del tejido adiposo, el cual contiene una gran población de células troncales mesenquimales multipotentes conocidas como ADSC. Se ha observado que las ADSC son reclutadas por los tumores e incrementan las capacidades proliferativas, invasivas y metastásicas de las células tumorales mediante la secreción de citocinas y factores de crecimiento. Debido a los efectos que desencadenan las ADSC sobre el fenotipo tumoral y la asociación que se ha observado entre obesidad y CaCU, resulta de suma relevancia estudiar la interacción entre CaCU y ADSC. Nos interesamos en investigar esta interacción a nivel del transcriptoma no codificante, específicamente en los RNAs largos no codificantes (lncRNAs), ya que se encuentran desregulados en varios tipos de cáncer y juegan un papel importante en el desarrollo y progresión tumorales. Estas características hacen de los lncRNAs blancos terapéuticos potenciales y marcadores clínicos atractivos.

**Objetivo:** El presente trabajo pretende caracterizar la expresión, localización celular y la relevancia biológica de los lncRNAs con expresión diferencial durante el cocultivo de células de cáncer cérvico uterino con células troncales derivadas del tejido adiposo (ADSC).

**Metodología:** Para estudiar la interacción entre células de CaCU y ADSC, se realizaron ensayos de cocultivo *in vitro* en soportes permeables que permitieran el cultivo simultáneo de la línea celular HeLa y de ADSC durante veinticuatro horas, así como también se cultivaron células HeLa en medio condicionado de ADSC.

Para el análisis del transcriptoma se utilizaron datos obtenidos a partir de secuenciación masiva de RNA de células HeLa cocultivadas con ADSC y se identificaron los lncRNAs expresados diferencialmente durante el cocultivo comparado con el monocultivo de HeLa. La identidad de las muestras de secuenciación se determinó mediante análisis de componentes principales y agrupación por correlación en un Heat Map.

La expresión de los lncRNAs obtenidos fue cuantificada mediante droplet digital PCR (ddPCR). Con esta misma tecnología se determinó la expresión de los lncRNAs seleccionados en un panel de líneas celulares de CaCU. Además, mediante fraccionamiento celular y RT-qPCR se determinó la localización intracelular de los lncRNAs.

Para documentar la relevancia biológica de los lncRNAs diferencialmente expresados durante el cocultivo, se realizó una búsqueda bioinformática en las bases de datos de The Cancer Genome Atlas. Finalmente, se evaluó el papel

de la vía de NF- $\kappa$ B en la regulación transcripcional de los lncRNAs. Para ello se inhibió esta vía de señalización por medio de la sobreexpresión de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ -DN, un superrepressor de NF- $\kappa$ B.

**Resultados:** Se identificaron 819 lncRNAs con expresión diferencial en el transcriptoma de las células HeLa cocultivadas con ADSC. De este total, 337 mostraron un incremento en su expresión mientras que 482 se vieron disminuidos. Se determinó que tres lncRNAs mostraron una disminución de su expresión en cocultivo y en medio condicionado (lnc-NFYB-1, lncCOPS4-1:1 y lnc-COPS4-1:2) y dos más incrementaron su expresión durante el cocultivo (lnc-NUTM1-1 y HIF1A-AS2). Se determinó también que ambas isoformas de lnc-COPS4 colocalizan con el gen codificante PLAC8. Tanto PLAC8 como lnc-COPS4-1 disminuyen su expresión de forma muy similar en el cocultivo HeLa-ADSC. Sobresale el hallazgo de una correlación entre niveles de expresión altos de HIF1A-AS2 con una baja sobrevida de las pacientes con CaCU, con base en datos del GDC-TCGA. También se halló una relación entre la expresión disminuida del gen PLAC8 con una menor sobrevida.

Al caracterizar la localización celular de los lncRNAs, se precisó que lnc-NFYB-1, lnc-NUTM1-1 y HIF1A-AS2 se localizan predominantemente en la fracción nuclear, mientras que los transcritos lnc-COPS4-1:1 y lnc-COPS4-1:2 se encuentran mayormente en la fracción citoplasmática de las células HeLa. Por otra parte, la cuantificación de la expresión de lncRNAs en un panel de líneas celulares de CaCU mostró que no existe un patrón distintivo de expresión de lncRNAs entre los subtipos tumorales de CaCU. Estos resultados son congruentes con la información de la base de datos del GDC-TCGA. Finalmente, como resultado de la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B, se concluyó la ausencia de cambios significativos en la expresión de los lncRNAs mediados por la señalización canónica de NF- $\kappa$ B.

**Conclusión:** Los resultados presentados en este proyecto muestran que la expresión de lncRNAs se modifica en células HeLa como consecuencia de la interacción con ADSC. En el cocultivo HeLa-ADSC, se identificaron cinco lncRNAs cuya expresión no había sido reportada previamente en CaCU. Destaca el hecho de que la expresión de HIF1A-AS2 muestra un valor pronóstico negativo en la supervivencia de las pacientes con CaCU mientras que la expresión de PLAC8 posee un valor pronóstico positivo. Esto abre la posibilidad de ser utilizados como marcadores de pronóstico para CaCU.

Este trabajo posibilitó caracterizar la localización celular de los lncRNAs identificados en la interacción HeLa-ADSC, así como cuantificar su expresión. Además, permitió llegar a la conclusión de que la de señalización de NF- $\kappa$ B no regula la expresión de estos lncRNAs, al menos a través de su señalización canónica.

## II. Introducción

### II.I Cáncer

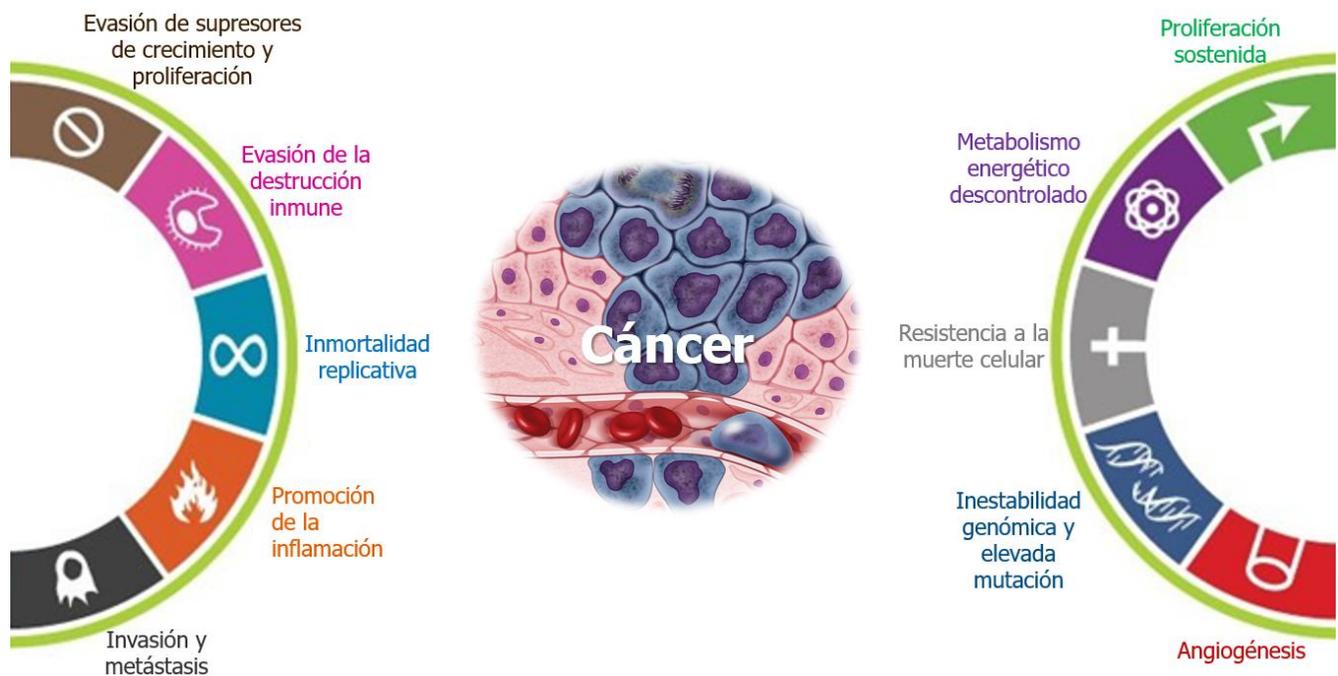
Cáncer es el término comúnmente empleado para denominar al conjunto de enfermedades caracterizadas por un crecimiento y proliferación anormal de las células que componen a un tejido, lo cual ocasiona la pérdida de la organización y composición normal del mismo. Este crecimiento descontrolado de células denominado neoplasia maligna, puede invadir tejidos cercanos e incluso propagarse a regiones distantes del cuerpo a través de los sistemas circulatorio y linfático, produciendo metástasis. Al perderse la estructura normal de los tejidos, se compromete su correcto funcionamiento y como consecuencia se afecta la salud del individuo en cuestión (Weinberg, 2013).

Existen más de 100 tipos distintos de cáncer descritos a la fecha, comúnmente denominados de acuerdo con su sitio anatómico de origen, por ejemplo, el origen del cáncer pulmonar radica en las células del pulmón, el cáncer mamario se origina en las células de la glándula mamaria y de manera similar puede ocurrir en todos los demás tejidos del cuerpo. También la gran diversidad de tumores que existen pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de tejido que les da origen, así los tumores originados en tejidos epiteliales escamosos son conocidos como carcinomas escamosos, aquellos originados en epitelios glandulares se denominan adenocarcinomas, o aquellos que se forman en hueso y tejidos blandos o fibrilares son llamados sarcomas, mientras que leucemia es el nombre que reciben los tumores sanguíneos (National Cancer Institute. NIH.).

Además de los tumores mencionados, existen muchos otros más que emergen de los diferentes tipos de tejidos que conforman el cuerpo. Sin embargo, a pesar de la gran diversidad y complejidad de los distintos tipos de tumores que existen, todos ellos comparten una serie de características comunes que les confieren a las células tumorales capacidades de proliferación, motilidad e invasión que no deberían poseer normalmente en condiciones de salud. Estas características moleculares que distinguen a las células de cualquier tumor se conocen como *hallmarks* del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

Los *hallmarks* del cáncer, incluyen capacidades biológicas como (1) autosuficiencia en las señales de crecimiento, (2) evasión de las señales supresoras de crecimiento, (3) resistencia a la muerte celular, (4) inmortalidad replicativa, (5) inducción de angiogénesis (6) activación de las capacidades de invasión y metástasis, (7) desregulación del metabolismo energético y (8) evasión del sistema inmune (Figura 1).

La adquisición de estos *hallmarks* se debe principalmente a dos propiedades de las neoplasias. La primera es la inestabilidad genómica que promueve la mutabilidad y dota a las células cancerosas de alteraciones genéticas que impulsan la progresión tumoral. La segunda es la formación de un microambiente tumoral que favorece la interacción con células no tumorales, entre ellas células del sistema inmune innato, lo cual desencadena un proceso inflamatorio que promueve el desarrollo de las capacidades malignas en las células neoplásicas.



**Figura 1. Los *Hallmarks* del cáncer son las capacidades biológicas alteradas que caracterizan a los tumores.** Estas características distintivas de las neoplasias incluyen mantener la señalización proliferativa, eludir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis. Otro par de cualidades clave de los tumores son las alteraciones en el metabolismo energético que favorecen la progresión tumoral, y la evasión de los mecanismos de destrucción por parte del sistema inmune. A todas estas características subyacen dos rasgos fundamentales que promueven dichos *hallmarks*: la inestabilidad genómica y la promoción de la inflamación. (Ilustración tomada y modificada del original de Hanahan & Weinberg, 2011).

Las enfermedades cancerosas son consideradas actualmente como uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial. Los resultados de GLOBOCAN (Ferlay *et al.*, 2015) indican que en 2012 hubo un estimado de 14.1 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en todo el mundo y alrededor de 8.2 millones de defunciones por cáncer. Para el final de 2018 se estiman 18.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes por cáncer (Bray *et al.*, 2018), además se espera que la incidencia de cáncer durante los próximos años continúe en aumento (B.W & Wild, 2014). Se pronostica que este incremento en el número de casos de cáncer será particularmente acentuado en los países en vías de desarrollo y México figura dentro de este grupo de países.

En países en vías de desarrollo los cánceres pulmonar, hepático y estomacal son los más predominantes entre el sexo masculino, mientras que en el sector femenino, el cáncer de mama es el más frecuente, seguido por el cáncer cérvico uterino (Ferlay *et al.*, 2015).

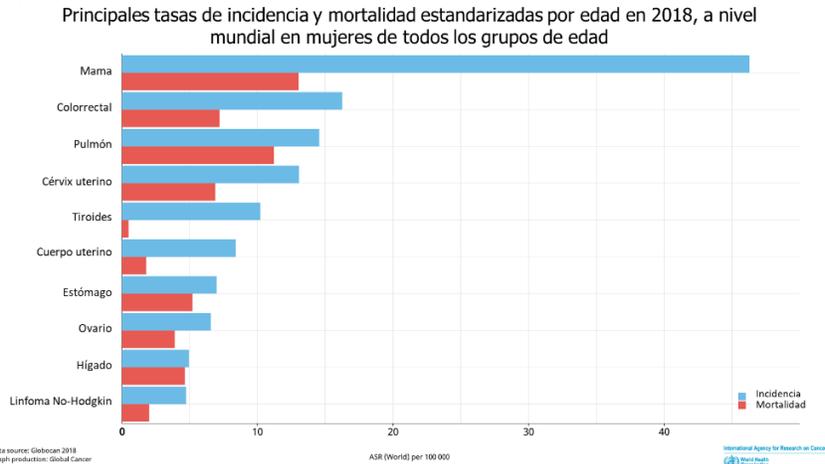
En México, el cáncer es un problema que requiere atención ya que la mortalidad por este tipo de enfermedades es muy elevada. En 2013, del total de defunciones en la población de 20 años y más, 13.6% se debieron a algún tumor maligno, destacando que en hombres los tumores con mayor tasa de mortalidad son los digestivos, intratorácicos y del sistema reproductor, mientras que en mujeres la primera y segunda causa de mortalidad por cáncer son el cáncer de mama y el cáncer cérvico uterino (INEGI, 2016). Es por ello que, en el presente trabajo de tesis, nos enfocamos en investigar la promoción del cáncer cérvico uterino debida a un exceso de tejido adiposo que exacerba las capacidades tumorales de este tipo de cáncer que sigue representando un serio problema de salud en nuestro país.

## **II.II Cáncer cérvico uterino**

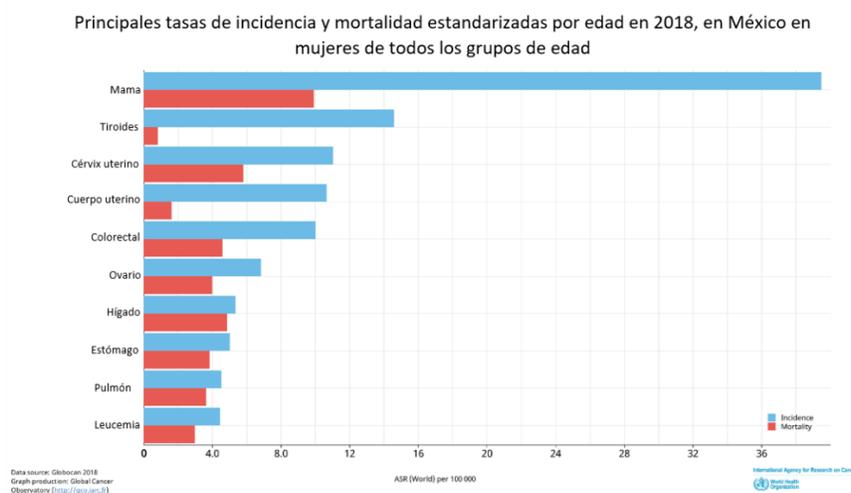
El cáncer cérvico uterino (CaCU) es el cuarto tipo de cáncer más frecuentemente presentado en mujeres a nivel global, con un estimado de 570 000 casos nuevos en 2018, la mayoría de los cuales se presentan en países en desarrollo. Además, la mortalidad por CaCU en el mundo es muy elevada, con un total de 311 000 defunciones en 2018 que representan el 7.5% de muertes por cáncer en mujeres, lo cual convierte al CaCU en el cuarto cáncer con mayor mortalidad femenina a nivel mundial ([Figura 2](#)) (Bray *et al.*, 2018).

En México el CaCU ocupa el segundo lugar en mortalidad por neoplasias en mujeres, con una tasa estandarizada de 5.8, y el tercer escaño en incidencia, tan sólo detrás del cáncer mamario y el cáncer de tiroides. Tan solo en 2018 se registró una tasa de incidencia estandarizada de 11.0 ([Figura 2](#)), lo cual representa un severo problema de salud. Se estima que en el país se proporciona atención médica aproximadamente a 9 000 mujeres con CaCU invasor y se registran 4 000 muertes anuales. También se ha visto que esta elevada morbilidad y mortalidad son debidas en gran parte a las desigualdades socioeconómicas imperantes en el país, las cuales excluyen de las estrategias de tamizaje, prevención y tratamiento del CaCU a los grupos poblacionales más pobres y desprotegidos (Sánchez-Barriga, 2012).

En años recientes la incidencia por CaCU en México ha mostrado una disminución moderada pasando de una incidencia estandarizada de 23.3 en el año 2012, a 11.0 en 2018. Esta disminución se debe a la aplicación de medidas preventivas y de tamizaje tales como la vacunación contra VPH y el tamiz por Papanicolau, las cuales a pesar de no tener una efectividad óptima, probablemente logren reducir la incidencia y mortalidad por CaCU (Gutiérrez-Delgado, *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de que el CaCU puede ser tratado quirúrgicamente o con radioterapia en fases tempranas, es imposible de curar cuando es hallado en fases invasivas y metastásicas. Por tal razón son necesarios nuevos abordajes terapéuticos específicos, así como marcadores de pronóstico y estrategias de vigilancia más precisas para esta enfermedad.



**Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial.** Tomado y modificado de Global Cancer Observatory (<http://pco.iarc.fr>)



**Figura 3. Incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres en México.** Tomado y modificado de Global Cancer Observatory (<http://pco.iarc.fr>)

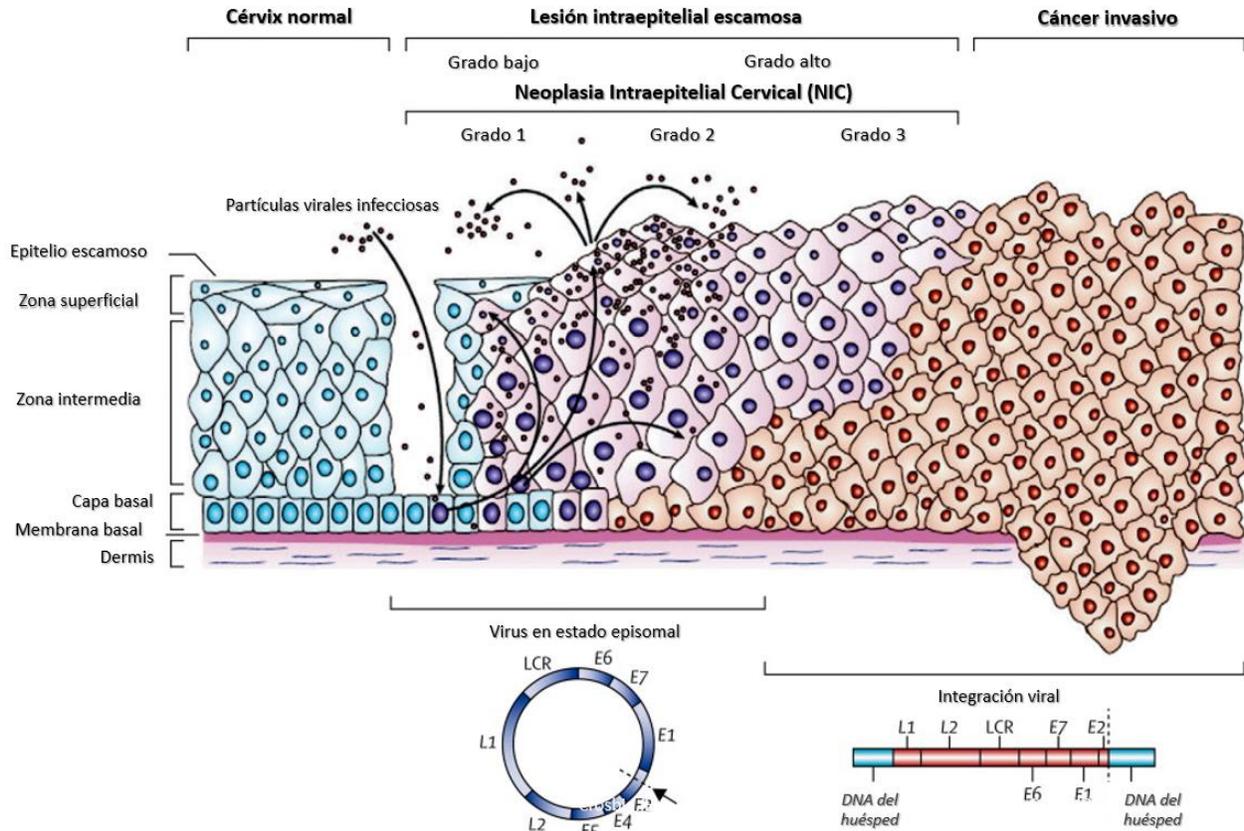
El desarrollo de CaCU está precedido por la aparición de neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) las cuales se clasifican dependiendo del grado de la lesión del epitelio. La aparición y progresión de NICs está estrechamente relacionada con la infección persistente de virus del papiloma humano (VPH) el cual es el principal agente etiológico del CaCU (Figura 4). La infección por VPH altera el control normal del ciclo celular, promoviendo la división celular descontrolada y la acumulación de daño genético que conllevan a un proceso carcinogénico (Crosbie, et al., 2013).

Prácticamente todos los casos de cáncer cérvico uterino en el mundo presentan infección por algún tipo de virus del papiloma humano de alto riesgo (Bosch et al., 2008), siendo los tipos más comunes el VPH 16, relacionado a

poco más del 50% de los casos de CaCU, y el VPH 18, al cual se le asocian cerca del 15% (Clifford, Smith, Plummer, Muñoz, & Franceschi, 2003). El porcentaje restante se atribuye a otros tipos de VPH menos frecuentes que también figuran como carcinógenos clasificados en el grupo 1 de la IARC (International Agency for Research on Cancer., 2007).

Histológicamente se reconocen dos tipos básicos de CaCU, el adenocarcinoma cervical y el carcinoma cervical de células escamosas, y corresponden con los tres subtipos moleculares que han sido caracterizados a la fecha; (1) el adenocarcinoma cervical, (2) el carcinoma cervical escamoso con alta expresión de citoqueratinas, y (3) el carcinoma cervical escamoso con baja expresión de citoqueratinas. Estos subtipos moleculares también están relacionados al tipo viral, ya que VPH 18 se encuentra enriquecido en adenocarcinomas y carcinomas escamosos bajos en citoqueratinas, mientras que el VPH 16 se encuentra en casi todos los escamosos altos en citoqueratinas.

A pesar de que la infección por VPH de alto riesgo es el principal factor para desarrollar CaCU, esta no es un factor determinante ya que solo una fracción de las lesiones precursoras (0-3.95% dependiendo de la edad y la región) progresan a cáncer invasor. Esto implica que se requiere la acción de factores adicionales, además del tipo viral, para favorecer el desarrollo tumoral (Hernández-Hernández et al., 2015). En la última década se ha propuesto que algunos de estos factores de riesgo adicionales tienen que ver con el estilo de vida y la salud nutricional, tal es el caso de factores como la baja ingesta de frutas y verduras, el sobrepeso y la obesidad (Arnheim Dahlström et al., 2011; Danaei et al., 2005).



**Figura 4. La infección y progresión de VPH se relaciona con el desarrollo gradual de las neoplasias cervicales.** La infección comienza cuando el virus alcanza las células basales a través de abrasiones del tejido epitelial. En esta etapa se expresan los genes tempranos del virus; E1, E2, E4, E5, E6 y E7 el genoma viral se replica de forma episomal. Cuando la replicación viral continua, la infección progresa a las capas celulares superiores y se expresan los genes tardíos L1 y L2 que permiten la formación de viriones. La progresión de la infección correlaciona con el grado de las lesiones cervicales y el grado de avance de la neoplasia hasta que el genoma viral se integra al genoma huésped y se pierde la función del gen E2 y como consecuencia se interrumpe la regulación de los genes oncovirales E6 y E7, los cuales desencadenan finalmente un cáncer invasor. (Tomado y modificado de Crosbie, Einstein, Franceschi, & Kitchener, 2013)

### II.III Obesidad y cáncer

La mayoría de los cánceres se asocian con factores de riesgo ambientales, ocupacionales o de estilo de vida. Factores de riesgo como el consumo de tabaco, la ingesta de alcohol, la exposición a contaminantes ambientales, así como la exposición a ambientes de trabajo con compuestos carcinógenos han sido relacionados a distintos tipos de cáncer. También las infecciones crónicas juegan un papel importante en los procesos carcinogénicos y en años recientes ha cobrado relevancia la relación que existe entre la dieta, la actividad física y la obesidad con el desarrollo y progresión de tumores (B.W & Wild, 2014).

Tanto el sobrepeso como la obesidad han sido identificados como factores de riesgo importantes para el desarrollo del cáncer, primordialmente de colon, páncreas, esófago, riñón, endometrio y mama (Key, Spencer, & Reeves, 2010). La Organización Mundial de la Salud define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa. El principal indicador que permite identificar el sobrepeso y obesidad en adultos es el índice de masa corporal (IMC) el cual se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Un IMC igual o superior a 25 indica sobrepeso, mientras que un IMC igual o superior a 30 indica obesidad.

Evidencia epidemiológica muestra que existe una relación proporcional entre el IMC y el incremento en el riesgo de padecer estos tipos de cáncer (Renehan, Tyson, Egger, Heller, & Zwahlen, 2008). Además, la mortalidad por cáncer también incrementa de forma lineal junto con el IMC, llegando a ser hasta un 70% mayor la probabilidad de morir por cáncer de una persona con obesidad mórbida en comparación con un paciente en normopeso (Berrington de Gonzalez et al., 2010; Parekh et al., 2012)

Varios estudios epidemiológicos que relacionan el IMC con la incidencia y mortalidad con diversos tipos de cáncer han mostrado que el CaCU es uno de los más afectados por un IMC elevado, llegándose a identificar un riesgo dos veces mayor de padecer adenocarcinoma cervical entre mujeres con sobrepeso y obesidad, además de un riesgo ligeramente incrementado de padecer carcinoma cervical escamoso (Lacey et al., 2003). También en un estudio retrospectivo que incluyó a 944, 227 mujeres se documentó que las pacientes obesas desarrollaron un riesgo mayor de padecer CaCU, y que aproximadamente el 20% de los casos de CaCU podrían ser atribuidos al sobrepeso y obesidad en las mujeres del citado estudio (Clarke et al., 2018). Mientras tanto, en otro estudio retrospectivo se llegó a la conclusión de que el control de peso en las pacientes con CaCU podría mejorar la sobrevida, ya que fue hallada una relación entre valores extremos del IMC con una disminución significativa de la sobrevida promedio de las pacientes (Clark et al., 2016).

Esta asociación entre sobrepeso, obesidad y cáncer representa un grave problema ya que a nivel mundial la obesidad se ha triplicado desde 1975 con cerca de 1.9 mil millones de adultos con sobrepeso en 2016 (World Health

Organization, 2018). En el caso particular de México, la obesidad y sobrepeso son algunos de los retos más grandes que enfrenta en materia de salud pública. Los datos publicados por los países miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, ubican a nuestro país como el segundo lugar en prevalencia de sobrepeso y obesidad, precedidos únicamente por Los Estados Unidos de América (OECD, 2017). Actualmente 1 de cada 3 niños y adolescentes, y 7 de cada 10 adultos mexicanos padecen sobrepeso y obesidad, además, se estima que para el año 2030 cerca del 39% de la población se encontrará en esta misma situación (Ruiz Matus et al., 2016). En este sentido se vuelve apremiante prevenir y reducir el sobrepeso y la obesidad, así como investigar los procesos patológicos que favorecen el desarrollo de enfermedades como el cáncer, con la finalidad de diseñar nuevas herramientas clínicas para estos padecimientos.

Es bien sabido que la obesidad tiene grandes repercusiones a nivel endócrino y metabólico, alteraciones fisiológicas que se han relacionado con un mayor desarrollo y progresión tumoral (IARC, 2002). En este estado de obesidad el tejido adiposo pierde su homeostasis metabólica y promueve un proceso inflamatorio generalizado debido a una mayor producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL6). También ocurre una desregulación del metabolismo de triglicéridos y la síntesis de hormonas esteroideas, lo cual se asocia con una proliferación sostenida y mayor viabilidad de las células tumorales (Khandekar, Cohen, & Spiegelman, 2011).

Se ha observado que las células tumorales presentan mayor proliferación e inhibición de la apoptosis debido a la señalización aberrante de factores asociados a la obesidad como la resistencia a insulina y la modificación en los niveles del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1). Además, la alteración de los niveles de leptina y adiponectina, características del fenotipo obeso, contribuye a la inducción de angiogénesis, la progresión tumoral y al incremento del potencial metastásico (Calle & Kaaks, 2004). Sin embargo, a pesar de que se han establecido asociaciones entre el desequilibrio homeostático provocada por la obesidad y su relación con la progresión tumoral, la mayoría de los mecanismos celulares y moleculares precisos que se involucran en la interacción obesidad-cáncer aún permanecen desconocidos.

## II.IV Células troncales derivadas del tejido adiposo y su relación con el cáncer

A comienzos del siglo XXI se halló que el estroma del tejido adiposo, el cual se encuentra enriquecido en condiciones de obesidad, contiene una gran población de células troncales mesenquimales multipotentes (Zuk et al., 2001) conocidas como células estromales adiposas o células troncales derivadas del tejido adiposo, ADSC por sus siglas en inglés, las cuales se localizan en la región perivascular del tejido adiposo.

Al igual que cualquier célula troncal, las ADSC poseen la capacidad de autorrenovarse o diferenciarse en múltiples linajes celulares y debido a su abundancia y accesibilidad en el tejido adiposo resultan candidatas atractivas para ser utilizadas en la medicina regenerativa. La caracterización fenotípica exacta de las ADSC aún está en desarrollo pero de manera general pueden ser identificadas por la expresión de los marcadores de superficie CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>+/-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>, y CD146<sup>-</sup> (Wankhade et al., 2016).

Además de diferenciarse en células maduras del tejido adiposo, de manera natural las ADSC se diferencian en células endoteliales y de músculo blando en la fracción vascular estromal. Estas células endoteliales nuevas se acoplan a los vasos sanguíneos recién formados durante la angiogénesis. Muy probablemente, las ADSC también dan origen a los pericitos, participando activamente en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Lin et al., 2010). También se ha observado que las ADSC son reclutadas a sitios dañados y participan en la reparación y regeneración de tejidos (Saito et al., 2014).

Es debido a esta plasticidad de las ADSC que numerosas publicaciones científicas proponen el uso de ADSC como agentes terapéuticos particularmente para la regeneración, reconstrucción y reemplazo de tejidos dañados (Cheng, Kuo, Kuo, & Hsiao, 2011; Wankhade et al., 2016). Sin embargo, en años recientes se ha observado que las ADSC son reclutadas por los tumores y contribuyen a incrementar los componentes estromales del microambiente tumoral.

A través de la secreción de citocinas y factores de crecimiento, las ADSC incrementan las capacidades proliferativas, invasivas y metastásicas de las células tumorales (Kidd et al., 2012). Se ha generado controversia al respecto del

efecto de las ADSC debido a que algunos autores han llegado a proponer el uso de ADSC como potenciales terapéuticos antitumorales, ya que han reportado que la acción de las ADSC puede inhibir la proliferación de las células cancerosas (Cousin et al., 2009).

El modelo que ha permitido estudiar más a detalle la interacción entre células tumorales y las ADSC es el cocultivo indirecto de células ADSC con células tumorales en cámaras separados por una membrana permeable que permiten el libre intercambio de proteínas y metabolitos secretados al medio. Se ha reportado que las ADSC incrementan el fenotipo maligno en las células cancerosas, por ejemplo, en cáncer de ovario las ADSC incrementan la proliferación y migración (Nowicka et al., 2013), mientras que en cáncer de pulmón, mama y colón se ha demostrado un mayor crecimiento tumoral debido al efecto de las ADSC. Esta células secretan interleucina 6 la cual actúa sobre las células tumorales activando la vía de JAK2/STAT3 (Lu et al., 2016; Wei et al., 2015). También se ha reportado que las células de osteosarcoma incrementan su proliferación y capacidad metastásica al ser cocultivadas con ADSC y al mismo tiempo incrementa la señalización de STAT3 (Y. Wang et al., 2017). En contraste, se ha descrito que la presencia de las ADSC induce arresto del ciclo celular y apoptosis en líneas celulares de cáncer de vejiga y hepatocarcinoma celular involucrando señalización a través de la vía de Akt (Yu et al., 2015; W. Zhao et al., 2012)

Por otro lado, en modelos *in vivo* donde se coinyectan células tumorales y ADSC se ha notado un incremento en la vascularización de tumores derivados de endometrio (Klopp et al., 2012). También ha sido reportado el reclutamiento de ADSC hacia el tumor a través del eje CXCL12/CXCR4 y la presencia de las ADSC ha favorecido una mayor vascularización mediada por FGF2 en células de cáncer de próstata (G. Lin et al., 2010). Estos reportes contrastan con un efecto opuesto observado *in vivo* en adenocarcinoma ductal pancreático, en el cual la coinyección de ADSC con células tumorales mostró una inhibición prolongada del crecimiento tumoral (Cousin et al., 2009).

Bastante ya se ha conocido al respecto de los cambios de expresión de genes codificantes durante la interacción entre ADSC y varios tipos de cáncer (Strong et al., 2015), pero poco se sabe al respecto de los cambios en el transcriptoma no codificante constituido por RNAs pequeños no codificantes y RNAs largos no codificantes, conocidos estos últimos como lncRNAs por sus siglas en inglés. Cabe mencionar que la relación entre ADSC y cáncer cérvico uterino aún no ha sido reportada, por lo cual los efectos de la interacción ADSC-CaCU permanecen

desconocidos, especialmente en lo referente al transcriptoma no codificante. Este es uno de los motivos que nos lleva a plantearnos el presente trabajo de investigación.

## II.V lncRNAs y cáncer

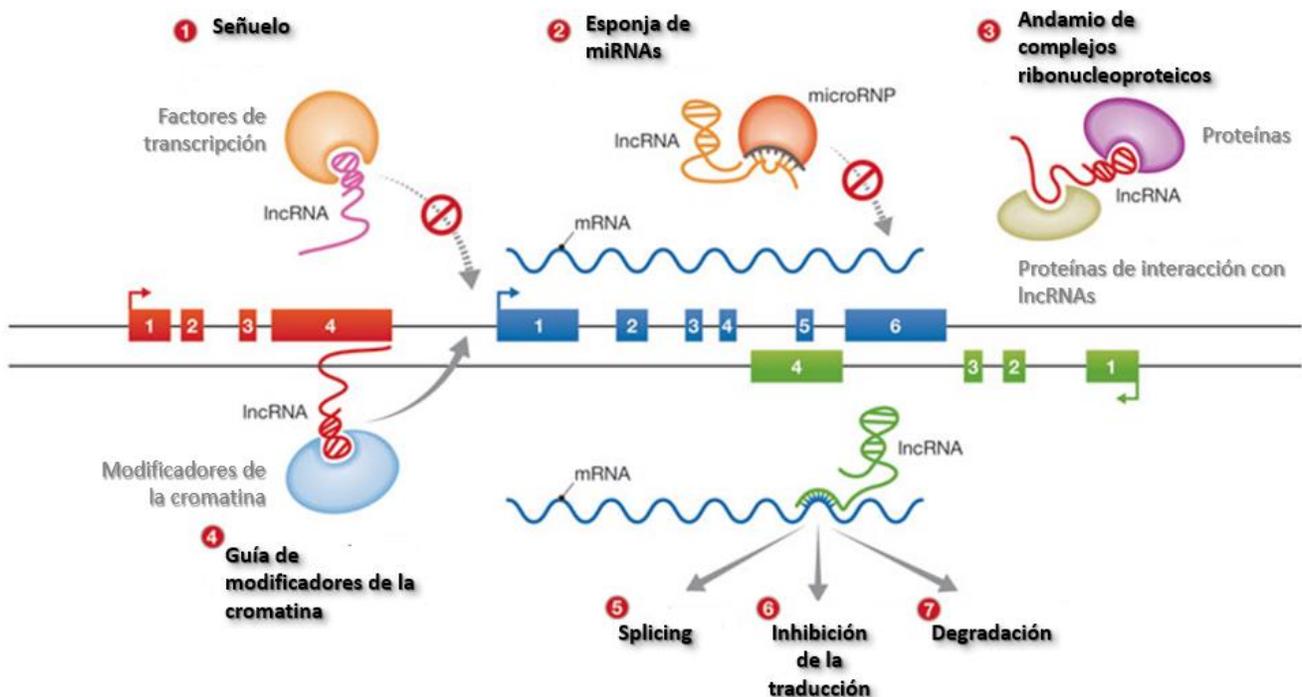
Los RNAs largos no codificantes, o lncRNA por sus siglas en inglés, son transcritos de tamaño superior a 200 nucleótidos, los cuales regularmente atraviesan por procesos de *splicing* y poliadenilación y que carecen de potencial codificante de proteínas (Garibotti, Cervellini, & Piccolo, 2009). Esta clase de genes no codificantes fue descubierta con el advenimiento de las tecnologías genómicas que permitieron el análisis de secuencias de genoma y transcriptoma completo. Estos análisis de secuenciación, junto con el uso de microarreglos, revelaron que el genoma codifica al menos la misma cantidad de lncRNAs como de genes codificantes de proteínas (Bertone et al., 2004) Esto llevó a la conclusión de que no sólo las regiones codificantes se transcriben, sino también la mayor parte del genoma. A este fenómeno se le conoce como transcripción penetrante o *pervasive transcription* (Carninci et al., 2005; ENCODE Consortium, 2007).

A pesar de que el nivel de conocimiento sobre cómo actúan en la célula los lncRNAs y cuál es el rol que desempeñan en los procesos patológicos es limitado, paulatinamente se ha descubierto que estos juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica a distintos niveles que incluyen modificaciones de la cromatina, así como regulación transcripcional y postranscripcional.

Entre algunos de los ejemplos más notables del papel funcional que desempeñan los lncRNAs, podemos mencionar a el lncRNA *Xist* (*X inactive-specific transcript*), el cual es responsable del silenciamiento del cromosoma X en los mamíferos hembra. Este gen no codificante se transcribe a partir de uno de los dos cromosomas X e interactúa con el complejo represor de polycomb 2 (PRC2) que instala la marca de trimetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27me3), lo cual resulta en la formación de heterocromatina y permite el silenciamiento de uno de los cromosomas X y la compensación de dosis génica (J. Zhao, Sun, Erwin, Song, & Lee, 2008).

Otro fenómeno biológico importante en que se involucran RNAs largos no codificantes es la impronta génica, en la cual los lncRNAs permiten la distinción específica entre el alelo materno y el paterno de un mismo gen, como ocurre con los lncRNAs *Air* y *Kcnq1ot1*, los cuales interactúan con la metilasa de la lisina 9 de la histona H3 G9a, actuando en *cis* para establecer la marca H3K9me3 y silenciar transcripcionalmente los loci *Igf2r* y *Kcnq1*, respectivamente (Nagano et al., 2008; Pandey et al., 2008).

Los mecanismos de acción de los lncRNAs son muy variados, lo cual los hace moléculas muy versátiles capaces de efectuar diversas acciones y participar en la regulación de la expresión génica de múltiples maneras y en distintos niveles, razón por la cual encajonarlos en una sola clasificación es una tarea muy complicada debido a la multiplicidad de criterios y formas en que pueden ser agrupados (St. Laurent, Wahlestedt, & Kapranov, 2015). Usualmente se puede clasificar a los lncRNAs de acuerdo con su posición en el genoma o al mecanismo de acción molecular que poseen (Figura 5).



**Figura 5. Los RNAs largos no codificantes poseen distintos mecanismos de acción.** (Tomado y modificado de Hu, Alvarez-Dominguez, & Lodish, 2012)

Por su posición en el genoma con relación a los genes codificantes, los lncRNAs pueden ser definidos como lncRNAs antisentido si se transcriben en la hebra complementaria de su contraparte codificante. Los lncRNAs intrónicos comienzan su transcripción a partir de la región intrónica de algún gen codificante y no se sobrelapan con ningún exón de este. Los lncRNAs bidireccionales comparten la región promotora con un gen codificante pero la transcripción de los dos genes ocurre en sentidos y hebras opuestas que divergen a partir de la región promotora común. Finalmente, los lncRNAs intergénicos son aquellos que se encuentran completamente separados de algún gen codificante aledaño (Rinn & Chang, 2012).

De acuerdo con el mecanismo molecular a través del cual ejercen su función los lncRNAs pueden ser:

- *Adaptadores y andamios.* Muchos lncRNAs permiten la interacción de diferentes grupos de proteínas formando complejos ribonucleoproteicos con capacidades regulatorias.
- *Guías.* Estos lncRNAs permiten el reclutamiento de proteínas reguladoras de la cromatina hacia sus blancos específicos.
- *RNAs enhancer.* Son un tipo particular de lncRNAs guías que permiten el anclaje de proteínas en regiones específicas del DNA permitiendo la formación de asas de cromatina propias de una interacción de tipo *enhancer*.
- *Señuelos.* Este tipo de lncRNAs se unen a factores de transcripción y evitan que interactúen con sus blancos.
- *Competidores endógenos/esponjas de miRNAs.* Actúan a nivel postranscripcional uniéndose a microRNAs y evitando que estos se unan con sus mRNAs blanco.
- *Reguladores de mensajeros.* Estos modulan el procesamiento de algunos mRNAs, regulando su splicing, degradación o traducción.

Dado que son elementos muy versátiles en la regulación génica, muchos lncRNAs se ven desregulados en diferentes tipos de cáncer y juegan un papel importante en el desarrollo y progresión tumorales, algunos de ellos participando como oncogenes o supresores tumorales, además de que pueden ser capaces de alterar el panorama epigenético

de los tumores (Forrest & Khalil, 2017). Estas particularidades de los lncRNAs los convierten en transcritos funcionales que promueven de manera activa los *hallmarks* del cáncer, motivo por el cual se han convertido en blancos terapéuticos potenciales y marcadores clínicos atractivos.

Existen varios casos descritos del papel funcional de algunos lncRNAs en distintos tipos tumorales. Por ejemplo, la sobreexpresión de lncRNA *HOTAIR* promueve la metástasis en células de cáncer de mama a través del silenciamiento epigenético del grupo de genes *HOXD* mediado por el complejo polycomb PRC2, el cual es responsable de la dimetilación y trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me2/3) a través de sus subunidades enzimáticas EZH1 y EZH2 (Gupta et al., 2010). Otro caso es el del lncRNA asociado a cáncer de próstata *PCA3*, el cual fue el primer lncRNA en ser relacionado con el desarrollo de cáncer debido a su expresión aberrante en tumores prostáticos y actualmente se ha propuesto como biomarcador de diagnóstico para este tipo de cáncer (Hessels et al., 2003).

Los lncRNAs también son capaces de disminuir la actividad de complejos remodeladores de la cromatina y factores de transcripción, tal es el caso del lncRNA *SCHLAP1*. Este impide la actividad de supresión del complejo remodelador del nucleosoma SWI/SNF, y sus niveles de expresión se relacionan con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de próstata (Prensner et al., 2013). Otro ejemplo es el del lncRNA *GAS5*, el cual funciona como señuelo, bloqueando la interacción del receptor de glucocorticoides (GR) con sus secuencias blanco, impidiendo la proliferación aberrante mediada por la activación génica dependiente de GR (Kino et al., 2010).

Los lncRNAs participantes en cáncer no sólo afectan la expresión de genes localizados en diferentes cromosomas tal como se ha ejemplificado hasta el momento. También varios lncRNAs que actúan en *cis* participan en los procesos tumorales como el lncRNA-p21, cuya expresión se induce de manera dependiente de p53 en respuesta al daño al DNA. Este lncRNA-p21 regula en *cis* a *CDKN1A* favoreciendo el arresto del ciclo celular de forma dependiente de p21 (Dimitrova et al., 2014). La deficiencia en este lncRNA en las células tumorales promueve la pérdida de control del ciclo celular en G1/S, lo cual conlleva a una proliferación aberrante.

En varios tipos de cáncer ya han sido descritos los efectos biológicos de una creciente variedad de lncRNAs. Sin embargo, los estudios de lncRNAs en CaCU aún son necesarios. A la fecha se han descrito poco más de treinta

lncRNAs implicados en este tipo de cáncer ([Tabla 1](#)), participando algunos de ellos en procesos de progresión, invasión, metástasis y algunos otros en la evasión de apoptosis y resistencia a agentes terapéuticos.

Uno de estos lncRNAs descritos en CaCU es *HOTAIR*, cuya expresión se encuentra elevada en los tejidos tumorales y correlaciona con el estadio clínico y el volumen tumoral de las pacientes, razones por las cuales su función está ligada a la progresión tumoral. Además, la expresión de *HOTAIR* se asocia a los fenómenos de recurrencia tumoral y a una menor supervivencia, características que lo convierten en un potencial marcador pronóstico en CaCU (Huang et al., 2014). También se ha visto que este lncRNA es capaz de promover la agresividad tumoral en células de CaCU a través de la regulación positiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la metaloproteínasa de matriz MMP-9 y genes relacionados con la transición epitelial-mesenquimal (EMT) (Kim et al., 2015).

Otro ejemplo es el lncRNA de unión con *EZH2* en cáncer cérvico uterino, mejor conocido como lncRNA-*EBIC* por sus siglas en inglés. Este transcrito se encuentra sobreexpresado en CaCU y es capaz de reclutar a *EZH2* hacia *E-cadherina* y otros genes blanco, catalizando la marca de silenciamiento epigenético H3K27me3 (Sun et al., 2014).

Por otro lado, algunos lncRNAs cuya expresión se encuentra disminuida en CaCU son los transcritos denominados *growth arrest-specific transcript 5 (GAS5)*, *XLOC\_010588 tumor suppressor candidate 8 (TUSC8)* y el *lncRNA low expression in tumor (lncRNA-LET)*. La expresión disminuida de estos genes se encontró relacionada con el estadio clínico y la supervivencia de las pacientes, además de asociarse a las capacidades de proliferación, invasión y migración de las células tumorales (Cao et al., 2014; Jiang et al., 2015; Liao et al., 2014).

Como se ha ejemplificado, algunos lncRNAs se han propuesto como potenciales marcadores de diagnóstico y pronóstico o como blancos terapéuticos para cáncer cérvico uterino. Sin embargo, a comparación de otros tipos de cáncer, el número de lncRNAs que han sido descritos para CaCU es reducido y los mecanismos exactos por los cuales actúan en CaCU aún son desconocidos (Peng et al., 2016). A la fecha no se conocen los lncRNAs que distinguen al CaCU entre el resto de los tipos tumorales, ni tampoco se sabe si pueden estar implicados en la interacción con las células del microambiente tumoral como las ADSC. Estos son sólo algunos motivos por los cuales se hace necesario caracterizar a los lncRNAs con funciones biológicas relevantes en CaCU, teniendo como propósito final ofrecer potenciales soluciones clínicas para esta enfermedad.

**Tabla 1. lncRNAs relacionados con cáncer cérvico uterino**

lncRNA	Expresión aberrante en CaCU	Función biológica o relevancia clínica en CaCU	Mecanismo molecular	Referencia
GAS5	Disminuida	Predecir la supervivencia. Promover la migración e invasión celulares.	Señuelo del receptor de glucocorticoides.	Cao et al., 2014
HOTAIR	Aumentada	Predecir recurrencia y prognosis. Incrementar migración e invasión.	Regular positivamente a VEGF, MMP-9 y genes de EMT	Kim et al., 2015
EBIC	Aumentada	Incremento en la capacidad invasiva	Unión a EZH2 y silenciamiento de E-cadherina	Sun et al., 2014
LET	Disminuida	Predecir la supervivencia	(Sin describir)	Jiang et al., 2015
TUSC8 (XLOC_010588)	Disminuida	Predecir la supervivencia	Inhibe la expresión de c-Myc y disminuye la proliferación	Liao et al., 2014
MEG3	Disminuida	Inhibir la proliferación y promover la apoptosis	Induce arresto celular en G2/M	Qin et al., 2013
ANRIL	Aumentada	Favorece el progreso del ciclo celular	Inhibe a p21	Naemura et al., 2015
MALAT1	Aumentada	Inhibe la apoptosis	Regula a caspasa-3, caspasa-8, Bax, Bcl-2 y BclxL	Guo et al., 2010
CCAT2	Aumentada	Promueve la progresión del ciclo celular en G1	(Sin describir)	Wu et al., 2016
PVT1	Aumentada	Disminuida supervivencia e incrementada invasión, proliferación y metástasis	Unión con EZH2 y silenciamiento de miR-200b	Zhang et al., 2016
HULC	Aumentada	Correlación con el estadio e invasión tumoral	(Sin describir)	Wang et al., 2016
XLOC_006390	Aumentada	Promoción de tumorigénesis y metástasis	Posible competidor endógeno de miR-331-3p y miR-338-3p	Luan & Wang, 2018
ATB	Aumentada	Predictor de supervivencia y estadio tumoral	(sin describir)	Cao et al., 2017
NNT-AS1	Aumentada	Relacionado a la progresión tumoral, disminuida supervivencia, mayor proliferación e invasión celular.	Activación de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina	Hua et al., 2017
SRA	Aumentada	Progresión tumoral, proliferación y migración	Activación de genes de EMT y de la vía NOTCH	Eoh et al., 2017

### III. Antecedentes

Trabajos previos en nuestro laboratorio aislaron y caracterizaron células ADSC a partir de pacientes obesas premenopáusicas con un IMC >30, no fumadoras y sin padecimientos crónicos degenerativos. Las ADSC se aislaron mediante digestión con colagenasa I y centrifugación diferencial. Su inmunofenotipo fue corroborado mediante citometría de flujo. Posteriormente estas células fueron cocultivadas con células HeLa, se extrajo RNA de esta línea celular de CaCU y se realizó secuenciación masiva de RNA (RNAseq) mediante la plataforma de Illumina GAI (Alanís-Manríquez, 2015; Diaz-Gastelum, 2016). A partir de estos datos de secuenciación se realizó un análisis bioinformático del transcriptoma codificante de las células HeLa en interacción con ADSC. A través del análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA) y del análisis de vías de transducción con el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA), se predijo que una de las principales vías de señalización activadas es la vía de NF- $\kappa$ B (Castro-Oropeza, 2019. Manuscrito en preparación).

NF- $\kappa$ B es el nombre que distingue a una familia de cinco factores de transcripción: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF $\kappa$ B1 (p50/p105) y NF $\kappa$ B2 (p52/p100). Estos factores controlan la expresión de un gran número de genes relacionados con procesos inmunológicos, de desarrollo, proliferación, supervivencia, angiogénesis y metástasis (Hayden & Ghosh, 2004). NF $\kappa$ B1 y NF $\kappa$ B2 se originan a partir de precursores proteínicos llamados p105 y p100 y contienen un dominio N-terminal RDH (*Rel homology domain*), necesario para la dimerización y unión al DNA, y un dominio de repetición de ankirina C-terminal. Este dominio de ankirina al ser procesado por el proteasoma permite que p105 y p100 den origen a p50 y p52.

Por otra parte, las proteínas RelA (p65), RelB y c-Rel además de contener el dominio RDH poseen un dominio de activación transcripcional C-terminal (TAD), del cual carecen NF $\kappa$ B1 y NF $\kappa$ B2. Todos estos factores de transcripción de la familia NF $\kappa$ B homodimerizan o heterodimerizan, y solo aquellos dímeros con TAD serán capaces de activar la transcripción, por lo que los dímeros formados entre p50 y p52 solo ocuparán y bloquearán los sitios de unión al DNA de NF $\kappa$ B, pero no promoverán la transcripción (Hayden & Ghosh, 2008).

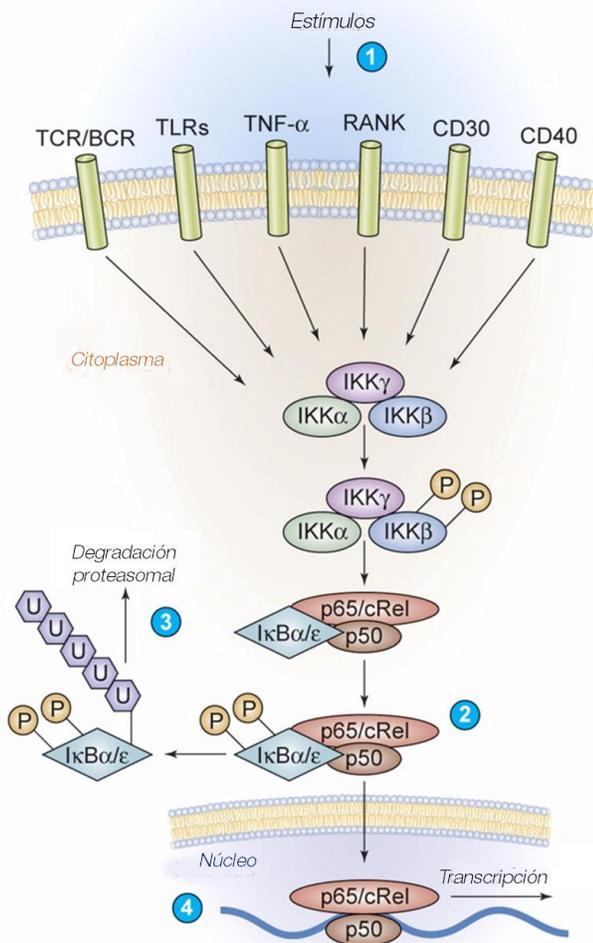
En un estado inactivo de la vía, las proteínas inhibidoras (I $\kappa$ B) retienen a las subunidades de NF $\kappa$ B fuera del núcleo ocultando la secuencia de localización nuclear de estas subunidades e impidiendo su función como activadores

transcripcionales. Cuando se induce la señalización canónica de NFκB, el complejo IκB cinasa (IKK) se activa y fosforila a las proteínas IκB (IκBα, IκBβ and IκBε) lo cual promueve su ubiquitinación y subsecuente degradación vía proteasoma. Así, al degradarse IκB, las subunidades de NFκB son libres de translocarse al núcleo y ejercer su función. En el caso de la señalización no canónica, la cinasa de inducción de NFκB (NIK) se sintetiza *de novo* y activa a complejos homodiméricos de IKKα, el cual a su vez fosforila a p100. Una vez fosforilada, p100 sufre una proteólisis parcial que resulta en la formación de p52. Esta subunidad (p52) es capaz de ingresar al núcleo y formar dímeros con RelB o p65 (Vazquez-Santillan et al., 2015) ([Figura 6](#)).

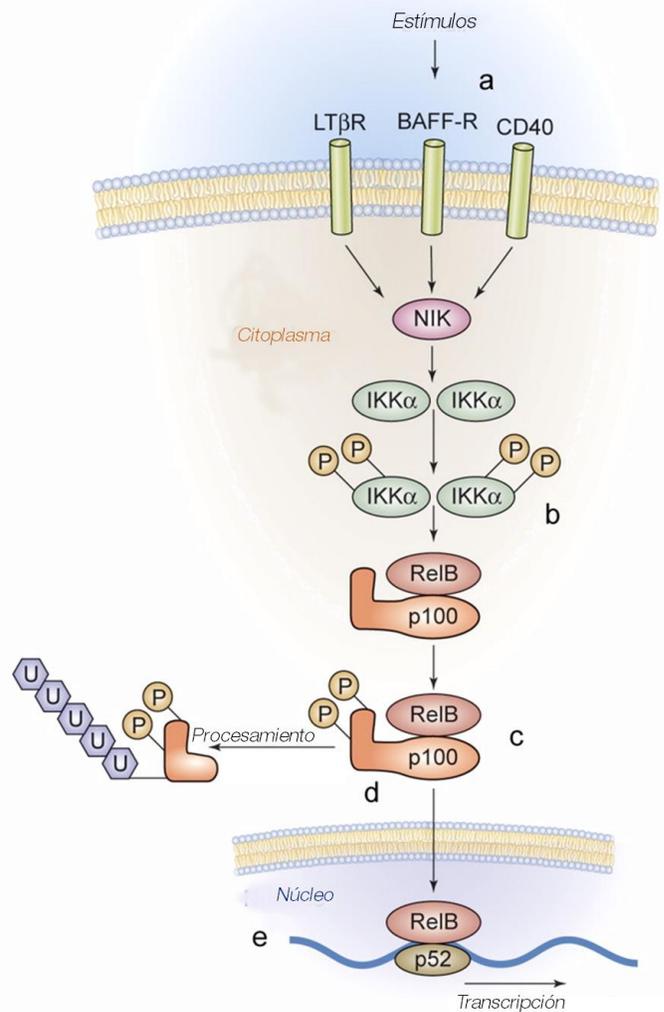
La relevancia de la activación de la vía de NFκB en las predicciones bioinformáticas realizadas radica en el hecho de que esta vía juega un papel principal en la biología de los tumores dado que regula procesos clave durante la iniciación y progresión de diferentes tipos de cáncer. En muchos tumores la señalización de NFκB se encuentra constitutivamente activada promoviendo procesos de proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis (Naugler & Karin, 2008). En este último proceso, NFκB se ha relacionado con la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la inducción de la secreción de citocinas como el factor de necrosis tumoral TNF o las interleucinas IL1 e IL6, las cuales estimulan la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF y de otras citocinas proangiogénicas como IL8, CXCL1 y CXCL8 (Karin, 2006).

A partir de los datos de transcriptoma de RNA de células HeLa cocultivadas con ADSC, además de obtener la expresión de mRNAs que llevó a identificar a NFκB como la principal vía activada, se obtuvo un conjunto de lncRNAs diferencialmente expresados durante el cocultivo de HeLa vs HeLa-ADSC con un valor de veces de cambio  $\leq -2$  o  $\geq 2$  con significancia estadística. En este proyecto nos hemos planteado estudiar los cambios en la expresión de lncRNAs durante la interacción de células de CaCU con ADSC, debido al papel que tienen estos transcritos no codificantes en la regulación epigenética y en los procesos tumorales, con miras a poder identificar y caracterizar lncRNAs factibles de ser utilizados como biomarcadores. Además, dado que la activación de NFκB es el principal rasgo identificado en esta interacción entre células y tomando en cuenta la variedad de procesos biológicos en los cuales interviene este factor de transcripción, consideramos evaluar el efecto de la inhibición de la vía de NFκB sobre el transcriptoma no codificante de las células de cáncer cérvico uterino.

A) Activación de la vía canónica de NF-κB



B) Activación de la vía no canónica de NF-κB



**Figura 6. Activación de la señalización canónica y no canónica de NF-κB.** (A) Activación de la vía canónica. Varios estímulos activan la señalización de esta vía, incluyendo citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF-α o patrones moleculares asociados a patógenos que se unen a TLRs, a los receptores de antígenos TCR/BCR, o receptores como CD40, CD30 o al receptor activador de NF-κB (RANK). (1) IKK fosforila a las proteínas IκB en dos residuos de serina conservados e induce la poliubiquitinación de IκB (2), la cual induce el reconocimiento por parte del proteasoma y la sucesiva degradación proteolítica (3). Posteriormente a la degradación de IκB, los dímeros NF-κB son libres de translocarse al núcleo donde activan la transcripción de sus genes blanco (4). (B) La vía No canónica de NF-κB comienza su activación con receptores de membrana que pertenecen a la superfamilia de receptores tipo TNF, incluyendo al receptor de linfotoxina β, al receptor CD40 y el receptor BAFF (a). Esta vía continúa con la activación de IKKα (b), proteína que puede fosforilar directamente a NF-κB2/p100 (c), induciendo la proteólisis parcial de p100 en p52 mediante procesamiento proteasomal (d). La proteína p52 carece de los repetidos de ankirina y dimeriza preferencialmente con RelB para translocarse al núcleo (e). (Ilustración tomada y modificada de Jost & Ruland, 2007)

## IV. Justificación

Dada la alta prevalencia de obesidad en México, es más que justificable investigar los procesos patológicos asociados con la obesidad tales como el cáncer, particularmente el CaCU el cual figura como la segunda neoplasia maligna con mayor índice de mortalidad en mujeres mexicanas. Los estudios que se plantean en el presente proyecto pretenden revelar la importancia de los lncRNAs que promueven el fenotipo tumoral de CaCU por la presencia de ADSC, para confirmar una vez más que los genes involucrados se transcriben de forma dinámica y diferencial contribuyendo a la variación y complejidad del fenotipo tumoral. Además, profundizar en la caracterización de estos lncRNAs es importante para contribuir al entendimiento de la biología del CaCU y en un futuro poder ofrecer opciones para el desarrollo de marcadores de diagnóstico o pronóstico destinados a pacientes con CaCU y obesidad.

## V. Hipótesis

Los lncRNAs con expresión diferencial en el cocultivo de HeLa-ADSC podrían estar relacionados con algún rasgo del fenotipo tumoral del cérvix y su transcripción podría estar regulada por la señalización de NF- $\kappa$ B.

## VI. Objetivos

- **Objetivo general:** Caracterizar la expresión, relevancia y localización celular de los lncRNAs con expresión diferencial durante el cocultivo de células de cáncer cérvico uterino con células troncales derivadas del tejido adiposo.
- **Objetivos particulares:**
  1. Identificar los lncRNAs más representativos de la interacción HeLa-ADSC con base en su localización

en el genoma, tasa de cambio, importancia de genes codificantes que los flanquean, entre otras condiciones.

2. Cuantificar los cambios de expresión de lncRNAs derivados del RNAseq de células HeLa vs HeLa-ADSC mediante *droplet digital* PCR (ddPCR).
3. Documentar la relevancia biológica de los lncRNAs con cambios de expresión validados a través de una búsqueda bibliográfica y bioinformática.
4. Caracterizar la localización intracelular de los lncRNAs validados mediante fraccionamientos celulares.
5. Determinar los niveles de expresión de los lncRNAs validados en diferentes líneas celulares de CaCU.
6. Determinar los niveles de expresión de estos mismos lncRNAs durante la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B.

## VII. Material y métodos

### *Análisis de la expresión de RNAs largos no codificantes a partir de datos de RNAseq*

Los valores de RPKM (*reads per kilobase million*) de lncRNAs fueron analizados, comparando los valores de cambio (*Fold Change*) entre HeLa vs HeLa-ADSC en tres réplicas independientes. Aquellos lncRNAs con un valor de *fold change*  $\leq -2$  o  $\geq 2$ , estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) fueron seleccionados. Como siguiente criterio se tomó en cuenta a aquellos transcritos que se encontraran vigentes en la base de datos de LNCipedia 5.0 ([Lncipedia.org](http://lncipedia.org)) y que mostraran la menor desviación entre réplicas. Todo este proceso de curación de los datos de lncRNAs expresados diferencialmente durante el cocultivo de HeLa-ADSC fue realizado de forma manual.

Con los lncRNAs seleccionados se realizó un *Heat-Map* y un análisis de componentes principales (PCA) mediante el uso de la herramienta web ClustVis ([biit.cs.ut.ee/clustvis](http://biit.cs.ut.ee/clustvis)), utilizando los valores de RPKM de cada transcrito y haciendo el agrupamiento no supervisado (*clustering*) por correlación. También se realizó un fenograma para ubicar la localización de los loci de cada lncRNA con la ayuda de la herramienta en línea PhenoGram Plot ([visualization.ritchielab.org/phenograms/plot](http://visualization.ritchielab.org/phenograms/plot)).

También se utilizaron datos de RNA-seq disponibles en la base de datos pública GDC-TCGA, a los cuales se accedió a través de la plataforma Xena Browser (UCSC, [xenabrowser.net](http://xenabrowser.net)) para evaluar la expresión de varios transcritos en la cohorte de carcinoma cervical de células escamosas y adenocarcinoma endocervical (CESC). Con los datos disponibles se evaluó la expresión de los lncRNAs de interés en los distintos tipos histológicos de CaCU, en los estadios tumorales y se realizaron curvas de Kaplan-Meier para correlacionar la expresión de los transcritos con la supervivencia de las pacientes.

#### *Cultivo de líneas celulares*

Las líneas celulares de cáncer cérvico uterino HeLa, SiHa, CaSki, C33A, así como la línea epitelial no tumoral HaCat, previamente tipificadas, fueron cultivadas en medio DMEM (Corning 10-017-CV) suplementado con 5% de suero fetal bovino (BFS), manteniéndolas en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Por otra parte, se cultivaron ADSC (ATCC® PCS-500-011™) en medio basal para células troncales mesenquimales (ATCC® PCS-500-030™) en las condiciones de incubación ya mencionadas.

#### *Ensayos de cocultivo in vitro*

La interacción entre HeLa y ADSC se recreó mediante ensayos de cocultivo indirecto, utilizando soportes permeables Transwell (Corning) de 75 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0.4 µm, colocados en placas de cultivo de 100 mm de diámetro. En la parte superior del soporte permeable se sembraron 2 millones de células HeLa con una confluencia del 80% y en la cámara inferior, debajo de la membrana permeable, se sembraron 600 mil ADSC a una confluencia similar, compartiendo ambas el mismo medio (DMEM sin FBS). Esta membrana permeable permitió el intercambio de factores solubles entre los dos tipos celulares sin que estas entraran en contacto directo durante 24 horas.

Para probar el efecto de los factores secretados por las ADSC sobre la línea celular HeLa, se obtuvo medio

condicionado (MC) de ADSC, cultivando ADSC confluentes al 85% en placas de 100mm de diámetro en medio DMEM sin FBS. Este medio condicionado se recuperó 24 horas más tarde y fue empleado para mantener en cultivo a células HeLa durante 24 horas.

#### *Extracción de RNA y síntesis de cDNA*

Se realizó la extracción de RNA total mediante el método de tiocianato de guanidinia-fenol-cloroformo (TRIzol™ Reagent, Invitrogen™). La cantidad y pureza de RNA extraído fue cuantificado mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El RNA aislado fue tratado con RQ1 RNase-Free DNase (Promega™ #M6101) y retrotranscrito a cDNA mediante el uso de High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™ #4329001) o Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™ #K1671).

#### *PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR)*

Se realizó RT-qPCR utilizando SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems™ #4472908), ejecutando las reacciones en un sistema QuantStudio 7 Flex para PCR en tiempo real (Applied Biosystems™). La abundancia relativa de los transcritos fue calculada mediante el método  $\Delta\Delta C_t$ . La cuantificación de cada transcrito se realizó por duplicado técnico en hasta 6 réplicas biológicas independientes.

#### *Droplet digital PCR (ddPCR)*

Los ensayos de ddPCR fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories). En breve, cada reacción de EvaGreen ddPCR Supermix (Bio-Rad) con su respectivo cDNA fue emulsificada con 70µl de Droplet Generation Oil (Bio-Rad), particionado las reacciones en hasta 20,000 gotas en el equipo generador de gotas QX200 Droplet Generator (Bio-Rad), las cuales posteriormente fueron transferidas en placas de 96 pozos

(Eppendorf) y selladas. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador convencional para PCR en punto final GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de reacción: 1× (95°C por 5 min), 40× (95°C por 30 s, Tm°C por 30 s, 72°C por 30 s), 1× (4°C por 5 min, 90°C or 5 min), 12°C ∞.

Al término de la amplificación, la fluorescencia individual de las gotas en cada una de las reacciones fue medida con el equipo QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). El análisis de los datos se realizó con ayuda del software QuantaSoft droplet reader (Bio-Rad). Las poblaciones de gotas positivas y negativas fueron detectadas de forma manual en los gráficos unidimensionales corrigiendo el ruido de fondo basados en los controles sin cDNA templado, ajustando los mismos valores de *threshold* para cada transcrito cuantificado. Los valores de expresión absoluta en número de copias/μl fueron calculadas por el software utilizando estadística para una distribución de tipo Poisson (Hindson et al., 2013). Los resultados de estas mediciones son representados en número de copias/μl de cDNA amplificable.

#### *Diseño de primers*

En el caso de los lncRNAs, los primers fueron diseñados buscando amplificar de manera específica exones individuales de cada lncRNA, evitando las zonas de solapamiento con otros genes. En los casos en que fue posible se diseñaron primers para discernir entre las diferentes isoformas de un mismo lncRNA. Los primers fueron diseñados utilizando la herramienta online Primer-BLAST (NCBI) y se evaluó *in silico* su especificidad, temperatura de alineamiento y probabilidad de formar estructuras secundarias, así como homo- y hetero-dimeros, con la ayuda de las herramientas Beacon Designer (Premier Biosoft), MFEprimer-3.0 (iGeneTech) y Primer Analyzer (Integrated DNA Technologies). A continuación, se enlistan las secuencias de los primers utilizados tanto en RT-qPCR como en ddPCR ([Tabla 2](#)).

### *Fraccionamiento celular*

El fraccionamiento celular se realizó a partir de células HeLa en una confluencia del 80%. Se utilizó el kit PARIS™ (Life technologies) y se recuperaron extractos de proteína y RNA de las fracciones nuclear y citoplasmática de estas células. El RNA se retrotranscribió a cDNA para la posterior cuantificación de transcritos mediante PCR, mientras que la proteína fue tratada con inhibidor de proteasas para su posterior estudio mediante Western Blot.

**Tabla 2. Secuencia y temperatura de fusión (tm) de los primers utilizados en RT-qPCR y ddPCR.**

<b>Gen</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>Inc-NFYB-1</b>	GCATATCTTGTCAGTGCTTGA	TGGCACCAGGTAGGAGGAAA	60
<b>Inc-COPS4-1:1</b>	GGATGGACTGGAGAGAAGGC	ACCTCTTTGGCAAATCATGTTCA	60
<b>Inc-COPS4-1:2</b>	ATCGGTGACAGAGTGGGTGT	ATCGGTGACAGAGTGGGTGT	58
<b>HIF1A-AS2</b>	TCCGTTCCAAGACGGTGCCCA	GCACCTGTCTATCGTCTCCG	58
<b>Inc-NUTM1-1</b>	GAGCAGCAGTTACGTGACCT	AATGAGGAACAAGCGGGGAG	58
<b>GAPDH</b>	CCCCTTCATTGACCTCAACT	TTGTCATGGATGACCTTGGC	58
<b>OCT4</b>	ACATCAAACCTCTGCAGAAAGAAC	CTGAATACCTTCCCAAATAGAACCC	56

### *Sobreexpresión de IκBα-DN*

Para sobreexpresar a la proteína inhibidora de NFκB, IκBα, se transfectaron 550,000 células HeLa con los plásmidos PLXSN-IκBα-DN y PLXSN-control, utilizando el reactivo de transfección Xfect™ (Clontech Laboratories), siguiendo las recomendaciones del producto, recuperando las células 48 horas después de la transfección. El gen IκBα-DN codifica a la proteína mutante IκBα dominante negativo, capaz de funcionar como superrepressor de la vía de NFκB.

### *Western Blot*

Los extractos totales de proteínas obtenidos con buffer de lisis RIPA o de fracciones celulares obtenidos con el kit PARIS, fueron cuantificados mediante el método de Lowry con el uso del kit DC™ protein assay (Bio-Rad) utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina y cuantificando las reacciones colorimétricas en un lector multimodo DTX 880 (Beckman Coulter).

La electroforesis de las muestras se realizó en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y la transferencia de proteínas se realizó en una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) utilizando una cámara de transferencia semiseca Trans-Blot SD (Bio-Rad) en buffer de transferencia. Las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\alpha$ -tubulina y lamina A/C fueron detectadas con sus anticuerpos específicos ( $\alpha$  Tubulin 10D8, Santa Cruz Biotechnology; I $\kappa$ B $\alpha$  9242, Cell Signaling Technology; Lamin A/C (4C11) 4777) y con los anticuerpos secundarios Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Conjugate (W401B, Promega) y Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Conjugate (W4021, Promega). Se reveló utilizando el Sustrato Immobilon quimoluminiscente de HRP para Western Blot (WBKLS0500) y un fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad)

### *Análisis estadístico*

Se realizaron tres réplicas biológicas de cada experimento, exceptuando algunos casos señalados en los pies de figura. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 5, en el cual se realizó la prueba T de Student, considerando un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo y en los casos pertinentes se realizó la prueba de Welch para comparar medias con varianzas desiguales. Las gráficas reportadas muestran la media y la desviación estándar ( $\pm$ SD) con excepción de los casos señalados en los que se grafica el error estándar muestral ( $\pm$ SEM).

## VIII. Resultados

### Identificación de lncRNAs con expresión diferencial durante el cocultivo de HeLa con ADSC

Previamente en nuestro laboratorio, se realizaron ensayos de cocultivo de células HeLa con ADSC, y se extrajo el RNA de las células HeLa para analizar los cambios de expresión en el transcriptoma de estas células con respecto a la condición control (células HeLa cultivadas normalmente sin interactuar con ningún otro tipo celular) ([Figura 7.A](#)). El transcriptoma de las células fue estudiado mediante RNA-seq y con los datos obtenidos se logró determinar que los cambios en el transcriptoma codificante estaban relacionados principalmente con la activación de la vía de señalización de NFkB. Sin embargo, la fracción no codificante del transcriptoma no fue caracterizada y por lo tanto fue de nuestro interés analizar los cambios de expresión de RNAs largos no codificantes, partiendo de esta misma secuenciación de RNA de células HeLa en cocultivo con ADSC.

De los datos de RNA-seq fue posible identificar un total de 819 lncRNAs con expresión diferencial en el transcriptoma de las células HeLa cocultivadas con ADSC. De este total, 337 mostraron un incremento en su expresión mientras que 482 se vieron disminuidos ([Figura 7.B](#)). A partir de este conjunto de transcritos, se seleccionó a un subgrupo considerando que los cambios de expresión fueran estadísticamente significativos, con de veces de cambio  $\geq 2$  o  $\leq -2$ , que mostraran la menor variación entre réplicas posible, además de que no se encontraran completamente sobrelapados con genes codificantes, con el fin de que fuera posible distinguir entre el transcrito codificante y su antisentido no codificante.

La expresión de este subconjunto de lncRNAs en las tres réplicas biológicas fue analizado a través de la elaboración de un *Heat-Map* y un análisis de componentes principales (PCA) ([Figuras 7.C](#) y [7.D](#)). Estos análisis no supervisados nos permitieron evaluar la identidad de las muestras al agruparlas de acuerdo con su similitud en el transcriptoma sin una distribución *a priori*. En el análisis de componentes principales se observó que los tres grupos control (HeLa 1, 2 y 3) se agrupan de manera cercana, alejados de los grupos del cocultivo (Hela-ADSC). De estos últimos solo un par, HeLa-ADSC 1 y 3, forman una agrupación cercana, mientras que HeLa-ADSC 2 se aleja de este agrupamiento, aunque sigue manteniéndose distante de los grupos control. A pesar de esta ligera divergencia de

HeLa-ADSC 2, esta permanece agrupada en el Heat-Map con sus similares, mostrando que las tres réplicas del cocultivo se agrupan por un lado, y por el otro las tres réplicas del control debido a una mayor similitud entre ellas. Finalmente, a partir de este grupo de lncRNAs preseleccionados conservamos únicamente aquellos que estuvieran vigentes en la base de datos Lncipedia 5.0. Los valores de veces de cambio de estos transcritos se muestran en la [figura 7.E](#).

Como primer abordaje para caracterizar a estos lncRNAs, diseñamos un fenograma mostrando los loci en que se ubican en los cromosomas cada uno de los lncRNAs con expresión diferencial en HeLa durante el cocultivo con ADSC ([Figura 7.F](#)). De manera interesante, cuatro lncRNAs colocalizaron en el mismo locus con cuatro genes codificantes cuya expresión también se mostró previamente desregulada durante la interacción de HeLa con ADSC. En estos cuatro casos tanto el lncRNA como el gen codificante colocalizados mostraron la misma tendencia en su cambio de expresión. Lnc-ADGRL4-6 colocalizó con el codificante IFI44 ambos con una expresión incrementada en el cocultivo; lnc-APH1B-1 colocalizó con el gen de respuesta a hipoxia CA12, ambos con una expresión incrementada, y lnc-RNF24-1 y su correspondiente codificante RNF24, también con expresión incrementada; mientras que con una expresión disminuida se encontraron a lnc-COPS4-1 junto con el codificante PLAC8. Esta colocalización en locus de los lnc-RNAs podría ser indicio de alguna regulación en *cis* de estos transcritos.

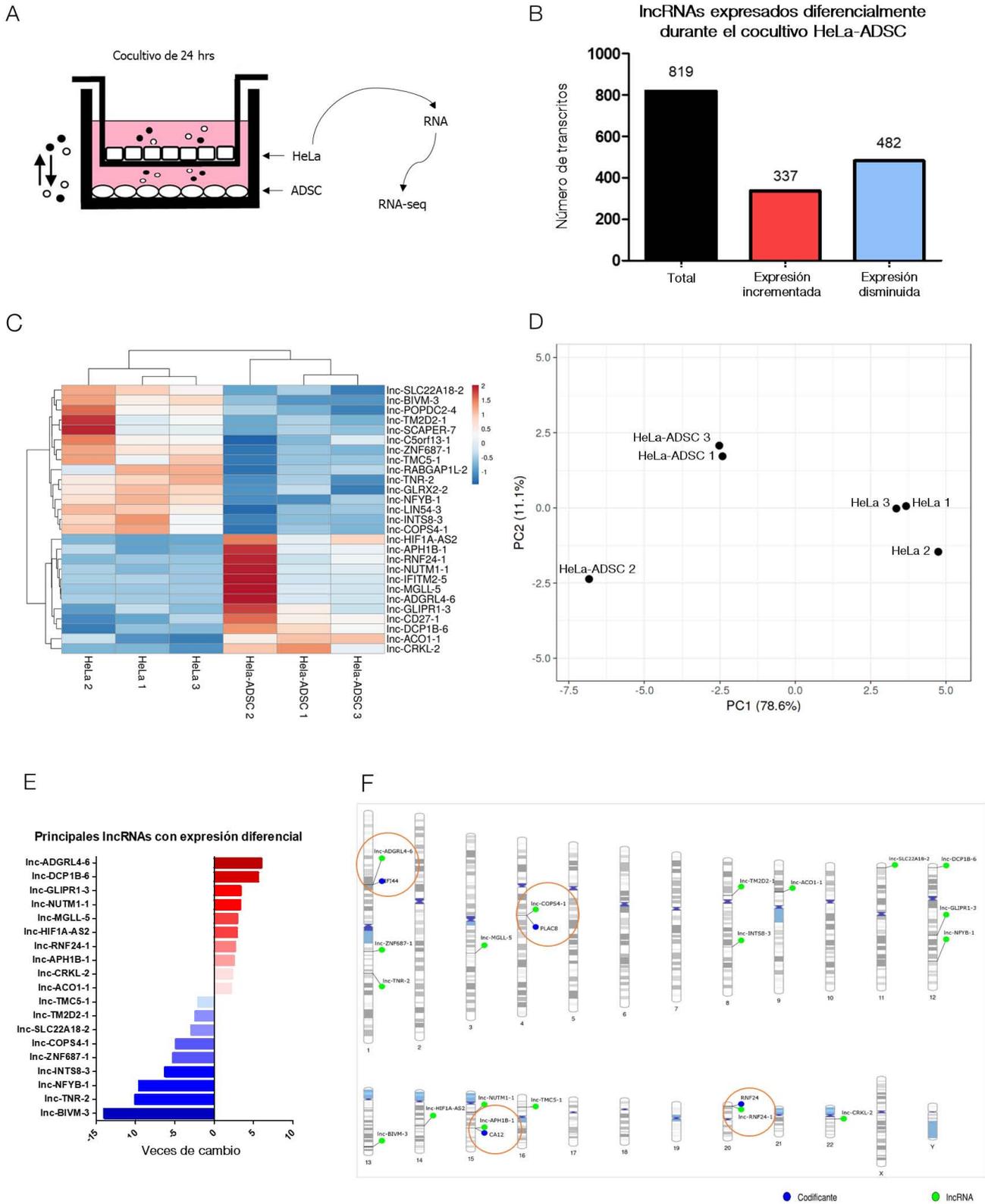


Figura 7. El cocultivo con ADSC modifica la expresión de RNAs largos no codificantes en células HeLa.

**Figura 7.** (A) Diagrama que muestra el procedimiento de cocultivo indirecto de células HeLa con ADSC que permitió la extracción de RNA de HeLa y su posterior secuenciación para analizar los cambios en el transcriptoma de estas células. (B) Número de lncRNAs con expresión alterada en HeLa tras se cocultivadas con ADSC. (C) Heat-Map con la expresión en rpkms de los lncRNAs derivada del RNA-seq en cada una de las réplicas biológicas de las condiciones control (HeLa) y cocultivo (HeLa-ADSC), agrupando a los transcritos y sus réplicas por correlación en análisis no supervisado. (D) Análisis de componentes principales (PCA) en el que se realizó descomposición en valores singulares (SVD) con imputación para calcular los componentes principales que explican el 78.6% (eje X, PC1) y el 11.1% (eje Y, PC2) de la varianza total. (E) Veces de cambio (*Fold change*) del subconjunto de lncRNAs seleccionados vigentes en Lncipedia 5.0. (F) Fenograma que muestra en verde la ubicación de los lncRNAs seleccionados y en azul a los genes codificantes cuya expresión también se ve alterada durante el cocultivo de HeLa con ADSC y colocalizan en los mismo loci que cuatro lncRNAs (círculos rojos).

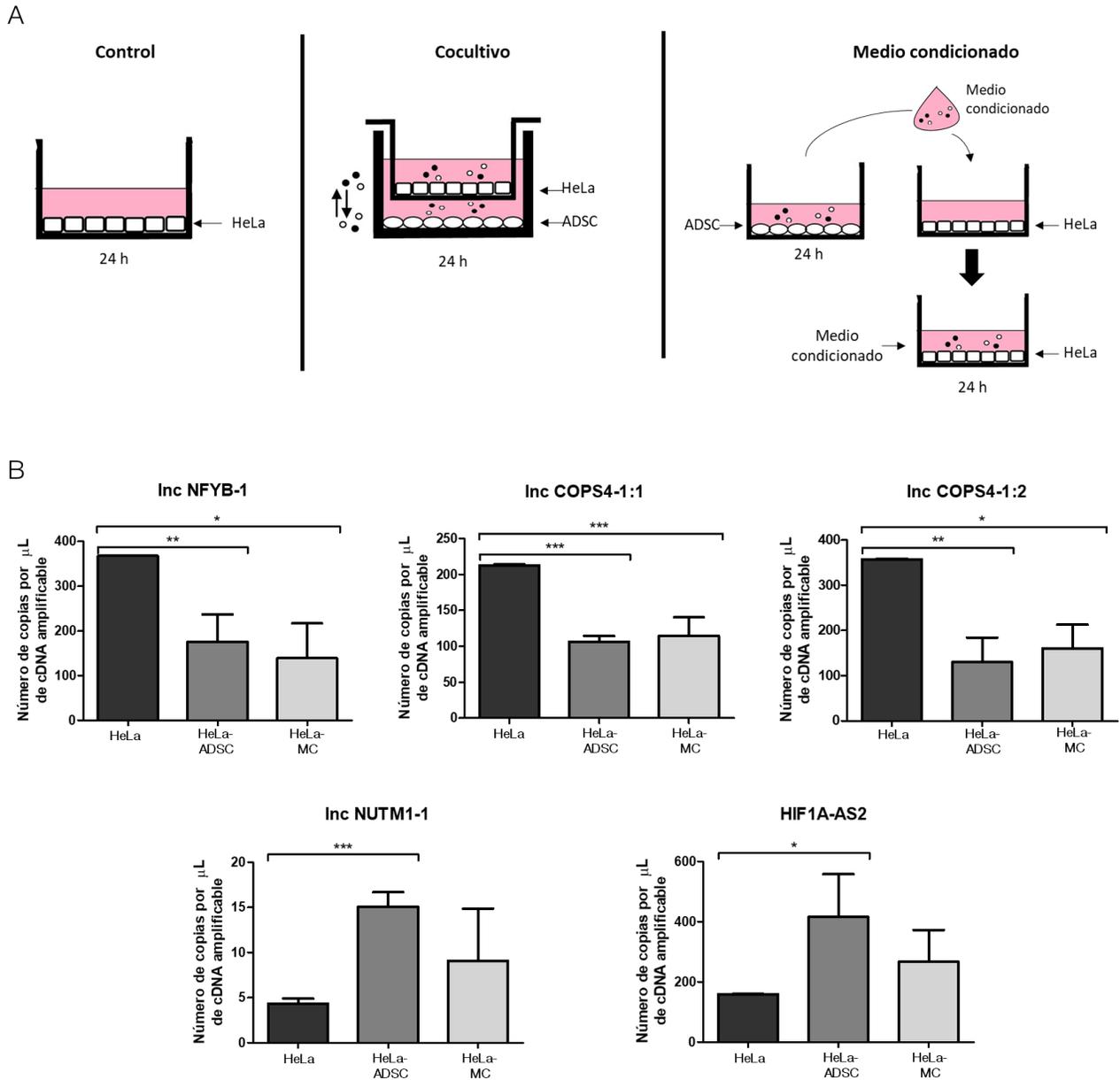
## Cuantificación de la expresión de lncRNAs mediante ddPCR

Posteriormente con el propósito de validar los cambios de expresión observados en la secuenciación repetimos en tres réplicas biológicas, las condiciones de cultivo: (1) HeLa en medio DMEM sin suero fetal bovino (FBS) (control), (2) HeLa en cocultivo indirecto con ADSC en medio DMEM sin FBS, y (3) HeLa en cultivo con medio condicionado de ADSC ([Figura 8.A](#)). Esta condición adicional se añadió para probar si la acción de los factores secretados por las ADSC en el medio era suficiente para desencadenar los mismos cambios de expresión en los lncRNAs que los suscitados durante el cocultivo indirecto de HeLa con ADSC.

De estas tres condiciones se obtuvo RNA de las células HeLa para evaluar la expresión de los lncRNAs mediante ddPCR. Se decidió utilizar esta tecnología de PCR de última generación ya que permite una cuantificación absoluta del número de copias de cada transcrito y al ser muy sensible nos permitiría identificar cambios en la expresión de lncRNAs que se expresen en niveles muy reducidos. Los resultados de ddPCR validaron cinco lncRNAs con expresión alterada durante el cocultivo de HeLa con ADSC. De estos, tres mostraron una disminución en cocultivo y en medio condicionado (lnc-NFYB-1, lncCOPS4-1:1 y lnc-COPS4-1:2) y dos más incrementaron su expresión durante el cocultivo (lnc-NUTM1-1 y HIF1A-AS2) ([Figura 8.B](#)). Las principales características de estos lncRNAs validados se enlistan en la [tabla 3](#). A la fecha, el único de estos lncRNAs que ha sido descrito previamente es HIF1A-AS2 (Bertozzi et al., 2011).

lnc-NFYB-1, es un lncRNA antisentido que se transcribe a partir de un intrón del gen de la reductasa de tiorredoxina 1 (TXNRD1). El gen de este lncRNA se compone de tres exones que transcriben a cinco isoformas diferentes de lnc-NFYB-1 (los primers no discriminan entre las isoformas), las cuales poseen una longitud que va de los 701 a los 1432 nucleótidos. Cabe mencionar que TXNRD1 se encuentra sobreexpresado en algunos tipos de cáncer como el

hepatocarcinoma celular y mama, asociado a un pronóstico desfavorable, así como a una mayor capacidad de invasión y metástasis (Arnér, 2017; Bhatia et al., 2016; Fu et al., 2017).



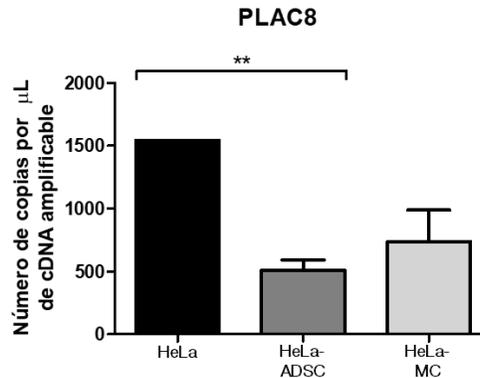
**Figura 8. Validación de los cambios de expresión de los lncRNAs durante el cocultivo de HeLa con ADSC.** (A) Esquema de las condiciones de cultivo celular utilizadas para evaluar los cambios de expresión de lncRNAs derivados de la interacción entre células HeLa y ADSC. (B) Expresión absoluta de los cinco diferentes lncRNAs validados. Se muestra el número de copias de cada transcrito en cada una de las tres condiciones de cultivo celular: Control (HeLa), Cocultivo (HeLa-ADSC) y Medio Condicionado de ADSC (HeLa-MC). El número de copias fue obtenido mediante ddPCR y se normalizó a GAPDH. Se muestra la media aritmética de 3 réplicas biológicas  $\pm$ SD. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante la prueba de Welch para comparar medias con varianzas desiguales. Se compararon las condiciones experimentales (HeLa-ADSC y HeLa-MC) contra la condición control (HeLa). Las marcas de significancia estadística indican \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Por otro lado, el lnc-NUTM1-1 cuya expresión incrementa durante el cocultivo, es un gen no codificante de dos exones cuyo transcrito tiene una longitud de 1716 nucleótidos y se transcribe en antisentido al gen del transportador de cloro-potasio SLC12A6. el lnc-NUTM1-1 es alelial al gen de la ribonucleoproteína, asociada a telomerasa NOP10 y al gen NUTM1, el primero asociado con disqueratosis congénita (Walne et al., 2007) y el segundo con el carcinoma de células escamosas tipo NUT (French, 2018).

Finalmente se determinó que la expresión del lncRNA HIF1A-AS2 incrementa en las células HeLa en condiciones de cocultivo con ADSC. lncRNA HIF1A-AS2 se compone de tres exones que se transcriben en dos isoformas. Este transcrito resulta de gran interés debido a que es antisentido al gen del factor inducible por hipoxia HIF1A, el cual juega un papel muy importante en la respuesta a hipoxia y es uno de los principales factores proangiogénicos con relevancia en los procesos de neovascularización tumoral (Masoud & Li, 2015). Además este lncRNA parece tener un papel funcional relevante en la biología de algunos tipos de cáncer (W. ming Chen et al., 2015; Mineo et al., 2016).

En cuanto al lnc-COPS4-1, pudimos validar la expresión de sus dos isoformas lnc-COPS4-1:1 y lnc-COPS4-1:2, las cuales disminuyen su expresión en las condiciones de medio condicionado y cocultivo con ADSC. Este par de transcritos de 245 y 228 nucleótidos, se constituyen por dos exones y son lncRNAs de tipo intergénico. Comparten locus con el gen codificante PLAC8, al que son aleliales, y cabe mencionar que, con base en los datos de RNAseq que sirvieron de antecedente a este trabajo, la expresión de este gen se encontró alterada en HeLa al estar cocultivadas con ADSC. El hecho de que las dos isoformas de lnc-COPS4-1 así como como PLAC8 mostraran una disminución en su expresión y se encuentren colocalizados en el mismo locus llamó nuestro interés por la posibilidad de que estos dos genes se encuentren corregulados.

Debido a esta observación de que lnc-COPS4-1 y PLAC8 se encuentran en el mismo locus, decidimos validar mediante ddPCR la expresión de PLAC8 en HeLa durante el cocultivo con ADSC. Los resultados obtenidos ([Figura 9](#)) corroboraron que la expresión de PLAC8 se altera en las condiciones de cocultivo, mostrando un decremento significativo con respecto a las células HeLa cultivadas en condiciones normales. Lo anterior nos permitió determinar que tanto PLAC8 como lnc-COPS4-1 disminuyen su expresión de forma muy similar en el cocultivo HeLa-ADSC.



**Figura 9. Validación de los cambios de expresión del gen codificante PLAC8.** Expresión absoluta del mRNA PLAC8 expresado en número de copias en cada una de las tres condiciones de cultivo celular: Control (HeLa), Cocultivo (HeLa-ADSC, 3 réplicas biológicas) y Medio Condicionado de ADSC (HeLa- MC, 2 réplicas biológicas). El número de copias fue obtenido mediante ddPCR y se normalizó a GAPDH. Se muestra la media aritmética de las réplicas  $\pm$ SD. La diferencia estadística se calculó mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. Las marcas de significancia estadística indican,  $**p < 0.01$ .

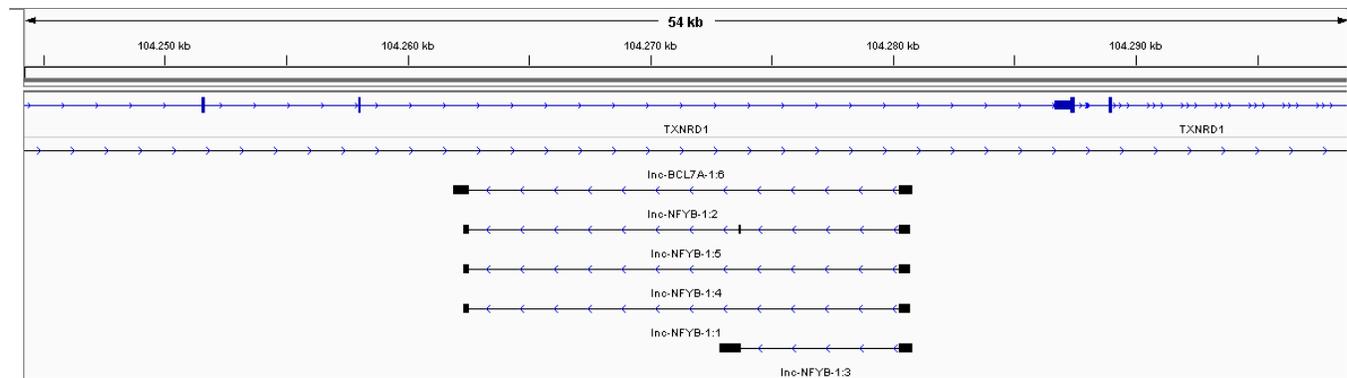
### Análisis del valor pronóstico de la expresión de los lncRNAs

Cómo primer paso para caracterizar los lncRNAs validados, nos propusimos evaluar la relevancia de la expresión de estos analizando su valor pronóstico. Para esto, utilizamos los datos de secuenciación de la cohorte de cáncer cérvico uterino disponibles en el repositorio de datos de secuenciación del GDC-TCGA, donde obtuvimos únicamente los datos de expresión de un par de lncRNAs: lnc-NFYB-1 y HIF1A-AS2; esto debido a que de los cinco lncRNAs que validamos, son los únicos que ya se encuentran debidamente anotados en las bases de datos. Con estos datos de secuenciación se realizaron curvas de Kaplan-Meier asociando la expresión de los transcritos con la supervivencia de las pacientes. En el caso de lnc-NFYB-1, se separó a la cohorte en dos grupos a partir de la media, una mitad con expresión elevada de este lncRNA y otra mitad con expresión disminuida. Entre estos dos grupos de alta y baja expresión de lnc-NFYB-1 no se encontró ninguna diferencia significativa en cuanto a la probabilidad de supervivencia de las pacientes ([Figura 10.A](#)).

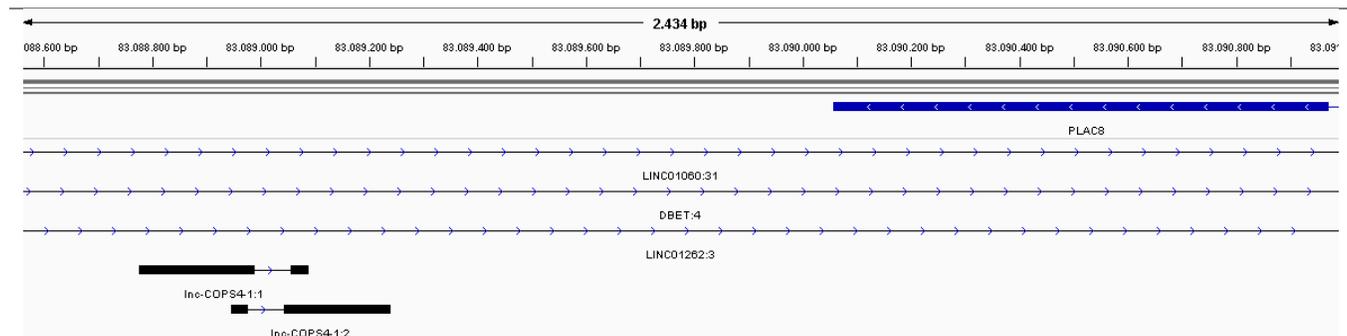
Para evaluar la relación entre la supervivencia y la expresión de HIF1A-AS2, se compararon dos grupos; el cuartil de la cohorte con la expresión más alta de HIF1A-AS2 contra el cuartil con la menor expresión. En este caso se halló una diferencia significativa en la supervivencia entre los dos grupos, correlacionando una mayor expresión de HIF1A-AS2 con una menor supervivencia de las pacientes ([Figura 10.B](#)). Esto es indicativo de que HIF1A-AS2 tiene un valor pronóstico considerable para CaCU.

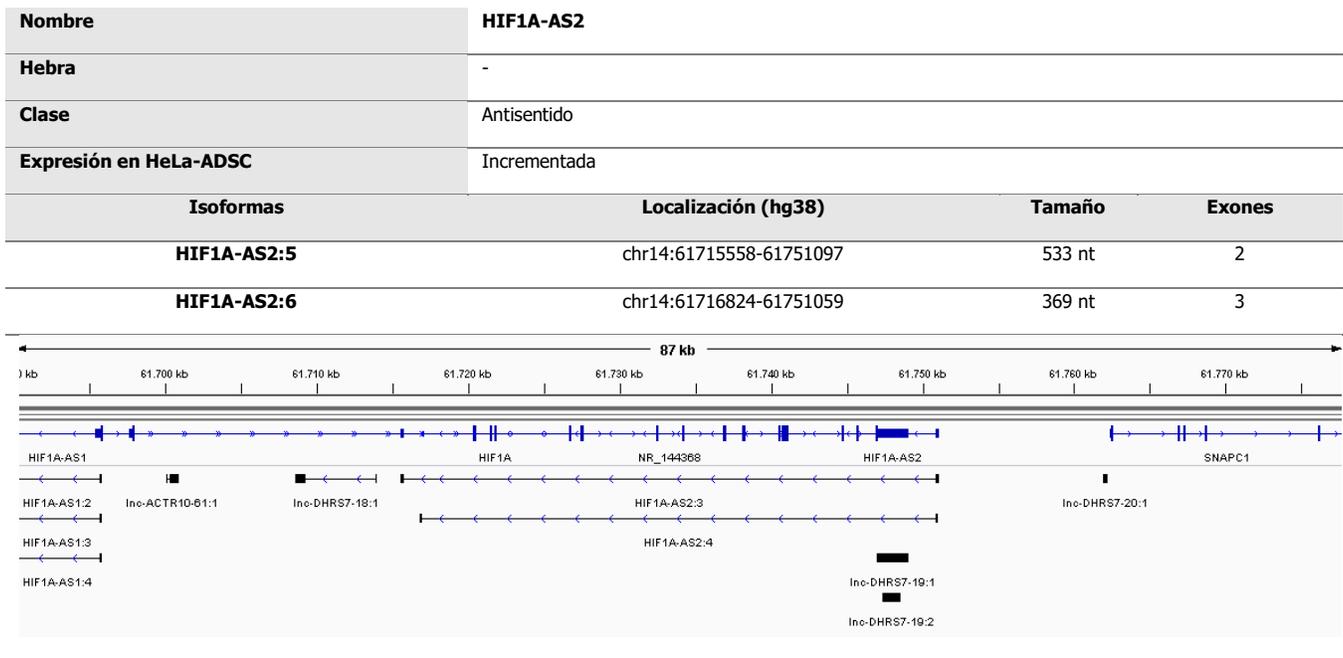
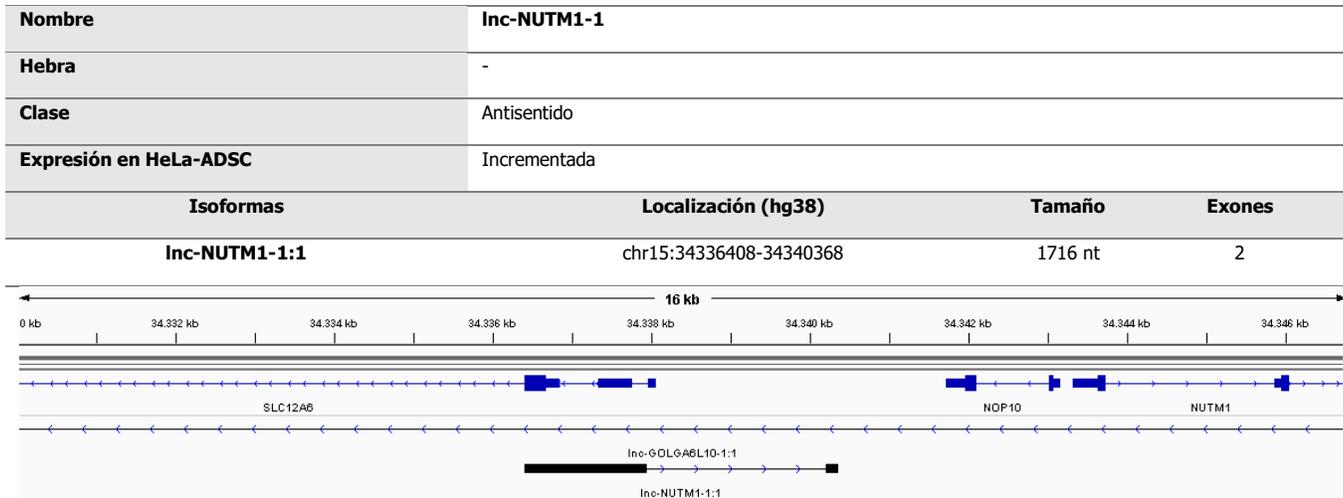
**Tabla 3. Características de los lncRNAs cuya expresión fue validada en células HeLa en cocultivo con ADSC.**

<b>Nombre</b>	<b>lnc-NFYB-1 (ENSG00000257732.1)</b>		
<b>Hebra</b>	-		
<b>Clase</b>	Intrónico antisentido		
<b>Expresión en HeLa-ADSC</b>	Disminuida		
<b>Isoformas</b>	<b>Localización (hg38)</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Exones</b>
<b>lnc-NFYB-1:1</b>	chr12:104262314-104280722	701 nt	2
<b>lnc-NFYB-1:2</b>	chr12:104261924-104280840	1209 nt	2
<b>lnc-NFYB-1:3</b>	chr12:104272868-104280840	1432 nt	2
<b>lnc-NFYB-1:4</b>	chr12:104262314-104280737	716 nt	2
<b>lnc-NFYB-1:5</b>	chr12:104262312-104280737	818 nt	3



<b>Nombre</b>	<b>lnc-COPS4-1</b>		
<b>Hebra</b>	+		
<b>Clase</b>	Intergénico		
<b>Expresión en HeLa-ADSC</b>	Disminuida		
<b>Isoformas</b>	<b>Localización (hg38)</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Exones</b>
<b>lnc-COPS4-1:1 (NONHSAT097203)</b>	chr4:83088777-83089088	245 nt	2
<b>lnc-COPS4-1:2 (NONHSAT097204)</b>	chr4:83088947-83089241	228 nt	2





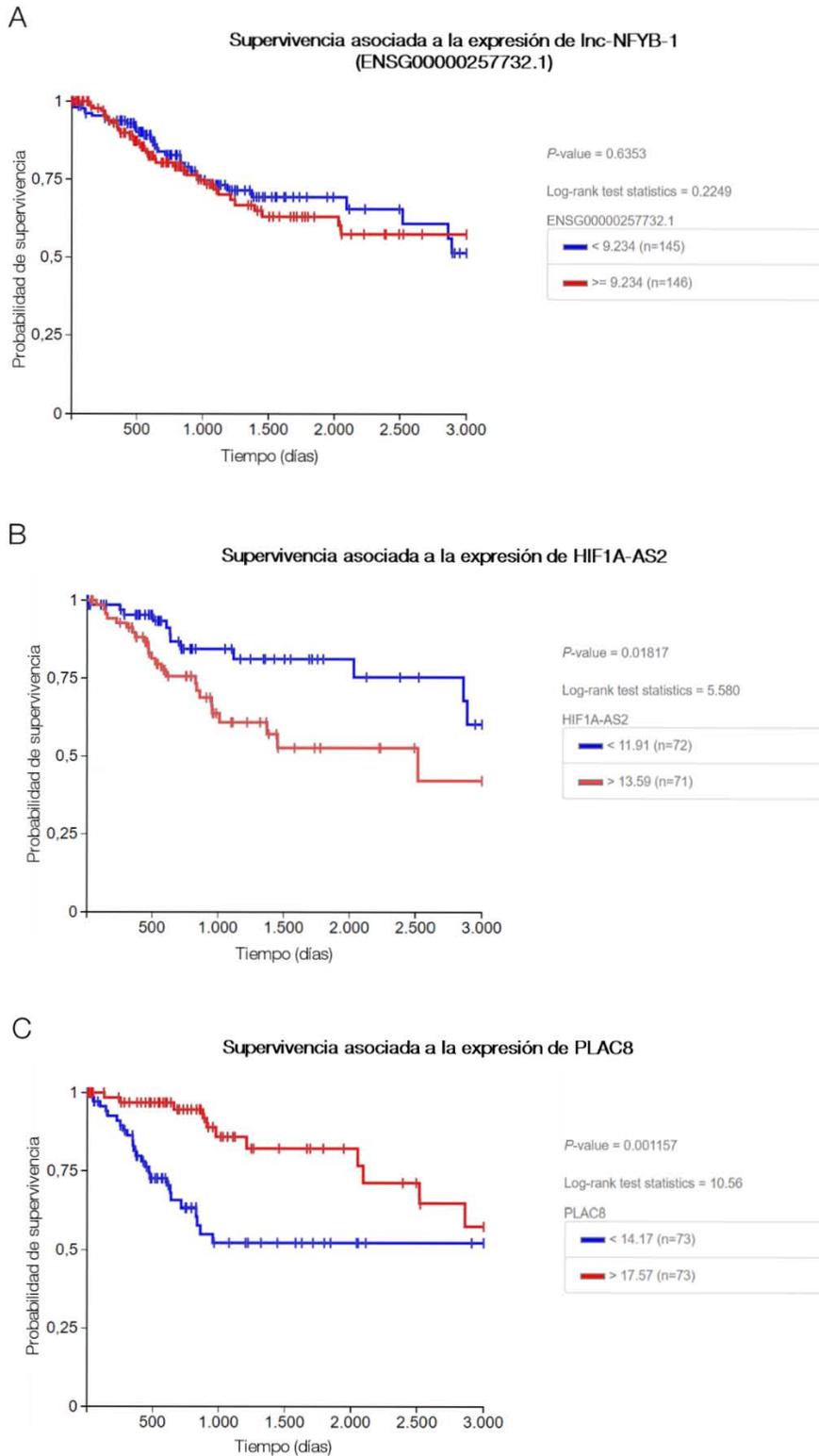
La tabla muestra el nombre y las principales características de los lncRNAs cuya expresión fue validada en células HeLa cocultivadas con ADSC. Las imágenes, obtenidas con el programa Integrative Genomics Viewer, muestran la localización genómica de los lncRNAs (indicados en barras de color negro) y la posición de los genes codificantes aledaños (barras azules). Las flechas sobre los genes indican el sentido de la transcripción.

Por otra parte, decidimos también analizar el valor pronóstico de PLAC8, debido a su colocalización en el genoma con Inc-COPS4-1, además de mostrar la misma tendencia de baja expresión que este gen no codificante durante el cocultivo de HeLa con ADSC. Lo que se observó fue que existe una diferencia significativa en la supervivencia entre las pacientes con baja y alta expresión de PLAC8. Se halló una relación entre una expresión disminuida de este gen con una menor supervivencia de las pacientes ([Figura 10.C](#)). Este hallazgo resulta interesante debido a que precisamente la expresión de este gen se encuentra disminuida en HeLa al estar interactuando con ADSC en las condiciones de cocultivo.

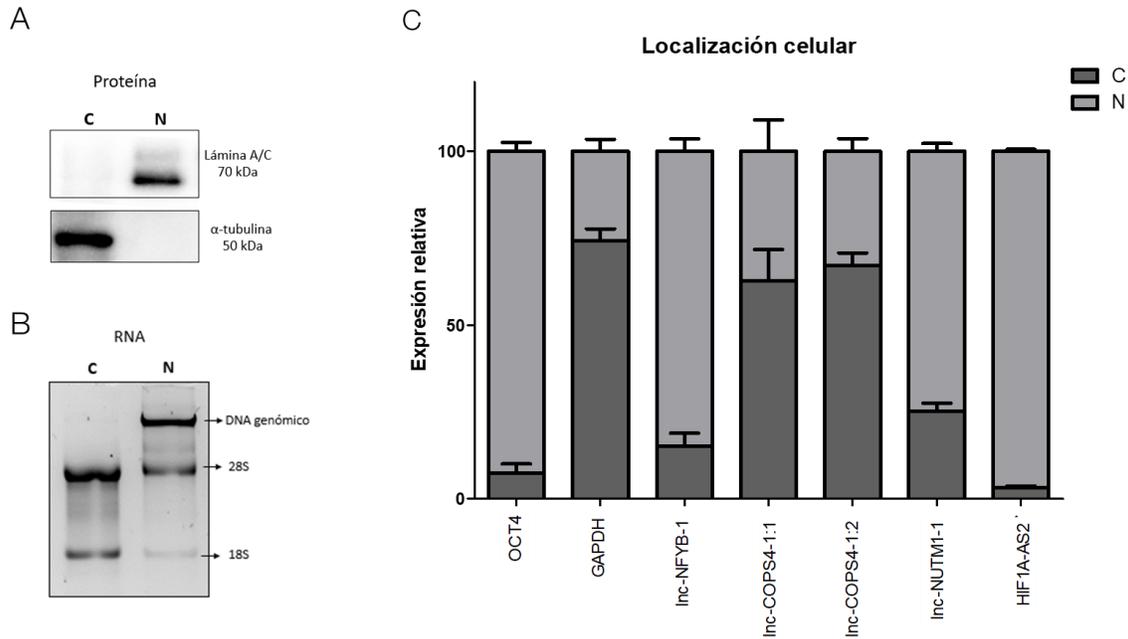
### **Caracterización de la localización celular de los lncRNAs**

Debido a que los lncRNAs desempeñan diferentes funciones moleculares en núcleo o en citoplasma (Marchese, Raimondi, & Huarte, 2017), decidimos evaluar la localización celular de los lncRNAs con expresión alterada en células HeLa durante el cocultivo con ADSC. Para este propósito se realizaron fraccionamientos celulares para separar las fracciones nuclear y citoplasmática de células HeLa, comprobando la correcta separación de las fracciones ([Figura 11.A](#) y [11.B](#)). Posteriormente cuantificamos la abundancia relativa de cada uno de los cinco transcritos validados en las fracciones nuclear y citoplasmática mediante RT-qPCR.

Como se puede observar en la [figura 11.C](#), obtuvimos como resultado que Inc-NFYB-1, Inc-NUTM1-1 y HIF1A-AS2 se localizan predominantemente en la fracción nuclear, mientras que los transcritos Inc-COPS4-1:1 y Inc-COPS4-1:2 se encuentran mayormente ubicados en la fracción citoplasmática de las células HeLa. Estos resultados nos dan indicios de que los tres lncRNAs identificados como nucleares podrían desempeñar funciones de regulación transcripcional o de regulación de la cromatina, mientras que los dos transcritos citoplasmáticos, en cambio, podrían estar relacionados con procesos postranscripcionales.



**Figura 10. Valor pronóstico de la expresión de los transcritos validados.** Se muestra en las curvas de Kaplan-Meier la probabilidad de supervivencia asociada a la alta o baja expresión de los transcritos Inc-NFYB-1 (A), HIF1A-AS2 (B), y PLAC8 (C). Los datos de expresión fueron obtenidos de la cohorte de cáncer cérvico uterino del GDC-TCGA y analizados con la plataforma Xena browser. Para Inc-NFYB-1 (A) la cohorte se dividió por la mitad en dos grupos con alta y baja expresión del transcrito. En el caso de HIF1A-AS2 (B), y PLAC8 (C) se compararon el cuartil superior (mayor expresión del transcrito) y el cuartil inferior (menor expresión del transcrito). Los valores de  $p$  se muestran a un costado de cada gráfica y fueron significativos sólo para HIF1A-AS2 (B), y PLAC8 (C). Los valores de expresión se muestran en  $\log_2(\text{fpkm-}uq+1)$ .



**Figura 11. Caracterización de la localización celular de los lncRNAs.** Para identificar la localización celular de los lncRNAs de interés se realizaron fraccionamientos celulares en células HeLa. (A) Western-Blot para las proteínas nuclear lámina A/C y la proteína citoplasmática  $\alpha$ -tubulina en las fracciones citoplasmática "C" y nuclear "N". (B) Electroforesis de RNA en la cual se observa un enriquecimiento en la fracción citoplasmática de las bandas 28S y 18S, así como la ausencia de DNA genómico en esta misma fracción. (C) Abundancia relativa de los lncRNAs de interés en las fracciones nuclear y citoplasmática. La abundancia relativa se cuantificó mediante RT-qPCR. Se muestra la media aritmética de 6 réplicas biológicas  $\pm$ SEM.

### Expresión de los lncRNAs en líneas celulares de CaCU

Como siguiente paso en la caracterización de los lncRNAs que validamos, decidimos evaluar la expresión de los lncRNAs en un panel de líneas celulares de CaCU derivadas de distintos subtipos tumorales y con copias virales de los principales tipos de VPH de alto riesgo ([Figura 12](#)). Para este experimento se utilizaron la línea celular HeLa, derivada de un adenocarcinoma cervical con copias virales de VPH-18; la línea celular SiHa, derivada de un carcinoma cervical escamoso con copias virales de VPH-16; la línea CaSki, obtenida de una metástasis en intestino de un carcinoma cervical escamoso; y la línea C33A, también de tipo escamoso, carente de infección por VPH.

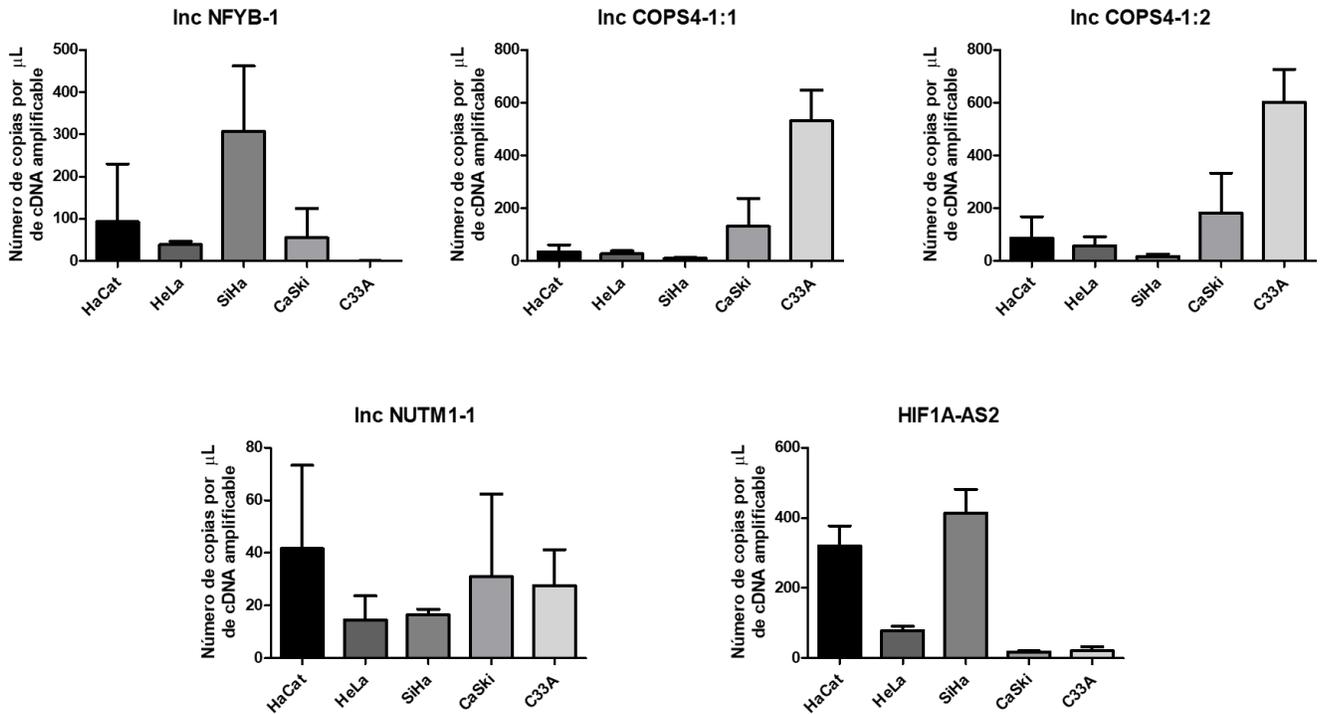
La expresión de los lnc-NFYB-1, lnc-COPS4-1:1, lnc-COPS4-1:2, lnc-NUTM1-1, y HIF1A-AS2 se cuantificó mediante ddPCR en este panel de líneas celulares de CaCU. En el caso de lnc-NFYB-1, su expresión es muy elevada en la línea celular SiHa, mientras que es cerca de cuatro veces menor en HeLa y CaSki, y prácticamente no se expresa en C33A. Los transcritos lnc-COPS4-1:1 y lnc-COPS4-1:2 mostraron una expresión con número de copias muy

similares. Ambos transcritos se expresan poco en HeLa y SiHa, con mayor abundancia en CaSki, y se expresan mucho más en C33A.

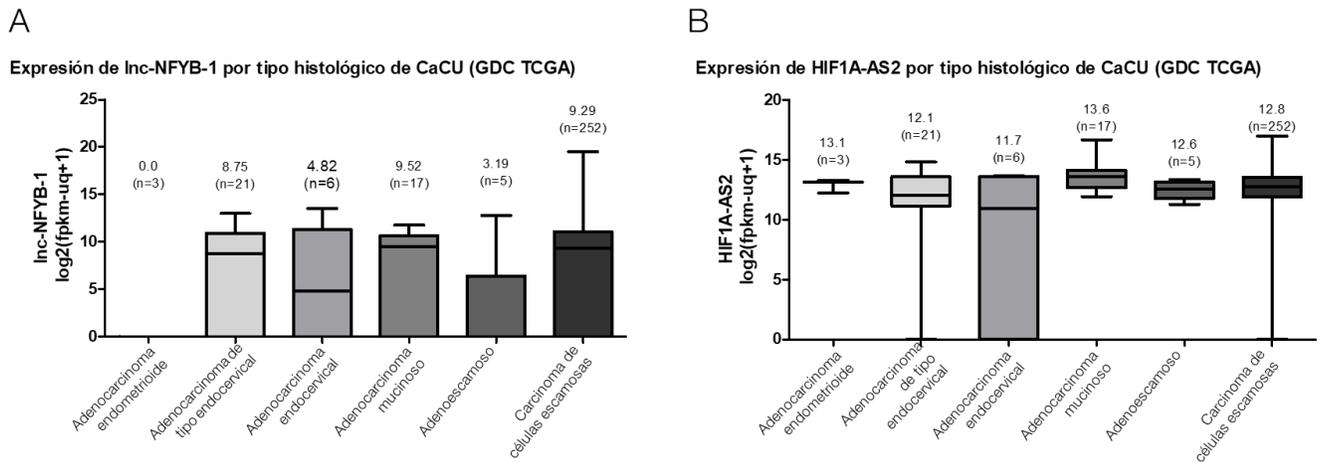
En el caso de lnc-NUTM1-1, su expresión fue más homogénea entre las diferentes líneas celulares y fue muy valioso el uso de ddPCR, ya que en este caso nos permitió cuantificar con alta sensibilidad a este transcrito que demostró expresarse con un número de copias muy reducido. Finalmente, HIF1A-AS2 se halló con una expresión mayor en la línea celular SiHa, en comparación con el resto de las líneas celulares de CaCU.

En ninguno de los casos se observó una diferencia significativa en la expresión de estos lncRNAs en todas las líneas tumorales con respecto a la línea epitelial no tumoral HaCat. Estos resultados nos mostraron una expresión muy variable de los lncRNAs en las líneas de CaCU, sin un patrón de expresión observable entre líneas tumorales y no tumorales, o entre líneas celulares de distintos tipos histológicos de CaCU o con diferentes tipos de VPH. A pesar de ello, estos datos sientan un antecedente descriptivo de la expresión de estos cinco lncRNAs en células de CaCU, la cual no había sido determinada a la fecha.

Para asegurarnos de que esta variabilidad sin patrón definido en la expresión de los lncRNAs observada en las líneas celulares de CaCU fuera un reflejo de la expresión real de los lncRNAs en tejidos tumorales, decidimos evaluar la expresión del par de lncRNAs que ya se encuentran anotados (lnc-NFYB-1 y HIF1A-AS2) en los datos disponibles para cáncer cérvico uterino en la base de datos de The Cancer Genome Atlas (TCGA) ([Figura 13](#)). Lo que pudimos observar es que no existe una correlación significativa entre la expresión de este par de lncRNAs con los diferentes tipos histológicos, lo cual concuerda con lo observado en las líneas celulares, mostrando que tampoco en muestras tumorales de pacientes se encuentra un patrón de expresión asociado a rasgos histopatológicos de estos transcritos.



**Figura 12. Expresión de los lncRNAs en líneas celulares de CaCU.** Las gráficas muestran la expresión de los cinco lncRNAs de interés en las líneas celulares HaCat (epitelial no tumoral), HeLa (VPH-18), SiHa (VPH-16), CaSki (VPH-16 y 18) y C33A (VPH negativo). La expresión se muestra en número de copias por  $\mu\text{L}$  de cDNA amplificable normalizado a la expresión de HPRT1. Las barras representan la media aritmética de 3 réplicas biológicas  $\pm$ SD.



**Figura 13. Expresión de los lncRNAs en las diferentes clases histopatológicas de CaCU.** Expresión en los distintos tipos histológicos de CaCU de los lncRNAs (A) lnc-NFYB-1 y (B) HIF1A-AS2. Datos obtenidos de la cohorte de pacientes con cáncer cérvico uterino del GDC-TCGA.

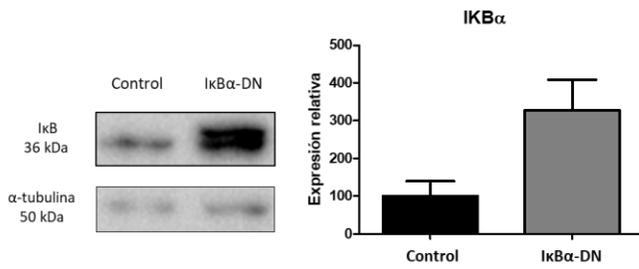
## **Inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B y cuantificación de la expresión de los lncRNAs**

Previamente en nuestro laboratorio, trabajando con el modelo de cocultivo de HeLa y ADSC, se analizó el transcriptoma codificante de las células HeLa mediante RNA-seq, y a través de métodos de análisis bioinformáticos y experimentales se identificó a la vía de NF- $\kappa$ B como la principal vía activada durante el cocultivo de esta línea celular de CaCU con ADSC. Partiendo de este antecedente consideramos evaluar si el cambio de expresión de los lncRNAs manifestados durante el cocultivo de HeLa con ADSC ocurren como consecuencia de la señalización de NF- $\kappa$ B. Por tal motivo, decidimos como primer acercamiento experimental, inhibir la actividad de la vía canónica de NF- $\kappa$ B mediante la sobreexpresión de la proteína alfa inhibidora de NF- $\kappa$ B (IKBa), la cual secuestra a las subunidades del factor transcripcional NF- $\kappa$ B y las mantiene fuera del núcleo, impidiendo su función de activador transcripcional. La proteína IKBa que utilizamos posee una mutación en su sitio de fosforilación, lo cual impide la instalación de esta modificación postraducciona la cual la llevaría a degradación proteasomal.

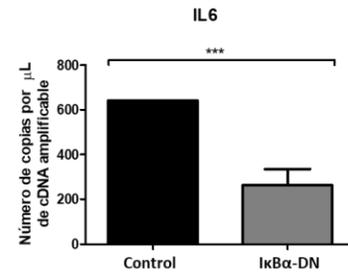
Tras haber transfectado las células HeLa con el super represor IKBa, comprobamos mediante Western Blot, la sobreexpresión de esta proteína ([Figura 14.A](#)), y con la finalidad de corroborar el estado de inactividad de la vía de NF- $\kappa$ B, cuantificamos mediante ddPCR la expresión de IL6, uno de los principales genes blanco de esta vía (Pahl, 1999). Así pudimos corroborar que al sobreexpresar a IKBa se disminuye de manera significativa la expresión de IL6 ([Figura 14.B](#)) comprobando de este modo la correcta inactivación de la señalización de NF- $\kappa$ B.

Una vez inactivada la vía de NF- $\kappa$ B, cuantificamos mediante ddPCR la expresión de nuestros cinco lncRNAs de interés en las condiciones control y de sobreexpresión de IKBa. Como resultado observamos que no se presentaron cambios significativos en el número de copias de estos lncRNAs como consecuencia de la inactivación de la señalización canónica de NF- $\kappa$ B, lo cual nos lleva a concluir que la activación transcripcional de estos cinco transcritos no se encuentra río abajo de esta vía ([Figura 14.C](#)).

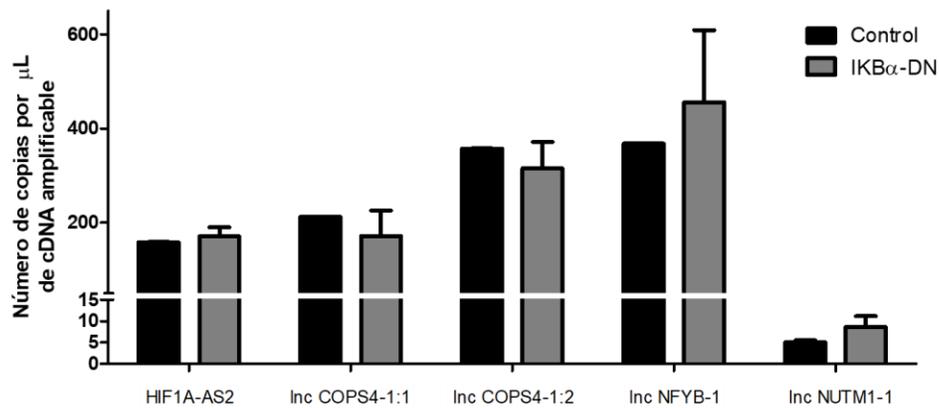
A



B



C



**Figura 14. Inhibición de la vía canónica de NF-κB.** (A) Western Blot y cuantificación de la proteína IκBα en las condiciones control y de sobreexpresión. La gráfica muestra la media aritmética  $\pm$ SD de 2 réplicas biológicas (B) Expresión de IL6 en las condiciones control y de sobreexpresión de IκBα-DN cuantificada mediante ddPCR. (D) Expresión de los cinco lncRNAs en las condiciones control y de sobreexpresión de IκBα. En (B) y (C) la expresión se muestra en número de copias por  $\mu\text{L}$  de cDNA amplificable normalizado a la expresión de HPRT1. Las barras representan la media aritmética de 3 réplicas biológicas  $\pm$ SD. La diferencia estadística se calculó mediante la prueba t de Student. Las marcas de significancia estadística representan  $***p < 0.001$ .

## IX. Discusión

La presencia de las ADSC promueve cambios en la actividad de las células tumorales en diferentes tipos de cáncer como el de ovario, el colorectal, de mama o de endometrio, sin embargo, la interacción entre ADSC y células de cáncer cérvico uterino no había sido estudiada con anterioridad a pesar de que es conocida la comorbilidad de obesidad y CaCU. De igual modo, a pesar de que es bien conocido el papel que pueden desempeñar los lncRNAs en los procesos tumorales, la mayoría de los trabajos de investigación realizados a la fecha se han enfocado en el estudio de factores de crecimiento y citocinas involucrados en la interacción ADSC-cáncer, relegando la participación

de los lncRNAs. Hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que describe los lncRNAs involucrados en la interacción entre ADSC y células cancerosas.

Los resultados obtenidos en este trabajo de licenciatura muestran que los lncRNAs exhiben alteraciones dinámicas en sus niveles de expresión como respuesta a un estímulo celular tal como lo es la interacción *in vitro* entre HeLa y ADSC, que sirve como modelo de una interacción celular que tiene lugar en el microambiente tumoral. Estos cambios de expresión de lncRNAs paralelos a los cambios de expresión de mRNAs desencadenados por un mismo estímulo, (la interacción de células HeLa con ADSC) sugieren que su expresión no es fortuita y que debería estar controlada por mecanismos similares.

Yan y colaboradores (2017) en un experimento similar que involucraba la interacción entre células de hepatocarcinoma y células troncales mesenquimales encontraron que la interacción entre estas células modifica los patrones de expresión de lncRNAs y que estos cambios de expresión se relacionan con la transición epitelial-mesenquimal de las células tumorales. Para el caso de la interacción entre células de cáncer cérvico uterino y ADSC, el panorama transcripcional de lncRNAs no había sido descrito. Nosotros a partir de nuestros datos de RNA-seq identificamos un número considerable de lncRNAs que mostraron cambios de expresión durante la interacción de células HeLa con ADSC.

Alanís-Manríquez (2015), quien trabajó previamente con esta misma secuenciación de RNA enfocándose únicamente en los datos de mRNAs, no encontró demasiada variación en la expresión de mRNAs entre réplicas biológicas, sin embargo, cuando observamos la expresión de lncRNAs obtenidos a partir de las mismas muestras de secuenciación la variación se acentúa en una de las réplicas tal como se puede notar en el Heat Map y en el análisis de componentes principales. Esto es congruente con reportes previos que indican que la expresión de lncRNAs suele ser más variable que la de mRNAs debido a que los primeros muestran patrones de expresión más específicos y sensibles al contexto celular en que se encuentran lo cual les confiere atractivo como posibles biomarcadores con mayor especificidad que los mRNAs (Gloss & Dinger, 2016; Kornienko et al., 2016).

La mayor parte de lncRNAs que transcribe el genoma humano no han sido debidamente anotados y caracterizados en las bases de datos y por lo mismo los datos de expresión de muchos lncRNAs suelen estar ausentes de las

cohortes con datos de RNA-seq. Esto hace complicado la caracterización funcional de este tipo de transcritos ya que se tiene que partir prácticamente desde cero. Por tal razón, uno de los primeros abordajes que realizamos con los lncRNAs que identificamos fue ubicarlos en los loci a partir de los cuales se transcriben, esto nos permitió identificar algunos loci en los que colocan mRNAs y lncRNAs con patrones de expresión similares durante el cocultivo de HeLa y ADSC.

Encontrar estos pares de gen codificante y su lncRNA aledaño con un cambio de expresión similar nos permitió hipotetizar algún tipo de regulación en *cis* de estos loci, particularmente de aquel ubicado en el cromosoma 20, a partir del cual se transcriben lnc-COPS4-1 y PLAC8, transcritos cuya expresión determinamos, ambos mostrando una disminución en número de copias durante el cocultivo HeLa-ADSC.

El uso de droplet digital PCR resultó muy valioso para poder cuantificar de manera precisa el número de copias de cada transcrito y detectar cambios sutiles en la expresión de los lncRNAs debido a que se ha reportado que la expresión de los lncRNAs suele ser muchas veces menor en comparación con la expresión de mRNAs (Z. Wu et al., 2014). El uso de ddPCR resultó de gran ayuda particularmente en el caso de lnc-NUTM1-1, el cual se expresa con un número de copias muy bajo y muestra cambios de expresión significativos que tal vez pueden parecer minúsculos, pero también pueden tener relevancia biológica. Este bajo nivel de expresión podría pasar desapercibido utilizando una cuantificación relativa, pero no así utilizando una cuantificación absoluta como la que ofrece el empleo de ddPCR (Taylor, Laperriere, & Germain, 2017).

También utilizando ddPCR pudimos constatar que el cultivo de células HeLa con medio condicionado (MC) de ADSC replica hasta cierto punto el efecto del cocultivo de HeLa con ADSC. Esta observación es indicativa de que los factores secretados por las ADSC y que componen al MC son responsables de algunos de los cambios de expresión de los lncRNAs y posiblemente de algunos de los cambios que presenta de manera general el transcriptoma de las células HeLa al interactuar con ADSC. Un caso similar también fue reportado por Yan (2017) al observar que el uso del MC podía replicar el efecto del cocultivo entre células troncales mesenquimales y células de hepatocarcinoma. Por tales razones sería conveniente en un futuro caracterizar cuáles son los factores presentes en el MC que promueven los cambios de expresión que observamos en las células HeLa.

De los transcritos cuya expresión pudimos validar sólo dos, lnc-NFYB-1 (ENSG00000257732.1) y HIF1A-AS2 ya estaban previamente anotados en Ensembl. De estos dos, sólo HIF1A-AS2 ha sido reportado previamente en la literatura científica, como un lncRNA antisentido al gen del factor inducible por hipoxia HIF1A (Bertozzi et al., 2011).

A este transcrito se le ha encontrado sobreexpresado en cáncer de estómago y de vejiga (M. Chen et al., 2016; W. ming Chen et al., 2015) y se ha visto que su expresión incrementada favorece el mantenimiento de las células troncales de glioblastoma en nichos hipóxicos (Mineo et al., 2016). HIF1A-AS2 favorece la expresión del mensajero de HIF1A y que tiene la capacidad de actuar como esponja sobre miR-153-3p, evitando el silenciamiento de HIF1A mediado por este miRNA (Li et al., 2017) sin embargo, aún no se han caracterizado a plenitud los mecanismos a través de los que actúa este lncRNA.

A pesar de que ya se ha reportado la actividad de HIF1A-AS2 en algunos tipos de cáncer, no se ha descrito cuál es su papel en CaCU ni en muchos otros tipos tumorales. Este lncRNA tiene potencial como un transcrito importante en la biología del cáncer debido a su relación con las respuestas celulares a hipoxia.

Por el hecho de que HIF1A-AS2 es un lncRNA ya anotado, pero nunca reportado en células de CaCU, decidimos indagar acerca de su expresión en muestras de pacientes con CaCU a través de los datos disponibles en GCD-TCGA. Mediante curvas de Kaplan-Meier pudimos observar que la expresión de HIF1A-AS2 tiene un valor pronóstico para la supervivencia de las pacientes con CaCU, ya que a mayor expresión de este transcrito se observa una menor sobrevida de las pacientes. Este dato es congruente con lo reportado previamente en cáncer gástrico, donde una sobreexpresión de HIF1A-AS2 se relaciona con un peor pronóstico en los pacientes (W. ming Chen et al., 2015).

El hallazgo del valor pronóstico de HIF1A-AS2 es interesante porque en el cocultivo de células HeLa con ADSC este lncRNA se sobreexpresa y precisamente la sobreexpresión de HIF1A-AS2 correlaciona con una menor sobrevida. Esto abre la puerta a la posibilidad de que HIF1A-AS2 pueda ser utilizado como un marcador de pronóstico en pacientes con CaCU, particularmente aquellas que sean obesas. También destaca el hallazgo de que una baja expresión de PLAC8 se relacione con una menor sobrevida en las pacientes, ya que también en el cocultivo HeLa-

ADSC su expresión se encuentra disminuida. Esto nos da una idea de que PLAC8 podría desempeñar alguna función importante en las células de CaCU, y si su expresión sigue un comportamiento similar a la de lnc-COPS4-1, entonces también este lncRNA podría jugar algún papel relevante en los tumores.

Al respecto de esta tendencia a una expresión similar que muestran lnc-COPS4-1 y PLAC8, y que llamó nuestra atención, hallamos esta misma tendencia de expresión en otro trabajo. Este consistió en un análisis comparativo de la expresión de lncRNAs entre timocitos inmaduros y células T diferenciadas de leucemia linfoblástica aguda en el cual lnc-COPS4-1 y PLAC8 mostraron una tendencia similar en su expresión y fueron ubicados en el top 50 de lncRNAs y mRNAs propuestos como oncogenes putativos (Wallaert et al., 2016). Por otra lado, en un trabajo diferente, lnc-COPS4-1 aparece en el top 30 de transcritos con expresión incrementada tras la inhibición de la ribonucleoproteína M heterogénea nuclear (HNRNPM), lo cual es un indicio de que esta ribonucleoproteína podría estar implicada en el procesamiento de lnc-COPS4-1 (Takino et al., 2017). Esta ribonucleoproteína se ha visto asociada con la activación de citocinas como IL-1, IL-10, IL-6 y TNF- $\alpha$ , jugando un rol importante en las señales inflamatorias tumorales en el hígado (Thomas et al., 2011). Estos datos nos inducen a pensar que lnc-COPS4-1 podría estar relacionado en algún proceso celular relacionado con el desarrollo tumoral y bien valdría la pena profundizar en la caracterización funcional de este lncRNA.

Para describir mejor los lncRNAs que identificamos, un primer paso en la caracterización de estos transcritos fue evaluar su localización celular. Resaltó el hecho de que las dos isoformas de lnc-COPS4-1 son tan abundantes en citoplasma como el mensajero de GAPDH, lo cual indica que si lnc-COPS4-1 ejerce alguna función, esta debe ocurrir en citoplasma, donde los lncRNAs suelen participar en procesos postranscripcionales como el splicing, la regulación de la traducción, como esponjas de miRNAs o interactuando con proteínas de señalización. Los otros lncRNAs que identificamos mostraron una localización nuclear, por lo cual probablemente tengan funciones de regulación transcripcional o de estructura de la cromatina.

Por otra parte, medir la expresión lncRNAs en varias líneas celulares de CaCU sienta un antecedente descriptivo del número de copias por  $\mu$ l de estos lncRNAs, lo cual podría ser útil en un futuro para seleccionar las líneas celulares más adecuadas para realizar ensayos de pérdida o ganancia de función de estos transcritos. Es evidente la ausencia

de un patrón de expresión claro de estos cinco lncRNAs a través de las diferentes líneas celulares que representan distintos tipos histológicos de CaCU y que poseen diferentes tipos de VPH, sin embargo, en datos del GDC-TCGA provenientes de muestras de pacientes tampoco encontramos diferencias significativas entre distintos tipos histológicos de CaCU, lo cual indica que hay congruencia entre lo observado en líneas celulares y en muestras de pacientes. Es también importante señalar que a pesar de que usamos a la línea celular HaCat como referencia al tratarse de una línea celular epitelial no tumoral comúnmente utilizada como referencia en la gran mayoría de trabajos sobre CaCU, sería mejor utilizar una línea inmortalizada derivada de cérvix, ya que HaCat es derivada de epidermis y por tanto no es el modelo ideal.

La vía de señalización de NF- $\kappa$ B regula la activación transcripcional de muchos genes que participan en procesos tumorales importantes (Naugler & Karin, 2008) y los genes de lncRNAs no son la excepción, pues se ha visto que existe una actividad regulatoria importante entre la señalización de NF- $\kappa$ B y la expresión de lncRNAs (Mao, Su, & Mookhtiar, 2017). Debido a la importancia que tiene esta vía de señalización y a que previamente fue identificada en nuestro grupo de investigación como la principal vía activada en células HeLa al estar en cocultivo con ADSC, nos parecía pertinente determinar si la expresión de los lncRNAs que identificamos era regulada por la activación de NF- $\kappa$ B. Observamos que la inhibición de la vía canónica de NF- $\kappa$ B no alteró la expresión de nuestros lncRNAs, por lo cual su activación transcripcional no yace río debajo de esta vía, sin embargo, sería conveniente inactivar la vía no canónica de NF- $\kappa$ B para valorar si esta regula la actividad de los lncRNAs. También cabe la posibilidad de que alguno de estos lncRNAs se encuentre río arriba de la vía y para esto sería necesario realizar ensayos de pérdida de función de los lncRNAs y evaluar su efecto en la vía de NF- $\kappa$ B, así como su efecto biológico en las células de CaCU.

Este trabajo tiene la cualidad de aportar la descripción de transcritos que no habían sido reportados en cáncer cérvico uterino con anterioridad y que surgen del estudio de la interacción entre células troncales del tejido adiposo con células HeLa. Esto tiene gran relevancia porque la expresión de los lncRNAs aquí descritos parece ser una característica propia de dicha interacción entre células. Además, el hallazgo de que HIF1A-AS2 y PLAC8 poseen un valor pronóstico de la supervivencia de las pacientes con CaCU es de gran relevancia clínica, especialmente porque se

ha mostrado que los lncRNAs son factibles de ser usados como biomarcadores ya que pueden encontrarse en la circulación sanguínea (Qi, Zhou, & Du, 2016).

## X. Conclusiones

Los resultados presentados en este proyecto muestran que la expresión de lncRNAs se modifica en células HeLa como consecuencia de la interacción con ADSC en cocultivo indirecto. Se validaron los cambios de expresión en el cocultivo HeLa-ADSC de cinco transcritos no codificantes que no habían sido identificados previamente en CaCU. Estos mismos cambios de expresión se pueden replicar de manera parcial cultivando las células HeLa en medio condicionado de ADSC, lo cual indica que el mayor efecto que las ADSC ejercen sobre HeLa se da a través de los factores secretados por el primer tipo celular.

De los lncRNAs validados destaca HIF1A-AS2, ya que muestra tener un valor pronóstico negativo en la supervivencia de las pacientes con CaCU. Lo contrario se puede decir de PLAC8, gen codificante aledaño a lnc-COPS4-1, con quien comparte la misma tendencia de expresión en cocultivo HeLa-ADSC, y que posee un valor pronóstico positivo en las pacientes con CaCU. HIF1A-AS2 y lnc-COPS4-1 podrían ejercer funciones importantes en las células de CaCU. También se determinó que las dos isoformas de lnc-COPS4-1 son predominantemente citoplasmáticas, mientras que el resto de los lncRNAs son nucleares. Además, permitió concluir que la vía de señalización de NF- $\kappa$ B no regula la expresión de los lncRNAs validados al menos a través de su señalización canónica.

Este trabajo se enfocó en describir lncRNAs que no habían sido identificados en CaCU, caracterizando su localización celular, así como sus niveles de expresión absoluta en líneas celulares de CaCU y sienta un antecedente en la caracterización de estos cinco transcritos no codificantes, abriendo la posibilidad de que alguno de ellos pueda ser utilizado a futuro como biomarcador de pronóstico para pacientes con CaCU, particularmente aquellas con sobrepeso.

## XI. Perspectivas

El presente trabajo demuestra que existen cambios dinámicos de expresión de lncRNAs en células HeLa cuando estas interactúan con células ADSC. Realizar más ensayos de cocultivo con otras líneas celulares de CaCU robustecería la información presentada, ya que permitiría averiguar si estos lncRNAs también modifican su expresión de manera similar en otras líneas celulares.

Con el propósito de caracterizar la función de los lncRNAs que identificamos, sería conveniente realizar una correlación bioinformática de la coexpresión de los lncRNAs con mRNAs a partir de los datos obtenidos de secuenciación, esto con la finalidad de identificar vías o procesos a los cuales pudieran estar asociados los lncRNAs en cuestión. Esta información debería ser corroborada de manera experimental a través de ensayos de pérdida de función, inhibiendo a los lncRNAs individualmente para observar cual es el efecto fenotípico que tiene su inhibición sobre las células de CaCU, realizando ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*. Sería interesante evaluar si inhibiendo la expresión de lnc-COPS4-1 se modifica la expresión de su gen aledaño PLAC8, para de esta forma determinar la existencia de una regulación transcripcional en *cis* de este lncRNA.

Por otra parte, es bien sabido que los lncRNAs comúnmente ejercen sus funciones celulares interactuando con proteínas. Por tal motivo, sería fundamental para la caracterización nuestros lncRNAs, conocer cuáles son las proteínas con las que interactúan. Para esto sería necesario realizar un *pull-down* de cada uno de los lncRNAs de interés, para mediante espectrometría de masas identificar las proteínas que interactúan con los transcritos. Un análisis *in silico* de las proteínas putativas de interacción con los lncRNAs ayudaría a dirigir de mejor manera el diseño experimental.

Finalmente, también sería conveniente realizar un análisis proteómico o metabolómico del medio condicionado con el fin de determinar su composición y estudiar qué factores producidos por las ADSC son los que le confieren al medio condicionado la capacidad de modificar el transcriptoma de las células HeLa.

## XII. Referencias

- Alanís-Manríquez, E. C. (2015). *Análisis molecular de la interacción entre células troncales de tejido adiposo ADSC y células tumorales de cáncer. Tesis de Maestría.* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arnér, E. S. J. (2017). Targeting the Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1 for Anticancer Therapy. *Advances in Cancer Research*, *136*, 139–151. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.07.005>
- Arnheim Dahlström, L., Andersson, K., Luostarinen, T., Thoresen, S., Ögmundsdóttir, H., Tryggvadóttir, L., ... Dillner, J. (2011). Prospective seroepidemiologic study of human papillomavirus and other risk factors in cervical cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *20*(12), 2541–50. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0761>
- B.W, S., & Wild, C. P. (2014). World Cancer Report 2014. *IARC Nonserial Publication: WHO Press.*, 422–431. <https://doi.org/9283204298>
- Berrington de Gonzalez, A., Hartge, P., Cerhan, J. R., Flint, A. J., Hannan, L., MacInnis, R. J., ... Thun, M. J. (2010). Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults. *New England Journal of Medicine*, *363*(23), 2211–2219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000367>
- Bertone, P., Stolc, V., Royce, T. E., Rozowsky, J. S., Urban, A. E., Zhu, X., ... Snyder, M. (2004). Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science*, *306*(5705), 2242–2246. <https://doi.org/10.1126/science.1103388>
- Bertozzi, D., Iurlaro, R., Sordet, O., Marinello, J., Zaffaroni, N., & Capranico, G. (2011). Characterization of novel antisense HIF-1 $\alpha$  transcripts in human cancers. *Cell Cycle*, *10*(18), 3189–3197. <https://doi.org/10.4161/cc.10.18.17183>
- Bhatia, M., McGrath, K. L., Di Trapani, G., Charoentong, P., Shah, F., King, M. M., ... Tonissen, K. F. (2016). The thioredoxin system in breast cancer cell invasion and migration. *Redox Biology*, *8*, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.12.004>
- Bosch, F. X., Burchell, A. N., Schiffman, M., Giuliano, A. R., de Sanjose, S., Bruni, L., ... Muñoz, N. (2008). Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. *Vaccine*, *26*, K1–K16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.064>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Journal for Clinicians*, *00*(00), 1–31. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Calle, E. E., & Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*, *4*(8), 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrc1408>
- Cao, S., Liu, W., Li, F., Zhao, W., & Qin, C. (2014). *Decreased expression of lncRNA GAS5 predicts a poor prognosis in cervical cancer. Int J Clin Exp Pathol* (Vol. 7). Retrieved from [www.ijcep.com/](http://www.ijcep.com/)
- Cao, W., Peng, T., & Zhou, Y. (2017). Long noncoding RNA activated by transforming growth factor- $\beta$  promotes cancer development and is a prognostic marker in cervical cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *13*(5), 801–806. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_256\\_17](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_256_17)
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., ... Genome Science Group. (2005).

The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309(5740), 1559–1563. <https://doi.org/10.1126/science.1112014>

- Chen, M., Zhuang, C., Liu, Y., Li, J., Dai, F., Xia, M., ... Huang, W. (2016). Tetracycline-inducible shRNA targeting antisense long non-coding RNA HIF1A-AS2 represses the malignant phenotypes of bladder cancer. *Cancer Letters*, 376(1), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.037>
- Chen, W. ming, Huang, M. de, Kong, R., Xu, T. peng, Zhang, E. bao, Xia, R., ... Shu, Y. qian. (2015). Antisense Long Noncoding RNA HIF1A-AS2 Is Upregulated in Gastric Cancer and Associated with Poor Prognosis. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(6), 1655–1662. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3524-0>
- Cheng, K.-H., Kuo, T.-L., Kuo, K.-K., & Hsiao, C.-C. (2011). Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences*, 3(2), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.gmbhs.2011.08.003>
- Clark, L. H., Jackson, A. L., Soo, A. E., Orrey, D. C., Gehrig, P. A., & Kim, K. H. (2016). Extremes in body mass index affect overall survival in women with cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 141(3), 497–500. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.03.035>
- Clarke, M. A., Fetterman, B., Cheung, L. C., Wentzensen, N., Gage, J. C., Katki, H. A., ... Schiffman, M. (2018). Epidemiologic Evidence That Excess Body Weight Increases Risk of Cervical Cancer by Decreased Detection of Precancer. *Journal of Clinical Oncology*, 36(12), JCO.2017.75.344. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.3442>
- Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Muñoz, N., & Franceschi, S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 88(1), 63–73. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600688>
- Cousin, B., Ravet, E., Poglio, S., De Toni, F., Bertuzzi, M., Lulka, H., ... Cordelier, P. (2009). Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 4(7), 31–34. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006278>
- Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013a). Human papillomavirus and cervical cancer. *Www.TheLancet.Com*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)
- Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013b). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 382, 889–899. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. L., & Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 366(9499), 1784–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67725-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67725-2)
- Diaz-Gastelum, C. B. (2016). *Efecto de los productos de secreción de células troncales derivadas del tejido adiposo sobre la viabilidad, proliferación y miRNoma en un amilínea tumoral humana*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dimitrova, N., Zamudio, J. R., Jong, R. M., Soukup, D., Resnick, R., Sarma, K., ... Jacks, T. (2014). LincRNA-p21 Activates p21 In cis to Promote Polycomb Target Gene Expression and to Enforce the G1/S Checkpoint. *Molecular Cell*, 54(5), 777–790. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.025>
- ENCODE Consortium. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447(7146), 799–816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>

- Eoh, K. J., Paek, J., Kim, S. W., Kim, H. J., Lee, H. Y., Lee, S. K., & Kim, Y. T. (2017). Long non-coding RNA, steroid receptor RNA activator (SRA), induces tumor proliferation and invasion through the NOTCH pathway in cervical cancer cell lines. *Oncology Reports*, *38*(6), 3481–3488. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6023>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Forrest, M. E., & Khalil, A. M. (2017). Review: Regulation of the cancer epigenome by long non-coding RNAs. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.040>
- French, C. A. (2018). NUT Carcinoma: Clinicopathologic features, pathogenesis, and treatment. *Pathology International*, (September), 1–13. <https://doi.org/10.1111/pin.12727>
- Fu, B., Meng, W., Zeng, X., Zhao, H., Liu, W., & Zhang, T. (2017). TXNRD1 Is an Unfavorable Prognostic Factor for Patients with Hepatocellular Carcinoma. <https://doi.org/10.1155/2017/4698167>
- Garibotti, E. J., Cervellini, P. M., & Piccolo, M. C. (2009). Microcrustáceos planctónicos y características limnológicas de dos lagunas pampeanas (Buenos Aires, Argentina). *Limnetica*, *28*(1), 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.013>
- Gloss, B. S., & Dinger, M. E. (2016). The specificity of long noncoding RNA expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1859*(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.08.005>
- Guo, F., Li, Y., Liu, Y., Wang, J., Li, Y., & Li, G. (2010). Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *42*(3), 224–229. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq008>
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., ... Chang, H. Y. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, *464*(7291), 1071–1076. <https://doi.org/10.1038/nature08975>
- Gutiérrez-Delgado, C., Báez-Mendoza, C., González-Pier, E., Prieto de la Rosa, A., & Witlen, R. (2008). Relación costo-efectividad de las intervenciones preventivas contra el cáncer cervical en mujeres mexicanas. *Salud Pública de México*, *50*(2), 107–118. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342008000200004>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes & Development*, *18*, 2195–2224. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704.bone>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*, *132*(3), 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- Hernández-Hernández, D. M., Apresa-García, T., Ma Patlán-Pérez, R., Factores de riesgo, E., de Salud, P., Con, C., & Hernández Hernández, D. M. (2015). Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino Epidemiological overview of uterine cervical cancer. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, *53*(2), 154–61. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/ims152f.pdf>
- Hessels, D., Klein Gunnewiek, J. M. T., Van Oort, I., Karthaus, H. F. M., Van Leenders, G. J. L., Van Balken, B., ... Cullig, Z. (2003). DD3PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *European Urology*, *44*(1), 8–16. [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(03\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(03)00201-X)

- Hindson, C. M., Chevillet, J. R., Briggs, H. A., Gallichotte, E. N., Ruf, I. K., Hindson, B. J., ... Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods*, *10*(10), 1003–1005. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2633>
- Hu, W., Alvarez-Dominguez, J. R., & Lodish, H. F. (2012). Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. *EMBO Reports*. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.145>
- Hua, F., Liu, S., Zhu, L., Ma, N., Jiang, S., & Yang, J. (2017). Highly expressed long non-coding RNA NNT-AS1 promotes cell proliferation and invasion through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in cervical cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *92*, 1128–1134. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.057>
- Huang, L., Liao, L.-M., Liu, A.-W., Wu, J.-B., Cheng, X.-L., Lin, J.-X., & Zheng, M. (2014). Overexpression of long noncoding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with cervical cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *290*(4), 717–723. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3236-2>
- INEGI. (2016). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO) DATOS NACIONALES. Retrieved March 26, 2018, from [http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016\\_0.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf)
- International Agency for Research on Cancer. (2007). *Human papillomaviruses*. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002). Weight Control and Physical Activity. *IARC Handbooks of Cancer Prevention/ World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, *6*, 1–315. Retrieved from <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/prev/handbook6/Handbook6.pdf>
- Jiang, S., Wang, H. L., & Yang, J. (2015). Low expression of long non-coding RNA LET inhibits carcinogenesis of cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, *8*(1), 806–811. Retrieved from [www.ijcep.com/](http://www.ijcep.com/)
- Jost, P. J., & Ruland, J. (2007). Aberrant NF- $\kappa$ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*, *109*(7), 2700–2707. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-025809>
- Karin, M. (2006). Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature*, *441*(7092), 431–436. <https://doi.org/10.1038/nature04870>
- Key, T. J., Spencer, E. A., & Reeves, G. K. (2010). Symposium 1: Overnutrition: Consequences and solutions Obesity and cancer risk. In *Proceedings of the Nutrition Society* (Vol. 69, pp. 86–90). <https://doi.org/10.1017/S0029665109991698>
- Khandekar, M. J., Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2011). Molecular mechanisms of cancer development in obesity. <https://doi.org/10.1038/nrc3174>
- Kidd, S., Spaeth, E., Watson, K., Burks, J., Lu, H., Klopp, A., ... Marini, F. C. (2012). Origins of the Tumor Microenvironment: Quantitative Assessment of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Stroma. *PLoS ONE*, *7*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030563>
- Kim, H. J., Lee, D. W., Yim, G. W., Nam, E. J., Kim, S., Kim, S. W., & Kim, Y. T. (2015). Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression. *International Journal of Oncology*, *46*(2), 521–530. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2758>
- Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N., & Chrousos, G. P. (2010). Noncoding RNA Gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science Signaling*, *3*(107). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000568>

- Klopp, A. H., Zhang, Y., Solley, T., Amaya-Manzanares, F., Marini, F., Andreeff, M., ... Kolonin, M. G. (2012). Omental adipose tissue-derived stromal cells promote vascularization and growth of endometrial tumors. *Clinical Cancer Research*, *18*(3), 771–782. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1916>
- Kornienko, A. E., Dotter, C. P., Guenzl, P. M., Gisslinger, H., Gisslinger, B., Cleary, C., ... Barlow, D. P. (2016). Long non-coding RNAs display higher natural expression variation than protein-coding genes in healthy humans. *Genome Biology*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0873-8>
- Lacey, J. V., Swanson, C. A., Brinton, L. A., Altekruise, S. F., Barnes, W. A., Gravitt, P. E., ... Hildesheim, A. (2003). Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer*, *98*(4), 814–821. <https://doi.org/10.1002/cncr.11567>
- Li, L., Wang, M., Mei, Z., Cao, W., Yang, Y., Wang, Y., & Wen, A. (2017). lncRNAs HIF1A-AS2 facilitates the up-regulation of HIF-1 $\alpha$  by sponging to miR-153-3p, whereby promoting angiogenesis in HUVECs in hypoxia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *96*(August), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.113>
- Liao, L. M., Sun, X. Y., Liu, A. W., Wu, J. B., Cheng, X. L., Lin, J. X., ... Huang, L. (2014). Low expression of long noncoding XLOC-010588 indicates a poor prognosis and promotes proliferation through upregulation of c-Myc in cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, *133*(3), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.555>
- Lin, C.-S., Xin, Z.-C., Deng, C.-H., Ning, H., Lin, G., & Lue, T. F. (2010). Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histology and Histopathology*, *25*(6), 807–815. <https://doi.org/10.14670/HH-25.807>
- Lin, G., Yang, R., Banie, L., Wang, G., Ning, H., Li, L.-C., ... Lin, C.-S. (2010). Effects of transplantation of adipose tissue-derived stem cells on prostate tumor. *The Prostate*, *70*(10), 1066–73. <https://doi.org/10.1002/pros.21140>
- Lu, J.-H., Wei, H.-J., Peng, B.-Y., Chou, H.-H., Chen, W.-H., Liu, H.-Y., & Deng, W.-P. (2016). Adipose-Derived Stem Cells Enhance Cancer Stem Cell Property and Tumor Formation Capacity in Lewis Lung Carcinoma Cells Through an Interleukin-6 Paracrine Circuit. *Stem Cells and Development*, *25*(23), 1833–1842. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0163>
- Luan, X., & Wang, Y. (2018). lncRNA XLOC\_006390 facilitates cervical cancer tumorigenesis and metastasis as a ceRNA against miR-331-3p and miR-338-3p. *Journal of Gynecologic Oncology*, *29*(6). <https://doi.org/10.3802/jgo.2018.29.e95>
- Mao, X., Su, Z., & Mookhtiar, A. K. (2017). Long non-coding RNA: A versatile regulator of the nuclear factor- $\kappa$ B signalling circuit. *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/imm.12698>
- Marchese, F. P., Raimondi, I., & Huarte, M. (2017). The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1348-2>
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 $\alpha$  pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>
- Mineo, M., Ricklefs, F., Rooj, A. K., Lyons, S. M., Ivanov, P., Ansari, K. I., ... Bronisz, A. (2016). The Long Non-coding RNA HIF1A-AS2 Facilitates the Maintenance of Mesenchymal Glioblastoma Stem-like Cells in Hypoxic Niches. *Cell Reports*, *15*(11), 2500–2509. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.018>
- Naemura, M., Murasaki, C., Inoue, Y., Okamoto, H., & Kotake, Y. (2015). Long Noncoding RNA ANRIL Regulates Proliferation of Non-small Cell Lung Cancer and Cervical Cancer Cells. *Anticancer Res*, *35*(10), 5377–5382. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26408699>

- Nagano, T., Mitchell, J. A., Sanz, L. A., Pauler, F. M., Ferguson-Smith, A. C., Feil, R., & Fraser, P. (2008). The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5908), 1717–20. <https://doi.org/10.1126/science.1163802>
- National Cancer Institute. NIH. (n.d.). What Is Cancer? - National Cancer Institute. Retrieved August 12, 2018, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Naugler, W. E., & Karin, M. (2008). NF- $\kappa$ B and cancer—identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development*, *18*(1), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.020>
- Nowicka, A., Marini, F. C., Solley, T. N., Elizondo, P. B., Zhang, Y., Sharp, H. J., ... Klopp, A. H. (2013). Human omental-derived adipose stem cells increase ovarian cancer proliferation, migration, and chemoresistance. *PLoS ONE*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081859>
- OECD. (2017). *Obesity Update 2017* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1007/s11428-017-0241-7>
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203239>
- Pandey, R. R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., ... Kanduri, C. (2008). Kcnq1ot1 Antisense Noncoding RNA Mediates Lineage-Specific Transcriptional Silencing through Chromatin-Level Regulation. *Molecular Cell*, *32*(2), 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.022>
- Parekh, N., Chandran, U., & Bandera, E. V. (2012). Obesity in Cancer Survival. *Annual Review of Nutrition*, *32*(1), 311–342. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071811-150713>
- Peng, L., Yuan, X., Jiang, B., Tang, Z., & Li, G. C. (2016, March 29). LncRNAs: key players and novel insights into cervical cancer. *Tumor Biology*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4663-9>
- Prensner, J. R., Iyer, M. K., Sahu, A., Asangani, I. A., Cao, Q., Patel, L., ... Chinnaiyan, A. M. (2013). The long noncoding RNA SChLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.2771>
- Qi, P., Zhou, X. yan, & Du, X. (2016). Circulating long non-coding RNAs in cancer: Current status and future perspectives. *Molecular Cancer*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0524-4>
- Qin, R., Chen, Z., Ding, Y., Hao, J., Hu, J., & Guo, F. (2013). Long non-coding RNA MEG3 inhibits the proliferation of cervical carcinoma cells through the induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Neoplasma*, *60*(5), 486–492. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2013\\_063](https://doi.org/10.4149/neo_2013_063)
- Renehan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F., & Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet*, *371*(9612), 569–578. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60269-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60269-X)
- Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, *81*(1), 145–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>
- Ruiz Matus, C., Gaona Pineda, E. B., Méndez Gómez-Humarán, I., Cuevas Nasu, L., Gómez Acosta, L. M., Jiménez Corona, M. E., ... Shamah Levy, T. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016* (1st ed.). Cuernava, Morelos.: SPM Ediciones. Retrieved from <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>
- Saito, Y., Shimada, M., Utsunomiya, T., Ikemoto, T., Yamada, S., Morine, Y., ... Takasu, C. (2014). Homing effect

of adipose-derived stem cells to the injured liver: The shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 21(12), 873–880. <https://doi.org/10.1002/jhbp.147>

- Sánchez-Barriga, J. J. (2012). Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008 A ntecedentes, 42–51.
- St. Laurent, G., Wahlestedt, C., & Kapranov, P. (2015). The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends in Genetics*, 31(5), 239–251. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.007>
- Strong, A. L., Burow, M. E., Gimble, J. M., & Bunnell, B. A. (2015). Concise review: The obesity cancer paradigm: Exploration of the interactions and crosstalk with adipose stem cells. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.1857>
- Sun, N. X., Ye, C., Zhao, Q., Zhang, Q., Xu, C., Wang, S. B., ... Li, W. (2014). Long noncoding RNA-EBIC promotes tumor cell invasion by binding to EZH2 and repressing E-cadherin in cervical cancer. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100340>
- Takino, J., Nagamine, K., Suzuki, M., Sakasai-Sakai, A., Takeuchi, M., & Hori, T. (2017). Gene Expression Changes Associated with the Loss of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein M Function. *American Journal of Molecular Biology*, 07(02), 87–98. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2017.72007>
- Taylor, S. C., Laperriere, G., & Germain, H. (2017). Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>
- Thomas, P., Forse, R. A., & Bajenova, O. (2011). Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clinical and Experimental Metastasis*. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9419-3>
- Vazquez-Santillan, K., Melendez-Zajgla, J., Jimenez-Hernandez, L., Martinez-Ruiz, G., & Maldonado, V. (2015). NF-κB signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target? *Cellular Oncology*, 38(5), 327–339. <https://doi.org/10.1007/s13402-015-0236-6>
- Wallaert, A., Durinck, K., Van Looche, W., Van De Walle, I., Matthijssens, F., Volders, P. J., ... Speleman, F. (2016). Long noncoding RNA signatures define oncogenic subtypes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 30(9), 1927–1930. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.82>
- Walne, A. J., Vulliamy, T., Marrone, A., Beswick, R., Kirwan, M., Masunari, Y., ... Dokal, I. (2007). Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Human Molecular Genetics*, 16(13), 1619–1629. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm111>
- Wang, Y.-F., Zhang, S., Li, X.-Q., & Wang, Y. (2016). Expression of lncRNA HULC in cervical cancer and its correlation with tumor progression and patient survival. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(19), 3987–3991. Retrieved from <https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/3987-3991-lncRNA-HULC-expression-in-cervical-cancer.pdf>
- Wang, Y., Chu, Y., Yue, B., Ma, X., Zhang, G., Xiang, H., ... Chen, B. (2017). Adipose-derived mesenchymal stem cells promote osteosarcoma proliferation and metastasis by activating the STAT3 pathway. *Oncotarget*, 8(14), 23803–23816. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15866>
- Wankhade, U. D., Shen, M., Kolhe, R., & Fulzele, S. (2016). Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. *Stem Cells International*.

<https://doi.org/10.1155/2016/3206807>

- Wei, H.-J., Zeng, R., Lu, J.-H., Lai, W.-F. T., Chen, W.-H., Liu, H.-Y., ... Deng, W.-P. (2015). Adipose-derived stem cells promote tumor initiation and accelerate tumor growth by interleukin-6 production. *Oncotarget*, *6*(10), 7713–7726. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3481>
- Weinberg, R. A. (2013). *The Biology of Cancer* (2nd ed., Vol. 53). Garland Science. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- World Health Organization. (2018). Obesity and overweight. Retrieved July 27, 2018, from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Wu, L., Jin, L., Zhang, W., & Zhang, L. (2016). Roles of Long Non-Coding RNA CCAT2 in Cervical Cancer Cell Growth and Apoptosis. *Med Sci Monit*, *22*, 875–879. <https://doi.org/10.12659/MSM.897754>
- Wu, Z., Liu, X., Liu, L., Deng, H., Zhang, J., Xu, Q., ... Ji, A. (2014). Regulation of lncRNA expression. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *19*(4), 561–575. <https://doi.org/10.2478/s11658-014-0212-6>
- Yan, X., Zhang, D., Wu, W., Wu, S., Qian, J., Hao, Y., ... Fan, Z. (2017). Mesenchymal stem cells promote hepatocarcinogenesis via lncRNA–MUF interaction with ANXA2 and miR-34a. *Cancer Research*, *77*(23), 6704–6716. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1915>
- Yang, M., Zhai, X., Xia, B., Wang, Y., & Lou, G. (2015). Long noncoding RNA CCHE1 promotes cervical cancer cell proliferation via upregulating PCNA. *Tumor Biology*, *36*(10), 7615–7622. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3465-4>
- Yu, X., Su, B., Ge, P., Wang, Z., Li, S., Huang, B., ... Lin, J. (2015). Human Adipose Derived Stem Cells Induced Cell Apoptosis and S Phase Arrest in Bladder Tumor, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/619290>
- Zhang, S., Zhang, G., & Liu, J. (2016). Long noncoding RNA PVT1 promotes cervical cancer progression through epigenetically silencing miR-200b. *APMIS*, *124*(8), 649–658. <https://doi.org/10.1111/apm.12555>
- Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J.-J., & Lee, J. T. (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5902), 750–6. <https://doi.org/10.1126/science.1163045>
- Zhao, W., Ren, G., Zhang, L., Zhang, Z., Liu, J., Kuang, P., ... Wang, X. (2012). Efficacy of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue in Inhibition of Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, *27*(9), 606–613. <https://doi.org/10.1089/cbr.2011.1150>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., ... Hedrick, M. H. (2001). Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, *7*(2), 211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>