



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación del papel
funcional del miR196a
en Cáncer Cervical**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :

**ERIKA BEATRIZ DÍAZ
HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. VÍCTOR MANUEL GONZÁLEZ QUINTANA**

**ASESOR DE TESIS:
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE**

Ciudad de México, Octubre 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Jurado asignado:

PRESIDENTE

Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA

VOCAL

DR. VÍCTOR MANUEL GONZÁLEZ QUINTANA

SECRETARIO

DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

SUPLENTE

Q.F.B. ALICIA CABRERA AGUILAR

SUPLENTE

Q.F.B. IXEL VENECIA GONZÁLEZ HERRERA

ÁREA DEL PROYECTO

Genética Clínica

MODALIDAD:

Experimental

LUGAR DE DESARROLLO

Laboratorio de Genómica del
Instituto Nacional de Cancerología
Secretaría de Salud

*“A veces, no se pone atención en cosas importantes,
porque parecen demasiado sencillas”*

José Martí (1853-1895)

Agradecimientos.

GRACIAS:

A Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida y tener la dicha de pertenecer a mi familia, la cual me ha apoyado en cada decisión que he tomado y por enseñarme lecciones valiosas que me han dejado bastos aprendizajes en este trayecto por la vida.

Agradezco la oportunidad que se me ha brindado para continuar con mis proyectos profesionales y personales que han ayudado en transformarme en la persona que soy actualmente. No ha sido nada sencillo el camino, pero gracias a la voluntad de Dios y de muchas personas que me han aportado su conocimiento y experiencias valiosas que me han aportado aprendizajes para lograr culminar esta meta.

A aquellas personas especiales y amistades que han estado acompañándome durante este camino con su buena intención y con su apoyo incondicional.

A cada uno de los formadores educativos que durante mi trayecto académico fueron aportando un granito de arena para construir la profesionalista que hoy represento.

Dedicatorias

*Dedico este trabajo a mis padres **Miguel Ángel Díaz Sámano (RIP), María Elvira Hernández Rosales** y a mis hermanos **Edison, Leonardo y Adán Díaz Hernández** por ser los mejores compañeros de vida que me tocaron.*

*Al **Dr. Víctor Manuel González Quintana** por las excelentes enseñanzas y apoyo para la realización de este trabajo.*

*A **José Manuel Pérez Pérez** por ser un gran amigo incondicional.*

*A la **Dra. Raquel Retana Ugalde** que con su propositividad y amplio conocimiento ha guiado la culminación de este proyecto.*

Contenido

1. RESUMEN	1
1.1 Cáncer cervical	4
1.1.1 Panorama mundial del cáncer cervical	4
1.1.2 El cáncer cervical en México	7
1.1.3 Clasificación del cáncer cervical	9
1.2 Cáncer	12
1.3 Epigenética y cáncer	13
1.4 MicroRNAs	14
1.5 Biogénesis de los microRNAs	15
1.6 MicroRNAs y cáncer	17
1.7 Antecedentes.....	19
2. Hipótesis.....	23
3. Planteamiento del problema	24
4. Objetivos.....	25
4.1 Objetivo general	25
4.1.1 Objetivos específicos.....	25
5. Métodos.....	26
5.1 Validación de la expresión de miR-196a en tumores cervicales.....	26
5.1.1 Obtención de las muestras	26
5.1.2 Criterios de inclusión	27
5.1.3 Criterios de exclusión	27
5.1.4 Extracción de RNA	28
5.1.5 Síntesis de cDNA.....	28

5.1.6 qPCR para medir la expresión de miR-196a	29
5.2 Validación de la expresión de miR-196a en líneas celulares de cáncer cervical..	30
5.2.1 Cultivo celular	30
5.2.2 Extracción de RNA	30
5.2.3 Síntesis de cDNA.....	30
5.2.4 qPCR para medir la expresión de miR-196a	31
5.3 Identificación de blancos moleculares de miR-196a.....	31
5.3.1 Búsqueda de blancos moleculares en las bases de datos: miRbase, TargetScan y DianaTools.....	31
5.3.2 Diseño de primers de ANXA1, GATA6 y PDCD4	31
5.3.3 qPCR para medir la expresión de ANXA1, GATA6 Y PDCD4	32
5.4 Ensayo funcional	34
5.4.1 Extracción de proteínas totales de líneas celulares.....	34
5.4.2 Identificación de proteínas por Western-blot	34
5.4.3 Silenciamiento y sobreexpresión de miR-196a.....	35
5.5 Análisis estadístico	36
6. RESULTADOS	37
6.1 Validación de la expresión de miR-196a en muestras de tumores cervicales	37
6.2 Evaluación de la expresión de miR-196a en líneas celulares de CC	38
6.3 Evaluación de la expresión de los blancos moleculares de miR-196a en un modelo in vitro de cáncer cervical	39
6.3.1 Resultados del análisis de expresión de ANXA1	39
6.3.2 Resultados del análisis de expresión de GATA6.....	40

6.3.3 Resultados del análisis de expresión de PDCD4	41
6.4 Ensayos funcionales.....	43
6.4.1 Nivel de expresión de miR-196a en células HeLa transfectantes.....	43
6.5 Nivel de expresión de blancos moleculares de miR-196a en células HeLa transfectantes	44
6.5.1 Resultados del análisis de expresión de ANXA1	44
6.5.2. Resultados del análisis de expresión de GATA6.....	45
6.5.3 Resultados del análisis de expresión de PDCD4	46
6.6 Expresión proteica de GATA6	46
7. DISCUSIÓN.....	48
8. CONCLUSIONES.....	54
9. REFERENCIAS:	55

Abreviaturas

- **ANXA1.** Annexina A1
- **CC.** Cáncer cervical
- **cDNA.** DNA complementario
- **CIS.** Carcinoma *in situ*
- **FIGO.** Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
- **GATA6.** Factor de transcripción asociado a GATA6
- **Hallmarks del cáncer.** Conjunto de características que definen a todas las enfermedades neoplásicas.
- **miRNA.** microRNA
- **NIC.** Neoplasia intraepitelial cervical
- **PDCD4.** Programmed cell death 4/factor inhibidor neoplásico
- **qPCR.** Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
- **RT.** Transcripción reversa
- **SFB.** Suero fetal bovino
- **VPH.** Virus del papiloma humano

1. RESUMEN

El cáncer cervical (CC) es una patología que afecta a mujeres en edad reproductiva, principalmente en países en vías de desarrollo, es por esto que en nuestro país es considerado un problema de salud pública. Se ha identificado al virus del Papiloma Humano como el agente etiológico en el 99.9% de los tumores cervicales, no obstante, se sabe que es un factor necesario, pero no suficiente para iniciar la carcinogénesis cervical. Los microRNAs son moléculas pequeñas (19-22nt) de RNA no codificante capaces de regular la expresión génica por complementariedad de bases con la región 3'UTR de los mRNA blanco, estas biomoléculas están asociadas a diversos procesos biológicos tanto en estados normales y patológicos, como el cáncer. Los microRNAs están asociados a procesos carcinogénicos tales como la proliferación celular, inhibición de apoptosis, migración y metástasis. El papel funcional de los microRNAs en el cáncer es complicado de describir debido al carácter pleiotrópico de los mismos, es por esto que el objetivo de este estudio fue describir la función de miR-196a, microRNA implicado en el cáncer cervical. En el presente trabajo se evaluó el nivel de expresión de miR-196^a en muestras de tumores cervicales, así como en un panel de 5 líneas celulares derivadas de CC, encontrándose este incrementado con respecto a los controles. Posteriormente se procedió a identificar los blancos moleculares de este microRNA utilizando las herramientas moleculares para predicción de blancos TarBase, miRTarBase y DianaTools y se seleccionaron 3 genes asociados a los *hallmarks* del cáncer ANXA1, GATA6 y PDCD4, el análisis de expresión de los mismos indicó una correlación negativa entre estos y miR-196a. Finalmente se midió la expresión proteica de GATA6 para

demostrar que la expresión de miR-196^a afecta los niveles de expresión de dicha proteína. Los resultados de este estudio contribuyen a la elucidación de los procesos celulares afectados por la desregulación de los microRNAs en cáncer cervical

Abstract

Cervical cancer is a neoplastic disease affecting reproductive-age women, mostly in less developed countries, therefore it is considered as a public health problem in Mexico. It is already reported that human papilloma virus is the etiological agent in 99.9% of cervical tumors, however it is a necessary but not sufficient factor for triggering cervical carcinogenesis. MicroRNAs are small (19-22nt) non-coding RNA molecules better known for its role in regulation of gene expression by base complementarity with 3'UTR region of target mRNAs, these biomolecules are associated with many biological processes, in both, normalcy and pathologic states, such as cancer. MicroRNAs are associated with carcinogenic processes, as cell proliferation, apoptosis inhibition, migration and metastasis. Unveiling the functional role of microRNAs in cancer is complex because of the pleiotropic behavior of these molecules, that is why the main objective of this project is to describe the function of miR-196a, a microRNA involved in cervical cancer. In the present work, the expression level of miR-196a was assessed in both, cervical tumor samples and a set of 5 cervical cancer cell lines, finding an increment in it. Afterwards, we proceeded to identify the molecular targets of miR-196a by means of bioinformatics online tools for predicting microRNA targets: TarBase, miRTarBase and DianaTools and 3 target genes were selected because of their relationship with the hallmarks of cancer ANXA1, GATA6 and PDCD4, further analysis revealed a negative correlation between target and miR-196a expression. Finally, protein levels of GATA6 were assessed in order to corroborate the relationship between miR-196a and GATA6. Taken together the results from this study contribute to the elucidation of cell processes affected by microRNA deregulation in cervical cancer.

INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer cervical

1.1.1 Panorama mundial del cáncer cervical

El cáncer cervical (CC) es una patología caracterizada por un crecimiento descontrolado y anormal de las células que recubren el epitelio cervical. Histológicamente, el CC se clasifica en carcinoma escamoso y adenoescamoso, siendo el primero el tipo de patología que comprende del 75% al 80% de los casos de CC¹.

El CC es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres, con un estimado promedio de 560 315 casos nuevos en 2018 (Figura 1) que representan el 7.1% de todos los cánceres. Aproximadamente el 90% de las muertes por cáncer de cuello uterino se produjeron en países de ingresos bajos y medios.

De acuerdo con datos de la International Agency for Research on Cancer 2019 de la World Health Organization, el CC es la cuarta enfermedad neoplásica más común en mujeres, solo antecedida por el cáncer de mama, colorrectal y de pulmón respectivamente en 2018. Asimismo, en el mismo año presentó una mortalidad estimada de 299 988 casos en el mundo. (Figura 2)

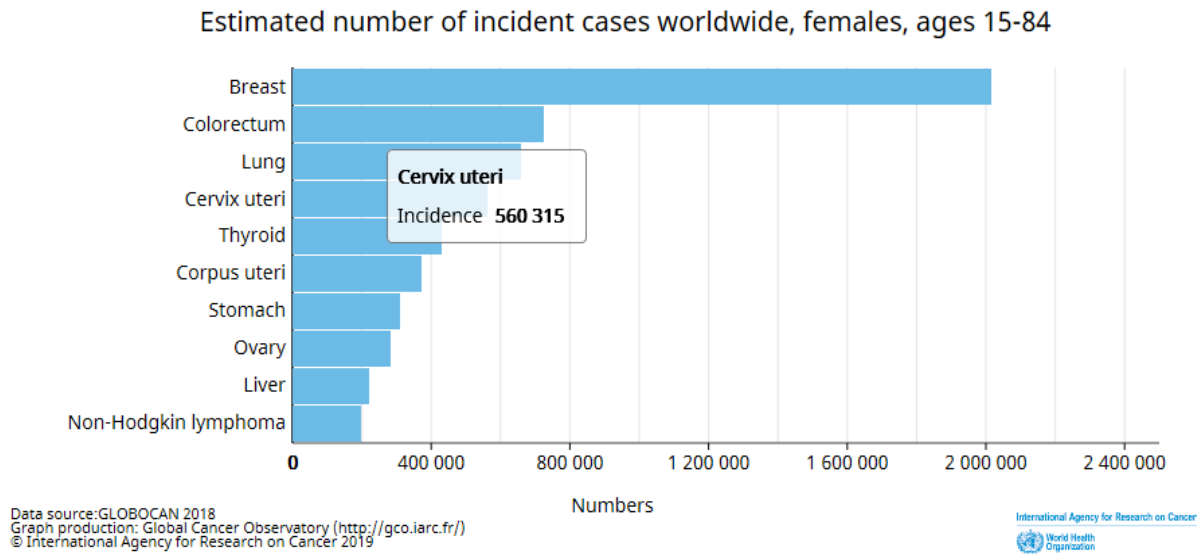


Figura 1. Cifra a nivel mundial de incidencia estandarizada de CC en mujeres entre edades de 15 y 84 años en 2018.²

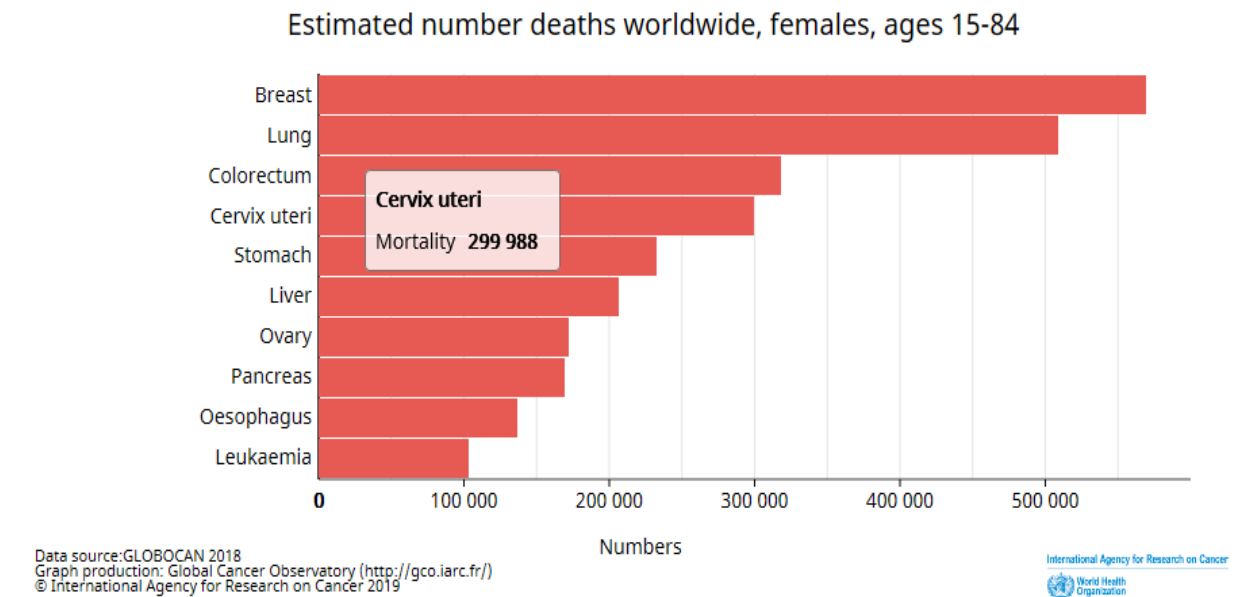


Figura 2. Cifra a nivel mundial de mortalidad estandarizada de CC en mujeres entre edades de 15 y 84 años en 2018.²

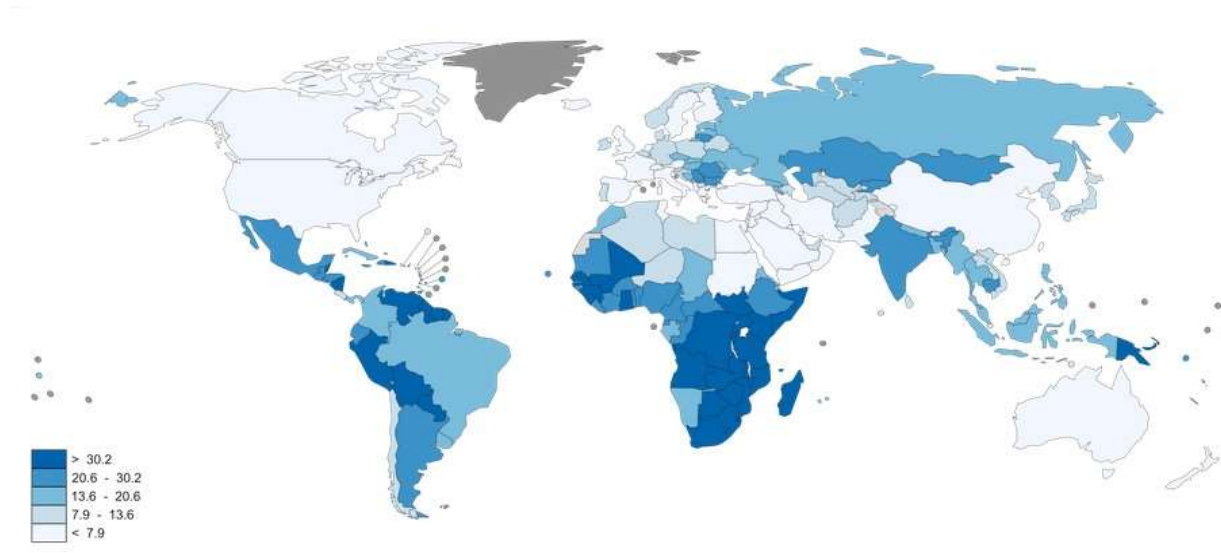


Figura 3. **Tasa de incidencia de CC por cada 100 000 habitantes a nivel mundial.** Las regiones con una mayor incidencia de CC se representan en tonos más oscuros de azul, en la figura destaca el continente africano, el sudeste asiático y Latinoamérica como las regiones geográficas con una mayor tasa de incidencia de CC.²

En este mismo período se reportó que las regiones con un menor índice de desarrollo y consecuentemente, una menor calidad de vida, concentraron cerca del 85% de todos los casos de CC, siendo el continente africano el sitio donde se reportó como el tipo de cáncer más común en mujeres, seguido del sudeste asiático donde se reportaron cerca del 56% de todos los casos de CC a nivel mundial, y finalmente América latina y el Caribe se identificó como la tercera región con mayor incidencia a nivel global² (Figura 3).

1.1.2 El cáncer cervical en México

En 2018 se registraron 13 960 casos CC en nuestro país, lo cual convirtió a esta enfermedad como el segundo tipo de cáncer más común entre mujeres mexicanas, únicamente superado por las neoplasias de tipo mamario (Figura 4).

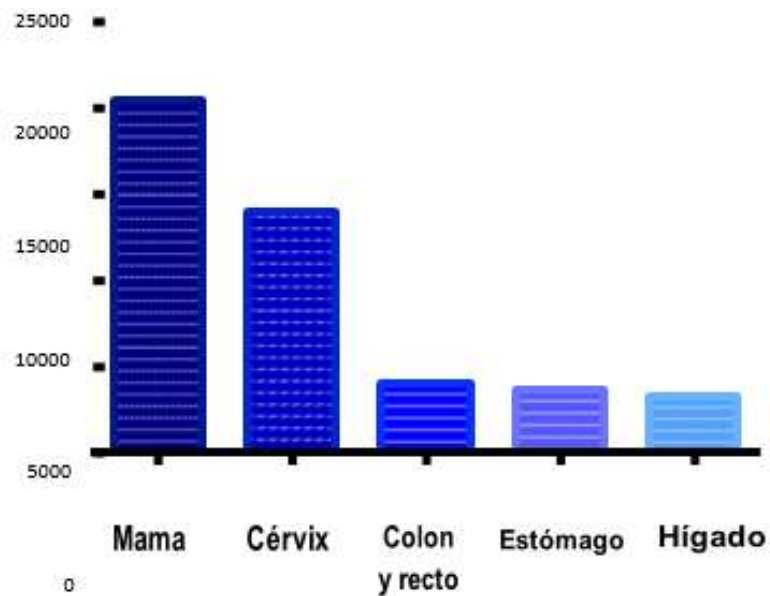


Figura 4. Incidencia estimada de CC para México en 2018. El CC es el segundo tipo de cáncer que más afecta a las mujeres mexicanas, solamente antecedido por el cáncer de mama.³

Durante el mismo período 4 764 defunciones fueron atribuidas al CC, presentado una mortalidad cercana al 30%, lo cual la convierte en la segunda enfermedad neoplásica con mayor índice de mortalidad en nuestro país (Figura 5).

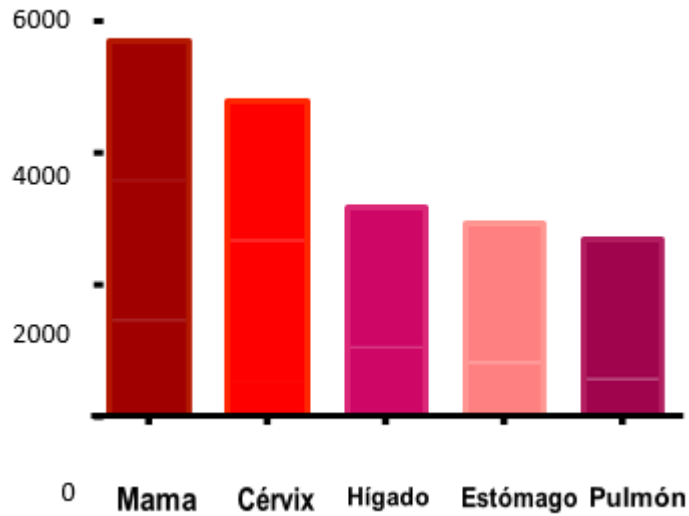


Figura 5. Mortalidad estimada de CC para México en 2018. Con 4 764 casos de este tipo de cáncer fue la segunda enfermedad neoplásica mayor mortalidad en nuestro país. ³

La distribución geográfica de CC en nuestro país corresponde a la tendencia internacional, ya que podemos encontrar las mayores tasas de mortalidad en regiones con una menor calidad de vida. Un estudio realizado por Lozano-Ponce et al, en 2009, puso de manifiesto que se atribuyen más muertes a este patología en estados del sureste del país, principalmente Oaxaca, Guerrero y Chiapas³ (Figura 6).



Figura 6. Distribución geográfica de la mortalidad por CC en México. La distribución nacional de la mortalidad por este tipo de neoplasia muestra que las zonas con mayor incidencia se ubican al sur del país, mientras que la región norte y la zona metropolitana de la Ciudad de México presentan las menores tasas de mortalidad.³ (Modificado de Lazcano-Ponce et al, 2008)

1.1.3 Clasificación del cáncer cervical

Este tipo de neoplasia se clasifica en función del tamaño y el grado de invasión del tumor, y se organiza de acuerdo con la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en etapas I, II, III y IV. La etapa I comprende todos los carcinomas limitados al cérvix, la siguiente corresponde a los carcinomas extendidos fuera de los límites del cérvix, pero que aún no han pasado la pared pélvica, la etapa III se asigna a los carcinomas que han invadido la pared pélvica y el tercio superior de la vagina, y finalmente la etapa IV aplica para los carcinomas que han invadido las mucosas del recto,

la vejiga y la vagina. En la tabla 1 se describen con detalle cada una de las etapas de esta patología.

Tabla 1. Clasificación FIGO para los distintos estadios del cáncer cervical (Modificado de Tewari y Monk, 2012) ⁴.

ETAPA 1	
IA	Carcinoma únicamente identificado con un examen microscópico. La invasión está limitada al estroma, con un máximo de 5 mm de profundidad y 7 mm de extensión horizontal.
IA1	La invasión en el estroma no supera 3 mm de profundidad y 7 mm de diámetro.
IA2	La invasión en el estroma está entre 3 y 5 mm de profundidad, pero no supera 7 mm de diámetro.
IB	Las lesiones se limitan al cérvix, de tamaño mayor que el estadio IA. Toda lesión macroscópicamente visible aún de manera superficial se considera un cáncer en estadio IB.
IB1	Lesiones visibles de tamaño máximo 4 cm
IB2	Lesiones visibles de tamaño mayor a 4 cm.
ETAPA 2	
IIA	Ninguna afección parametrial evidente, la invasión afecta dos tercios superiores de la vagina
IIB	Afección parametrial evidente, sin afectar la pared de la pelvis.
ETAPA 3	
IIIA	Ninguna extensión en la pared pelviana, pero afección del tercio inferior de la vagina.
IIIB	Extensión de la pared pelviana, hidronefrosis o disfunción renal.
ETAPA IV	
IVA	Extensión del tumor a los órganos cercanos a la pelvis
IVB	Extensión a los órganos distantes.

A partir de los trabajos realizados en la década de los 80 por el Dr. Harold Zur Hausen; se logró establecer la correlación existente entre el VPH y la carcinogénesis cervical. Estos trabajos fueron el antecedente para descubrir la capacidad oncogénica de estos virus.

Actualmente se reconoce que el 99.9% de los casos de CC contiene secuencias de VPH, y que estos casos están relacionados principalmente a 13 serotipos de VPH: VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Estos son considerados de alto riesgo debido a su alta capacidad carcinogénica. No obstante el 70% de los casos del CC se relacionan directamente con solo 2 de los 13 serotipos oncogénicos, VPH16 y 18 (Bosch et al., 2002; IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans).⁵

La infección con el Virus de Papiloma Humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual con mayor incidencia a nivel mundial⁶. A pesar de la evidencia actual, se considera que el VPH es un factor necesario, pero no suficiente para provocar el desarrollo de la carcinogénesis cervical, ya que no todos los casos de mujeres infectadas por VPH, incluso con aquellos tipos de alto riesgo, progresan a cáncer. En la mayoría de los casos, las mujeres menores de 30 años que cuentan con un sistema inmune funcional son capaces de resolver la infección por este virus, sin embargo, el riesgo de desarrollar neoplasia incrementa cuando la infección provocada por el VPH es persistente⁷.

Además del VPH, existen otros agentes de transmisión sexual que aumentan el riesgo a desarrollar CC, entre los que destacan las infecciones por ***Chlamydia trachomatis*** y ***Neisseria gonorrhoeae***, aunque su presencia o ausencia no es determinante para el desarrollo de esta patología. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana también representa un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, esto debido

a la inmunosupresión que representa dicha infección para la paciente, lo cual no le permite combatir la infección por el VPH.

El tabaquismo es un factor que está asociado prácticamente a todos los tipos de cáncer, debido a la gran cantidad de agentes mutagénicos presentes en el humo del cigarro. Factores hormonales como embarazos múltiples y el consumo de anticonceptivos hormonales incrementan el riesgo de desarrollar CC, esto debido a que el cérvix es un tejido altamente sensible a estímulos hormonales^{8,9}. Estudios realizados en modelos murinos apoyan indican que el receptor de estrógenos α está sobreexpresado en este tipo de cáncer, y que su inhibición disminuye la proliferación celular¹⁰.

1.2 Cáncer

El término cáncer se refiere a un grupo altamente heterogéneo de enfermedades en las cuales las células normales adquieren la capacidad de proliferación infinita y evasión los procesos normales de muerte celular, convirtiéndose a su vez en una célula tumoral o transformada. El cáncer puede originarse a partir de cualquier estirpe celular del organismo, no obstante las enfermedades neoplásicas que tienen su origen en células epiteliales son las que se presentan con mayor frecuencia, por ejemplo piel, colon, mama, próstata, cérvix o pulmón ¹¹. A pesar de los esfuerzos para combatir estas enfermedades, el cáncer continua siendo un problema de salud pública de relevancia mundial, ya que en 2018, se reportaron 14.1 millones de nuevos casos de enfermedades neoplásicas¹².

La acumulación de mutaciones que activan proto-oncogenes e inactivan genes supresores de tumores, promueve el desarrollo de la célula tumoral ¹³. A su vez, el daño a la integridad del DNA promueve un estado de inestabilidad genómica, lo cual coadyuva

en la transformación de las células normales hacia el fenotipo maligno.

La transformación celular es un proceso multietapa que resulta de la acumulación de mutaciones somáticas que culmina en la adquisición de 10 características distintivas de todas las células neoplásicas sin importar su origen clonal, conocidas como los hallmarks del cáncer. Estos eventos incluyen una proliferación constante, evasión de las señales de inhibición del crecimiento, inmortalidad replicativa, desregulación del metabolismo energético, inestabilidad genómica, inducción de angiogénesis, ambiente inflamatorio mediado por el tumor, evasión de la respuesta inmune y de la apoptosis, así como capacidad invasiva y metástasis¹⁴

1.3 Epigenética y cáncer

Actualmente es ampliamente aceptado que las mutaciones, ya sea de líneas germinales o somáticas son un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer, no obstante en años recientes se han descrito otros eventos que van más allá del cambio en la secuencia primaria de nucleótidos de un gen¹⁵. Estos eventos, denominados eventos epigenéticos se han demostrado asociados directamente con el desarrollo del cáncer, por ejemplo la hipermetilación de regiones promotoras en genes supresores de tumores, la desmetilación de regiones normalmente silenciadas del genoma, la modificación del código de histonas, y la regulación mediada por moléculas de RNA no codificante ^{16, 17}.

Con el descubrimiento de que las regiones genómicas que codifican para un producto proteico corresponden únicamente al 1.5% del contenido total del genoma, se despertó un interés de investigar la función del porcentaje restante, dentro del cual destacan los RNAs no codificantes¹⁸. Estas moléculas presentan diversos grupos tales como

microRNAs, piRNAs, snoRNAs y lncRNAs, los cuales son transcritos de manera tejida específica y se ha demostrado que juegan un papel crucial en los eventos regulatorios, asimismo se ha demostrado que su expresión se encuentra alterada en distintos padecimientos, entre ellos el cáncer.

1.4 MicroRNAs

Los microRNAs son las moléculas de RNA no codificante estudiadas con mayor profundidad, esto debido a su papel como reguladores de la expresión génica a nivel postranscripcional mediante complementariedad de bases con la región 3'- No traducida (UTR por sus siglas en inglés) de un mRNA blanco ^{19,20}.

Desde su descubrimiento a la actualidad, los microRNAs han sido asociados con una gran cantidad de procesos celulares, tales como control del desarrollo, diferenciación celular, muerte celular programada, control del metabolismo y la respuesta inmune²¹. Este hallazgo fue realizado mientras se llevaban a cabo investigaciones con respecto al desarrollo embrionario del gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Mientras se analizaba la función del gen lin-4 de *Caenorhabditis elegans* se encontró que este gen no codifica para ningún producto proteico, no obstante, su expresión es inversamente proporcional al del producto del gen lin-14, el cual codifica para una proteína necesaria para el desarrollo embrionario normal de este nematodo.

Posteriormente, mediante ensayos de clonación, se descubrió que el producto de lin-4 era un RNA pequeño con complementariedad de bases hacia la región 3'UTR del mRNA de LIN-14, lo cual condujo a los investigadores a postular la hipótesis de que este RNA

pequeño no codificante era capaz de regular la expresión a nivel post-transcripcional de LIN-14 ^{22,23}.

1.5 Biogénesis de los microRNAs

En su más reciente actualización, la base de datos miRbase 21 tenía registro de 24 521 microRNAs reportados, de los cuales 2 585 corresponden a la especie Homo sapiens (hsa-miRNAs) ^{24,25} esta base de datos continua siendo actualizada con los nuevos descubrimientos sobre microRNAs.

Los microRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II por dos mecanismos, el primero es en forma policistrónica ²⁶, en la que un solo transcrito largo contiene varios genes para microRNAs, mientras que el segundo es monocistrónico ^{27,28}). La mayoría de los genes que codifican para microRNAs se localizan dentro de las regiones intrónicas de otros genes codificantes, por lo que su transcripción está acoplada al sitio promotor de dicho gen. No obstante algunos genes que codifican microRNAs se encuentran aislados de cualquier otro gen, por lo que se sabe que poseen su propia secuencia promotora; la razón por la cual existe esta distinción aún es desconocida²¹

Los transcritos primarios de microRNAs policistrónicos adoptan una estructura característica de tallo-asa de algunos cientos de bases de longitud, en una doble cadena, la cual se conoce comúnmente como microRNA primario o pri-miRNA. La escisión del pri-miRNA está a cargo del complejo de microprocesamiento nuclear, que a su vez está conformado por una RNAsa-III nuclear denominada DROSHA y la proteína Di George syndrome critical region 8 (DGCR8), (también conocida como PASHA o Partner of Drosha) ^{19,29}. El complejo de microprocesamiento es capaz de reconocer el sitio de corte

en el pri-miRNA debido a que la proteína DGCR8 identifica la marca epigenética N6-metiladenosina en la secuencia de nucleótidos del microRNA primario ³⁰.

El complejo de microprocesamiento nuclear realiza cortes específicos que liberan un fragmento de ~60-70 nucleótidos, con una estructura similar a la del pri-miRNA, denominado microRNA precursor (pre-miRNA). Una vez que el procesamiento nuclear concluye, el pre-miRNA es transportado hacia el citoplasma mediante la carioferina Exportina-5, la cual se acopla al mecanismo de hidrólisis de RanGTP para obtener la energía necesaria para llevar a cabo esta translocación, una vez en el citoplasma RanGTP es hidrolizado a RanGDP y el pre-miRNA es liberado del complejo ^{27, 28, 29}).

Una vez en el citoplasma el pre-miRNA sufre una nueva escisión enzimática ahora por parte de otra RNAsa-III citoplásmica denominada DICER, esta enzima se acopla con la proteína HIV-1 TAR RNA BINDING PROTEIN (TRBP) y ambas forman un complejo capaz de reconocer los microRNAs de doble cadena para escindir el pre-miRNA, específicamente en la región de asa. Esta escisión genera dúplex pequeños de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud denominados miRNA dúplex (Figura 5) ³¹. Una vez generado este dúplex, una de las cadenas es liberada del complejo para ser degradada, dando lugar a un microRNA de cadena sencilla, es decir un microRNA maduro ^{32, 33}

Una vez que el complejo DICER-TRBP-microRNA es totalmente dissociado y el microRNA se encuentra libre, la proteína Argonata 2 (Ago2) es reclutada por la proteína TRBP para formar lo que se conoce como el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC por sus siglas en inglés), el cual es el actor funcional en el mecanismo de silenciamiento

inducido por microRNAs ³⁴

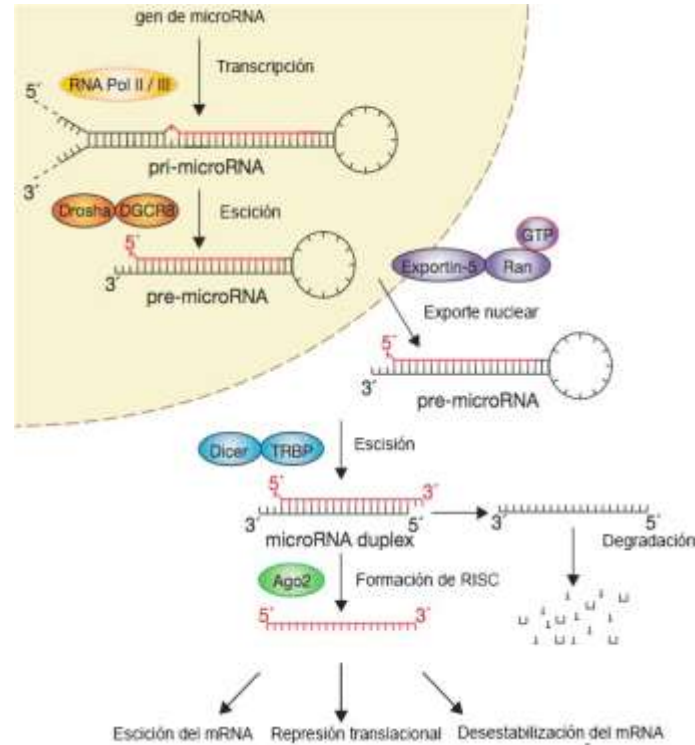


Figura 7 Biogénesis de los microRNAs. En esta figura se puede identificar por completo el mecanismo por el cual se genera un microRNA maduro a partir de su secuencia dentro del genoma celular.²⁹

1.6 MicroRNAs y cáncer

Se ha demostrado que la expresión de un perfil normal de microRNAs es necesario para el correcto mantenimiento de la homeostasis celular y que la pérdida de este equilibrio puede desencadenar eventos moleculares que derivan en diversos estadios patológicos, tales como la leucemia linfocítica crónica de células B ³⁵.

Desde su descubrimiento, diversos estudios se han enfocado en evaluar la expresión de los microRNAs en prácticamente todos los tipos de cáncer, a su vez estos trabajos han demostrado que los microRNAs se expresan de manera diferencial en tumores con respecto a tejido normal, no obstante su función principal recae en su capacidad de actuar

como oncomiRNAs o como miRNAs supresores de tumores ^{36; 37}). Este tipo de trabajos fueron el precedente del estudio de los microRNAs como reguladores maestros de la carcinogénesis.

En 2002, Calin y colaboradores estudiaban una deleción cromosómica frecuentemente encontrada en la leucemia linfocítica crónica de células B (B- CCL), la región 13q14 pero descubrieron que los productos proteicos codificados en esta región no se encontraban alterados en B-CCL, lo cual sugería que no eran relevantes para el desarrollo de la enfermedad^{36, 38, 39}. Estudios posteriores permitieron conocer que en la región deletada se encontraban dos genes que codificaban para microRNAs, miR-15 y miR-16, cuya expresión en este tipo de leucemia es inversamente proporcional a la del gen antiapoptótico Bcl2 ³⁶, en conjunto estos resultados demostraron por primera vez la asociación de un microRNA con un tipo de cáncer.

Los genes que codifican para microRNAs se encuentran con mucha frecuencia en sitios cromosómicos denominados sitios frágiles^{32,33}. Estos sitios han recibido tal denominación debido a la gran cantidad de alteraciones encontradas en ellos en prácticamente todos los tipos de cáncer, además estos loci presentan a menudo errores en la replicación ⁴⁰, mismos que pueden manifestarse como mutaciones, deleciones, duplicaciones, translocaciones o amplificaciones^{32,33,39}. Se estima que los microRNAs regulan aproximadamente el 30% de los genes que codifican para proteínas⁴¹, esta enorme capacidad regulatoria en conjunto con su localización dentro del genoma confiere a estas moléculas un papel trascendental en los mecanismos moleculares del desarrollo neoplásico.

1.7 Antecedentes

Diversos estudios han demostrado que los perfiles de expresión de microRNAs pueden utilizarse para clasificar tumores por su origen y su estadio clínico, además, dichos perfiles permiten un mayor grado de discriminación que los perfiles de expresión globales de mRNA, esto sugiere que los microRNAs tienen un papel importante en los mecanismos carcinogénicos⁴².

Las alteraciones genómicas encontradas en los genes que codifican para microRNAs son las mismas que se manifiestan en los genes supresores de tumores, tales como rearrreglos cromosomales, amplificaciones, deleciones y mutaciones^{38, 39}. Estos genes se localizan en regiones cromosomales que se encuentran comúnmente alterados y que presentan una alta tendencia a presentar fusiones cromosomales en distintos tipos de cáncer, dichos loci se conocen como sitios frágiles^{32, 33 y 42}.

Los perfiles de expresión normales de microRNAs son necesarios para el mantenimiento de la homeostasis celular, por lo que sus alteraciones se han relacionado directamente con el cáncer⁴⁴. La primera evidencia de la relación directa entre los microRNAs y un tipo de cáncer se identificó en leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), un tipo de neoplasia hematológica en la cual la región 13q14 se encuentra frecuentemente deletada, a continuación se identificó que dicha región contiene dos genes que no codifican para un producto proteico, miR15 y miR16⁴⁵). Posteriormente se demostró la existencia de una relación inversamente proporcional entre la expresión de miR15 y miR16 y el producto proteico del gen supresor de tumores B cell lymphoma 2 (Bcl2) en células de B-CLL⁴⁶. En conjunto, ambos resultados indicaron por primera vez el papel oncogénico de los microRNAs, al menos en B-CLL.

Actualmente se acepta que los microRNAs son reguladores maestros de mecanismos carcinogénicos tales como la proliferación celular, la inhibición de apoptosis, invasión y metástasis^{44,47,48,49}.

En el laboratorio de genómica del Instituto Nacional de Cancerología se analizó el perfil de expresión de 1 066 microRNAs en 35 muestras de tumores cervicales utilizando como control 10 muestras de tejido sin afección tumoral utilizando una plataforma de microarreglos (Figura 8).

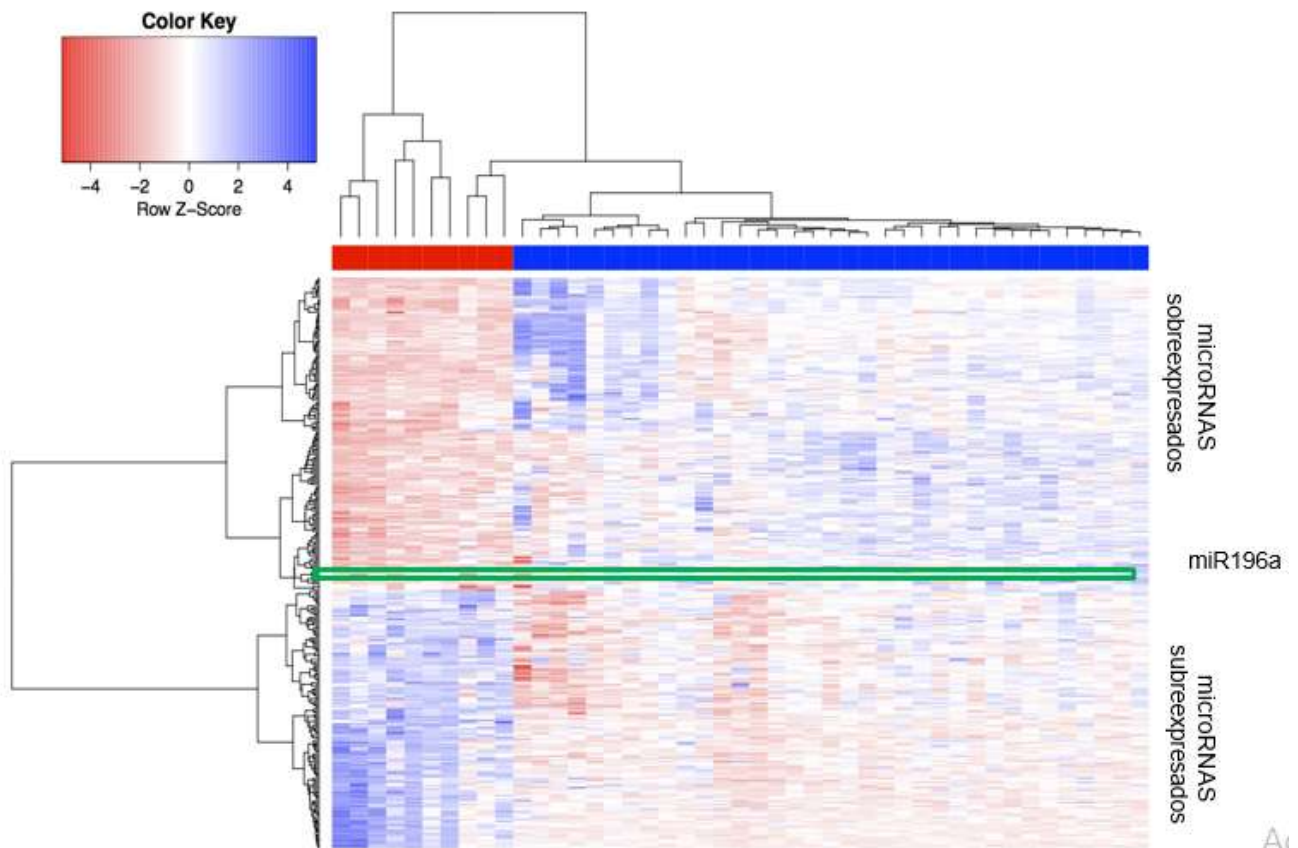


Figura 8. Heat Map supervisado del perfil de expresión de 1 066 microRNAs. Podemos observar diferencias en la expresión de diversos microRNAs cuando se compara entre ambos grupos, miR-196a pertenece al grupo de los microRNAs sobreexpresados en tumores cervicales.

Posteriormente el análisis estadístico con una prueba t de student para obtener la significancia entre las diferencias del nivel de expresión entre ambos grupos reveló 305 microRNAs con una diferencia significativa, dentro de los cuales destacó miR- 196a con una $p < 0.01$ (Figura 9).

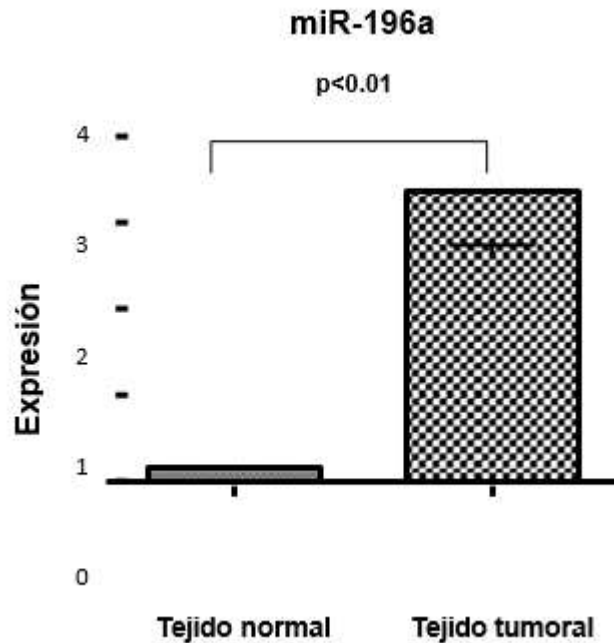


Figura 9. MiR-196a está sobreexpresado en los datos del microarreglo. El análisis estadístico puso de manifiesto que miR-196a se encuentra hasta 3 veces sobreexpresado en muestras de tejido tumoral con respecto a muestras sin afección tumoral.

El gen que codifica es un para miR-196a se localiza en la banda citogenética 17q21.3, particularmente en las regiones intrónicas de los clusters de los genes homeóticos (HOX) A, B, C y D, los cuales son blancos moleculares de este microRNA, además su transcripción es dependiente de los factores de transcripción que activan estos genes ⁵⁰

Otros trabajos han destacado la expresión aberrante de miR-196a en otros tipos de cáncer, por ejemplo, está demostrado que miR-196a promueve la migración celular a

través de la regulación negativa del factor nuclear inhibidor de Kappa-B a (NFKBIA), lo cual tiene un posible impacto en un peor pronóstico en pacientes con cáncer de páncreas⁵¹. Asimismo, los resultados de un estudio realizado por Shang⁵² y colaboradores indican que la sobreexpresión de miR-196a aumenta la tasa de proliferación e inhibe la muerte celular programada mediante la regulación negativa de la vía PTEN/Akt/FOXO1 en células Saos-2 derivadas de osteosarcoma⁵². Además, se ha identificado la sobreexpresión de este microRNA en muestras de tumores gástricos, y a su vez se ha encontrado que dicho fenómeno incrementa el índice de metástasis en pacientes, debido a una correlación negativa entre los niveles de miR-196a y los niveles proteicos de radixina, un bien identificado gen supresor de tumores⁵³).

2. Hipótesis

La desregulación de la expresión de los microRNAs es un evento que altera la homeostasis celular y promueve la adquisición de características celulares relacionadas al fenotipo tumoral, por lo tanto la sobreexpresión de miR-196a en CC puede influir directamente en el desarrollo de esta patología a través de sus blancos moleculares ANXA1, GATA6 y PDCD4.

3. Planteamiento del problema

Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante, mayormente conocidos como reguladores maestros de la expresión génica y su desregulación está implicada directamente con el desarrollo de diversos estados patológicos, entre los cuales se encuentra el cáncer cervical. Debido a la capacidad pleiotrópica de los microRNAs, los mecanismos moleculares a través de los cuales estos contribuyen al desarrollo y la progresión de dicha enfermedad neoplásica no han sido descritos en su totalidad es por eso que la función de estos RNAs no codificantes, tales como miR-196a es importante para la elucidación de los mecanismos de la oncogénesis cervical.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Evaluar el papel funcional de miR-196a en cáncer cervical

4.2 Objetivos específicos

- Validar la expresión de miR-196a en muestras de tumores cervicales
- Validar la expresión de miR-196a en un panel de líneas celulares derivadas de CC
- Identificar blancos moleculares de miR-196a utilizando herramientas bioinformáticas
- Evaluar la expresión génica de los blancos moleculares ANXA1, GATA6 y PDCD4
- Evaluar la expresión proteica de GATA6 en la línea celular HeLa

5. Métodos

5.1 Validación de la expresión de miR-196a en tumores cervicales

5.1.1 Obtención de las muestras

Las muestras de tejido cervical fueron obtenidas de mujeres con cáncer cervical localmente avanzado (Clasificación FIGO IB2 y IVA) por el Departamento de Cirugía Ginecológica del Instituto Nacional de Cancerología bajo previo consentimiento informado (Ver anexo), y fueron divididas en dos grupos; con y sin diagnóstico de CC localmente avanzado. Posteriormente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido hasta su procesamiento siguiendo el diagrama de trabajo propuesto para este estudio (Figura 10)

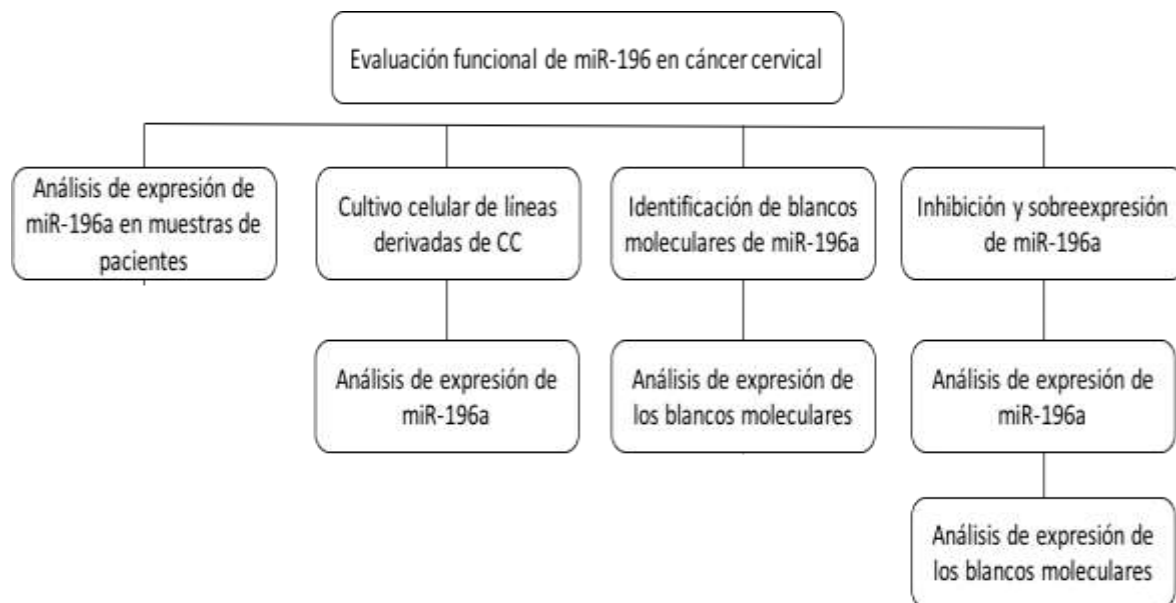


Figura 10. Diagrama de trabajo de este estudio.

5.1.2 Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico patológico confirmado de CC localmente avanzado, determinado por el servicio de patología del INCAN.
- Biopsias que reportaron un porcentaje mayor al 80% de células tumorales.
- Mujeres entre 30 y 60 años en el momento de la toma de muestra.
- Expediente clínico completo
- Función hematológica, renal y hepática normales.
- Radiografía de tórax posteroanterior normal.
- Firma del consentimiento informado (Anexo 1)

5.1.3 Criterios de exclusión

- Presencia de comorbilidades.
- Pacientes que recibieron quimio y/o radioterapia previa a la toma de muestra.

5.1.4 Extracción de RNA

Las muestras de tejido cervical fueron homogeneizadas utilizando perlas de porcelana: MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics Cat. #03358941001) en conjunto con el equipo Magna Lyser Instrument (Roche Diagnostics Cat. #14082) durante 30 segundos a 5,000 rpm. Posteriormente al homogeneizado se le añadieron 500 µL del reactivo TRIzol en un tubo Eppendorf de 1.5 mL (Ambion Cat. # 15596018) de acuerdo con la siguiente metodología.

- Se añadieron 200 µL de cloroformo (Sigma Cat. #-2423)
- Se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf de 1.5 mL
- Se agregaron 500 µL de isopropanol al nuevo tubo que contenía la fase acuosa y se incubó por 10 min a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se centrifugó a 12 000 g durante 10 min a 4 °C.
- Se removió el sobrenadante del tubo y el pellet formado fue lavado con 1 mL de etanol al 75% dos veces.
- El tubo fue centrifugado a 7500 g durante 5 min para descartar el sobrenadante.
- El tubo fue inclinado sobre una superficie absorbente durante aproximadamente 10 min, con la finalidad de remover el exceso de etanol.
- El pellet fue resuspendido en 50 µL de H₂O libre de RNAsas.
- Finalmente, el RNA fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro Epoch Biotek (Biotek take 3 Cat. # 14017) a 260 y 280 nm.

5.1.5 Síntesis de cDNA

A partir de 500 ng de RNA se sintetizó DNA complementario (cDNA) siguiendo las instrucciones del kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems Cat. 4368814) utilizando el termociclador Artik® de ThermoFisher Scientific (ThermoFisher Scientific Cat. # TCA0001) y con el programa de amplificación detallado

en la tabla 2.

Tabla 2. Programa de amplificación para la síntesis del cDNA

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura °C	25	37	65	4
Tiempo (min)	10	120	5	∞

5.1.6 qPCR para medir la expresión de miR-196a

Se utilizaron sondas TaqMan® específicas para miR-196a y se preparó la reacción de acuerdo con el protocolo del fabricante, posteriormente se utilizó el equipo StepOne® (Applied Biosystems Cat. # 271003317) para placas de 48 pozos, siguiendo el programa de termociclado descrito en la tabla 3. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el método de $\Delta\Delta CT$ y se utilizó el RNA pequeño no codificante U6 para normalizar los datos.

Tabla 3. Programa de amplificación para sondas TaqMan.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3
Temperatura °C	95	95	60
Tiempo	10 min	15 s	1 min
		40 ciclos	

5.2 Validación de la expresión de miR-196a en líneas celulares de cáncer cervical

5.2.1 Cultivo celular

Las líneas celulares C33, CaSki, HaCaT, HeLa, ME-180 y SiHa con números de registro ATCC®: HTB-31, CRL-1550, CCL-2, HTB-33 y HTB-35 respectivamente, fueron cultivadas en cajas T-25 utilizando medio DMEM-F12 (Gibco Cat. # 12400-024) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) (Corning Cat. #35-010- CV) y 1% de antibiótico-antimicótico (Invitro Cat. # A-07). En todo momento las células fueron mantenidas en un ambiente controlado de 37 °C y 5% de CO₂.

5.2.2 Extracción de RNA

Cuando las células alcanzaron una confluencia cercana al 80% se llevó a cabo el procesamiento de las mismas para la extracción del RNA total. Los cultivos fueron lavados con 3 mL de PBS 1X estéril y posteriormente se añadieron 500 µL del reactivo TRIzol. La monocapa fue desprendida de la caja de cultivo utilizando un gendarme estéril y el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril, en el cual se continuo la extracción de acuerdo con lo descrito en la sección 5.1.4.

5.2.3 Síntesis de cDNA

Se sintetizó cDNA utilizando la misma metodología descrita en la sección 5.1.5.

5.2.4 qPCR para medir la expresión de miR-196a

Se utilizaron sondas TaqMan® específicas para miR-196a y se procedió de acuerdo con el protocolo descrito previamente en la sección 2.1.6.

5.3 Identificación de blancos moleculares de miR-196a

5.3.1 Búsqueda de blancos moleculares en las bases de datos: miRbase, TargetScan y DianaTools

Se buscó en la base de datos miRbase 24 la secuencia de miR-196a, con número de acceso: MI0000238, posteriormente se procedió a realizar la búsqueda de blancos moleculares de este microRNA en las bases de datos: miRtarbase y Dianatools 54; 55).

Se seleccionaron genes diana cuya interacción con miR-196a se encontró validada en ambas bases de datos por técnicas de inmunofluorescencia y PCR tiempo real. Además, se evaluó la función de los genes validados, priorizando aquellos que participan en mecanismos que se encuentran normalmente desregulados en el cáncer, tales como apoptosis, migración e invasión celular.

Se eligieron como blancos moleculares los genes ANXA1, GATA6 Y PDCD4, los cuales se encuentran involucrados en los procesos de división celular, apoptosis, transición epitelio-mesénquima y en la capacidad invasiva y migratoria de las células.

5.3.2 Diseño de primers de ANXA1, GATA6 y PDCD4

Se obtuvieron las secuencias de mRNA para todas las isoformas existentes de los genes ANXA1, GATA6 y PDCD4 a partir de los datos reportados actualmente en la base de datos Gen Bank, posteriormente se realizó un alineamiento múltiple con el software bioinformático SeaView versión 4 para obtener para obtener una secuencia consenso 56)

Los primers fueron diseñados utilizando la herramienta Primer-BLAST del National Center for Biotechnology Information 57. Se utilizaron secuencias de unión entre exones como templado para el diseño de estas moléculas, con la finalidad de aumentar la especificidad para secuencias de RNA. Para verificar que el diseño de los primers fuera correcto y específico, se realizó una PCR in silico en la plataforma virtual UCSC Genome Browser 58

Tabla 4. Características de los primers para amplificar los blancos moleculares de miR-196a

GEN	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	TM (°C)	TAMAÑO ESPERADO DEL AMPLICON
ANXA1	5'-ATCAGAAGCCCAAGTCTCCAC-3'	5-TTGGATGACTTCACAGTTTGAACAT-3'	56 °C	185 pb
GATA6	5'-AGAAGCGCGTGCCTTCATC-3'	5-ATAGCAAGTGGTCTGGGCAC-3'	58 °C	157 pb
PDCD4	5'-TCTGGGAAAGGAAGGGGACT-3'	5-GCCCTTTCATCCAAAGGCAAAA-3'	57 °C	173 pb

5.3.3 qPCR para medir la expresión de ANXA1, GATA6 Y PDCD4

Para medir la expresión de estos genes se utilizó el reactivo Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Cat. # K03091, Thermo Scientific®), el cual utiliza SYBR Green, un agente fluorescente intercalante específico para DNA de doble cadena, por lo que emite una señal cada que se forma una doble cadena de DNA.

Cada reacción de PCR se realizó con primers específicos para cada uno de los genes de interés. La cuantificación de mRNA se llevó a cabo utilizando los datos de expresión del

gen endógeno Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se utilizó la línea celular HaCaT como un control de expresión no tumoral. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos fueron analizados siguiendo el método de $\Delta\Delta C_t$. La reacción de amplificación se realizó en el termociclador StepOne de Applied Biosystems con lector de placas de 48 pozos, con el programa de termociclado descrito en la tabla 5.

Tabla 5. Programa de termociclado para los blancos moleculares de miR-196a

	<i>Paso 1</i>	<i>Paso 2</i>	<i>Paso 3</i>	<i>Paso 4</i>
<i>Temperatura °C</i>	25	37	65	4
<i>Tiempo (min)</i>	10	120	5	∞

5.4 Ensayo funcional

5.4.1 Extracción de proteínas totales de líneas celulares

Las líneas celulares previamente mencionadas en la sección, fueron procesadas cuando alcanzaron 80% de confluencia en una caja de cultivo T-25, primeramente, se lavaron 3 veces con PBS 1X estéril, después se añadieron 100 μ L del buffer de lisis Radio Immunoprecipitation Assay Buffer (RIPA) suplementado con inhibidores de fosfatasas 1:100, las células fueron lisadas con un gendarme estéril y el raspado fue transferido a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, para ser homogeneizado en un vortex 30 seg cada 5 min durante 30 min, posteriormente la mezcla fue pasada a través de la aguja de una jeringa de insulina 15 veces, se dejó reposar en hielo durante 3 min y se repitió el paso anterior, finalmente se centrifugaron 20 min a 12 000 g a 4 °C para precipitar lo insoluble e hidrofóbico, y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo, posteriormente las proteínas fueron cuantificadas con el kit DCTM de BioRad.

5.4.2 Identificación de proteínas por Western-blot

Con el objetivo de detectar la expresión de la proteína GATA6 se utilizó la técnica de inmunodetección en membrana. Las proteínas (25g) fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis) utilizando el equipo Mini-Protean Tetra System (BioRad) a 100 V durante 2 h. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) con un tamaño de poro de 0.45 μ m mediante transferencia semi-seca en un equipo Trans-blot turbo (BioRad) a 20V durante 30 min. Al terminar la transferencia,

la membrana de PVDF fue bloqueada con una solución de leche libre de grasas al 5% en TBS-Tween 0.1% y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína GATA6 (Genetex Cat. #GTX37422) a una concentración de 1:2000. Una vez transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo primario, la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario Anti-mouse IgG-HRP a una concentración de 1:2000 (Cat #7074s) durante 2 h a 4 °C. Para revelar los inmunocomplejos, se lavó la membrana quimioluminiscente SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific Cat. # 34095) para la detección del inmunocomplejo. La membrana fue analizada en un digitalizador C- Digit Blot Scanner (LI-COR Biosciences) y las imágenes resultantes fueron analizadas con el software ImageStudio (LI-COR Biosciences).

5.4.3 Silenciamiento y sobreexpresión de miR-196a

Se realizó una transfección en reversa utilizando el kit comercial Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen Cat. # 13778-075). Con la finalidad de alcanzar una confluencia entre el 60% y 80% al momento de realizar la inhibición de miR-196a, se sembraron 200 000 células HeLa por pozo, en una placa de 6 pozos. En breve, se preparó el mix de la reacción de inhibición conteniendo 50 µL de medio reducido en suero OptiMEM I (Applied biosystems Cat. # 31985062) y 3 µL de Lipofectamine RNAiMax, posteriormente se diluyeron 3 µL de mirVana® miRNA inhibitor específico para miR196a (Applied biosystems Cat. # 4464084) o de Mimic para miR-196a, a una concentración de 10 µM en 50 µL de medio reducido en suero OptiMEM I. A continuación, se mezcló en un tubo Eppendorf de 1.5 µL 100 µL de una mezcla 1:1 de la dilución del reactivo Lipofectamine®

RNAiMAX y la dilución del inhibidor específico de hsa-miR-196a, finalmente se añadieron 50 μ L de la mezcla 1:1 por duplicado a cada pozo. Las células transfectadas fueron mantenidas bajo las condiciones mencionadas durante 48h hasta la extracción de RNA y proteínas, de acuerdo con las metodologías descritas en la sección 5.1.4. y 5.4.1. respectivamente para llevar a cabo el análisis de expresión génico y proteico.

5.5 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos en 2 eventos independientes, el análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el programa GraphPad Prisma versión 6.0. Se realizó una prueba t-student para realizar la comparación entre las diferencias de los grupos de estudio. Los resultados se consideraron significativos cuando se obtuvo un estadístico p ($p < 0.05$).

6. RESULTADOS

6.1 Validación de la expresión de miR-196a en muestras de tumores cervicales

Se colectaron en total 30 muestras, 15 muestras de tejido tumoral y 15 muestras sin afección tumoral, de acuerdo con los criterios establecidos en la sección 2. Se midió la expresión génica de miR-196a técnica de PCR cuantitativa previamente descrita en la sección 2.1.6. Se encontró una sobreexpresión de miR-196a estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las muestras obtenidas a partir de tumores cervicales, con respecto a las que fueron obtenidas de pacientes libres de CC al momento de la toma de muestra. (Figura 11). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

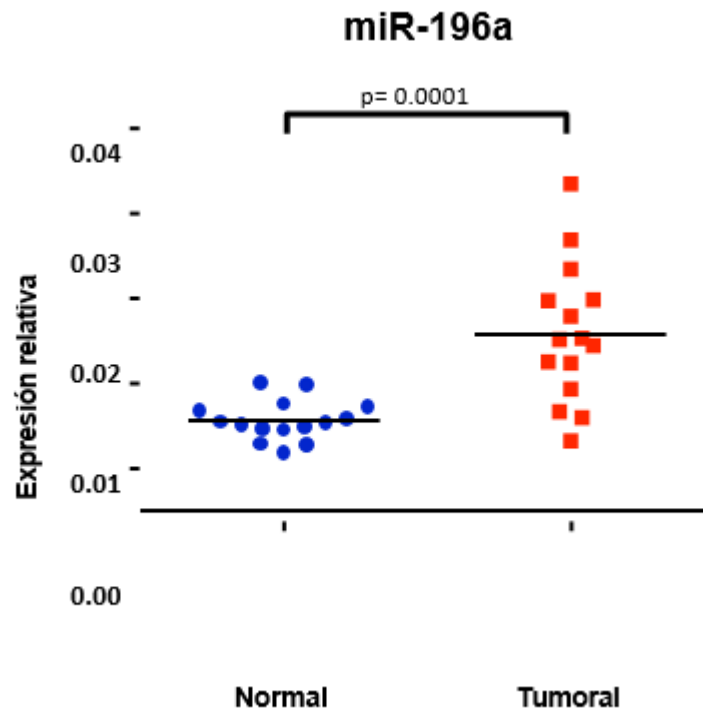


Figura 11. Validación de la expresión génica de miR-196a en muestras clínicas. Cada punto de la figura indica el nivel de expresión de cada una de las 15 muestras incluidas

en el estudio, se puede claramente una expresión elevada de miR-196a en el grupo de pacientes con diagnóstico de CC con respecto al control sin diagnóstico de la enfermedad. ($p < 0.05$)

6.2 Evaluación de la expresión de miR-196a en líneas celulares de CC

La expresión de miR-196a en líneas celulares de CC fue medida utilizando la metodología de qPCR previamente descrita en la sección 6.2.3. Se realizó el análisis de expresión en un panel completo de líneas celulares con la finalidad de mimetizar la heterogeneidad que existe entre los diversos casos de CC. Estos resultados indican una clara sobreexpresión de este microRNA en las líneas tumorales con respecto a la línea control no tumoral HaCaT (Figura 12). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Los resultados se consideraron significativos cuando en la comparación de grupos por la prueba estadística t-student se obtuvo una $p < 0.05$, a excepción de la línea celular SiHa, la cual no demostró un incremento en la expresión de miR-196a.

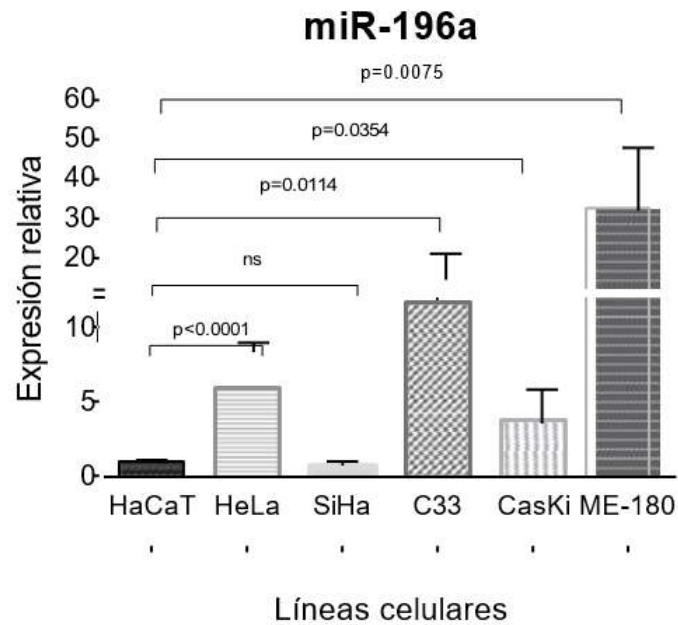


Figura 12. Análisis de expresión de miR-196a en líneas celulares de CC. Se realizó el análisis de expresión en 4 de 5 líneas celulares derivadas de tumores cervicales con respecto a HaCaT, el control no tumoral, y se encontró una sobreexpresión de miR-196a en el 80% de las líneas celulares evaluadas.

6.3 Evaluación de la expresión de los blancos moleculares de miR-196a en un modelo in vitro de cáncer cervical

Se midió la expresión de los blancos moleculares de miR-196a en 5 líneas celulares tumorales y 1 línea celular no tumoral, utilizando el agente intercalante SYBR green, de acuerdo con la metodología descrita en la sección 6.3.4.

6.3.1 Resultados del análisis de expresión de ANXA1

Se encontró que la expresión del mRNA que codifica para la proteína Anexina1 se

encuentra significativamente disminuida en las 5 líneas celulares incluidas en este estudio, con respecto a la línea celular control de queratinocitos inmortalizados HaCaT ($p > 0.05$) (Figura 13).

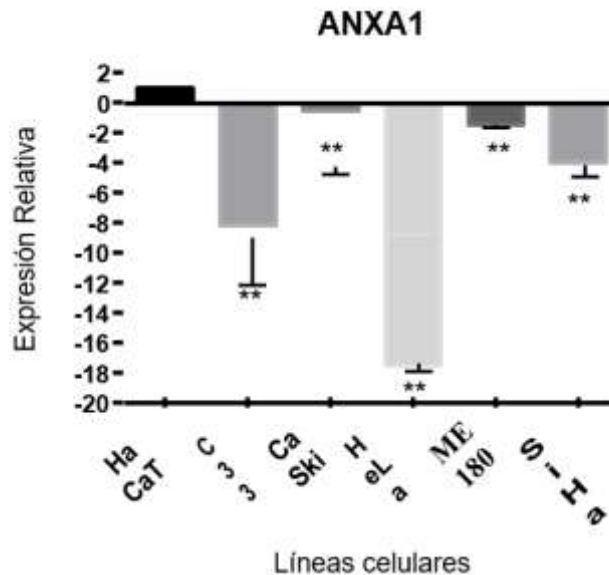


Figura 13. La expresión de ANXA1 está disminuida en 4 de 5 líneas celulares derivadas de tumores cervicales. Se encontró que existe una disminución de la expresión de ANXA1 en todas las líneas celulares consideradas en este estudio, a excepción de la línea celular CaSki (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$).

6.3.2 Resultados del análisis de expresión de GATA6

La expresión del gen GATA6 se encontró significativamente disminuida de manera en

todas las líneas celulares que participan en este estudio, con respecto a la línea celular control ($p < 0.05$) (Figura 14).

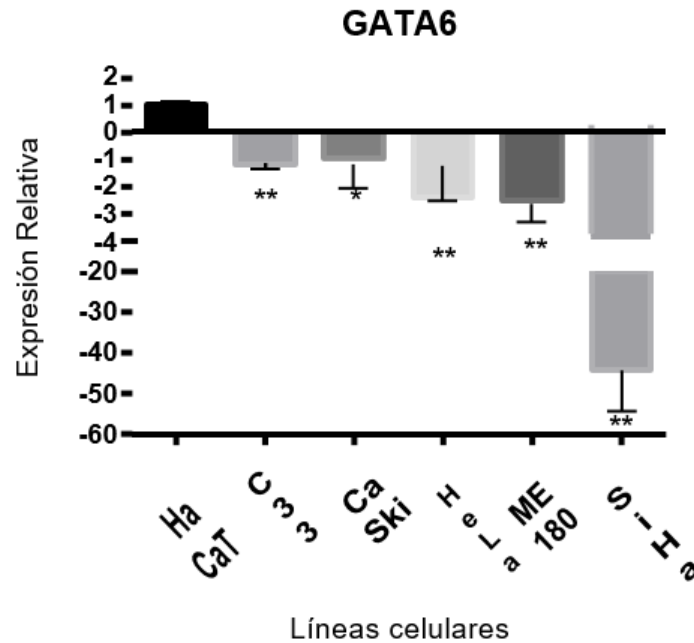


Figura 14. La expresión de GATA6 se encuentra disminuida en líneas celulares derivadas de CC. En todas las líneas celulares incluidas en este estudio se encontró una subexpresión de GATA6 con respecto a HaCaT (**= $p < 0.01$)

6.3.3 Resultados del análisis de expresión de PDCD4

La expresión génica de PDCD4 se encontró significativamente disminuida de manera en todas las líneas celulares que participan en este estudio, con respecto a la línea celular control ($p < 0.05$) (Figura 15).

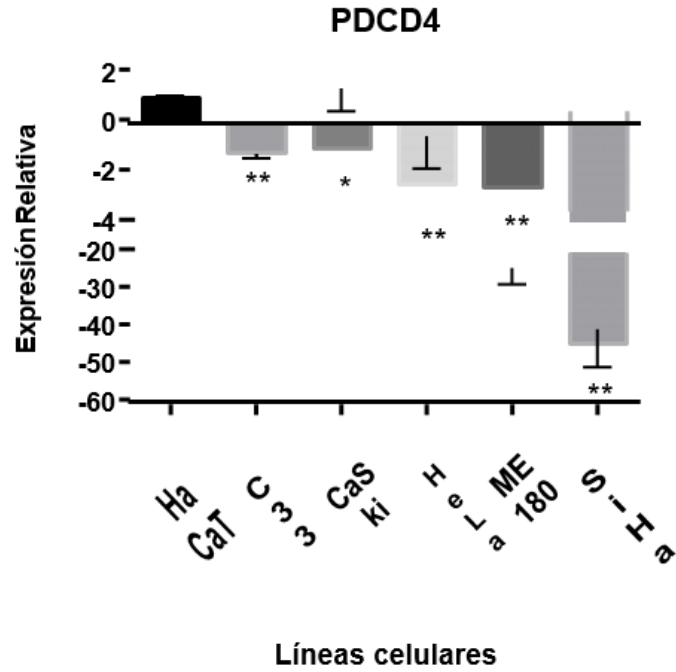


Figura 15. La expresión de PDCD4 se encuentra disminuida en líneas celulares derivadas de tumores cervicales. Todas las líneas celulares involucradas en este estudio presentaron una menor expresión del gen con respecto al control de expresión no tumoral.

6.4 Ensayos funcionales

6.4.1 Nivel de expresión de miR-196a en células HeLa transfectantes

Se realizó una transfección reversa en células HeLa utilizando condiciones de sobreexpresión y silenciamiento, 48 h después de la transfección se realizó la extracción de RNA para medir sus niveles mediante qPCR, como se describió previamente en la sección 2.1.6. En los resultados se observa que el grupo transfectado con el Mimic presentó una sobreexpresión significativa ($p < 0.0001$), mientras que el grupo tratado con el antimiR de miR-196a presentó una disminución significativa en el nivel de expresión ($p < 0.05$) (Figura 16).

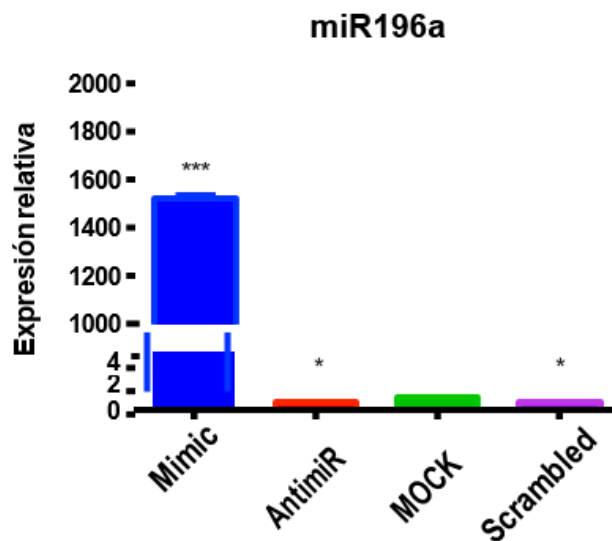


Figura 16. Niveles de expresión de miR-196a en células HeLa transfectantes. Se observa un incremento significativo en el nivel de expresión de miR-196a en células transfectadas con el Mimic de miR-196a, con respecto a los demás grupos.

6.5 Nivel de expresión de blancos moleculares de miR-196a en células HeLa transfectantes

6.5.1 Resultados del análisis de expresión de ANXA1

El nivel de expresión de ANXA1 se encuentra disminuido con respecto al grupo control MOCK en las células HeLa que fueron transfectadas con el Mimic de miR- 196a ($p < 0.05$), mientras que el grupo que fue transfectado con el antimiR de miR- 196a solamente presentó una tendencia hacia incrementar su expresión (Figura 17).

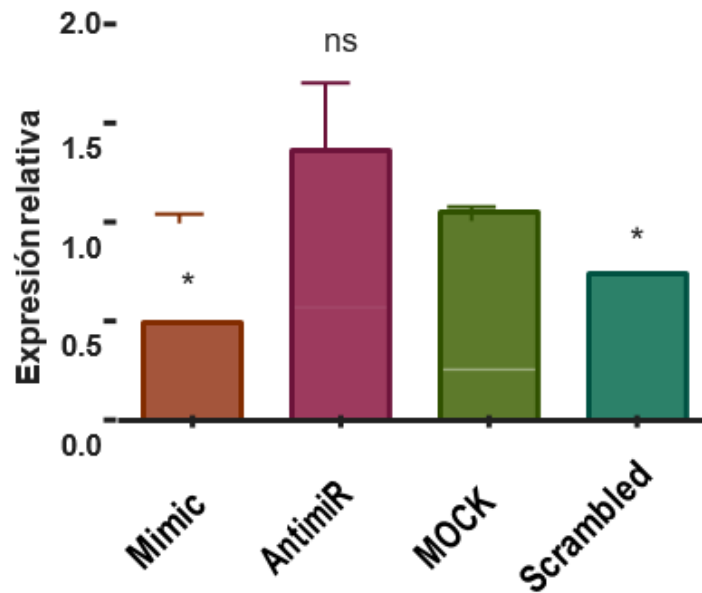


Figura 17. La expresión de ANXA disminuye en células HeLa transfectantes. La expresión de este gen disminuyó considerablemente en las células transfectadas con el Mimic, mientras que solo presentó una tendencia al incremento en el grupo transfectado con el antimiR de miR-196a.

6.5.2. Resultados del análisis de expresión de GATA6

Después de 48 h transcurridas el nivel de expresión de GATA6 disminuye significativamente ($p < 0.05$) en el grupo de células HeLa transfectadas con el Mimic de miR196a y presenta el comportamiento contrario, es decir la expresión aumenta significativamente ($p < 0.05$) en el grupo transfectado con el antimiR de miR-196a, esto cuando se compara ambos grupos con el grupo que incluye el vehículo vacío MOCK (Figura 18).

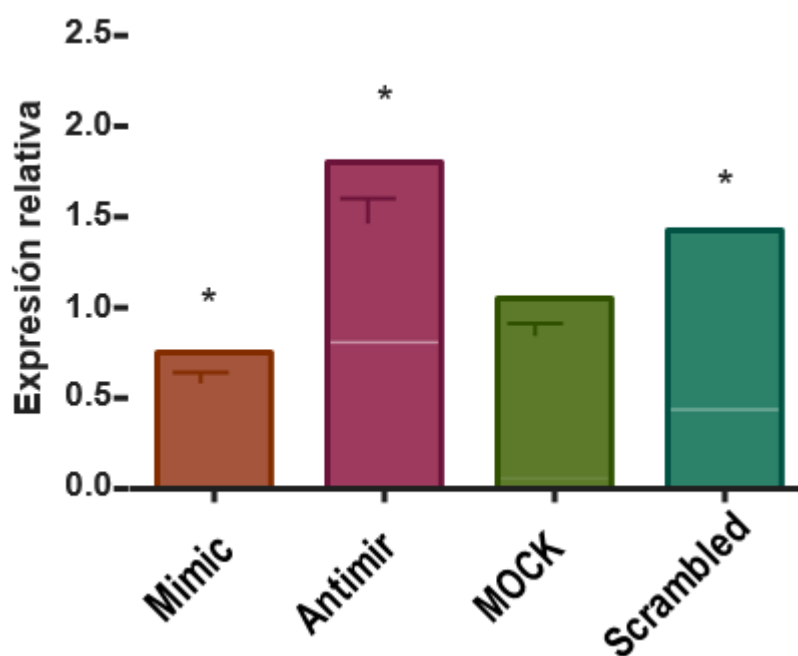


Figura 18. La expresión de GATA6 cambia de manera significativa en células HeLa transfectantes. Ambos grupos de estudio presentan la tendencia esperada después de 48 horas con el medio de transfección, comparadas con el grupo MOCK.

6.5.3 Resultados del análisis de expresión de PDCD4

El análisis de expresión de PDCD4, después de 48 h de haber realizado la transfección reversa, reveló que la expresión de este gen disminuye de manera significativa ($p < 0.01$) en el grupo transfectado con el Mimic de miR-196a, sin embargo, el grupo transfectado con antimiR solo presentó una tendencia al incremento (Figura 19).

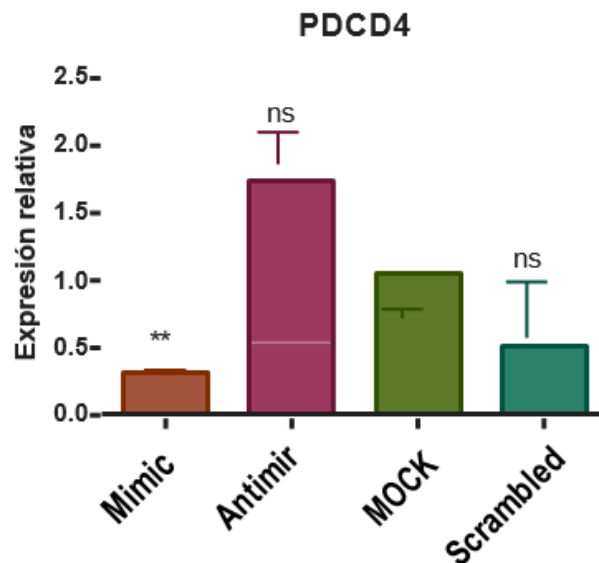


Figura 19. La expresión de PDCD4 disminuye en células HeLa transfectantes. La expresión de miR-196a disminuye de manera significativa en el grupo transfectado con el Mimic de miR-196a.

6.6 Expresión proteica de GATA6

Después de transcurrido el tiempo determinado, se extrajeron las proteínas de acuerdo con el protocolo mencionado en la sección 2.4.1. y se realizó la inmuno detección en

membrana. Se identificó que el nivel proteico de GATA6 bajo el estímulo del mimic de miR-196a disminuye, mientras que aumenta cuando las células HeLa son retadas al antimir de miR-196a (Figura 20 y 21).

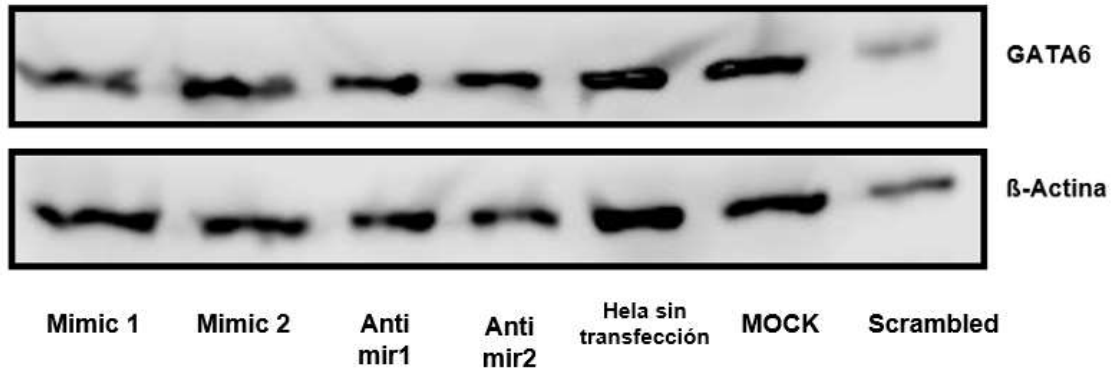


Figura 20. Expresión proteica de GATA6 en células HeLa transfectantes. La expresión de GATA6 es mayor en los grupos transfectados con el antimir de miR-196a

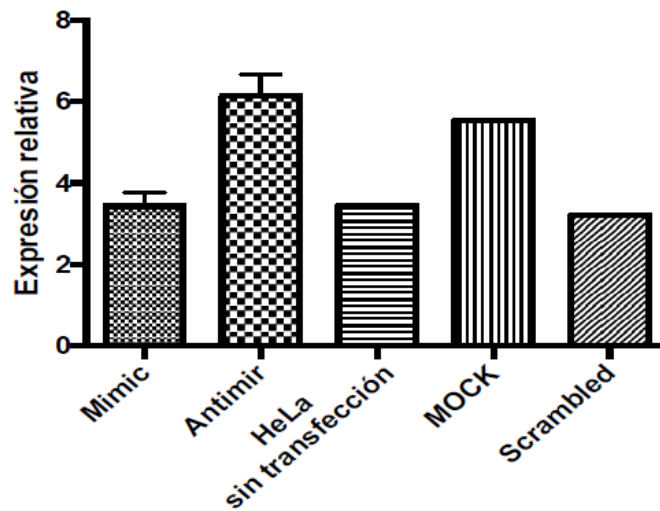


Figura 21. Análisis densitométrico de GATA6 en células HeLa transfectantes. La expresión de GATA6 se incrementa 48 h después de la transfección reversa del antimir de miR-196a.

7. DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han demostrado que la alteración de la expresión de microRNAs está asociada al cáncer. No obstante, debido a la gran complejidad que existe en las redes de regulación celular y su carácter pleiotrópico, el papel que estos desempeñan en los mecanismos moleculares de la carcinogénesis es poco entendido.

En este trabajo se evaluó el nivel de expresión de miR-196a en muestras de tumores cervicales y muestras no tumorales. Los resultados de este análisis muestran una sobreexpresión de miR-196a en los tumores de cérvix con respecto a aquellas muestras sin afección tumoral. En un estudio realizado en el año 2018, por Gocze y colaboradores se cuantificó la expresión de diversos microRNAs, entre los que destacan miR-196a. Este trabajo se realizó en una cohorte de 98 muestras de tejidos embebidos en parafina provenientes de pacientes con diagnóstico de CC, las cuales fueron previamente clasificadas de acuerdo con la FIGO. Los resultados de nuestro estudio son congruentes con lo descrito por Gocze y colaboradores, y sugieren que la alteración de la expresión de miR-196a en CC tiene un papel importante en la carcinogénesis cervical.

Con el fin de caracterizar el papel de miR-196a en el desarrollo y la progresión del CC se evaluó la expresión de este microRNA en un panel de líneas celulares derivadas de tumores cervicales. Se encontró que este microRNA está sobreexpresado en 4 de las 5 líneas celulares evaluadas en comparación con la línea celular no tumoral HaCaT ($p > 0.05$). De manera interesante, se observó que las células SiHa, las cuales tienen integrado en su genoma secuencias de VPH16, no siguen esta tendencia. Este resultado coincide con lo reportado por Liu y colaboradores quienes demostraron que la proteína E5 del VPH16 inhibe la expresión de miR-196a⁵⁹

Como se ha mencionado previamente en este trabajo, los microRNAs son capaces de regular una gran cantidad de blancos, por lo que sus efectos sobre la regulación génica son complejos y no están comprendidos por completo. En este estudio se realizó una identificación de blancos utilizando las bases de datos: miRtarbase y Dianatools, las cuales siguen un algoritmo que compara la secuencia de un microRNA y la compara con la secuencia de la región semilla contenida en la región 3'UTR de un mRNA ^{24,25,53,54, 55}. Este análisis permitió la identificación de los genes ANXA1, GATA6 y PDCD4 como blancos de miR-196a, además existen reportes en la literatura que ponen de manifiesto la expresión disminuida de estos genes en diversos tipos de cáncer, por lo que se decidió caracterizar la participación de estos genes en el desarrollo y la progresión de las neoplasias cervicales ^{60,61,63}.

El gen ANXA1 (Annexin A1) codifica para una proteína miembro de la familia de proteínas de unión fosfolípidos dependiente de calcio, la cual originalmente se identificó como uno de los principales mediadores de la muerte celular programada o apoptosis ⁶⁴. Además, existe evidencia que sustenta su participación en diversos procesos celulares como, migración y proliferación celular, así como en procesos de diferenciación celular y transducción de señales ²⁸. La pérdida o disminución de la función de este gen ha sido reportada en diversos tipos de cáncer, principalmente en tumores mamarios, y en cáncer de cabeza y cuello ⁶⁵. El análisis de expresión de ANXA1 realizado en este estudio puso de manifiesto que existe una disminución de este mRNA en líneas celulares de CC, mientras que la expresión de miR-196a se encuentra incrementada en el mismo grupo de estudio; los resultados de un trabajo realizado por Luthra y colaboradores en 2008, demostraron que existe un mecanismo de regulación de ANXA1 mediado por miR- 196a

en líneas celulares provenientes de adenocarcinomas de esófago ⁶⁶ Es por esto que, la evidencia obtenida de nuestros datos, sugiere la posible existencia de este mecanismo en líneas celulares derivadas de tumores cervicales.

GATA6 (GATA binding protein 6) es un factor de transcripción con dominios de unión al DNA de tipo dedos de zinc, pertenece a la familia de proteínas de unión a GATA, las cuales reciben este nombre debido a que reconocen la secuencia consenso 5'-GATA-3' ⁶⁷. Esta proteína está implicada en el desarrollo embrionario temprano, organogénesis y en el mantenimiento de la diferenciación celular ⁶⁸. Los resultados obtenidos a partir del análisis de expresión de GATA6 demuestran que existe una disminución de mRNA en las líneas celulares tumorales involucradas en este estudio, con respecto a la línea celular no tumoral HaCaT. Existen estudios que indican que la sobreexpresión de GATA6 es un mecanismo molecular pro-oncogénico en tumores colorrectales ⁶⁹, sin embargo, también se ha demostrado que la pérdida o ausencia de la función de este gen, es un factor que promueve la carcinogénesis; un estudio realizado en 2016 por Wu y colaboradores puso de manifiesto que el silenciamiento epigenético del promotor de GATA6 es un factor que promueve la carcinogénesis gástrica ⁷⁰ Otro estudio de 2009 realizado por Capo-chichi y colaboradores demostró que la pérdida de función del gen GATA6 induce anormalidades en la morfología nuclear en células de cáncer de ovario ⁷¹; debido a que existen evidencias que sustentan ambos papeles, se sugiere que la participación de GATA6 en el desarrollo oncogénico es tejido-específico. Uno de los principales genes regulados por GATA6 es la proteína disabled-2 (dab-2), la cual cumple la función de mantener la diferenciación en las células epiteliales de ovario ⁶⁰. Los datos obtenidos a partir de nuestro estudio sugieren la posible de la existencia de un mecanismo de inhibición de

GATA6 mediante miR-196a en el CC, lo cual a su vez podría promover la transición epitelio-mesénquima vía la inactivación de alguno de los genes regulados positivamente por GATA6, tal como la proteína dab-2.

El gen PDCD4 (Programmed cell death 4 / neoplastic transformation inhibitor) codifica para una proteína que regula procesos celulares cuyo descontrol se encuentra asociado al cáncer, tales como apoptosis, ciclo celular, migración, invasión, proliferación celular y metástasis ⁶². Diversos estudios publicados demuestran que PDCD4 se encuentra subexpresado en diversos tipos de cáncer, tales como cáncer de pulmón y cáncer colorrectal^{72, 73}. Los resultados de este estudio sugieren un posible mecanismo de regulación de PDCD4 mediado por este microRNA

Con la finalidad de corroborar que existe un mecanismo de regulación de los 3 genes blanco mediado por miR-196a se realizó una transfección en reversa en células HeLa utilizando dos estímulos distintos: el Mimic de miR-196a para promover una sobreexpresión del mismo, y el antimimic para disminuir la expresión. Pudimos observar una sobreexpresión de este microRNA en los grupos transfectado con el Mimic. Posteriormente se procedió a medir la expresión de los blancos de miR-196a en los mismos grupos, encontramos que los 3 genes presentan una disminución significativa ($p < 0.05$) en el grupo de estudio que sobreexpresa miR-196a, sin embargo no todos presentaron un incremento significativo cuando este microRNA era inhibido, lo cual sugiere que este microRNA regula a estos genes al menos de manera parcial. Lo anterior es congruente con estudios anteriores, en los que demuestran que un solo microRNA no es capaz de regular totalmente la expresión de un gen, sino que es parte de un mecanismo sinérgico de regulación negativa ^{74,75,76}.

Existen 6 genes de la familia de factores de transcripción GATA (GATA1, 2, 3, 4, 5 y 6) los cuales están relacionados debido a su similitud en la secuencia de aminoácidos de la región de unión de DNA⁷⁷ se ha demostrado que estos factores de transcripción están relacionados principalmente a procesos en el desarrollo mesodermal, sin embargo en la etapa adulta también participan en el mantenimiento de la estructura y función celular, además participan en el desarrollo del linaje eritroide, y la inmunidad adaptativa a través de la secreción de citosinas en linfocitos CD4^{68, 78 79}. Además, otros estudios han relacionado la pérdida de la expresión de esta familia de factores de transcripción en estados patológicos como el cáncer, en un estudio realizado por Wu et al se demostró que el silenciamiento epigenético de GATA6 altera la vía de señalización JAK/STAT, lo cual potencia el desarrollo tumoral en cáncer gástrico⁷⁰, asimismo otro estudio demostró que GATA4 y GATA5 se encuentran silenciados mediante mecanismos epigenéticos en cáncer colorrectal y cáncer gástrico⁸⁰. Otro estudio puso de manifiesto que el silenciamiento epigenético GATA6 está presente el 85% de los casos de cáncer de ovario, mientras que GATA4 no se expresa en líneas celulares de cáncer de ovario⁸¹ Los resultados obtenidos en el análisis de expresión de GATA6 en líneas celulares derivadas de CC y en células HeLa transfectantes con los estímulos previamente mencionados, condujeron a proponer el análisis funcional de este gen como un blanco de miR-196a, ya que se encontró una disminución en la expresión del mRNA y de la proteína de GATA6 en líneas celulares de cáncer cervical, y se demostró que este fenómeno puede revertirse, al menos parcialmente, cuando se inhibe la expresión de miR-196a, por lo que en este trabajo se reporta por primera vez un mecanismo de regulación epigenética de GATA6 mediado por un RNA no codificante.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que existe una expresión incrementada de miR-196a en muestras de tumores cervicales y en líneas celulares de CC, a su vez existe una correlación negativa entre la expresión de este microRNA y la cantidad de mRNA de los genes ANXA1, GATA6 y PDCD4 en líneas celulares derivadas de tumores cervicales. Asimismo, se demostró que la expresión de estos genes puede recuperarse en parte, cuando se inhibe la expresión de miR196a en células HeLa. Los niveles proteicos de GATA6 demuestran que este gen es regulado por la expresión de miR-196a, ya que se encontró que, en el grupo estimulado para inhibir la expresión de este microRNA, la expresión proteica de GATA6 incrementa con respecto al control.

8. CONCLUSIONES

- Existe una expresión diferencial de miR-196a en las muestras de tumores cervicales con respecto al tejido sin afección tumoral.
- Existe una expresión diferencial de miR-196a en las líneas celulares derivadas de tumores cervicales con respecto a la línea celular control no tumoral.
- La expresión de miR-196a se correlaciona negativamente con la expresión de los genes que codifican para ANXA1, GATA6 y PDCD4 en líneas celulares de cáncer cervical, lo cual sugiere la posible existencia de un mecanismo de regulación negativa de estos genes mediados por miR- 196a.
- Los niveles de expresión de ANXA1, GATA6 y PDCD4 se recuperan, al menos de manera parcial, cuando se inhibe la expresión de miR-196a.
- El nivel de expresión proteica de GATA6 disminuye cuando se sobreexpresa miR-196a en células HeLa y aumenta cuando este se inhibe, lo cual sugiere por primera vez que este factor de transcripción es regulado por un microRNA.

9. REFERENCIAS:

- 1.- Saia PJ, Creasman WT. Clinical gynecologic oncology. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2012
- 2- Ferlay et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2018: Globocan 2018. International Journal of Cancer. 2018; 136: E359–E386.
- 3.- Lazcano-Ponce E, Palacio-Mejia LS, Allen-Leigh B, Yunes-Diaz, E, Alonso P, Schiavon R, Hernandez-Avila, M. Decreasing Cervical Cancer Mortality in Mexico: Effect of Papanicolaou Coverage, Birthrate, and the Importance of Diagnostic Validity of Cytology. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2008; 17: 2808–2817.
- 4- Tewari KS, Monk BJ. Invasive Cervical Cancer. In Clinical Gynecologic Oncology: Elsevier; 2012 p. 51–119.e13.
5. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer C, Shah KV.. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. Journal of Clinical Pathology. 2002; 55: 244–265.
6. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders, PJF, Peto J, Meijer CJLM, Muoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. The Journal of Pathology. 1999; 189:12–19.
7. Creasman WT. Preinvasive disease of the cervix. Clinical Gynecologic Oncology. 2012; 1–34.
8. Castellsague X, Bosch FX., Munoz, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. Virus Research. 2002; 89: 191–199.
9. Castellsagué X, Muñoz N, et al. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis- role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003; 31: 20–8.
- 10 Chung SH, Franceschi S, Lambert PF. Estrogen and ER α : Culprits in cervical cancer? Trends in Endocrinology & Metabolism. 2010; 21: 504–511.
- 11 Blanpain C. Tracing the cellular origin of cancer. Nature Cell Biology. 2013; 15: 126-

134.

12 Bray F, Gombe-Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R, Ferlay J. GLOBOCAN 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018 (World Health Organization).

13 Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001; 411: 366–374.

14 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*: 2011; 144: 646–674.

15 Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*. 2003; 349: 2042–2054.

16 Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*. 2009; 10: 295–304.

17 Lee JT. Epigenetic Regulation by Long Noncoding RNAs. *Science*. 2012; 338: 1435–1439.

18 Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2011; 12: 861–874.

19 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281–297.

20 Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: Biogenesis and Molecular Functions. *Brain Pathology*. 2008; 18: 113–121.

21 Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009; 10: 126–139.

22 Lagos-Quintana M. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*. 2001; 294: 853–858.

23 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75: 843–854.

- 24 Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2014a; 42; D68–D73.
- 25 Kozomara A., and Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2014b; 42: D68–D73.
- 26 Lee Y, Kim M. Han J, Yeom KH, Lee S, Baek S.H, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*. 2004; 23: 4051–4060.
- 27 Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005; 6; 376–385.
- 28 Wang L, Yang Y, Liu Y, Song H, Zhang L, Li P. Decreased Expression of Annexin A1 during the Progression of Cervical Neoplasia. *Journal of International Medical Research*. 2008; 36: 665–672.
- 29 Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 2009; 11: 228–234.
- 30 Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*. 2015; 519; 482–485.
- 31 Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*. 2010:
- 32 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004a; 101; 2999–3004.
- 33 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004a; 101; 2999–3004
- 34 Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC Couples

- MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell*. 2005; 12: 631–640.
- 35 Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2016; 1: 15004.
- 36 Garzon R, Calin GA Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annual Review of Medicine*. 2009
- 37 Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103: 2257–2261.
- 38 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006a; 6: 857–866.
- 39 Calin GA, Croce CM MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006b; 6: 857–866.
- 40 Durkin SG, Glover TW. Chromosome Fragile Sites. *Annual Review of Genetics*. 2007; 41: 169–192.
- 41 Ruan K, Fang X., Ouyang G. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Letters*. 2009; 285: 116–126.
- 42 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA., et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435: 834–838.
- 43 Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, et al.. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103: 9136–9141.
- 44 Esquela-Kerscher A., Slack FJ.. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 259–269.
- 45 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating

M, Rai K, et al. Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99: 15524–15529.

46 Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M., Shimizu M., Wojcik SE, Aqeilan, RI, Zupo S, Dono M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102: 13944–13949.

47 Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2009a: 10: 704–714.

48 Croce CM (2009b). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2009b: 10: 704–714.

49 Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene*. 2006: 25; 6170–6175.

50 Yekta S. MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004; 304; 594–596.

51 Huang F, Tang J, Zhuang X, Zhuang Y, Cheng W, Chen W, Yao H, Zhang S. MiR-196a Promotes Pancreatic Cancer Progression by Targeting Nuclear Factor Kappa-B-Inhibitor Alpha. *PLoS ONE*. 2014: 9, e87897.

52 Shang Y, Wang LQ, Guo QY, Shi TL. MicroRNA-196a overexpression promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through PTEN/Akt/FOXO1 pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015: 8; 2461.

53 Tsai MM, Wang CS, Tsai CY, Chen, CY, Chi HC, Tseng, YH, Chung PJ, Lin YH, Chung IH, Chen CY, et al.. MicroRNA-196a/-196b promote cell metastasis via negative regulation of radixin in human gastric cancer. *Cancer Letters*. 2014; 351: 222–231.

54 Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH, Yang CD, Hong HC., Wei TY, Tu SJ, et al.. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Research*. 2016; 44: D239–D247.

55 Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko, M, Filippidis C, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-microT web server v5.0: Service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41: W169– W173.

56 Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution*. 2010; 27: 221–224.

57 Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 134.

58 Tyner C, Barber GP, Casper J, Clawson H, Diekhans M, Eisenhart C, Fischer CM., Gibson D, Gonzalez JN., Guruvadoo, L., et al. The UCSC Genome Browser database: 2017 update. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45: D626–D634.

59 Liu C, Lin J, Li L, Zhang Y, Chen W, Cao Z, Zuo H, Chen C, Kee K. HPV16 early gene E5 specifically reduces miRNA-196a in cervical cancer cells. *Scientific Reports*. 2015; 5:

60 Capo-chichi CD, Roland IH, Vanderveer L, Bao R, Yamagata T, Hirai H, Cohen C, Hamilton TC, Godwin AK, Xu XX. Anomalous expression of epithelial differentiation-determining GATA factors in ovarian tumorigenesis. *Cancer Res*. 2003; 63: 4967–4977.

61 Lankat-Buttgereit B, Göke R. The tumour suppressor Pcdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biology of the Cell*. 2009a; 101: 309–317.

62 Lankat-Buttgereit B, Göke R.. The tumour suppressor Pcdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biology of the Cell*. 2009b; 101: 309–317.

63 Wang L, Bi J, Yao C, Xu X, Li X., Wang S, Li Z, Zhang D, Wang M., Chang G. Annexin A1 expression and its prognostic significance in human breast cancer. *Neoplasma*. 2010; 57: 253–259.

64 Solito E, Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, Perretti M. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *British Journal of Pharmacology*. 2001; 133: 217–

228.

65 Garcia Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, Herrero Zapatero A, Gonzalez MV, Suarez Nieto C, Rodrigo JP. Annexin A1 Down-Regulation in Head and Neck Cancer Is Associated with Epithelial Differentiation Status. *The American Journal of Pathology*. 2004; 164: 73–79.60, 167–179.

66 Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM, et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA- mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene*. 2008; 27: 6667–6678.

67 Capo-chichi DC, Jeanne AD, Luc B, Blanche A, Vidéhouénu AK, Toussain A, Amidou, S, Xiang-Xi X., Ambaliou, S.. Deficiency of GATA6 as a Molecular Tool to Assess the Risk for Cervical Cancer. *American Journal of Biomedical Research*. 2014; 2: 1–6.

68 Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R, Grosveld F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development*. 1999; 126: 723–732.

69 Xu B. GATA6 predicts prognosis and hepatic metastasis of colorectal cancer. *Oncology Reports*. 2013;

70 Wu CS, Wei KL, Chou JL, Lu CK, Hsieh CC, Lin J, Deng Y, Hsu WT, Wang HM, Leung CH, et al. Aberrant JAK/STAT Signaling Suppresses TFF1 and TFF2 through Epigenetic Silencing of GATA6 in Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17: 1467.

71 Capo-chichi CD, Cai KQ, Testa JR, Godwin AK, Xu XX. Loss of GATA6 Leads to Nuclear Deformation and Aneuploidy in Ovarian Cancer. *Molecular and Cellular Biology*. 2009; 29: 4766–4777.

72 Asangani IA, Rasheed SAK, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008; 27: 2128–2136.

73 Chen Y, Knösel T, Kristiansen G, Pietas A, Garber ME, Matsushashi S, Ozaki I,

Petersen I. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis: PDCD4 expression in lung cancer. *The Journal of Pathology*. 2003; 200: 640– 646.

74 Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA Target Recognition. *PLoS Biology*. 2005; 3: e85.

75 Brodersen P, Voinne O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009; 10: 141–148.

76 Krek A, Grn D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*. 2005; 37: 495–500.

77 Ko LJ, Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Molecular and Cellular Biology*. 1993; 13: 4011–4022.

78 Leonard M, Brice M, Engel JD, Papayannopoulou T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood*. 1993; 82: 1071–1079.

79 Zheng W, Flavell RA. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell*. 1997; 89: 587

80 Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H, Jair KW, van Engeland M, Esteller M, Sakai H, Ren CY, Yuasa Y, Herman JG, et al. GATA-4 and GATA-5 Transcription Factor Genes and Potential Downstream Antitumor Target Genes Are Epigenetically Silenced in Colorectal and Gastric Cancer. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 23: 8429–8439.

81 Caslini C, Capo-chichi CD, Roland IH, Nicolas E, Yeung AT, Xu XX. Histone modifications silence the GATA transcription factor genes in ovarian cancer. *Oncogene*. 2006; 25: 5446– 5461.

ANEXO 1. Consentimiento informado para la donación de tejidos.

	<p style="text-align: center;">Instituto Nacional de Cancerología CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACION DE TEJIDOS</p>
<p>1. Datos generales Investigadores principales: Víctor Manuel González Quintana Correo electrónico: vmgonzalezq@gmail.com</p>	
<p>Título del proyecto: ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN EL GENOMA Y TRANSCRIPTOMA DE TUMORES DEL CERVIX UTERINO ASOCIADAS A LA FALTA DE RESPUESTA A TRATAMIENTO.</p>	
<p>Versión del consentimiento: Febrero 2018</p>	
<p>1. Información para el paciente y formato de consentimiento. LE ESTAMOS INVITANDO A PARTICIPAR EN UN PROYECTO DE INVESTIGACION EN EL QUE QUEREMOS ESTUDIAR ALGUNAS CARACTERISTICAS EN EL TUMOR QUE USTED TIENE. EN ESTE ESTUDIO NO SE REALIZARA NINGUN TRATAMIENTO DIFERENTE AL QUE ACTUALMENTE SE UTILIZA PARA EL CANCER DEL CUELLO DE LA MATRIZ. Si usted acepta participar le solicitaremos que nos permita tomar una muestra de su tumor antes de que inicie su tratamiento. En esta muestra se estudiarán si existen algunas características que nos permitan predecir que tanto se beneficia del tratamiento y posiblemente diseñar nuevas formas para tratar a pacientes con tumores como el que usted tiene ahora. PARA ESTE ESTUDIO SE ESPERA QUE PARTICIPEN 100 MUJERES CON DIAGNOSTICO DE CANCER CERVICO UTERINO LOCALMENTE AVANZADO. SU PARTICIPACION ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA Y SI USTED NO ACEPTA PARTICIPAR NO SE AFECTARA SU ATENCIÓN MEDICA.</p>	
<p>2. Datos propios del procedimiento SI USTED ACEPTA PARTICIPAR ANTES DE QUE INICIE SU TRATAMIENTO CON MEDICINAS Y RADIACIONES LE PEDIREMOS QUE NOS PERMITA TOMAR UNA BIOPSIA DE SU TUMOR, LA BIOPSIA ES UNA MUESTRA DEL TUMOR COMO LA QUE LE TOMARON PARA HACER SU DIAGNOSTICO. EN ESTA OCASION ESTA MUESTRA NO SE UTILIZARA PARA HACER DIAGNOSTICO, SINO PARA ESTUDIAR ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LOS GENES DE LAS CELULAS DEL TUMOR. EN ESTE ESTUDIO SE OBTENDRA A PARTIR DE LAS CELULAS DEL TUMOR ADN Y RNA (ASI LLAMA EL MATERIAL DEL QUE ESTAN HECHOS SUS GENES) Y EN ESTE MATERIAL GENETICO BUSCAREMOS "MARCAS" QUE NOS PUDIERAN AYUDAR A IDENTIFICAR SI EXISTE FORMA DE SABER COMO VA A RESPONDER AL TRATAMIENTO. TODOS ESTOS ESTUDIOS SE HACEN EN UN LABORATORIO Y USTED CONTINUARA RECIBIENDO EL MISMO TRATAMIENTO.</p>	

Si usted acepta participar en este estudio un fragmento de esta biopsia se guardará durante un año en el Laboratorio de Genómica de la Subdirección de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología.

Una vez que se han recibido, procesado y almacenado las muestras biológicas el archivo estará disponible para los investigadores. El acceso no es libre, existe un reglamento que regula el acceso a las muestras. ALGUNOS DATOS RELACIONADOS A SU ENFERMEDAD PODRAN SER REVISADOS POR LOS INVESTIGADORES, SIN EMBARGO, SUS DATOS PERSONALES COMO SU NOMBRE, EDAD, DIRECCION, TELEFONO Y NUMERO DE EXPEDIENTE, NO PODRAN SER CONSULTADOS.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACION DE TEJIDOS. Versión 1, en español. Fecha 12 de febrero de 2018.