



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DISEÑO DE UN SISTEMA PARA
LA VISUALIZACIÓN DE MicroRNAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
RICARDO DAVID MONROY CONTRERAS

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. JESÚS AGUIRRE LINARES
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. JORGE VÁZQUEZ RAMOS
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Mayo, 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.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 126 Norte que pertenece al Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Luis Vaca. Ricardo Monroy-Contreras recibió una beca de CONACyT para maestría (No. 234486) durante la realización del mismo.

DEDICATORIA.

A Emma Sofía, por tantos y tan bellos momentos. A Rosa, por su amor incondicional. A Cristina Contreras, por su comprensión y apoyo, especialmente en los momentos difíciles, cuando más hacía falta.

A mi familia: Addy Cristina, Addy Mireya, Rosa Lilia, Lucia, Licha, María Elena, Alejandra, Nancy, Daniel, Rafael, Ariana y Diana, quienes, de muchas maneras, me han brindado su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio 126 Norte: Josué, Jonathan, Adriana, Gabriela, Claudia, Israel, Alejandro, Julián, Ryan, Alicia y Doña Salus, que han creado un ambiente de amable convivencia y me han ofrecido su ayuda.

Y a mis compañeros de la maestría en ciencias bioquímicas: Sandra, Gerardo y Erika, que me han ofrecido su amistad y han hecho llevaderos los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Luis Vaca por permitirme desarrollar este trabajo en su laboratorio, dirigirme, brindarme su apoyo, paciencia y tiempo.

A los doctores Jorge Vázquez y Jesús Aguirre por la retroalimentación y la crítica constructiva que aportaron durante el desarrollo de este trabajo.

Al personal de las Unidades de Microscopía y Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por las facilidades prestadas.

A la Dra. Silvia Anna Ciafrè de la Universidad Tor Vergata de Roma por la donación del plásmido Dpa-miR-128, así como por la asesoría técnica para su uso.

A la Dra. Gohar Gevorkian y al Biól. Gonzalo Acero del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por la donación de la línea celular SH-SY5Y y la asesoría técnica para su cultivo.

Al Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por darme la oportunidad y las facilidades para presentar este trabajo y obtener el grado.

Finalmente, a las doctoras: Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Gohar Gevorkian Markosian y Alejandra Alicia Covarrubias Robles. Así como, a los doctores: José Luis Reyes Taboada y Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas. Por haber revisado el presente trabajo y hacer importantes aportaciones para su mejora.

Abreviaturas

RNA: *ribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico.

MB: *molecular beacon*, faro molecular, también conocido como baliza molecular.

mRNA: *messenger RNA*, RNA mensajero.

miRNA o miR: microRNA.

DNA: *desoxirribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico.

gDNA: *genomic desoxirribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico genómico.

PCR: *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

SAGE: *serial analysis of gene expression*, análisis en serie de la expresión génica.

FISH: *fluorescent in situ hybridization*, hibridación fluorescente *in situ*.

SLO: streptolisina tipo O.

miR-9: microRNA-9.

miR-128: microRNA-128.

3' UTR: *3' untranslated region*, región que no se traduce en el extremo 3' de los mRNAs.

RISC: *RNA induced silencing complex*, complejo de silenciamiento inducido por RNA.

t-TrkC: forma truncada del receptor de neurotrofina.

GSC: *glioblastoma stem cells*, células tallo de glioblastoma.

CAMTA1: *calmodulin transcription activator 1*, activador 1 de la transcripción de calmodulina.

Sox2 o Sry-box2: *sex-determining region Y-box 2*, región determinante del sexo de la caja-Y 2.

HD: *Huntington's disease*, enfermedad de Huntington.

Htt: huntingtina.

MMP: *matrix metalloproteinases*, metaloproteinasas de matriz.

ATRA: *all-trans retinoic acid*, ácido transretinoico.

SNP: *single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de un sólo nucleótido.

DCX: doblecortina o lisencefalina-X.

T_M o θ_m : *melting temperature*, temperatura de fusión.

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

FRET: *Föster's resonance energy transfer*, transferencia de la energía de resonancia de Föster.

Dabcyl: ácido 4-([4'-(dimetilamino)fenil]azo) benzoico.

6-FAM: 6-carboxyfluoresceina.

PPE: *poly(phenylene ethynylene)s*, poli(fenileno etinileno)s.

2'OME: nucleótidos 2'-O-metilados.

PS: nucleótidos derivados de fosforotioato.

LNA: *locked nucleic acids*, ácidos nucleicos cerrados.

PNA: *peptide nucleic acids*, ácidos nucleicos peptídicos.

FRAP: *fluorescence recovery after photobleaching*, recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento.

QD: *quantum dot*, punto cuántico.

Í N D I C E D E C O N T E N I D O .

R E S U M E N.....	1
A B S T R A C T.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. PLANTEAMIENTO.....	7
III. MicroRNAs.....	9
3.1. Definición y Características.....	10
3.2. MicroRNA-9.....	10
3.3. MicroRNA-128.....	16
IV. FAROS MOLECULARES.....	20
4.1. Definición y Características.....	21
4.2. Estructura y Funcionamiento.....	22
4.3. Transferencia de Energía entre el Fluoróforo y el Apagador.....	24
4.4. Fundamentos del Diseño.....	25
4.4.1. Elección del Par Fluoróforo-Apagador.....	26
4.4.2. Parámetros Termodinámicos.....	27
4.4.3. Balance entre Selectividad y Velocidad de Hibridación.....	28
4.5. Modificaciones Químicas.....	31
4.5.1. MBs con Selectividad Aumentada.....	31
4.5.2. MBs Resistentes a Nucleasas.....	34
4.6. Métodos para Introducir MBs en Células Vivas.....	38
4.6.1. Permeabilización de la Membrana Celular Mediante Toxinas.....	38
4.7. Ensayos con MBs en Células Vivas para Visualizar RNAs.....	39
4.7.1. Visualizando mRNAs.....	39
4.7.2. Monitoreando la Expresión Génica.....	43
4.7.3. Monitoreando la Replicación de RNA Genómico Viral.....	44
4.7.4. Visualización de RNAs en Neuronas.....	45
4.7.5. Detección de miRNAs en Células Vivas.....	46
V. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	48
5.1. Objetivo General.....	49
5.2. Objetivos Específicos.....	49
5.3. Hipótesis.....	49
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
6.1. Faros Moleculares.....	51
6.2. Oligonucleótidos.....	51
6.3. Ensayos de Hibridación.....	53
6.4. Ensayos de Desnaturalización Térmica.....	54
6.5. Análisis en el Equilibrio.....	55

6.6.	Análisis de la Cinética de Hibridación.....	57
6.7.	Concentración del MB Libre y Estabilidad del Híbrido MB-blanco.....	58
6.8.	Cultivo Celular.....	59
6.9.	Plásmidos.....	59
6.10.	Ensayos con Streptolisina O.....	59
6.11.	Transfección, Fijación y Montaje de las Células.....	60
6.12.	Análisis Estadístico.....	60
VII.	RESULTADOS.....	62
7.1.	Hibridación de los MBs con sus Oligonucleótidos Blanco.....	63
7.1.1.	Parámetros de las Curvas de Hibridación.....	65
7.1.1.1.	Oligonucleótidos de Igual Longitud.....	65
7.1.1.2.	Oligonucleótidos que Incrementan su Longitud en 5'.....	65
7.1.1.3.	Oligonucleótidos que Incrementan su Longitud Bilateralmente.....	66
7.2.	Transición del Estado Hibridado al Libre.....	68
7.2.1.	Temperaturas de Fusión del Híbrido MB-oligonucleótido Blanco.....	68
7.2.1.1.	θ_m del MB9 con sus Oligonucleótidos Blanco.....	68
7.2.1.2.	θ_m del MB128 con sus Oligonucleótidos Blanco.....	69
7.2.2.	Termodinámica de la Transición del Estado Hibridado al Libre.....	71
7.3.	Equilibrio o Fase Estacionaria.....	74
7.3.1.	Medida de la Estabilidad en el Equilibrio.....	74
7.3.2.	Proporción del MB que está Unido a su Blanco en el Equilibrio.....	77
7.4.	Ensayos en el Microscopio Confocal.....	79
7.4.1.	Interacción del MB con SLO.....	79
7.4.2.	Entrada de un MB al Citoplasma de Células Vivas.....	80
7.4.3.	Visualización de miRNA-128 en Células Fijas.....	81
VIII.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	83
IX.	PERSPECTIVAS.....	86
X.	APÉNDICES.....	88
	Apéndice A. Nomenclatura de microRNAs.....	89
	Apéndice B. Biogénesis de los miRNAs canónicos.....	91
	Apéndice C. Biogénesis de los miRtrons.....	94
	Apéndice D. Métodos para introducir MBs en células vivas.....	97
XI.	ANEXOS.....	104
	Anexo 1. Calidad de síntesis de los oligonucleótidos blanco.....	105

Í N D I C E D E F I G U R A S .

Figura 1.	Número de artículos acerca de microRNAs publicados por año.....	5
Figura 2.	Estructura y función de los MBs.....	23
Figura 3.	Formas en las que un MB puede hibridar a su blanco.....	29
Figura 4.	Desnaturalización térmica de un MB.....	30
Figura 5.	MBs con superapagado.....	32
Figura 6.	Estructuras de nucleótidos resistentes a nucleasas.....	35
Figura 7.	Interacciones entre MBs.....	37
Figura 8.	Estrategias para la detección de mRNAs en células vivas.....	42
Figura 9.	MB con sus diferentes oligonucleótidos blanco.....	53
Figura 10.	Estados conformacionales de un MB.....	57
Figura 11.	Cinética de hibridación de los MBs	64
Figura 12.	Termodinámica de la transición entre el estado hibridado y el libre...	72
Figura 13.	Interacción de MBs con Streptolisina tipo O.....	79
Figura 14.	Entrada de MBs al citoplasma de células vivas.....	80
Figura 15.	Visualización de miRNA-128 en células fijas.....	81
Figura 16.	Biogénesis de los miRNAs canónicos.....	93
Figura 17.	Biogénesis de los miRtrons.....	96
Figura 18.	Péptidos acoplados a MBs.....	100
Figura 19.	Oligonucleótidos de igual longitud (MB9).....	105
Figura 20.	Oligonucleótidos que aumentan su longitud en 5' (MB9).....	106
Figura 21.	Oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente (MB9).....	107
Figura 22.	Oligonucleótidos de igual longitud (MB128).....	108
Figura 23.	Oligonucleótidos que aumentan su longitud en 5' (MB128).....	109
Figura 24.	Oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente (MB128).....	110

Í N D I C E D E T A B L A S.

Tabla 1. Pares de fluoróforos y apagadores.....	26
Tabla 2. Secuencias de los MBs y sus oligonucleótidos blanco.....	52
Tabla 3. Parámetros de las curvas de hibridación.....	67
Tabla 4. Temperaturas de fusión (θ_m) entre el MB y sus oligonucleótidos blanco...	70
Tabla 5. Termodinámica de la transición entre el estado hibridado y el libre.....	73
Tabla 6. Estabilidad de los híbridos MB-oligonucleótido blanco.....	76
Tabla 7. Proporción del MB que permanece unido a su blanco en el equilibrio.....	78

RESUMEN.

Dentro de las células, en los espacios intercelulares y en los fluidos biológicos, existen moléculas de RNA de distintos tipos que desempeñan funciones fundamentales para la fisiología celular y patología de los organismos. A la fecha, se han desarrollado una gran variedad de técnicas para el estudio del RNA. Comenzando por las que requieren su purificación para cuantificarlo de forma secuencia-específica; continuando con aquellas que permiten visualizarlo en células o tejidos fijos; finalmente, las más recientes y novedosas, que hacen posible visualizar moléculas de RNA en células e incluso en organismos vivos.

Los faros o balizas moleculares (MBs: *molecular beacons*), son sondas que consisten en un oligonucleótido con un fluoróforo o reportero ligado covalentemente a su extremo 5'; mientras, en su extremo opuesto (3') tienen un apagador de fluorescencia. Adoptan una estructura secundaria de tallo-asa, debido a que en los extremos cuentan con secuencias complementarias de entre 4 y 7 nucleótidos que se aparean. El tallo hace que el fluoróforo y el apagador estén cerca, permitiendo que la energía de fluorescencia del primero sea transferida al segundo. Cuando los MBs hibridan a su secuencia blanco, pierden su estructura secundaria; como consecuencia, el fluoróforo y el apagador se alejan, el apagador no absorbe la energía del fluoróforo y la fluorescencia de este es emitida y puede ser detectada.

Se han usado MBs y microscopia confocal para observar varios tipos de RNAs en células vivas y de manera reciente microRNAs, tanto maduros como precursores. Los microRNAs son cortos (18-25 nucleótidos de longitud), de cadena sencilla, no codifican proteínas; son capaces de regular la expresión génica a nivel postranscripcional, hibridando la región 3' que no se traduce (3'-UTR: *3' untranslated region*) de los mRNAs y bloquear su traducción.

En el presente trabajo, se analiza cómo la manera en que el MB hibrida a su blanco; esto es, usando sólo los nucleótidos que están en el asa, o estos y adicionalmente los que están en el tallo; afecta la velocidad de hibridación y la estabilidad del híbrido MB-blanco. Con la finalidad de determinar cuál es la mejor opción para hibridar microRNAs en células vivas. Para tal propósito, se realizaron ensayos de hibridación y desnaturalización térmica (MB-blanco), *in vitro*, pero en condiciones fisiológicas. Además, se llevaron a cabo experimentos de introducción de MB en células vivas usando SLO (streptolisina tipo O) como agente permeabilizante de la membrana celular y de detección en células fijas de microRNAs sobreexpresados mediante un vector plasmídico.

ABSTRACT.

Inside the cells, in extracellular spaces, and in biological fluids, resides a wide variety of RNA molecules playing crucial roles in cellular physiology and pathology. Today, a lot of techniques for the study of RNA are available; some of them, need pure RNA for its sequence-specific quantification, another have the capability to show RNAs in fixed cells or tissues, but the more recent techniques offers the possibility to observe RNA molecules in living cells or organisms.

Molecular beacons (MBs) are oligonucleotide probes with a fluorophore attached at the 5' end, and a fluorescence quencher linked at the 3' end. The probes has a stem-loop hairpin secondary structure due to complementary sequences at every end that forms the loop (4 to 7 nucleotides). Reporter and quencher are in close proximity at the loop, making possible the transference of the fluorescence energy from the reporter to the quencher. When the MB loses its structure, after hybridizing a target sequence, the reporter and quencher are located far one from the another, in this way, the fluorescence can be emitted and detected.

Some articles, reports the detection of diverse kinds of RNA molecules using MBs and confocal microscopy, and very recently microRNAs. They are non-coding, very short (18 – 25 nucleotides), single-strand RNA molecules; with the function to downregulate gene expression at the post-transcriptional level, interacting with the 3' untranslated region (3'-UTR) of the messenger RNA and preventing translation.

In this work, we analyzed the effect of the way in that the MB hybridizes its target; it is, using only nucleotides at the loop, or these plus nucleotides at the stem; in the hybridization rate and in the stability of the MB-target hybrid. In order to determine the better choice for hybridize microRNAs in living cells. For this purpose, we realized hybridization and thermal denaturing assays (MB-target), *in vitro*, but under physiological conditions. We also carry out experiments of MB introduction into living cells using streptolysin type O like cell-membrane permeabilizing-agent and the detection of plasmid-vector over-expressed microRNAs into fixed cells.

I. INTRODUCCIÓN

A la fecha, se posee suficiente evidencia experimental para demostrar el papel esencial del RNA en la fisiología y patología celular, tisular y de los organismos. Se han hallado diversos tipos de RNA en compartimentos celulares, espacios intercelulares y fluidos biológicos. Las funciones que desempeña el RNA requieren de su transporte dentro de la célula de un compartimento a otro, dentro del mismo compartimento a regiones específicas o de su secreción a espacios intercelulares [1]–[4]. Se han descrito varios mecanismos que permiten regular, tanto la cantidad de determinada molécula de RNA, como su distribución espacio-temporal en diversas regiones intra y extracelulares [5]–[8].

La transcripción cuenta con mecanismos de regulación positivos y negativos, que actúan antes, durante o después del proceso, estos, pueden darse mediante elementos de regulación tipo *cis* o *trans*, a nivel de DNA o RNA. Los elementos *cis*, son regiones no codificantes presentes en el DNA genómico (gDNA) o en el RNA mensajero (mRNA), regulan la transcripción o la traducción, respectivamente. Es decir, las moléculas (gDNA y mRNA) se autorregulan mediante éstos elementos [9]–[11]. Por otro lado, los elementos *trans* son moléculas, generalmente proteínas, que interactúan con regiones del DNA o del mRNA, regulando la expresión génica o la traducción, respectivamente [12]–[16].

Se ha descrito, que las células durante el desarrollo embrionario y en la madurez, muestran patrones particulares de distribución de moléculas de RNA de acuerdo a su estadio y estirpe [5], [17], [18]. Incluso, se ha demostrado, que el control de la traducción se lleva a cabo en regiones específicas del citoplasma que están determinadas por la identidad de la molécula de mRNA que se traduce [6], [19], [20].

La exportación del mRNA desde el núcleo al citoplasma [21]–[24], así como su transporte a regiones específicas del mismo para ser traducido, son procesos altamente regulados por una gran cantidad de moléculas e incluso por porciones del mismo mRNA [3], [19], [25].

Recientemente, se han identificado en células tanto animales [26]–[28], como vegetales [29]–[32], RNAs de cadena sencilla, con una longitud que va de los 18 a los 25 nucleótidos, capaces de regular negativamente la traducción de los mRNAs, estos han sido denominados microRNAs [33], [34]. Suelen usarse las abreviaturas miRNAs o miRs para referirse a los microRNAs.

Dada la importancia de los miRNAs por su implicación en varios procesos fisiológicos [35]–[38] y diversas patologías, muchas de ellas con alta incidencia y gran impacto en los sistemas de salud a nivel mundial, *e. g.* cáncer [39]–[41], hepatopatologías [42]–[44], obesidad [45], dislipidemias [46] y diabetes [47], [48], su estudio se ha intensificado gradualmente, desde su descripción (2001), hasta la fecha (Figura 1).

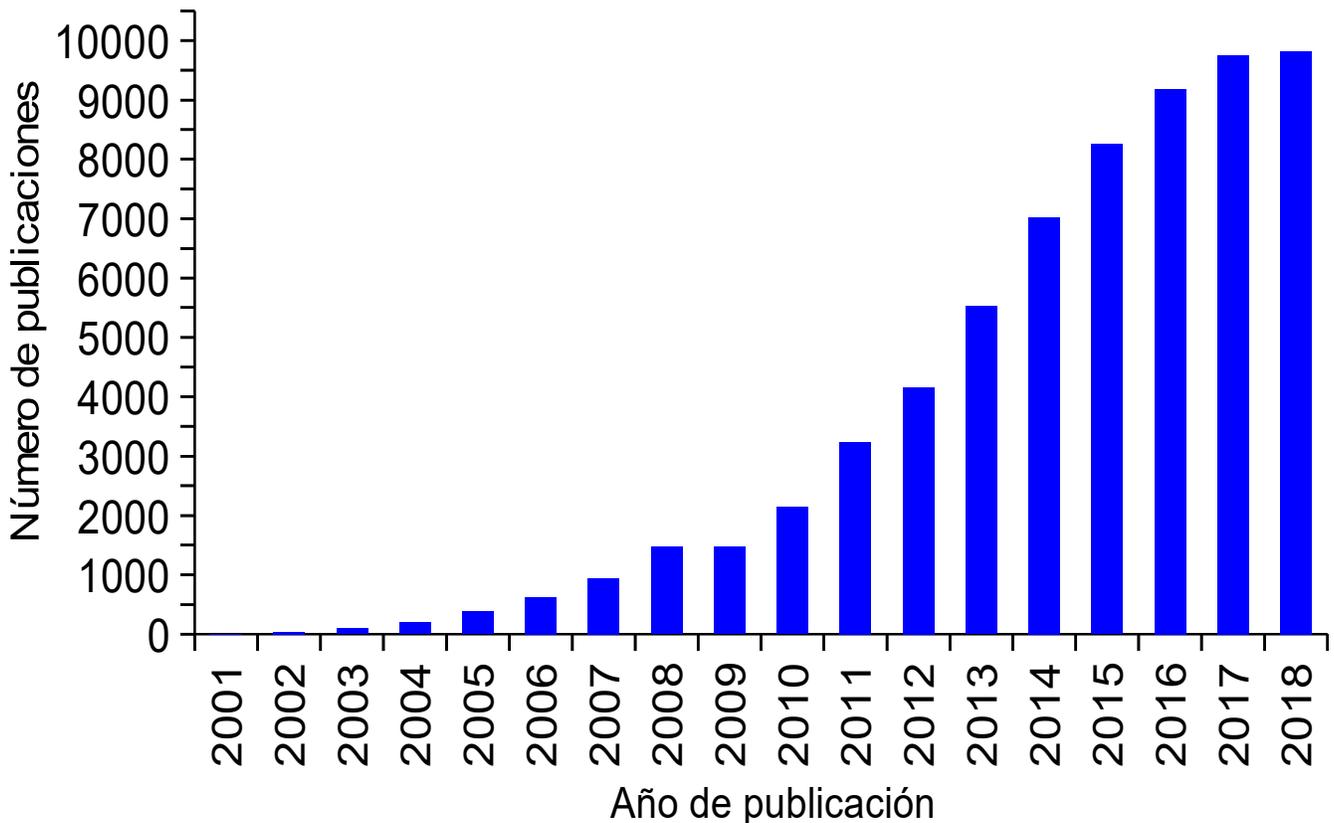


Figura 1. Número de artículos acerca de microRNAs publicados por año.
Publicaciones referentes a miRNAs hechas en el periodo 2001-2018.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*) [49], *northern blot* [50], análisis en serie de la expresión génica (SAGE: *serial analysis of gene expression*) [51], microarreglos [52], entre otras técnicas [53]–[56]; permiten analizar el nivel de expresión de uno o varios miRNAs en muestras de RNA total, con lo que es posible hacer comparaciones de los niveles de expresión de estos RNAs entre diferentes células, cultivos, tejidos, órganos, organismos, etcétera. Sin embargo, estas técnicas no ofrecen ninguna información respecto a la localización de moléculas de RNA a nivel tisular, celular o subcelular, y menos aún del movimiento de las mismas dentro de células vivas, además de requerir un protocolo previo de purificación [57]–[60].

En 1982, aparece una técnica citogenética denominada hibridación fluorescente *in situ* (FISH: *fluorescent in situ hybridization*), esta, a diferencia de las mencionadas en el párrafo anterior, ofrece información acerca de la localización a nivel tisular, celular y subcelular de moléculas de ácidos nucleicos con secuencia conocida [61]–[63].

La FISH, usa oligonucleótidos que tienen un fluoróforo enlazado covalentemente (sondas) para hibridar moléculas de ácidos nucleicos presentes en células o tejidos fijos. Después de incubar las muestras con las sondas, estas son lavadas para eliminar las sondas que no hibridaron a su blanco. Finalmente, son visualizadas mediante microscopia de fluorescencia o confocal. La FISH, no permite hacer ensayos en células vivas, y por lo tanto, no es posible visualizar el movimiento de moléculas de ácidos nucleicos en tiempo real en este contexto.

Los faros moleculares (MBs: *molecular beacons*) son oligonucleótidos con una estructura de tallo-asa, tienen un fluoróforo o reportero en su extremo 5' y un apagador de fluorescencia en el extremo opuesto (3'). Al hibridar a una molécula con una secuencia complementaria a la que el MB tiene en su asa, este pierde su estructura y emite fluorescencia [64].

Actualmente, se están desarrollando técnicas para visualizar miRNAs en células vivas mediante MBs y microscopia confocal, las mismas se encuentran en un proceso de optimización. Aún se exploran varias posibilidades en cuanto a diseños, métodos de introducción y tipos de células en los que pueden usarse.

II. PLANTEAMIENTO.

Son evidentes; la necesidad de estudiar el comportamiento de los miRNAs en el contexto de la célula viva, su visualización en tiempo real durante procesos fisiológicos y patológicos, así como la importancia del avance que esto representa.

En el momento en que el presente trabajo se gesta (julio 2009), se habían visualizado varias especies de RNA en células vivas usando MBs, pero no miRNAs, por esto, se planteó la posibilidad de observarlos mediante microscopía confocal y con MBs como sondas.

En este reporte, se realiza un análisis cinético y termodinámico de ensayos de hibridación y disociación de MBs con diversos oligonucleótidos blanco, *in vitro*, pero en condiciones similares a las intracelulares, para determinar si los MBs que usan para hibridar a su blanco su asa y adicionalmente nucleótidos ubicados en el tallo, presentan una velocidad de hibridación mayor y/o si producen híbridos MB-blanco más estables al compararlos con los MBs que solo usan su asa (convencionales); siendo más apropiados para hibridar miRNAs en células, considerando que estos pueden presentarse en números tan bajos como 1000 moléculas por célula, y que por lo tanto, las sondas que los hibridan deben unirse de manera eficiente a ellos.

También, se muestran experimentos de introducción de MBs a células vivas usando SLO (streptolisina tipo O) como agente permeabilizante de la membrana celular. Sobreexpresión del miR-128 en células HEK-132 usando un vector plasmídico (Dpa-miR-128) para su posterior detección mediante microscopía confocal y un MB como sonda. Finalmente, se presenta como perspectiva, el diseño de experimentos que pueden usarse para visualizar dos miRNAs intrínsecos que son expresados a niveles detectables por una línea celular (SHSY-5Y) durante su diferenciación (miR-128) o su exposición a estrés oxidante (miR-9).

III. MicroRNAs.

3.1. Definición y Características.

Los miRNAs son moléculas de RNA de cadena sencilla, no codificantes, con una longitud de alrededor de 21 nucleótidos, tienen la capacidad de regular la expresión de genes endógenos y exógenos a nivel postranscripcional [26], [34]. Interactúan de forma específica con secuencias que se ubican en la región 3' que no se traduce (3'-UTR: 3' *untranslated region*) de los mRNAs [65], [66], bloqueando su traducción y/o provocando su degradación [67], [68]. Para la interacción miRNA-mRNA, son particularmente importantes los nucleótidos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 ubicados en el extremo 5' del miRNA, estos se denominan semilla; en orden de significancia, le siguen los nucleótidos correspondientes a los números del 8 al 16.

Más del 60% de los mRNAs del transcriptoma humano que codifican para proteínas poseen un sitio de unión a miRNAs que está evolutivamente conservado, y se cree que muchos otros poseen sitios no conservados, por lo que se asume que la mayoría de los genes humanos se hallan bajo el control de miRNAs [69]–[71].

A partir de que se descubrieron en *Caenorhabditis elegans* los dos primeros genes que codifican miRNAs: *lin-4* y *let-7* [72]–[74], se han detectado cientos de miRNAs en diversas especies eucariotas. Sin embargo, muchas de sus funciones y mecanismos siguen siendo estudiados para elucidarse por completo.

La nomenclatura que se usa para designar a los miRNAs es inconsistente, desde su descripción, se han usado diferentes criterios para nombrarlos. En el apéndice A (página 89) se hace una revisión al respecto, y se describe el sistema actual para clasificar y nombrar a los miRNAs.

3.2. MicroRNA-9

El gen *miR-9* de eumetazoos (Eumetazoa) es ancestral, está evolutivamente conservado y es muy probable que haya surgido conjuntamente con la triploblastia [75]. En octubre de 2019 había 68 especies de vertebrados registradas en miRBase [76], [77], de estas, 53 expresan *miR-9* y 39 tienen copias parálogas del gen [78], [79]. Es seguro, que conforme vaya creciendo el número de especies incluidas en miRBase, aumenten tanto los registros de aquellas que expresan *miR-9* como de las que poseen genes parálogos.

La secuencia del miR-9 maduro es idéntica entre especies tan diversas como: *Homo sapiens* (humano), *Mus musculus* (ratón), *Gallus gallus* (pollo), *Xenopus tropicalis* (rana africana o de uñas), *Danio rerio* (pez cebra), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Aedes aegypti* (mosco de la fiebre amarilla).

En algunas de las especies de vertebrados cuyos genomas presentan genes parálogos de *miR-9*, los miRNAs maduros difieren en su secuencia sólo en uno o dos nucleótidos con respecto al consenso, sin embargo, la semilla se conserva intacta [76], [80]. Adicionalmente, el nivel de conservación de la secuencia de los pre-miRNAs entre especies de eumetazoos es muy alto, especialmente en los extremos 3' y 5', que son las regiones de las cuales se originan los miRNAs maduros [81].

En las especies de vertebrados, la existencia de varias copias del gen *miR-9* que producen miRNAs maduros idénticos generalmente obedece a un nivel de especialización funcional. Es decir, cada copia se expresa de forma tejido-específica o durante un determinado estadio o proceso celular [81].

En contraste, existe mucha variedad en la elección de la cadena guía y la cadena pasajera o estrella. En deuterostomados, se observa una marcada preferencia por elegir la cadena 5' (miR-9-5p) como cadena guía, sin embargo, existen niveles detectables de RISCs (RNA induced silencing complex: complejo de silenciamiento inducido por RNA) que portan como guía a la cadena 3' (miR-9-3p) [79].

Dado que miR-9-5p es detectado predominantemente en los RISCs, es denominado simplemente miR-9, mientras que miR-9-3p suele llamarse miR-9*, aún cuando esta nomenclatura se considera obsoleta [79].

Los nemátodos y *D. melanogaster* tienen cinco genes parálogos de *miR-9*: *miR-9a*, *miR-9b*, *miR-9c*, *miR-4* y *miR-79*; para los tres primeros (*miR-9a*, *miR-9b* y *miR-9c*), la cadena elegida predominantemente es la 5', mientras que para los últimos dos (*miR-4* y *miR-79*), se favorece la elección de la cadena 3' sobre la 5' [82], [83].

El caracol marino *Aplysia californica* cuenta sólo con un gen de *miR-9*. Para este, no existe una preferencia en el uso de una cadena sobre otra, es decir, ambas se encuentran cargadas en el RISC en proporciones muy similares [84].

El análisis a gran escala de la expresión génica de miRNAs, ha revelado que el nivel de miR-9 durante el desarrollo y en la madurez, está enriquecido en el sistema nervioso central de todos los vertebrados [85]–[88].

Análisis funcionales en modelos de vertebrados, han mostrado el papel predominante que tiene miR-9 en la regulación del comportamiento de las células progenitoras neuronales, tanto en su diferenciación como en su proliferación. La presencia del miR-9 duplex (miR-9/miR-9*) en fibroblastos de humano en sinergia con miR-124 es suficiente para hacer que estos se diferencien en neuronas [89]. La presencia de miR-9 en células nerviosas puede ser una característica ancestral en animales bilaterales, esto ha sido especialmente observado en cefalocordados y anélidos [90], [91].

Debido a que miR-9 está involucrado en el control de los procesos de diferenciación y proliferación de las células progenitoras neuronales; es de esperarse, que la desregulación del mismo, esté relacionada con el desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer cerebral; entre ellos, el meduloblastoma, glioblastoma y neuroblastoma.

El papel de miR-9 en el surgimiento, desarrollo y progresión del cáncer es muy variable; mientras en meduloblastoma, miR-9 actúa como protector al limitar la proliferación celular; en glioblastoma, la favorece. Se ha relacionado a miR-9 con otros tipos de cáncer fuera del sistema nervioso, favorece la progresión de los linfomas de Hodgkin [92], y ocurre lo mismo en cáncer de mama [93], cervical [94], de colón [95] y estómago [96].

El meduloblastoma, es el cáncer cerebral que más comúnmente se presenta durante la niñez y tiene su origen en células progenitoras del cerebelo. Se ha observado en biopsias de meduloblastoma, que las células tumorales expresan niveles significativamente bajos de *miR-9* en comparación con los niveles expresados por las células del tejido sano circundante [97].

El mRNA de la forma truncada del receptor de neurotrofina (t-TrkC) es un blanco de miR-9. Debido a que este último tiene un bajo nivel de expresión en células de meduloblastoma, existe una sobreexpresión de t-TrkC en dichas células. Esto, provoca que, las células tengan una capacidad

proliferativa aumentada. En conjunto, estos procesos están relacionados con el desarrollo y proliferación del meduloblastoma [97].

En contraste, algunos tipos de glioblastoma presentan una sobreexpresión de *miR-9*. El glioblastoma es el más común y agresivo tipo de cáncer cerebral que se presenta en la etapa adulta [98]. La expresión de altos niveles de *miR-9* también se presenta en células tumorales que adquieren características que las hacen similares a células tallo de cáncer (*cancer stem cells*) [99].

En el caso del glioblastoma, este tipo de células, se denominan células tallo de glioblastoma (GSC: *glioblastoma stem cells*). Las GSC tienen una alta capacidad proliferativa y para producir metástasis. Se ha demostrado, mediante cultivos primarios *in vitro*, que las GSC desarrollan fácilmente resistencia a radiación y al tratamiento con fármacos [100].

La reducción de la expresión de *miR-9* en cultivos primarios de células provenientes de glioblastomas se refleja en la pérdida de su capacidad de replicación, esto se debe a un aumento en la expresión del activador 1 de la transcripción de calmodulina (CAMTA1), un supresor de tumores cuyo mRNA posee en su 3'-UTR una secuencia blanco para miR-9 [99]. Adicionalmente, existen estudios que demuestran que miR-9* inhibe la expresión de *Sox2* (*Sry-box2: sex-determining region Y-box 2*), un factor de transcripción que favorece la proliferación y la resistencia a fármacos y radiación en las GSC [101].

Sólo en pocas ocasiones, ha sido posible identificar la causa de la sobreexpresión de miR-9 en carcinomas, *e. g.* en algunos casos de cáncer cervical se presenta el aumento del número de copias del gen *miR-9* [94], en algunas muestras de cáncer de mama se ha detectado que la sobreexpresión de *miR-9-3* se debe a un aumento en la expresión del oncogen *MYC* [93].

En lo general, se ha observado que miR-9 regula varios procesos relacionados con el surgimiento y desarrollo del cáncer como: proliferación celular [93], [96], migración [93], [95] e inflamación [92].

Otros tipos de cáncer que se presentan fuera del sistema nervioso y se caracterizan por tener niveles bajos de expresión de *miR-9* en comparación con el tejido sano circundante son: leucemia [102], cáncer

de pulmón [103] y de colón [104]. La implicación de miR-9 en la tumorigénesis y en otros procesos relacionados con el cáncer depende del tejido involucrado y el grado de progresión del mismo.

Recientemente, se ha documentado la relación entre miR-9 y las enfermedades neurodegenerativas [105]. La enfermedad de Huntington (HD: *Huntington's disease*) es autosómica dominante, y es causada por la inserción de tres nucleótidos iguales en el gen *huntingtina* (*Htt*). En la HD se altera el transcriptoma de algunas regiones del cerebro, esto se debe, a una actividad anormal del represor transcripcional REST [106]. En contraste con los portadores del gen silvestre *Htt*, los portadores del gen mutante *Htt* no mantienen a REST en el citoplasma, en cambio, este es translocado al núcleo, reprimiendo excesivamente a sus blancos. REST regula negativamente la expresión de *miR-9*, mientras que los mRNAs de REST y de su co-represor coREST son blancos de miR-9/9* [97], [107].

En los cerebros de los pacientes que padecen HD, la expresión de miR-9/9* decrece paulatinamente conforme avanza el grado de la enfermedad [107]. El bajo nivel de expresión de miR-9/9* que se presenta en los cerebros de las personas que padecen HD, puede deberse a la alta actividad de REST, esto, puede aumentar los niveles de las proteínas REST y coREST. Considerando el gran número de mRNAs blanco que posee miR-9, el bajo nivel de su expresión puede afectar profundamente el patrón de transcripción del genoma en las neuronas.

Se ha observado, que la desregulación de la expresión de *miR-9* también se presenta en otras patologías de tipo neurodegenerativo. Los cerebros de personas que presentan la enfermedad de Alzheimer expresan niveles bajos de *miR-9* [108]–[110]. Mientras que, la corteza de los cerebros de pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson expresa niveles altos de *miR-9* [111]. Adicionalmente, se ha reportado que la desregulación en la expresión de *miR-9* está relacionada con el desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica, una enfermedad neurodegenerativa que afecta la motoneurona [112].

MiR-9 tiene un nivel de expresión bajo en el cerebro de una cepa de ratones que se usa como modelo experimental de las enfermedades de la motoneurona, en donde, el daño es debido a la sobreexpresión de una proteína componente de neurofilamentos que es regulada a nivel de mRNA por miR-9. Cuando el nivel de expresión de *miR-9* se normaliza, se evita el daño [112].

Es necesario establecer el papel de miR-9 en el surgimiento, desarrollo y progresión de las enfermedades neurodegenerativas, de forma general y particular, para identificar las vías de señalización involucradas e identificar potenciales blancos terapéuticos.

De acuerdo a las bases de datos: miRanda [113], [114], miRDB [115], RNA22 [116] y TargetScan [71], [117]–[121]; el mRNA de la metaloproteinasa de matriz 14 (MMP-14: *matrix metalloproteinase 14*) es blanco de miR-9.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP: *matrix metalloproteinases*), también denominadas matrixinas, son endopeptidasas que se sintetizan en forma de zimógenos, contienen zinc y son dependientes de calcio. Típicamente las MMPs son capaces de degradar una gran cantidad de proteínas de la matriz extracelular, pero también pueden procesar otras biomoléculas [122].

Se sabe que, las MMPs están involucradas en procesos celulares como: proliferación celular, migración, adhesión, dispersión, diferenciación, angiogénesis, apoptosis y defensa. Las MMPs se distinguen de otras endopeptidasas porque poseen iones metálicos como cofactores, tienen capacidad para degradar componentes de la matriz extracelular y poseen un alto nivel de conservación evolutiva interespecífica [111].

La MMP 14 (MMP-14), también conocida como metaloproteinasa de membrana del tipo 1, facilita el remodelamiento y penetración de la matriz extracelular por parte de las células tumorales [123]. Se ha documentado que MMP-14 promueve la invasión tumoral funcionando como colagenasa pericelular y activadora de proMMP-2 (proMMP-2 → MMP-2). MMP-2, está a su vez relacionada con procesos de tumorogénesis, metástasis y angiogénesis [124], [125].

La línea celular SH-SY5Y proviene de una biopsia de tejido metastásico alojado en la médula ósea de una niña de 4 años cuyo tumor primario era un neuroblastoma [126]. Se obtuvo después de tres procesos de resiembra y selección artificial que dieron origen a cuatro líneas celulares (SK-N-SH → SH-SY → SH-SY5 → SH-SY5Y) [127]. Al crecer células SH-SY5Y en medio de cultivo enriquecido con ácido transretinoico (ATRA: *all-trans retinoic acid*), estas se diferencian, adquiriendo un fenotipo

similar al de las neuronas, y de acuerdo con ensayos *in vitro*, pierden su capacidad para migrar y proliferar [128]–[130].

En 2012, el grupo de Qiangsong Tong demostró experimentalmente que miR-9 regula negativamente la expresión de MMP-14 mediante la interacción con la 3'-UTR de su mRNA. En uno de sus experimentos, transfectaron la línea celular de neuroblastoma SHSY-5Y con el vector pPG-miR-9-EGFP, que codifica al pre-miR-9, observando que la expresión de MMP-14 disminuía a nivel de mRNA y proteína.

También realizaron un ensayo de gen reportero, para esto, clonaron la 3'-UTR presente en el mRNA de MMP-14 entre los sitios de restricción *XhoI* y *NotI* del vector reportero dual de luciferasa/renilla pmiR-RB-repor (RiboBio Co. Ltd.) para obtener el vector pmiR-RB-MMP-14-3'UTR.

La actividad de luciferasa/renilla disminuye significativamente cuando se transfectan las células SHSY-5Y que poseen el vector pmiR-RB-MMP-14-3'UTR con el precursor de miR-9 (pre-miR-9), lo que confirma la hipótesis de que miR-9 interactúa directamente con la 3'-UTR del mRNA de MMP-14 regulando negativamente su expresión [131].

En la sección de perspectivas (página 86), se sugiere un experimento para visualizar moléculas de miR-9 sobreexpresadas mediante el vector pPG-miR-9-EGFP en células HEK-293 vivas usando MBs y microscopia confocal, además uno, para visualizar miR-9 endógeno que se produce al someter células SHSY-5Y a estrés oxidante con H₂O₂.

De acuerdo a su biogénesis, miR-9 se produce a través de la vía canónica. En el apéndice B (página 91), se hace una descripción detallada del proceso de síntesis de los miRNAs canónicos.

3.3. MicroRNA-128.

El gen *mir-128* tiene patrones de expresión específicos de acuerdo al tejido y estadio de desarrollo, se expresa predominantemente en tejido nervioso, especialmente en neuronas y astrocitos [132]. Mir-128, es particularmente abundante en el hipocampo, tanto en cerebros de fetos como de adultos, así como en cerebros de personas que padecen Alzheimer [133].

Se ha demostrado fehacientemente que miR-128 es esencial para el desarrollo del sistema nervioso central, así como para el mantenimiento de sus funciones fisiológicas habituales [134]. Algunos tumores presentan una desregulación en la expresión de *miR-128*, esta puede detectarse tanto en el tejido tumoral como en la sangre circulante [135], [136].

MiR-128 pertenece a los miRNAs de tipo intrónico; también, denominados miRtrons. En humanos, es codificado por dos genes diferentes: *mir-128-1* y *mir-128-2*; antes, denominados *mir-128a* y *mir-128b*, respectivamente. Mir-128-1 está embebido en un intrón de *r3hdm1* (dominio R3H que contiene 1, *R3H domain containing 1*) y mir-128-2 en uno de los intrones de *rsc* (ARPP21, fosfoproteína de 21 kDa que es regulada por AMP cíclico). Los *loci* de *r3hdm1* y *rsc* son respectivamente 2q21.3 y 3p22.3 [137].

El procesamiento de los transcritos de los genes *mir-128-1* y *mir-128-2* producen miRNAs maduros con secuencias idénticas. Por otro lado, se sabe que la mayoría de los miRtrons dependen a nivel transcripcional y de procesamiento de su gen hospedero, ya que son procesados directamente del transcrito primario [138], Por lo anterior, es posible que hayan coevolucionado, lo que explica que estén conservados filogenéticamente entre especies, y su acción sea sinérgica o que se comporten como antagonistas el uno del otro [139], [140]. En el apéndice C (página 94), se hace una descripción detallada de la vía de biogénesis de los miRtrons.

Se ha demostrado que, sólo el 26% de los miRtrons de mamífero son transcritos mediante su propio promotor [141]. Monteys *et. al.* demostraron que el gen *mir-128-2* tiene en su extremo 5' un promotor para la RNAPol III, y que este le permite expresarse de forma independiente a *rsc*, su gen hospedero [142].

Muinos-Gimeno *et. al.*, demostraron que existen tres polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP: *single nucleotide polymorphism*) localizados en la región genómica correspondiente a *mir-128-1*→*r3hdm1* en seres humanos y que estos polimorfismos presentan una alta variabilidad dependiendo de la ubicación geográfica de las poblaciones de acuerdo a HapMap [143].

Se han cuantificado niveles bajos de miR-128 en tumores de neuroblastoma [136], [144]–[155] y en líneas celulares derivadas de esta neoplasia [156], [157]. Sin embargo, no se han realizado estudios

para determinar si este fenómeno, se debe a un bajo nivel de expresión, o bien, al incremento en la degradación del mismo. Es decir, a que la vida media de miR-128 sea corta.

La búsqueda de probables blancos para miR-128 mediante herramientas bioinformáticas *e. g.* TargetScan (<http://www.targetscan.org>) [70], [71], [117]–[120], arroja a los mRNAs de las proteínas DCX y Reelina como sus probables blancos.

La doblecortina (DCX), llamada también lisencefalina-X, es una proteína asociada a microtúbulos que es expresada por precursores de células neuronales y neuronas inmaduras ubicadas en las estructuras corticales de embriones y adultos. Es una importante reguladora de los procesos de migración y diferenciación de las mismas. Las células precursoras de neuronas expresan DCX mientras se dividen y las células hijas continúan expresándola por 2 ó 3 semanas hasta convertirse en neuronas maduras [90].

La reelina, es una glicoproteína de la matriz extracelular que regula la migración y posicionamiento de las células precursoras neuronales durante el desarrollo del cerebro, a través del control de la interacción entre células. La reelina, continua expresándose en el cerebro adulto para regular la plasticidad sináptica, promoviendo y enriqueciendo la potenciación a largo plazo [158]–[160]. También, estimula el desarrollo dendrítico [161] y de las espinas dendríticas [162]. Además, regula la migración de los neuroblastos en el cerebro adulto, desde sus lugares de origen en las zonas subventriculares y subgranulares hasta su ubicación definitiva. Sin embargo, la reelina no sólo se expresa en el cerebro, también lo hace en la médula espinal, sangre, así como en otros órganos y tejidos.

En 2009, el grupo de A. S. Ciafrè demostró que durante el proceso de diferenciación de las células SH-SY5Y en presencia de ATRA, estas aumentan la expresión de *miR-128*, como consecuencia, las proteínas DCX y Reelina (ambas reguladas por miR-128) disminuyen su expresión, resultando en la reducción de la migración de las células SH-SY5Y en ensayos *in vitro* [156].

Ciafrè y colaboradores, también demostraron que al transfectar células SH-SY5Y con un vector plasmídico para sobreexpresar miR-128 (Dpa-miR-128), disminuye la expresión de DCX y Reelina a nivel de mRNA y proteína.

Adicionalmente, construyeron un vector para un ensayo de gen reportero, el vector fue diseñado de tal forma, que el mRNA de la luciferasa que resulta después de la transcripción, cuenta con una 3'-UTR idéntica a la que portan los mRNAs de DCX y Reelina, como resultado se observó una disminución significativa en la actividad de luciferasa [78].

En la sección de perspectivas (página 86) se describe un experimento para visualizar moléculas de miR-128 sobreexpresados mediante el vector Dpa-miR-128 en células HEK-293 vivas, y otro para visualizar miR-128 endógenos a través de la estimulación de células SHSY-5Y mediante ATRA.

IV. FAROS MOLECULARES.

4.1. Definición y Características.

Los MBs son sondas conformadas por un oligonucleótido, típicamente, tienen un fluoróforo o reportero en su extremo 5' y un apagador de fluorescencia en su extremo 3' [163]. También, existen MBs con la configuración opuesta, *i. e.*, el fluoróforo en el extremo 3' y el apagador de fluorescencia en el extremo 5' [164].

Los MBs, tienen una estructura de tallo-asa, debido a que cuentan con secuencias complementarias (5 a 7 nucleótidos) que se hallan en los extremos del oligonucleótido (Figura 2(a)). La estructura tallo-asa permite que el fluoróforo se encuentre cerca del apagador (<10 nm), provocando que el apagador absorba la energía de fluorescencia del fluoróforo, fenómeno que se conoce como apagado de fluorescencia [163].

Cuando los MBs se encuentran en una solución, en ausencia de ácidos nucleicos que tengan secuencias complementarias a su asa (moléculas blanco); estos, permanecerán predominantemente en una conformación estructural de tallo-asa. Si se agregan moléculas blanco a la solución, los MBs las hibridarán, perdiendo su estructura de tallo-asa. En consecuencia, el fluoróforo y el apagador quedarán espacialmente lejos (>10 nm) y la energía de fluorescencia no podrá transferirse del primero al segundo (Figura 2(b)). Como resultado, la energía será emitida al medio y la intensidad de fluorescencia de la solución aumentará 10 veces o más (Figura 2(c)) [163].

Las sondas lineales sólo pueden estar de dos formas: libres o hibridadas a su blanco. Por otro lado, los MBs pueden presentarse en tres estados: libres en su conformación de tallo-asa, libres desestructurados (*random coil*) o hibridados a su blanco (Figura 2(b)). La conformación tallo-asa, compite con la del híbrido MB-blanco, lo que aumenta la especificidad, hasta el punto en el que, los MBs son capaces de diferenciar entre blancos perfectamente complementarios y blancos que poseen un solo nucleótido diferente. Un híbrido perfecto MB-blanco puede tener una T_M (*temperature of melting*, temperatura de fusión, aquella en la que la mitad de los MBs se encuentran hibridando a su blanco y la otra libres) hasta 13 ± 3 °C mayor que un híbrido con un desapareamiento de un sólo nucleótido [165]–[167].

Cuando una solución contiene al MB hibridado a su secuencia blanco y esta se calienta produciendo su disociación; el MB, adoptará predominantemente la conformación de tallo-asa, ya que se halla favorecida termodinámicamente por encima de la conformación desestructurada. Es debido a este fenómeno, que los MBs poseen una fluorescencia de fondo muy baja, casi despreciable [168].

La alta especificidad y baja señal de fondo que poseen los MBs, son las cualidades que los convierten en las sondas ideales para muchas técnicas de detección/cuantificación de ácidos nucleicos, tanto *in vitro* como en células vivas. Dichas técnicas son: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*) [169]–[171], detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP: *single nucleotide polymorphism*) mediante PCR en tiempo real [172]–[174], genotipificación de poblaciones [175]–[178], detección de mutaciones [179]–[181], monitoreo de degradación de ácidos nucleicos [182], [183], detección de células cancerosas [184]–[186], monitoreo de infecciones virales [187]–[189], así como la visualización de mRNA en células vivas durante diversos procesos [190], [191].

4.2. Estructura y Funcionamiento.

Los MBs tienen cinco componentes estructurales: un asa, un tallo, dos conectores, un fluoróforo o reportero y un apagador de fluorescencia (Figura 2(a)). El asa tiene la función de hibridar a la secuencia blanco, y junto con los nucleótidos que forman el tallo y los conectores, forman un puente de unión entre el fluoróforo y el apagador. El tallo permite que en ausencia de la secuencia blanco, el MB adquiera la conformación estructural de tallo-asa. Los conectores son los encargados de unir al fluoróforo y el apagador con los extremos del oligonucleótido. Mientras que el fluoróforo y el apagador forman un sistema de transducción de señales que se “prende” cuando está presente la secuencia blanco y se “apaga” en su ausencia [163].

Un MB típico, tiene un tallo con una longitud de 5 a 7 nucleótidos, un asa de 15 a 25 nucleótidos e hibrida a su blanco usando sólo la región del asa. Sin embargo, existen diseños alternos de MBs en los que se usa parcial o totalmente uno o ambos brazos del tallo para hibridar a la secuencia blanco [167].

Entre mayor es la proporción de nucleótidos que participan en la hibridación con respecto a la longitud total del MB, la formación y estabilidad del híbrido MB-blanco tenderá a estar termodinámicamente favorecida, por encima de que el MB se encuentre libre en su conformación de tallo-asa [192]. Por lo tanto, dos MBs con la misma longitud, pueden tener diferentes velocidades de hibridación, al poseer distinta cantidad de nucleótidos complementarios con su blanco.

El MB con la mayor cantidad de nucleótidos complementarios tendrá una mayor velocidad de hibridación, así la formación del híbrido MB-blanco estará favorecida termodinámicamente, por encima de que el MB permanezca libre en su conformación tallo-asa [192].

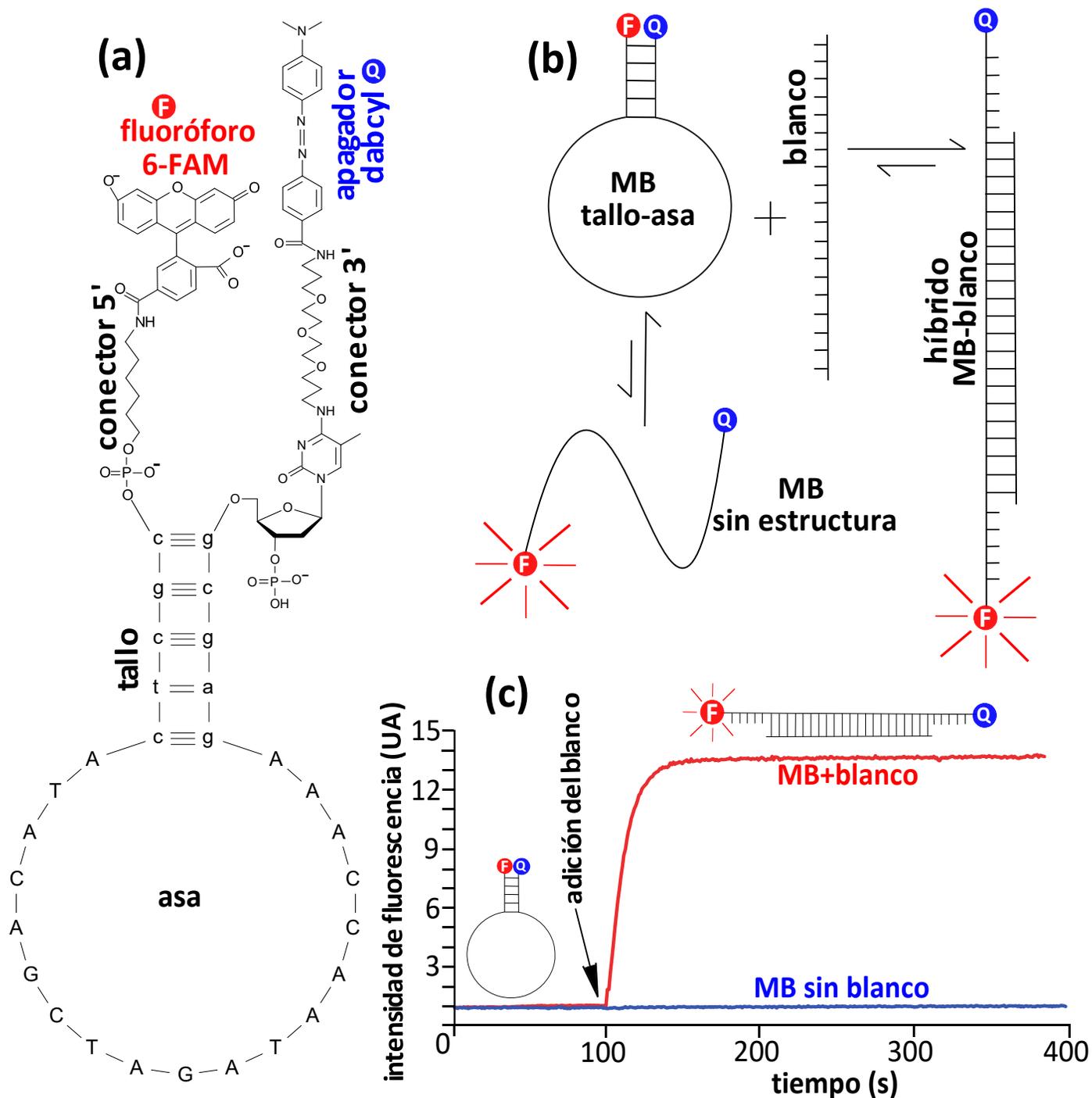


Figura 2. Estructura y función de los MBs.

(a) Estructura tallo-asa de un MB; se muestran sus cuatro componentes estructurales: fluoróforo (F, círculo rojo), apagador (Q, círculo azul), tallo (letras minúsculas) y asa (letras mayúsculas), la estructura química de los conectores fue dibujada de acuerdo a los fabricantes (*Integrated DNA Technologies*, Iowa, EE.UU.). (b) Mecanismo de funcionamiento; en una solución que contiene a un MB y a su blanco, este puede adoptar tres estados: libre en una conformación de tallo-asa, hibridado a su blanco o libre sin estructura (*random coil*). Las flechas más largas representan las direcciones de las cinéticas que están termodinámicamente favorecidas. (c) Intensidad de fluorescencia; la línea azul muestra la fluorescencia de un MB en solución sin blanco (fluorescencia basal, los MBs sin estructura contribuyen con la intensidad), la línea roja muestra una solución con un MB a la que se le agrega su blanco en el segundo 100, como respuesta se observa un aumento significativo en la fluorescencia, está alcanza una intensidad máxima de aproximadamente 13 veces la fluorescencia basal. UA, significa unidades arbitrarias. Modificado de [192].

En un MB, el tallo es un componente estructural que juega un papel preponderante para determinar la eficiencia de la transferencia energética fluoróforo→apagador. Mientras más estable es el tallo, más duradera será la interacción fluoróforo-apagador y la eficiencia en la transferencia de energía será mayor. Hay dos factores determinantes de la estabilidad del tallo: su longitud y su proporción de Cs y Gs. Ambos parámetros determinan la cantidad de puentes de hidrógeno que se forman entre los brazos que constituyen el tallo. El aumento de la longitud del tallo y/o de su proporción de Cs y Gs; provocará que este sea más estable, aumente la interacción fluoróforo-apagador, y así, la eficiencia de la transferencia de energía entre ellos, y que en consecuencia, disminuya la fluorescencia de fondo [165], [166].

Los conectores, son las partes del MB, que se encargan de unir a los extremos 5' y 3' del oligonucleótido con el fluoróforo y el apagador, respectivamente. Todas las compañías que sintetizan MBs usan conectores que consisten en cadenas de hidrocarburos con pocas insaturaciones, como es el caso de los MBs sintetizados por la compañía IDT (*integrated DNA technologies*) (Figura 2(a)).

4.3. Transferencia de Energía entre el Fluoróforo y el Apagador.

El MB, es *per se*, un sistema de transducción de señales con dos estados: (1) prendido, cuando hay una distancia mayor a 10 nm entre el fluoróforo y el apagador; o (2) apagado, cuando el fluoróforo y el apagador están cerca y puede haber transferencia energética entre ellos [193], [194]. La transferencia de energía sucede mediante dos mecanismos.

El primer mecanismo, es llamado transferencia dinámica, porque el fluoróforo y el apagador se encuentran en movimiento y en consecuencia los mismos están cerca, pero sin establecer contacto físico. La transferencia dinámica comprende dos procesos: la transferencia de la energía de resonancia de Förster (FRET: *Förster's resonance energy transfer*) y la transferencia tipo Dexter.

La FRET, requiere que exista un traslape al menos parcial de los espectros de emisión y absorción del fluoróforo y el apagador, respectivamente [195]; que estos, estén a una distancia menor a 100 Å (distancia de Förster) y que la orientación relativa que tienen los dipolos transitorios de cada componente sea adecuada para que ocurra la transferencia [196]. En la FRET, la tasa de transferencia cae a una razón de $1/R^6$, en donde R es la distancia entre fluoróforo y apagador [197].

La transferencia tipo Dexter, también llamada transferencia por colisión, depende del solapamiento espacial entre los orbitales moleculares del fluoróforo y el apagador [198]. En los fenómenos dinámicos, el FRET es un evento de mayor importancia que la transferencia de Dexter, ya que se transfiere una mayor cantidad de energía. En la transferencia tipo Dexter, la tasa de transferencia decae a una razón de e^{-kR} , en donde R es la distancia entre el fluoróforo y el apagador y k es una constante que es inversamente proporcional al radio atómico de van der Waals [199].

El segundo mecanismo es llamado transferencia estática o transferencia por contacto, debido a su característica más importante [200]. Ocurre a través del contacto físico entre el fluoróforo y el apagador, mediante interacciones de tipo electrostático e hidrofóbicas, así los electrones pueden transferirse del fluoróforo al apagador sin que se requiera de la irradiación de energía en forma de luz, pero si de calor [167], [201]. La transferencia estática es el mecanismo por el que se transfiere la mayor cantidad de energía entre el fluoróforo y el apagador de un MB.

Entre el 85 y el 97% de la energía que se transfiere entre el par fluoróforo-apagador de un MB, es a través mecanismos estáticos; el restante (3-15 %), es mediante FRET; mientras que la cantidad de energía que se transfiere por el proceso de Dexter, es mínima (<1 %) [167], [195].

En general, mientras mayor en fuerza y/o tiempo sea la interacción fluoróforo-apagador, la eficiencia de transferencia energética entre estos será mayor. La secuencia y longitud de los oligonucleótidos que componen a los MBs; la naturaleza química, longitud y estructura de los conectores que se encargan de unir al fluoróforo y al apagador con los extremos del oligonucleótido; así como, la estructura química de estos componentes, determinan la fuerza y en consecuencia la duración de la interacción entre estos grupos [192], [195], [201].

4.4. Fundamentos del Diseño.

Existen tres factores clave que deben ser considerados para el diseño de un MB: la eficiencia del apagado de la fluorescencia; la estructura de tallo-asa que forma cuando no está hibridando a su blanco, que depende de las secuencias de las regiones terminales 3' y 5' y del contenido de citosina y guanina del tallo; así como, la secuencia y estructura del blanco [192].

4.4.1. Elección del Par Fluoróforo-Apagador.

Considerando que, hasta un 97% de la transferencia de energía entre el par fluoróforo-apagador se da a través de mecanismos estáticos, y los mismos no dependen del traslapamiento de los espectros de emisión del fluoróforo y de absorción del apagador, es fácil saber por qué la principal característica que se toma en cuenta para la elección del apagador es su costo. Este, depende de la complejidad de su estructura molecular, y esta, determina el costo del proceso de síntesis.

Por su bajo costo, el ácido 4-([4'-(dimetilamino)fenil]azo) benzoico (Dabcyl) se usa prácticamente como un apagador universal para fluoróforos que emiten cerca del infrarrojo, su pico de absorción se ubica alrededor de los 475 nm.

Otros apagadores de fluorescencia que se usan comúnmente en la síntesis de MBs son los denominados *black hole quenchers 1, 2 y 3* (BHQ-1, BHQ-2 y BHQ-3); así como, *Iowa Black FQ y RQ*. La eficiencia de transferencia energética entre el par fluoróforo-apagador, también denominada eficiencia de apagado que tienen estos apagadores es alta (85-97%) [167], [195]. Estos apagadores pueden usarse como pares con diversos fluoróforos, entre ellos: Cy3, Cy5, CR-6G, 6-FAM, HEX, TAMRA, TET, etcétera (Tabla 1) [202].

Fluoróforo	Pico de Excitación (nm)	Pico de Emisión (nm)	Apagadores Compatibles
Cy3	550	605	BHQ-2 y Dabcyl
Cy5	640	675	BHQ-3 y Dabcyl
CR-6G	505	570	Dabcyl
6-FAM	484	525	Iowa Black-FQ, BHQ-1 y Dabcyl
HEX	525	554	Iowa Black-FQ, BHQ-1 y Dabcyl
TAMRA	555	605	Dabcyl
TET	490	535	Iowa Black-FQ, BHQ-1 y Dabcyl

Tabla 1. Pares de fluoróforos y apagadores.

Se muestra el pico de excitación y emisión de cada fluoróforo, así como los apagadores compatibles. Los valores de los picos de excitación y emisión de los fluoróforos fueron tomados de la referencia: E. McGown, M. Su, and R. Dennis, "Measurement of molecular beacons in the SPECTRAMax® GEMINI spectrofluorometer," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 75, no. 10, pp. 942–944, 2000.

Se ha reportado, que las guaninas (Gs) pueden utilizarse como apagadores de fluorescencia en los MBs, estos se conocen como MB apagados por Gs, o bien, MBs G-apagados [203], [204]. Las guaninas

actúan como apagadores cuando se colocan en el extremo opuesto a donde se encuentra el fluoróforo, pudiendo colocarse al ras o sobresaliendo (*overhang*) con respecto a la cadena complementaria.

Los MBs apagados por Gs que no poseen nucleótidos sobresalientes (al ras), presentan un incremento de sólo el 15% en la intensidad de su fluorescencia, entre cuando predomina su conformación tallo-asa (ausencia de su blanco) y cuando están hibridado a su blanco [205]. En caso de que el MB apagado por Gs se construya con dos guaninas sobresalientes, se observa una diferencia de intensidad de fluorescencia entre su estado hibridado y no hibridado de hasta 2 veces [206].

Las guaninas funcionan como apagadores para varios reporteros como: pireno, coumarina, acridona y 6-FAM. El usar guaninas como apagadores mejora el rendimiento en la síntesis de los MBs y además reduce significativamente su costo. Los MB apagados por Gs no han sido usados para ensayos en células vivas, este es un campo que permanece sin ser explorado. La estructura y función de los MBs apagados por guaninas son ampliamente discutidas en la referencia [207].

4.4.2. Parámetros Termodinámicos.

La hibridación entre una sonda y su blanco se debe al apareamiento de tipo Watson y Crick que se da entre sus bases nitrogenadas (A=T y G=C). Las sondas lineales pueden estar libres o hibridadas a su blanco, mientras que, los MBs pueden estar de tres formas: libres con una conformación de tallo-asa, libres desestructurados, o hibridados a su blanco (Figura 2(b)). En términos de energía libre de Gibbs (ΔG°), un MB que no está hibridado a su blanco, es más estable cuando está en su conformación de tallo-asa que cuando se encuentra desestructurado (*random coil*). Esto, indica que cuando la temperatura aumenta y sobreviene la disociación MB-blanco (desnaturalización térmica), el MB libre adoptará preferentemente la conformación tallo-asa sobre la conformación desestructurada. Este fenómeno explica la baja fluorescencia de fondo y alta proporción señal/fondo que tienen los MBs en comparación con las sondas lineales [208]–[210].

Existe evidencia experimental que consiste en ensayos de desnaturalización térmica, así como modelos matemáticos binarios o de estado estacionario (sólo consideran el inicio y el final) de la cinética de hibridación, que apoyan el hecho de que un híbrido MB-blanco totalmente complementarios entre sí

tengan una T_M 13 ± 3 °C mayor que un híbrido con la misma longitud pero con el desapareamiento de una sola base [166], [167], [172].

La capacidad que tiene una sonda para discriminar entre un blanco perfectamente complementario y uno con el desapareamiento de una sola base se llama potencial de selectividad, y su magnitud se determina por la diferencia de las temperaturas en las fases de transición [168].

La estabilidad del tallo de un MB aumenta proporcional y directamente con su longitud y con su contenido de Cs y Gs; la selectividad aumenta de la misma manera, en función de estos parámetros [165]–[167]. Mientras más alta sea la selectividad del MB, mayor deberá ser la fuerza que produce la interacción de la región del asa con su blanco para romper los puentes de hidrógeno del tallo y hacer que se produzca la hibridación [192]. La fuerza de la interacción asa-blanco de un blanco totalmente complementario, es significativamente mayor que la fuerza de un blanco con el desapareamiento de una sola base. De esta forma, un MB que se encuentre en una solución que contenga a ambos tipos de blancos, es capaz de discriminarlos y sólo hibridar al que es 100% complementario [165]–[167], [192].

Se debe tener precaución en el diseño; toda vez que, MBs con un tallo demasiado estable, pueden no hibridar a su blanco, porque la fuerza de interacción entre el asa del MB y el blanco no es suficiente para romper todos los puentes de hidrógeno que existen en el tallo. En particular, cuando esto debe suceder a temperaturas fisiológicas, como en los ensayos en células vivas. Entonces, debe mantenerse un equilibrio entre la estabilidad del tallo y la fuerza que se genera de la interacción del asa del MB y el blanco, para que los MBs puedan usarse exitosamente y con un desempeño adecuado para ensayos en células vivas [192]. En la siguiente sección, se hace una descripción detallada de los criterios que se deben tomar en cuenta para lograr un diseño que cumpla los requisitos de estabilidad, selectividad y velocidad de hibridación que se requiere para realizar ensayos en células vivas.

4.4.3. Balance entre Selectividad y Velocidad de Hibridación.

Como se mencionó con anterioridad, la principal ventaja que ofrecen los MBs sobre las sondas lineales es su alta selectividad de blanco. Esta es, directamente proporcional a la estabilidad que posee la estructura tallo-asa, que a su vez, depende principalmente de la estabilidad del tallo. La estabilidad de la estructura tallo-asa puede incrementarse al aumentar la longitud del tallo y/o su contenido de citosinas y guaninas.

Desafortunadamente, el incremento de la estabilidad del tallo y con esto el de la selectividad, disminuye la velocidad de hibridación MB-blanco. Para un determinado MB, la velocidad de hibridación disminuye en uno o dos órdenes de magnitud al pasar de tener un tallo de dos nucleótidos a uno de cuatro [166]. Un tallo más corto produce estructuras tallo-asa menos estables; en consecuencia, reduce la proporción señal/fondo y la selectividad, pero aumenta la velocidad de hibridación.

El óptimo diseño de un tallo, requiere que se determine el balance entre selectividad y velocidad de hibridación que es necesario para un ensayo en específico, primero mediante su predicción *in silico* [211] y después de manera experimental [165], [166]. Un MB típico, tiene un tallo con una longitud de 5-7 nucleótidos y un asa de 15 a 25 nucleótidos e hibrida a su blanco sólo con la región del asa. Con el objetivo de incrementar la velocidad de hibridación en MBs con tallos altamente estables, se puede aumentar la cantidad de nucleótidos que hibridan al blanco aumentando la longitud del asa.

Otra opción que permite aumentar la cantidad de nucleótidos del MB que hibridan al blanco sin aumentar su longitud total, consiste en usar total (Figura 3(f) y (g)) [167] o parcialmente uno de los brazos que conforman al tallo (Figura 3(c) y(d)), parcialmente ambos (Figura (e)), o incluso cuando las estructuras primaria y secundaria del blanco lo permiten se puede usar ambos brazos totalmente (Figura 3(h)) [192].

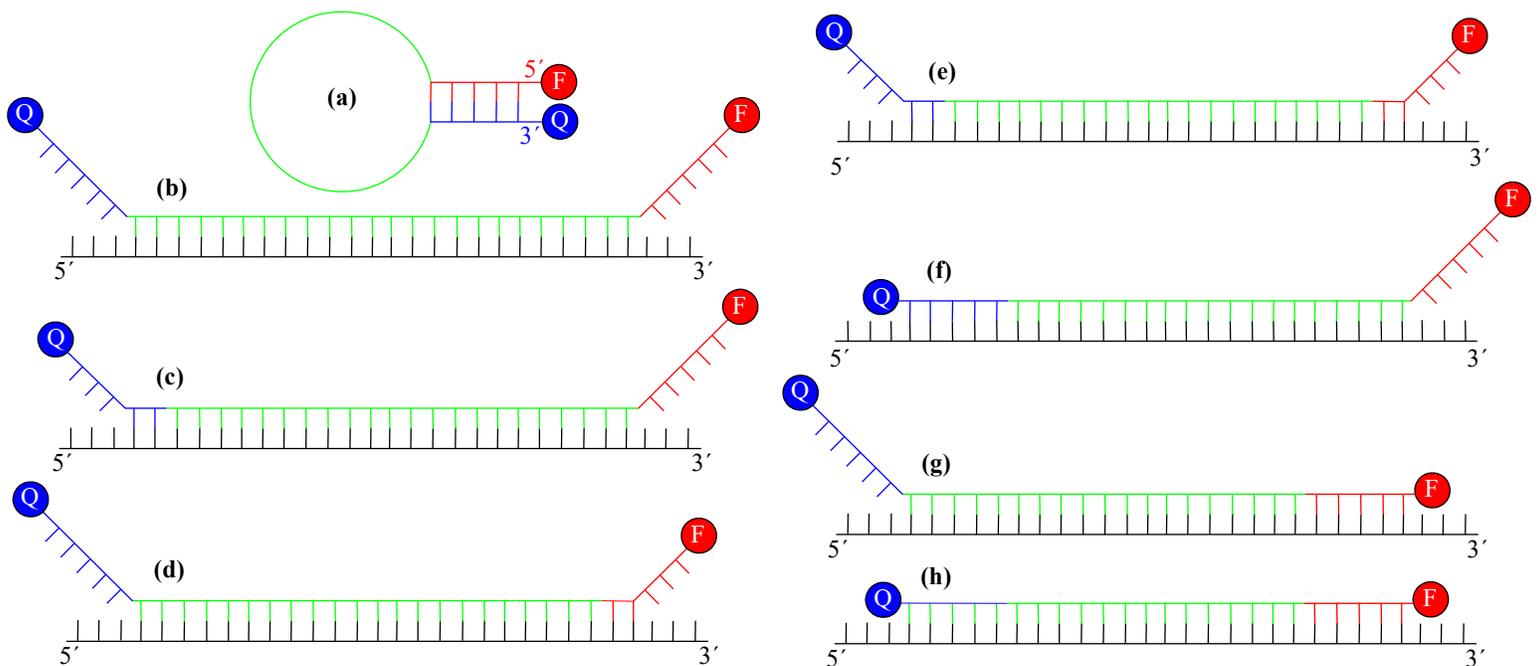


Figura 3. Formas en las que un MB puede hibridar a su blanco.

En todas las estructuras; el asa es **verde brillante**; el brazo 3', **azul**; y el brazo 5', **rojo**. El fluoróforo (F) está representado con un círculo **rojo** y el apagador de fluorescencia (Q) con uno **azul**. El blanco al que hibrida el MB, es el segmento negro. (a) Un MB con un tallo de 5 nucleótidos en su conformación de tallo-asa. (b) Un MB convencional, que hibrida a su blanco usando sólo el asa. (c)-(g) Un MB puede usar para hibridar a su blanco adicionalmente al asa: (c) parcialmente su brazo 3' (2 nucleótidos), (d) parcialmente su brazo 5' (2 nucleótidos), (e) parcialmente ambos brazos, (f) totalmente su brazo 3', (g) la totalidad de su brazo 5', (h) la totalidad de ambos brazos (3' y 5').

Se denominan MBs de tallo compartido (*shared stem molecular beacons*) (Figura 3(f) y 3(g)) a aquellos que usan completamente uno de los brazos que componen al tallo para hibridar a su secuencia blanco [167]. Para una secuencia blanco dada, un MB de tallo compartido presenta una velocidad de hibridación alta en comparación con un MB que posee el mismo número de nucleótidos complementarios pero que sólo usa el asa para hibridar a su blanco (convencional), y que por lo tanto, es más largo. Esto se debe a que, la velocidad de hibridación es directamente proporcional al número de nucleótidos complementarios e inversamente proporcional a la longitud del MB, tal como lo muestra la siguiente expresión matemática (Ecuación 1) [192].

$$\text{Velocidad de Hibridación} \propto \frac{\text{Nucleótidos Complementarios}}{\text{Longitud del MB}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Un MB diseñado para experimentos en células vivas debe tener la capacidad de discriminar a 37° C entre un blanco con el que híbrida perfectamente y uno que tiene un desapareamiento en una sola base. Esto implica que, la T_M que el MB tiene con el blanco que posee el desapareamiento de un solo nucleótido debe ser menor que 37° C, mientras que la T_M del MB con el blanco que aparea perfectamente debe de ser superior a 37° C (Figura 4). Estos requisitos deben ser cubiertos durante el diseño del MB, tomando en cuenta la estabilidad del tallo, la longitud del asa y de las regiones que participan en la hibridación MB-blanco. Sí el diseño considera valores de T_M muy cercanos, será imposible que el MB discrimine entre los dos blancos [192].

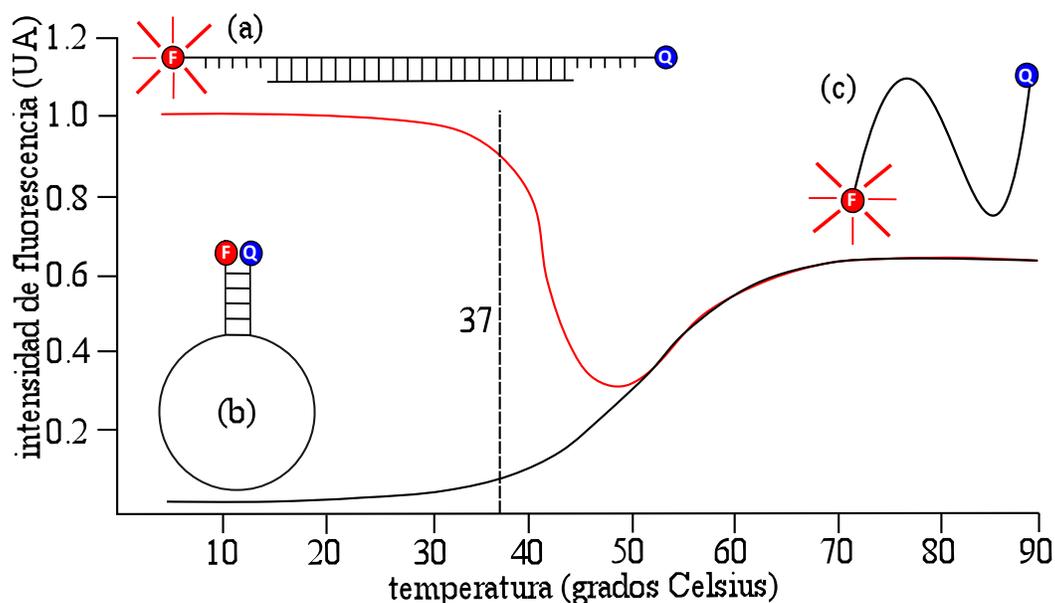


Figura 4. Desnaturalización térmica de un MB.

(a) Un híbrido MB-blanco es sometido a un aumento gradual de temperatura (4→90 °C), a los 50 °C sobreviene la desnaturalización. (b) Un MB es sometido al aumento de temperatura (4→90 °C), como resultado pierde su conformación tallo-asa. En ambos casos ((a) y (b)), el MB termina desestructurado (*random coil*) (c) observándose niveles altos de fluorescencia.

4.5. Modificaciones Químicas.

Cuando un MB se usa para ensayos en células vivas, este debe cumplir con ciertos requisitos en términos de sensibilidad y selectividad para evitar señales falso positivas debidas a interacciones no específicas, como las que pueden darse entre MB y proteínas [212]–[214], o la digestión de la sonda por nucleasas [183], [215]. Es fácil predecir, que la digestión de un MB, derivará en la separación del fluoróforo y el apagador, produciendo una señal que no resultará de la interacción del MB con su secuencia blanco. De forma similar, si la interacción MB-proteína afecta la eficiencia del apagador y esto produce la emisión de fluorescencia, la misma no reflejará la interacción del MB con su blanco. Con el objeto de producir MBs resistentes a nucleasas y que no interactúen con proteínas u otras biomoléculas produciendo falsos positivos, se han usando nucleótidos modificados químicamente para sintetizar MBs mejorados.

4.5.1. MBs con Selectividad Aumentada.

En las células, algunas especies de RNA se presentan en un número muy bajo; en particular, las de RNA no codificante, como los miRNAs. Por lo tanto, su detección es un reto, más aún, cuando se desea hacerlo en células vivas a temperaturas fisiológicas. Los MBs representan una opción para este propósito, es deseable que los mismos tengan una alta sensibilidad y una alta proporción señal/fondo. Es posible lograr esto, mediante modificaciones químicas, que permiten aumentar la eficiencia del apagado de fluorescencia o incrementar la intensidad de la fluorescencia que emite el fluoróforo después de que el MB hibrida a su blanco.

Como se mencionó antes, la cantidad de energía de fluorescencia que se transfiere del fluoróforo al apagador mediante mecanismos estáticos se sitúa entre el 85 y el 97% [167], [195], [216]. Al incrementar la eficiencia del apagado de fluorescencia, necesariamente se incrementará la proporción señal/fondo. El incremento del rango dinámico, aumenta a su vez la diferencia de la intensidad de fluorescencia emitida por una solución que contiene un MB en presencia de blancos perfectamente complementarios, en comparación con la que emite una solución equivalente de MB en presencia de blancos con el desapareamiento de sólo una base.

Recientemente, se ha desarrollado una estrategia para incrementar la eficiencia del apagado de fluorescencia, la misma, consiste en colocar varias moléculas de apagador en un mismo MB, a esto se le conoce como superapagado [217]. Se han sintetizado MBs que tienen 6-FAM como fluoróforo en el extremo 3' y dos o tres moléculas de Dabcyl como apagadores en el extremo 5' (Figura 5).

Esta estrategia, resulta en el incremento de la eficiencia de apagado, de 92.95% para los MBs que tienen una molécula de Dabcyl, a 98.75% cuando poseen dos, y 99.7% si cuentan con tres. El incremento en la eficiencia de apagado, provoca el aumento de la intensidad de señal. Mientras que el MB que posee un Dabcyl tiene una intensidad de señal de 14 unidades, el que cuenta con dos llega a 80 y el que tiene tres alcanza las 320 unidades (Figura 5) [217], [218].

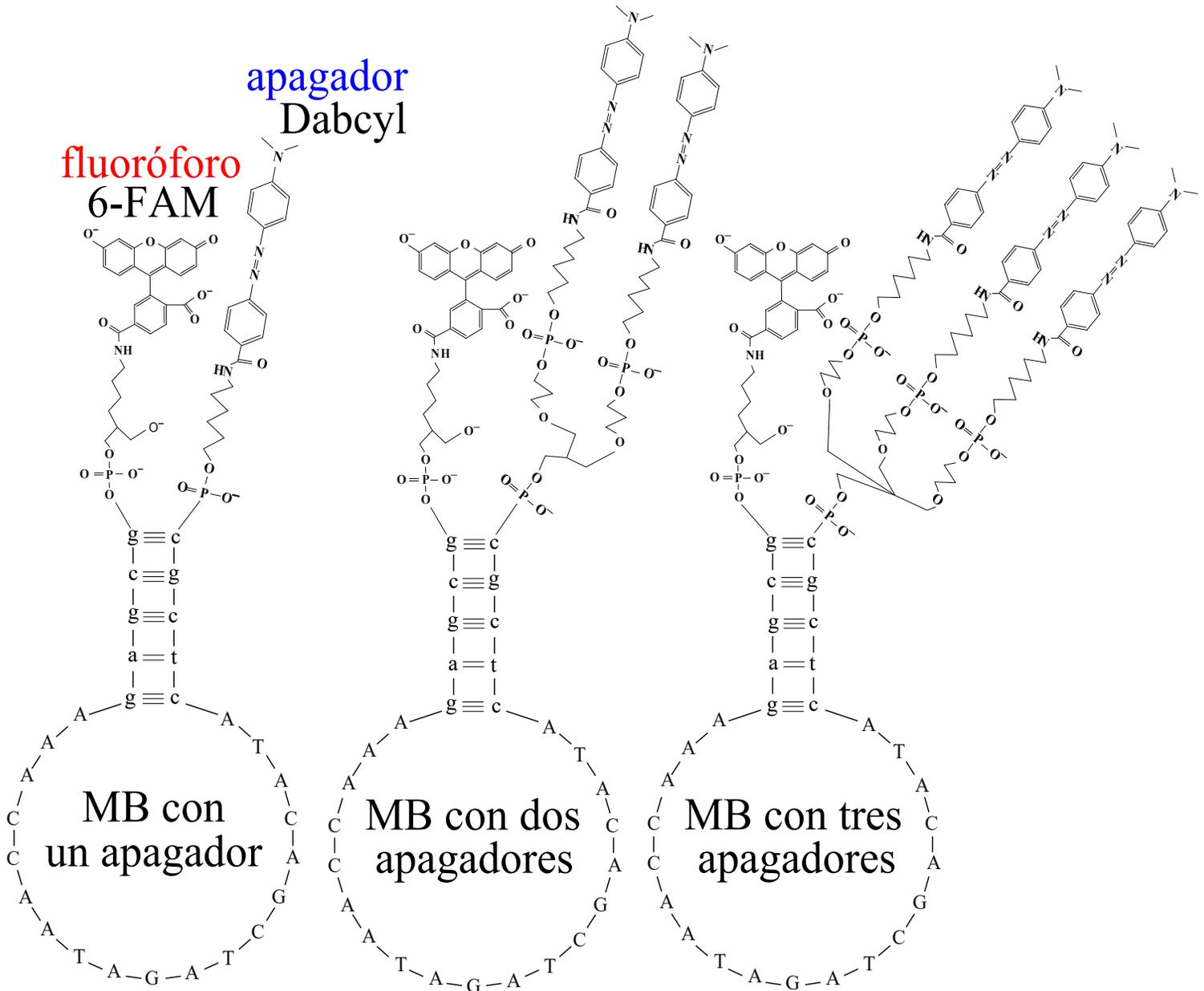


Figura 5. MBs con superapagado.

Estructuras correspondientes, de izquierda a derecha, a un MB con un solo apagador de fluorescencia (Dabcyl), dos y tres apagadores. Las estructuras están representadas en su estado oxidado que son como se presentan a pH fisiológico (7.3). Las estructuras de los conectores, así como de Dabcyl y 6-FAM corresponden con la referencia [281].

La mejora en el desempeño de los MBs, permite incrementar significativamente las posibilidades de detectar moléculas de RNA que se encuentran en cantidades muy pequeñas, como es el caso de los miRNAs.

Cabe señalar, que el uso de tres moléculas de Dabcyl en un mismo MB hace que también aumenten las interacciones hidrofóbicas fluoróforo-apagador, lo que se refleja en el aumento de la T_M del tallo en 4° C en comparación con MBs que sólo tienen una molécula de Dabcyl como apagador y que tienen una secuencia idéntica. El incremento de la T_M puede mejorar la capacidad que tiene el MB para discriminar entre blancos complementarios y aquellos que poseen una sola base desapareada [218].

Debido a que el apagado de la fluorescencia se basa en procesos dinámicos y estáticos, y estos dependen de las distancias moleculares y la orientación espacial (momento dipolar), tener varios apagadores aumenta las probabilidades de que uno de ellos tenga la posición adecuada respecto al fluoróforo en un momento dado para recibir la transferencia de la energía del fluoróforo, explicando así la alta eficiencia del superapagado [218].

Es posible emplear algunos fluoróforos poliméricos para incrementar la intensidad de la señal de fluorescencia y también la sensibilidad de los MBs. Los poli(fenileno etinileno)s (PPE: *poly(phenylene ethynylene)s*) son una familia de fluoróforos poliméricos solubles en agua y con una alta eficiencia cuántica para ceder o aceptar electrones [218].

Recientemente, se ha descrito que es posible enlazar PPEs directamente a oligonucleótidos mediante una reacción de polimerización [219]. Los PPEs tienen una intensidad de fluorescencia 20 veces mayor que la que posee Cy3 y más de seis veces mayor que la que se observa para Alexa Fluor 488, el fluoróforo con mayor intensidad de fluorescencia entre los que se usan comercialmente en la síntesis de MBs. Adicionalmente, la intensidad de fluorescencia que presenta una cadena sencilla de PPEs es alrededor del 75% de la intensidad que tiene un punto cuántico (QD: *quantum dot*).

El apagador de fluorescencia Dabcyl, presenta una buena eficiencia cuando se usa como par de los PPEs, pero sí se usan arreglos de varias moléculas de Dabcyl (superapagado), es posible mejorar el desempeño de los MBs hasta un punto en el que se facilite la visualización en células vivas de moléculas de RNA muy poco abundantes como los miRNAs.

4.5.2. MBs Resistentes a Nucleasas.

Las células usan nucleasas para el catabolismo de los ácidos nucleicos y el reuso de los nucleótidos para la síntesis de nuevas moléculas de DNA y RNA, también son usadas como mecanismo de defensa contra ácidos nucleicos extraños y para la degradación de ácidos nucleicos dañados. Desafortunadamente las nucleasas degradan a los MBs [183], [215], esto es un problema cuando se pretende visualizar moléculas de RNA en células vivas usando MBs.

Se ha observado, que sólo 45 minutos después de introducir MBs en una célula se da un aumento en la fluorescencia, aun cuando la célula no tenga ácidos nucleicos con secuencias blanco para el MB en cuestión [220], las observaciones indican que este incremento en la fluorescencia se debe a la degradación de los MBs por nucleasas presentes en el citoplasma.

Para que las nucleasas no reconozcan a los MBs y estos no sean degradados dentro de las células, se han incorporado nucleótidos modificados estructuralmente en las cadenas de oligonucleótidos que componen a los MBs (Figura 6). Estos incluyen: nucleótidos 2'-O-metilados (2'OME) (Figura 6(c)) [221]–[223], derivados de fosforotioato (PS) (Figura 6(d)) [224], [225], ácidos nucleicos cerrados (LNA: *locked nucleic acids*) (Figura 6(e)) [226], y ácidos nucleicos peptídicos (PNA: *peptide nucleic acids*) (Figura 6(f)) [227]–[229].

Los MBs sintetizados con nucleótidos 2'-O-metilados tienen una alta resistencia a nucleasas, tanto a DNAasas como a RNAasas [221]. Sin embargo, interactúan fuertemente y de forma inespecífica con proteínas [212]–[214], esto hace que se produzcan falsos positivos. Además tienden a acumularse en el núcleo [201] y la mitocondria [230]. El fenómeno sólo se ha reportado cuando se usan fluoróforos derivados de cianina (*i. e.* Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7). Con la finalidad de evitar su acumulación en el núcleo, se ha colocado un QD unido al brazo 3' de MBs construidos con nucleótidos 2'-O-metilados usando bioina-dT como conector [231].

Los MBs que incorporan PNAs muestran una alta afinidad tanto por moléculas de DNA como de RNA, así como una alta resistencia a la acción de las nucleasas. Sin embargo, su reducida solubilidad y su ocasional agregación limitan su uso para ensayos en células vivas.

Los LNAs tienen una unidad de furanosa bicíclica (con un puente de metileno 2'-O, 4'-C) cuya conformación es mimética con la ribosa del RNA. Los MBs que poseen LNAs tienen una afinidad más alta por su blanco que la de los MBs de DNA, sin embargo, su velocidad de hibridación es menor. Los MBs quiméricos, poseen algunos nucleótidos sin modificar y otros LNAs, son resistentes a nucleasas y presentan una selectividad aumentada con respecto a los MB hechos sólo con nucleótidos sin modificar.

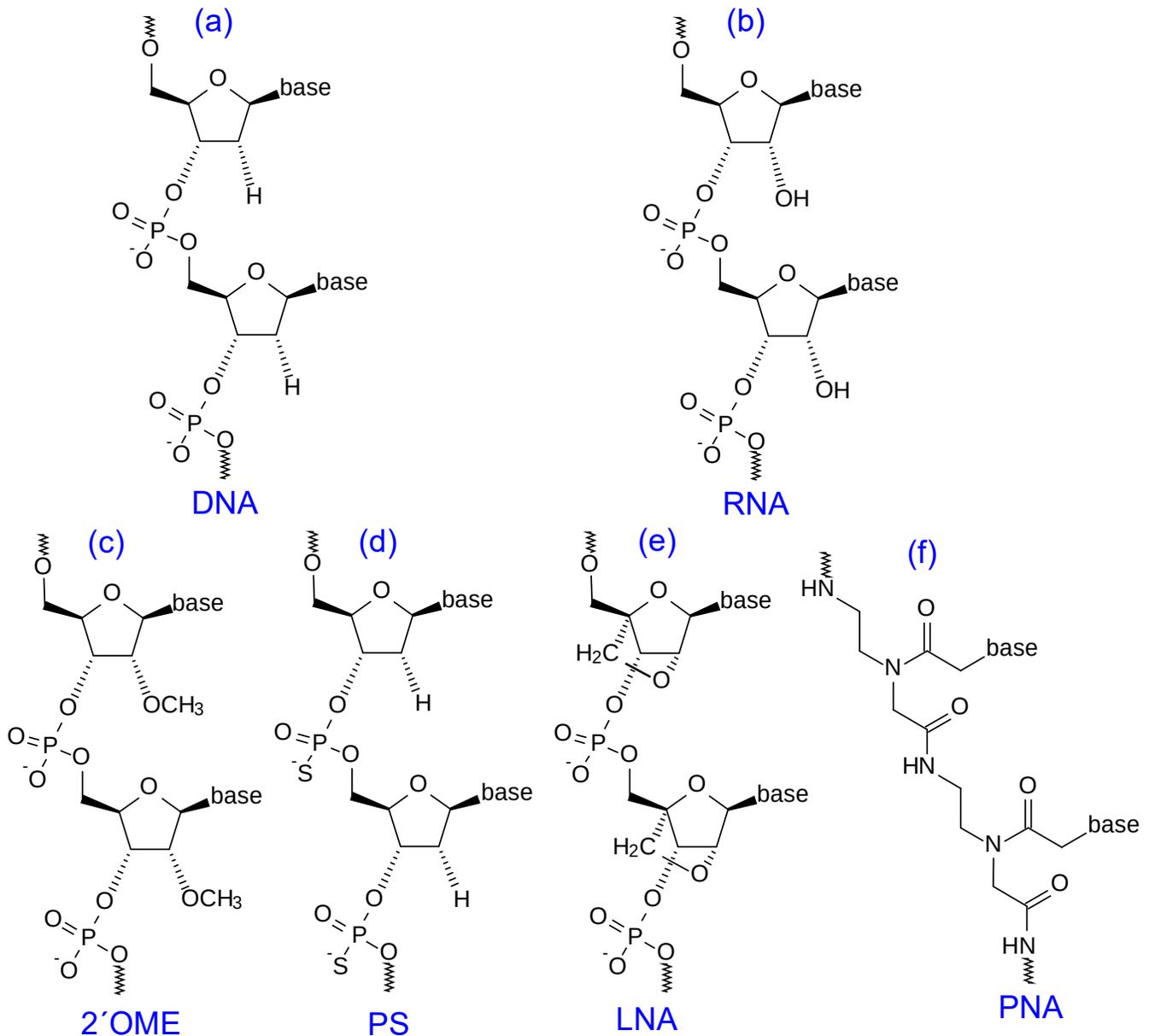


Figura 6. Estructuras de nucleótidos resistentes a nucleasas.

(a) y (b) Estructuras del DNA y RNA, respectivamente. (c) nucleótidos oxo-metilados en su posición 2' (2'OME), (d) derivados de fosfortioato (PS), (e) ácidos nucleicos cerrados (LNA), (f) ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

Es importante la proporción de *nucleótidos de LNA/nucleótidos de DNA* que tiene un MB quimérico; porque cuando esta disminuye, también lo hace la resistencia a la degradación por nucleasas; por el contrario, la velocidad de hibridación aumenta [226]. También es necesario, determinar si es conveniente o no incluir nucleótidos de LNA en el tallo; al incluirlos, aumenta la estabilidad del mismo y así su selectividad, pero su T_M y velocidad de hibridación MB-blanco disminuyen.

Un diseño de un MB con un tallo compartido de cuatro bases, una proporción de *nucleótidos de LNA/nucleótidos sin modificar* de 1:1, ha sido sugerido para experimentos en células vivas [232]. Con este diseño se obtiene una velocidad de hibridación razonable, una alta resistencia a la actividad de nucleasas y un bajo nivel de interacción con proteínas.

Una estrategia novedosa para evitar que el MB interactúe de forma inespecífica con ácidos nucleicos o sucedan hibridaciones MB-MB mediante el fenómeno conocido como extremos pegajosos (*sticky ends*) (Figura 7), consiste en el uso de L-DNA (el isómero especular del D-DNA) en la región del tallo [233], [234]. El D-DNA y el L-DNA no pueden hibridarse entre sí. El D-DNA forma una doble hélice dextrógira a diferencia de la conformación levógira adoptada por el L-DNA, de esta manera, existe una incompatibilidad topológica y la hibridación es imposible.

Esta estrategia incrementa la estabilidad del tallo y en consecuencia la selectividad del MB. Cabe aclarar, que usando L-DNA en el tallo no es posible diseñar MBs que hibriden a su blanco con el asa y tallo (*shared-stem molecular beacons*), ya que ninguno de los dos brazos de L-DNA puede hibridar al blanco de D-DNA.

4.6. Métodos para Introducir MBs en Células Vivas.

La introducción de MBs en células vivas no es una tarea sencilla. El método usado debe ser capaz de introducir la cantidad necesaria de MBs para detectar unas pocas moléculas de RNA, puesto que, algunos tipos de RNA se presentan en número tan bajos como 1000 copias por célula, este es el caso de algunos RNA no codificantes como los miRNAs. Para un experimento determinado, debe analizarse cuál es el método más adecuado en función de su dificultad, costo y eficiencia, después es necesario probarlo y optimizarlo, o en caso de que no funcione buscar alternativas.

Los métodos que se han usado para introducir MBs en células vivas pueden clasificarse en dos grupos: físicos y químicos. Los físicos, incluyen la biobalística, microinyección y electroporación; mientras que dentro de los químicos, se contempla a la transfección, permeabilización de la membrana celular mediante toxinas y el uso de MB ligados a péptidos capaces de penetrar las células.

La mayoría de los agentes transfectantes producen patrones de fluorescencia puntuados debido al paso de los MBs por la vía endocítica y su consecuente degradación. Por esto, es deseable un método de introducción capaz de evadir esta vía, *e. g.* microinyección, permeabilización de la membrana celular mediante toxinas, MBs conjugados con péptidos capaces de penetrar células, electroporación/microporación o biobalística.

Existen métodos para introducir ácidos nucleicos en células vivas, como la sonoporación y los polímeros catiónicos, que no han sido usados para MBs. Es importante, determinar si estos son adecuados para ser usados para MBs, así como conocer su eficiencia.

En la siguiente sección, se discute la permeabilización de membranas mediante toxinas, en particular, mediante streptolisina tipo O (SLO). Para una revisión amplia de técnicas de introducción de MB en células vivas por favor diríjase al apéndice D (página 97).

4.6.1. Permeabilización de la Membrana Celular Mediante Toxinas.

Es un método no endocítico y reversible que consiste en la permeabilización de la membrana celular mediante toxinas. La estreptolisina tipo O (SLO) es una toxina bacteriana producida por una cepa

hemolítica de *Streptococcus pyogenes* que tiene la capacidad de formar poros en la membrana celular a través de los cuales pueden pasar los MBs [235], [236].

Una molécula de SLO (monómero) se une al colesterol que se encuentra en la membrana celular, después, varias moléculas se oligomerizan para formar un anillo, produciendo un poro transitorio de entre 25 y 30 nm en la membrana de la célula.

La permeabilización de la membrana celular debe llevarse a cabo en medio de cultivo libre de suero, después de la permeabilización y la entrada de los MBs, es posible revertir el efecto de la SLO usando medio de cultivo con suero [236], [237].

Debido a que cada línea celular posee membranas con un contenido de colesterol diferente, el proceso de permeabilización debe ser optimizado para cada línea o tipo celular, probando la entrada de MBs a diferentes temperaturas, concentraciones de SLO, número de células y tiempos de incubación.

Para determinar la eficiencia con la que un MB dado entra en una línea o tipo celular a través de los poros formados por SLO, se pueden usar soluciones que contengan híbridos MB-oligonucleótido blanco, otra opción, es transfectar células con blancos sintéticos y posteriormente introducir los MBs mediante SLO, monitoreando los procesos en tiempo real.

4.7. Ensayos con MBs en Células Vivas para Visualizar RNAs.

A la fecha, se han usado MBs como herramienta para visualizar diversas especies de RNAs en células vivas en diferentes ensayos. Conforme el tiempo ha transcurrido, los protocolos han sido modificados y adecuados con el fin de obtener los mejores resultados para cada especie de RNA. Esto ha permitido monitorear en tiempo real los procesos en los que las diferentes especies de RNA participan. En esta sección, se describen los trabajos más representativos que se han realizado en este campo.

4.7.1. Visualizando mRNAs.

Se han usado MBs para visualizar mRNAs en células vivas con buenos resultados [238]. Los mRNAs se caracterizan por estar presentes en las células en concentraciones relativamente altas, en comparación con las especies de RNA no codificantes. Además, son mucho más largos que los miRNAs y por lo tanto, presentan más opciones para la elección de una secuencia blanco.

Los MBs usados para detectar mRNAs en células vivas deben de estar diseñados adecuadamente. Para esto, deben considerarse todos los factores que pueden afectar el proceso de hibridación. Es necesario, predecir y analizar las estructuras secundaria y terciaria del mRNA, con la finalidad de determinar cuál es la mejor región para que el MB hibride. Esto, se hace con software bioinformático [239]–[241], como consecuencia es posible que las estructuras predichas no representen a las que ocurren *in vivo*.

En general, se asume que las mejores regiones del mRNA para ser usadas como blanco, son aquellas en las que no existen interacciones intracatenarias y que por lo tanto están accesibles para las sondas. Es decir, no tienen estructura secundaria o bien que esta es débil. Cuando las secuencias blanco se encuentran en regiones que tienen largas interacciones intracatenarias, y como consecuencia, una estructura secundaria y/o terciaria fuerte; se dificulta e incluso, se bloquea el acceso de los MBs a su secuencia blanco, y así su hibridación. Esto, es particularmente importante para los ensayos en células vivas, ya que se llevan a cabo en condiciones fisiológicas.

También, debe considerarse que la secuencia blanco elegida, no coincida con las presentes en otras moléculas de ácidos nucleicos que existan en la misma célula. Esto puede analizarse con herramientas como el BLAST (*basic local alignment search tool*) [242]. Debe hacerse una búsqueda de la secuencia en cuestión en las bases de datos disponibles, y asegurarse de que no existan secuencias idénticas en otras moléculas de ácidos nucleicos (DNA o RNA) presentes en el genoma de la célula en la que se va a realizar el ensayo.

Se ha diseñado una estrategia novedosa para aumentar la especificidad de los ensayos, asegurando de esta forma la identidad del mRNA hibridado y detectado. Esta consiste en el uso de dos MBs con tallo compartido (*shared stem*), uno que hibrida usando el brazo 3' y el otro con el brazo 5', ambos deben hibridar en posiciones adyacentes, de tal forma que el fluoróforo colocado en el extremo 5' del primer MB se posicione espacialmente cerca del fluoróforo colocado en el extremo 3' del segundo MB (Figura 8(a)) [164], [243]. Estos fluoróforos deben ser preferentemente un par FRET, pues aún cuando existen otros procesos de transferencia de energía, el hecho de que se traslape el espectro de emisión del primer fluoróforo con el espectro de absorción del segundo hace que la transferencia sea óptima.

El hecho de que los tallos sean compartidos reduce los grados de libertad del movimiento de los fluoróforos, lo que incrementa la eficiencia de la transferencia energética entre ellos, sobre todo a través de mecanismos estáticos. Por otro lado, al usar dos MBs se reduce drásticamente la posibilidad de que ocurran falsos positivos, ya que el hecho de tener dos sondas que hibridan simultáneamente a un mismo blanco aumenta la longitud de la secuencia que debe reconocerse (la suma de los nucleótidos que son hibridados por los dos MBs), por lo tanto, la posibilidad de que exista otro ácido nucleico con la misma secuencia que se desea detectar es prácticamente de cero.

Debe considerarse en el análisis bioinformático de las estructuras secundaria y terciaria del mRNA, que para este ensayo, la región que hibridarán los dos MBs es aproximadamente el doble que la usada en un ensayo con sólo un MB. Así también, la región con estructura débil y accesible para hibridarse, debe ser mayor en esa misma proporción.

Otra posibilidad es el uso conjunto de MBs y colorantes fluorescentes específicos para organelos o estructuras subcelulares. Por ejemplo, puede diseñarse un ensayo para determinar, si cierto mRNA es traducido en ribosomas asociados a retículo endoplásmico (RE) (Figura 8(b)), o en ribosomas libres (Figura 8(c)). Para este objetivo, pueden usarse colorantes fluorescentes específicos para el RE y los ribosomas, además un MB diseñado para detectar el mRNA en cuestión [192]. Si, se presenta la colocalización de los tres colorantes fluorescentes; es decir, la fluorescencia del colorante usado para teñir los ribosomas con el empleado para teñir el RE y también con la del fluoróforo del MB encargado de hibridar al mRNA (Figura 8(b)), podría concluirse que el mRNA en cuestión es traducido en ribosomas asociados a RE. Por otro lado; la no colocalización del colorante que tiñe al RE con el fluoróforo del MB que hibrida al mRNA, pero sí la de este último con el colorante para los ribosomas, puede interpretarse que el mRNA en cuestión se traduce en ribosomas libres (Figura 8(b)).

Para el procedimiento descrito en el párrafo anterior, el ribosoma puede marcarse de dos maneras: mediante un colorante específico, o bien, con un MB que hibride una secuencia blanco accesible, preferentemente en la superficie de una de las subunidades. En el primer caso, el colorante puede colocalizar con el fluoróforo de un MB que hibride a un mRNA mientras se está traduciendo (Figura 8(d)). Para la segunda opción, un MB puede hibridar una secuencia blanco que se ubique en la superficie de una de las subunidades y colocalizar con el fluoróforo del MB que está hibridando al mRNA (Figura 8(e)).

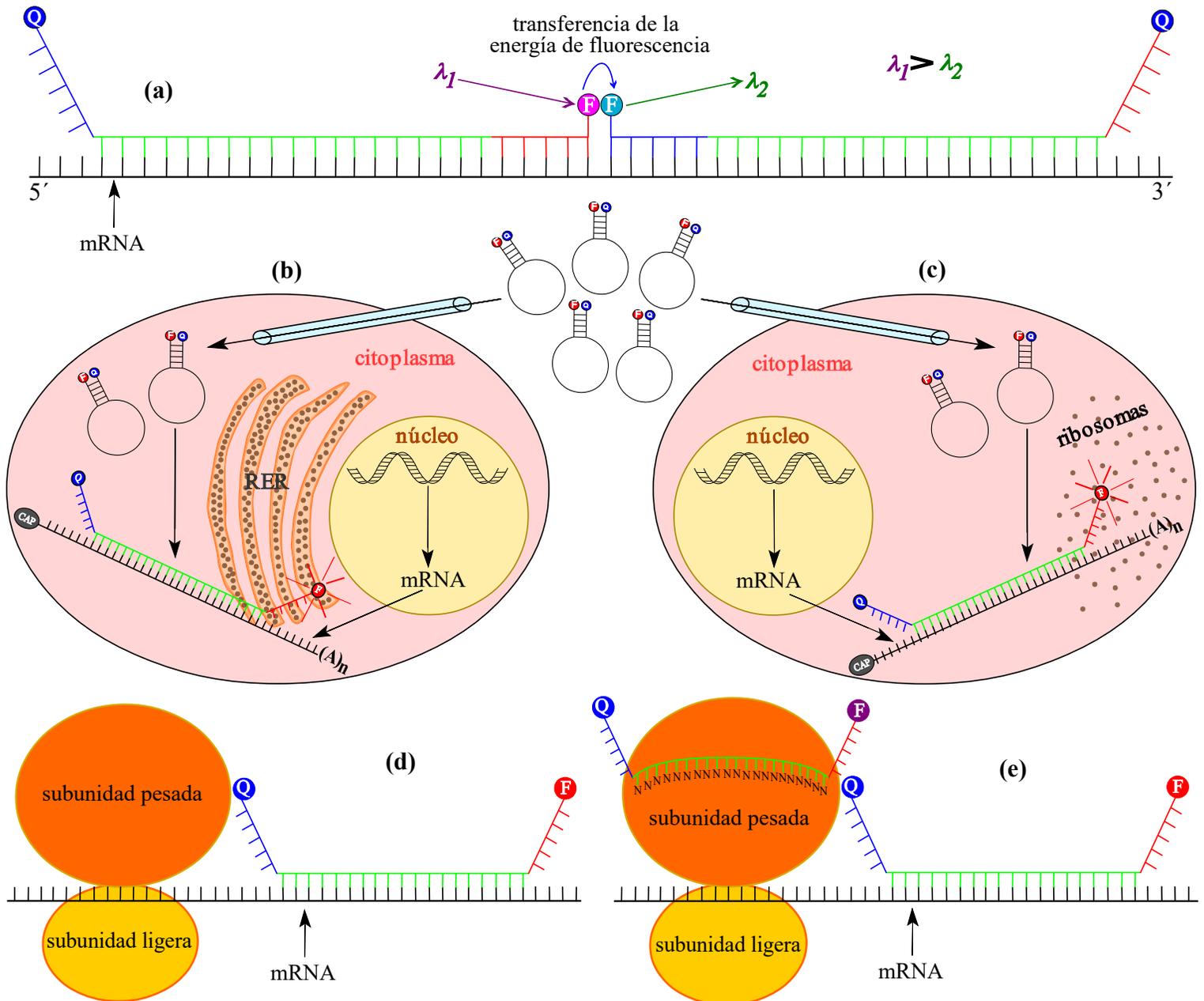


Figura 8. Estrategias para la detección de mRNAs en células vivas.

(a) Hibridación de regiones contiguas de un blanco por dos MBs de tallo compartido; el MB de la izquierda usa el brazo 5' para hibridar al blanco, y tiene una disposición convencional del fluoróforo (F) y el apagador (Q); el MB de la derecha usa el brazo 3' para hibridar al blanco, y tiene el fluoróforo (F) y el apagador (Q) con una disposición invertida, 3'-reportero y 5'-apagador; el fluoróforo del primer MB, representado con un círculo color **púrpura** actúa como fluoróforo donador, mientras que el fluoróforo del segundo MB representado con un círculo color **cyan** lo hace como aceptor. (b) Esquema de la colocación de un mRNA que es hibridado por un MB, con el retículo endoplásmico y sus ribosomas, cuando ambos organelos están teñidos con colorantes fluorescentes. El mRNA en cuestión, está siendo traducido en los ribosomas asociados a retículo endoplásmico rugoso (RER). (c) Esquema de la colocación de un mRNA con los ribosomas, pero no con el retículo endoplásmico, debido a que es traducido en ribosomas libres. (d) Detalle de la colocación entre un mRNA que está hibridado con un MB y un ribosoma marcado con un colorante fluorescente específico. (e) Detalle de la colocación entre un mRNA que está hibridado con un MB y un ribosoma marcado con un MB que hibrida una secuencia blanco representada con letras N que se encuentra accesible en su superficie.

4.7.2. Monitoreando la Expresión Génica.

Los primeros ensayos con MBs se limitaban sólo a detectar blancos sintéticos *in vitro*. Pero en 2003 Bratu *et. al.* demostraron que los MBs son una poderosa herramienta para visualizar la distribución y transporte de los mRNAs en células vivas [238]. Como se describió antes, se puede usar un diseño de dos MBs que hibriden regiones adyacentes de un mismo mRNA con la finalidad de aumentar la especificidad del ensayo y también disminuir el fondo. La hibridación de los dos MBs y la transferencia de energía entre sus fluoróforos indican la presencia del mRNA [164], [243]. La robustez del método permite no sólo la identificación del mRNA blanco y la determinación de su localización, sino que también posibilita hacer un seguimiento espacio-temporal del transporte del mRNA a través de la célula en tiempo real. Es posible calcular los coeficientes de difusión de los mRNAs usando la técnica denominada recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP: *fluorescence recovery after photobleaching*).

En 2004, Santangelo *et. al.* fueron más allá y analizaron la distribución y transporte de los mRNAs respecto a las mitocondrias en fibroblastos humanos, para este estudio los MBs fueron usados en combinación con un colorante fluorescente específico para las mitocondrias y mediante resolución espectral demostraron que ambos, el mRNA de la GA3PDH (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) y el de K-ras son abundantes especialmente en las mitocondrias [164].

Recientemente Wang *et. al.* describieron un método para determinar los niveles de expresión de un mRNA específico usando MBs [218]. El sistema consta de dos MBs y una prueba de referencia interna para análisis radiométrico. La prueba de referencia ha sido usada para eliminar las variaciones debidas a las diferentes concentraciones de MBs que se presentan en la célula. Un MB se usa para detectar el mRNA que se desea, el otro se usa para hibridar un mRNA constitutivo que se usa como referencia. Tres tipos celulares diferentes fueron usados para comparar los niveles de expresión del mRNA de interés con excelentes resultados.

Aun cuando se han implementado varios métodos para el estudio de una sola molécula de mRNA, monitorear varias moléculas de RNA en la misma célula sigue representando un reto técnico. El análisis radiométrico ofrece una buena opción para la cuantificación de la expresión génica [244], [245], posibilitando una estimación más precisa de los niveles de un mRNA en una determinada célula.

Es factible, que modificando esta técnica sea posible estudiar varias moléculas distintas de RNA simultáneamente usando las diferencias espectrales de los fluoróforos de cada MB.

4.7.3. Monitoreando la Replicación de RNA Genómico Viral.

Los virus se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a la composición de sus genomas: los virus de DNA y los virus de RNA. A su vez, estos últimos se subclasifican de acuerdo a la estructura de su genoma en tres subgrupos; el subgrupo III, posee un genoma de doble cadena (dsRNA) segmentado; el subgrupo IV, tiene un genoma de cadena sencilla con sentido positivo (+ssRNA); mientras que, los del subgrupo V, tienen un genoma de cadena sencilla y sentido negativo (-ssRNA). Hoy en día, existen métodos basados en MBs para visualizar en tiempo real la replicación de genomas virales de RNA.

Recientemente, se ha desarrollado un método para monitorear la replicación del coxsackievirus B6 usando MBs de RNA 2'-O-metilado ligados al péptido Tat mediante un puente thiol-maleimida [189]. El MB está dirigido a una secuencia de 18 pares de bases localizada en la región 5' no codificante del genoma viral. Los Coxsackievirus pertenecen a la familia Picornaviridae y por lo tanto tienen un genoma de cadena sencilla con sentido positivo.

También se ha monitoreado la replicación del RNA genómico del virus sincicial bovino (bRSV) usando MBs dirigidos a secuencias consenso repetidas en tándem que se encuentran en regiones intergénicas, con el objeto de amplificar la señal [188].

Una de las principales dificultades para la detección del RNA genómico viral usando MBs, al igual que ocurre con otras especies de RNA, es la poca intensidad de fluorescencia que presentan los fluoróforos convencionales, así mismo se sabe que incrementando la eficiencia del apagador se mejora el cociente señal/fondo.

Recientemente Yeh *et. al.* diseñaron unos MBs construidos con ácidos nucleicos peptídicos (PNA: *peptide nucleic acids*) y por lo tanto resistentes a la acción de nucleasas, que poseen como apagador nanopartículas de oro y como fluoróforo un punto cuántico (QD: *quantum dot*) en una proporción de 6:1. El punto cuántico posee en su superficie moléculas del péptido Tat. El hecho de que se use como apagador varias nanopartículas de oro, hace que la eficiencia de apagado sea casi del 100%, por otro

lado la introducción de los MBs en las células usando el péptido Tat hace que el proceso sea prácticamente inocuo para las células. El MB diseñado por Yeh *et. al.* reconoce una secuencia de 18 pb en la región no codificante del genoma del coxsackievirus B6 [246].

La visualización de genomas virales en células vivas es una técnica prometedora ya que facilita la detección de virus prescindiendo de los procesos de purificación de RNA, síntesis de cDNA o amplificación, también presenta la posibilidad de obtener información espacio-temporal, contribuyendo al entendimiento de la replicación, liberación y propagación viral. Esta información puede usarse para el desarrollo de fármacos y diseño o mejoramiento de métodos de diagnóstico.

Los MBs han sido capaces de impulsar la investigación en el campo de la virología, haciendo posible el estudio de la dinámica viral y la replicación de los genomas virales dentro de células vivas.

4.7.4. Visualización de RNAs en Neuronas.

Debido a la extraordinaria complejidad del sistema nervioso, los mecanismos que permiten la función del mismo permanecen siendo un enigma, aún cuando han sido objeto de investigación intensiva. Nuestro entendimiento del cerebro está limitado, en parte, porque aún cuando ya se realizan estudios a nivel molecular del funcionamiento neuronal, queda pendiente el desarrollo de técnicas que permitan monitorear procesos moleculares en neuronas vivas en tiempo real.

Los MBs son una buena opción para lograr este cometido, actualmente se cuentan con las herramientas para visualizar la dinámica de una o varias moléculas de RNA en neuronas vivas en tiempo real, sin embargo son pocos los trabajos que han explorado esta posibilidad.

En 2010 Simon *et. al.* demostraron que era posible identificar a las neuronas que expresaban determinado mRNA mediante un microscopio de fluorescencia usando MBs de 2'-O-metil RNA introducidos a regiones particulares de la retina mediante biobalística [191].

En 2013 Zepeda *et. al.* publicaron un protocolo detallado para visualizar mRNAs a través de un microscopio confocal en neuronas cultivadas *in vitro* usando MBs introducidos mediante microinyección. Los MBs usados en este reporte son de DNA, mediante la microinyección logran

entrar de forma independiente a la vía endocítica, sin ser depredados por nucleasas. Los autores mencionan que el protocolo puede ser adaptado para visualizar otras especies de RNAs incluyendo los miRNAs [247].

Queda pendiente probar que es posible monitorear la dinámica de los miRNAs en neuronas vivas usando MBs. También deben evaluarse los alcances y limitaciones de la técnica, es decir la resolución espacio-temporal que tiene, si es posible diferenciar las zonas y momentos en los que los miRNAs son producidos y/o procesados, las regiones en las que actúan, si es posible colocalizarlos con los mRNAs o ubicarlos en estructuras específicas de las neuronas, esto es, axones, dendritas y/o sinapsis.

4.7.5. Detección de miRNAs en Células Vivas.

Después de probar que es posible detectar varias especies de RNAs mediante MBs en células vivas, toca el turno de explorar esta posibilidad con los miRNAs. Como se ha mencionado antes, este tipo de RNAs se caracterizan por ser cortos (19-21 nucleótidos), lo que limita de forma importante el diseño de los MBs para detectarlos, ya que éstos deben hibridar por completo a su miRNA blanco. En general los miRNAs, son menos abundantes que otras especies de RNA, algunos pueden encontrarse en número tan bajos como 1000 moléculas por célula. Por lo que debe optimizarse el proceso de hibridación y hacer que el híbrido MB-miRNA blanco sea lo más estable posible en términos termodinámicos.

En diciembre de 2010 aparece disponible en línea un artículo de la autoría de Kang *et. al.*, en él se describe una técnica para detectar y cuantificar a miR-206 y miR-26a simultáneamente usando MBs de DNA introducidos mediante transfección con LipofectAMINE Plus® en células C2C12 [248]. Este reporte es muy interesante, ya que logra detectar miRNAs tanto exógenos (sintéticos) como endógenos usando MBs de DNA, es decir susceptibles a la degradación por nucleasas y además los introduce por transfección, incrementando la posibilidad de que sean depredados. Sin embargo la técnica funciona bien y logra su objetivo.

En 2012 Kim *et. al.* publicaron un reporte en donde logran visualizar y cuantificar a miR-33a usando MBs que liberan a su apagador después de hibridar a su mRNA blanco, lo introducen en células MCF-7 y MDA-MB-231 mediante nanocontenedores basados en ácido hialurónico. Los nanocontenedores están diseñados para introducirse en células que expresen receptores para ácido hialurónico como

CD44 o CD54 también llamado CAM-1 [249]. Este reporte hace importantes contribuciones al campo, ya que propone el diseño de una nueva clase de MBs, así como un novedoso método para su introducción en las células.

Yao *et. al.* publicaron en 2012 un estudio en donde logran detectar y medir a miR-155 en células A549, SPC-A1 y PC-3 usando un MB de LNA/DNA que introducen en las células mediante transfección con siPORT® neoFX®, un agente especializado en la introducción de pequeñas cantidades de siRNA en células [250].

V. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

5.1. Objetivo General.

Diseñar un sistema que permita visualizar miRNAs en células mediante microscopia confocal y usando faros moleculares (*molecular beacons*) como sondas.

5.2. Objetivos Específicos.

- Determinar los parámetros cinéticos y termodinámicos de los MBs usados en los ensayos.
- Determinar si la SLO interactúa o no con los MBs.
- Determinar si es posible introducir MBs a través de poros transitorios de SLO en células vivas.
- Determinar si es posible observar miRNAs sobreexpresados mediante vectores en células fijas.

5.3. Hipótesis.

Es posible visualizar miRNAs en células mediante microscopia confocal y usando faros moleculares como sondas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Faros Moleculares.

Fueron diseñados dos MBs de DNA sin modificaciones químicas (Figura 6(a)). El MB9, para hibridar a miR-9 maduro; y MB128, que hibrida tanto a miR-128 maduro, como a su precursor: pre-miR-128. El MB9, posee en el asa una secuencia que es complementaria a la secuencia del miR-9 maduro, su tallo está conformado por 5 nucleótidos de los cuales los dos más cercanos al asa corresponden con dos nucleótidos palindrómicos que se encuentran en los extremos de la secuencia del miR-9. El MB128 tiene una secuencia que es complementaria a la porción comprendida entre el nucleótido número 50 y el 73 del pre-miR-128, de esta manera, MB128 es capaz de hibridar tanto al miR-128 maduro como a su precursor (pre-miR-128), ya que la secuencia que tiene en su asa es complementaria a ambos blancos (Tabla 2).

Ambos MBs tienen en su extremo 5', como fluoróforo, 6-carboxyfluoresceína (6-FAM); y en su extremo 3', ácido 4-(4'-dimetilamino-fenilazo)benzoico (Dabcyl), como apagador de fluorescencia. MB9 y MB128 fueron sintetizados y después purificados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC: *high-performance liquid chromatography*) por la compañía IDT (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, Iowa, EE. UU.).

6.2. Oligonucleótidos.

Se diseñaron tres bloques de oligonucleótidos complementarios a los dos MBs descritos en la sección anterior para ser usados como blancos en los ensayos,

El primer bloque, está conformado por oligonucleótidos de igual longitud que hibridan al MB en diferentes porciones; el 1° oligonucleótido, sólo hibrida el asa; el 2°, se recorre un nucleótido en la dirección 3' para hibridar un nucleótido del brazo 3' del MB correspondiente; el 3°, se recorre 2 nucleótidos en la misma dirección para hibridar dos nucleótidos del brazo 3' del MB; los siguientes oligonucleótidos del bloque se van recorriendo nucleótido a nucleótido hasta que el sexto y último hibrida por completo el brazo 3' (5 nucleótidos).

El segundo bloque, está constituido por oligonucleótidos que aumentan su longitud en el extremo 5', un nucleótido a la vez. El 1° oligonucleótido, hibrida el asa por completo y un nucleótido del brazo 3'; mientras que el último, hibrida completamente tanto el asa como el brazo 3'.

El tercer y último bloque, consiste en oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente, esto es, al mismo tiempo en ambos extremos (3' y 5'). El 1° oligonucleótido, hibrida toda el asa y un nucleótido de cada brazo (uno del brazo 3' y otro del brazo 5'); el 2° oligonucleótido, hibrida toda el asa y dos nucleótidos de cada brazo; finalmente el 5° oligonucleótido, hibrida por completo al MB, el asa y ambos brazos. Las secuencias se encuentran en la Tabla 2 y la descripción en la Figura 9.

(a) Secuencias (miR-9)	(b) Nombres	(c) Secuencias (miR-128)
D-3' -gcgagAAACCAATAGATCGACATActgac-5' -F <i>5' -ucUUUGGUUAUCUAGCUGUAUga-3'</i>	MB9 <i>miR-9</i>	D-3' -gcgctcAGTGTCACTTGGCCAGAGAAAAAGgacgc-5' -F <i>5' ...⁵⁰UCACAGUGAACCGGUCUCUUUUUC⁷³... 3'</i> <i>5' -UCACAGUGAACCGGUCUCUUU-3'</i>
5' -TTTGGTTATCTAGCTGTAT-3' 0 5' - cTTTGGTTATCTAGCTGTA -3' 1 5' - tcTTTGGTTATCTAGCTGT -3' 2 5' - ctcTTTGGTTATCTAGCTG -3' 3 5' - gctcTTTGGTTATCTAGCT -3' 4 5' - cgctcTTTGGTTATCTAGC -3' 5	bloque 1 oligonucleótidos de igual longitud	5' -TCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTC-3' 0 5' - gTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTT -3' 1 5' - agTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTT -3' 2 5' - cagTCACAGTGAACCGGTCTCTTTT -3' 3 5' - gcagTCACAGTGAACCGGTCTCTT -3' 4 5' - cgcagTCACAGTGAACCGGTCTCT -3' 5
5' - cTTTGGTTATCTAGCTGTAT -3' 1 5' - tcTTTGGTTATCTAGCTGTAT -3' 2 5' - ctcTTTGGTTATCTAGCTGTAT -3' 3 5' - gctcTTTGGTTATCTAGCTGTAT -3' 4 5' - cgctcTTTGGTTATCTAGCTGTAT -3' 5	bloque 2 oligonucleótidos que incrementan su longitud en su extremo 5'	5' - gTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTC -3' 1 5' - agTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTC -3' 2 5' - cagTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTC -3' 3 5' - gcagTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTC -3' 4 5' - cgcagTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTC -3' 5
5' - cTTTGGTTATCTAGCTGTATg -3' 2 5' - tcTTTGGTTATCTAGCTGTATga -3' 4 5' - ctcTTTGGTTATCTAGCTGTATgag -3' 6 5' - gctcTTTGGTTATCTAGCTGTATgagc -3' 8 5' - cgctcTTTGGTTATCTAGCTGTATgagcg -3' 10	bloque 3 oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente	5' - gTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTCc -3' 2 5' - agTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTCcct -3' 4 5' - cagTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTCcctg -3' 6 5' - gcagTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTCcctgac -3' 8 5' - cgcagTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTTCcctgacg -3' 10

Tabla 2. Secuencias de los MBs y sus oligonucleótidos blanco.

Columna (a); MB9 (**negritas**); y su blanco intrínseco, miR-9 (*cursivas*). Columna (b), nombre de cada secuencia o bloque de oligonucleótidos. Columna (c); MB128 (**negritas**); y sus blancos intrínsecos, pre-miR-128 y miR-128 (*cursivas*), los superíndices en la secuencia parcial del pre-miRNA-128 indican las coordenadas del segmento representado. El primer bloque corresponde a oligonucleótidos de longitud idéntica. El segundo, a los que aumentan su longitud en el extremo 5' nucleótido a nucleótido. Y el tercero, a los que aumentan su longitud bilateralmente, extremos 3' y 5' a la vez. Las secuencias de ambos MBs se encuentran en sentido 3'→5', las demás están en dirección 5'→3', la letra D representa a Dabcyl y la letra F a 6-FAM, las letras minúsculas representan nucleótidos que se encuentran en los brazos del MB o que hibridan con estos (oligonucleótidos blanco). Los números de colores a la derecha de las secuencias de los oligonucleótidos, indican el número de nucleótidos que son hibridados en uno (bloques 1 y 2) o en ambos brazos (bloque 3) del MB, los colores corresponden con los de las figuras y tablas de la sección de resultados.

Todos los oligonucleótidos se adquirieron desalados a la compañía Sigma-Aldrich, fueron disueltos en agua estéril de grado biología molecular para obtener soluciones madre con una concentración de 100 mM, la misma fue verificada usando un espectrofotómetro de microvolumen (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*. Whaltam, Massachusetts, EE. UU.).

Para garantizar que los oligonucleótidos no presentaban subproductos de síntesis detectables, estos fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones desnaturalizantes (urea 0.4 g / mL), teñidos con azul de metileno (ver anexo 1, página 105), secados a temperatura ambiente en una prensa de acrílico entre dos piezas de celofán dulce y digitalizados usando un escáner de cama plana (TX-100, Epson. Suwa, Nagano, Japan).

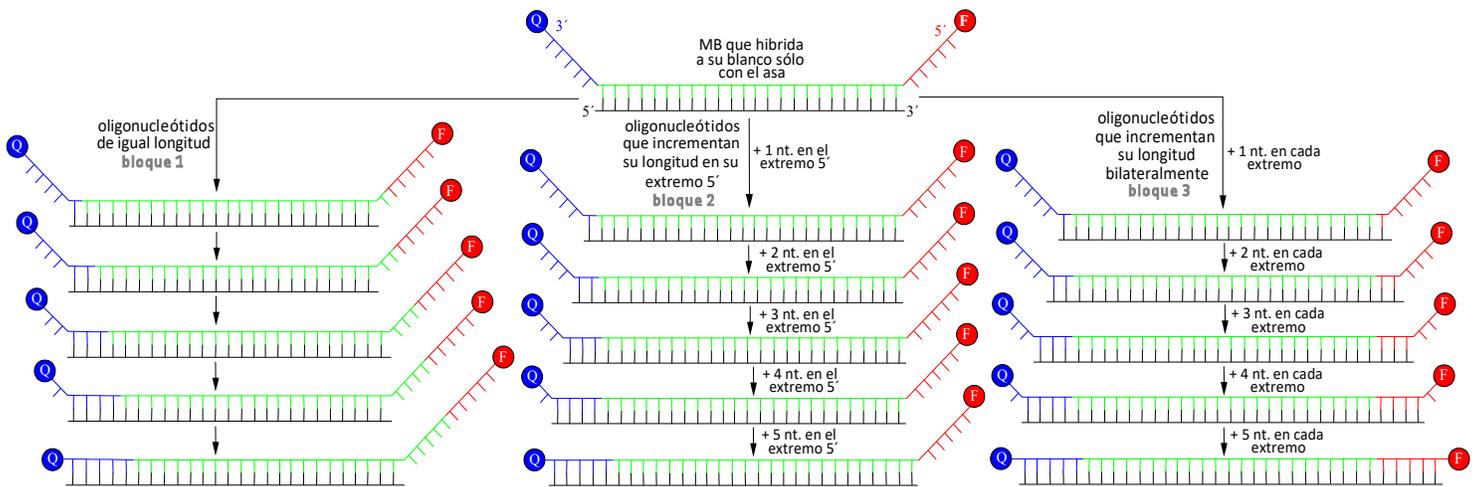


Figura 9. MB con sus diferentes oligonucleótidos blanco.

Arriba, se muestra un MB con un asa de 24 nt. y un tallo de 5 nt. (como MB128) que hibrida a su oligonucleótido blanco sólo con el asa. Izquierda, el bloque 1, son oligonucleótidos de la misma longitud que se van recorriendo gradualmente hacia el extremo 3' del MB, el primero invade sólo un oligonucleótido del brazo 3' del MB y el último lo hibrida completamente. Centro, el bloque 2, está conformado por oligonucleótidos que incrementan su longitud en el extremo 5', nucleótido a nucleótido, el primero hibrida el asa y sólo un nucleótido del brazo 3' del MB, mientras que el último hibrida el asa y el brazo 3' por completo. Derecha, el bloque 3, está constituido por oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente, un nucleótido en cada extremo a la vez, el primero hibrida el asa y un oligonucleótido de cada brazo del MB, mientras que el último hibrida al MB por completo, esto es, el asa y ambos brazos.

6.3. Ensayos de Hibridación.

Se usó un espectrofluorómetro (*Bowman series 2*, SLM-Aminco. Madison, Wisconsin, EE. UU.) para realizar un curso temporal de la cinética de hibridación entre el MB y su oligonucleótido blanco. Durante el ensayo, se midió la temperatura en el interior de la cámara en la que se encontraba la celda que contenía la solución del MB, observando que esta se mantenía constante en 30° C.

Todos los ensayos fueron realizados en celdas de polimetacrilato (*fluorometer cuvette*, Sigma-Aldrich. Saint Louis, Missouri, EE. UU.) que contenían 990 µL de solución intracelular artificial (CaCl₂ 1 mM,

KCl 120 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM a pH 7.30) en la que estaba disuelto uno de los dos MBs [191].

La fluorescencia basal fue medida durante 200 segundos, observando que esta tenía valores constantes, después se inyectaron 10 µL de una solución que contenía suficiente oligonucleótido blanco para hacer que la solución resultante de 1 mL tuviera una concentración de 500 nM del oligonucleótido blanco y 50 nM del MB.

Los ensayos fueron hechos usando agitación magnética al nivel máximo permitido por el aparato, configurándolo para que midiera la intensidad de la fluorescencia cada segundo. Después de que el oligonucleótido blanco se agregó, la intensidad de fluorescencia tuvo un aumento superior a 12 veces la fluorescencia de fondo, tal y como se reporta en la literatura [163].

6.4. Ensayos de Desnaturalización Térmica.

Se usó un termociclador de tiempo real (*ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems*. Foster City, California, EE. UU.), para medir la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura de una solución que contiene a un MB en presencia o ausencia de uno de sus oligonucleótidos blanco ([Figura 4](#)). Para los ensayos, tanto los MBs como los oligonucleótidos blanco fueron disueltos en la solución intracelular artificial descrita en la sección anterior.

En todos los ensayos, se usaron soluciones con una concentración 50 nM de uno de los MB y para los ensayos en presencia de un oligonucleótido blanco se usaron concentraciones 50, 250, 500, 5000 y 10000 nM de cada uno de ellos. En todos los ensayos se usó un volumen de 10 µL colocado en uno de los pozos de una microplaca (PCR-96-AB-C, *Axygen Scientific. Corning*, Nueva York, EE. UU.) con una cubierta capaz de sellar herméticamente y con propiedades ópticas adecuadas (*adhesive qPCR seal*, Sarstedt. Nümbrecht, Alemania). En ensayos realizados previamente usando microtubos para PCR con tapa óptica (*MicroAmp, Applied Biosystems. Foster City*, California, EE. UU.) no fue posible detectar fluorescencia.

La temperatura fue incrementada en un grado Celsius desde 4 °C hasta 90 °C ([Figura 4](#)), permaneciendo un minuto en cada grado, se realizó la medición de la intensidad de fluorescencia

durante los últimos 15 segundos de este lapso. Para verificar que el equilibrio fue alcanzado y no se presentó histéresis, el ensayo incluyó el proceso inverso, es decir, disminuir la temperatura desde 90 hasta 4 °C grado a grado.

Con el objetivo de que sea posible hacer una comparación entre el perfil térmico producido por cada par MB-oligonucleótido blanco, se realizaron dos manipulaciones aritméticas para normalizar los datos. Primero, el valor de la intensidad de fluorescencia obtenido a cada temperatura fue dividido entre el valor de la intensidad de fluorescencia obtenido a 80 °C para cada muestra. Segundo, para eliminar las variaciones intrínsecas de la intensidad de fluorescencia debidas al efecto de la temperatura en el fluoróforo, se usó el respectivo MB previamente digerido con DNAasa I recombinante (Roche. Basel, Suiza) y los valores obtenidos de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo fueron restados a cada uno de los valores que conforman cada perfil.

6.5. Análisis en el Equilibrio.

El perfil obtenido al someter la solución que contiene al MB sin su oligonucleótido blanco al cambio térmico (4 °C → 90 °C) ([Figura 4](#)) fue usado para calcular la constante de transición ($K_{3,4}$) ([Figura 10](#)) para cada temperatura usando la ecuación 2.

$$K_{3,4} = \left(\frac{\Phi - \beta}{\gamma - \Phi} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde; Φ , es la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura (θ); β , es la intensidad de fluorescencia emitida por el MB a 10 °C, cuando se asume que todas las moléculas del MB están en su conformación estructural de tallo-asa; y γ , es la intensidad de fluorescencia emitida a 80 °C, cuando se asume que todas las moléculas del MB se hallan desestructuradas (*random coil*). Los valores de $K_{3,4}$ se usaron para calcular la constante de transición denominada $K_{1,2}$ ([Figura 10](#)) mediante la ecuación 3.

$$K_{1,2} = \frac{(\delta - \Psi) T_0}{(\Psi - \beta) + (\Psi - \gamma) K_{3,4}} \quad \text{Ecuación 3}$$

En donde; δ , es el valor de la intensidad de fluorescencia de una solución que contiene la mezcla MB-oligonucleótido blanco a una temperatura de 10 °C, asumiendo que todas las moléculas del MB se hayan asociadas a su blanco; Ψ , es la intensidad de fluorescencia de una solución que contiene al MB y a su oligonucleótido blanco pero a 80 °C, donde se asume que todos los MBs se hallan libres y desestructurados (*random coil*); β y γ , representan lo mismo que en la ecuación 2; y T_0 , es la concentración inicial del oligonucleotido blanco.

La temperatura de fusión (θ_m : *melting temperature*), de un par MB-oligonucleótido blanco, se define como la temperatura a la cual, la mitad de las moléculas del MB presente en una solución se encuentran unidas a su blanco, mientras que, las restantes se encuentran libres.

Para determinar la temperatura de fusión (θ_m), de cada par MB-oligonucleótido blanco. Es necesario asumir, que en cada solución que contiene a un MB y a su correspondiente oligonucleótido blanco, $T_0 > \frac{1}{2}B$, y $\theta = \theta_m$, cuando $K_{1,2} = T_0 - \frac{1}{2}B$.

Una vez que se determinó el valor de θ_m con las consideraciones antes descritas, se construyó una gráfica del inverso de la θ_m ($1/\theta_m$) en el eje de las abscisas y el valor de $R \cdot \ln(T_0 - \frac{1}{2}B)$ en el eje de las ordenadas, es decir $1/\theta_m$ versus $R \cdot \ln(T_0 - \frac{1}{2}B)$. Con los puntos, se realizó una regresión lineal, la recta resultante describe la termodinámica de la transición; entre el estado 1, en el que el MB esta hibridado a su blanco; y el estado 2, cuando está libre en una conformación de tallo-asa (Figura 10).

La recta, tiene una pendiente igual al cambio de entalpia (ΔH), y su intersección con el eje y (de las ordenadas) es igual al cambio de entropía (ΔS). La ecuación 4, es del tipo $y = mx + b$, y describe la recta obtenida de la regresión lineal.

$$R \ln \left(T_0 - \frac{B_0}{2} \right) = -\Delta H_{1,2} \frac{1}{\theta_m} + \Delta S_{1,2} \quad \text{Ecuación 4}$$

En donde R, es la constante universal de los gases ideales (1.9872 cal mol⁻¹ K⁻¹); T_0 y B_0 , son la cantidad inicial de oligonucleótido blanco y MB en unidades molares, respectivamente; y θ_m , es la temperatura de fusión en escala Kelvin.

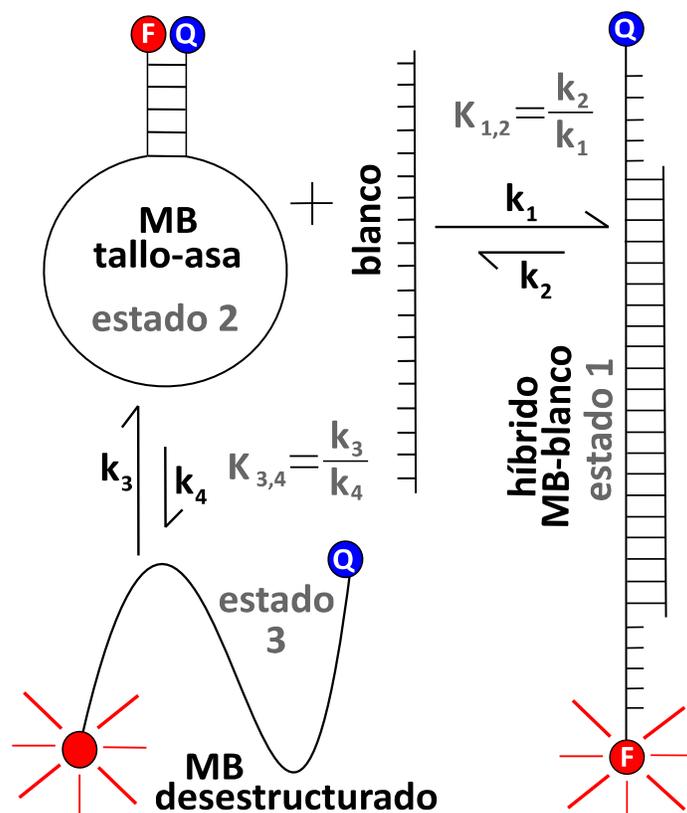


Figura 10. Estados conformacionales de un MB.

Un MB en una solución que contiene a su blanco puede estar en tres estados; (1) formando un híbrido con su blanco, (2) libre con una conformación tallo-asa, o (3) libre desestructurado (*random coil*). Se muestran las constantes de equilibrio ($K_{1,2}$ y $K_{3,4}$) involucradas en la transición entre cada uno de los estados.

Se usó la herramienta *two-state melting (hybridization)* del *DINAMelt Web Server* [239], para predecir las θ_m de cada par MB-oligonucleótido blanco para cada concentración, 50, 250, 500, 5000 y 1000 nM. Con estos puntos se realizó una regresión lineal y se predijeron ΔH y ΔS . Los valores predichos de θ_m , ΔH y ΔS se usan como referencia para los valores obtenidos mediante los procesos experimentales.

6.6. Análisis de la Cinética de Hibridación.

Los valores de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo ($F(t)$) de cada par MB-oligonucleótido blanco obtenido en el ensayo de hibridación fueron usados para calcular k_1 (constante de asociación entre el MB y su oligonucleótido blanco) (Figura 10) mediante la ecuación 5. Los ensayos fueron hechos usando una solución con una concentración 50 nM del MB y una concentración 10 veces mayor del oligonucleótido blanco (500 nM).

$$k_1 = \frac{1}{\Delta} \ln \left(1 - \lambda \frac{[F(t) - F_0]}{[F_{eq} - F_0]} \right) - \frac{1}{\Delta} \ln \left(1 - \frac{[F(t) - F_0]}{[F_{eq} - F_0]} \right) \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde: $\Delta = ([B_0 + T_0 + K_{1,2}]^2 - [4 B_0 T_0])^{1/2}$, $[D_{eq}] = 1/2 (B_0 + T_0 + K_{1,2} - \Delta)$ y $\lambda = [D_{eq}]^2 / (B_0 T_0)$. Se calculó la pendiente (m) de la fase exponencial de la cinética de hibridación entre el MB y su oligonucleótido blanco usando la ecuación 6, considerando el último punto ($p_1 (x_1, y_1)$) antes de la adición del oligonucleótido blanco ($t = 199$ s) y el último punto antes de alcanzar el valor asintótico ($p_2 (x_2, y_2)$).

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad \text{Ecuación 6}$$

Finalmente, se determinó el valor del incremento de fluorescencia (ΔF) para cada curva, restando el valor de la fluorescencia basal (F_0) al valor de la fluorescencia en el equilibrio (F_{eq}).

6.7. Concentración del MB Libre y Estabilidad del Híbrido MB-blanco.

Para determinar cómo afectan la posición en la que el MB hibrida a su blanco, así como la proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB* en la estabilidad de un híbrido MB-oligonucleótido blanco, se calculó la fracción del MB libre (α) a través de su cambio de entalpía (ΔH) y su cambio de entropía (ΔS) para cada par MB-blanco, mediante la ecuación 7.

$$\frac{\alpha}{(1 - \alpha)(\eta - \alpha) \hat{B}_0} = e^{\left(\left(\frac{-\Delta H_{1,2}}{R\theta} \right) + \left(\frac{\Delta S_{1,2}}{R} \right) \right)} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde $\eta = T_0/B_0$, $\hat{B}_0 = B_0/c_0$ y $c_0 = 1$ M. El valor de α en función de la temperatura fue calculado para cada par MB-oligonucleótido blanco, usando muestras con una concentración 50 nM de cada MB (B_0) y 500 nM de cada oligonucleótido blanco (T_0) como concentraciones iniciales y una temperatura de 30° C (303.15 K).

También se calculó la energía de Gibbs para usarla como medida de la estabilidad del híbrido MB-oligonucleótido blanco sabiendo que: $\Delta G = \Delta H - (T \Delta S)$, donde T es la temperatura a la que ocurre el proceso medida en escala Kelvin.

6.8. Cultivo Celular.

Las células fueron cultivadas hasta la confluencia en medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*) adicionado al 10% con suero de feto bovino en una cámara de incubación con una temperatura constante de 37° C y una atmósfera con 5% de CO₂.

6.9. Plásmidos.

El plásmido Dpa-miR-128 fue donado por la Dra. Silvia Anna Ciafrè. Para construirlo, se clonó el gen *miR-128* entre los sitios de corte de las enzimas *KpnI* y *XhoI* en el vector pcDNA 3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.), usando los oligonucleótidos: 5'-GAAGATCTTAATGGCCTTGTTCTG-3' y 5'-CCGCTCGAGGTGGAAACCTGAGTAAAA-3', superior e inferior de manera respectiva.

El vector plasmídico pPG-miR-9-EGFP fue diseñado por el grupo del Dr. Tong, el gen *miR-9* se clonó entre los sitios de corte de las endonucleasas de restricción *BamHI* y *XhoI*, en el plásmido pPG/miR/EGFP (GenePharma, Shanghai, China), usando los oligonucleótidos:

- ◆ 5'-TGCTGTCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAGTTTTGGCCACTGACTGACTCATACAGAGATAACCAAAGA-3', superior.
- ◆ 5'-CCTGTCTTTGGTTATCTCTGTATGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCATACAGCTAGATAACCAAAGAC-3', inferior.

6.10. Ensayos con Streptolisina O.

Se realizó un ensayo para determinar si los MBs (MB9 y MB128) se unen de manera inespecífica a la streptolisina tipo O de *Streptococcus pyogenes* (SLO). Para esto, se colocaron tres muestras; las tres contenían una concentración 200 nM de uno de los dos MBs (MB9 o MB128), la segunda tenía además una concentración 200 nM del oligonucleotido blanco más largo (Tabla 2, 10), y la tercera tenía el MB más SLO previamente activada (incubada con dithiothreitol 100 mM en solución amortiguadora de fosfatos durante 30 minutos a 37° C).

También, se realizó un ensayo para determinar si los MBs hibridados a su blanco, son capaces de entrar al citoplasma de células HEK-293 vivas a través de poros transitorios formados por SLO. Para tal propósito, se incubaron previamente células HEK-293 (sección 6.8), después se retiró el medio de cultivo con SFB, se sustituyó con medio libre de SFB y que contenía 0.2 U/mL de SLO, 200 nM de MB 128 y 200 nM de oligonucleótido blanco (Tabla 2, 10) y se monitoreo el proceso mediante microscopia confocal.

6.11. Transfección, Fijación y Montaje de las Células.

Las células HEK-293 fueron transfectadas usando LipofectAMINE 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, EE. UU.), 24 h después fueron tratadas con tripsina para removerlas de la caja de cultivo y resembrarlas sobre cubreobjetos de vidrio.

Transcurridas 2 horas, cuando se adherieron al sustrato, fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% a pH 7.3 y permeabilizadas con una solución de triton al 0.1%. A continuación fueron incubadas con una solución de MB a 50 μ M durante 3 h, después se usó tetrahidrocloruro de 3, 3'-diaminobenzidina como medio de montaje para microscopía de fluorescencia (DAKO, Agilent. Santa Clara, California, EE. UU.) con el objeto de adherir el cubreobjetos en el que estaba la muestra sobre el portaobjetos.

Al día siguiente se colocó barniz transparente para uñas en las orillas del cubreobjetos para sellarlas y se observó a través del microscopio confocal (FV-10, Olympus. Tokio, Japon). Cabe resaltar que para este procedimiento, no fue necesario realizar un lavado para remover los MBs (sondas) que no hibridaron a sus blancos, como debe hacerse cuando se usan sondas lineales, ya que los MBs al no hibridar a su blanco, adquieren una conformación de tallo-asa y no emiten fluorescencia.

6.12. Análisis Estadístico.

Se usó el paquete estadístico PSPP (*GNU Project, Free Software Foundation*) para el análisis de los datos experimentales. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para establecer si existía diferencia entre los parámetros de las curvas de asociación *i. e.* las pendientes (m) de las curvas de asociación, incremento de la intensidad de fluorescencia (ΔF) y constantes de asociación (k_1) dentro de cada grupo de oligonucleótidos (de igual longitud, que aumentan su longitud en el extremo 5', y que aumentan su longitud bilateralmente). Después se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para hacer comparaciones por pares y determinar entre que pares existen diferencias significativas.

La prueba de Kruskal-Wallis, también se usó para comparar las temperaturas de fusión (θ_m) y la estabilidad (ΔG) entre los diferentes pares de MB-oligonucleótidos blanco dentro de cada grupo (de igual longitud, que aumentan su longitud en el extremo 5', y que aumentan su longitud bilateralmente). Después de uso la prueba U de Mann-Whitney para hacer comparaciones por pares.

Para determinar si existe o no relación entre la longitud de los oligonucleótidos blanco y los parámetros de las curvas de hibridación; es decir, las pendientes (m) de las curvas de asociación, incremento de la intensidad de fluorescencia (ΔF) y constantes de asociación (k_1); así como con los parámetros en el equilibrio, estabilidad (ΔG) y proporción del MB libre en el equilibrio (α) se usó la prueba de coorelación de Sperman.

VII. RESULTADOS.

7.1. Hibridación de los MBs con sus Oligonucleótidos Blanco.

Con los resultados de los ensayos de hibridación (sección 6.3, página 53), se construyeron las gráficas de cinética, fluorescencia en función del tiempo ($F(t)$), medida con el espectrofluorómetro, cada segundo durante el ensayo (Figura 11). Las curvas son representativas de la cinética de hibridación de uno de los MBs (MB9 o MB128) con cada uno de sus oligonucleótidos blanco. Se editó la escala de tiempo de las gráficas para que fuera posible observar las diferencias entre las fases exponenciales de las curvas. La tabla 2 contiene las secuencias de los MBs y sus oligonucleótidos blanco.

Es notorio que los oligonucleótidos de la misma longitud muestran cinéticas de hibridación muy similares, esto sucede para ambos MBs, MB9 (Figura 11(a)) y MB128 (Figura 11(d)). Puede observarse, que las pendientes (m) de la fase exponencial, los valores de sus asintotas, y por lo tanto el valor del incremento de la fluorescencia (ΔF), también son similares.

Por otro lado, los oligonucleótidos que incrementan su longitud en el extremo 5' muestran curvas que pueden diferenciarse bien unas de otras. Aparentemente; tanto para MB9 (Figura 11(b)), como para MB128 (Figura 11(e)); los oligonucleótidos más largos producen curvas con pendientes (m) más pronunciadas en sus fase exponenciales. También, se observan valores asintóticos e incrementos en la intensidad de fluorescencia (ΔF) mayores.

Finalmente; los oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente, esto es, extremos 3' y 5' a la vez (Figura 11(c) y (f)). Muestran un comportamiento similar a los mencionados en el párrafo anterior, es decir, los oligonucleótidos más largos muestran pendientes (m) más pronunciadas en su fase exponencial, así como, valores asintóticos y valores de ΔF aparentemente mayores que los oligonucleótidos más cortos.

Cabe mencionar que, los oligonucleótidos que crecen bilateralmente presentan una estructura de tallo-asa similar a la que poseen los MBs. El oligonucleótido que tiene un nucleótido adicional en cada extremo (3' y 5'), puede producir una estructura con un tallo de un nucleótido; el que tiene dos nucleótidos adicionales en cada extremo, un tallo de 2 nucleótidos y así sucesivamente; hasta llegar al que posee 5 nucleótidos adicionales en cada extremo, que puede formar una estructura con un tallo de 5 nucleótidos. Este hecho puede hacer que las pendientes de las fases exponenciales producidas por los oligonucleótidos

que crecen bilateralmente (Figura 11(c) y (f)) no sean mucho más pronunciadas que las de los oligonucleótidos que crecen en solo un extremo (Figura 11(b) y (e)).

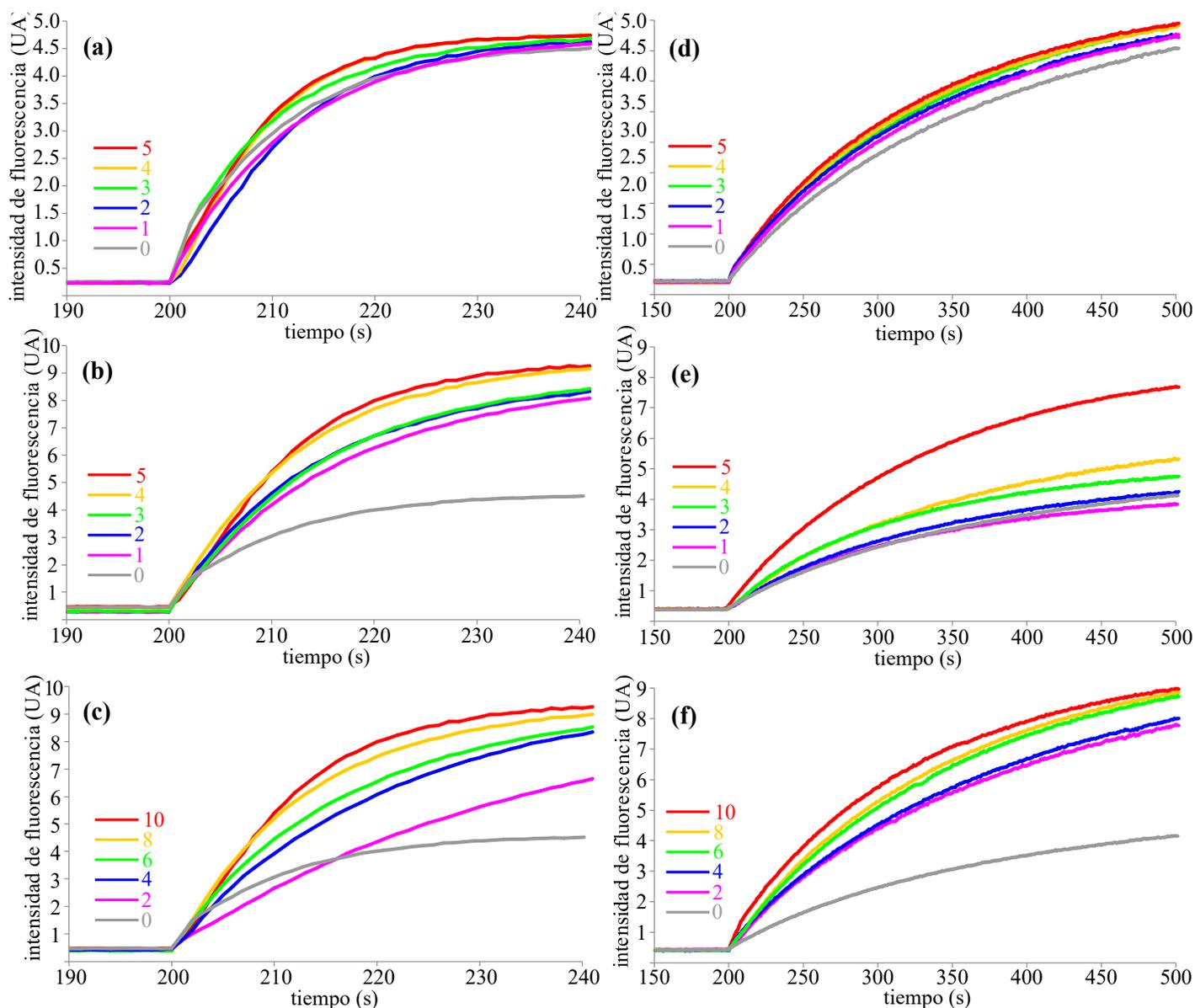


Figura 11. Cinética de hibridación de los MBs.

El ensayo se llevó a cabo a 30° C (303.15 K). Las gráficas del lado izquierdo (a), (b) y (c), son de la hibridación del MB9. Mientras que las del lado derecho (d), (e) y (f), corresponden a MB128. (a) y (d) con oligonucleótidos de igual longitud, (b) y (e) que aumentan su longitud en el extremo 5', mientras que (c) y (f) incrementan su longitud bilateralmente (extremos 3' y 5' a la vez). Los números de colores, indican la cantidad de nucleótidos que los oligonucleótidos blanco hibridan en uno ((a), (b), (d) y (e)) o ambos brazos ((c) y (f)) del MB. Las secuencias de los MB y los oligonucleótidos se encuentran en la tabla 2, los colores de las secuencias corresponden con los de las curvas. UA significa unidades arbitrarias.

7.1.1. Parámetros de las Curvas de Hibridación.

Los resultados que se describen en esta sección se hallan en la Tabla 3, la misma se titula: Parámetros de las curvas de hibridación de los MBs con sus oligonucleótidos blanco.

7.1.1.1. Oligonucleótidos de Igual Longitud.

Los oligonucleótidos con la misma longitud; 19 nucleótidos para los que son hibridados por MB9, y 24 nucleótidos para los que son blanco de MB128. Presentan pendientes muy similares, $0.50 < m < 0.58$ para los que son blanco de MB9 y $0.51 < m < 0.58$ para los que son hibridados por MB128. Estadísticamente ($n=5$, $p=0.05$), no existen diferencias significativas entre los valores de m de las curvas de asociación de los oligonucleótidos de igual longitud que hibridan a MB9, lo mismo ocurre para el grupo de oligonucleótidos que son blanco de MB128.

Los valores de ΔF de los oligonucleótidos de igual longitud se incrementa ligeramente conforme aumenta el número de nucleótidos que son hibridados en el brazo 3'. Esto puede deberse a que al inmovilizarse el apagador (dabcyl), que está ubicado en el extremo 3', la transferencia energética entre el fluoróforo y el apagador sucede con mayor dificultad lo que resulta en una mayor ΔF . Sin embargo, este efecto no alcanza a ser tan determinante como para producir diferencias que sean estadísticamente significativas ($n=5$, $p=0.05$). El fenómeno es similar tanto para los oligonucleótidos que son blanco del MB9 como para los que son hibridados por MB128.

En cuanto a los valores de k_1 , se observa que estos aumentan ligeramente conforme se incrementa la cantidad de nucleótidos que son hibridados en el brazo 3' del MB, sin embargo este aumento no es significativo desde el punto de vista estadístico ($n=5$, $p=0.05$). La diferencia solo es significativa entre los oligonucleótidos que hibridan con uno o más nucleótidos el brazo 3' del MB (1, 2, 3, 4 y 5) y el oligonucleótido que no lo hace (0), el efecto se presenta en ambos MBs (9 y 128).

7.1.1.2. Oligonucleótidos que Incrementan su Longitud en 5'.

Del grupo de cinco oligonucleótidos que aumentan su longitud en el extremo 5' e hibridan a MB9, los tres primeros (1, 2, y 3) muestran valores de m similares ($0.49 < m < 0.52$) y no existen diferencias significativas ($n=5$, $p=0.05$) entre ellos. Sin embargo, si existen diferencias entre éstos y los últimos dos, es decir los oligonucleótidos 4 y 5 describen pendientes comparativamente más pronunciadas en sus fases exponenciales ($m > 0.55$) que las que describen los primeros tres oligonucleótidos del grupo (1, 2, y 3).

Mientras que el grupo de cinco oligonucleótidos que crece en su extremo 5' y que hibrida a MB128 muestra un valor de m que va aumentando significativamente ($n=5$, $p=0.05$) conforme se incrementa la longitud del oligonucleótido y con esto el número de nucleótidos que son hibridados por el brazo 3' del MB128.

En cuanto a los valores de ΔF estos aumentan de forma directamente proporcional a la longitud de los oligonucleótidos blanco, tanto para los oligonucleótidos que hibridan a MB9 como para los que son blanco de MB128. Sin embargo este aumento es más pronunciado en el caso de MB128, debido probablemente a la longitud del MB y la distancia que hay entre el fluoróforo y el apagador en el estado hibridado.

Para la hibridación de MB9 y sus oligonucleótidos blanco que crecen en su extremo 5', los valores de k_1 no muestran diferencias entre los tres primeros oligonucleótidos del grupo (1, 2 y 3). Sin, embargo entre éstos y los últimos dos (4 y 5) si existen diferencias ($n=5$, $p=0.05$). Por otro lado, la hibridación de MB128 con sus oligonucleótidos blanco que crecen en su extremo 5', no produce valores de k_1 que sean significativamente diferentes.

7.1.1.3. Oligonucleótidos que Incrementan su Longitud Bilateralmente.

La pendiente de la fase exponencial de las curvas de hibridación de los oligonucleótidos blanco de MB9 que crecen bilateralmente aumenta proporcionalmente conforme al número de nucleótidos que son hibridados en ambos brazos del MB. Esta diferencia es más pronunciada entre el primer nucleótido (2) y los demás (4, 6, 8 y 10), sin embargo, es suficiente para ser significativa entre todos.

Los valores de ΔF aumentan de forma directamente proporcional a la longitud de los oligonucleótidos blanco que incrementan su longitud bilateralmente, las diferencias son estadísticamente significativas ($n=5$, $p=0.05$) y ocurren tanto para MB9, como para MB128.

Para MB9, los valores de k_1 aumentan conforme aumenta la longitud de los oligonucleótidos, y aunque el efecto no es tan pronunciado, si es significativo desde el punto de vista estadístico. Por otro lado, para MB128, no hay diferencias significativas entre el primer oligonucleótido que hibrida a MB128 con un nucleótido en cada brazo (2) y el que lo hace con dos (4), pero si existe diferencia entre estos (2 y 4) y los últimos tres (6, 8 y 10).

		Longitud (nucleótidos)	No. de puentes de hidrógeno	nt. complementarios longitud del MB	pendiente (m)	ΔF (UA)	k_1 [M]	
MBS (longitud = 29 nucleótidos)	oligonucleótidos de igual longitud	0	19	44	0.65	0.55±0.005	116.4±0.4	0.03±0.005
		1	19	45	0.65	0.56±0.004	118.4±0.4	0.17±0.002
		2	19	45	0.65	0.57±0.003	120.4±0.1	0.18±0.002
		3	19	46	0.65	0.57±0.002	121.1±0.5	0.20±0.002
		4	19	44	0.65	0.56±0.002	122.3±0.4	0.22±0.010
	5	19	47	0.65	0.58±0.003	123.3±0.1	0.23±0.010	
	oligonucleótidos que incrementan su longitud en su extremo 5'	1	20	47	0.69	0.49±0.003	105.3±1.0	0.12±0.006
		2	21	49	0.72	0.50±0.005	109.5±0.3	0.14±0.003
		3	22	52	0.76	0.52±0.007	112.0±0.3	0.14±0.001
		4	23	53	0.79	0.55±0.002	118.6±0.5	0.16±0.001
		5	24	58	0.83	0.56±0.002	121.7±0.6	0.18±0.009
	oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente	2	21	50	0.72	0.40±0.003	83.7±0.1	0.06±0.001
		4	23	54	0.79	0.51±0.004	106.4±0.4	0.09±0.002
		6	25	60	0.86	0.54±0.003	109.3±0.4	0.11±0.001
		8	27	66	0.93	0.57±0.001	116.3±0.7	0.15±0.001
10		29	72	1	0.59±0.005	120.5±0.4	0.19±0.002	
MB128 (longitud = 34 nucleótidos)	oligonucleótidos de igual longitud	0	24	59	0.71	0.52±0.008	116.1±0.1	0.09±0.004
		1	24	59	0.71	0.54±0.005	122.4±0.3	0.10±0.001
		2	24	59	0.71	0.55±0.006	122.3±0.6	0.11±0.008
		3	24	60	0.71	0.56±0.003	125.9±2.9	0.11±0.003
		4	24	61	0.71	0.56±0.002	127.7±0.3	0.12±0.0004
	5	24	62	0.71	0.58±0.004	127.8±0.4	0.12±0.001	
	oligonucleótidos que incrementan su longitud en su extremo 5'	1	25	62	0.73	0.23±0.003	52.0±0.0	0.18±0.018
		2	26	64	0.76	0.26±0.006	58.1±0.3	0.18±0.024
		3	27	67	0.79	0.29±0.005	65.7±0.4	0.20±0.001
		4	28	70	0.82	0.33±0.006	74.9±0.1	0.17±0.003
		5	29	73	0.85	0.49±0.004	110.8±0.3	0.20±0.014
	oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente	2	26	65	0.76	0.49±0.004	111.8±0.0	0.15±0.012
		4	28	69	0.82	0.51±0.005	115.8±0.3	0.16±0.001
		6	30	75	0.88	0.55±0.004	125.3±0.3	0.17±0.001
		8	32	81	0.94	0.57±0.0005	128.0±0.7	0.18±0.003
10		34	87	1	0.58±0.004	130.6±0.5	0.20±0.007	

Tabla 3. Parámetros de las curvas de hibridación.

Del lado izquierdo se indican las características de cada oligonucleótido blanco, longitud, número de puentes de hidrógeno que establece con el MB que lo hibrida y cociente *nucleótidos complementarios/longitud del MB*. Del lado derecho se muestran los valores de la pendiente ($m \pm DS$) de la fase exponencial de las curvas de cinética de hibridación, el valor del incremento de la intensidad de fluorescencia ($\Delta F \pm DS$) y el valor de la constante de asociación ($k_1 \pm DS$) para cada par MB-oligonucleótido blanco. UA significa unidades arbitrarias, y DS desviación estándar. Las secuencias de los MB y los oligonucleótidos se encuentran en la tabla 2, los colores de las secuencias corresponden con los de los números dispuestos a la izquierda de las columnas.

7.2. Transición del Estado Hibridado al Libre.

7.2.1. Temperaturas de Fusión del Híbrido MB-oligonucleótido Blanco.

Los resultados presentados en esta sección se encuentran concentrados en la Tabla 4, la misma se titula: Temperaturas de fusión (θ_m) entre el MB y sus oligonucleótidos blanco.

7.2.1.1. θ_m del MB9 con sus Oligonucleótidos Blanco.

Para los oligonucleótidos que son blanco tanto de MB9 como de MB128, el comportamiento es el que se esperaba. El grupo de oligonucleótidos que poseen la misma longitud (19 nucleótidos para MB9 y 24 para MB128), presenta una θ_m similar en todas las concentraciones de oligonucleótidos que se usaron para los ensayos (50, 250, 500, 1000 y 10000 nM), sin diferencias estadísticamente significativas ($n=6$, $p=0.05$). Las variaciones que se observan, aún cuando no son significativas, pueden deberse a que cada oligonucleótido blanco establece con el MB un número de puentes de hidrógeno (H) diferente. Esto, en función del % CGs que tiene la porción hibridada.

Los valores de θ_m del grupo de oligonucleótidos que aumentan su longitud en el extremo 5' (de 20 a 24 nucleótidos) es significativamente mayor a los valores de θ_m del grupo de oligonucleótidos de igual longitud. Además, el valor de θ_m de los oligonucleótidos que incrementan su longitud en el extremo 5', se incrementa significativamente ($n=6$, $p=0.05$), conforme aumenta la longitud del oligonucleótido. Esta tendencia se presenta para todas las concentraciones de oligonucleótidos que se usaron para los ensayos.

Para el grupo de oligonucleótidos que crece bilateralmente (21, 23, 25, 27 y 29 nucleótidos), los valores de θ_m tienen un comportamiento muy similar al de los del grupo de oligonucleótidos que crece sólo en su extremo 5'. Esto es, el valor de θ_m aumenta conforme se incrementa la longitud del oligonucleótido blanco.

El aumento de la θ_m es más pronunciado para el grupo de oligonucleótidos que crece bilateralmente que para el grupo que crece sólo en un extremo (5'). Porque para los oligonucleótidos del grupo que crece bilateralmente, el aumento de su longitud es de dos nucleótidos entre un oligonucleótido y el siguiente; mientras que para el grupo que crece en un sólo extremo, el crecimiento es de sólo un nucleótido a la vez.

El aumento en el número de puentes de hidrógeno MB-blanco, resultante del aumento de la longitud de los oligonucleótidos es lo que provoca el aumento de la θ_m . Claramente, estos aumentan de la misma manera que la longitud, es decir más para los oligonucleótidos que crecen bilateralmente, que para los que aumentan su longitud sólo en un extremo.

Para todos los oligonucleótidos del grupo, los valores de θ_m determinados experimentalmente son similares a los que se obtuvieron mediante el uso de un programa bioinformático [251].

7.2.1.2. θ_m del MB128 con sus Oligonucleótidos Blanco.

La θ_m del conjunto de oligonucleótidos de igual longitud (24 nucleótidos) se encuentra entre 69 y 69.75° C para la concentración de 50 nM, no existe diferencia significativa ($n=6$, $p=0.05$) para este valor. Por lo que puede asumirse que todos los oligonucleótidos que pertenecen a este conjunto tienen el mismo valor de θ_m . El valor de θ_m se incrementa de acuerdo al aumento de la concentración del oligonucleótido blanco. Para las demás concentraciones del oligonucleótido blanco (250, 500, 1000 y 10000 nM), las diferencias tampoco son significativas y puede asumirse que los oligonucleótidos de igual longitud tienen el mismo valor de θ_m .

Por otro lado, el grupo de oligonucleótidos que crecen en su extremo 5' (de 25 a 29 nucleótidos) tienen una θ_m significativamente mayor que la del grupo anterior (oligonucleótidos de igual longitud). Además el valor de θ_m se incrementa significativamente ($n=6$, $p=0.05$), conforme aumenta la longitud de los oligonucleótidos, esta tendencia se presenta en todas las concentraciones con las que se realizaron los ensayos (50, 250, 500, 1000 y 10000 nM).

Los oligonucleótidos que crecen bilateralmente muestran una tendencia similar a la de los oligonucleótidos que crecen sólo en su extremo 5', esto es, aumentan su valor de θ_m conforme aumenta su longitud. Este aumento es más pronunciado que el que se presenta en el grupo que solo crece en un extremo, ya que en el grupo que crece bilateralmente, en cada paso, la longitud de los oligonucleótidos se incrementa en dos nucleótidos (uno por extremo) y no en uno como ocurre en el grupo que crece sólo en un extremo. La tendencia de aumentar el valor de θ_m conforme aumenta la longitud se presenta en todas las concentraciones de oligonucleótidos usadas para realizar los ensayos.

Los valores θ_m determinados experimentalmente, en la mayoría de los casos, se parecen a los que fueron determinados mediante un programa bioinformático [239], [251]. Sin embargo, en pocas ocasiones, esto no ocurre, notándose las limitaciones del programa.

Por ejemplo, para el último oligonucleótido del grupo de los que crecen bilateralmente (10, el más largo), en las concentraciones de 1000 y 10000 nM, el programa calculó un valor de θ_m de 47.6 y 46.8 °C, respectivamente. Claramente, esto difiere mucho con los datos experimentales.

		θ_m medida ($^{\circ}$ C)					θ_m predicha ($^{\circ}$ C)					
		50 nM	250 nM	500 nM	5000 nM	10000 nM	50 nM	250 nM	500 nM	5000 nM	10000 nM	
MB9	oligonucleótidos de igual longitud	0	56 \pm 1	59.3 \pm 0.5	61.5 \pm 1	64 \pm 0.5	65.3 \pm 0.5	55.6	58.8	60.2	64.3	65.4
		1	54.8 \pm 0.8	57.5 \pm 0.5	59.5 \pm 0.5	62.5 \pm 0.5	64.5 \pm 0.5	56.9	59.9	61.2	65.1	66.1
		2	55 \pm 0.5	57.8 \pm 0.8	60.8 \pm 0.8	63.3 \pm 0.5	66.5 \pm 0.5	57	59.5	61.3	65.1	66.1
		3	54.5 \pm 0.5	56.3 \pm 0.5	58.5 \pm 0.5	63 \pm 1	65.5 \pm 0.5	56.5	59.5	60.8	64.6	65.6
		4	56.5 \pm 0.5	59.5 \pm 0.5	61.5 \pm 0.5	63.5 \pm 0.5	65.5 \pm 0.5	57	59.9	61.1	64.4	64.8
	5	55.5 \pm 0.3	58 \pm 1	60.5 \pm 0.5	64.5 \pm 0.5	66.5 \pm 0.5	57.2	60.1	61.3	64.6	65.2	
	oligonucleótidos que incrementan su longitud en su extremo 5'	1	58.5 \pm 0.5	60.5 \pm 0.5	62.3 \pm 0.5	64.5 \pm 0.5	67.3 \pm 0.5	57.5	60.5	61.8	65.6	66.6
		2	59.8 \pm 0.1	61.3 \pm 0.5	63.5 \pm 0.5	66 \pm 0	68.8 \pm 0.1	59.1	61.9	63.1	66.7	67.6
		3	62 \pm 0.5	63.7 \pm 0.1	65.5 \pm 0.5	67.5 \pm 0.5	70.3 \pm 0.5	60.1	62.9	64	67.4	68.3
		4	64.8 \pm 0.1	66.8 \pm 0.1	68.3 \pm 0.5	69.8 \pm 0.1	71.3 \pm 0.5	61.7	64.8	65.8	68.7	69.3
		5	65.8 \pm 0.1	67.5 \pm 0.5	68.8 \pm 0.1	71.3 \pm 0.5	73 \pm 0	64	66.5	67.4	70.1	70.5
	oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente	2	58.5 \pm 0.5	60.5 \pm 0.5	62.5 \pm 0.5	64.5 \pm 0.5	66.5 \pm 0.5	58.6	61.5	62.7	66.3	67.2
		4	61.5 \pm 0.5	62.8 \pm 0.1	64.3 \pm 0.5	66.5 \pm 0.5	68.3 \pm 0.5	61.2	63.9	65	68.2	69
		6	63 \pm 1	65 \pm 0.5	66.8 \pm 0.1	68.5 \pm 0.5	70.5 \pm 0.5	62.7	65.3	66.2	69.1	69.7
		8	64.5 \pm 0.5	65.8 \pm 0.1	67.3 \pm 0.5	69.8 \pm 0.1	71.5 \pm 0.5	65.6	67.8	68.7	70.5	52.9
10		66.3 \pm 0.5	69.3 \pm 0.5	71.5 \pm 0.5	73.8 \pm 0.1	74.8 \pm 0.1	68	70.1	70.8	71.6	56.8	
MB128	oligonucleótidos de igual longitud	0	69.5 \pm 1.3	70.3 \pm 0.8	72.3 \pm 0.6	73.8 \pm 0.5	75 \pm 0.8	68.8	71.5	75.7	75.7	76.1
		1	69.8 \pm 0.5	70.8 \pm 1	72.5 \pm 0.6	74.3 \pm 0.5	76.8 \pm 0.5	68.9	71.7	75.8	75.8	76.2
		2	69 \pm 1.2	70.8 \pm 1	72 \pm 1.2	74.5 \pm 6	76.5 \pm 0.5	69.6	72.3	76.3	76.3	76.8
		3	69.5 \pm 0.6	70.3 \pm 0.5	72 \pm 0	74.5 \pm 6	76.3 \pm 0.5	70.3	73	77	77	77.4
		4	69.8 \pm 1	70.8 \pm 0.5	72.3 \pm 1	74.5 \pm 0.5	76.8 \pm 0.5	70.8	73.4	77.3	77.3	77.7
	5	69.3 \pm 0.5	70.8 \pm 0.5	72.5 \pm 0.6	74.8 \pm 0.5	77.3 \pm 1	71.2	73.7	77.5	77.5	78	
	oligonucleótidos que incrementan su longitud en su extremo 5'	1	70.3 \pm 1	72.3 \pm 1	73 \pm 0	74.3 \pm 1.3	75.8 \pm 0.6	69.2	71.9	73	75.9	76.3
		2	70.8 \pm 0.5	72.5 \pm 0.6	73.75 \pm 0.5	74.5 \pm 0.5	76.8 \pm 1	70.2	72.9	73.9	76.7	77.1
		3	71.8 \pm 0.5	72.75 \pm 0.5	74.25 \pm 1.3	75 \pm 0	77.8 \pm 0.5	71.3	73.8	74.8	77.6	78
		4	73.3 \pm 0.5	74.3 \pm 0.5	75.25 \pm 0.5	76.8 \pm 0.5	78.3 \pm 0.5	72.2	74.7	75.6	78.2	78.6
		5	75 \pm 0.6	76.8 \pm 0.1	77.25 \pm 0.9	78.8 \pm 0.8	79.3 \pm 0.5	73.2	75.6	76.5	78.9	79.4
	oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente	2	70.5 \pm 0.6	71.8 \pm 0.5	72.8 \pm 0.5	74 \pm 0	75.3 \pm 0.5	69.5	72.2	73.2	76	76.3
		4	73 \pm 0.8	73.8 \pm 0.5	75 \pm 0	76.5 \pm 0.6	77.8 \pm 0.5	71.2	73.6	74.5	77	77.3
		6	74.3 \pm 0.5	75.8 \pm 0.5	76.8 \pm 0.5	77.8 \pm 0.5	79.3 \pm 0.5	72.8	75	75.8	78.1	78.5
		8	76.5 \pm 0.6	77 \pm 0	77.5 \pm 0.6	78.3 \pm 0.5	79.5 \pm 0.6	74.1	76.2	76.9	79	79.3
10		76.8 \pm 0.5	77.5 \pm 0.6	78.3 \pm 1	79.3 \pm 1	79.75 \pm 0.5	75.5	77.4	78.1	47.6	46.8	

Tabla 4. Temperaturas de fusión (θ_m) entre el MB y sus oligonucleótidos blanco.

Los oligonucleótidos blanco de cada MB (MB9 y MB128) se encuentran organizados en tres grupos: de igual longitud, que incrementan su longitud en su extremo 5' y que incrementan su longitud bilateralmente (extremo 3' y 5'). Los números de colores indican el número de nucleótidos que son hibridados en uno de los brazos (oligonucleótidos de igual longitud y que aumentan su longitud en el extremo 5'), o en ambos brazos (oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente). Se muestra $\theta_m \pm DS$ para cada par MB-oligonucleótido blanco, del lado izquierdo están los valores correspondientes a las mediciones experimentales, mientras del lado derecho se hallan los que fueron predichos mediante un programa bioinformático [274]. DS, significa desviación estándar. Las secuencias de los MB y los oligonucleótidos se encuentran en la tabla 2, los colores de las secuencias corresponden con los de los números dispuestos a la izquierda de las columnas.

7.2.2. Termodinámica de la Transición del Estado Hibridado al Libre.

Las gráficas de van't Hoff (Figura 12) muestran que el proceso de desnaturalización de los híbridos MB-oligonucleótido blanco es de tipo endotérmico (rectas con pendiente negativa). Las rectas, describen la termodinámica del proceso, $\Delta S_{1,2}$ está dada por su intersección con el eje y, mientras que $\Delta H_{1,2}$ es su pendiente (m). Las rectas que se encuentran a la izquierda representan híbridos MB-oligonucleótido blanco más estables y que por lo tanto requieren una mayor cantidad de energía calorífica para ser desnaturalizados (separados), en cambio, a la derecha se encuentran las rectas de los híbridos menos estables, y que, en consecuencia, requieren una menor cantidad de energía calorífica para ser desnaturalizados.

Los oligonucleótidos de igual longitud (Tabla 2), muestran rectas con un comportamiento muy similar, las mismas se encuentran muy cercanas unas de otras, concentradas, esto ocurre para ambos MBs, MB9 (Figura 12(a)) y MB128 (Figura 12(d)). Aunque las rectas correspondientes a los híbridos de MB128 con sus oligonucleótidos blanco se encuentran más concentradas que las correspondientes a MB9. Para ambos casos, MB9 y MB128, no existen diferencias significativas ($n=6$, $p=0.05$) para los valores de $\Delta S_{1,2}$ y $\Delta H_{1,2}$ (Tabla 5), por lo que puede asumirse que son similares.

Las rectas que corresponden a los oligonucleótidos que aumentan su longitud en el extremo 5' (Figura 12(b) y 12(e)), están más dispersas que las del grupo de oligonucleótidos de igual longitud (Figura 12(a) y 12(d)), descrito en el párrafo anterior. Para ambos MBs, MB9 (Figura 12(b)) y MB128 (Figura 12(e)), se observa que los oligonucleótidos más largos producen las curvas que están más a la izquierda y que por lo tanto forman los híbridos más estables y requieren de una mayor cantidad de energía para ser desnaturalizados. Los valores de $\Delta S_{1,2}$ y $\Delta H_{1,2}$ (Tabla 5) son significativamente diferentes ($n=6$, $p=0.05$) para cada híbrido MB-oligonucleótido blanco, por lo que puede asumirse que los híbridos conformados por oligonucleótidos más largos son significativamente más estables que los que están constituidos por oligonucleótidos de menor longitud.

Los oligonucleótidos que crecen bilateralmente poseen rectas que están más dispersas (Figura 12(c) y 12(f)) que las que describen los oligonucleótidos que solo crecen en el extremo 5' (Figura 12(b) y 12(e)), esto se debe a que los oligonucleótidos que crecen bilateralmente aumentan su longitud dos nucleótidos a la vez, entonces la estabilidad de los híbridos MB-oligonucleótido blanco aumenta de forma más abrupta, esta descripción se aplica para ambos MBs, MB9 (Figura 12(c)) y MB128 (Figura 12(f)). La forma en que las rectas se disponen en la gráfica es la misma, las rectas que están dispuestas más a la izquierda

corresponden a los híbridos más estables, mientras que las que se disponen más a la derecha son de los híbridos menos estables. Dado que los valores de $\Delta S_{1,2}$ y $\Delta H_{1,2}$ (Tabla 5) son estadísticamente diferentes ($n=6$, $p=0.05$) entre los diferentes híbridos MB-oligonucleótido blanco, puede decirse que los oligonucleótidos de mayor longitud producen híbridos más estables que los más cortos.

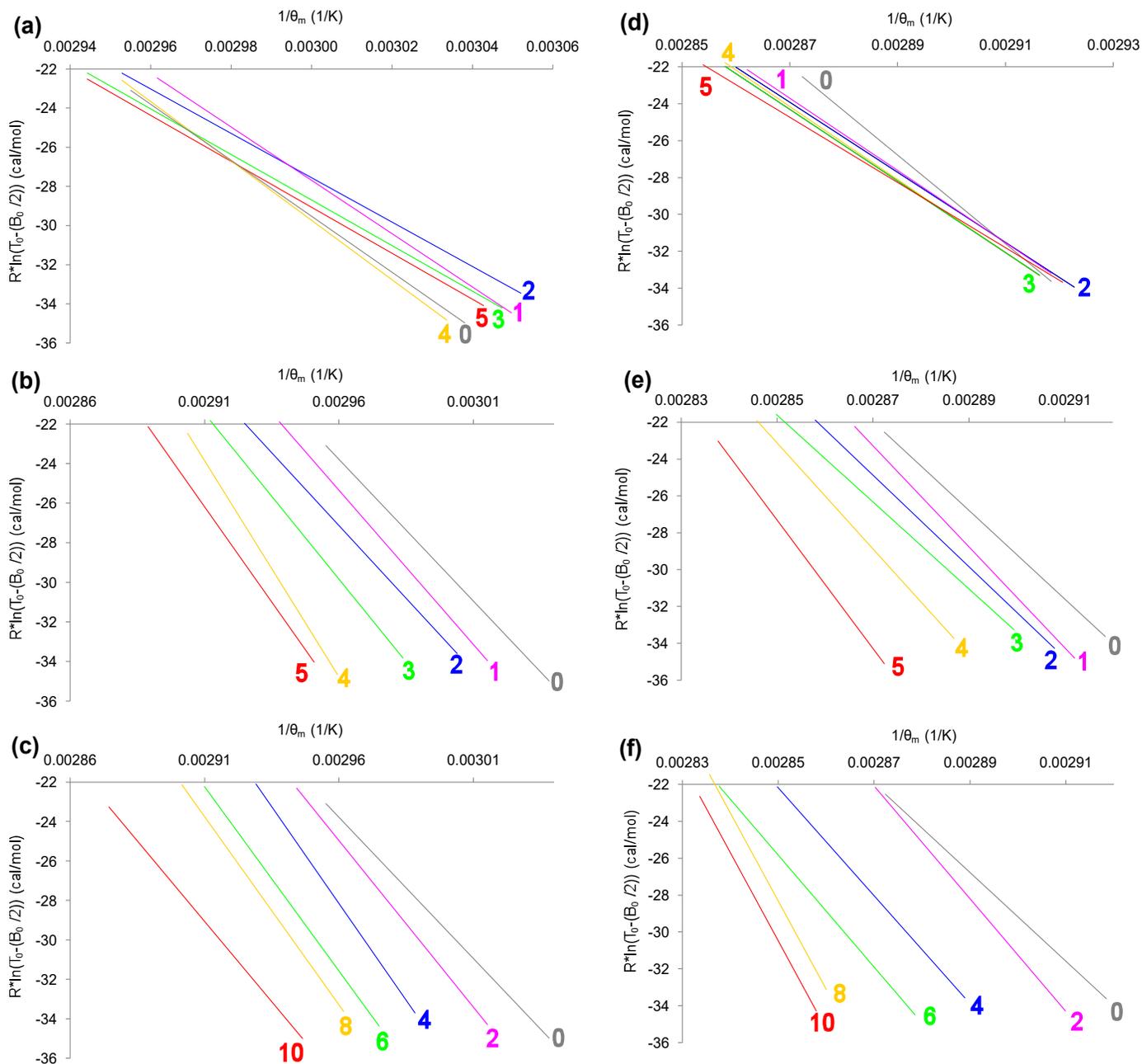


Figura 12. Termodinámica de la transición entre el estado hibridado y el estado libre del MB.

Para cada par MB-oligonucleótido blanco hay una recta ($y = mx + b$) que describe la termodinámica de la transición entre el estado hibridado (1) y el estado libre en conformación de tallo-asa (2), su pendiente (m) es igual a $\Delta H_{1,2}$, mientras que la intersección con el eje y (b) es igual a $\Delta S_{1,2}$. Los números de colores indican la cantidad de nucleótidos que los oligonucleótidos blanco hibridan en uno ((a), (b), (d) y (e)), o ambos brazos ((c) y (f)) del MB. Las secuencias tanto de los MBs como de los oligonucleótidos se encuentran en la Tabla 2, los colores de las secuencias corresponden con los de las rectas.

		medida		predicha		
		$\Delta H_{1,2}$ (kcal/mol)	$\Delta S_{1,2}$ (cal/mol*K)	$\Delta H_{1,2}$ (kcal/mol)	$\Delta S_{1,2}$ (cal/mol*K)	
MB9	oligonucleótidos de igual longitud	0	143.0±6	399.3±17	133.1	370.2
		1	136.4±4	381.5±12	142.3	396.5
		2	116.3±2	320.3±5	141.1	393.1
		3	113.3±2	312.5±5	143.8	401.6
		4	152.0±4	426.1±0.6	164.9	464.9
		5	117.3±1	322.8±4	162.8	458.1
	oligonucleótidos que incrementan su longitud en su extremo 5'	1	155.6±0.5	435.3±1	144.7	402.9
		2	146.8±4	407.5±12	155.7	434
		3	166.9±4	464.3±12	163.3	455.3
		4	218.1±12	610.9±36	178.4	497.8
		5	191.7±4	531.6±11	207.5	580.6
	oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente	2	168.8±0.5	474.7±0.7	153.9	429.2
		4	196.2±5	552.5±16	172.3	480.7
		6	186.4±10	520.2±31	193.1	540.3
		8	190.7±2	531.3±6	246.8	693.5
10		163.2±7	445.9±21	318.1	896.9	
MB128	oligonucleótidos de igual longitud	0	239.8±18	666.1±50	188.9	517.7
		1	197.0±4	541.5±13	189.8	519.9
		2	197.1±19	541.9±56	194.3	532.1
		3	182.9±1	500.8±4	196.6	537.5
		4	195.6±8	537.1±23	202.7	554.6
		5	176.9±9	482.9±27	207.3	576.3
	oligonucleótidos que incrementan su longitud en su extremo 5'	1	265.3±29	737.7±81	195.4	535.9
		2	248.7±18	688.9±53	202.9	556
		3	233.9±3	659.9±31	209.3	572.7
		4	287.8±0.8	797.1±1	192.7	524.4
		5	340.9±12	944.2±35	231.9	634.6
	oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente	2	303.3±12	848.3±35	203.7	559.5
		4	288.3±9	799.5±25	229.3	630.9
		6	303.3±0.9	838.5±1	249.8	687.0
		8	468.7±43	1307.7±124	274.8	756.3
10		469.4±25	1307.3±74	276.7	758.9	

Tabla 5. Termodinámica de la transición entre el estado hibridado y el libre.

Del lado izquierdo, se muestran los valores de $\Delta H_{1,2} \pm DS$ y $\Delta S_{1,2} \pm DS$ determinados experimentalmente; mientras que del lado derecho, se enlistan los que fueron predichos mediante un programa bioinformático [239]. Arriba para MB9 y abajo para MB128. Los colores de los números dispuestos a la izquierda de las columnas corresponden con los de la tabla 2.

7.3. Equilibrio o Fase Estacionaria.

7.3.1. Medida de la Estabilidad en el Equilibrio.

Se dice que una solución que contiene a un MB y a su oligonucleótido blanco a alcanzado el equilibrio, cuando las concentraciones de las tres especies, estas son: MB libre en su conformación de tallo-asa, MB libre desestructurado e híbrido MB-oligonucleótido blanco, se mantienen constantes y por lo tanto la intensidad de fluorescencia tiene un valor asintótico.

La energía de Gibbs (ΔG), conocida anteriormente como energía libre de Gibbs, puede interpretarse en el equilibrio ($\Delta G_{1,2}$), como la estabilidad de un híbrido MB-oligonucleótido blanco determinado. Un valor positivo de la energía de Gibbs ($\Delta G_{1,2} > 0$), indica que el híbrido MB-oligonucleótido blanco no se separará de forma espontánea, sino que se necesita introducir energía al sistema para que la desnaturalización sobrevenga. Mientras mayor sea el valor de $\Delta G_{1,2}$, mayor será la estabilidad del híbrido y en consecuencia, será requerida una mayor cantidad de energía para que el MB se separe de su oligonucleótido blanco.

Los valores de $\Delta G_{1,2}$ para el conjunto de oligonucleótidos que tienen la misma longitud es similar (Tabla 6), $20175.9455 < \Delta G_{1,2} < 24905.3405$ para los que son hibridados por MB9, y $32889.0375 < \Delta G_{1,2} < 35641.5606$ para los que son blanco de MB128 (25° C). Sin embargo, dentro del conjunto de oligonucleótidos que hibrida a MB128 el que hibrida solo el asa y por lo tanto ningún nucleótido del tallo (0), sale de dicho intervalo y tiene una $\Delta G_{1,2}$ estadísticamente diferente. Ya que para todos los demás oligonucleótidos blanco, las diferencias no son estadísticamente significativas ($n=6$, $p=0.05$), es posible asumir que los híbridos que forman todos los oligonucleótidos de la misma longitud tanto para MB9, como para MB128 tienen una estabilidad similar para las tres temperaturas para las que se realizaron los cálculos (25, 30 y 37° C). Las variaciones que se observan pueden deberse a que cada oligonucleótido establece un número distinto de puentes de H con el MB que los hibrida, aún cuando su longitud sea la misma.

Para el conjunto de oligonucleótidos que aumentan su longitud en su extremo 5' y que son hibridados por MB9, el valor de $\Delta G_{1,2}$ (Tabla 6) es diferente estadísticamente ($n=6$, $p=0.05$), las diferencias se presentan entre el grupo que hibrida el asa y el brazo 3' con 1, 2 y 3 nucleótidos (1, 2 y 3) y los últimos dos oligonucleótidos del conjunto de los que aumenta su longitud en el extremo 5' (4 y 5). Dentro del

conjunto de oligonucleótidos que aumenta su longitud en su extremo 5', hay un aumento gradual de la estabilidad expresada como $\Delta G_{1,2}$, aún cuando este no sea estadísticamente significativo para todos los elementos del conjunto. El comportamiento del conjunto de oligonucleótidos que crecen en su extremo 5' y que hibridan a MB128 es idéntico, las diferencias son significativas sólo entre el conjunto de los tres primeros oligonucleótidos y los últimos dos, y aunque hay un aumento gradual en el valor de $\Delta G_{1,2}$, el mismo no es significativo para todos los elementos del conjunto.

Para los oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente y son hibridados por MB9 (Tabla 6), sólo existen diferencias significativas ($n=6$, $p=0.05$) en el valor de $\Delta G_{1,2}$ entre el primer oligonucleótido blanco (2) y los otros cuatro (4, 6, 8 y 10). Mientras que para los que son blanco de MB128 (Tabla 6), sólo hay diferencias estadísticamente significativas ($n=6$, $p=0.05$), entre el valor de $\Delta G_{1,2}$ de los primeros tres (2, 4 y 6) y los dos últimos (8 y 10) oligonucleótidos blanco. No parece existir una lógica que explique este comportamiento, ya que no existe una tendencia o coorelación aparente.

			$\Delta G_{1,2}$ (kcal/mol) 25° C = 298.15 K	$\Delta G_{1,2}$ (kcal/mol) 30° C = 303.15 K	$\Delta G_{1,2}$ (kcal/mol) 37° C = 310.15 K
MB9	oligonucleótidos de igual longitud	0	23.9±0.9	21.9±0.8	19.1±0.7
		1	22.6±0.6	20.7±0.6	18.1±0.5
		2	20.8±0.4	19.2±0.4	16.9±0.3
		3	20.2±0.7	18.6±0.03	16.4±0.1
		4	24.9±0.2	22.8±0.2	19.8±0.2
		5	21.0±0.3	19.4±0.3	17.2±0.3
	oligonucleótidos que aumentan su longitud en el extremo 5'	1	25.8±0.3	23.7±0.3	20.6±0.2
		2	25.3±0.6	23.3±0.5	20.5±0.4
		3	28.5±0.3	26.2±0.2	22.9±0.1
		4	35.9±0.1	32.9±1	28.7±1.0
		5	33.2±0.6	30.5±0.6	26.8±0.5
	oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente	2	27.3±0.3	24.9±0.3	21.6±0.3
		4	31.4±0.4	28.7±0.3	24.8±0.2
		6	31.3±1.6	28.8±1.4	25.1±1.2
		8	32.3±0.1	29.7±0.03	26.0±0.01
10		30.3±1.1	28.0±1.0	25.0±0.9	
MB128	oligonucleótidos de igual longitud	0	41.2±2.9	37.8±2.7	33.2±2.3
		1	35.6±0.2	32.9±0.2	29.1±0.1
		2	35.5±3.2	32.8±2.9	29.0±2.5
		3	33.6±0.2	31.1±0.02	27.6±0.1
		4	35.5±1.5	32.8±1.4	29.0±1.2
		5	32.9±1.0	30.5±0.9	27.1±0.7
	oligonucleótidos que aumentan su longitud en el extremo 5'	1	45.3±4.5	41.6±4.1	36.5±3.5
		2	43.3±2.1	39.8±1.9	35.0±1.5
		3	37.1±6.1	33.8±6.3	29.2±6.5
		4	50.1±0.5	46.2±4.7	40.6±0.5
		5	59.4±1.4	54.6±1.2	48.0±1.0
	oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente	2	50.4±2.0	46.1±1.8	40.2±1.6
		4	50.0±1.6	45.9±1.5	40.4±1.3
		6	53.3±0.5	49.1±0.5	43.2±0.5
		8	78.9±6.0	72.3±5.4	63.2±4.5
10		79.6±3.1	73.0±2.7	63.9±2.2	

Tabla 6. Estabilidad de los híbridos MB-oligonucleótido blanco.

Se muestran los valores de la estabilidad ($\Delta G_{1,2}$) de cada híbrido calculado a temperatura ambiente (25° C), temperatura de hibridación dentro del espectrofluorómetro (30° C) y temperatura fisiológica (37° C). Arriba para MB9 y abajo para MB128. Los colores de los números dispuestos a la izquierda de las columnas corresponden con los de la Tabla 2.

7.3.2. Proporción del MB que está Unido a su Blanco en el Equilibrio.

En un ensayo determinado, es importante conocer la proporción de MB que se encuentra unido a su blanco en el equilibrio y en consecuencia aquella que no lo está (α). En MBs con alto nivel de pureza, en los que puede asumirse que no están presentes subproductos de síntesis como MBs con fluoróforo pero sin apagador o incluso fluoróforos libres, la señal de fondo o fluorescencia basal (*background*), es producida por la pequeña porción de MBs que no se unen a su blanco y además se encuentran en su conformación desestructurada (*random coil*). Probablemente, en ensayos *in vitro*, como la PCR cuantitativa (qPCR) o los ensayos de hibridación en espectrofluorómetros (Figura 11), la pequeña proporción de MBs libres y en conformación desestructurada no sea determinante para que un ensayo sea exitoso o no; pero cuando se trata de ensayos en células vivas, en los que se analizan conjuntos de tres o cinco células y en estas se visualizan algunas centenas de moléculas, como en los ensayos para monitorear miRNAs, la cantidad de MBs no unidos a sus blancos puede ser determinante para que un ensayo tenga un desempeño adecuado o no.

Para el conjunto de oligonucleótidos de la misma longitud, puede asumirse que no existen diferencias estadísticamente significativas ($n=6$, $p=0.05$) que permitan concluir que uno u otro oligonucleótido tiene un valor α mayor o menor respecto a los otros oligonucleótidos del conjunto. Este comportamiento se observa tanto para los oligonucleótidos que son blanco de MB9, como con los que son hibridados por MB128, en cualquiera de las tres temperaturas (25, 30 y 37° C) para las que fue calculado el valor de α (Tabla 7).

El valor de α disminuye conforme aumenta la longitud de los oligonucleótidos blanco de MB9 que aumentan su longitud en su extremo 5' (Tabla 7), esto aplica entre los oligonucleótidos más largos (3, 4 y 5) y los más cortos (1 y 2). El comportamiento es similar para los oligonucleótidos que crecen en su extremo 5' y son hibridados por MB128, pero la diferencia es estadísticamente significativa ($n=6$, $p=0.05$) sólo entre los tres oligonucleótidos más cortos (1, 2 y 3) y los dos más largos (4 y 5).

Para el conjunto de oligonucleótidos que son hibridados por MB9 y que crecen bilateralmente no hay diferencias estadísticamente significativas ($n=6$, $p=0.05$) en cuanto a sus valores α ; sin embargo, para los oligonucleótidos blanco de MB128 si existen diferencias entre los tres oligonucleótidos más cortos (2, 4 y 6) y los dos más largos (8 y 10).

		longitud (nt.)	número de puentes de H	nt. complementarios / longitud del MB	α a 25° C [M]	α a 30° C [M]	α a 37° C [M]		
MB9 (longitud = 29 nucleótidos)	oligonucleótidos de igual longitud	0	19	44	0.66	2.9E-24±3.5E-24	1.4E-22±1.6E-22	2.5E-20±2.5E-20	
		1	19	45	0.66	1.8E-23±1.7E-23	7.4E-22±6.4E-22	1.2E-19±8.4E-20	
		2	19	45	0.66	3.1E-22±1.9E-22	7.7E-21±4.5E-21	5.8E-19±3.1E-19	
		3	19	46	0.66	8.1E-22±9.2E-24	1.9E-20±1.1E-21	1.3E-18±1.6E-19	
		4	19	44	0.66	2.9E-25±1.2E-25	2.0E-23±7.8E-24	5.9E-21±2.2E-21	
		5	19	47	0.66	2.0E-22±1.1E-22	5.3E-21±2.5E-21	4.2E-19±1.8E-19	
	oligonucleótidos que incrementan su longitud en el extremo 5'	1	20	47	0.69	6.1E-26±2.6E-26	4.6E-24±1.9E-24	1.6E-21±6.1E-22	
		2	21	49	0.72	1.8E-25±1.5E-25	9.9E-24±7.7E-24	2.3E-21±1.5E-21	
		3	22	52	0.76	6.9E-28±3.1E-28	7.0E-26±2.4E-26	3.5E-23±7.5E-24	
		4	23	53	0.79	8.1E-33±1.2E-32	2.6E-30±3.6E-30	6.3E-27±7.7E-27	
		5	24	58	0.83	3.3E-31±3.2E-31	6.5E-29±5.7E-29	7.9E-26±6.0E-26	
	oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente	2	21	50	0.72	5.4E-27±2.4E-27	5.9E-25±2.5E-25	3.3E-22±1.4E-22	
		4	23	54	0.79	5.2E-30±3.4E-30	1.2E-27±6.0E-28	1.7E-24±5.8E-25	
		6	25	60	0.86	2.8E-29±4.4E-29	3.8E-27±5.7E-27	2.9E-24±4.0E-24	
		8	27	66	0.93	9.9E-31±1.0E-31	2.0E-28±1.1E-29	2.5E-25±3.4E-27	
		10	29	72	1	8.6E-29±1.2E-28	6.8E-27±8.8E-27	2.5E-24±2.9E-24	
	MB128 (longitud = 34 nucleótidos)	oligonucleótidos de igual longitud	0	24	59	0.71	1.5E-35±2.5E-35	7.2E-33±1.2E-32	2.9E-29±4.9E-29
			1	24	59	0.71	3.9E-33±1.6E-33	9.3E-31±2.7E-31	1.5E-27±1.9E-28
2			24	59	0.71	3.1E-31±5.3E-31	4.3E-29±7.4E-29	3.4E-26±5.7E-26	
3			24	60	0.71	1.2E-31±3.1E-35	1.9E-29±6.5E-31	1.8E-26±1.4E-27	
4			24	61	0.71	2.3E-32±3.5E-32	4.3E-30±6.3E-30	5.0E-27±6.9E-27	
5			24	62	0.71	8.6E-31±1.1E-30	9.7E-29±1.1E-28	5.8E-26±5.6E-26	
oligonucleótidos que incrementan su longitud en el extremo 5'		1	25	62	0.74	2.0E-37±3.5E-37	1.5E-34±2.5E-34	1.0E-30±1.8E-30	
		2	26	64	0.76	1.2E-37±1.9E-37	7.3E-35±1.2E-34	4.3E-31±6.6E-31	
		3	27	67	0.79	3.2E-30±5.6E-30	2.4E-27±4.1E-27	1.7E-23±2.9E-23	
		4	28	70	0.82	1.1E-43±8.0E-44	3.2E-40±2.3E-40	1.5E-35±1.1E-35	
		5	29	73	0.85	5.7E-50±8.5E-50	5.7E-46±7.9E-46	1.4E-40±1.7E-40	
oligonucleótidos que incrementan su longitud bilateralmente		2	26	65	0.76	6.2E-43±1.0E-42	2.2E-39±3.4E-39	1.2E-34±1.8E-34	
		4	28	69	0.82	6.1E-43±9.4E-43	1.5E-39±2.2E-39	5.4E-35±7.7E-35	
		6	30	75	0.88	5.5E-46±4.3E-46	2.5E-42±1.9E-42	2.2E-37±1.6E-37	
		8	32	81	0.94	6.5E-61±1.1E-60	9.1E-56±1.6E-55	7.7E-49±1.3E-48	
		10	34	87	1	1.5E-63±2.6E-63	3.5E-58±6.0E-58	6.0E-51±10.0E-51	

Tabla 7. Proporción del MB que permanece unido a su blanco en el equilibrio.

Se muestran algunas características (columnas de la izquierda) de los oligonucleótidos blancos de MB9 (arriba) y MB128 (abajo) *i. e.* longitud, número de puentes de hidrógeno que forman con el MB que los hibrida y proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB*. También se muestran los valores de α calculados a temperatura ambiente (25° C), temperatura de hibridación dentro del espectrofluorómetro (30° C) y temperatura fisiológica (37° C). E significa x10, como en la notación de Excel de Microsoft®. Las secuencias de los MB y los oligonucleótidos se encuentran en la tabla 2, los colores de las secuencias corresponden con los de los números dispuestos a la izquierda de las columnas (Tabla 2).

7.4. Ensayos en el Microscopio Confocal.

7.4.1. Interacción del MB con SLO.

Es posible que los MBs interactúen con proteínas de forma inespecífica y produzcan falsos positivos (sección 4.5.2, página 34), por esa razón se determinó si la SLO interactúa o no con el MB9 o el MB128 (en la sección 6.10, página 59, se describe el diseño). Para ambos MBs el resultado fue negativo, de manera representativa se muestra el resultado de MB128 (Figura 13).

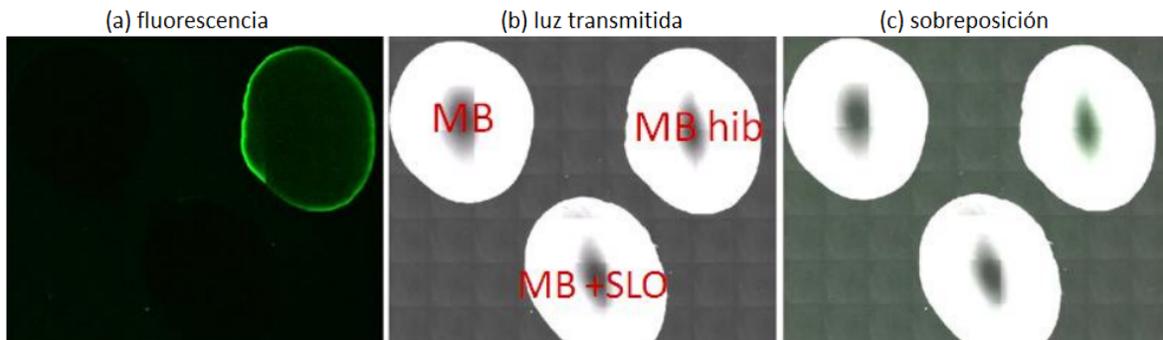


Figura 13. Interacción de MBs con SLO.

Se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia (Olympus FV10) de tres muestras: MB, que corresponde a MB128 sin oligonucleótido blanco; MB hib, que es el MB128 en presencia de su oligonucleótido blanco; y MB+SLO, que corresponde a MB128 sin su oligonucleótido blanco, pero en presencia de SLO.

Como puede apreciarse (Figura 13), de las tres muestras (MB, MB128 sin oligonucleótido blanco; MB hib, MB128 + oligonucleótido blanco; y MB+SLO, MB128 sin su oligonucleótido blanco, pero en presencia de SLO) sólo la que corresponde al MB en presencia de su oligonucleótido blanco fue la que presentó fluorescencia, lo que determina que los MBs de DNA sin modificaciones estructurales, como lo son MB9 y MB128 no interactúan con SLO de manera significativa para interferir con los ensayos de microscopía confocal.

7.4.2. Entrada de un MB al Citoplasma de Células Vivas.

Se determinó si los MBs podían entrar al citoplasma de células vivas, Para ello, se trataron células HEK-293 con SLO y se monitoreó el proceso durante 60 minutos a través del microscopio confocal Olympus FV10 (Figura 14). El diseño del experimento se describe a detalle en la sección 6.10 (página 59).

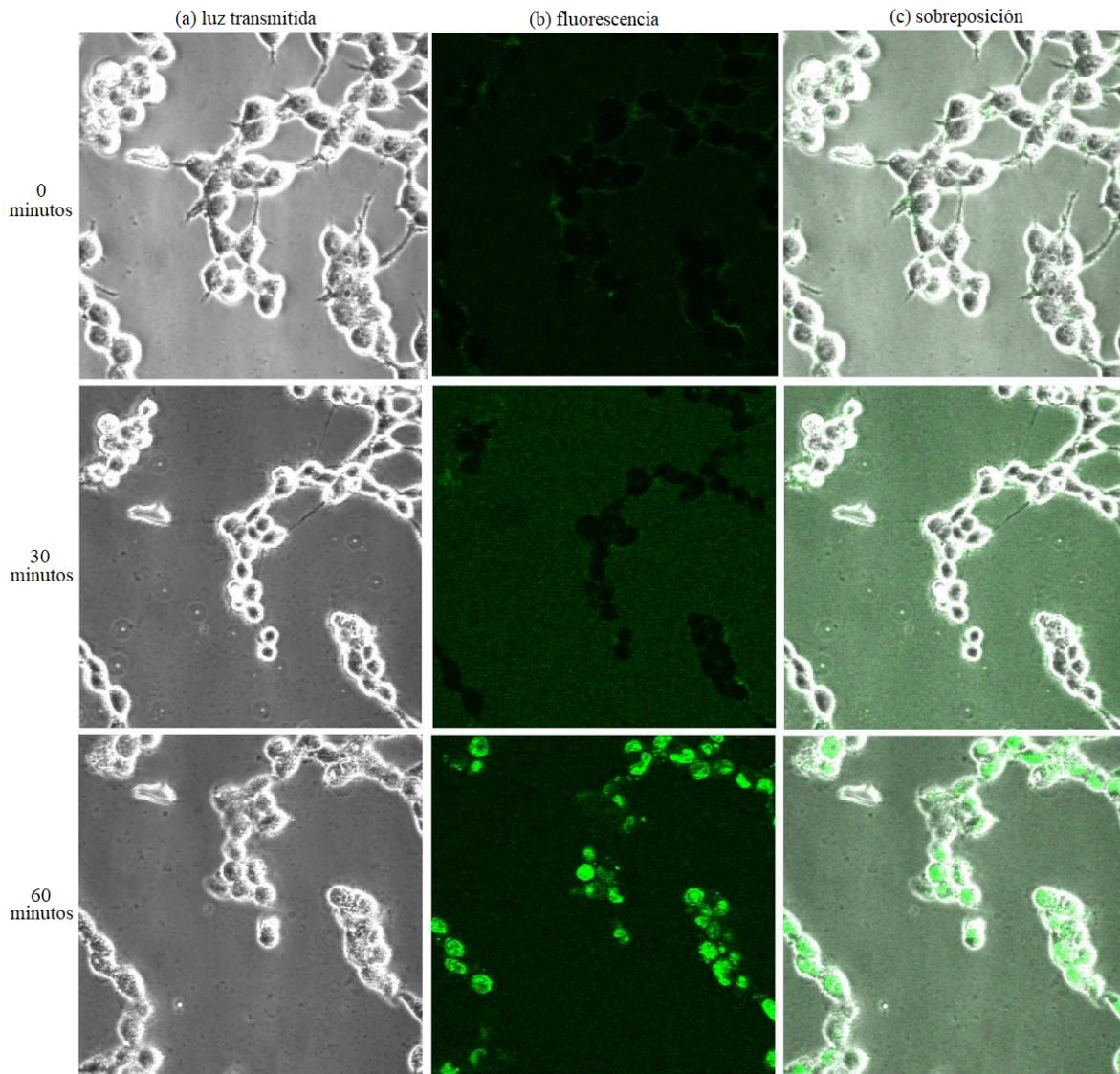


Figura 14. Entrada de MBs al citoplasma de células vivas.

Se muestra la entrada de MB128 a células HEK-293 vivas a través de poros transitorios formados por SLO. (a) luz transmitida, (b) fluorescencia y (c) imágenes superpuestas. A los 0 minutos los MBs se encuentran poco distribuidos, a los 30 minutos se han distribuido uniformemente en el medio y a los 60 minutos se han concentrado en el citoplasma de las células.

Se observa como MB128 es capaz de entrar a través de poros transitorios formados por SLO (Figura 14). Después de 60 minutos, la fluorescencia aumenta de forma considerable en el citoplasma, lo que es indicativo de que el MB128 entró al citoplasma de las células HEK-293 vivas.

7.4.3. Visualización de miR-128 en Células Fijas.

Se visualizó mediante microscopia confocal a miR-128 (Figura 15) en células HEK-293 que fueron previamente transfectadas con el vector Dpa-miR-128 (sobrexpresión de miR-128), se usó como sonda a MB128.

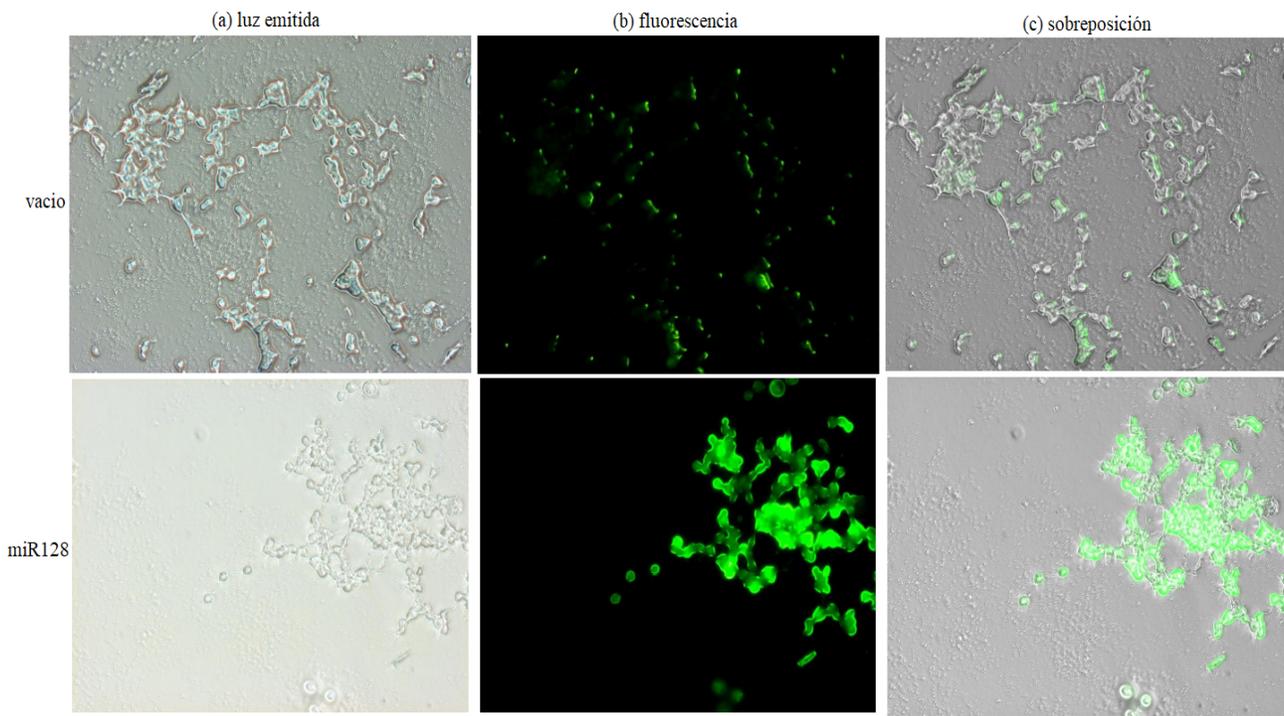


Figura 15. Visualización de miR-128 en células fijas.

Se observan células HEK-293 transfectadas con el vector pcDNA 3.1 (+) que no contiene al inserto para sobreexpresar a miR-128 (vacio), y células transfectadas con el vector Dpa-miR-128 diseñado para sobreexpresar a miR-128.

Fue posible visualizar a miR-128 en células fijas transfectadas con un vector para sobreexpresarlo (Dpa-miR-128), se usó a MB128 como sonda (Figura 15), la misma cuenta con la capacidad para hibridar tanto a miR-128 maduro como a su precursor (pre-miR-128). Antes de realizar la observación a través del microscopio confocal, no fue necesario realizar un lavado para eliminar la porción de sonda que no se hibridó a su blanco, toda vez que la sonda (MB128), cuenta con un apagador de fluorescencia.

En la Figura 15, al comparar el panel que corresponde a la fluorescencia (b) de las células HEK-293 transfectadas con el vector “vacío” (pcDNA 3.1 (+)), con el de la fluorescencia (b) de las células transfectadas con el vector que posee el inserto para sobreexpresar a miR-128 (Dpa-miR-128), puede observarse que para este último la fluorescencia es más alta. La fluorescencia mostrada en el primer caso (células transfectadas con el vector “vacío”) se debe tanto a la fluorescencia basal de MB128 como a la autofluorescencia natural que presentan las células.

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

Las curvas de las cinéticas de hibridación, así como sus parámetros (m , ΔF y k_1), muestran que los oligonucleótidos blanco de igual longitud (19 nucleótidos para MB9 y 24 para MB128), tienen un comportamiento muy similar en el proceso de hibridación, independientemente de las porciones que usan para hibridar al blanco, esto es, sólo el asa, o esta y total o parcialmente el brazo 3'. Por lo que, es posible afirmar que la cinética de hibridación y en consecuencia sus parámetros, están determinados por la longitud del oligonucleótido y no por la porción con la que el MB hibrida a su blanco.

Por el contrario, tanto los oligonucleótidos que crecen bilateralmente, como los que lo hacen sólo en su extremo 5', conforme aumentan su longitud, producen curvas de hibridación con pendientes más pronunciadas, así mismo, los parámetros de estas (m , ΔF y k_1), aumentan al incrementarse la longitud de los oligonucleótidos blanco. Como consecuencia, puede decirse que los oligonucleótidos más largos producen curvas de cinética de asociación con pendientes visiblemente más pronunciadas, además, los parámetros de estas (m , ΔF y k_1), aumentan conforme lo hace la longitud de los oligonucleótidos blanco. Este fenómeno se debe más que a la longitud del oligonucleótido, a la proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB*.

El hecho de que los oligonucleótidos blanco con una mayor proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB* produzcan curvas de hibridación con una pendiente más pronunciada y con parámetros cinéticos mayores en comparación con oligonucleótidos con una proporción menor, permite saber que, los MBs que usan total o parcialmente uno o ambos brazos para hibridar a su blanco lo harían de una forma más eficiente que los convencionales (usan sólo el asa para hibridar). Por esto, es más conveniente elegir este tipo de diseños cuando la cantidad del blanco es baja y siempre que las condiciones del mismo lo permitan; esto es, secuencia, longitud, estructura secundaria y terciaria, etcétera.

El incremento de la fluorescencia (ΔF) también es un factor a considerar. Los oligonucleótidos con mayor proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB*, hacen que el fluoróforo y el apagador de fluorescencia se separen más, con esto, aumenta la intensidad de la señal, y se incrementa la sensibilidad del ensayo porque aumenta la proporción *señal/fondo*.

Como es de esperarse, mientras más largos son los oligonucleótidos y mayor es la proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB*, la θ_m también aumenta. Esto significa que, aun cuando la temperatura sea alta, una proporción suficiente de MBs permanece unida a su blanco, permitiendo su detección. Aunque la θ_m no es una medida de la estabilidad de un híbrido MB-blanco, si nos permite saber que una proporción adecuada de un determinado MB se mantendrá unido a su blanco a determinada temperatura. Como se mencionó anteriormente, esto, es determinante para ensayos en células vivas, las cuales deben mantenerse a temperatura fisiológica, a esta temperatura, los MBs deben tener la capacidad de discriminar entre un blanco

completamente complementario y otro con el que existe el desapareamiento de una sola base. Todavía no se explora la posibilidad de realizar ensayos en células de especies cuya temperatura fisiológica sea superior, por ejemplo, los pollos (42 °C); en este caso, es necesario considerar esta variante en el diseño.

Es posible observar en las gráficas de van't Hoff, que la cantidad de energía que se requiere para desnaturalizar a un híbrido MB-oligonucleótido blanco, aumenta conforme aumenta la longitud del blanco y en consecuencia su proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB*, este fenómeno se presenta tanto en los oligonucleótidos que crecen en su extremo 5', como en los que lo hacen bilateralmente. En el mismo sentido, $\Delta G_{1,2}$ tiende a aumentar conforme aumenta la longitud y proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB* de los oligonucleótidos blanco. Lo descrito en las líneas anteriores, permite afirmar que los oligonucleótidos más largos producen híbridos más estables y que por lo tanto requieren más energía para ser desnaturalizados que oligonucleótidos más cortos.

La proporción de oligonucleótido blanco libre en el equilibrio (α) disminuye conforme aumenta la longitud y la proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB* de los híbridos. El fenómeno, se presenta tanto cuando se aumenta la longitud de los oligonucleótidos en el extremo 5', como cuando se hace de manera bilateral. Con lo anterior, es posible asegurar, que si se realizan ensayos usando MBs que tengan una mayor proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB*, disminuirá la proporción seal/fondo, aumentará la intensidad de seal y la sensibilidad.

La SLO, no interactúa con MBs hechos con DNA que poseen como fluoróforo en el extremo 5' a 6-FAM y Dabcyl como apagador de fluorescencia en su extremo 3', al menos no a un nivel detectable por el microscopio confocal (FV-10). La SLO permite la entrada del MB128 al citoplasma de células HEK-293 mediante los poros transitorios que forma en su membrana. MB128 es capaz de detectar a miRNA-128 (exógeno) en células HEK-293 fijas y previamente transfectadas con el vector plasmídico Dpa-miR-128 para sobreexpresarlo.

De acuerdo a lo descrito en esta sección, los MBs que hibridan a sus blancos usando no sólo su asa, sino adicionalmente nucleótidos en uno o ambos brazos (3' y 5') y que por lo tanto tienen una mayor proporción *nucleótidos complementarios/longitud del MB*, hibridan más rápidamente a su blanco, tienen una mayor intensidad de señal, forman híbridos MB-blanco más estables que requieren de una mayor cantidad de energía para separarse, y tienen una α menor, por lo que son más adecuados para ser usados en ensayos en donde los blancos sean escasos, como lo que ocurre en la detección de microRNAs en células vivas. Es posible introducir MBs de este tipo en células vivas mediante poros transitorios formados por SLO para detectar microRNAs como miR-128.

IX. PERSPECTIVAS.

Si bien, el presente trabajo sienta las bases para diseñar MBs con mejor desempeño que los convencionales (hibridan a su blanco sólo con el asa), queda pendiente el uso de oligonucleótidos blanco que no formen estructuras secundarias (por ejemplo, hechos de LNA) y que puedan ser hibridados por los MBs usando ambos brazos, de tal manera que se puedan determinar los parámetros de los MBs con este diseño, sin que los altere la estructura secundaria que pudieran tener los oligonucleótido blanco.

Los MBs que hibridan a sus blancos usando parcial o totalmente uno o ambos brazos podrían ser adecuados para detectar blancos cuya cantidad o concentración sea baja tanto *in vitro*, como miRNAs en células vivas. Sin embargo, hace falta explorar el desempeño de los mismos en ensayos con células vivas, tanto con miRNAs sobreexpresados mediante vectores, como con miRNAs endógenos que determinadas líneas celulares expresan bajo ciertas condiciones fisiológicas. Para estos propósitos se diseñaron dos experimentos que se describen en los párrafos siguientes.

Para detectar miRNAs sobreexpresados en células vivas, es posible transfectar células de la línea HEK-293 con el vector Dpa-miR-128 para visualizar a miRNA-128 mediante microscopia confocal usando MB128 (sonda) introducido a través de poros transitorios inducidos por SLO. Un procedimiento similar puede realizarse con el plásmido pPG-miR-9-EGFP para visualizar a miRNA-9 usando MB9 como sonda.

Las células de la línea SHSY-5Y tienen la capacidad de expresar, bajo ciertas condiciones fisiológicas, cantidades detectables (*Northern Blot*) tanto de miRNA-9 como de miRNA-128. Es posible, cultivar *in vitro* células SHSY-5Y, agregar ácido transretinoico (ATRA) para inducir su diferenciación y monitorear la expresión de miR-128 durante el proceso usando MB128 como sonda y SLO como agente permeabilizante de la membrana celular. También es posible, visualizar a miR-9 endógeno, expresado por células de la línea SHSY-5Y bajo condiciones de estrés oxidativo (presencia de H₂O₂ en el medio), mediante microscopia confocal usando MB9 como sonda y SLO como agente permeabilizante de la membrana celular.

APÉNDICES.

Apéndice A

Nomenclatura de microRNAs.

A la fecha, han sido descritos cientos de miRNAs en diversas especies vegetales, animales y de protozoarios. Sin embargo, su origen evolutivo, biogénesis, así como la estructura y secuencia de sus precursores son distintos entre dichos grupos taxonómicos.

No existen criterios unificados para clasificar y nombrar a los miRNAs, ni para los genes que los codifican [252]–[255]. No obstante, se asume que los miRNAs cuya semilla sea idéntica pertenecen a una misma familia [66].

Uno de los grupos de genes más abundante y ampliamente distribuido en animales, plantas, protozoarios y virus es el de los genes que codifican para miRNAs. En la última versión de la base de datos especializada en miRNAs denominada miRBase, publicada en octubre de 2018 [76], [80], [252]–[264], existen registrados a la fecha (noviembre de 2019) 330 miRNAs de *Caenorhabditis elegans*, 274 de *Drosophila melanogaster* y 1982 de *Homo sapiens*, dicha versión de miRBase contiene secuencias depuradas acorde a la tecnología de secuenciación profunda (*deep-sequencing*) y de muchos de estos miRNAs ha sido corroborada experimentalmente su actividad biológica [76], [80].

En muchas especies existen múltiples *loci* con secuencias relacionadas entre sí que provienen de la duplicación de genes [77], [81], [265]. En el genoma humano existen 14 *loci* parálogos que codifican miRNAs hermanos y que pertenecen a la familia de *let-7*. Existen 34 familias de miRNAs conservadas filogenéticamente entre *C. elegans* y *H. sapiens* y 196 familias de miRNAs están conservados entre mamíferos [75], [265]. Los miRNAs hermanos generalmente actúan de forma redundante sobre un mismo mRNA blanco, sin embargo, pueden tener papeles diferentes en el mismo proceso fisiológico o actuar sobre distintos procesos que guardan alguna relación [266].

Algunos miRNAs comparten su origen evolutivo pero divergen en su semilla. Por ejemplo los miR-141 y miR-200c pertenecen a la superfamilia de miR-200 que está altamente conservada, la secuencia de su semilla difiere en sólo un nucleótido respecto a la semilla que portan los demás miRNAs integrantes de la superfamilia [267].

La nomenclatura de los genes que codifican para miRNAs es claramente inconsistente. Al inicio de su estudio, dichos genes eran nombrados de acuerdo a los fenotipos que producía su deficiencia (por ejemplo, *lin-4*, *let-7* y *lsey-6*), mientras que la mayoría de los miRNAs que se han hallado mediante clonación o secuenciación reciben nombres numéricos, por ejemplo los homólogos de *lin-4* hallados en especies distintas a *C. elegans* se llaman *mir-125* [77], [80], [253], [254].

Los genes que codifican miRNAs hermanos se indican usando sufijos literales (e. g. *mir-125a* y *mir125b*). Cuando un mismo miRNA maduro es producido independientemente por varios *loci* que están separados se usan sufijos numéricos que se adicionan al final de los nombres de los *loci* del miRNA (por ejemplo, *mir-125b-1* y *mir-125b-2*). Finalmente, cuando el mismo *locus* produce dos miRNAs maduros uno de la cadena 5' y el otro de la cadena 3' se usa el sufijo 5p y 3p respectivamente e. g. *miR-125a-5p* y *miR-125a-3p* [76], [81], [258]–[260], [265].

Apéndice B

Biogénesis de los miRNAs Canónicos.

La biogénesis de los miRNAs canónicos en animales inicia con la expresión del gen que los codifica, la RNA polimerasa tipo II (RNAPol II), sintetiza al transcripto primario (pri-miRNA) de alrededor de 1 Kb de longitud [29], [268]–[270]. Después, el complejo denominado microprocesador conformado por la endoribonucleasa del tipo III Drosha y su cofactor, Región Crítica No. 8 para el Síndrome DiGeorge (DGCR8: *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) [271]–[274] lo procesa para producir al precursor del miRNA (pre-miRNA) de alrededor de 65 nucleótidos [271], [272]. El pre-miRNA es transportado desde el nucleoplasma hasta el citoplasma por Exportina5 de manera dependiente a Ran-GTP (Figura 16) [275]–[277].

En el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por otra endoribonucleasa tipo III llamada Dicer para producir un RNA de doble cadena de una longitud de entre 21 y 25 pares de bases, conocido como miRNA dúplex [278]–[282]. Una de las cadenas del miRNA dúplex es cargada en el precursor del complejo de silenciamiento inducido por RNA (pre-RISC: *RNA induced silencing complex precursor*) formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC: *RNA induced silencing complex*) propiamente dicho (Figura 16) [283].

La cadena presente en RISC es considerada el miRNA maduro y será usada como cadena guía para hibridar la secuencia blanco que se encuentra en la 3'-UTR del mRNA que será silenciado, mientras que la cadena pasajera es cortada por Dicer en su región central y liberada en el citoplasma para ser degradada completamente por la acción de exonucleasas [284].

La selección de la cadena guía y de la cadena pasajera se da en función de la estabilidad termodinámica que se presenta en el extremo 5' de cada una de las cadenas, predominantemente se selecciona como cadena guía la que tiene menor estabilidad en la unión de su extremo 5' con el RISC, también hay una preferencia por las cadenas que tienen U como primer nucleótido en el extremo 5' [285]–[287].

Cuando la cadena guía está cargada en el RISC, esta hibrida la 3'-UTR de un mRNA específico, el nivel de complementariedad que exista entre el miRNA y el mRNA determina el mecanismo de silenciamiento que ocurrirá [288], la región conocida como semilla que corresponde con los

nucleótidos numerados del 2 al 7 en el extremo 5' de la cadena guía, así como los nucleótidos 10 y 11 de la misma son particularmente importantes en este proceso [65], [66], [289]–[291].

Cuando existe una complementariedad perfecta o cercana a esta entre la región hibridada del mRNA y la cadena guía, el mecanismo preferido será la degradación (Figura 16(a)). Por el contrario, mientras más nucleótidos desapareados existan, mayor será la probabilidad de optar por el bloqueo de la transcripción mediante el secuestro del mRNA por RISC (Figura 16(b)) [288].

La regulación de la traducción de los mRNAs vía RISC ocurre en regiones especializadas del citoplasma conocidas como cuerpos de procesamiento (*p-bodies: processing bodies; cuerpos-p*) en donde se lleva a cabo la degradación de mRNAs o su secuestro por RISC [292]–[295]. En dichos sitios está presente la batería enzimática necesaria para dichos procesos y se han detectado productos de la degradación de RNAs, así como mRNAs intactos que salen de dichas regiones para dirigirse a los ribosomas en donde son traducidos [296]–[298].

El primer paso de la degradación del mRNA es catalizado por Argonata2 que posee actividad de endonucleasa, en este proceso, se hace un corte en la zona media del mRNA que lo libera de RISC para que continúe su degradación dentro del cuerpo-p, a través de la acción de otras enzimas (Figura 16) [299], [300].

En el cuerpo-p existe una batería de nucleasas, algunas catalizan la degradación de la cola de poli-adenina. Después, el mRNA puede ser degradado vía exosoma, que es un complejo multiproteico con actividad de exonucleasa en dirección 3'→5'. Adicionalmente, puede darse la pérdida del capuchón (decapitación), catalizada por las enzimas Dcp1 y Dcp2 que facilitarían la degradación por la exorribonucleasa Xrn1p [295], [298]–[303].

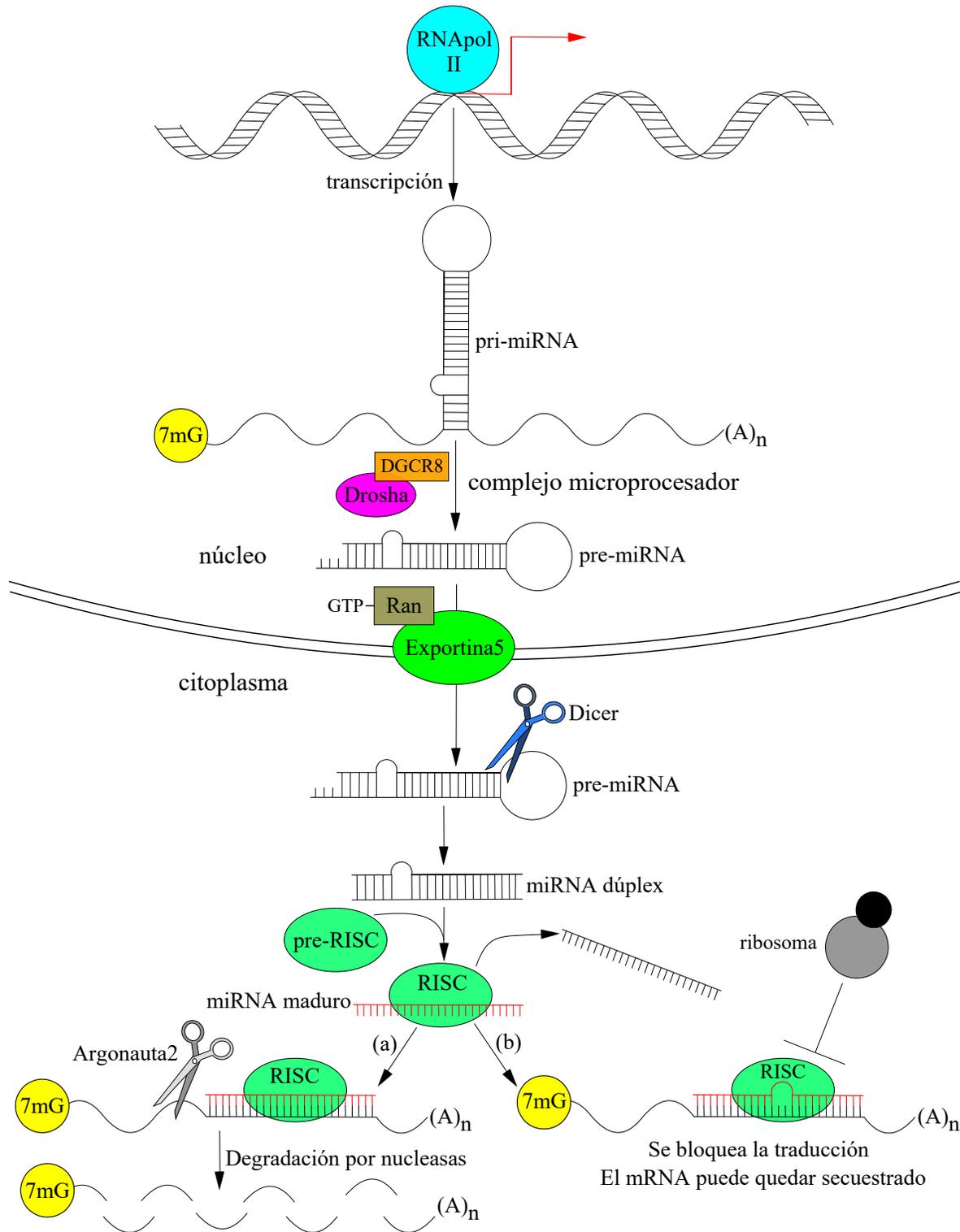


Figura 16. Biogénesis de los miRNAs canónicos.

Los genes de los miRNAs canónicos son transcritos por la RNAPol II. El pri-miRNA es procesado secuencialmente por un conjunto de enzimas, de las cuales, algunas se encuentran en el núcleo y otras en el citoplasma. Para finalmente producir el miRNA maduro que es cargado en RISC y usado como guía para hibridar al mRNA blanco, este puede ser degradado si la complementariedad con el miRNA es perfecta (a) o su traducción puede bloquearse cuando existen desapareamientos (b).

Apéndice C

Biogénesis de los miRtrons.

El primer mecanismo alternativo de generación de miRNAs fue descrito en *D. melanogaster* [304], [305] y *C. elegans* [305], [306], en este, los miRNAs se producen a partir de intrones (miRtrons) [307], [308]. Se dedujo la existencia de la vía después de clonar pequeños RNAs y determinar que sus secuencias coincidían con las regiones terminales de pequeños intrones con la capacidad de adoptar una estructura de tallo-asa [304], [309].

Una vez que los intrones han salido del spliceosoma, son reestructurados, partiendo de una conformación denominada “lazo” hasta una de tallo-asa que puede o no poseer un segmento sobresaliente en su extremo 3' (miRtrons con cola en 3') o en el 5' (miRtrons con cola en 5') [310]. Debido a su estructura, son reconocidos y procesados por Dicer para producir pre-miRNAs que pueden canalizarse a la vía de los miRNAs canónicos al ser exportados al citoplasma por el complejo Exportina5-Ran-GTP (Figura 17).

Los precursores de los miRtrons poseen un tallo más corto en comparación con el que tienen los pre-miRNAs canónicos, debido a que estos únicamente contienen la región que origina el miRNA-duplex y omiten el tallo menor de alrededor de una vuelta helicoidal (~10.5 pb) que está involucrado en el reconocimiento y corte por el complejo microprocesador (Drosha y DGCR8) [310]. De esta manera, el proceso de corte y empalme de exones (*splicing*) sustituye al corte que realiza Drosha (Figura 17).

Mediante estudios estructuro-funcionales y usando modelos *knockdown*, se ha verificado que la vía de miRtrons, toma intrones cortos que provienen del *splicing* y que tienen la capacidad de conformarse en una estructura de tallo-asa que la mayoría de los intrones no puede adoptar. Sin embargo, en dicha estructura los extremos 3' y 5' que hibridan para formar un tallo quedan apareados sin que haya un segmento de 2 o 3 nucleótidos que sobresalga en el extremo 3' como ocurre en los pre-miRNAs canónicos. Así, una enzima interviene para hacer un corte en el extremo 3' y producir el segmento que sobresale 2 o 3 nucleótidos respecto al extremo 5'. Después de esto, el pre-miRNA (punto en donde convergen ambas vías, Figuras 16 y 17), ya con la conformación adecuada, es reconocido por el sistema de Exportina5 para ser transportado al citoplasma en donde es cortado por Dicer y cargado en

Argonauta2 para que funcione como cadena guía (miRNA maduro) en la regulación de la expresión génica [304], [309].

Aun cuando la vía de miRtrons fue inicialmente descrita en *C. elegans* y *D. melanogaster*, a la fecha, se ha comprobado experimentalmente que también existe en una gran diversidad de organismos como: mamíferos [261], [311], [312], aves [262] y plantas [263], no así en hongos. Adicionalmente, se ha reportado en modelos de organismos mutantes que es posible generar miRtrons de manera independiente a las proteínas que conforman el complejo microprocesador: Drosha y DGCR8 [256], [257], [264].

En los modelos de organismos mutantes para *drosha* y/o *dgcr8* se ha reportado que la cantidad de miRtrons aumenta con respecto al control no mutante. Aunque no se ha establecido la razón de forma experimental, este fenómeno puede deberse a la liberación de la maquinaria de síntesis que comparten miRNAs canónicos y miRtrons. Otra explicación del fenómeno, es la posibilidad de que decaiga la molécula de RNA que se toma como referencia (gen constitutivo; *housekeeping gene*, en inglés), en ese sentido, el experimento debe diseñarse teniendo cuidado de elegir una referencia que no tenga variaciones [312].

Una serie de estudios particularmente estrictos de genética funcional se han llevado a cabo en *D. melanogaster*, en los mismos se ha usado un reportero que porta un sitio de reconocimiento para un miRNA canónico o para un miRtron, resultando que en clonas celulares homocigotas mutantes para el gen *dicer-1* ninguno de los dos, miRNA canónico o miRtron es capaz de regular la expresión de su blanco reflejando el requerimiento de Dicer en ambas vías. En contraste, las clonas de células homocigotas mutantes de *pasha* (*dgcr8*) pero silvestres para *drosha* fallan para inhibir a sus blancos mediante la vía canónica, sin embargo la vía de miRtrons sigue intacta, permitiendo la regulación negativa de sus blancos [306].

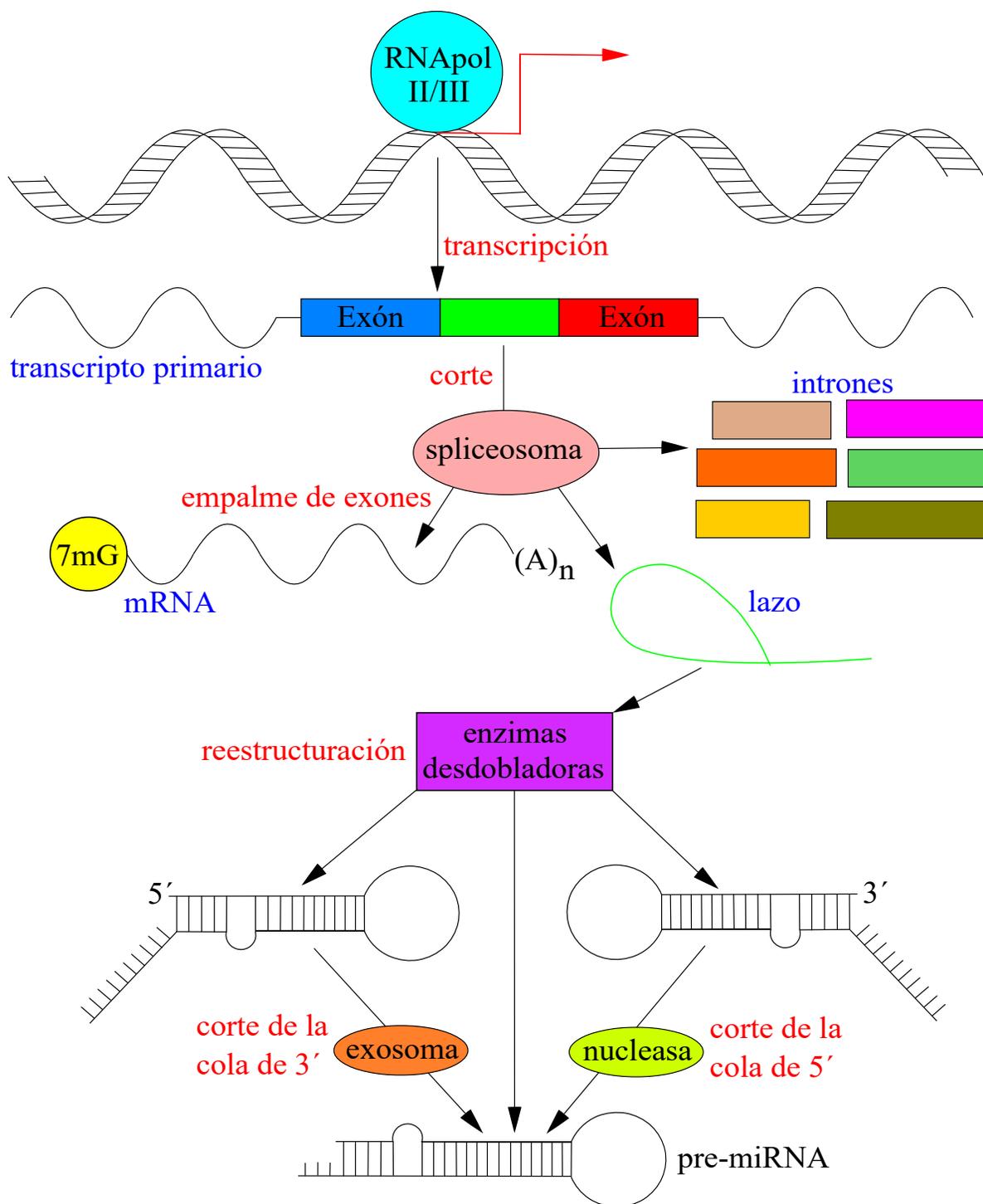


Figura 17. Biogénesis de los miRtrons.

El transcripto primario porta el intrón que generará al miRtron (**verde brillante**); el spliceosoma produce al mRNA, un RNA con forma de lazo (**verde brillante**) y los intrones. Las enzimas desdobladoras reestructuran al RNA partiendo de una forma de lazo a una de tallo-asa con una cola en 3', sin ella, o presente en 5'; para el primer caso el exosoma retira la cola, en el segundo caso no se requiere de enzima alguna, y para el tercer caso una nucleasa desconocida retira la cola de 5'. La molécula con estructura de tallo-asa que resulta en cada caso, puede fungir como pre-miRNA, siendo exportado a través del poro nuclear por Exportina5-Ran-GTP (punto de convergencia con la vía canónica) y continuar la vía en el citoplasma para convertirse en un miRNA maduro.

Apéndice D

Métodos para Introducir MBs en Células Vivas.

La introducción de MBs en células vivas no es una tarea sencilla. El método usado debe ser capaz de introducir la cantidad necesaria de MBs para detectar pocas moléculas de RNA, como en el caso de miRNAs y otros RNAs no codificantes. Para un experimento determinado debe definirse el método más adecuado en función de su dificultad, costo y eficiencia, después debe probarse y en caso de que no funcione debe encontrarse una alternativa.

Los métodos que se han usado para introducir MBs en células vivas pueden clasificarse en dos grupos: físicos y químicos. Los físicos, incluyen la biobalística, la microinyección y la electroporación; mientras que dentro de los químicos, se contempla a la transfección, la permeabilización de la membrana celular mediante toxinas y el uso de MB ligados a péptidos capaces de penetrar las células.

La mayoría de los agentes transfectantes producen patrones de fluorescencia puntuados debido al paso de los MBs por la vía endocítica. Por eso, es deseable un método de introducción capaz de evadir esta vía *e. g.* microinyección, permeabilización de membrana celular mediante toxinas, MBs conjugados con péptidos penetrantes de la membrana celular, electroporación/microporación o biobalística.

Existen métodos para introducir otros tipos de ácidos nucleicos en células vivas que no han sido usados para MBs como la sonoporación y los polímeros catiónicos. Es importante determinar si estos métodos son adecuados para ser usados con MBs, así como conocer su eficiencia.

Métodos Químicos.

Transfección.

Minutos después de haber transfectado células con MBs aparecen puntos fluorescentes en el citoplasma, este fenómeno se debe a que los MBs pasan por la vía endocítica [313], que comprende la fusión de los endosomas con lisosomas y la consiguiente degradación de los MBs por las nucleasas presentes en éstos últimos. Una pequeña cantidad (0.01 a 10 %) de los MBs transfectados puede escapar de la vía endocítica después de algunas horas sin ser degradados [314]–[316], por estas razones, es deseable que el método de introducción sea capaz de evadir la vía endocítica.

Sin embargo, no existen estudios acerca del comportamiento de los diferentes MBs resistentes a nucleasas (nucleótidos 2'-O-metilados, derivados de fosforotioato, PNAs y LNAs) cuando son introducidos a la célula mediante otros agentes de transfección como los lípidos catónicos (lipofección), polímeros catiónicos sintéticos o nanopartículas, como las que se forman con fosfato de calcio. En este caso, es posible que los MBs resistentes a nucleasas no sean degradados, pero que su liberación de los endosomas-lisosomas sea muy lenta haciendo inviable el experimento.

Permeabilización de la Membrana Celular.

Es un método no endocítico y reversible que consiste en la permeabilización de la membrana celular mediante toxinas. La estreptolisina tipo O (SLO) es una toxina bacteriana producida por una cepa hemolítica de *Streptococcus pyogenes* que tiene la capacidad de formar poros en la membrana celular a través de los cuales pueden pasar los MBs [235], [236]. La SLO se une como un monómero al colesterol que se encuentra en la membrana celular, después la SLO se oligomeriza para formar un anillo produciendo un poro transitorio de entre 25 y 30 nm. La permeabilización de la membrana celular debe llevarse a cabo en medio de cultivo libre de suero, después de la permeabilización y la introducción de los MBs, es posible revertir el efecto de la SLO mediante medio de cultivo con suero [236], [237]. Debido a que cada línea celular posee membranas con un contenido de colesterol diferente, el proceso de permeabilización debe ser optimizado para cada línea o tipo celular, probando la entrada de MBs a diferentes temperaturas, concentraciones de SLO, número de células y tiempos de incubación. El uso de soluciones en donde se encuentran híbridos MB-oligonucleótido blanco es muy útil para conocer la eficiencia con la que entra determinado MB en una línea celular específica, bajo ciertas condiciones.

MBs Acoplados a Péptidos Penetrantes.

Existen varios péptidos en la naturaleza con la capacidad para penetrar membranas celulares (CPP: *cell-penetrating peptide*, péptido penetrante de la membrana celular) [317], [318]. Uno de los CPPs más usados es el factor de transcripción Trans-activo (Tat) del virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1) [319]–[322]. Otro CPP es el fragmento RQIKIWFQNRRMKWKK del homeodominio de antennapedia de *Drosophila melanogaster* y el péptido VP22 del tegumento del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) [323]–[325].

En general, los CPPs son péptidos cortos ricos en aminoácidos básicos que presentan un arreglo anfipático. Los CPPs penetran a través de la membrana celular sin efectos tóxicos y con una eficiencia muy alta (cerca del 100% de las células expuestas presenta MBs en su citoplasma). El mecanismo de introducción mediante CPPs evita la desestabilización de la membrana, la pérdida de la integridad celular y parecen ser independientes de la vía endocítica, en consecuencia se evita la degradación de los MBs. Actualmente el CPP más usado es el péptido Tat del HIV-1, debido a que es corto, tiene una alta eficiencia y además está bien estudiado.

Se han usado los CPPs para introducir una gran cantidad de moléculas en cultivos celulares y tejidos [321], [322]. Una gran ventaja que presentan los CPPs es que no alteran la sensibilidad y especificidad de los MBs.

Recientemente se han usado CPPs y péptidos con secuencias de localización nuclear (NLS: *nuclear localization sequences*) conjugados a MBs mediante diferentes conectores, los más comunes son cadenas de hidrocarburos saturados. El sistema maleimida-tiol es muy usado para conjugar MBs con péptidos, debido a que la maleimida reacciona con moléculas que poseen grupos tiol como la cisteína (Figura 18(a)). La primera opción es colocar un sulfhidrilo al final del conector del MB para que reaccione con la maleimida al final del péptido (Figura 18(b)). La segunda opción es al revés, es decir, el conector del MB tiene la maleimida y el péptido el grupo tiol (Figura 18(c)). Una tercera opción consiste en tener dos grupos sulfhidrilo, uno al término del conector del MB, y otro al término del péptido, estos pueden formar un puente disulfuro entre sí. Esta última opción es la más versátil, porque es reversible, permite la separación entre el péptido y el MB en un medio reductor (Figura 18(d)) [192].

Usando CPPs ha sido posible visualizar mRNAs como el de la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GA3PDH) [326]. Otra estrategia interesante involucra el uso de NLS en conjunto con SLO para la visualización de RNAs que se localizan en el núcleo como U1, U2 o U3 (Figura 18(e)) [327]. La SLO forma poros en la membrana celular y las NLS provoca que los MBs sean transportados hacia el núcleo en donde pueden alcanzar blancos que se ubican en este espacio, si se usaran MBs conjugados con CPPs en conjunto con SLO, estos no podrían introducirse al núcleo (Figura 18(e)). Por otro lado, si se usaran MBs que estuvieran conjugados tanto a CPPs como a NLS, estos tendrían la capacidad de entrar al citoplasma celular sin la necesidad de SLO y después, ser transportados al núcleo (Figura 18(f)).

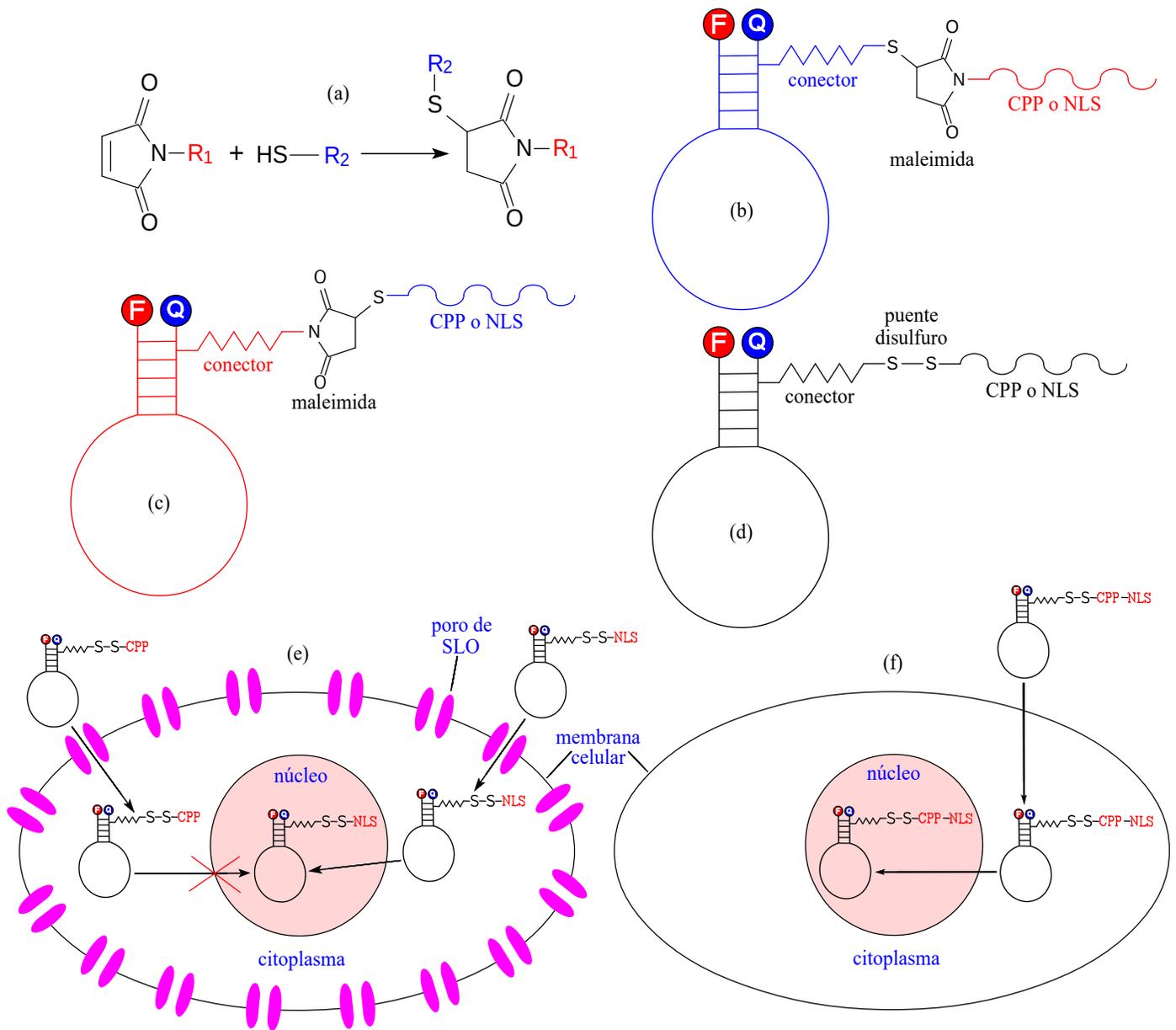


Figura 18. Péptidos acoplados a MBs.

(a) Reacción de acoplamiento entre una molécula de maleimida que posee un radical (R_1) formando una amina terciaria y una molécula con un grupo tiol que posee otro radical (R_2). (b) Molécula resultante de la reacción de un grupo sulfhidrilo colocado al final del conector del MB y una molécula de maleimida con un péptido (CPP o NLS) anclado a su grupo amino. (c) Molécula resultante de la reacción de una molécula de maleimida con un MB anclado a su grupo amino y un péptido (CPP o NLS) con un grupo sulfhidrilo en uno de sus extremos, por ejemplo el de una cisteína. (d) Anclaje de un péptido a un MB mediante un puente disulfuro que se forma entre un grupo tiol en el extremo del péptido y otro en el extremo del conector del MB, es posible romper esta unión usando agentes reductores. (e) Estrategia que permite la entrada de MBs al citoplasma celular mediante SLO, el MB que posee una NLS es transportado dentro del núcleo en donde puede hibridar blancos que se hallan en ese compartimento (lado derecho), mientras que el MB que posee un CPP no puede ser transportado dentro del núcleo (lado izquierdo). (f) Un MB que posee tanto un CPP como una NLS puede entrar al citoplasma y de ahí ser transportado al núcleo para alcanzar blancos intranucleares sin la necesidad de usar SLO u otros agentes para introducir los MBs en el citoplasma de las células.

Microinyección.

El proceso de microinyección [184], [328], consiste en usar una aguja o un capilar aguzado de entre 0.5 y 5 μm de diámetro para penetrar la membrana celular o nuclear e inyectar MBs u otro tipo de ácidos nucleicos. La microinyección es un método simple, económico, efectivo, reproducible y no tóxico para introducir MBs en células vivas, sin embargo, también es altamente invasivo lo que hace que a menudo resulte en daño y/o muerte celular. En algunas ocasiones, aun cuando la célula no muere la microinyección puede interferir con el funcionamiento normal produciendo resultados alterados o no reproducibles. Dado que el método requiere la manipulación e inyección individual de células el número de estas que puede tratarse es muy limitado.

Cabe señalar que el método permite reducir la cantidad de MB utilizado y en consecuencia el costo de los ensayos, ya que el mismo es inyectado directamente dentro de la célula y los volúmenes que se inyectan son minúsculos. Cuando se usa este método es recomendable el uso de un colorante no fluorescente que permita monitorear la entrada de la solución en la célula. La tinta india, también denominada tinta china suele usarse para monitorear la microinyección, debido a que es visible a bajas concentraciones ($\sim 5\%$) y resulta inocua para las células.

Una de las principales desventajas de este método es la necesidad de un sistema capaz de microinyectar unos pocos nanolitros en las células, además de que su uso requiere de personal especializado. Típicamente una célula de mamífero no puede recibir un volumen superior a los 5 nL, sin que se comprometa su viabilidad.

Electroporación.

La electroporación es un método que permite la introducción de MBs en el citoplasma de las células evitando la vía endocítica y por lo tanto su degradación. En un principio, la electroporación estaba asociada a una baja viabilidad celular, pero avances recientes en la técnica han permitido la reducción de los eventos responsables del estrés o daño celular, estos eventos incluyen la generación de calor, disolución de iones metálicos, variaciones en el pH o la generación de radicales libres.

Recientemente una novedosa técnica llamada microporación ha sido desarrollada, esta permite que poco tiempo después de la electroporación, se observe una distribución uniforme de los MBs en el

citoplasma . La microporación tiene una eficiencia superior al 90% y las células que son sometidas a esta presentan una viabilidad cercana al 86% [329].

Con la microporación, como con cualquier otro método basado en la electroporación, las células permanecen en suspensión durante el procedimiento. Esto significa que después del mismo debe transcurrir un tiempo hasta que las células se adhieren y puedan ser observadas, esta espera evita que sean visualizados los procesos de movilización o transporte de RNA inmediatamente después de introducir los MBs, esta limitación debe tomarse en cuenta durante el diseño de los experimentos.

Sonoporación.

La sonoporación usa ondas de ultrasonido para inducir la permeabilización pasajera de la membrana celular y permitir la entrada de moléculas de ácidos nucleicos. En cada ciclo de ultrasonido parte de la energía de las ondas es absorbida por las células, esto modifica la topología de la membrana celular haciendo que se formen poros. El uso de agentes facilitadores hace que mejore la eficiencia del procedimiento [330]. Los agentes facilitadores tienen la capacidad de formar microburbujas que son estabilizadas por polímeros o fosfolípidos. Cuando son activadas por ultrasonidos las microburbujas se mueven rápidamente describiendo movimientos oscilatorios, se expanden y se contraen, finalmente se rompen produciendo ondas de choque capaces de impactar la superficie externa de la membrana celular y formar pequeños poros que la hacen permeable. Para hacer el procedimiento más eficiente, es posible tratar previamente las células con agentes como la lidocaína o calor [331], [332], también se pueden utilizar complejos de DNA-lípidos catiónicos en lugar de solo DNA [333], [334].

La mayor diferencia entre la electroporación y la sonoporación es que en la primera el DNA se mueve dentro de un campo eléctrico debido a una fuerza electromotriz, mientras que en la sonoporación la entrada se da por difusión simple [335]. La eficiencia de la sonoporación depende de varios factores como: la frecuencia e intensidad de las ondas de los ultrasonidos, la duración del tratamiento, la cantidad de DNA usado, los agentes adicionales que se emplean y el tipo de células sonoporaadas.

La principal ventaja de la sonoporación es ser poco invasiva, como consecuencia las alteraciones que produce en las células son mínimas, las mismas presentan una alta viabilidad y los experimentos son reproducibles.

Biobalística.

Las técnicas biobalísticas consisten en usar partículas metálicas que poseen MBs adheridos a su superficie para que estas sean propulsadas dentro de las células mediante una pistola de gas. La primer técnica biobalística fue usada para transfectar células vegetales en 1987 [336]. Fue hasta 1990 que la técnica fue usada por primera vez en células de mamífero [337]. Las partículas (también llamadas biobalas) son hechas con metales biocompatibles como: oro, platino o tungsteno, y tienen un diámetro de 1-5 micrometros [338].

Las biobalas deben ser impregnadas con los MBs antes de ser cargadas en la pistola. Las balas son propulsadas por un gas, usualmente helio [339] o vapor de agua [337] que entra rápidamente a una cámara que contiene también a las partículas, estas son propulsadas y entran rápidamente al citoplasma de forma independiente a la vía endocítica, en consecuencia los MBs no son degradados [340].

Una desventaja de esta técnica es que los impactos de las biobalas pueden producir alteraciones en la membrana celular derivando en estrés y daño celular. Sin embargo, la biobalística es considerablemente menos invasiva que la microinyección y las alteraciones que ocurren a nivel de membrana suelen ser de corta duración. Probablemente la mayor desventaja de la biobalística es la incapacidad de controlar la cantidad de MBs que son introducidos a la célula, así que la cantidad de MBs que entran a cada célula es variable. Esta técnica es más adecuada para estudios poblacionales y puede complicar la interpretación de los resultados en los ensayos de una sola célula.

ANEXOS.

Anexo 1

Calidad de Síntesis de los Oligonucleótidos Blanco.

Se observa que en ningún carril existen bandas inferiores a las que corresponden con los oligonucleótidos; esto, indica que no existen subproductos de síntesis, lo que asegura la pureza y funcionalidad de los oligonucleótidos. En cada pozo, se depositaron 3 pg de oligonucleótido. Sin embargo, cuatro de las 5 bandas correspondientes a los oligonucleótidos que aumentan su longitud en su extremo 5' y que son hibridados por MB128 muestran bandas (Figura 23), pero estas se ubican en la parte superior, curiosamente el quinto oligonucleótido, que es hibridado completamente por el brazo 3' de MB128 y que fue corrido en otro gel, no muestra bandas, lo que hace pensar que estas son dímeros de los oligonucleótidos o algún otro tipo de artefacto que no tiene que ver con la presencia de subproductos de síntesis.

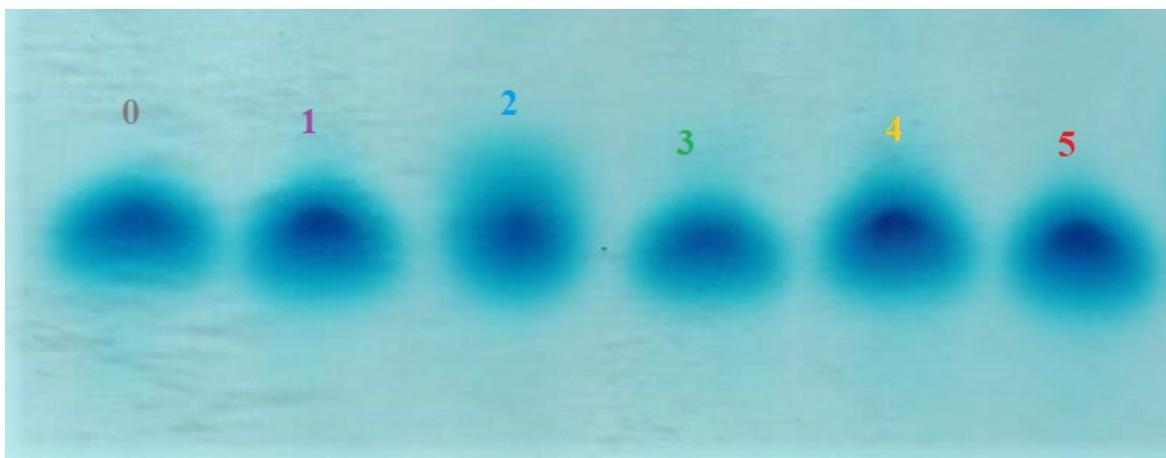


Figura 19. Oligonucleótidos de igual longitud (MB9).

Se muestra el corrimiento electroforético de los oligonucleótidos de igual longitud que son hibridados por MB9. (0) oligonucleótido que sólo es hibridado por el asa de MB9. Los números 1, 2, 3, 4 y 5; indican el número de nucleótidos del brazo 3' del MB9 que hibridan al oligonucleótido. Las secuencias se encuentran en la tabla 2, los colores de los números corresponden con los de las gráficas y tablas de la sección de resultados.

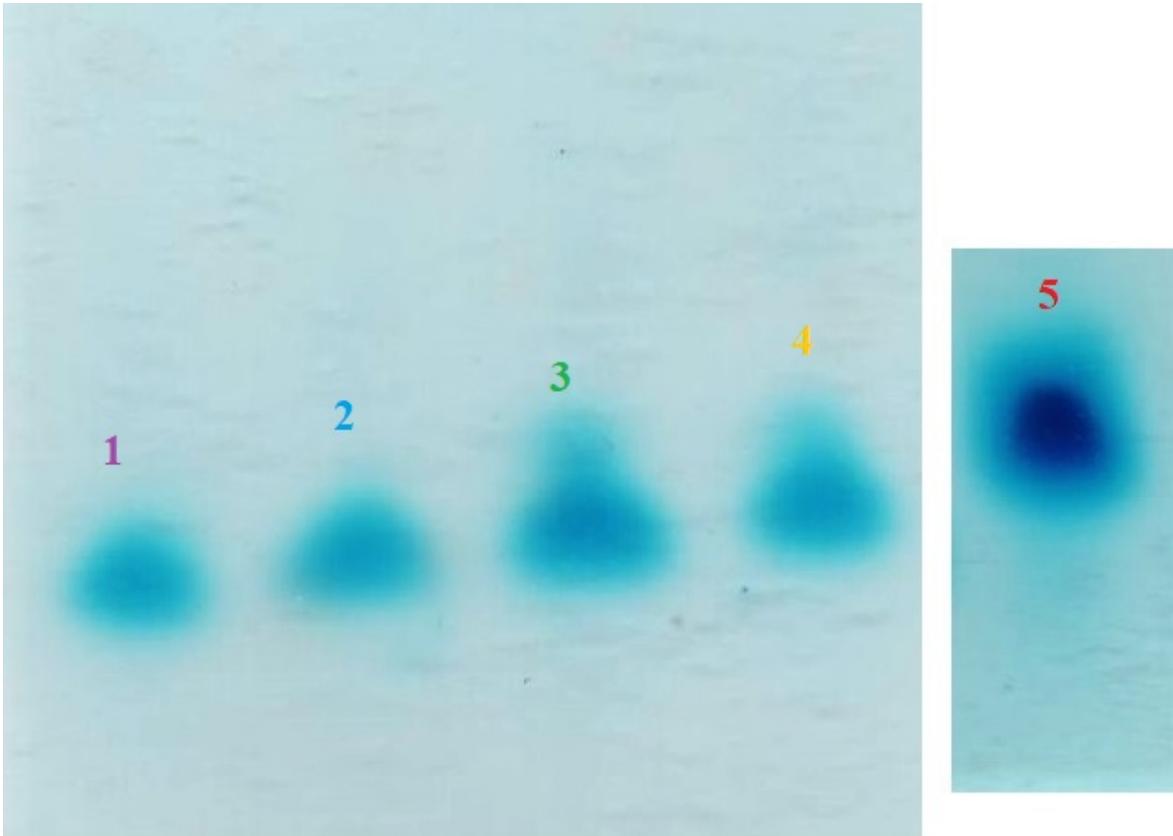


Figura 20. Oligonucleótidos que aumentan su longitud en el extremo 5' (MB9).

Se muestra el corrimiento electroforético de los oligonucleótidos que aumentan su longitud en su extremo 5' y que son hibridados por MB9. (1) oligonucleótido que es hibridado por el asa de MB9 más un nucleótido del brazo 3', (2) el que es hibridado por el asa más dos nucleótidos del brazo 3', (3) el que es hibridado por el asa más tres nucleótidos del brazo 3', (4) el que es hibridado por el asa más cuatro nucleótidos del brazo 3', y (5) el que es hibridado por el asa más cinco nucleótidos del brazo 3' del MB. Las secuencias se encuentran en la tabla 2, los colores de los números corresponden con los de las gráficas y tablas de la sección de resultados.

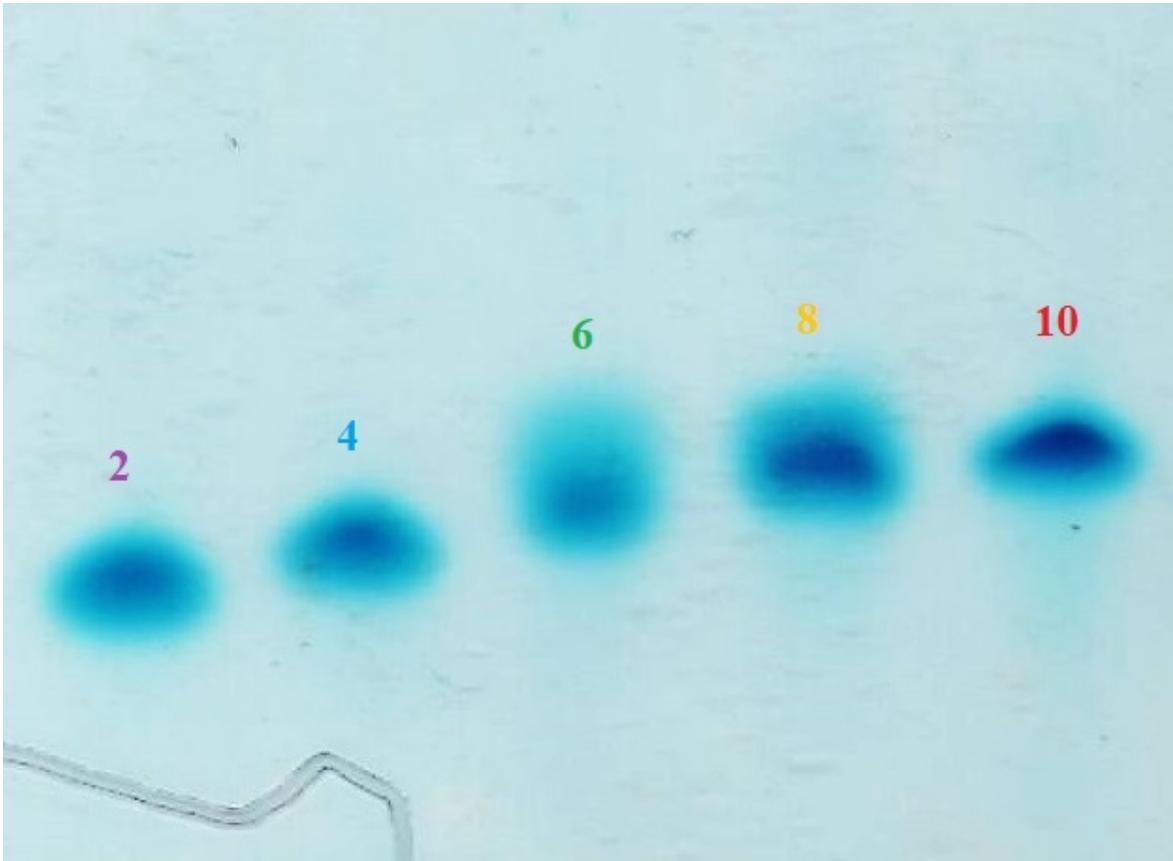


Figura 21. Oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente (MB9).

Se muestra el corrimiento electroforético de los oligonucleótidos que crecen bilateralmente y son blanco de MB9. (2) oligonucleótido que es hibridado con el asa, más dos nucleótidos, uno de cada brazo (uno de 3' y el otro de 5'); (4) oligonucleótido que es hibridado con el asa, más cuatro nucleótidos, dos de cada brazo; (6) oligonucleótido que es hibridado con el asa, más seis nucleótidos, tres de cada brazo; (8) oligonucleótido que es hibridado por el asa, más ocho oligonucleótidos, cuatro de cada brazo; y (10) oligonucleótidos que es hibridado por el asa, más diez nucleótidos, cinco de cada brazo. Los números de colores corresponden con los de la Tabla 2, y con los de las gráficas y tablas de la sección de resultados.

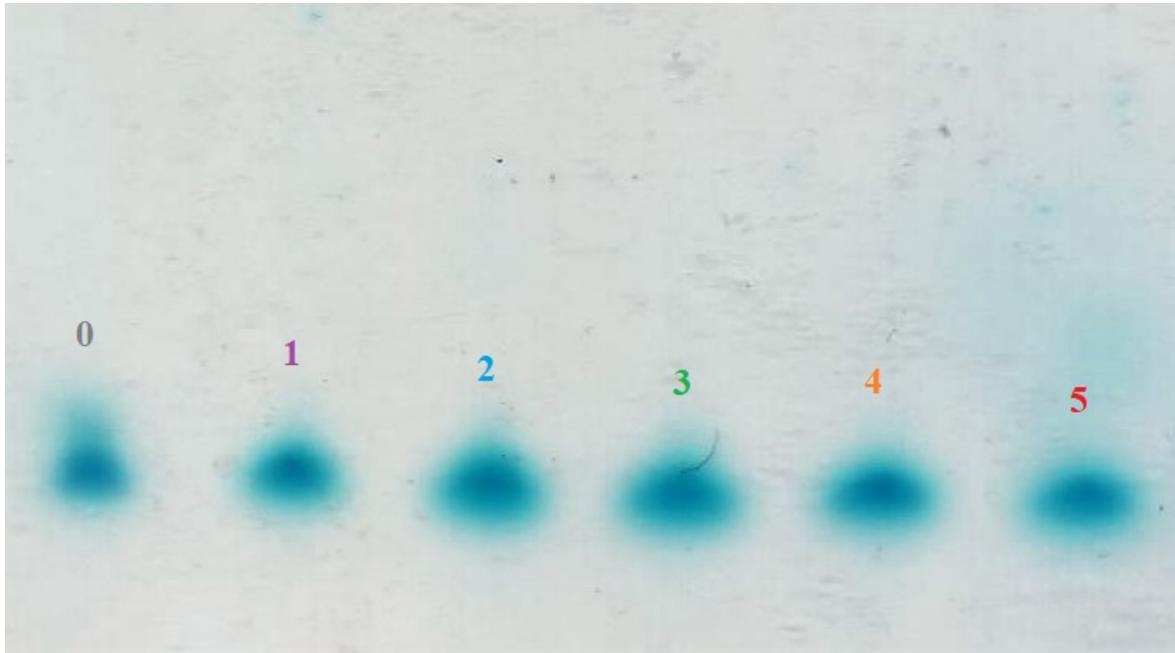


Figura 22. Oligonucleótidos de igual longitud (MB128).

Se muestra el corrimiento electroforético de los oligonucleótidos de igual longitud que son hibridados por MB128. (0) oligonucleótido que sólo es hibridado por el asa. Los números 1, 2, 3, 4 y 5; indican el número de nucleótidos del brazo 3' del MB128 que hibridan al oligonucleótido blanco. Las secuencias se encuentran en la tabla 2, los colores de los números corresponden con los de las gráficas y tablas de la sección de resultados.

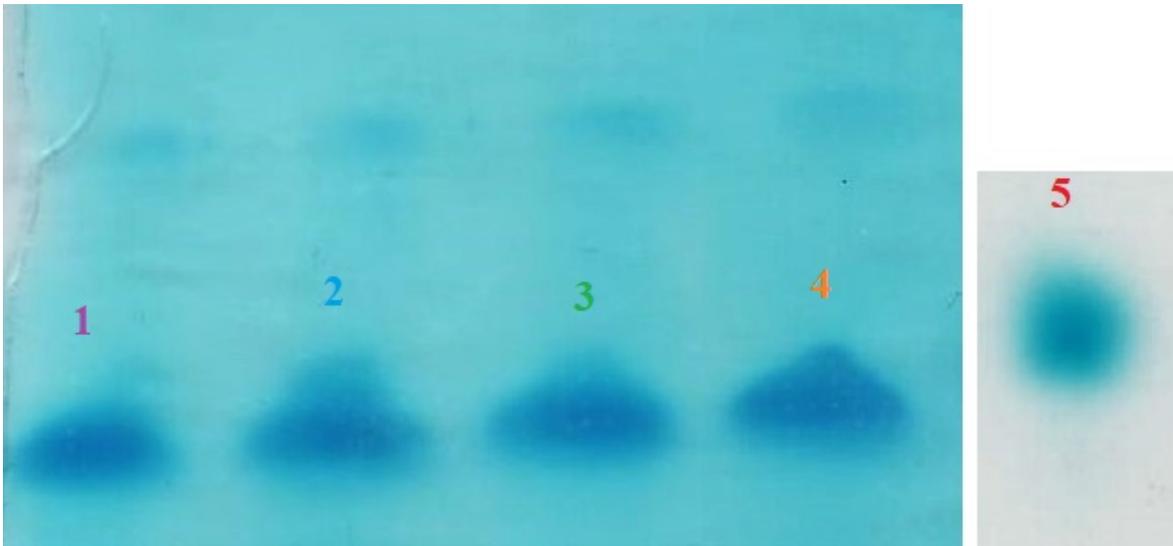


Figura 23. Oligonucleótidos que aumentan su longitud en el extremo 5' (MB128).

Se muestra el corrimiento electroforético de los oligonucleótidos que aumentan su longitud en su extremo 5' y que son hibridados por MB128. (1) oligonucleótido que es hibridado por el asa de MB128 más un nucleótido del brazo 3', (2) el que es hibridado por el asa más dos nucleótidos del brazo 3', (3) el que es hibridado por el asa más tres nucleótidos del brazo 3', (4) el que es hibridado por el asa más cuatro nucleótidos del brazo 3', y (5) el que es hibridado por el asa más cinco nucleótidos del brazo 3' del MB. Las secuencias se encuentran en la tabla 2, los colores de los números corresponden con los de las gráficas y tablas de la sección de resultados.

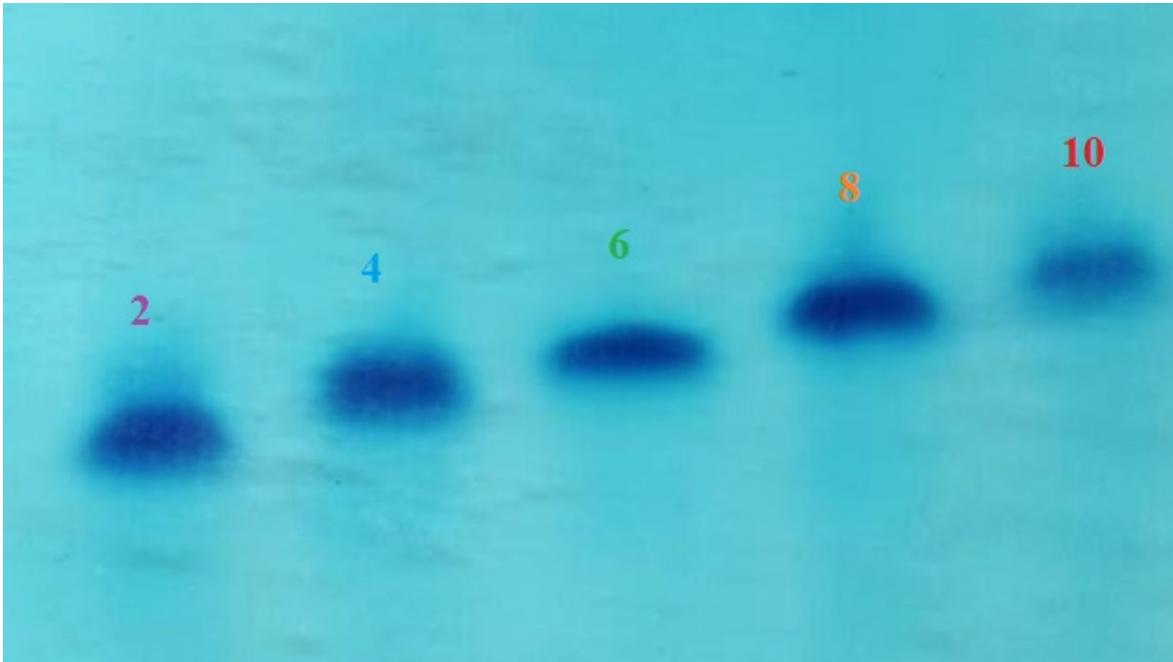


Figura 24. Oligonucleótidos que aumentan su longitud bilateralmente (MB128).

Se muestra el corrimiento electroforético de los oligonucleótidos que crecen bilateralmente y son blanco de MB128. (2) oligonucleótido que es hibridado con el asa más dos nucleótidos, uno de cada brazo (uno de 3' y el otro de 5'); (4) oligonucleótido que es hibridado con el asa, más cuatro nucleótidos, dos de cada brazo; (6) oligonucleótido que es hibridado con el asa, más seis nucleótidos, tres de cada brazo; (8) oligonucleótido que es hibridado por el asa, más ocho oligonucleótidos, cuatro de cada brazo; y (10) oligonucleótidos que es hibridado por el asa, más diez nucleótidos, cinco de cada brazo. Los números de colores corresponden con los de la Tabla 2, y con los de las gráficas y tablas de la sección de resultados.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [1] K. L. Farina and R. H. Singer, “The nuclear connection in RNA transport and localization,” *Trends in Cell Biology*, vol. 12, no. 10. pp. 466–472, 2002.
- [2] J. a Gagnon and K. L. Mowry, “Molecular motors: directing traffic during RNA localization.,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 46, no. March, pp. 229–239, 2011.
- [3] S. Kindler, H. Wang, D. Richter, and H. Tiedge, “Rna Transport and Local Control of Translation,” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 21, no. 1. pp. 223–245, 2005.
- [4] J. M. Taliaferro, E. T. Wang, and C. B. Burge, “Genomic analysis of RNA localization.,” *RNA Biol.*, vol. 11, no. 8, pp. 1040–50, 2014.
- [5] M. Kloc and L. D. Etkin, “RNA localization mechanisms in oocytes.,” *J. Cell Sci.*, vol. 118, pp. 269–282, 2005.
- [6] H. D. Lipshitz and C. A. Smibert, “Mechanisms of RNA localization and translational regulation,” *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 10, no. 5. pp. 476–488, 2000.
- [7] Y. Oleynikov and R. H. Singer, “RNA localization: Different zipcodes, same postman?,” *Trends in Cell Biology*, vol. 8, no. 10. pp. 381–383, 1998.
- [8] Y. Shav-Tal, “RNA localization,” *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. 18, pp. 4077–4081, 2005.
- [9] P. J. Wittkopp and G. Kalay, “Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 1, pp. 59–69, 2011.
- [10] H. D. Priest, S. A. Filichkin, and T. C. Mockler, “Cis-regulatory elements in plant cell signaling,” *Curr Opin Plant Biol*, vol. 12, no. 5, pp. 643–649, 2009.
- [11] C. M. Hernandez-Garcia and J. J. Finer, “Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements,” *Plant Science*, vol. 217–218. pp. 109–119, 2014.
- [12] L. M. Holdt *et al.*, “Alu Elements in ANRIL Non-Coding RNA at Chromosome 9p21 Modulate Atherogenic Cell Functions through Trans-Regulation of Gene Networks,” *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 7, 2013.
- [13] V. G. Cheung *et al.*, “Polymorphic cis- and Trans-Regulation of human gene expression,” *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 9, 2010.
- [14] B. Schoepp-Cothenet, R. van Lis, P. Philippot, A. Magalon, M. J. Russell, and W. Nitschke, “The ineluctable requirement for the trans-iron elements molybdenum and/or tungsten in the origin of life,” *Sci. Rep.*, vol. 2, no. 2, pp. 1–5, 2012.
- [15] X. Shi, D. W.-K. Ng, C. Zhang, L. Comai, W. Ye, and Z. J. Chen, “Cis- and trans-regulatory divergence between progenitor species determines gene-expression novelty in Arabidopsis allopolyploids,” *Nat. Commun.*, vol. 3, p. 950, 2012.

- [16] J. H. Graber, J. Salisbury, L. N. Hutchins, and T. Blumenthal, “C. elegans sequences that control trans-splicing and operon pre-mRNA processing,” *RNA*, vol. 13, no. 9, pp. 1409–1426, 2007.
- [17] S. Minakhina and R. Steward, “Axes formation and RNA localization,” *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 15, no. 4. pp. 416–421, 2005.
- [18] A. Bashirullah, R. L. Cooperstock, and H. D. Lipshitz, “RNA LOCALIZATION IN DEVELOPMENT,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 67, no. 1, pp. 335–394, 1998.
- [19] G. B. Gonsalvez and R. M. Long, “Spatial regulation of translation through RNA localization,” *F1000 Biol. Rep.*, vol. 4, p. 16, 2012.
- [20] P. D. Campbell, J. a Chao, R. H. Singer, and F. L. Marlow, “Dynamic visualization of transcription and RNA subcellular localization in zebrafish,” *Development*, no. March, pp. 1–7, 2015.
- [21] S. Rodríguez-Navarro and E. Hurt, “Linking gene regulation to mRNA production and export,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 23, no. 3. pp. 302–309, 2011.
- [22] M. J. Walsh, G. M. Hautbergue, and S. A. Wilson, “Structure and function of mRNA export adaptors,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 38, no. Pt 1, pp. 232–236, 2010.
- [23] V. O. Wickramasinghe and R. A. Laskey, “Control of mammalian gene expression by selective mRNA export,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 7, pp. 431–442, 2015.
- [24] P. Björk and L. Wieslander, “Mechanisms of mRNA export,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 32. pp. 47–54, 2014.
- [25] K. C. Martin and A. Ephrussi, “mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension,” *Cell*, vol. 136, no. 4. pp. 719–730, 2009.
- [26] V. Ambros, “The functions of animal microRNAs,” *Nature*, vol. 431, no. 7006, pp. 350–5, 2004.
- [27] I. Bentwich *et al.*, “Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs,” *Nat. Genet.*, vol. 37, no. 7, pp. 766–770, 2005.
- [28] I. Beuvink *et al.*, “A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 7, 2007.
- [29] O. Voinnet, “Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs,” *Cell*, vol. 136, no. 4. pp. 669–687, 2009.
- [30] K. Nobuta, K. McCormick, M. Nakano, and B. C. Meyers, “Plant MicroRNAs,” *Business*, vol. 592, no. 1, pp. 89–106, 2010.
- [31] Z. Xie, K. Khanna, and S. Ruan, “Expression of microRNAs and its regulation in plants,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 21, no. 8. pp. 790–797, 2010.

- [32] K. Rogers and X. Chen, “Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs.,” *Plant Cell*, vol. 25, no. 7, pp. 2383–99, 2013.
- [33] V. Ambros, “microRNAs,” *Cell*, vol. 107, no. 7, pp. 823–826, 2001.
- [34] D. P. Bartel, “MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function,” *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 281–297, 2004.
- [35] D. E. Clouthier, “MicroRNAs in facial development,” *Nat. Genet.*, vol. 40, no. 3, pp. 269–270, 2008.
- [36] R. Fiore and G. Schrat, “MicroRNAs in vertebrate synapse development,” *ScientificWorldJournal.*, vol. 7, pp. 167–77, 2007.
- [37] J. C. Carrington and V. Ambros, “Role of microRNAs in plant and animal development,” *Science (80-)*, vol. 301, no. July, pp. 336–338, 2003.
- [38] C.-Z. Chen, L. Li, H. F. Lodish, and D. P. Bartel, “MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation,” *Science*, vol. 303, no. 5654, pp. 83–6, 2004.
- [39] A. Esquela-Kerscher and F. J. Slack, “Oncomirs - microRNAs with a role in cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 4, pp. 259–69, 2006.
- [40] G. Di Leva, M. Garofalo, and C. M. Croce, “MicroRNAs in cancer,” *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 9, pp. 287–314, 2014.
- [41] P. Gao, “MicroRNAs and cancer metabolism,” in *MicroRNAs in Cancer Translational Research*, 2011, pp. 485–497.
- [42] X. W. Wang, N. H. H. Heegaard, and H. Orum, “MicroRNAs in liver disease,” *Gastroenterology*, vol. 142, no. 7, pp. 1431–1443, 2012.
- [43] M. Thirion and T. Ochiya, “Roles of microRNAs in the hepatitis B virus infection and related diseases,” *Viruses*, vol. 5, no. 11, pp. 2690–2703, 2013.
- [44] S. Shrivastava, R. Steele, R. Ray, and R. B. Ray, “MicroRNAs: Role in hepatitis C virus pathogenesis,” *Genes Dis.*, vol. 2, no. 1, pp. 35–45, 2015.
- [45] M. D. Williams and G. M. Mitchell, “MicroRNAs in insulin resistance and obesity,” *Experimental Diabetes Research*, vol. 2012, 2012.
- [46] X. M. Nan, J. Q. Wang, H. Y. Chen, and H. Hu, “MicroRNAs and Lipids Metabolism,” *Prog. Biochem. Biophys.*, vol. 40, no. 2, pp. 118–129, 2013.
- [47] I. G. M. Kolfschoten, E. Roggli, V. Nesca, and R. Regazzi, “Role and therapeutic potential of microRNAs in diabetes,” *Diabetes, Obes. Metab.*, vol. 11, no. SUPPL. 4, pp. 118–129, 2009.

- [48] H. Chen, H. Y. Lan, D. H. Roukos, and W. C. Cho, "Application of microRNAs in diabetes mellitus," *Journal of Endocrinology*, vol. 222, no. 1. 2014.
- [49] R. . Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, and G. T. Horn, "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia," *Science (80-.)*, vol. 239, pp. 1350–54, 1985.
- [50] J. C. Alwine *et al.*, "[15] Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzylloxymethyl paper," *Methods Enzymol.*, vol. 68, no. C, pp. 220–242, 1979.
- [51] V. E. Velculescu, L. Zhang, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler, "Serial Analysis of Gene Expression," *Science (80-.)*, vol. 270, no. 5235, pp. 484–487, 1995.
- [52] M. Schena *et al.*, "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray," *Science*, vol. 270, no. 5235, pp. 467–70, 1995.
- [53] L. Diatchenko *et al.*, "Suppression subtractive hybridization A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. June, pp. 6025–6030, 1996.
- [54] P. Liang and A. B. Pardee, "Differential display of eukaryotic messenger RNA \tby means of the polymerase chain reaction.," *Science (80-.)*, vol. 257, no. 5072, pp. 967–970, 1992.
- [55] N. Lisitsyn, M. Wigler, N. Lisitsyn, and M. Wigler, "Cloning the differences between two complex genomes.," *Science*, vol. 259, no. 5097, pp. 946–51, 1993.
- [56] M. Adams, M. Dubnick, and A. Kerlavage, "Sequence identification of 2, 375 human brain genes," *Nature*, 1992.
- [57] V. Glišin, R. Crkvenjakov, and C. Byus, "Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation," *Biochemistry*, vol. 13, no. 12, pp. 2633–2637, 1974.
- [58] C. AUFFRAY and F. ROUGEON, "Purification of Mouse Immunoglobulin Heavy-Chain Messenger RNAs from Total Myeloma Tumor RNA," *Eur. J. Biochem.*, vol. 107, no. 2, pp. 303–314, 1980.
- [59] P. Chomczynski and N. Sacchi, "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction," *Anal. Biochem.*, vol. 162, no. 1, pp. 156–159, 1987.
- [60] R. E. Kingston, P. Chomczynski, and N. Sacchi, "Guanidine methods for total RNA preparation.," *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. Chapter 4, no. 1996, p. Unit4.2, 2001.
- [61] P. R. Langer-Safer, M. Levine, and D. C. Ward, "Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 14, pp. 4381–5, 1982.

- [62] R. Amann and B. M. Fuchs, “Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 5, pp. 339–48, 2008.
- [63] K. Lee *et al.*, “Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity.,” *RNA*, vol. 17, no. 6, pp. 1076–89, 2011.
- [64] S. Tyagi and F. R. Kramer, “Molecular Beacons: Probes that Fluoresce Upon Hybridization,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 303–308, 1996.
- [65] J. Brennecke, A. Stark, R. B. Russell, and S. M. Cohen, “Principles of microRNA-target recognition,” in *PLoS Biology*, 2005, vol. 3, no. 3, pp. 0404–0418.
- [66] D. P. Bartel, “MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions,” *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215–233, 2009.
- [67] W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, “Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?,” *Nat Rev Genet*, vol. 9, no. 2, pp. 102–114, 2008.
- [68] I. G. Cannell, Y. W. Kong, and M. Bushell, “How do microRNAs regulate gene expression?,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 36, no. Pt 6, pp. 1224–1231, 2008.
- [69] M. R. Fabian, N. Sonenberg, and W. Filipowicz, “Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs.,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 79, pp. 351–379, 2010.
- [70] H. oki Iwakawa and Y. Tomari, “The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression,” *Trends in Cell Biology*, vol. 25, no. 11, pp. 651–665, 2015.
- [71] R. C. Friedman, K. K. H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel, “Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs,” *Genome Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 92–105, 2009.
- [72] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*,” *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843–854, 1993.
- [73] B. J. Reinhart *et al.*, “The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.,” *Nature*, vol. 403, no. 6772, pp. 901–906, 2000.
- [74] A. E. Pasquinelli and G. Ruvkun, “Control of developmental timing by micromRNAs and their targets,” *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 18, pp. 495–513, 2002.
- [75] B. M. Wheeler *et al.*, “The deep evolution of metazoan microRNAs,” *Evol. Dev.*, vol. 11, no. 1, pp. 50–68, 2009.
- [76] A. Kozomara and S. Griffiths-Jones, “MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. SUPPL. 1, 2011.

- [77] J. Hertel *et al.*, “The expansion of the metazoan microRNA repertoire.,” *BMC Genomics*, vol. 7, p. 25, 2006.
- [78] Y. Yuva-Aydemir, A. Simkin, E. Gascon, and F.-B. Gao, “MicroRNA-9: functional evolution of a conserved small regulatory RNA.,” *RNA Biol.*, vol. 8, no. 4, pp. 557–64, 2011.
- [79] M. Coolen, S. Katz, and L. Bally-Cuif, “miR-9: a versatile regulator of neurogenesis.,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. November, p. 220, 2013.
- [80] A. Kozomara and S. Griffiths-Jones, “MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. D1, 2014.
- [81] E. Berezikov, “Evolution of microRNA diversity and regulation in animals.,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 12, no. 12, pp. 846–60, 2011.
- [82] L. P. Lim *et al.*, “The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*.,” *Genes Dev.*, vol. 17, pp. 991–1008, 2003.
- [83] E. C. Lai, C. Wiel, and G. M. Rubin, “Complementary miRNA pairs suggest a regulatory role for miRNA:miRNA duplexes.,” *RNA*, vol. 10, no. 2, pp. 171–175, 2004.
- [84] P. Rajasethupathy *et al.*, “Characterization of Small RNAs in *Aplysia* Reveals a Role for miR-124 in Constraining Synaptic Plasticity through CREB,” *Neuron*, vol. 63, no. 6, pp. 803–817, 2009.
- [85] E. A. Miska *et al.*, “Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain.,” *Genome Biol.*, vol. 5, no. 9, p. R68, 2004.
- [86] L. F. Sempere, S. Freemantle, I. Pitha-Rowe, E. Moss, E. Dmitrovsky, and V. Ambros, “Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation,” *Genome Biol.*, vol. 5, no. 3, p. R13, 2004.
- [87] E. Wienholds *et al.*, “MicroRNA expression in zebrafish embryonic development.,” *Science*, vol. 309, no. 5732, pp. 310–1, 2005.
- [88] A. M. Heimberg, R. Cowper-Sal-lari, M. Semon, P. C. J. Donoghue, and K. J. Peterson, “microRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 45, pp. 19379–19383, 2010.
- [89] A. S. Yoo *et al.*, “MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons.,” *Nature*, vol. 476, no. 7359, pp. 228–231, 2011.
- [90] J. P. Brown, S. Couillard-Després, C. M. Cooper-Kuhn, J. Winkler, L. Aigner, and H. G. Kuhn, “Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 467, no. 1, pp. 1–10, 2003.

- [91] S. Candiani, "Focus on mirnas evolution: A perspective from amphioxus," *Brief. Funct. Genomics*, vol. 11, no. 2, pp. 107–117, 2012.
- [92] E. Leucci *et al.*, "Inhibition of miR-9 de-represses HuR and DICER1 and impairs Hodgkin lymphoma tumour outgrowth in vivo," *Oncogene*, vol. 31, no. 49, pp. 5081–5089, 2012.
- [93] L. Ma *et al.*, "miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis," *Nat. Cell Biol.*, 2010.
- [94] S. M. Wilting *et al.*, "Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis," *Oncogene*, vol. 32, no. 1, pp. 106–116, 2013.
- [95] M. H. Lu, C. C. Huang, M. R. Pan, H. H. Chen, and W. C. Hung, "Prospero homeobox 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells by inhibiting e-cadherin via miR-9," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 23, pp. 6416–6425, 2012.
- [96] P. Rotkrua, Y. Akiyama, Y. Hashimoto, T. Otsubo, and Y. Yuasa, "MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells," *Int. J. Cancer*, vol. 129, no. 11, pp. 2611–2620, 2011.
- [97] E. Ferretti *et al.*, "MicroRNA profiling in human medulloblastoma," *Int. J. Cancer*, vol. 124, no. 3, pp. 568–577, 2009.
- [98] T. M. Kim, W. Huang, R. Park, P. J. Park, and M. D. Johnson, "A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by microRNAs," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 9, pp. 3387–3399, 2011.
- [99] D. Schraivogel *et al.*, "CAMTA1 is a novel tumour suppressor regulated by miR-9/9* in glioblastoma stem cells.," *EMBO J.*, vol. 30, no. 20, pp. 4309–22, 2011.
- [100] Z. Huang, L. Cheng, O. A. Guryanova, Q. Wu, and S. Bao, "Cancer stem cells in glioblastoma-molecular signaling and therapeutic targeting," *Protein and Cell*, vol. 1, no. 7. pp. 638–655, 2010.
- [101] H. M. Jeon *et al.*, "ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 9, pp. 3410–3421, 2011.
- [102] V. Senyuk *et al.*, "Critical role of miR-9 in myelopoiesis and EVI1-induced leukemogenesis.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 14. pp. 5594–9, 2013.
- [103] G. Heller *et al.*, "Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 6, pp. 1619–1629, 2012.

- [104] E. Bandres *et al.*, “Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer,” *Int. J. Cancer*, vol. 125, no. 11, pp. 2737–2743, 2009.
- [105] P. Lau and B. de Strooper, “Dysregulated microRNAs in neurodegenerative disorders,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 21, no. 7, pp. 768–773, 2010.
- [106] N. J. Buckley, R. Johnson, C. Zuccato, A. Bithell, and E. Cattaneo, “The role of REST in transcriptional and epigenetic dysregulation in Huntington’s disease,” *Neurobiology of Disease*, vol. 39, no. 1, pp. 28–39, 2010.
- [107] A. N. Packer, Y. Xing, S. Q. Harper, L. Jones, and B. L. Davidson, “The Bifunctional microRNA miR-9/miR-9* Regulates REST and CoREST and Is Downregulated in Huntington’s Disease,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 53, pp. 14341–14346, 2008.
- [108] J. C. Richardson *et al.*, “O3-02-07: Identification of miRNA changes in Alzheimer’s disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways,” *Alzheimer’s Dement.*, vol. 4, no. 4, p. T162, 2008.
- [109] S. S. Hébert *et al.*, “MicroRNA regulation of Alzheimer’s Amyloid precursor protein expression,” *Neurobiol Dis*, vol. 33, no. 3, pp. 422–428, 2009.
- [110] S. S. Hébert *et al.*, “Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer’s disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 17, pp. 6415–20, 2008.
- [111] J. Kim *et al.*, “A MicroRNA Feedback Circuit in Midbrain Dopamine Neurons,” *Science (80-.)*, vol. 317, no. 5842, pp. 1220–1224, 2007.
- [112] S. Haramati *et al.*, “miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 29, pp. 13111–13116, 2010.
- [113] B. John, A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander, and D. S. Marks, “Human MicroRNA Targets,” *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 11, p. e363, 2004.
- [114] B. John, C. Sander, and D. S. Marks, “Prediction of human microRNA targets,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 342, pp. 101–113, 2006.
- [115] X. Wang, “miRDB: A microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface,” *RNA*, vol. 14, no. 6, pp. 1012–1017, 2008.
- [116] K. C. Miranda *et al.*, “A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes,” *Cell*, vol. 126, no. 6, pp. 1203–1217, 2006.
- [117] B. P. Lewis, C. B. Burge, and D. P. Bartel, “Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets,” *Cell*, vol. 120, no. 1, pp. 15–20, 2005.

- [118] A. Grimson, K. K. H. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, and D. P. Bartel, "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing," *Mol. Cell*, vol. 27, no. 1, pp. 91–105, 2007.
- [119] D. M. Garcia, D. Baek, C. Shin, G. W. Bell, A. Grimson, and D. P. Bartel, "Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of *Isy-6* and other microRNAs," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 18, no. 10, pp. 1139–1146, 2011.
- [120] V. Agarwal, G. W. Bell, J. W. Nam, and D. P. Bartel, "Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs," *Elife*, vol. 4, no. AUGUST2015, 2015.
- [121] B. Fromm *et al.*, "A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome.," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 49, no. 1, pp. 213–42, 2015.
- [122] R. P. Verma and C. Hansch, "Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 15, no. 6, pp. 2223–2268, 2007.
- [123] T. H. Chun *et al.*, "MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix," *J. Cell Biol.*, 2004.
- [124] A. C. Aplin, W. H. Zhu, E. Fogel, and R. F. Nicosia, "Vascular regression and survival are differentially regulated by MT1-MMP and TIMPs in the aortic ring model of angiogenesis," *Am. J. Physiol. Physiol.*, 2009.
- [125] F. Sabeh *et al.*, "Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP," *J. Cell Biol.*, 2004.
- [126] J. L. Biedler, L. Helson, and B. A. Spengler, "Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture," *Cancer Res.*, vol. 33, no. 11, pp. 2643–2652, 1973.
- [127] J. L. Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, and L. S. Freedman, "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones," *Cancer Res*, vol. 38, no. 11 Pt 1, pp. 3751–3757, 1978.
- [128] M. P. La Quaglia and K. M. Manchester, "A comparative analysis of neuroblastic and substrate-adherent human neuroblastoma cell lines.," *J. Pediatr. Surg.*, vol. 31, no. 2, pp. 315–8, 1996.
- [129] M. Canals *et al.*, "Molecular mechanisms involved in the adenosine A and A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures.," *J. Neurochem.*, vol. 92, pp. 337–348, 2005.
- [130] J. Qiao *et al.*, "PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 424, no. 3, pp. 421–426, 2012.

- [131] H. Zhang *et al.*, “microRNA-9 Targets Matrix Metalloproteinase 14 to Inhibit Invasion, Metastasis, and Angiogenesis of Neuroblastoma Cells,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 7, pp. 1454–1466, 2012.
- [132] L. Smirnova, A. Gräfe, A. Seiler, S. Schumacher, R. Nitsch, and F. G. Wulczyn, “Regulation of miRNA expression during neural cell specification,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 21, no. 6, pp. 1469–1477, 2005.
- [133] W. J. Lukiw, “Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer’s disease hippocampus,” *Neuroreport*, vol. 18, no. 3, pp. 297–300, 2007.
- [134] S. P. Persengiev, I. I. Kondova, and R. E. Bontrop, “The impact of MicroRNAs on brain aging and neurodegeneration,” *Current Gerontology and Geriatrics Research*, vol. 2012. 2012.
- [135] S. Volinia *et al.*, “A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 7, pp. 2257–2261, 2006.
- [136] P. Roth *et al.*, “A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients,” *J. Neurochem.*, vol. 118, no. 3, pp. 449–457, 2011.
- [137] I. G. Bruno *et al.*, “Identification of a MicroRNA that Activates Gene Expression by Repressing Nonsense-Mediated RNA Decay,” *Mol. Cell*, vol. 42, no. 4, pp. 500–510, 2011.
- [138] S. Baskerville and D. P. Bartel, “Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes,” *RNA*, vol. 11, no. 3, pp. 241–7, 2005.
- [139] D. Lutter, C. Marr, J. Krumsiek, E. W. Lang, and F. J. Theis, “Synergistic and antagonistic host-target relationships mediated by intronic microRNAs,” in *Proc. {GSSB} 2009*, 2009.
- [140] D. Lutter, C. Marr, J. Krumsiek, E. W. Lang, and F. J. Theis, “Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects,” *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, p. 224, 2010.
- [141] D. L. Corcoran, K. V. Pandit, B. Gordon, A. Bhattacharjee, N. Kaminski, and P. V. Benos, “Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data,” *PLoS One*, vol. 4, no. 4, 2009.
- [142] A. M. Monteys *et al.*, “Structure and activity of putative intronic miRNA promoters,” *RNA*, vol. 16, no. 3, pp. 495–505, 2010.
- [143] M. Muiños-Gimeno, M. Montfort, M. Bayés, X. Estivill, and Y. Espinosa-Parrilla, “Design and evaluation of a panel of single-nucleotide polymorphisms in microRNA genomic regions for association studies in human disease,” *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 18, no. 2, pp. 218–226, 2010.
- [144] Y.-D. Zhu *et al.*, “Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia,” *Med. Oncol.*, vol. 29, no. 4, pp. 2323–31, 2012.

- [145] A. P. Khan *et al.*, “Quantitative proteomic profiling of prostate cancer reveals a role for miR-128 in prostate cancer.,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 9, no. 2, pp. 298–312, 2010.
- [146] H.-H. Woo, C. F. László, S. Greco, and S. K. Chambers, “Regulation of colony stimulating factor-1 expression and ovarian cancer cell behavior in vitro by miR-128 and miR-152.,” *Mol. Cancer*, vol. 11, p. 58, 2012.
- [147] Y. Zhu *et al.*, “Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 22, pp. 7105–7115, 2011.
- [148] V. Fulci *et al.*, “Characterization of B- and T -Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia by Integrated Analysis of MicroRNA and mRNA Expression Profiles,” *Cancer*, vol. 1082, no. April, pp. 1069–1082, 2009.
- [149] R. Garzon *et al.*, “Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 10, pp. 3945–50, 2008.
- [150] J. Novakova, O. Slaby, R. Vyzula, and J. Michalek, “MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 386, no. 1. pp. 1–5, 2009.
- [151] J. C. S. Pang, W. K. Kwok, Z. Chen, and H. K. Ng, “Oncogenic role of microRNAs in brain tumors,” *Acta Neuropathologica*, vol. 117, no. 6. pp. 599–611, 2009.
- [152] E. Lages *et al.*, “MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes,” *PLoS One*, vol. 6, no. 5, 2011.
- [153] S. Wuchty *et al.*, “Prediction of associations between microRNAs and gene expression in glioma biology,” *PLoS One*, vol. 6, no. 2, 2011.
- [154] S. Venkataraman, I. Alimova, R. Fan, P. Harris, N. Foreman, and R. Vibhakar, “MicroRNA 128a increases intracellular ROS level by targeting Bmi-1 and inhibits medulloblastoma cancer cell growth by promoting senescence,” *PLoS One*, vol. 5, no. 6, 2010.
- [155] T. Katada *et al.*, “MicroRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer,” *Int. J. Oncol.*, vol. 34, no. 2, pp. 537–542, 2009.
- [156] C. Evangelisti *et al.*, “MiR-128 up-regulation inhibits Reelin and DCX expression and reduces neuroblastoma cell motility and invasiveness.,” *FASEB J.*, vol. 23, no. 12, pp. 4276–4287, 2009.
- [157] M. Guidi, M. Muiños-Gimeno, B. Kagerbauer, E. Martí, X. Estivill, and Y. Espinosa-Parrilla, “Overexpression of miR-128 specifically inhibits the truncated isoform of NTRK3 and upregulates BCL2 in SH-SY5Y neuroblastoma cells.,” *BMC Mol. Biol.*, vol. 11, no. 1, p. 95, 2010.

- [158] E. J. Weeber *et al.*, “Reelin and apoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 42, pp. 39944–39952, 2002.
- [159] U. Beffert *et al.*, “Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2,” *Neuron*, vol. 47, no. 4, pp. 567–579, 2005.
- [160] G. D’Arcangelo, “Apoer2: A Reelin receptor to remember,” *Neuron*, vol. 47, no. 4, pp. 471–473, 2005.
- [161] S. Niu, A. Renfro, C. C. Quattrocchi, M. Sheldon, and G. D’Arcangelo, “Reelin Promotes Hippocampal Dendrite Development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 Pathway,” *Neuron*, vol. 41, no. 1, pp. 71–84, 2004.
- [162] S. Niu, O. Yabut, and G. D’Arcangelo, “The Reelin Signaling Pathway Promotes Dendritic Spine Development in Hippocampal Neurons,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 41, pp. 10339–10348, 2008.
- [163] S. Tyagi and F. R. Kramer, “Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 303–308, 1996.
- [164] P. J. Santangelo, “Dual FRET molecular beacons for mRNA detection in living cells,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 6, pp. e57–e57, 2004.
- [165] G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, and F. R. Kramer, “Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 11, pp. 6171–6, 1999.
- [166] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, and G. Bao, “Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons,” *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 4, pp. 1319–1330, 2003.
- [167] A. Tsourkas, M. A. Behlke, and G. Bao, “Structure-function relationships of shared-stem and conventional molecular beacons,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 19, pp. 4208–15, 2002.
- [168] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand, “Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product By Utilizing the 5’-]3’ Exonuclease Activity of *Thermus-Aquaticus* Dna-Polymerase,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 16, pp. 7276–7280, 1991.
- [169] S. D. Bélanger, M. Boissinot, C. Ménard, F. J. Picard, and M. G. Bergeron, “Rapid detection of Shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the Smart Cycler,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 4, pp. 1436–1440, 2002.
- [170] S. D. Bélanger *et al.*, “Rapid Detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR Rapid Detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 2, pp. 730–734, 2003.

- [171] A. Beloukas, D. Paraskevis, M. Psychogiou, and A. Hatzakis, "The Role of HIV-1 DNA as an Additional Marker of HIV-1 Infection," *Curr. HIV Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 255–265, 2009.
- [172] I. Täpp, L. Malmberg, E. Rennel, M. Wik, and A. C. Syvänen, "Homogeneous scoring of single-nucleotide polymorphisms: Comparison of the 5'-nuclease TaqMan® assay and Molecular Beacon probes," *Biotechniques*, vol. 28, no. 4, pp. 732–738, 2000.
- [173] M. M. Mhlanga and L. Malmberg, "Using Molecular Beacons to Detect Single-Nucleotide Polymorphisms with Real-Time PCR," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 463–471, 2001.
- [174] L. B. Barreiro, R. Henriques, and M. M. Mhlanga, "High-throughput SNP genotyping: combining tag SNPs and molecular beacons.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 578, pp. 255–76, 2009.
- [175] L. G. Kostrikis, S. Shin, and D. D. Ho, "Genotyping HIV-1 and HCV strains by a combinatorial DNA melting assay (COMA)," *Mol. Med.*, vol. 4, no. 7, pp. 443–453, 1998.
- [176] G. Orrù *et al.*, "Rapid PCR real-time genotyping of M-Malton alpha1-antitrypsin deficiency alleles by molecular beacons.," *Diagn. Mol. Pathol.*, vol. 14, no. 4, pp. 237–42, 2005.
- [177] G. Orru *et al.*, "Rapid multiplex real-time PCR by molecular beacons for different BRAF allele detection in papillary thyroid carcinoma.," *Diagn. Mol. Pathol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–8, 2010.
- [178] K. Szuhai *et al.*, "A novel strategy for human papillomavirus detection and genotyping with SybrGreen and molecular beacon polymerase chain reaction.," *Am. J. Pathol.*, vol. 159, no. 5, pp. 1651–1660, 2001.
- [179] B. A. J. Giesendorf, J. A. M. Vet, S. Tyagi, E. J. M. G. Mensink, F. J. M. Trijbels, and H. J. Blom, "Molecular beacons: A new approach for semiautomated mutation analysis," *Clin. Chem.*, vol. 44, no. 3, pp. 482–486, 1998.
- [180] K. Frei *et al.*, "Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria," *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 10, no. 7, pp. 427–432, 2002.
- [181] D. R. Hodgson, C. a Foy, M. Partridge, S. Pateromichelakis, and N. J. Gibson, "Development of a facile fluorescent assay for the detection of 80 mutations within the p53 gene.," *Mol. Med.*, vol. 8, no. 5, pp. 227–37, 2002.
- [182] J. B. Biggins, J. R. Prudent, D. J. Marshall, M. Ruppen, and J. S. Thorson, "A continuous assay for DNA cleavage: the application of 'break lights' to enediynes, iron-dependent agents, and nucleases.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 25, pp. 13537–42, 2000.
- [183] J. J. Li, R. Geyer, and W. Tan, "Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 11, p. E52, 2000.

- [184] C. D. Medley, T. J. Drake, J. M. Tomasini, R. J. Rogers, and W. Tan, "Simultaneous monitoring of the expression of multiple genes inside of single breast carcinoma cells," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 15, pp. 4713–4718, 2005.
- [185] X. H. Peng *et al.*, "Real-time detection of gene expression in cancer cells using molecular beacon imaging: new strategies for cancer research," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 5, pp. 1909–1917, 2005.
- [186] L. Yang, Z. Cao, Y. Lin, W. C. Wood, and C. A. Staley, "Molecular beacon imaging of tumor marker gene expression in pancreatic cancer cells.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 4, no. 5, pp. 561–70, 2005.
- [187] A. Wang, A. M. Salazar, M. V. Yates, A. Mulchandani, and W. Chen, "Visualization and detection of infectious coxsackievirus replication using a combined cell culture-molecular beacon assay," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 12, pp. 8397–8401, 2005.
- [188] P. Santangelo, N. Nitin, L. Laconte, A. Woolums, and G. Bao, "Live-Cell Characterization and Analysis of a Clinical Isolate of Bovine Respiratory Syncytial Virus, Using Molecular Beacons," *J. Virol.*, vol. 80, no. 2, pp. 682–688, 2006.
- [189] H.-Y. Yeh, M. V. Yates, A. Mulchandani, and W. Chen, "Visualizing the dynamics of viral replication in living cells via Tat peptide delivery of nuclease-resistant molecular beacons.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 45, pp. 17522–17525, 2008.
- [190] S. Tyagi and O. Alsmadi, "Imaging Native β -Actin mRNA in Motile Fibroblasts," *Biophys. J.*, vol. 87, no. 6, pp. 4153–4162, 2004.
- [191] B. Simon, M. Sandhu, and K. L. Myhr, "Live FISH: Imaging mRNA in living neurons," *J. Neurosci. Res.*, vol. 88, no. 1, pp. 55–63, 2010.
- [192] R. Monroy-Contreras and L. Vaca, "Molecular beacons: powerful tools for imaging RNA in living cells.," *J. Nucleic Acids*, vol. 2011, p. 741723, 2011.
- [193] X. H. Fang, J. W. J. Li, J. Perlette, W. H. Tan, and K. M. Wang, "Molecular beacons - Novel fluorescent probes," *Anal Chem*, vol. 72, no. 23, pp. 747A-753A, 2000.
- [194] W. Tan, X. Fang, J. Li, and X. Liu, "Molecular beacons: a novel DNA probe for nucleic acid and protein studies.," *Chemistry*, vol. 6, pp. 1107–1111, 2000.
- [195] S. a E. Marras, F. R. Kramer, and S. Tyagi, "Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 21, p. e122, 2002.
- [196] K. M. Parkhurst and L. J. Parkhurst, "Donor—Acceptor Distance Distributions in a Double-Labeled Fluorescent Oligonucleotide Both as a Single Strand and in Duplexes," *Biochemistry*, vol. 34, no. 1, pp. 293–300, 1995.

- [197] D. C. Harris, "Applications of Spectrophotometry," *Quant. Chem. Anal.*, vol. (8th ed.), pp. 419–444, 2010.
- [198] D. L. Dexter, "A Theory of Sensitized Luminescence in Solids," *J. Chem. Phys.*, vol. 21, no. 5, pp. 836–850, 1953.
- [199] C. B. Murphy, Y. Zhang, T. Troxler, V. Ferry, J. J. Martin, and W. E. Jones, "Probing Förster and Dexter Energy-Transfer Mechanisms in Fluorescent Conjugated Polymer Chemosensors," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 5, pp. 1537–1543, 2004.
- [200] S. Bernacchi and Y. Mély, "Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 13, p. e62, 2001.
- [201] A. K. Chen, M. A. Behlke, and A. Tsourkas, "Sub-cellular trafficking and functionality of 2'??-O-methyl and 2'??-O-methyl-phosphorothioate molecular beacons," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 22, 2009.
- [202] L. B. McGown and K. Nithipatikom, "Molecular Fluorescence and Phosphorescence," *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 35, no. 4, pp. 353–393, 2000.
- [203] C. A. M. Seidel, A. Schulz, and M. H. M. Sauer, "Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies," *J. Phys. Chem.*, vol. 100, no. 13, pp. 5541–5553, 1996.
- [204] T. Heinlein, J.-P. Knemeyer, O. Piestert, and M. Sauer, "Photoinduced Electron Transfer between Fluorescent Dyes and Guanosine Residues in DNA-Hairpins," *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 31, pp. 7957–7964, 2003.
- [205] G. Luo, L. Zheng, X. Zhang, J. Zhang, P. Nilsson-Ehle, and N. Xu, "Genotyping of single nucleotide polymorphisms using base-quenched probe: A method does not invariably depend on the deoxyguanosine nucleotide," *Anal. Biochem.*, vol. 386, no. 2, pp. 161–166, 2009.
- [206] S. A. Oladepo and G. R. Loppnow, "Self-quenching smart probes as a platform for the detection of sequence-specific UV-induced DNA photodamage," in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, vol. 397, no. 7, pp. 2949–2957.
- [207] N. Venkatesan, Y. Jun Seo, and B. Hyeon Kim, "Quencher-free molecular beacons: a new strategy in fluorescence based nucleic acid analysis," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, no. 4, p. 648, 2008.
- [208] S. Tyagi, S. a Marras, and F. R. Kramer, "Wavelength-shifting molecular beacons.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1191–1196, 2000.

- [209] S. Tyagi, D. P. Bratu, and F. R. Kramer, "Multicolor molecular beacons for allele discrimination," *Nat. Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, pp. 49–53, 1998.
- [210] L. Tan *et al.*, "Molecular beacons for bioanalytical applications," *Analyst*, vol. 130, no. 7, p. 1002, 2005.
- [211] N. R. Markham and M. Zuker, "UNAFold: Software for nucleic acid folding and hybridization," *Methods Mol. Biol.*, vol. 453, pp. 3–31, 2008.
- [212] X. Fang, J. J. Li, and W. Tan, "Using molecular beacons to probe molecular interactions between lactate dehydrogenase and single-stranded DNA," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 14, pp. 3280–3285, 2000.
- [213] R. Yang *et al.*, "Carbon nanotube-quenched fluorescent oligonucleotides: Probes that fluoresce upon hybridization," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 26, pp. 8351–8358, 2008.
- [214] N. Graf, M. Göritz, and R. Krämer, "A metal-ion-releasing probe for DNA detection by catalytic signal amplification," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 24, pp. 4013–4015, 2006.
- [215] C. J. Yang, J. J. Li, and W. Tan, "Using molecular beacons for sensitive fluorescence assays of the enzymatic cleavage of nucleic acids.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 335, pp. 71–81, 2006.
- [216] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006.
- [217] C. J. Yang, H. Lin, and W. Tan, "Molecular assembly of superquenchers in signaling molecular interactions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 37, pp. 12772–12773, 2005.
- [218] K. Wang *et al.*, "Molecular engineering of DNA: Molecular beacons," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 48, no. 5, pp. 856–870, 2009.
- [219] H. Huang *et al.*, "Design of a modular-based fluorescent conjugated polymer for selective sensing," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 43, no. 42, pp. 5635–5638, 2004.
- [220] C. Y. J. Yang, C. D. Medley, and W. H. Tan, "Monitoring nucleic acids using molecular beacons," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 6, no. 6, pp. 445–452, 2005.
- [221] C. Molenaar *et al.*, "Linear 2' O-Methyl RNA probes for the visualization of RNA in living cells.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 17, pp. E89–E89, 2001.
- [222] A. Tsourkas, M. A. Behlke, and G. Bao, "Hybridization of 2'-O-methyl and 2-deoxy molecular beacons to RNA and DNA targets," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 23, pp. 5168–5174, 2002.
- [223] R. H. Kehlenbach, "In vitro analysis of nuclear mRNA export using molecular beacons for target detection," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 11, p. e64, 2003.

- [224] R. Shah and W. S. El-Deiry, "p53-dependent activation of a molecular beacon in tumor cells following exposure to doxorubicin chemotherapy," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 3, no. 9, pp. 871–875, 2004.
- [225] V. Vijayanathan, T. Thomas, L. H. Sigal, and T. J. Thomas, "Direct measurement of the association constant of HER2/neu antisense oligonucleotide to its target RNA sequence using a molecular beacon," *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, vol. 12, no. 4, pp. 225–33, 2002.
- [226] C. J. Yang *et al.*, "Synthesis and investigation of deoxyribonucleic acid/locked nucleic acid chimeric molecular beacons," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 12, pp. 4030–4041, 2007.
- [227] K. Petersen *et al.*, "Short PNA molecular beacons for real-time PCR allelic discrimination of single nucleotide polymorphisms," *Mol. Cell. Probes*, vol. 18, no. 2, pp. 117–122, 2004.
- [228] H. Kuhn, V. V. Demidov, B. D. Gildea, M. J. Fiandaca, J. C. Coull, and M. D. Frank-Kamenetskii, "PNA Beacons for Duplex DNA," *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, vol. 11, no. 4, pp. 265–270, 2001.
- [229] H. Kuhn, V. V. Demidov, J. M. Coull, M. J. Fiandaca, B. D. Gildea, and M. D. Frank-Kamenetskii, "Hybridization of DNA and PNA molecular beacons to single-stranded and double-stranded DNA targets," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 6, pp. 1097–1103, 2002.
- [230] W. J. Rhee and G. Bao, "Slow non-specific accumulation of 2'-deoxy and 2'-O-methyl oligonucleotide probes at mitochondria in live cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 9, 2010.
- [231] A. K. Chen, M. A. Behlke, and A. Tsourkas, "Avoiding false-positive signals with nuclease-vulnerable molecular beacons in single living cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 16, 2007.
- [232] Y. Wu, C. J. Yang, L. L. Moroz, and W. Tan, "Nucleic acid beacons for long-term real-time intracellular monitoring," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 8, pp. 3025–3028, 2008.
- [233] N. C. Hauser, R. Martinez, A. Jacob, S. Rupp, J. D. Hoheisel, and S. Matysiak, "Utilising the left-helical conformation of L-DNA for analysing different marker types on a single universal microarray platform," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 18, pp. 5101–5111, 2006.
- [234] Y. Kim, C. J. Yang, and W. Tan, "Superior structure stability and selectivity of hairpin nucleic acid probes with an L-DNA stem," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 21, pp. 7279–7287, 2007.
- [235] R. V. Giles, D. G. Spiller, J. Grzybowski, R. E. Clark, P. Nicklin, and D. M. Tidd, "Selecting optimal oligonucleotide composition for maximal antisense effect following streptolysin O-mediated delivery into human leukaemia cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no. 7, pp. 1567–1575, 1998.
- [236] I. Walev *et al.*, "Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 6, pp. 3185–3190, 2001.

- [237] M. A. Barry and A. Eastman, "Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis," *Archives of Biochemistry & Biophysics*, vol. 300, no. 1, pp. 440–450, 1993.
- [238] D. P. Bratu, B.-J. Cha, M. M. Mhlanga, F. R. Kramer, and S. Tyagi, "Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 23, pp. 13308–13, 2003.
- [239] M. Zuker, "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.," *Nucleic Acids Res.*, 2003.
- [240] D. H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker, and D. H. Turner, "Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure," *J. Mol. Biol.*, vol. 288, no. 5, pp. 911–940, 1999.
- [241] J. S. Reuter *et al.*, "RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis," *BMC Bioinformatics*, vol. 11, no. 1, p. 129, 2010.
- [242] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, "Basic local alignment search tool.," *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403–10, 1990.
- [243] A. Tsourkas, M. A. Behlke, Y. Xu, and G. Bao, "Spectroscopic features of dual fluorescence/luminescence resonance energy-transfer molecular beacons," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 15, pp. 3697–3703, 2003.
- [244] T. J. Drake, C. D. Medley, A. Sen, R. J. Rogers, and W. Tan, "Stochasticity of manganese superoxide dismutase mRNA expression in breast carcinoma cells by molecular beacon imaging," *ChemBioChem*, vol. 6, no. 11, pp. 2041–2047, 2005.
- [245] A. K. Chen, O. Davydenko, M. A. Behlke, and A. Tsourkas, "Ratiometric bimolecular beacons for the sensitive detection of RNA in single living cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 14, p. e148, 2010.
- [246] H.-Y. Yeh, M. V. Yates, A. Mulchandani, and W. Chen, "Molecular beacon–quantum dot–Au nanoparticle hybrid nanoprobe for visualizing virus replication in living cells," *Chem. Commun.*, vol. 46, no. 22, p. 3914, 2010.
- [247] A. Zepeda, C. Arias, F. Flores-Jasso, and L. Vaca, "RNA Imaging. Tracking in Real-Time RNA Transport in Neurons Using Molecular Beacons and Confocal Microscopy.," *Methods Cell Biol.*, vol. 113, pp. 361–389, 2013.
- [248] W. J. Kang, Y. L. Cho, J. R. Chae, J. D. Lee, K. J. Choi, and S. Kim, "Molecular beacon-based bioimaging of multiple microRNAs during myogenesis," *Biomaterials*, vol. 32, no. 7, pp. 1915–1922, 2011.

- [249] E. Kim *et al.*, “Consecutive targetable smart nanoprobe for molecular recognition of cytoplasmic microRNA in metastatic breast cancer,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 10, pp. 8525–8535, 2012.
- [250] Q. Yao *et al.*, “Novel molecular beacons to monitor microRNAs in non-small-cell lung cancer,” *Mol. Cell. Probes*, vol. 26, no. 5, pp. 182–187, 2012.
- [251] N. R. Markham and M. Zuker, “DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. SUPPL. 2, 2005.
- [252] S. Griffiths-Jones, R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, and A. J. Enright, “miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. Database issue, pp. D140-4, 2006.
- [253] V. Ambros *et al.*, “A uniform system for microRNA annotation.,” *RNA*, vol. 9, no. 3, pp. 277–9, 2003.
- [254] S. Griffiths-Jones, “MiRBase: MicroRNA sequences and annotation,” *Curr. Protoc. Bioinforma.*, no. SUPPL. 29, pp. 1291–12910, 2010.
- [255] S. Griffiths-Jones, “miRBase blog: About,” *miRBase*, 2013. [Online]. Available: <http://www.mirbase.org/blog/about/>.
- [256] R. Yi *et al.*, “DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 2, pp. 498–502, 2009.
- [257] M. M. W. Chong, G. Zhang, S. Cheloufi, T. A. Neubert, G. J. Hannon, and D. R. Littman, “Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery,” *Genes Dev.*, vol. 24, no. 17, pp. 1951–1960, 2010.
- [258] S. Griffiths-Jones, “miRBase: the microRNA sequence database.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 342, pp. 129–38, 2006.
- [259] S. Griffiths-Jones, “The microRNA Registry.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. Database issue, pp. D109-11, 2004.
- [260] S. Griffiths-Jones, H. K. Saini, S. Van Dongen, and A. J. Enright, “miRBase: Tools for microRNA genomics,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. SUPPL. 1, 2008.
- [261] E. A. Glazov, K. Kongsuwan, W. Assavalapsakul, P. F. Horwood, N. Mitter, and T. J. Mahony, “Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection,” *PLoS One*, vol. 4, no. 7, 2009.
- [262] E. A. Glazov, P. A. Cottee, W. C. Barris, R. J. Moore, B. P. Dalrymple, and M. L. Tizard, “A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach,” *Genome Res.*, vol. 18, no. 6, pp. 957–964, 2008.

- [263] Q. H. Zhu *et al.*, “A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains,” *Genome Res.*, vol. 18, no. 9, pp. 1456–1465, 2008.
- [264] R. Martin *et al.*, “A *Drosophila pasha* mutant distinguishes the canonical microRNA and mirtron pathways,” *Mol Cell Biol*, vol. 29, no. 3, pp. 861–870, 2009.
- [265] H. R. Chiang *et al.*, “Mammalian microRNAs: Experimental evaluation of novel and previously annotated genes,” *Genes Dev.*, vol. 24, no. 10, pp. 992–1009, 2010.
- [266] A. Ventura *et al.*, “Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters.[see comment],” *Cell*, vol. 132, no. 5, pp. 875–886, 2008.
- [267] Y.-K. Kim *et al.*, “TALEN-based knockout library for human microRNAs.,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 20, no. 12, pp. 1458–1464, 2013.
- [268] M. Ha and V. N. Kim, “Regulation of microRNA biogenesis,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 8, pp. 509–524, 2014.
- [269] M. J. Axtell, J. O. Westholm, and E. C. Lai, “Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals,” *Genome Biol.*, vol. 12, no. 4, p. 221, 2011.
- [270] S.-S. Chang, Z. Zhang, and Y. Liu, “RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 66, pp. 305–323, 2012.
- [271] Y. Lee *et al.*, “The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.,” *Nature*, vol. 425, no. 6956, pp. 415–419, 2003.
- [272] J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin, and V. N. Kim, “The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing,” *Genes Dev.*, vol. 18, no. 24, pp. 3016–3027, 2004.
- [273] A. M. Denli, B. B. J. Tops, R. H. a Plasterk, R. F. Ketting, and G. J. Hannon, “Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.,” *Nature*, vol. 432, no. 7014, pp. 231–5, 2004.
- [274] R. I. Gregory, T. P. Chendrimada, and R. Shiekhattar, “MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 342, pp. 33–47, 2006.
- [275] M. T. Bohnsack, K. Czaplinski, and D. Gorlich, “Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs.,” *RNA*, vol. 10, no. 2, pp. 185–91, 2004.
- [276] V. N. Kim, “MicroRNA precursors in motion: Exportin-5 mediates their nuclear export,” *Trends in Cell Biology*, vol. 14, no. 4. pp. 156–159, 2004.
- [277] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen, “Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs,” *Genes Dev.*, vol. 17, no. 24, pp. 3011–3016, 2003.

- [278] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon, "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference," *Nature*, vol. 409, no. 6818, pp. 363–366, 2001.
- [279] A. Grishok *et al.*, "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing," *Cell*, vol. 106, no. 1, pp. 23–34, 2001.
- [280] G. Hutvagner, J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Lint, T. Tuschl, and P. D. Zamore, "A Cellular Function for the RNA-Interference Temporal RNA Small let-7 Enzyme Dicer in the Maturation of the ," *Science (80-.)*, vol. 293, no. 5531, pp. 1–6, 2010.
- [281] R. F. Ketting, S. E. J. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon, and R. H. A. Plasterk, "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 20, pp. 2654–2659, 2001.
- [282] S. W. Knight and B. L. Bass, "A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*," *Science (80-.)*, vol. 293, no. 5538, pp. 2269–2271, 2001.
- [283] T. M. Rana, "Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 23–36, 2007.
- [284] D. S. Schwarz and P. D. Zamore, "Why do miRNAs live in the miRNP?," *Genes and Development*, vol. 16, no. 9, pp. 1025–1031, 2002.
- [285] J. Krol *et al.*, "Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 40, pp. 42230–42239, 2004.
- [286] A. Khvorova, A. Reynolds, and S. D. Jayasena, "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias," *Cell*, vol. 115, no. 2, pp. 209–216, 2003.
- [287] D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P. D. Zamore, "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex," *Cell*, vol. 115, no. 2, pp. 199–208, 2003.
- [288] L. P. Lim *et al.*, "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs.," *Nature*, vol. 433, no. 7027, pp. 769–73, 2005.
- [289] J. G. Doench and P. A. Sharp, "Specificity of microRNA target selection in translational repression.," *Genes Dev.*, vol. 18, no. 5, pp. 504–11, 2004.
- [290] A. Krek *et al.*, "Combinatorial microRNA target predictions.," *Nat. Genet.*, vol. 37, no. 5, pp. 495–500, 2005.

- [291] B. P. Lewis, I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, and C. B. Burge, "Prediction of Mammalian MicroRNA Targets," *Cell*, vol. 115, no. 7, pp. 787–798, 2003.
- [292] J. Liu, M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon, and R. Parker, "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies," *Nat Cell Biol*, vol. 7, no. 7, pp. 719–723, 2005.
- [293] J. Liu, F. V Rivas, J. Wohlschlegel, J. R. Yates, R. Parker, and G. J. Hannon, "A role for the P-body component GW182 in microRNA function," *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, no. 12, pp. 1261–6, 2005.
- [294] S.-P. Chan and F. J. Slack, "microRNA-mediated silencing inside P-bodies.," *RNA Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 97–100, 2006.
- [295] R. Parker and U. Sheth, "P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation," *Molecular Cell*, vol. 25, no. 5. pp. 635–646, 2007.
- [296] S. N. Bhattacharyya, R. Habermacher, U. Martine, E. I. Closs, and W. Filipowicz, "Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress," *Cell*, vol. 125, no. 6, pp. 1111–1124, 2006.
- [297] S. N. Bhattacharyya, R. Habermacher, U. Martine, E. I. Closs, and W. Filipowicz, "Stress-induced Reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells," in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2006, vol. 71, pp. 513–521.
- [298] J. Collier and R. Parker, "General translational repression by activators of mRNA decapping," *Cell*, vol. 122, no. 6, pp. 875–886, 2005.
- [299] P. a Maroney, Y. Yu, J. Fisher, and T. W. Nilsen, "Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 13, no. 12, pp. 1102–7, 2006.
- [300] P. A. Maroney, Y. Yu, and T. W. Nilsen, "MicroRNAs, mRNAs, and translation," in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2006, vol. 71, pp. 531–535.
- [301] N. Kedersha *et al.*, "Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling," *J. Cell Biol.*, vol. 169, no. 6, pp. 871–884, 2005.
- [302] M. A. Andrei, D. Ingelfinger, R. Heintzmann, T. Achsel, R. Rivera-Pomar, and R. Lührmann, "A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies.," *RNA*, vol. 11, no. 5, pp. 717–727, 2005.
- [303] C. Y. Chu and T. M. Rana, "Translation repression in human cells by MicroRNA-induced gene silencing requires RCK/p54," *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 7, pp. 1122–1136, 2006.

- [304] J. G. Ruby, C. H. Jan, and D. P. Bartel, "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing," *Nature*, vol. 448, no. 7149, pp. 83–6, 2007.
- [305] W. J. Chung *et al.*, "Computational and experimental identification of mirtrons in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*," *Genome Res*, vol. 21, no. 2, pp. 286–300, 2011.
- [306] C. H. Jan, R. C. Friedman, J. G. Ruby, and D. P. Bartel, "Formation, regulation and evolution of *Caenorhabditis elegans* 3'UTRs.," *Nature*, vol. 469, no. 7328, pp. 97–101, 2011.
- [307] J. O. Westholm and E. C. Lai, "Mirtrons: MicroRNA biogenesis via splicing," *Biochimie*, vol. 93, no. 11, pp. 1897–1904, 2011.
- [308] S. L. Lin, J. D. Miller, and S. Y. Ying, "Intronic microRNA (miRNA)," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2006, 2006.
- [309] K. Okamura, J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler, and E. C. Lai, "The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*," *Cell*, vol. 130, no. 1, pp. 89–100, 2007.
- [310] J. Han *et al.*, "Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex," *Cell*, vol. 125, no. 5, pp. 887–901, 2006.
- [311] E. Berezikov, W. J. Chung, J. Willis, E. Cuppen, and E. C. Lai, "Mammalian Mirtron Genes," *Mol. Cell*, vol. 28, no. 2, pp. 328–336, 2007.
- [312] J. E. Babiarz, J. G. Ruby, Y. Wang, D. P. Bartel, and R. Blelloch, "Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other microprocessor-independent, dicer-dependent small RNAs," *Genes Dev.*, vol. 22, no. 20, pp. 2773–2785, 2008.
- [313] P. J. Santangelo, "Molecular beacons and related probes for intracellular RNA imaging," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 2, no. 1, pp. 11–19, 2010.
- [314] J. C. Politz, K. L. Taneja, and R. H. Singer, "Characterization of hybridization between synthetic oligodeoxynucleotides and RNA in living cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 23, no. 24, pp. 4946–4953, 1995.
- [315] J. C. Politz, E. S. Browne, D. E. Wolf, and T. Pederson, "Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 11, pp. 6043–6048, 1998.
- [316] J. C. Politz, R. A. Tuft, T. Pederson, and R. H. Singer, "Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells," *Curr. Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 285–291, 1999.
- [317] E. L. Snyder and S. F. Dowdy, "Protein/peptide transduction domains: potential to deliver large DNA molecules into cells.," *Curr. Opin. Mol. Ther.*, vol. 3, no. 2, pp. 147–52, 2001.

- [318] M. Matsushita and H. Matsui, "Protein transduction technology," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 83, no. 5. pp. 324–328, 2005.
- [319] M. Becker-Hapak, S. S. McAllister, and S. F. Dowdy, "TAT-Mediated Protein Transduction into Mammalian Cells," *Methods*, vol. 24, no. 3, pp. 247–256, 2001.
- [320] I. M. Kaplan, J. S. Wadia, and S. F. Dowdy, "Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis," *J. Control. Release*, vol. 102, no. 1, pp. 247–253, 2005.
- [321] H. Brooks, B. Lebleu, and E. Vivès, "Tat peptide-mediated cellular delivery: Back to basics," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 4 SPEC.ISS. pp. 559–577, 2005.
- [322] J. S. Wadia and S. F. Dowdy, "Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 4 SPEC.ISS. pp. 579–596, 2005.
- [323] X. Wu and W. Gehring, "Cellular uptake of the Antennapedia homeodomain polypeptide by macropinocytosis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 443, no. 4, pp. 1136–1140, 2014.
- [324] C. Garcia-Echeverria, L. Jiang, T. M. Ramsey, S. K. Sharma, and Y. N. Chen, "A new Antennapedia-derived vector for intracellular delivery of exogenous compounds," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 11, no. 11, pp. 1363–1366, 2001.
- [325] G. Dom *et al.*, "Cellular uptake of Antennapedia Penetratin peptides is a two-step process in which phase transfer precedes a tryptophan-dependent translocation," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 2. pp. 556–561, 2003.
- [326] N. Nitin, P. J. Santangelo, G. Kim, S. Nie, and G. Bao, "Peptide-linked molecular beacons for efficient delivery and rapid mRNA detection in living cells.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 6, p. e58, 2004.
- [327] N. Nitin and G. Bao, "NLS peptide conjugated molecular beacons for visualizing nuclear RNA in living cells," *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 11, pp. 2205–2211, 2008.
- [328] R. W. Dirks, C. Molenaar, and H. J. Tanke, "Visualizing RNA molecules inside the nucleus of living cells," *Methods*, vol. 29, no. 1, pp. 51–57, 2003.
- [329] A. K. Chen, M. A. Behlke, and A. Tsourkas, "Efficient cytosolic delivery of molecular beacon conjugates and flow cytometric analysis of target RNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 12, 2008.
- [330] M. Endoh *et al.*, "Fetal Gene Transfer by Intrauterine Injection with Microbubble-Enhanced Ultrasound," *Mol. Ther.*, vol. 5, no. 5, pp. 501–508, 2002.

- [331] T. Nozaki, R. Ogawa, L. B. Feril, G. Kagiya, H. Fuse, and T. Kondo, "Enhancement of ultrasound-mediated gene transfection by membrane modification," *J. Gene Med.*, vol. 5, no. 12, pp. 1046–1055, 2003.
- [332] R. Ogawa, T. Nozaki, G. Kagiya, L. B. Feril, H. Fuse, and T. Kondo, "Ultrasound-mediated transfection enhanced by cavitation facilitation and membrane modification," in *AIP Conference Proceedings*, 2005, vol. 754, pp. 91–93.
- [333] S. Koch, P. Pohl, U. Cobet, and N. G. Rainov, "Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 26, no. 5, pp. 897–903, 2000.
- [334] K. Anwer *et al.*, "Ultrasound enhancement of cationic lipid-mediated gene transfer to primary tumors following systemic administration," *Gene Ther*, vol. 7, no. 21, pp. 1833–1839, 2000.
- [335] H. J. Kim, J. F. Greenleaf, R. R. Kinnick, J. T. Bronk, and M. E. Bolander, "Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells," *Hum Gene Ther*, vol. 7, no. 11, pp. 1339–1346, 1996.
- [336] T. M. Klein, E. D. Wolf, R. Wu, and J. C. Sanford, "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells," *Nature*, vol. 327, no. 6117, pp. 70–73, 1987.
- [337] N.-S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, and D. McCabe, "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment," *Genetics*, vol. 87, pp. 9568–9572, 1990.
- [338] E. F. Fynan, R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro, and H. L. Robinson, "DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 24, pp. 11478–82, 1993.
- [339] J. A. Wolff, P. Williams, G. Acsadi, S. Jiao, A. Jani, and W. Chong, "Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo," *Biotechniques*, vol. 11, no. 4, pp. 474–485, 1991.
- [340] C. Condon, S. C. Watkins, C. M. Celluzzi, K. Thompson, and L. D. Falco, "DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells.," *Nat. Med.*, vol. 2, pp. 1122–1128, 1996.