



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Detección del pri-miRNA hsa-mir-196b en líneas
celulares derivadas de cáncer cérvico uterino”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

GUADALUPE ELIZABETH JUAREZ GALLEGOS

ASESOR: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Detección del pri -miRNA hsa-mir196b en líneas celulares
derivadas de cáncer cérvico uterino".

que presenta la pasante: Guadalupe Elizabeth Juárez Gallegos
con número de cuenta: 09917995-3 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 9 de Mayo de 2008

PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
VOCAL	<u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Mauricio Salcedo Vargas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Maritere Domínguez Rojas</u>	

PENSAMIENTOS

- ✂ *"El secreto de la existencia humana no solo está en vivir, sino también en saber para qué se vive." **Fedor Dostoievski***
- ✂ *"Las personas cambian cuando se dan cuenta del potencial que tienen para cambiar las cosas." **Paulo Coelho***
- ✂ *"Si he hecho descubrimientos invaluable ha sido más por tener paciencia que cualquier otro talento." **Isaac Newton***
- ✂ *"Hay que hacer las cosas ordinarias, con un amor extraordinario." **Madre Teresa de Calcuta***
- ✂ *"La medicina es el arte de disputar los hombres a la muerte de hoy, para cedérselos en mejor estado, un poco más tarde." **Noel Clarasó***
- ✂ *"Afortunado el hombre que se ríe de sí mismo, ya que nunca le faltará motivo de diversión." **Habib Bourguiba***
- ✂ *"Sin religión, es decir sin cimientos, sin ataduras a una verdad trascendental, el hombre se viene abajo, girará a todos los vientos." **Benjamín Jarnes***
- ✂ *"La memoria del corazón elimina los malos recuerdos y magnifica los buenos, y gracias a ese artificio, logramos sobrellevar el pasado." **Gabriel García Márquez***
- ✂ *"La verdadera amistad es una planta que crece despaciosamente, y debe resistir los azotes de la adversidad para poder dar buenos frutos." **George Washington***
- ✂ *"Puedes ser solamente una persona para el mundo, pero para una persona tú eres el mundo." **Gabriel García Márquez***

AGRADECIMIENTOS

*Primeramente tengo que darle gracias a **Dios** por permitirme llegar a este momento de mi vida rodeada de tantas personas importantes para mí y llena de tantas bendiciones. Gracias Dios por estar siempre conmigo.*

*Gracias a mis Padres por apoyarme e impulsarme durante todos estos años de mi formación académica. A mi papá **Pablo Juárez Dávila** por ser ese hombre amable y responsable que nunca me negó nada para alcanzar mis metas. A mi mamá **M^a Guadalupe Gallegos Montoya** por nunca dejarme sola, cuidando de mí y alentándome con su ejemplo de mujer inteligente y tenaz.*

*A mis hermanos por siempre estar allí cuando los necesite y compartir tantas cosas juntos; a **Paola** por ser esa hermana mayor que me abrió camino en la senda escolar y a **Marco** por ayudarme a medida de sus posibilidades y que espero verlo todo un triunfador.*

A todos los miembros de mi Familia y personas allegadas que han tenido algo que ver para que yo haya llegado hasta aquí con una palabra de aliento o algún consejo.

*A mi mejor amigo **Mario** por ser mi fiel compañero en tantos trabajos y motivarme para llegar al Centro Medico ya que sin tu apoyo y compañía la carrera no hubiera sido la misma.*

*A mis amigos de la FESC: A **Sara** por ser mi amiga incondicional desde la prepa; a **Karina, Dulce, Janethe, Toño, Carlos, Víctor, Alicia, Vero, Ana Iris, Jairo, Rubén** y **Eve** por todos esos momentos en que sufrimos juntos con las tareas y trabajos pero que también nos divertimos en las fiestas y reuniones inolvidables que gracias a ellas pudimos hacer de la carrera una de las etapas más bonitas de nuestras vidas pero sobre todo por su amistad.*

*A toda la **generación 29** por compartir tantas experiencias inolvidables.*

A todos mis profesores de la FES Cuautitlán por transmitirme sus conocimientos para poderlos aplicar en mi desempeño profesional.

*A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por ser mi alma mater y que siempre la llevaré en mi mente y pondré su nombre en alto.*

*A la **UNAM** por brindarme una educación de calidad y al alcance de todos y así poder decir que soy orgullosamente **PUMA**.*

Al Dr. Mauricio Salcedo Vargas por haber creído en mí para la realización de esta tesis y apoyarme como asesor de este trabajo.

A todo el grupo de trabajo del Laboratorio de Oncología Genómica del CMN siglo XXI, a Vane, Sergio, Raúl, Karla, Hugo, Brenda, David, Paty Piña, Paty Mendoza, y la Dra. Guela por su apoyo y enseñanzas.

A las profesoras:

*Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo
QFB. Rosalba Bonilla Sánchez
MC. Ana Laura Vázquez Martínez
MC. Maritere Domínguez Rojas*

Por su tiempo invertido para revisar este trabajo y por sus consejos.

“Detección del pri-miRNA hsa-mir-196b en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino”

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Genómica de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Bajo la tutoría del Dr. Mauricio Salcedo Vargas.

	Páginas
Abreviaturas	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	IV
Resumen	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Cáncer cérvico uterino	1
1.3. Virus del papiloma humano	4
1.3.1. Biología molecular del virus del papiloma humano	4
1.3.2. Tipos de Virus del Papiloma Humano	4
1.4. RNAs pequeños	5
1.5. MicroRNAs	6
1.5.1. Biogénesis de los microRNAs	7
1.5.2. Mecanismo y de función de los microRNAs	10
1.5.3. MicroRNAs asociados al cáncer	11
1.5.4. MicroRNAs como oncogenes y genes supresores de tumores	17
1.6. MicroRNA hsa-mir-196b	20
1.6.1. Estructura tallo-burbuja (stem-loop) del pri-miRNA hsa-mir-196b	20
1.6.2. Secuencia madura del miRNA hsa-mir-196b	21
1.6.3. Blancos del hsa-mir -196b	21
1.7. Genes HOX en Cáncer cérvico uterino	22
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo General	25
3.2. Objetivos particulares	25
4. DIAGRAMA DE TRABAJO	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS	27
5.1. Muestras Biológicas	27
5.2. Reactivos Químicos	27
5.3. Equipos	28
5.4. Cultivos celulares	28

	Páginas
5.5. Purificación de linfocitos	28
5.6. Extracción de RNA total	28
5.7. Evaluación de la integridad de los RNAs	29
5.8. Detección de la presencia del pri-miRNA hsa-mir-196b por RT-PCR	29
5.9. Evaluación de los productos de amplificación	31
6. RESULTADOS	32
6.1. Cultivos celulares	32
6.2. Extracción de RNA total	33
6.3. Detección de la presencia del pri-miRNA hsa-mir-196b por RT-PCR	35
6.4. Evaluación de los productos de amplificación	36
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIÓN	41
9. GLOSARIO	42
10. REFERENCIAS	45

Abreviaturas

Ago	Argonauta.
BCL2	Linfoma 2 de la Célula B.
CaCU	Cáncer Cérvico Uterino.
CHC	Carcinoma Hepatocelular.
CN	Cérvix Normal
CPT	Carcinoma Papilar de Tiroides.
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ETS	Enfermedades de Transmisión Sexual.
Exp5	Exportina 5.
GDP	Guanosín Difosfato
GR	Glóbulos Rojos
GS	Genes Supresores.
GTP	Guanosín Trifosfato
hsa-mir-196b	Homo Sapiens MicroRNA 196b.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
LC	Linfocitos
LEIAG	Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado
LEIBG	Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica.
LLC-B	Leucemia Linfocítica de las Células B.
min	Minutos
miR	MicroRNA
miRNA	MicroRNA
miRNA*	MicroRNA complemento del microRNA maduro.
mRNA	RNA Mensajero.
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ng	Nanogramos

nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ONC	Oncogenes.
ORF	Marco Abierto de Lectura.
pb	Pares de Bases.
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico.
RNA_{dc}	RNA de doble cadena
RNA_i	RNA de interferencia.
rpm	Revoluciones por minuto.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medio de Cultivo).
rRNAs	RNAs ribosomales.
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a una Transcriptasa Inversa.
SF	Sitios Frágiles
siRNAs.	RNAs pequeños de interferencia.
snoRNAs	RNAs nucleolares pequeños.
snRNAs	RNAs nucleares pequeños.
VPH	Virus del Papiloma Humano.
μl	Microlitros.

Índice de Figuras

	Páginas
Figura 1. Cáncer Cérvico uterino.	1
Figura 2. Incidencia de Cáncer cérvico uterino en el Mundo.	2
Figura 3. Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos en mujeres. INEGI, 2005.	2
Figura 4. Infección del VPH a una célula	5
Figura 5. Genoma del VPH	5
Figura 6. Transcritos de los pri-miRNAs en sus diversas formas.	6
Figura 7. Biogénesis de los microRNAs.	9
Figura 8. Mecanismo de acción de los microRNAs	10
Figura 9. Correlación entre SF y miRNAs.	12
Figura 10. Algunos mecanismos propuestos por los cuales ciertos microRNAs funcionan como Oncomirs.	15
Figura 11. MicroRNA funcionando como gen supresor de tumor.	18
Figura 12. MicroRNA funcionando como oncogén.	18
Figura 13. Localización cromosómica del microRNA hsa-mir-196b.	20
Figura 14. Organización genómica de los grupos de genes HOX.	22
Figura 15. Representación esquemática del patrón de expresión del grupo de HOX Abd-B en cérvix uterino humano.	23
Figura 16. Células HeLa.	32
Figura 17. Células INBL.	32
Figura 18. Células SiHa.	32
Figura 19. Células CaLO.	32
Figura 20. Células CaSki.	32
Figura 21. Geles de RNAs Totales.	34
Figura 22. “Blasteo” de las secuencias del hsa-mir-196b.	36
Figura 23. Gel de Productos de amplificación. Se corrió por separado el gen constitutivo y el pri-miRNA.	37
Figura 24. Gel de Productos de amplificación. Se corrió en el mismo pozo el gen constitutivo y el pri-miRNA.	37
Figura 25. Gel de Productos de amplificación con el tono más concentrado. Se corrió en el mismo pozo el gen constitutivo y el pri-miRNA.	38

Índice de Tablas

	Páginas
Tabla 1. Sistemas de clasificación de las lesiones precursoras del cáncer cérvico uterino.	3
Tabla 2. Principales microRNA asociados al cáncer y sus genes blanco potenciales.	19
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos empleados.	29
Tabla 4. Reactivos y Condiciones utilizados para la RT- PCR en un solo paso utilizando el sistema Access System (Promega, Madison, WI).	30
Tabla 5. Programa de amplificación para el gen constitutivo - actina	30
Tabla 6. Programa de amplificación para el pri-miRNA hsa-mir-196b.	31
Tabla 7. Cuantificación de los RNAs extraídos.	33
Tabla 8. Posición de los RNAs en el gel.	34
Tabla 9. Concentración de las diluciones de los RNAs extraídos.	35
Tabla 10. Resumen de resultados	38

Resumen

El desarrollo del cáncer representa una compleja serie de interacciones entre factores ambientales, la respuesta inmunológica y características genéticas de cada individuo. Debido a su etiología multifactorial, la carcinogénesis representa un gran reto para la investigación biomédica.

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es la segunda neoplasia ginecológica más frecuente en todo el mundo; además de ser la principal causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer. Casi todos (99,8%) los casos de CaCU se deben a tipos específicos de virus del papiloma humano (VPH). No obstante, la infección por VPH es común y el cáncer cervical es relativamente raro. Por lo tanto, debe haber los factores genéticos subyacentes que predisponen a algunas mujeres para desarrollar la enfermedad.

El estudio de la regulación génica ha cobrado gran importancia; esto confirma que la expresión génica tiene influencia directa sobre una gran cantidad de actividades celulares. Cada día hay más evidencia de que cientos de transcritos pequeños pueden ser factores muy importantes en la regulación genética.

Un microRNA (miRNA) se define como un RNA de cadena sencilla de 18 a 24 nucleótidos de longitud que es generado por la enzima Dicer, una RNAsa de tipo III, a partir de un transcrito endógeno que contiene una estructura de horquilla. El mecanismo del miRNA es determinado por la identidad de su blanco; una vez incorporado en un RISC citoplásmico, el miRNA especificará una escisión si el mRNA tiene suficiente complementariedad al miRNA, o reprimirá la traducción si el mRNA no la tiene.

Recientes descubrimientos han apoyado fuertemente el papel de miRNAs en la regulación de procesos cruciales tales como proliferación celular, apoptosis, desarrollo, diferenciación y metabolismo. Últimamente, la expresión del miRNA se ha ligado al cáncer. Diversos grupos han demostrado que los miRNAs se encuentran expresados de forma diferente en los tejidos normales que en los tejidos con tumor, pudiendo funcionar como una nueva clase de oncogenes o de genes supresores de tumor llamados "oncomirs".

El microRNA 196b también llamado hsa-mir-196b es una secuencia expresada que se localiza en el cromosoma 7, región 1, banda 5, subbanda 2; con una estructura primaria de 85 nucleótidos y que puede interactuar con numerosos genes blancos y la mayoría de ellos relacionados con la proliferación celular pero de todos estos, solo se han confirmado algunos genes HOX. Una asociación entre la expresión de los genes homeobox (HOX) y la transformación oncogénica se ha divulgado recientemente en tumores humanos.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia del pri-miRNA hsa-mir-196b en el cérvix uterino humano. Para esto se realizó el cultivo en una atmósfera humedecida de 95% aire y 5% CO₂, usando RPMI 1640 y 10% de suero fetal bovino a 37°C de cinco líneas celulares derivadas de CaCU (HeLa, SiHa, CaSki, CaLO, INBL), la purificación de linfocitos obtenidos de la sangre periférica de una persona sin ningún padecimiento y la posterior extracción del RNA, a partir de tres muestras de tejidos cervicales normales, los linfocitos y las líneas celulares ya mencionadas.

Una vez obtenidos todos los RNAs de las muestras a estudiar, se procedió a la amplificación del gen constitutivo - actina con los oligonucleótidos citados en materiales y métodos, el tamaño obtenido fue de aproximadamente 243pb, lo cual se esperaba y con esto se verificó que el RNA obtenido era perfectamente amplificable.

Así aplicando la prueba de la RT-PCR en las diversas muestras de RNA, utilizando oligonucleótidos específicos para este microRNA se observó un fragmento de 85pb proveniente del pri-microRNA hsa-mir-196b en las muestras de tejido de cérvix normal sin infección y en las líneas celulares **HeLa, CaLo e INBL**. En cuanto a las líneas celulares **SiHa, CaSki** no se encontró dicho fragmento; formándose dos grupos de líneas celulares uno con la presencia del pri-miRNA y otro sin el pri-miRNA. Así, tenemos la evidencia que el microRNA hsa-mir-196b se expresa normalmente en el epitelio cervical normal sin lesión y que se observa una subexpresión en epitelios donde hay una infección por el VPH 16.

El conocimiento de los miRNAs expresados diferencialmente en las células normales del cérvix como en las células neoplásicas del mismo, puede llevar a contribuir en la explicación del proceso por el cual dichas células infectadas con el VPH llegan a convertirse en células tumorales y posteriormente desarrollar cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El desarrollo del cáncer representa una compleja serie de interacciones entre factores ambientales, la respuesta inmunológica y características genéticas de cada individuo. Debido a su etiología multifactorial, la carcinogénesis representa un gran reto para la investigación biomédica (Hidalgo y Salcedo, 2001)

En los análisis de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se indica que desde la edad madura hasta la vejez, una de las principales causas de muerte en las mujeres es el cáncer. Asimismo, dentro del grupo de tumores malignos que afectan a la población femenina son principalmente los de tipo ginecológico.

En el 2005, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en México, 63 128 personas fallecieron por éstos. El volumen representa 12.7% del total de las defunciones registradas.

Las defunciones por tumores malignos representaron 11.3% del total de fallecimientos en los varones y 14.5%, en las mujeres (INEGI, 2007).

1.2 Cáncer Cérvico uterino



Figura 1. Cáncer Cérvico uterino

El cáncer cérvico uterino (CaCU) llamado también cáncer de cérvix o cáncer de cuello uterino es la segunda neoplasia ginecológica más frecuente en todo el mundo. Cerca de 500,000 nuevos casos se presentan cada año. Cerca del 80% de casos se presentan en los países menos desarrollados (Waggoner, 2003). Tan solo en el año 2002 se presentaron 493 243 y de estos, 273 505 fueron decesos.

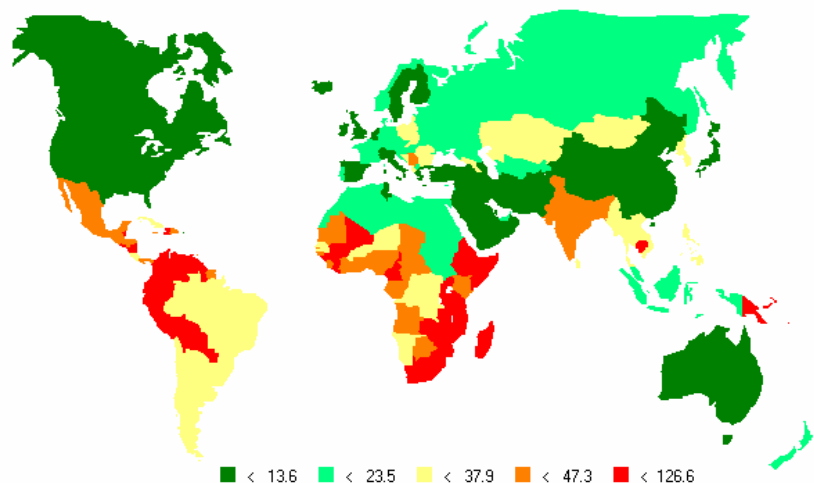


Figura 2. Incidencia de Cáncer cérvico uterino en el Mundo. GLOBOCAN 2002

En México, en el año 2002, se presentaron 12 512 nuevos casos de cáncer cérvico uterino, de los cuales 5 777, es decir el 46% de los casos, fueron decesos (Ferlay et al., 2004). Esta enfermedad fue la principal causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, en el año 2005 ocupó un 13.3% de las defunciones por cáncer (INEGI, 2007).

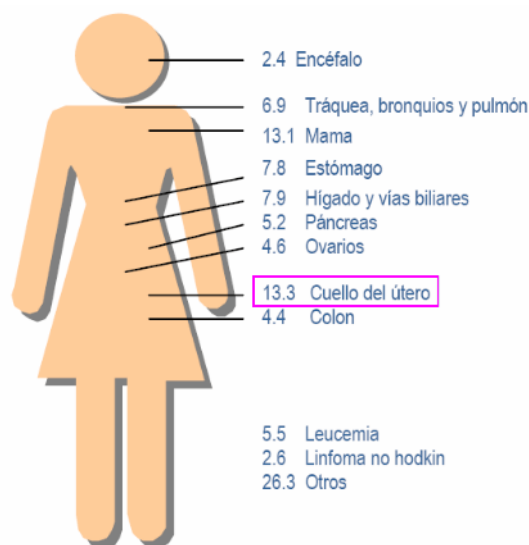


Figura 3. Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos en mujeres. INEGI, 2005.

El principal agente etiológico identificado en la actualidad es la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Otros factores de riesgo descritos clásicamente son el inicio precoz de relaciones sexuales, la promiscuidad, la multiparidad, la toma de anticonceptivos orales (relación con adenocarcinomas), los antecedentes de algunas enfermedades de transmisión sexual (ETS), el tabaco, la dieta y algunos factores genéticos (relacionados con la inmunidad) (Sánchez-Seco, 2002; Lerma, 2005).

La citología cervicovaginal, la colposcopia, la histopatología y las pruebas moleculares para detectar DNA de papilomavirus humano son métodos utilizados en el diagnóstico de esta patología (Dzul-Rosado et al., 2004).

La mayoría de las mujeres que desarrollan este cáncer tienen entre 40 y 50 años de edad. Sin embargo, cada vez es más común ver mujeres jóvenes infectadas, que a edades de 20 y 30 años se les diagnostica CaCU.

Tabla 1. *Sistemas de clasificación de las lesiones precursoras del cáncer cérvico uterino.*

Sistema Bethesda	Sistema Richard	OMS
LEIBG Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado	IVPH Infección por Virus del Papiloma Humano	
	NIC I	Displasia Leve
LEIAG Lesión intraepitelial escamosa de alto grado	NIC II	Displasia Moderada
	NIC III Neoplasia Intraepitelial Cervical	Displasia Severa o Carcinoma in situ
		Carcinoma Invasor

Casi todos (99,8%) los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de virus del papiloma humano (VPH). El enlace entre el CaCU y el VPH fue demostrado a principios de los años 80's por el doctor Harald zur Hausen y la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad. La infección por VPH puede ser causa de otros carcinomas ano genitales incluyendo de pene, vagina, vulva y ano (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

1.3 Virus del Papiloma Humano

1.3.1 Biología molecular del virus del papiloma humano

El virus del papiloma, pertenece a la familia Papillomaviridae, una familia recientemente reconocida como distinta de los poliomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, (ICTV) (de Villiers et al., 2004). Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infectan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles. La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral. Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

El genoma del VPH consiste de una molécula de DNA circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (Vilata, 2001).

1.3.2 Tipos de Virus del Papiloma Humano

Actualmente se conocen unas 20 cepas del VPH, que pueden producir cáncer de cérvix y se clasifican en virus de bajo riesgo (tipos 6, 11, 41, 42, 43, 44) y de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Las cepas de alto riesgo (principalmente 16 y 18) pueden identificarse en más del 90% de los carcinomas escamosos invasores y en la mayoría (60-85%) de adenocarcinomas (Muñoz et al., 2003).

El papilomavirus humano (VPH) ha demostrado ser el agente etiológico principal tanto en carcinoma escamoso como en adenocarcinomas de cérvix, debido a que los tipos de VPH de alto riesgo 16 y 18 son detectados en más del 95% de los cánceres cervicales.

No obstante, la infección por VPH es común y el cáncer cervical es relativamente raro. Por lo tanto, debe haber los factores genéticos subyacentes que predisponen a algunas mujeres para desarrollar la enfermedad (Martin et al., 2006).

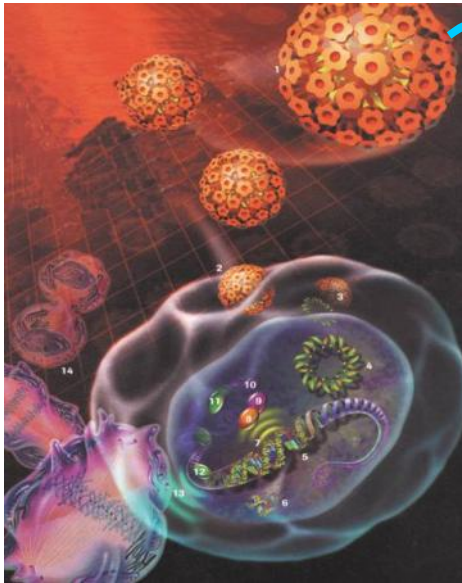


Figura 4. Infección del VPH a una célula

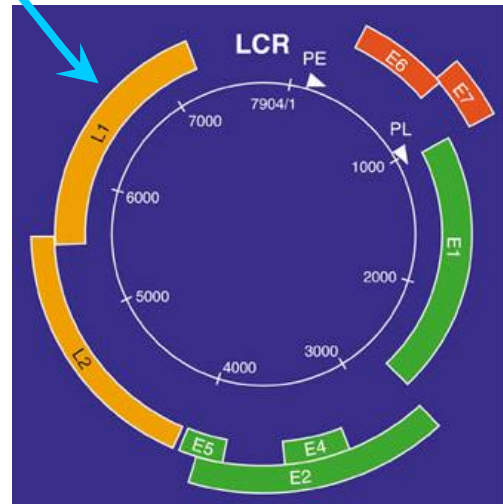


Figura 5. Genoma del VPH.

1.4 RNAs pequeños

El estudio de la regulación génica ha cobrado gran importancia; esto confirma que la expresión génica tiene influencia directa sobre una gran cantidad de actividades celulares. Aunque es conocida la actividad de las proteínas que intervienen en este proceso, cada día hay más evidencia de que cientos de transcritos pequeños pueden ser factores muy importantes en la regulación genética (Vázquez-Ortiz et al., 2006).

Los RNAs pequeños abarcan diversas clases de RNAs no codificantes, cada uno con sus propias características y funciones. Estos RNAs pequeños incluyen:

- MicroRNAs (miRNAs).
- RNAs pequeños de interferencia (siRNAs). Los miRNAs y los siRNAs, en efecto, se crean de la misma manera, y ambos participan en la regulación génica. Estos RNAs diminutos, de aproximadamente 21-26 nt, dependen de la maquinaria del RNA de interferencia (RNAi) para efectuar su acción más conocida, es decir el silenciamiento de la expresión génica al interactuar con secuencias complementarias (Murchison y Hannon, 2004).

- RNAs nucleolares pequeños (snoRNAs). Los snoRNAs modifican a los RNAs ribosomales (rRNAs) orquestando la división del pre-rRNA largo, en sus moléculas funcionales de las subunidades (18S, 5.8S y 28S). Los snoRNAs también agregan modificaciones a las subunidades del rRNA.
- RNAs nucleares pequeños (snRNAs). Éstos son componentes del spliceosoma, la maquinaria celular que ayuda para producir mRNA quitando las regiones no codificantes (intrones) de genes y ensamblando las regiones de la codificación (exones) que se traducirán a las proteínas. Algunos de estos snRNAs han mostrado ser las enzimas funcionales en las reacción de corte y empalme (Buckingham, 2003).

1.5 MicroRNAs

Un microRNA (miRNA) se define como un RNA de cadena sencilla de 18 a 24 nucleótidos de longitud que es generado por la enzima Dicer, una RNAsa de tipo III, a partir de un transcrito endógeno que contiene una estructura de horquilla (Vázquez-Ortiz et al., 2006). La base de datos de microRNAs llamada miRBase (disponible en: <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna>) hasta el momento contiene 5,071 secuencias, de las cuales existen varias específicas para *C. elegans*, *D. melanogaster*, *Danio renio*, *Gallus gallus*, *A thaliana* y virus de Epstein Barr, entre otras. Para *Homo sapiens* existen 533 secuencias.

Aunque la mayoría de los miRNAs están aislados a lo largo del genoma, algunos se encuentran formando grupos o clusters que son transcritos y expresados de manera coordinada (Cullen, 2004). Los miRNAs se pueden situar dentro de intrones, de exones, o de regiones sin traducir (UTRs) (Mendell, 2005).

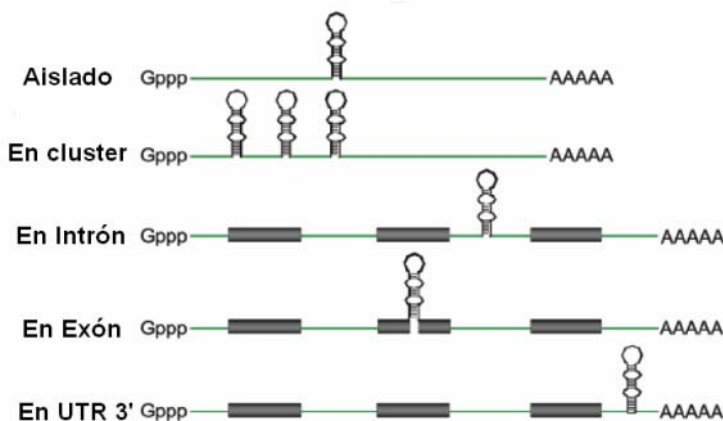


Figura 6. Transcritos de los pri-miRNAs en sus diversas formas Tomado y modificado de Mendell (2005). *Cell Cycle*, 4(9): 1179-118.

1.5.1 Biogénesis de los microRNAs

El conocimiento sobre la biogénesis del miRNA ha avanzado visiblemente en años recientes.

La RNA polimerasa II transcribe los genes de microRNA's y así se producen los miRNAs primarios (pri-miRNAs) de estructura tallo burbuja de aproximadamente 80 nt de longitud (Lee et al., 2004). Esta estructura es procesada en el núcleo por Drosha (RNAsa tipo III) para liberar una horquilla más pequeña de aproximadamente 60 nt de longitud llamada pre-miRNA, la cual contiene un extremo cohesivo colgante. Aún no se determina la forma exacta en la cual Drosha discrimina estructuras de tallo y burbuja de pre-miRNA y posteriormente determina el sitio exacto de la digestión.

Esta enzima forma parte del complejo proteico de 600 kDa denominado "microprocesador". Otro de los componentes esenciales del microprocesador, además de Drosha, se denomina DGCR8 en humanos y Pasha en *Drosophila*. El microprocesador se presenta como un heterotetrámero y consiste principalmente en dos moléculas de Drosha y dos de DGCR8. La proteína DGCR8 contiene dos dominios de unión a RNAdc, sugiriendo que ésta puede jugar un papel importante en el reconocimiento o unión del complejo microprocesador (Vázquez-Ortiz et al., 2006).

Este pre-miRNA entonces se exporta del núcleo al citoplasma de una manera dependiente Ran-GTP vía una asociación directa con Exportina 5 (Exp5) la cual es un miembro de la familia de las karioferinas que son factores de transporte núcleo-citoplasma, éstos son dependientes de un cofactor denominado Ran (una GTPasa) para su funcionamiento. Exp5 forma un heterodímero nuclear con Ran-GTP y con los pre-miRNA. De la misma manera que Drosha y el heterodímero Exp5/Ran-GTP se une a RNAs pequeños que tienen una hebra terminal de aproximadamente 16 pb y una cola cohesiva en el extremo 3', precisamente la estructura que presentan los pre-miRNA.

Una vez en el citoplasma la hidrólisis de Ran-GTP a Ran-GDP causa la disociación del complejo de exportación (Nakahara and Carthew, 2004).

Dicer una segunda RNAsa tipo III, predominante en el citoplasma, juega un papel importante en la generación de los miRNA maduros, donde el dominio PAZ de Dicer se une a la cola

cohesiva presente en la base de la horquilla de pre-miRNA, y el dominio de unión a RNAdc de Dicer se une a la base de la burbuja y define la distancia de la digestión desde la base.

El procesamiento por Dicer genera RNA dúplex de aproximadamente 22 pb, que contienen dos colas cohesivas en el extremo 3'. Después de la digestión, Dicer permanece asociada con el miRNA de 22 pb y posteriormente es liberado por una helicasa (Vázquez-Ortiz et al., 2006; Du y Zamore, 2005).

Finalmente el miRNA: miRNA* dúplex es desenrollado por una helicasa en un miRNA* y un miRNA maduro el cual se incorpora al complejo RISC.

El microRNA maduro es químicamente idéntico a RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) (Miska, 2005).

El miRNA maduro se incorpora al complejo RISC (“RNA-induced silencing complex”, por sus siglas en inglés). Existe una variedad de componentes que auxilian en el ensamblaje de RISC, particularmente aquellos que despliegan al siRNA o al miRNA y a través de esta acción determinan cuál cadena de estos RNA dúplex es la que se activa para el silenciamiento (Vázquez-Ortiz et al., 2006).

Los complejos de RISC se componen principalmente de ribonucleoproteínas que contienen a miembros de la familia de proteínas Argonauta (Ago) con dominios PAZ-Piwi. De manera adicional, RISC contiene varios factores accesorios cuyas acciones son necesarias para la función efectora.

La mayoría de los organismos tienen homólogos de la familia de Argonauta, *Drosophila* tiene cinco, el ratón tiene ocho, los nematodos tienen al menos veinticuatro y ocho en el ser humano. Estas proteínas dan especificidad al complejo RISC y determinan la respuesta específica para cada siRNA o miRNA (Meister et al., 2004).

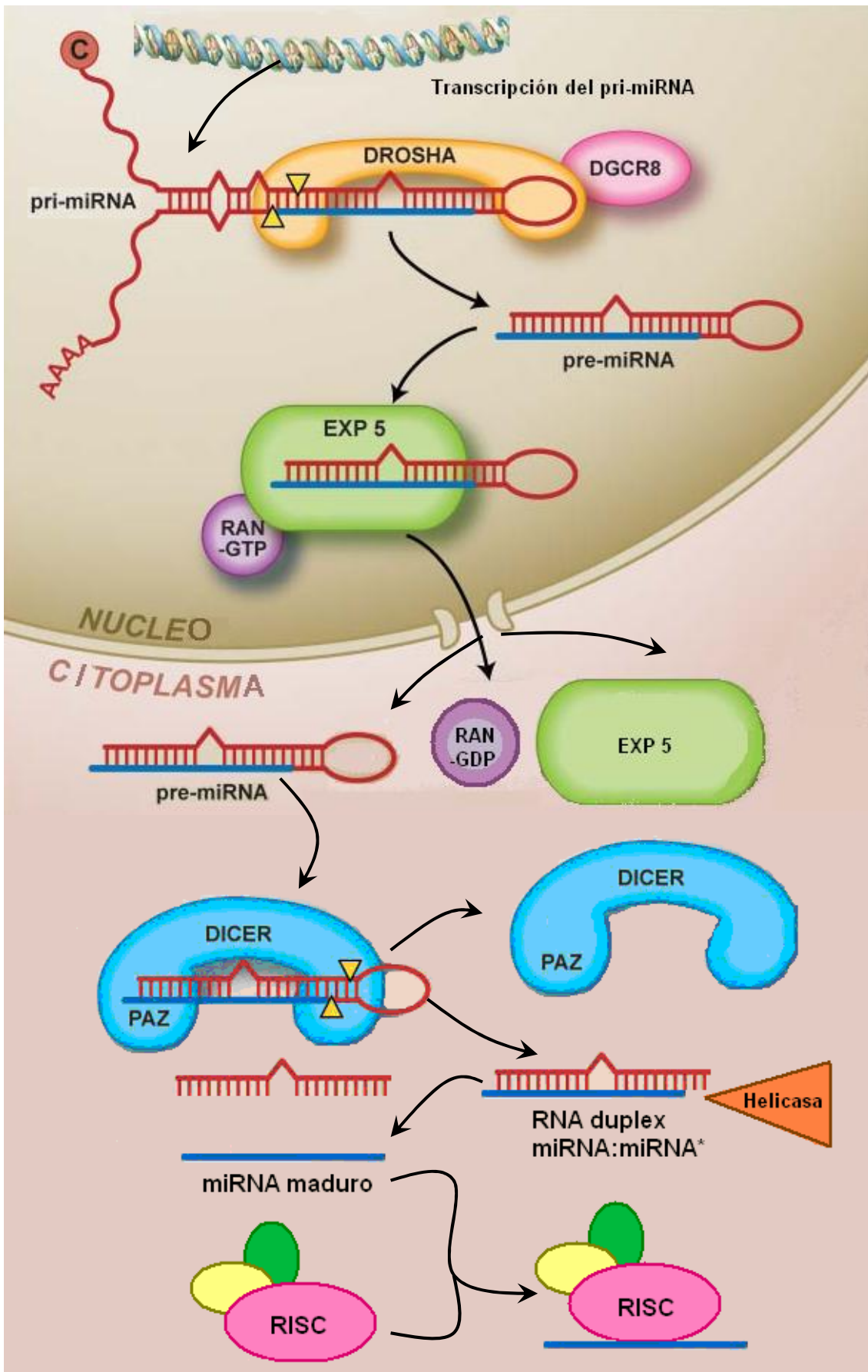


Figura 7. Biogénesis de los microRNAs. Tomado y modificado de Cullen (2004). *Molecular Cell*, 16:861-865.

1.5.2 Mecanismo y de función de los microRNAs

Los miRNA son herramientas moleculares cada vez más importantes, pues son a menudo el método de opción utilizado por los investigadores que tienen como objetivo aclarar la función de un gen. Más importante, quizás, es el alto potencial para los usos terapéuticos, conduciendo a varias firmas biotecnológicas a desarrollar las herramientas, y mejorar el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para aprovechar la maquinaria del RNA para silenciar la expresión de genes que causan enfermedad.

El mRNA blanco puede ser sujeto a la escisión (digestión) o represión de la traducción, dependiendo de si el apareamiento del miRNA: mRNA es perfecto o no (Ouellet et al., 2006).

La opción de los mecanismos no se determina si el RNA pequeño de silenciamiento es originado como un siRNA o miRNA sino que por el contrario es determinado por la identidad del blanco; una vez incorporado en un RISC citoplásmico, el miRNA especificará una escisión si el mRNA tiene suficiente complementariedad al miRNA, o reprimirá la traducción si el mRNA no tiene suficiente complementariedad. (Bartel, 2004).

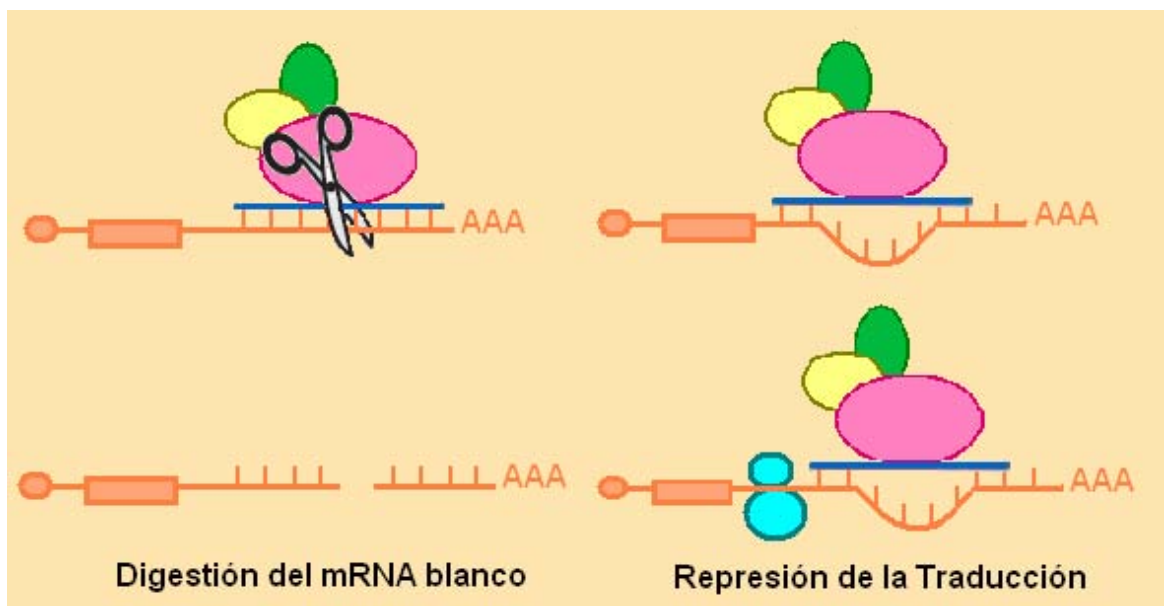


Figura 8. Mecanismo de acción de los microRNAs

Los descubrimientos de los últimos cinco años han apoyado fuertemente el papel de miRNAs en la regulación de procesos cruciales tales como proliferación celular, apoptosis, desarrollo, diferenciación y metabolismo (Garzon et al., 2006).

Un papel importante de los miRNAs en la función endocrina se observa en el reciente descubrimiento de miR-375, un miRNA expresado específicamente en el islote pancreático, reveló un nuevo componente en la maquinaria de la secreción de insulina; miR-375 regula la secreción de la hormona en células del páncreas de ratón, inhibiendo la expresión de miotrofina, una proteína citoplásmica que induce la exocitosis de los gránulos de insulina (Ricarte y Kimura, 2006).

1.5.3 MicroRNAs asociados al Cáncer

Cuando las células exhiben crecimiento anormal y pérdida de la función de apoptosis, esto da lugar generalmente a la formación del cáncer. Varios estudios recientes indican que los miRNAs regulan el crecimiento celular y la apoptosis (Baohong et al., 2006).

En los seres humanos, muchos miRNAs están localizados en sitios genómicos asociados al cáncer.

Un estudio demostró la posible correlación entre la localización de regiones genómicas asociadas al cáncer y la posición genómica de los genes de miRNAs, para lo cual se investigaron 186 genes humanos de miRNAs (todos los miRNAs disponibles en ese entonces).

Se observó que más de la mitad (52.5%, 98 de 186) de los genes humanos de miRNAs se encuentran dentro o cerca de sitios frágiles (SF) y en regiones mínimas de pérdida heterocigótica, regiones mínimas de amplificaciones y puntos de ruptura comunes asociados al cáncer. Sugiriendo que los miRNAs puedan desempeñar un papel importante en la patogénesis de una gama de cánceres humanos (Calin et al., 2004).

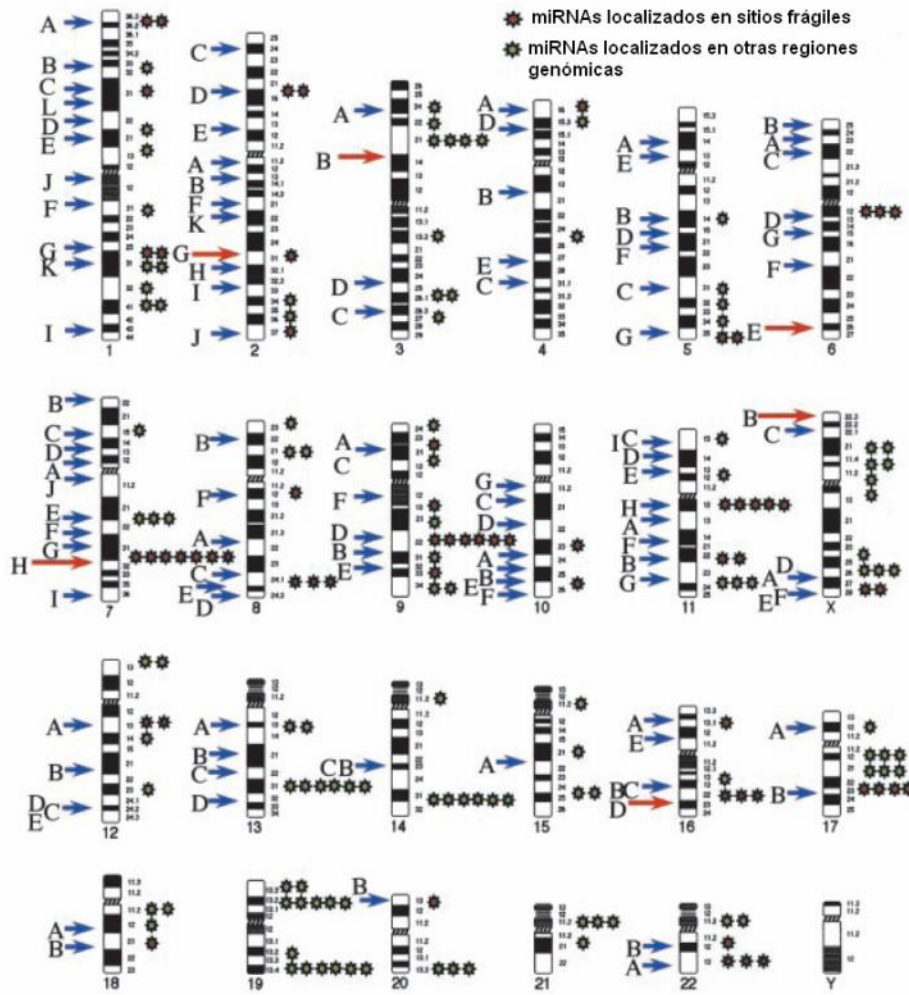


Figura 9. Correlación entre SF y miRNAs. El cariotipo muestra la posición de 113 SF y de 186 miRNAs.

Tomado y modificado de Calin et al. (2004). PNAS, 101(9): 2999-3004.

Recientemente, la expresión del miRNA se ha ligado al cáncer. Diversos grupos han estudiado la expresión de los miRNA's en pacientes con cáncer y se ha demostrado que los miRNAs se encuentran expresados de forma diferente en los tejidos normales que en los tejidos con tumor (Garzon et al., 2006).

Actualmente, casi todos los estudios relacionados con miRNAs en cánceres, se basan en el perfil de expresión de diversos miRNAs en células de cáncer contra células normales. La disminución o la sobre expresión de un miRNA específico permite estudiar el papel del miRNA en la iniciación y el desarrollo del cáncer (Baohong et al., 2006).

La evidencia inicial para la implicación de miRNAs en cáncer proviene de un estudio molecular que caracterizaba la supresión de 13q14 en la leucemia linfocítica crónica humana

(LLC), la forma más común de leucemia del adulto en el mundo occidental. Se observó que dos miRNAs, miR-15a y miR-16a, están situados en el cromosoma 13q14, una región suprimida en más de la mitad de los casos crónicos de la leucemia linfocítica de la célula B (LLC-B). El análisis de la supresión indicó que estos dos miRNAs son los únicos dos genes dentro de la pequeña región que se pierden en pacientes de LLC, y el análisis de la expresión indicó que miR-15a y miR-16a eran ausentes en la mayoría (el 68%) de pacientes de LLC. (Calin et al., 2002).

Un estudio reciente indicó que la proteína antiapoptótica BCL2 es uno de los blancos de miR-15a y de miR-16-1. La expresión miR-15a y miR-16-1 fue correlacionada inversamente a la expresión BCL2 en LLC; ambos miRNAs regulan negativamente BCL2 a nivel post transcripcional. Por lo tanto, la baja regulación de miR-15a y de miR-16-1, que se debe principalmente a una deleción genética, podría promover la proliferación de las células B en LLC, una enfermedad donde su principal característica es el incremento de la proliferación de células B maduras (Cimmino et al., 2005).

El cáncer de pulmón es uno de los más comunes en los adultos. La evidencia sugiere que el miRNA let-7 puede controlar el desarrollo del cáncer de pulmón, o por lo menos desempeña un papel crítico en su patogénesis. Se observó que los niveles de expresión de let-7 fueron reducidos con frecuencia en estudios de cáncer de pulmón tanto *in vitro* como *in vivo*; los bajos niveles de expresión de let-7a se asociaron a una supervivencia postoperatoria corta en 148 pacientes con cáncer de pulmón, independientemente de la etapa de la enfermedad. También se observó que la sobre expresión del miRNA let-7 en la línea celular del adenocarcinoma de pulmón A549 inhibió el crecimiento de la célula (Takamizawa, 2004).

Los miR-21 y miR-205 están situados en una región amplificada en cáncer de pulmón, mientras que miR-126 en 9q34.3 se encuentran en una región suprimida comúnmente en cáncer de pulmón (Garzon et al., 2006).

Los miRNAs del cluster miR-17, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b y miR-92, son denotados colectivamente como mir-17-92. Se ha observado que este intervalo cromosómico (13q31-q32) donde se localiza el mir-17-92 está amplificado con frecuencia en varios tipos de linfoma. La función dominante de miR-17-92 parece ser, suprimir la apoptosis inducida por Myc. Un blanco confirmado de miR-17 y de miR-20 es la transcripción del gene E2F1 un

factor de transcripción del ciclo celular. Aunque esta proteína puede promover la proliferación celular por la activación de genes de la fase S, también tiene la capacidad de promover apoptosis por la vía ARF-p53. La transcripción de los genes de E2F ha demostrado ser inducida por c-Myc. La expresión de c-Myc también es inducida por la actividad de E2F, revelando un supuesto circuito de regeneración positiva. Sin embargo, desde que E2F1 y E2F3 son señalados como blancos del cluster mir-17-92, se presumió que la activación de estos miRNAs por c-Myc puede apagar la activación recíproca de Myc-E2F, permitiendo una señal proliferativa rigurosamente controlada que no induzca la apoptosis. En este panorama, el cluster mir-17 desempeña un papel crítico en la modulación proliferativa contra la respuesta apoptótica de las células después de la inducción de c-Myc y de la actividad de E2F (Mendell, 2005; O'Donnell et al., 2005). Esta es la primera evidencia funcional de un miRNA, actuando como un oncogén mamífero. Por esta razón se denominó a la transcripción del mir-17-92 como el OncomiR-1 (Hammond, 2006).

Otro miRNA, miR-155, y su gen hospedero, el gen no codificante Bic que está relacionado con varios cánceres y su activación acelera la patogénesis de los linfomas y las leucemias, también ha demostrado estar constantemente sobre expresado en linfoma de Burkitt pediátrico, la enfermedad clásica de Hodgkin, el linfoma grande y difuso de la célula B, la LLC de la célula B y más recientemente, en el cáncer del pulmón y de mama. Se ha ligado a la progresión temprana de la enfermedad en LLC y a la corta supervivencia en el cáncer de pulmón. Sin embargo, el mecanismo por el cual miR-155 induce la proliferación de la células B no maduras es desconocido (Garzon et al., 2006). Un reciente estudio resolvió que miR-155 está situado en la única región filogenéticamente conservada del gen del Bic, sugiriendo que miR-155 puede ser responsable de la actividad oncogénica del gen del Bic (Baohong et al., 2006).

Los miR-372 y miR-373 son dos ejemplos adicionales de los miRNAs oncogénicos. Estos miRNAs normalmente se expresan solamente en las células madre embrionarias, un tipo de células que se caracterizan por su progresión rápida durante el ciclo celular. Estos dos miRNAs promueven la proliferación celular y la tumorigénesis de células humanas primarias en cooperación con RAS neutralizando la proteína p53 mediante la inhibición de CDK, posiblemente por la inhibición directa de la expresión del gene supresor del tumor LATS2. Encontraron que este mecanismo participa en la oncogénesis de la célula germinal en los tumores testiculares humanos (Voorhoeve et al., 2006).

Los miRNAs también están implicados en cáncer de cerebro humano. El glioblastoma multiforme, la forma más frecuente de tumores de cerebro primarios. Entre ellos, miR-21, miR-221 y miR-25 que se encuentran sobre expresados. Esto indica la función de miR-21 como oncogén (Garzon et al., 2006). La disminución de miR-21 en células cultivadas de glioblastoma, activa la acción de las caspasas y conduce a la muerte apoptótica de la célula. Esto sugiere que miR-21 es un factor antiapoptótico en células humanas del glioblastoma. Además se encontró que la expresión de miR-181a, miR-181b, y miR-181c disminuyó en glioblastoma comparada con los controles normales de cerebro (Baohong et al., 2006).

También es posible que el cáncer pudiera resultar de la translocación en el locus de un oncogén. Un ejemplo potencial es la translocación t(8;17), del gen Myc en el locus del mir-142, que induce una sobre expresión de Myc y esto se asocia a los linfomas y a la leucemia prolinfocítica. El gene Myc se transloca solamente cuatro nucleótidos “downstream” río abajo del extremo 3’ de mir-142, y está probablemente bajo control del promotor del miRNA (McManus, 2003).

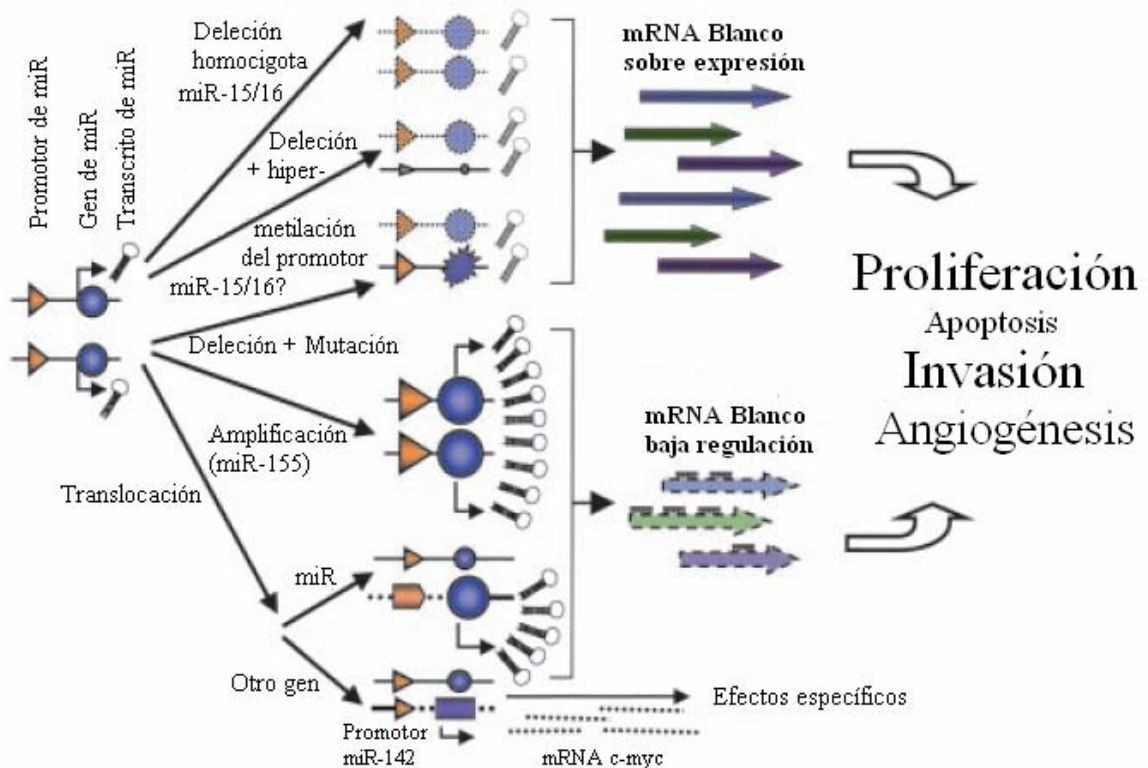


Figura 10. Algunos mecanismos propuestos por los cuales ciertos microRNAs funcionan como Oncomirs.

Tomado y modificado de Calin et al. (2004). PNAS, 101(9): 2999-3004.

Se encontraron que los patrones de expresión de los miRNAs eran perceptiblemente diferentes entre los tejidos normales de mama y los neoplásicos; miR-125b, miR-145, miR-21, y miR-155 fueron reducidos perceptiblemente en tejidos de cáncer de mama (Baohong et al., 2006). Similar al cáncer de pulmón, en los tumores de mama una expresión reducida de let-7a fue correlacionada con el mal pronóstico, caracterizado por la metástasis del nodo linfático y el alto índice proliferativo (Garzon et al., 2006).

En un trabajo reciente sobre la expresión de los miRNAs en carcinoma papilar de tiroides (CPT), se encontró que los miRNAs, miR-221, miR-222, y miR-146 estaban sobre expresados fuertemente en los tumores de tiroides comparados con los tejidos normales de tiroides. También encontraron que los niveles tanto del mRNA KIT como de la proteína del KIT están disminuidos dramáticamente mientras que los niveles de miR-221, de miR-222, y de miR-146 aumentaron de cánceres de tiroides, sugiriendo que la regulación negativa del KIT por estos tres miRNAs puede también contribuir a los cánceres de la tiroides. Se ha predicho a KIT como uno de los blancos de la sobre expresión de los miRNAs en el CPT. Colectivamente, estos datos apoyan la función de miR-221 y de miR-222 como oncogenes por la regulación baja del gene del KIT (Garzon et al., 2006; Baohong et al., 2006).

El carcinoma hepatocelular (CHC) es uno de los tumores malignos más comunes del hígado. Los perfiles de expresión de los miRNAs en CHC y en tejido no tumoral adyacente demostraron que miR-18 y miR-224 estaban perceptiblemente sobre expresados en CHC comparados con los tejidos no tumorales. En contraste, miR-199a, miR-195, miR-200a, y miR-125a tenían una expresión más baja en tejidos de CHC (Baohong et al., 2006).

En un estudio reciente se determinó la variación de la expresión entre cérvix normal y algunas líneas celulares de cáncer cérvico uterino. De 166 miRNAs expresados en cérvix normal y en líneas celulares de cáncer, fueron encontrados seis, teniendo una variación substancial de la expresión entre los dos grupos. Aunque let-7b, let-7c, miR-23b, miR-196b, y miR-143 demostraron perceptiblemente una expresión reducida en las líneas celulares de cáncer cervical, miR-21 exhibió una expresión más alta en el grupo con cáncer (Lui et al., 2007).

1.5.4 MicroRNAs como oncogenes y genes supresores de tumores

Varios experimentos y análisis clínicos ya mencionados sugieren que la expresión alterada de los miRNAs se relaciona con diversos tipos tumorales, pudiendo funcionar como una nueva clase de oncogenes o de genes supresores de tumor llamados los "oncomirs".

Esos miRNAs que su expresión aumenta en tumores se pueden considerar como oncogenes. Estos miRNAs oncogenes, generalmente promueven el desarrollo del tumor negativamente, inhibiendo los genes supresores de tumor y/o los genes que controlan la diferenciación celular o la apoptosis. Se han encontrado muchos genes de miRNAs que se sobre expresan significativamente en diversos cánceres. Todos ellos parecen funcionar como oncogenes; sin embargo, solamente algunos de ellos se han caracterizado bien (Esquela-Kerscher y Slack, 2006).

En oncogénesis, la expresión de algunos miRNAs está disminuida en células cancerosas. Estos tipos de miRNAs se consideran como genes supresores de tumor. Los miRNAs supresores de tumor generalmente previenen el desarrollo del tumor negativamente, inhibiendo los oncogenes y/o los genes que controlan la diferenciación celular o la apoptosis. La pérdida de función de este miRNA por mutaciones, deleciones, metilación del promotor o cualquier anomalía en la biogénesis del miRNA, puede dar lugar a una expresión anormal del oncogén blanco, que contribuye posteriormente a la formación del tumor (Baohong et al., 2006).

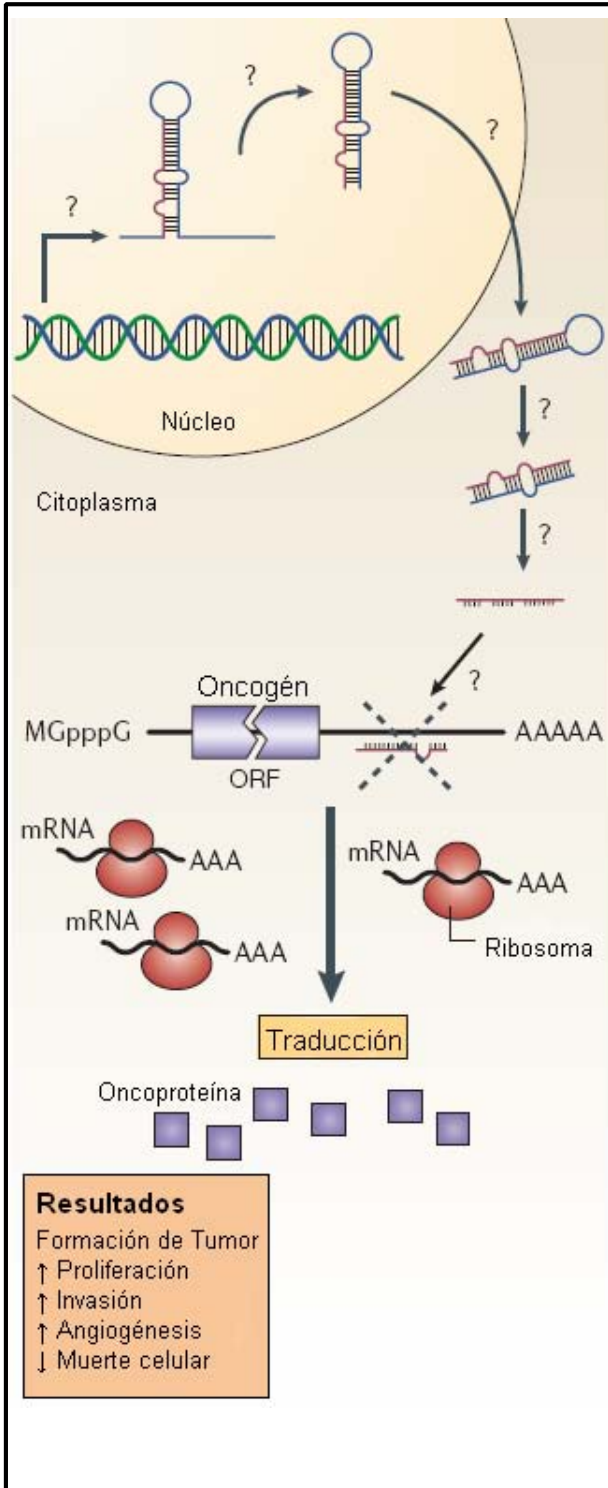


Figura 11. MicroRNA funcionando como gen supresor de tumor. Tomado y modificado de Esquela-Kerscher y Slack (2006). *Nature Reviews*, 6: 259-269.

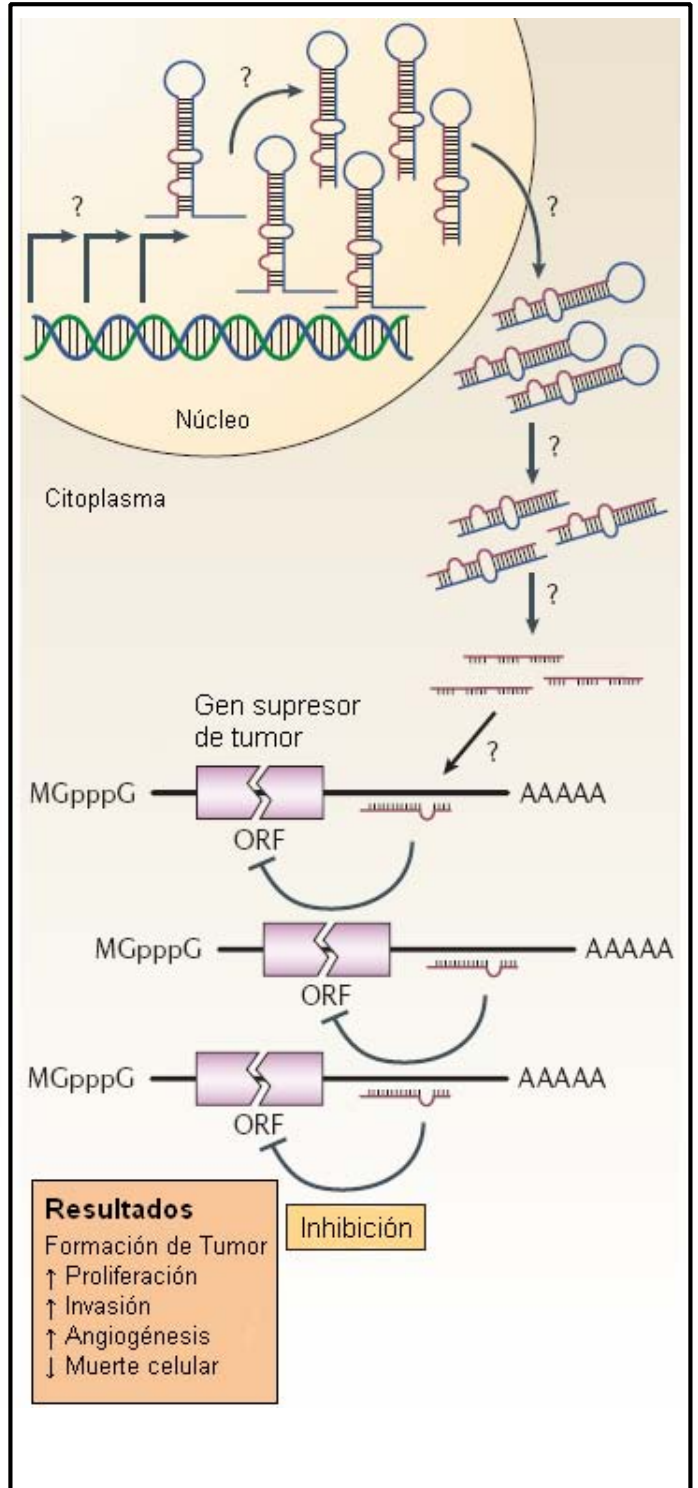


Figura 12. MicroRNA funcionando como oncogén. Tomado y modificado de Esquela-Kerscher y Slack (2006). *Nature Reviews*, 6: 259-269.

Tabla 2. Principales microRNA asociados al cáncer y sus genes blanco potenciales.

microRNAs	Localización	Cáncer al que es asociado	Genes blanco	Función
miR-15a, miR-16-1	Cromosoma 13q14	Leucemia Linfocítica Crónica	BCL2	Supresores de tumores
miR-143 , miR-145	Cromosoma 5q32–33	Cáncer Colorectal; Mama y en líneas celulares cervicales con cáncer		Supresores de tumores
miR-21	Cromosoma 17q23.2	Glioblastoma, Cáncer de Mama y Cáncer de Pulmón		Oncogén
Miembros de la Familia let-7	Loci múltiples	Cáncer de Pulmón	RAS	Supresores de tumores
miR-155	Cromosoma 21q21	Linfoma pediátrico de Burkitt, la enfermedad de Hodgkin y Cáncer de Mama	BIC	Oncogén
cluster miR-17–92	Cromosoma 13q31–32	Cáncer de Pulmón Linfomas	MYC BIC	Oncogenes OncomiR-1
miR-372 , miR-373	Cromosoma 19q13	Tumores Testiculares de las células germinales	LATS2	Oncogenes
miR-221 , miR-222	Cromosoma Xp11	Carcinoma Papilar de Tiroides	KIT	Oncogenes
miR-142	Cromosoma 17q22	Linfomas y la Leucemia prolinfocítica	MYC	Translocación

Representa que la expresión de los miRNAs aumentó en este tipo de cáncer; representa que la expresión de los miRNAs disminuyó en este tipo de cáncer.

1.6 MicroRNA hsa-mir-196b

Nombre: microRNA 196b o hsa-mir-196b (miRBase).

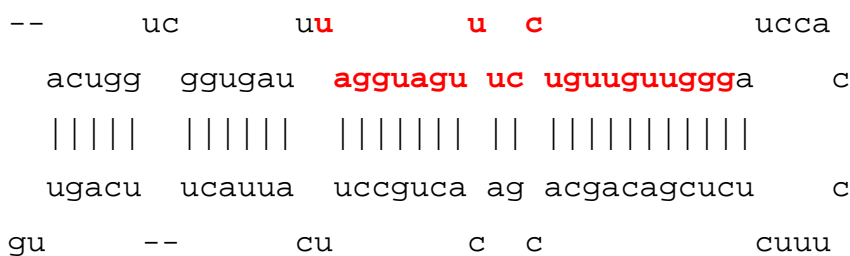
Otros nombres: MIR196B, MIRN196B, miR-196b (Entrez Gene).

Localización cromosómica 7p15.2 (Ensembl Human Feature View).



Figura 13. Localización cromosómica del microRNA

1.6.1 Estructura tallo-burbuja (*stem-loop*) del pri-miRNA hsa-mir-196b



Secuencia del pri-miRNA hsa-mir-196b en forma lineal.

acuggucggugauuuuagguaguuuuccuguuguugggauccacccuucucucgcagcagcac
acugccuucuuacuucaguug

1.6.2 Secuencia madura del miRNA hsa-mir-196b

15 - uagguaguuuuccuguuguuggg - 36 (miRBase)

1.6.3 Blancos del hsa-mir -196b

Los genes blancos para hsa-mir196b encontrados en la base de datos miRBase Target Database son 1385 (miRBase Target Database). En el predictor de blancos de microRNAs llamado Target Scan se encuentran para el hsa-mir-196, 167 blancos (Target Scan). Y en las predicciones de la base de datos Pic Tar se localizaron 162 blancos para hsa-mir-196b (PicTar WEB INTERFACE).

Muchos genes blancos se relacionan con la proliferación celular pero de todos los blancos predichos bioinformáticamente solo se han confirmado algunos genes HOX por medio de la experimentación.

Las proteínas HOX son una familia de factores de la transcripción que desempeñan un papel crucial en el desarrollo animal y en la oncogénesis. Los HOX tienen en común una secuencia de DNA conocida como caja homeótica, la cual está constituida por 180 pares de bases. En vertebrados los 39 genes HOX están organizados en cuatro grupos cromosómicos: HOXA, HOXB, HOXC y HOXD. Este arreglo condujo a la generación de subgrupos de genes parálogos (afines), los cuales están altamente relacionados en base a secuencias similares y posición dentro del grupo. Los HOXA a HOXD se han subdividido en 13 subgrupos o familias de genes parálogos. Varios miRNAs, tales como miR-196, están situados en grupos HOX (Calin et al., 2004).

Los miRNAs miR-196 están expresados en el grupo de los genes HOX en mamíferos, y los genes HOX de este grupo son blancos del miR-196. De hecho, el mRNA HOXB8 fue demostrado ser un blanco natural para la escisión dirigida por miR-196 a través de un sitio

perfectamente complementario al blanco en embriones de ratón. Otros genes HOX tienen sitios complementarios imperfectos a miR-196 un indicativo de la regulación por la represión de la traducción. (Yekta et al., 2004; John et al., 2004).

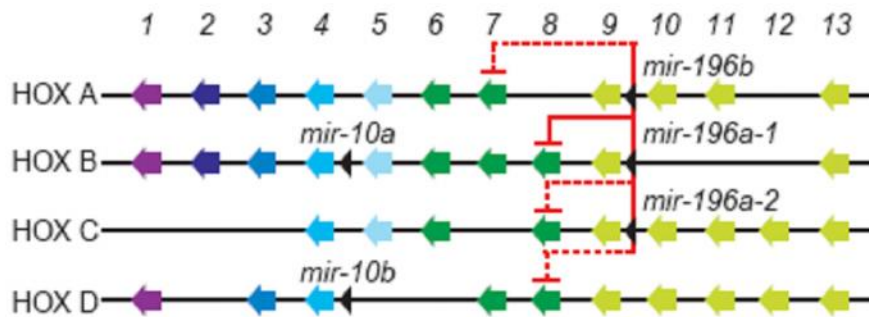


Figura 14. Organización genómica de los grupos de genes HOX. Las flechas coloreadas indican los genes HOX que representan a los 13 subgrupos de genes parálogos (afines); las puntas de flecha negra representan genes de miRNAs. La represión apoyada por cultivo celular y evidencia bioinformática se indica con línea roja punteada y la represión apoyada in vivo, cultivo celular y evidencia bioinformática con línea continua. La línea vertical roja indica que los miRNAs de cualquiera de los tres loci podrían reprimir los blancos. Tomado de Yekta et al. (2004). *Science*, 304: 594.

1.7 Genes HOX en Cáncer cérvico uterino

Usando un método enzimático que permite sintetizar numerosas copias de un fragmento concreto de DNA acoplado a una transcriptasa inversa llamado RT-PCR, se observa que el mRNA del gen HOXC5 y HOXC8 solo se expresan en queratinocitos transformados (células SiHa) y no en los queratinocitos normales (Alami et al., 1999).

Con el análisis de expresión mediante la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una retrotranscriptasa (RT-PCR) se demostró que HOXD9 fue expresados en células de cáncer cérvico uterino y no en cérvix normal (Li et al., 2002).

Una asociación entre la expresión del gene homeobox (HOX) y la transformación oncogénica se ha divulgado recientemente en tumores humanos. Usando RT-PCR, 11 líneas celulares de carcinoma cervical humano y 14 muestras de tejido cervical normal fueron examinadas para la expresión del mRNA de 39 genes HOX clase I. Los genes HOXA1, B2, B4, C5, C10 y D13 fueron expresados en 8, 7, 9, 9, 9 y 11 de 11 líneas celulares de carcinoma cervical, respectivamente, pero no en ninguno de los tejidos cervicales normales. (Hung et al., 2003).

Los genes homeobox (HOX) codifican factores de la transcripción muy importantes que especifican la proliferación y el destino celular. El papel desempeñado por los genes HOX en la diferenciación celular es confuso hasta la fecha, pero la evidencia cada vez mayor sugiere que pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo del cáncer. Para estudiar el papel desempeñado por los genes HOX en cáncer cervical, se analizaron la expresión de los genes HOXB y la localización de sus transcritos en tejidos cervicales humanos. El análisis de RT-PCR y la hibridación *in situ* fueron utilizados para detectar la expresión de HOXB en 11 tejidos cervicales normales y 17 carcinomas cervicales. Fue determinado que la expresión del gene HOXB2, HOXB4, y HOXB13 fue encontrada solamente en los tejidos de los tumores (López et al., 2006).

La RT-PCR y la hibridación *in situ* técnica por la cual es posible detectar ácidos nucleicos sobre cortes histológicos sin alterar la estructura de los tejidos y células; fueron utilizados para detectar la expresión del mRNA los genes HOX Abd-B en 9 tejidos cervicales normales y 10 carcinomas cervicales. Los tejidos normales eran negativos para (VPH), mientras que todos los carcinomas invasores incluidos eran positivos para VPH16. En este estudio, se demostró que los genes HOXB13, C9, C11, C12, C13, D9, y D10 fueron expresados solamente en los tejidos tumorales pero no en el cérvix normal (López et al., 2006).

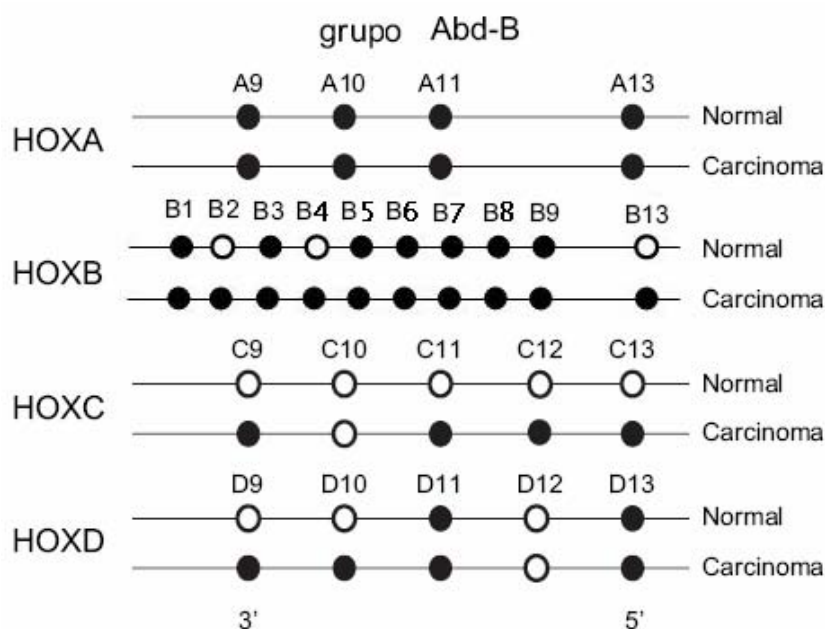


Figura 15. Representación esquemática del patrón de expresión del grupo de HOX Abd-B en cérvix uterino humano. Los genes HOXB2, B4, B13, C9, C11, C12, C13, D9, y D13 son expresados diferencialmente en carcinoma cervical comparado con cérvix normal. Los círculos negros representan genes expresados y los círculos blancos indican genes no expresados. Tomado y modificado de López et al. (2006). *Journal of Gynecological Cancer*, 16(3): 289–1296.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico uterino es la segunda neoplasia ginecológica más frecuente en todo el mundo; además de ser la principal causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer.

Actualmente, se están descubriendo nuevos mecanismos de regulación génica proveniente de cientos de transcritos pequeños conocidos como los microRNAs. Los cambios en la expresión de diferentes microRNAs frecuentemente resultan en la activación de oncogenes (ONC) e inactivación de genes supresores (GS), respectivamente, los cuales son factores necesarios para la transformación celular.

La información sobre el microRNA 196b es muy escasa y aún no se conoce sobre su expresión en cáncer cérvico uterino, sin embargo se sabe que podría regular algunos de los genes HOX.

En un estudio reportado recientemente por nuestro grupo de trabajo, se señaló que existe una asociación entre la expresión de algunos genes homeóticos y la transformación oncogénica sugiriendo así la participación de estos genes dentro del proceso de carcinogénesis del cérvix.

Por todo lo anterior surge la inquietud de saber si existe la presencia del probable regulador de genes HOX el microRNA hsa-mir-196b en las células del cérvix humano, tanto en cérvix normal sin infección como en células neoplásicas.

3. OBJETIVOS

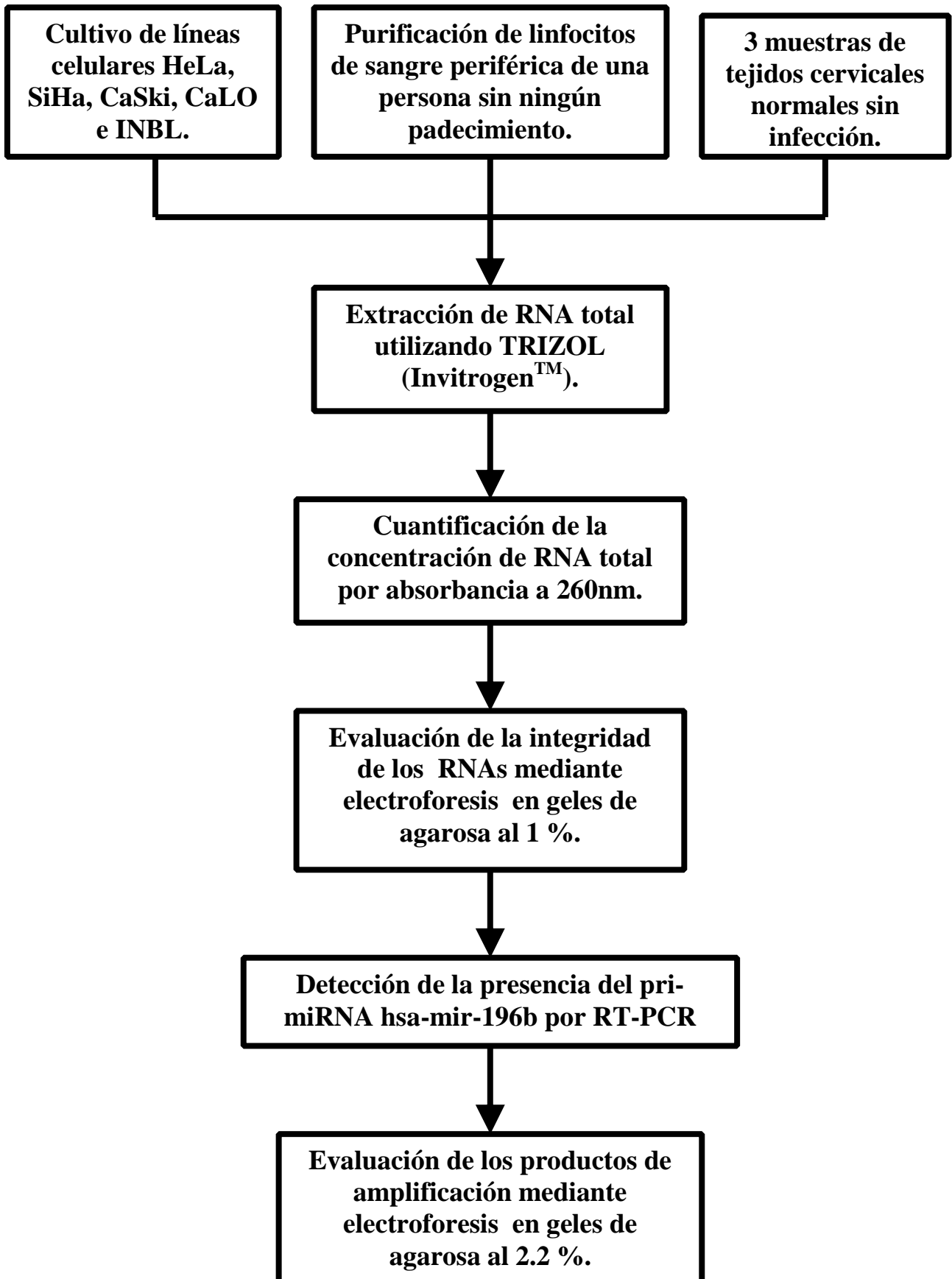
3.1 Objetivo General

- ❖ Determinar la presencia del pri-miRNA hsa-mir-196b en el cérvix uterino humano.

3.2 Objetivos particulares

- Realizar la detección del pri-miRNA hsa-mir-196b mediante RT-PCR en las muestras de cérvix normal sin infección.
- Realizar la detección del pri-miRNA hsa-mir-196b mediante RT-PCR en las líneas celulares derivadas de cáncer cervical.

4. DIAGRAMA DE TRABAJO



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Muestras Biológicas

Tres muestras de tejido cervical normales de mujeres premenopáusicas se obtuvieron post mortem en el Departamento de Patología del Hospital General de México de mujeres que murieron de causas no relacionadas ginecológicamente. Todos los procedimientos descritos han sido evaluados y aprobados por el comité de ética local del IMSS. Todas las muestras de tejido fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -70C hasta la extracción del ácido nucleico.

Las líneas celulares de cáncer cérvico uterino que se utilizaron fueron: **HeLa** (VPH 18), **SiHa** (VPH 16), **CaSki** (VPH 16), **CaLO** (derivada de la etapa invasora II B de un carcinoma escamoso, VPH 18), **INBL** (derivada de un carcinoma escamoso invasor etapa IVA, VPH 18) (Hidalgo et al., 2005).

Se tomo una muestra de 5 mL de sangre periférica con EDTA de una persona sin ningún padecimiento.

5.2 Reactivos Químicos

- Medio RPMI 1640
- Suero Fetal bovino
- Solución de lisis de Glóbulos Rojos
- TRIZOL, InvitrogenTM.
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol al 70%
- Agua DEPC
- Agua Bidestilada
- Access RT-PCR System, Promega.
- Agarosa al 1% y 2.2%
- 25 pb DNA Ladder, InvitrogenTM.
- Bromuro de etidio (0.625mg/ml).
- Buffer de carga
- Buffer de corrimiento TBE 0.5

5.3 Equipos

- Micropipetas
- Microcentrífuga Eppendorf
- Espectrofotómetro ND-1000, NanoDrop[®]
- Incubadora de CO₂
- Termociclador PCR Sprint, Termo Hybaid
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador Eagle eye system.

5.4 Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer cérvico uterino fueron cultivadas en una atmósfera humedecida de 95% aire y 5% CO₂, usando RPMI 1640 u otro medio conveniente y 10% de suero fetal bovino a 37°C tal como se recomienda en los cultivos celulares (Schmittgen et al., 2004). Las células se cosecharon para la extracción del RNA total con una confluencia del 60-80% (Santin A. D. et al. 2005) (ver Figuras 16-20). Los cultivos celulares se llevaron a cabo en la sección de investigación de la FES Zaragoza, UNAM (Laboratorio a cargo del Dr. Alberto Monroy).

5.5 Purificación de linfocitos

Los 5mL de sangre periférica con EDTA se centrifugaron a 3500rpm por 15 min, se obtuvo la interfase (linfocitos) y se transfirió a otro tubo de 1.5mL. Se agregó 1mL de solución de lisis de GR se mezcló durante 3 min y se centrifugó a 3500rpm por 15min; se eliminó el sobrenadante y se agregó nuevamente 1mL de solución de lisis de GR, se mezcló y se centrifugó. Se repitió esto hasta obtener una pastilla blanca. Se eliminó perfectamente el remanente de solución de lisis de GR y se agregó 1mL de Trizol. Se homogenizó y se guardó a -70°C.

5.6 Extracción de RNA total

El RNA total fue extraído tanto de líneas celulares como de los linfocitos y las muestras de cérvix normal utilizando TRIZOL (Invitrogen[™]), de acuerdo al protocolo de manufactura.

Las líneas celulares, los linfocitos y las muestras de cérvix normal previamente homogenizadas y resuspendidas en 1mL de TRIZOL y almacenados a -70°C para mejorar su extracción, se

mantuvieron en agitación constante durante 15 min., posteriormente se les agregó 200µL de cloroformo (CHCl₃); se homogenizaron a temperatura ambiente durante 3 min. y se centrifugaron a 13 000rpm por 15 minutos a 4°C. Se obtuvieron 3 fases (fase acuosa: RNA, interfase: DNA, fase orgánica: DNA/proteínas). Se retiró la fase acuosa y se transfirió a otro tubo, se le agregó 500µL de isopropanol (CH₃CH(OH)CH₃) frío resbalándolo por las paredes; se mezcló por inversión 10 veces y se incubó a 4°C por 10 min.; se centrifugó a 13 000rpm por 15 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante; se lavó la pastilla con 500µL de etanol (CH₃CH₂OH) al 70% y se centrifugó a 14 000rpm por 5 minutos a 4°C. Se desechó nuevamente el sobrenadante; se secó la pastilla y se rehidrató con 50µL de agua DEPC estéril. Se reservó 3µl para correr en el gel de agarosa y para cuantificar. El restante se guardó a -70 °C; hasta su uso.

La concentración de RNA total extraído de las líneas celulares como de los linfocitos y las muestras de cérvix normal se cuantificaron por absorbancia a 260nm. (ver Tabla 7).

5.7 Evaluación de la integridad de los RNAs

Los RNAs extraídos se sometieron a electroforesis por 30 minutos en geles de agarosa al 1 % teñidos con Bromuro de etidio, y la señal de las bandas se capturó con el Eagle eye system (Stratagene, La Jolla, Ca) (ver Figura 21).

5.8 Detección de la presencia del pri-miRNA hsa-mir-196b por RT-PCR

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos empleados.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tamaño del fragmento	TM
-actinaF ¹	TGAAGTCTGACGTGGACATC	243 pb ¹	55°C ¹
-actinaR ¹	GTTCGTTCCCTCATACTGCTCA		
miR-196bF ²	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG	85 pb ³	56°C ²
miR-196bR ²	AGGCAGTGTCGTGCTGT		

F oligonucleótido sentido; R oligonucleótido antisentido. Tomados de (Vázquez-Ortíz et al., 2005)¹, (Jiang et al., 2005)², (Ensembl Transcript Report)³.

Tabla 4. Reactivos y Condiciones utilizados para la RT- PCR en un solo paso utilizando el sistema Access System (Promega, Madison, WI).

Reactivo	Concentración Final	Volumen
Buffer AMV/ TFI	1x	5µl
dNTP's	0.2 mM	0.5µl
Primer F	1 µM	25pmol
Primer R	1 µM	25pmol
MgSO ₄	1mM	1µl
H ₂ O		cbp. 25µl
TFI (taq polimerasa)	0.1 u / µl	0.5 µl
AMV(transcriptasa reversa)	0.1u / µl	0.5 µl
RNA línea celular	200ng	Dependiendo la [] RNA
Volumen final		25µl

Tabla 5. Programa de amplificación para el gen constitutivo - actina

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Etapa
48 °C	45 minutos		Síntesis de cDNA
94 °C	2 minutos		Desnaturalización
94 °C	30 segundos	40 ciclos	Desnaturalización
55a.C.	1 minuto		Alineamiento
68 °C	2 minutos		Extensión
68 °C	7 minutos		Extensión Final
4 °C			Conservar

Tabla 6. Programa de amplificación para el pri-miRNA hsa-mir-196b.

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Etapas
48 °C	45 minutos		Síntesis de cDNA
94 °C	2 minutos		Desnaturalización
94 °C	30 segundos	40 ciclos	Desnaturalización
56°C	1 minuto		Alineamiento
68 °C	2 minutos		Extensión
68 °C	7 minutos		Extensión Final
4 °C			Conservar

5.9 Evaluación de los productos de amplificación

Los productos de las amplificaciones se sometieron a electroforesis durante 60 minutos en geles de agarosa al 2.2 % teñidos con Bromuro de etidio, y la señal de las bandas se capturó con el Eagle eye system (Stratagene, La Jolla, Ca) (ver Figuras 22-24).

6. RESULTADOS

6.1 Cultivos celulares

Las células se cosecharon para la extracción del RNA total con una confluencia del 60-80% (ver Figuras 16-20).

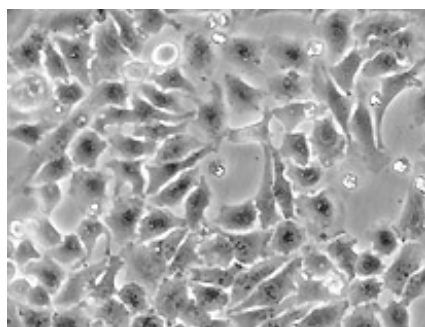


Figura 16. Células HeLa

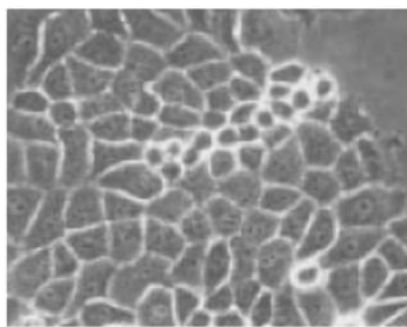


Figura 17. Células INBL

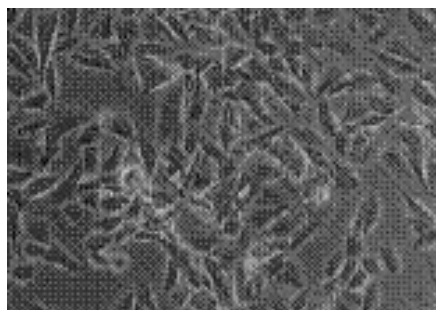


Figura 18. Células SiHa

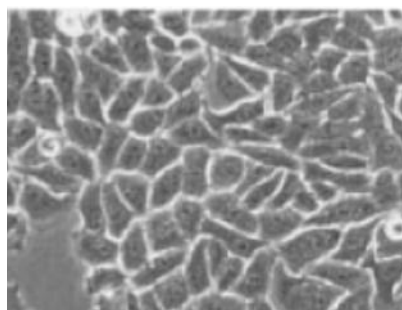


Figura 19. Células CaLo

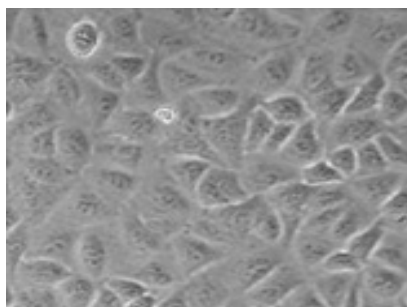


Figura 20. Células CaSki

6.2 Extracción de RNA total

La extracción de RNA por el método de TRIZOL es sencilla y rápida además de obtenerse cantidades de RNA adecuadas para trabajar.

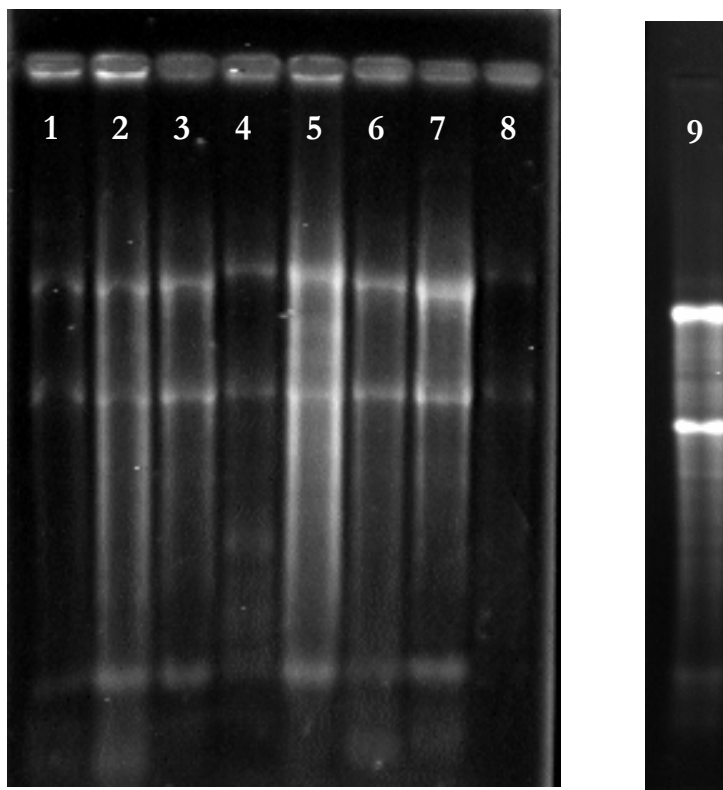
Se corrieron geles de agarosa al 1% para verificar la integridad de los RNAs (ver Tabla 8 y Figura 21) y posteriormente se procedieron a cuantificar los mismos en el Espectrofotómetro ND-1000, NanoDrop® (ver Tabla 7).

Tabla 7. Cuantificación de los RNAs extraídos.

Muestra	Concentración
HeLa	1159 ng / μ l
CaSki	638 ng / μ l
INBL	921 ng / μ l
SiHa	1190 ng / μ l
CaLO	1206 ng / μ l
Linfocitos	475 ng / μ l
Cérvix Normal 01	1000 ng / μ l
Cérvix Normal 02	960 ng / μ l
Cérvix Normal 03	861 ng / μ l

Tabla 8. Posición de los RNAs en el gel.

Carril	Muestra	Volumen
1	HeLa	2 μ l
2	CaSki	2 μ l
3	INBL	2 μ l
4	SiHa	2 μ l
5	CaLO	2 μ l
6	Cérvix Normal 02	2 μ l
7	Cérvix Normal 03	2 μ l
8	Linfocitos	2 μ l
9	Cérvix Normal 01	2 μ l

*Figura 21. Geles de RNAs Totales*

Debido a la concentración obtenida de los RNAs; se realizaron diluciones a fin de obtener un volumen que se pudiera utilizar en la RT-PCR.

A continuación se muestra una tabla con la concentración de dicha dilución y el volumen utilizado para la RT-PCR.

Tabla 9. Concentración de las diluciones de los RNAs extraídos.

Muestra	Concentración de la dilución	Volumen utilizado en la RT-PCR
HeLa	232 ng / μ l	1 μ l
CaSki	219 ng / μ l	1 μ l
INBL	230 ng / μ l	1 μ l
SiHa	238 ng / μ l	1 μ l
CaLO	241 ng / μ l	1 μ l
Linfocitos	224 ng / μ l	1 μ l
Cérvix Normal 01	200 ng / μ l	1 μ l
Cérvix Normal 02	225 ng / μ l	1 μ l
Cérvix Normal 03	195 ng / μ l	1 μ l

6.3 Detección de la presencia del pri-miRNA hsa-mir-196b por RT-PCR

Para verificar la complementariedad de los oligonucleotidos con la secuencia del microRNA se realizó un “*blasteo*” en la página Ensembl Human BlastView con las secuencias correspondientes.

Secuencia de Exón

Secuencia Total del microRNA

Secuencia madura del microRNA

Oligonucleótido miR-196bF

Oligonucleótido miR-196bR

Cromosoma: 7:27175324:27176007

GCTTCTCGGAGCTGCTCTCGTCTCGCCTGCTCCCCGCCTTTATTCTCTCTCCC
 TGCCTTTCCTCCCTCTCTTTTCTCCCTCTCCCTCCCAGGAATACCTTACTGGG
 GCCTGTGGCTTCCCCTTCCTTGACGCATTTGCGGCCGCCTGGGGCACTCTGTTG
 CACTGGCGGGCGCAGGTTGCCTAGGGGCTGGGCTGGGCCGGGCCAGGCGCGATG
 GCAGGGTTCTCTCCTTGGCGGGCGGCAGCGGCCGAGGCGGCCGGCGGGCGG
 GCGAGGCAGCCCTTCGCGGGCAGCACCCAGA**ACTGGTCGGTGATT****TAGGTAGTTT**
CCTGTTGTTGG**ATCCACCTTTCTCTCG****ACAGCACGACACTGCCTTCATTACTT**
CAGTTGAAATCGTCTCCAGGTACCTCTGCGCGCGGGGGTTCGGGCCGGGCGGGGC
 ATCACGGCCCTGGTCTGTCAGGCCTGCGGTGGCAACCTCGGCTTTCCCTGCTC
 AGGAGCCTCGTGTCTTTCTCCGCAGCGCTTTGCCAGCCGGCCGGCTTTCCCCTT
 CCACCACACACCTCCACCTGGTCACAGCAGGTAGGGTTAGGTTGGCTGCTCCTT
 CGCGGACGCCGGGGGCGTGGTAGGAATTCTGGGCTTTGGGCCATTCAAGGTCAG
 GGGCGCCCGCTTCCATCCTGAGCCTCCCCTGGAGG

Figura 22. "Blasteo" de las secuencias del hsa-mir-196b.

6.4 Evaluación de los productos de amplificación

Para observar el pri-miRNA; una vez que fueron obtenidos los productos de amplificación, se procedió a someterlos a electroforesis por aproximadamente 60 minutos en geles de agarosa al 2.2 % teñidos con Bromuro de etidio, y la señal de las bandas se capturó con el Eagle eye system (Stratagene, La Jolla, Ca). Así aplicando la prueba de la RT-PCR en las diversas muestras de RNA, se observó un fragmento de 85pb proveniente del pri-microRNA hsa-mir-196b en las muestras de tejido de cérvix normal sin infección y en las líneas celulares **HeLa**, **CaLo e INBL**. En cuanto a los linfocitos y las líneas celulares **SiHa** y **CaSki** no se encontró dicho fragmento (ver Figuras 22-24).

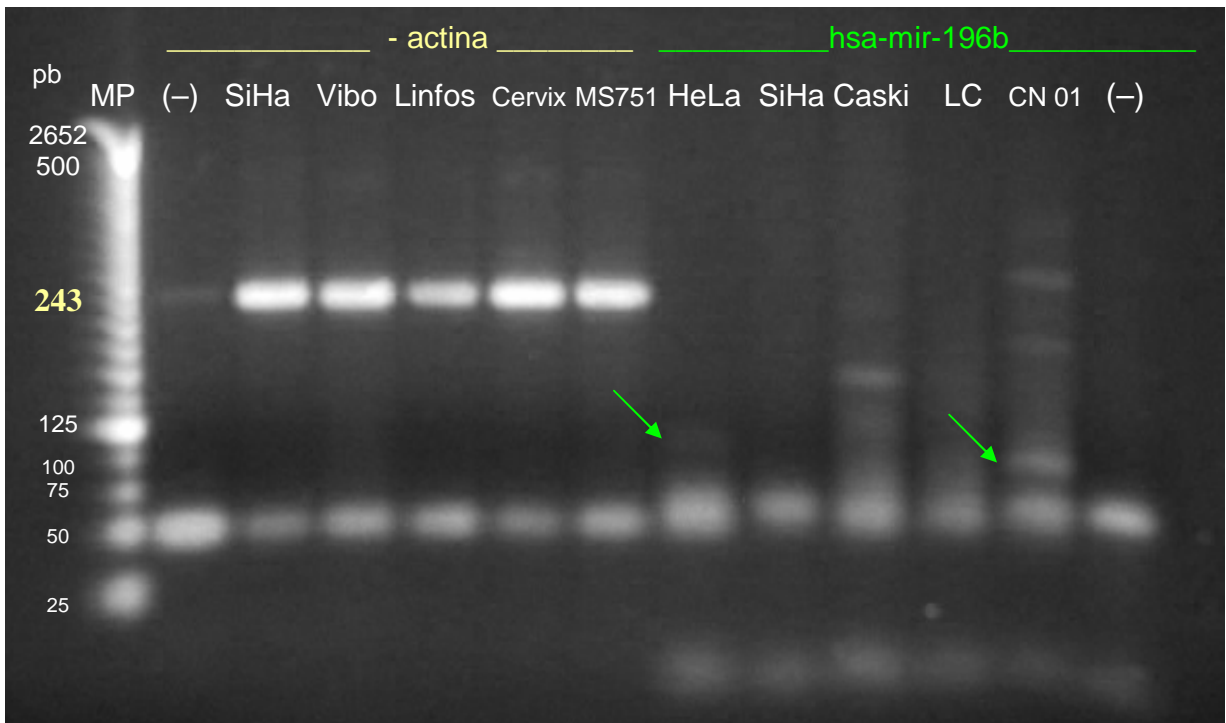


Figura 23. Gel de Productos de amplificación. Se corrió por separado el gen constitutivo y el pri-miRNA. Las flechas indican la banda de la presencia del pri-miRNA. LC: Linfocitos.

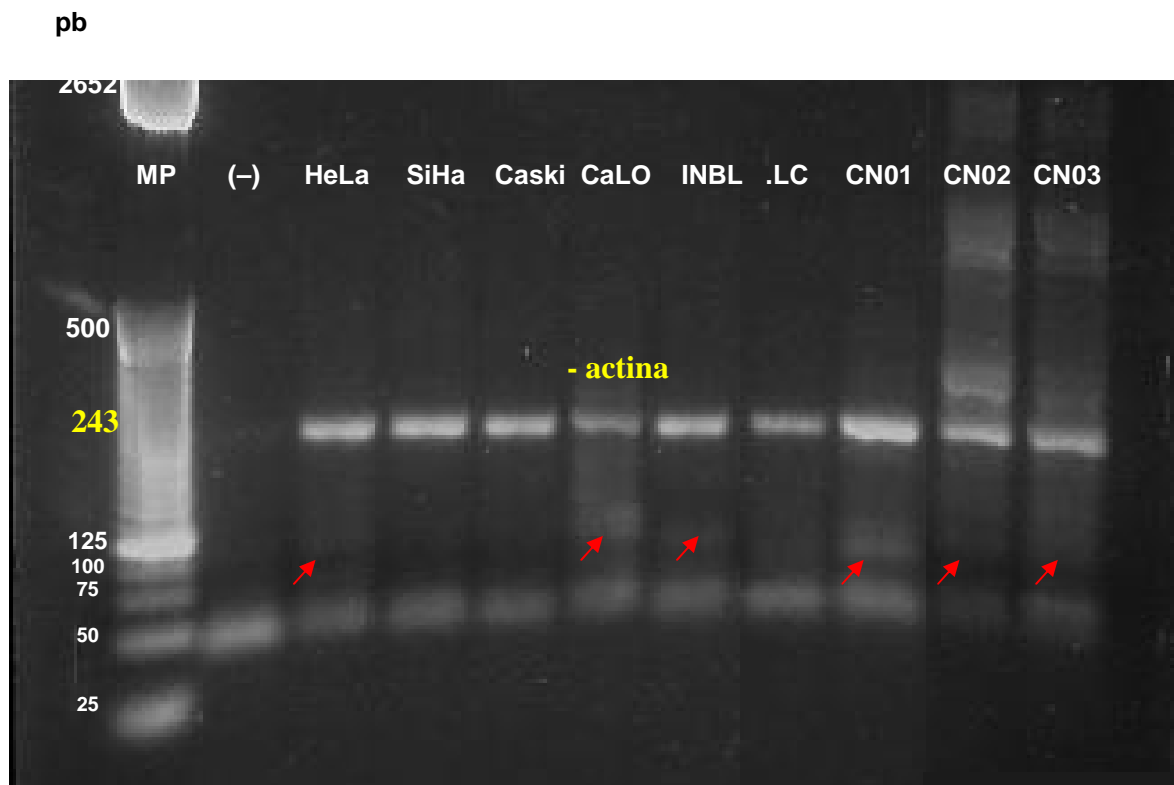


Figura 24. Gel de Productos de amplificación. Se corrió en el mismo pozo el gen constitutivo y el pri-miRNA. Las flechas indican la banda de la presencia del pri-miRNA. LC: Linfocitos.

Debido a que el pri-miRNA tiene un peso molecular pequeño se aumento la tonalidad de la imagen del gel para poder visualizar mejor las bandas que denotan la presencia del pri-miRNA.

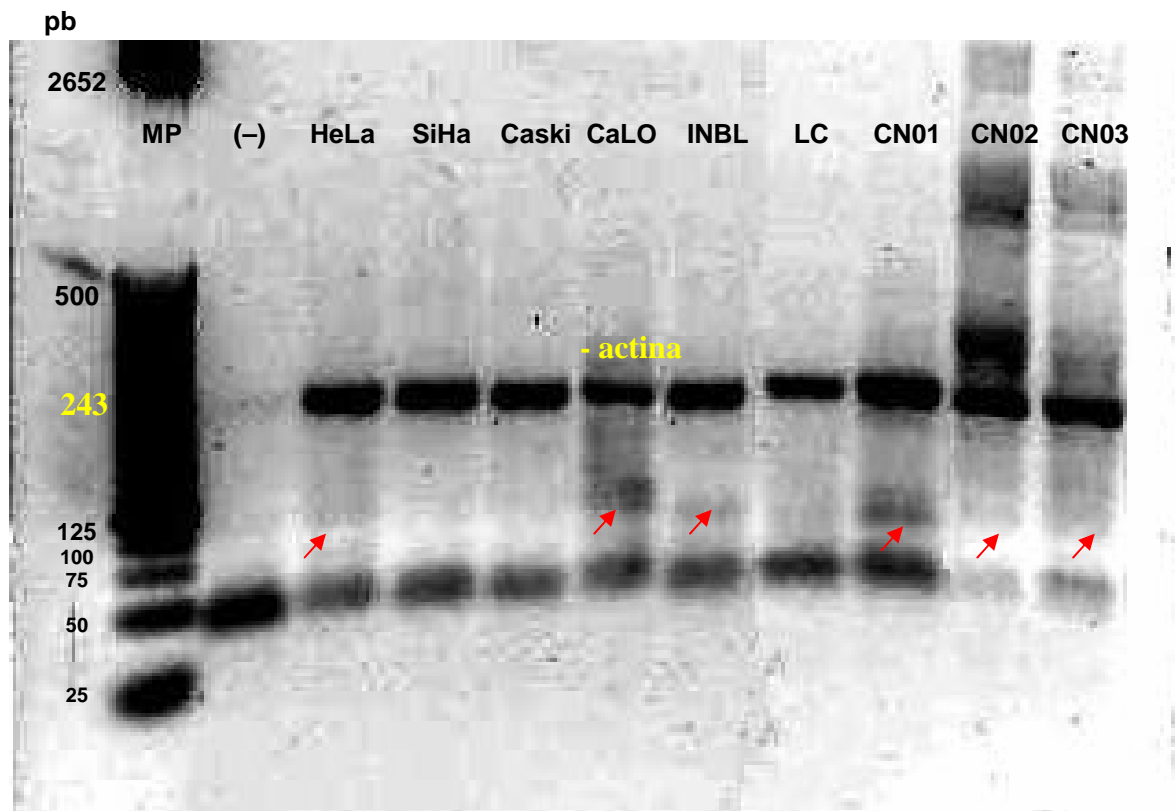


Figura 25. Gel de Productos de amplificación con el tono más concentrado. Se corrió en el mismo pozo el gen constitutivo y el pri-miRNA. Las flechas indican la banda de la presencia del pri-miRNA. LC: Linfocitos.

Tabla 10. Resumen de resultados

Muestra	Presencia del pri-miRNA hsa-mir-196b
Cérvix Normal 01	+
Cérvix Normal 02	+
Cérvix Normal 03	+
HeLa	+
CaLO	+
INBL	+
SiHa	-
CaSki	-
Linfocitos	-

7. DISCUSIÓN

El cáncer cérvico uterino, es el segundo cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo, es causado frecuentemente por infecciones específicas del VPH. Aunque la participación de las oncoproteínas del VPH (E6 y E7) en la transformación de la célula se encuentra bien documentada, la red detallada de los acontecimientos que conducen de la infección del VPH al desarrollo del tumor tiene que ser aclarada con mayor detalle. (Waggoner, 2003; Sánchez-Seco, 2002; Lerma, 2005).

Existe la evidencia que los microRNAs están presentes en prácticamente cualquier organismo procariótico y eucariótico (Bartel, 2004). Hasta este momento se conoce muy poco sobre la expresión de los miRNAs celulares del epitelio cervical, especialmente se desconoce sobre la expresión del microRNA 196b en cérvix uterino humano, únicamente se sabe que podría regular algunos de los genes HOX de los cuales se asocia su expresión con la transformación oncogénica en tumores humanos resaltando el cáncer cérvico uterino. (Yekta et al., 2004; John et al., 2004; Hung et al., 2003; López et al., 2006).

Las muestras incluídas en este estudio consistieron en tres muestras de tejido cervical normales sin infección; además de cinco líneas celulares de cáncer cérvico uterino: **HeLa**, **SiHa**, **CaSki**, **CaLO** e **INBL** y una muestra de linfocitos de sangre periférica de una persona sin ningún padecimiento.

En base a los oligonucleotidos para miR-196b que se reportaban en el artículo de (Jiang et al., 2005) (ver Tabla 3), se realizó un blasteo en la página Ensembl Human BlastView de dichas secuencias para corroborar su alineamiento a la secuencia del microRNA que nos interesa, mostrando que este se realizaba eficientemente (ver figura 22).

Una vez obtenidos todos los RNAs de las muestras a estudiar, se procedió a la amplificación del gen constitutivo - actina con los oligonucleotidos citados en materiales y métodos (ver Tabla 3), el tamaño obtenido fue de aproximadamente 243pb, lo cual esperábamos y con esto se verificó que el RNA obtenido era perfectamente amplificable (ver figura 23).

Por otra parte el pri-microRNA hsa-mir-196b se presentó en las muestras de tejido de cérvix normal sin infección y en cuanto a las líneas celulares se formaron dos grupos uno con la presencia del pri-miRNA incluyendo a **HeLa**, **CaLo** e **INBL** y otro sin el pri-miRNA conteniendo a **SiHa** y **CaSki** (ver figuras 24 y 25). Analizando los dos grupos se observó que el grupo de líneas celulares en el cual se presentaba el microRNA es positivo a VPH 18 y el otro grupo sin la presencia del microRNA es positivo para VPH 16.

Así, tenemos la evidencia que el microRNA hsa-mir-196b se expresa normalmente en el epitelio cervical normal sin lesión y que se observa una subexpresión en epitelios donde hay una infección por el VPH 16. Aparentemente, en la infección por el VPH 18 no ocurre dicho mecanismo.

Este evento nos permite discutir lo siguiente, el VPH 16 es uno de los virus oncogénicos en el epitelio cervical, por lo que se sugiere que uno de los papeles de su oncogenicidad podría ser inactivando (directa o indirectamente) al microRNA hsa-mir-196b.

Esto abre la oportunidad de demostrar el mecanismo molecular por el cual este microRNA hsa-mir-196b se regula en presencia de este virus.

8. CONCLUSIÓN

- ☑ El pri-microRNA hsa-mir-196b se expresa normalmente en el cérvix uterino humano y en una infección con el VPH 16 se inhibe su expresión.

9. GLOSARIO

Apoptosis: Programa controlado genéticamente de muerte celular que se activa como parte del desarrollo normal o como consecuencia de un daño celular.

Cápside: Es una estructura proteica formada por una serie de monómeros llamados capsómeros. En el interior de esta cápside se encuentra siempre el material genético del virus. Puede estar rodeada por una envoltura. Cada capsómero puede estar constituido por una o varias proteínas distintas.

Carcinogénesis: Proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerosas.

Carcinoma: Es una forma de cáncer con origen en células de tipo epitelial o glandular, de tipo maligno. Los dos grandes grupos de carcinomas son los carcinomas epidermoides y los adenocarcinomas. Los carcinomas constituyen el tipo más común de cáncer.

Cérvix uterino: Es la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina, y es un componente anatómico exclusivo de la hembra de los mamíferos. Aunque, por lo general mide, de 3 a 4 cm. de longitud y unos 2,5 cm. de diámetro, el cérvix se puede dilatar unos 10 cm. durante el parto.

Colposcopia: es un procedimiento ginecológico. El colposcopio es una especie de telescopio de enfoque próximo que permite al médico ver con detalle regiones anormales del cuello uterino, a través de la vagina, por lo que es posible extraer una biopsia del área anormal y enviarlo al patólogo.

Confluencia celular: cantidad de células presentes en un cultivo celular.

Deleción: Mutación cromosómica que implica la pérdida de material cromosómico.

Electroforesis: Técnica utilizada para separar una mezcla de moléculas por su migración diferencial en una fase estacionaria sometida a un campo eléctrico.

Exón: Segmento o segmentos de DNA de un gen que se transcriben y se traducen a proteínas. En el transcrito primario, es la secuencia de ribonucleótidos que no se elimina durante el proceso de corte y empalme o *splicing*, y que, por lo tanto, forma parte del transcrito maduro de mRNA, rRNA, tRNA.

Gen: La secuencia de DNA que codifica uno o varios productos capaces de desempeñar una función específica generalmente fuera de su lugar de síntesis. Estos productos pueden ser polipéptidos (es el caso de la mayoría de los genes) o RNA (RNAt, RNAr). El segmento de DNA o de RNA que codifica un polipéptido contiene asimismo secuencias reguladoras tales como los promotores, silenciadores, o potenciadores.

Genética: Rama de la biología que trata de la herencia y de la expresión de los caracteres hereditarios.

Genoma: La totalidad de la secuencia de DNA de un organismo.

Genómica: Estudio de las características genéticas globales de una célula u organismo, la medicina genómica tomará en cuenta las características particulares de cada individuo para diseñar estrategias de diagnóstico y tratamiento específicas para cada paciente.

Histopatología: Estudio de las células y el tejido enfermos bajo un microscopio.

Intrón: Porción de DNA entre regiones codificantes que se transcribe pero no se conserva en la molécula de RNA madura. En el transcrito primario, es la secuencia de ribonucleótidos que se elimina durante el proceso de corte y empalme, y que, por lo tanto, no forma parte del transcrito maduro de mRNA, rRNA y tRNA

Invasión: Es la migración y la penetración directa por las células del cáncer en los tejidos vecinos.

Metástasis: Es la diseminación a órganos distantes de una infección o de un tumor primario maligno o cáncer, que ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática.

microRNA: Es un RNA de cadena sencilla de 18 a 24 nucleótidos de longitud que es generado por la enzima Dicer, una RNAsa de tipo III, a partir de un transcrito endógeno que contiene una estructura de horquilla.

Multiparidad: Que ha tenido numerosos partos como mínimo dos.

Neoplasia: Proliferación de células, de manera persistente y anormal y relativamente autónoma de una serie de alteraciones estructurales en determinadas células con capacidad de transmisión a otras células. En el cáncer una célula modifica su composición genética de manera que ese cambio genera un clon que se multiplica y forma la masa tumoral.

Oligonucleótido: Secuencia corta de DNA.

Oncomirs: microRNAs que funcionan como genes supresores de tumor u oncogenes.

PCR: Técnica por la cual es posible amplificar enzimáticamente billones de veces una secuencia de DNA determinada, cuando se usa para detectar secuencias de RNA, se utiliza la PCR acoplada a retrotranscripción (**RT PCR**), es decir, se convierte el RNA a DNA en un primer paso y posteriormente se amplifica.

Proliferación: Es una reproducción rápida de los tejidos. Las células del cáncer son sumamente prolíficas, con tasas altas de división y crecimiento celular.

Protooncogenes: Genes comúnmente involucrados en el control de la proliferación y diferenciación celular, cuando éstos se alteran reciben el nombre de **Oncogenes**. La acción

conjunta de varios oncogenes transforma a la célula normal en una neoplásica. Los oncogenes actúan de forma dominante. Por Ejemplo: C-myc, Ret, etc.

Retrotranscripción: Síntesis de una molécula de DNA catalizada por la enzima retrotranscriptasa a partir de una hebra de RNA.

Spliceosoma: Complejo ribonucleoproteico responsable de la eliminación de los intrones de los transcritos primarios en el núcleo celular.

Supresores de tumor: Genes comúnmente involucrados en los procesos de control del ciclo celular, se consideran los “frenos” de la proliferación. Su alteración trae como consecuencia la pérdida del control de procesos como la reparación del DNA. Su acción es de tipo recesivo. Por Ejemplo: p53, Rb.

Transcripción: Proceso por el cual un gen en el DNA se copia para producir un RNA, es el primer paso en la expresión genética, aunque finalmente no todos los RNAs producidos (transcritos) darán lugar a proteínas. Se lleva a cabo en el núcleo celular.

Tumorigénesis: Es la formación de tumores en el cuerpo, causada a menudo por los oncogenes. Estos tumores son el resultado de la reproducción incontrolable (división celular) debido a las alteraciones en el código genético de la célula, creando lesiones en el tejido donde residen. Tumorigénesis es un síntoma del cáncer.

10. REFERENCIAS

Alami Younes, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D and Clause N. (1999) HOXC5 and HOXC8 Expression Are Selectively Turned on in Human Cervical Cancer Cells Compared to Normal Keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257: 738-745.

Baohong Zhang, Pan Xiaoping, Cobb George, Anderson Todd. (2006) MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1)1-12.

Bartel David P. (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell Press*, 116: 281–297.

Buckingham Steven. (2003) The major world of microRNAs. *Understanding the RNA issuance*, 3: 1-3.

Calin George Adrian, Dumitru C, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, and Croce C. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*, 99(24): 15524-15529.

Calin George Adrian, Sevignani C, Dumitru C, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, and Carlo M. Croce C. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *PNAS*, 101(9): 2999-3004.

Cimmino Amelia Calin G, Fabbri M, Dorio M, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik S, Aqeilan R, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C-g, Kipps T, Negrini M, and Croce C. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS*, 102(39): 13944-13949.

Cullen Bryan R. (2004) Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Research*, 102: 3–9.

- De Villiers Ethel-Michele, Fauquet C., Broker T. R., Bernard H.-U. and zur Hausen H. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27.
- Du Tingting and Zamore Phillip D. (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132(21): 4645-4652.
- Dzul-Rosado K., Puerto-Solís M., González-Losa M. (2004) Cáncer cérvicouterino. Métodos actuales para su detección. *Revista Biomédica*, 15: 233-241.
- Esquela-Kerscher Aurora and Slack Frank J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews*, 6: 259-269.
- Ferlay J., Bray F., Pisani P. and Parkin D. M. GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC Cancer Base No. 5, version 2.0 IARC Press, Lyon, 2004.
- Garzon Ramiro Fabbri Muller, Cimmino Amelia, Calin George A. and Croce Carlo M. (2006) MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 12: 580-587.
- Hammond Scott M. (2006) MicroRNAs as oncogenes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16: 4-9.
- Hidalgo A, Baudis M, Petersen I, Arreola H, Piña P, Vázquez-Ortiz G, Hernández D, González J, Lazos M, López R, Pérez C, García J, Vázquez K, Alatorre B. and Salcedo M. (2005) Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma. *BMC Cancer*, 5:77-84.
- Hidalgo A, Salcedo M. (2001) Estrategias de Análisis Global. Hacia el Manejo Genético de las Neoplasias. *Revista de Investigación Clínica*, 53(5): 430-443.
- Hung Yao-Ching, Ueda Masatsugu, Terai Yoshito, Kumagai Koji, Ueki Ken, Kanda Koji, Yamaguchi Hiroyuki, Akise Daisuke and Ueki Minoru. (2003) Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. *Cancer Science*, 94(5):437-441.

- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática INEGI (2007) Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales. Sala de prensa.
- Jiang Jinmai, Lee Eun Joo, Gusev Yuriy and Schmittgen Thomas D. (2005) Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research*, 33(17): 5394-5403.
- John Bino, Enright Anton J., Aravin Alexei, Tuschl Thomas, Sander Chris, Marks Debora S. (2004) Human MicroRNA Targets. *PLoS Biol* 2(11): 1862-1879.
- Lee Yoontae, Kim Minju, Han Jinju, Yeom Kyu-Hyun, Lee Sanghyuk, Baek Sung Hee and Kim V. Narry. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23: 4051-4060.
- Lerma Enrique. (2005) Factores que intervienen en la diseminación del cáncer de cuello uterino. *Revista Española de Patología*, 38 (4): 201-206.
- Li Hung, Huang Chiu-Jung and Choo Kong-Bung. (2002) Expression of Homeobox Genes in Cervical Cancer. *Gynecologic Oncology*, 84: 216–221.
- López R, Garrido E, Piña P, Hidalgo A, Lazos M, Ochoa R, Salcedo M. (2006) HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*, 16(1): 329–335.
- López R, Garrido E, Vázquez G, Piña P, Pérez C, Alvarado I, Salcedo M. (2006) A subgroup of HOX Abd-B gene is differentially expressed in cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 16(3): 289–1296.
- López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. (2006) Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, Vol.1, (1): 31-55.
- Martin C. M., Astbury K and O’Leary J. (2006) Molecular profiling of cervical neoplasia. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6(2): 217-229.

- McManus Michael T. (2003) MicroRNAs and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 13: 253-258.
- Meister Gunter, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, and Tuschl T. (2004) Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, 15: 185-197.
- Mendell Joshua T. (2005) MicroRNAs Critical Regulators of Development, Cellular Physiology and Malignancy. *Cell Cycle*, 4(9): 1179-1184.
- Miska Eric A. (2005) How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15: 563-568.
- Muñoz Nubia, Bosch F, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah K, Snijders P, and Meijer C. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348: 518-27.
- Murchison Elizabeth and Hannon Gregory J. (2004) miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 223-229.
- Nakahara Kenji and Carthew Richard W. (2004) Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 127–133.
- O'Donnell Kathryn A., Wentzel Erik A., Zeller Karen I., Dang Chi V., and Mendell Joshua T. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435: 839-843.
- Ouellet Dominique L. Perron M, Gobeil L-A, Plante P, and Patrick P. (2006) MicroRNAs in Gene Regulation: When the Smallest Governs It All. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006: 1–20.
- Ricarte Filho Julio and Teruko Kimura Edna. (2006) MicroRNAs: Novel Class of Gene Regulators Involved in Endocrine Function and Cancer. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 50(6): 1102-1107.

- Sánchez-Seco Higuera P. (2002) Cáncer de cérvix uterino. *Semergen*, 28(3): 145-51.
- Santin A.D, Zhan F, Bignotti E, Siegel E. R, Cané S, Bellone S, Palmieri M, Anfossi S, Thomas M, Burnett A, Kaye H, Roman J, O'Brien T, Tian E, Cannon M, Shaughnessy J, Pecorelli S. (2005) Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology*, 331: 269–291.
- Schmittgen Thomas D, Jiang J, Liu Q. and Yang L. (2004) A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Research*, 32(4): 1 -10.
- Takamizawa Junichi. (2004) Reduced Expression of the *let-7* MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Res*, 64: 3753-3756.
- Vázquez-Ortíz G, Ciudad C. J, Piña P, Vázquez K, Hidalgo A, Alatorre B, García J. A, Salamanca F, Peralta-Rodríguez R, Rangel A. and Salcedo M. (2005) Gene Identification by cDNA Arrays in HPV-Positive Cervical Cancer. *Archives of Medical Research*, 36: 448-458.
- Vázquez-Ortiz G, Piña-Sánchez P, Salcedo M. (2006) Grandes Alcances de los RNAs pequeños. RNA de Interferencia y microRNA. *Rev de Investigación Clínica*, 58(4): 335-349.
- Vilata Corell Juan José. (2001) Infección por el virus del papiloma humano (VPH). *Prog Obstet Ginecol*, 44: 289-323.
- Voorhoeve P, Mathijs, Sage C, Schrier M, Gillis A, Stoop H, Nagel R, Liu Y-P, Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga L, and Agami R. (2006) A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cell*, 124: 1169-1181.
- Waggoner Steven E. (2003) Cervical Cáncer. *Lancet*, 361: 2217-2225.
- Yekta Soraya, Shih I-hung, Bartel David P. (2004) MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 304: 594-596.

Ensembl Transcript Report

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/transview?db=core&transcript=ENST00000384852&show=rna&number=off&submit=Refresh

Entrez Gene

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&list_uids=442920

miRBase sequences hsa-mir-196b

http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/mirna_entry.pl?acc=MI0001150

miRBase Target Database

http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/targets/v4/hit_list.pl?genome_id=native&mirna_id=hsa-miR-196a

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Universidad Johns Hopkins

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=609688>

PicTar WEB INTERFACE

http://pictar.bio.nyu.edu/cgi-bin/PicTar_vertibrate.cgi?action=Search%20for%20targets%20of%20a%20miRNA&name2=hsa-miR-196a