



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

PARTICIPACIÓN DE MIR-138 EN LA REGULACIÓN INDIRECTA DEL  
PROMOTOR DE MDR1, A TRAVÉS DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO  
DE NF-KB/P65

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**HERNÁNDEZ FLORES ROCIO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GUILLERMO AQUINO-JARQUIN  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MÉXICO, D.F. MARZO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE MIR-138 EN LA REGULACIÓN INDIRECTA DEL  
PROMOTOR DE MDR1, A TRAVÉS DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO  
DE NF-KB/P65**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**HERNÁNDEZ FLORES ROCIO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GUILLERMO AQUINO-JARQUIN

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MÉXICO, D.F. MARZO 2015**

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 19 de enero de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **HERNÁNDEZ FLORES ROCIO** con número de cuenta **408000800**, con la tesis titulada "**PARTICIPACIÓN DE miR-138 EN LA REGULACIÓN INDIRECTA DEL PROMOTOR DE MDR1, A TRAVÉS DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE NF-kB/p65**", realizada bajo la dirección del **DR. GUILLERMO AQUINO JARQUIN**:

Presidente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO  
Vocal: DR. EMILIO JOAQUÍN CORDOVA ALARCÓN  
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
Suplente: DR. LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA  
Suplente: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

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

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de marzo de 2015

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el período de duración de la maestría.

A los miembros de mi Comité Tutor:

Al Dr. Guillermo Aquino Jarquin por su constante apoyo en todo el transcurso del proyecto y sus valiosas observaciones.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por su constante apoyo en los momentos más difíciles, pero sobre todo por su apreciable amistad.

Al Dr. Felipe Vadillo Ortega, por los valiosos comentarios y observaciones realizadas durante este proyecto

## **AGREDECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

Gracias Mama y Papa nunca lo habría logrado sin ustedes, son mi razón de seguir y mi fuerza en momentos difíciles.

Gracias Hermanas, Alma y Mónica por estar conmigo y siempre hacerme reír a pesar de mis preocupaciones, siempre tratando de hacerme ver que las cosas no son tan difíciles si se tiene a personas que te quieren.

Gracias Lesly que aunque nunca supiste porque tu tía se iba tanto tiempo siempre me recibías con una sonrisa y esperabas por mí, por cuidar de mis papas y por hacernos tan feliz solo con existir.

Gracias a mi hermosa familia que a pesar del tiempo que me perdí junto a ellos, nunca dejaron de apoyarme para terminar con este proyecto.

Gracias Esteban por siempre estar ahí para escuchar mis quejas y mis enojos, por apoyarme y por ayudarme a terminar la tesis. Gracias por todo el amor que me has brindado que ha sido mi fuerza en momentos difíciles.

## **DEDICATORIA**

A mis padres que han estado siempre apoyándome en todo mi camino que he decidido tomar, por su alegría y su cariño inigualable que todos los días me han mostrado, los amo y siempre serán lo más importante en mi vida.

A mis hermanas y mi sobrina que siempre me han hecho tan feliz cuando más estaba preocupada. Las amo muchísimo.



## ÍNDICE

FIGURAS.....	i
TABLAS.....	iv
ABREVIATURAS .....	v
I. RESUMEN .....	1
II. ABSTRACT .....	2
III. INTRODUCCIÓN .....	3
1. La quimioterapia en cáncer .....	3
2. La resistencia a múltiples fármacos o “MDR1” .....	4
3. La glicoproteína MDR1.....	5
4. El factor nuclear $\kappa$ B .....	6
5. miRNAs en la resistencia a fármacos .....	8
6. miRNAs en la regulación transcripcional .....	10
7. miR-138 en la regulación del fenotipo a múltiples fármacos .....	12
8. La regulación post-transcripcional de MDR1 .....	13
9. La regulación de MDR1 por miR-138 .....	15
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
V. HIPOTESIS.....	17
VI. OBJETIVOS .....	18
VII. MATERIAL Y METODOS .....	19
VIII. RESULTADOS.....	39
1. Expresión de miR-138 en las líneas celulares T98 y AD-293 .....	39
2. Expresión de NF- $\kappa$ B (p65) en las líneas celulares T98 y AD-293 .....	41
3. Construcción del vector psi-3'-UTR-p65 .....	42

4.	Eliminación del sitio de unión de miR-138 sobre el 3'-UTR de NF-κB (p65).....	46
5.	Clonación de miR-138 en el vector de pLVx-shRNA-2 (pLVx-miR-138).....	48
6.	Efecto regulatorio de la sobre expresión de miR-138 sobre el 3' UTR de NF-κB (p65) en las líneas celulares T98 y AD-293.....	51
7.	Efecto de miR-138 sobre la expresión del mensajero de NF-κB (p65) en las líneas celulares T98 y AD-293.....	54
8.	Efecto de miR-138 sobre la expresión de la proteína de NF-κB (p65) en la línea celular T98 y AD-293.....	56
9.	Determinación de la expresión de miR-138 en células T98 y AD-293 después de la transfección.....	58
IX.	DISCUSIÓN.....	60
X.	CONCLUSIONES.....	69
XI.	PERSPECTIVAS.....	70
XII.	LITERATURA CITADA.....	71
XIII.	ANEXO 1.....	77

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biogénesis de los microRNAs .....	10
Figura 2. Región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) .....	23
Figura 3. Mapa del vector psiCHECK-2.....	24
Figura 4. Secuencia de oligonucleótidos para eliminar el sitio de unión a miR-138 en el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65).....	26
Figura 5. Precursor de miR-138 .....	30
Figura 6. Mapa del vector PGEM-T Easy .....	32
Figura 7. Mapa del vector pLVX-shRNA-2 .....	34
Figura 8. Expresión de miR-138 en las líneas celulares T98 y AD-293 .....	40
Figura 9. Determinación de los niveles de NF- $\kappa$ B (p65) en las líneas celulares T98 y AD-293.....	41
Figura 10. Representación esquemática del 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65).....	43
Figura 11. Amplificación de la secuencia de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65).....	44
Figura 12. Mapa del vector psiCHECK-2 y sitio de clonación múltiple (MSC) .....	45
Figura 13. Análisis de la integridad de la secuencia de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) .....	46
Figura 14. Análisis de la secuencia de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) .....	47

Figura 15. Representación del precursor de miR-138 .....	48
Figura 16. Amplificación de la secuencia precursora de miR-138 .....	49
Figura 17. Mapa del vector pLVX-shRNA-2 y sitio de clonación múltiple (MSC) ..	50
Figura 18. Análisis de la secuencia de nucleótidos correspondientes a la región precursora de miR-138 .....	51
Figura 19. Regulación post-transcripcional de NF- $\kappa$ B (p65) a través de miR-138 .....	53
Figura 20. Efecto de la sobre-expresión de miR-138 sobre el RNA mensajero de NF- $\kappa$ B (p65) .....	55
Figura 21. Efecto de miR-138 en la expresión de la proteína NF- $\kappa$ B (p65).....	57
Figura 22. Evaluación de la sobre-expresión de miR-138 después de la transfección con el mimic de miR-138 y el plásmido pLVX-miR-138 .....	59
Figura 23. Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de MDR1 mediante la herramienta microPIR .....	77
Figura 24. Análisis <i>in silico</i> mediante la herramienta microRNA.org, de la región 3'-UTR del mensajero de NF- $\kappa$ B (p65): Predicción del sitio de unión a miR-138.....	78
Figura 25. Análisis <i>in silico</i> mediante el algoritmo TargetScanHuman, de la región 3'-UTR del mensajero de NF- $\kappa$ B (p65), donde también se observa un sitio de unión para miR-138 .....	79

Figura 26. Análisis de los nucleótidos 9-11 necesarios para el reconocimiento y escisión por proteínas argonautas en la interacción de miR-138 sobre el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65). Imagen modificada de referencia .....81

Figura 27. Evaluación de la expresión de MDR1 en la línea celular T98 para determinar la distribución de la proteína, mediante microscopia confocal después de la transfección con miR-138 y el control negativo.....82

Figura 28. Evaluación de la expresión del RNA mensajero de NF- $\kappa$ B (p65), a 48 horas de transfección del plásmido pLVX-miR-138 en células AD-293 y de la transfección del mimic de miR-138 en células T98 .....83

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacción para el RT-qPCR de miR-138 y U6.....	20
Tabla 2. Reacción para el RT-qPCR para NF- $\kappa$ B (p65) y $\beta$ -Actina .....	21
Tabla 3. Reacción de amplificación de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) .....	22
Tabla 4. Reacción de secuenciación de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) .....	25
Tabla 5. Reacción para la eliminación del sitio de unión de miR-138 en la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) pGEM-T Easy .....	27
Tabla 6. Reacción de PCR punto final para amplificar al precursor de miR-138 .....	29
Tabla 7. Reacción para la adición de la cola de poly A .....	31
Tabla 8. Reacción de ligación del precursor de miR-138 en el vector pGEM-T Easy.....	31
Tabla 9. Reacción de ligación del precursor de miR-138 en el vector pLVX-shRNA2 .....	33
Tabla 10. Blancos de distintos miRNAs, donde su represión se asocia con ninguna o sólo una mínima degradación del mRNA .....	80

## ABREVIATURAS

3'-UTR.....	Región no traducida 3'
5-FU.....	5-Flouracilo
ABC.....	Casete de unión a ATP
Ago 2.....	Proteína argonauta 2
AKT.....	Proteína cinasa B
ALDH.....	Aldehído deshidrogenasa
BCRP.....	Proteína de resistencia al cáncer de mama
DGCR8.....	Región critica 8 Di George
DNA.....	Acido desoxirribonucleico
ERK.....	Cinasa regulada por señales extracelulares
EZH2.....	histona-lisina metiltransferasa
H <sub>2</sub> O LN.....	Agua libre de nucleasas
HI-60/VDR.....	Línea celular humana de leucemia promielocitica resistente a vincristina
HNSCC.....	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
IAPs.....	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
lncRNA.....	RNA largo no codificante
MDR.....	Resistencia a múltiples drogas, del inglés "Multidrug Resistance"
MDR1.....	Proteína de Resistencia a múltiples drogas 1
MRE.....	Elementos de reconocimiento del mRNA
MRP1.....	proteína asociada a MDR1

MUT.....	Mutado
NF-κB.....	Factor nuclear κB
NLS.....	Señal de localización nuclear
NT.....	No tratado
PBS.....	Tampón salino fosfato
PBST.....	PBS mas tween 20 al 0.05%
PI3K.....	Fosfoinositol 3-cinasa
Pol II y III.....	Polimerasa II y III
POLR3D.....	Subunidad de la RNA polimerasa III
pre-mRNA.....	Precursor del mRNA
GPR124.....	Receptor acoplado a la proteína G-124
RISC.....	Complejo de Silenciamiento inducido por ARN
SFB.....	Suero Fetal Bovino
snRNA.....	RNA pequeño nuclear
TNF-α.....	Factor de necrosis tumoral α
tRNA.....	RNA de transferencia
WT.....	Tipo silvestre



## I. RESUMEN

Aunque en los últimos años se ha demostrado un avance importante en la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, el 25-30% de los pacientes desarrollan el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR). La exclusión del fármaco de la célula tumoral es el mecanismo de resistencia más profundamente estudiado y se encuentra relacionado fundamentalmente con la actividad de proteínas transportadoras como MDR1.

Recientemente se reportó que miR-138 puede modular la MDR en células HL-60/VDR, a través de la regulación transcripcional del gen que codifica para MDR1. Sin embargo al realizar un ensayo *in-silico* con el software microPIR, identificamos que MDR1 no posee ningún sitio de unión para miR-138, sugiriendo que la regulación de MDR1 no es de manera transcripcional. Se ha descrito que NF- $\kappa$ B (p65) regula la actividad transcripcional del promotor de MDR1. Interesantemente al evaluar la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B, se determinó un sitio de unión para miR-138. Por lo que resulta razonable pensar, que miR-138 podría estar participando en la regulación post-transcripcional de NF- $\kappa$ B de manera directa. Nuestros resultados sugieren una regulación post-transcripcional de miR-138 sobre el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B, induciendo la represión traduccional sin degradar el mRNA de NF- $\kappa$ B en la línea celular T98 y AD-293 y por lo tanto, explicaría la regulación ejercida de manera indirecta sobre MDR1.

## II. ABSTRACT

Although significant progress has been shown in recent years about the effectiveness of chemotherapeutic agents, 25-30% of patients develop a multi-drug resistance phenotype (MDR). Drug efflux out the cell is the most studied resistance mechanism, which is mainly associated with the activity of transport proteins such as MDR1.

It was recently reported that miR-138 can modulate MDR phenotype in HL-60 / VDR cells through transcriptional regulation of the MDR1 gene. However in-silico assays using the software microPIR, determined that MDR1 promoter has no binding site for miR-138, suggesting that the regulation is not transcriptionally. It has been described that NF- $\kappa$ B (p65) regulates the transcriptional activity of the MDR1 promoter. Interestingly when we evaluated the 3'UTR/RelA region, a binding site for miR-138 was predicted. It is arguable that miR-138 may be involved in post-transcriptional regulation of NF- $\kappa$ B directly.

Our results suggest a post-transcriptional regulation of miR-138 on the 3'UTR of NF- $\kappa$ B, inducing translational repression without degrading the NF- $\kappa$ B mRNA in the cell line T98 and AD-293 and therefore, to explain the regulation exerted directly on MDR1.

### **III. INTRODUCCIÓN**

#### **1. La quimioterapia en cáncer.**

Las células son sistemas complejos y dinámicos, que utilizan circuitos de señalización moleculares que rigen las actividades celulares básicas y coordinan sus acciones [1]. La capacidad de las células para percibir y responder de manera apropiada al microambiente es la base para la homeostasis, el desarrollo, la reparación de tejidos y la inmunidad. Los errores en estos distintos procesos son responsables de diferentes condiciones celulares y fisiológicas que conducen hacia enfermedades, entre ellas autoinmunes, síndrome metabólico y cáncer [2,3].

La palabra cáncer es un término empleado para clasificar un conjunto de enfermedades en donde las células se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y/o por el sistema linfático [1\*]. El cáncer requiere de un conjunto muy complejo de condiciones. Es impulsado por un modelo de evolución darwiniana a nivel celular [4], que comprende todos los niveles de información celular (es decir, la genética, la epigenética, la regulación traduccional y modificaciones post-traduccionales). Por consiguiente, se trata de un proceso de comunicación entre diferentes tipos de células, e interacciones entre el microambiente tumoral y la fisiología del organismo [5,6].

Existen distintos esquemas de tratamiento para los pacientes con cáncer, como la escisión quirúrgica local y la radioterapia, sin embargo en pacientes que no responden a estos tratamientos (cerca del 50% del total de casos de cáncer) y

para los pacientes con neoplasias no sólidas hematológicas, se utiliza el tratamiento quimioterapéutico, inmunoterapia y modificadores de la respuesta biológica [7]. Dentro de estos tratamientos, la quimioterapia es la más utilizada y se define como el uso de cualquier fármaco (Ej. aspirina o penicilina) para tratar cualquier enfermedad, pero para la mayoría de las personas, quimioterapia se refiere a las fármacos oncológicos usados para el tratamiento del cáncer [2\*].

Para conseguir la eliminación de las células tumorales, que es el principal objetivo de la quimioterapia, es necesario que la mayor cantidad del fármaco activo llegue a su blanco molecular al interior de la célula y cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo, puede ser causa de resistencia [8].

Aunque en los últimos años se ha demostrado un avance importante en la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, el 25-30% de los pacientes desarrollan resistencia al tratamiento y en la mayoría de los casos, para revertirla, se administran altas dosis de agentes quimioterapéuticos. Lo anterior da lugar a efectos secundarios adversos en órganos sanos [9], así como el desarrollo de un fenotipo funcional de resistencia a múltiples fármacos o MDR (por sus siglas en inglés "*Multidrug Resistance*") [10][11].

## **2. La resistencia a múltiples fármacos o "MDR".**

La resistencia a múltiples fármacos es definida como un mecanismo donde las células se tornan resistentes frente agentes quimioterapéuticos, con estructura química y mecanismos de acción muy diferentes [6].

Los mecanismos de resistencia a la quimioterapia, se dividen en dos categorías: intrínsecos o adquiridos. Se considera resistencia intrínseca cuando antes de recibir la quimioterapia, los factores que regulan la resistencia pre-existen en la mayoría de las células que integran al tumor, resultando en la ineficaz terapia.

La resistencia a drogas adquirida puede desarrollarse durante el tratamiento farmacológico de las células cancerosas, que inicialmente eran sensibles y que puede ser causado por mutaciones que surgen durante el tratamiento, lo que genera diversas respuestas adaptativas, tales como el aumento de la expresión del blanco terapéutico y la activación de vías de señalización alternativas compensatorias [12].

Dentro de los mecanismos extrínsecos podemos encontrar los siguientes:

- Falta de activación o inactivación del fármaco [13,14].
- Alteraciones en el blanco molecular [15][14].
- Reparación de daños en el ADN [16].
- Desregulación de la apoptosis [17-19].
- Exclusión del fármaco [7,20].

### **3. La glicoproteína MDR1**

La familia de transportadores de unión a ATP o también conocida como familia ABC tiene en total 49 miembros, tres de las cuales han sido ampliamente estudiadas en relación con MDR. Estas son la proteína de resistencia a múltiples

fármacos 1 (MDR1, también conocida como la glicoproteína-P y ABCB1), proteína asociada MDR-1 (MRP1; también conocido como ABCC1) y proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP; también conocido como ABCG2) [20]. MDR1 fue el primer transportador de la familia ABC en ser identificado; es una glicoproteína transmembranal que se expresa en casi todos los tejidos en niveles bajos, pero se encuentra en niveles altos en la superficie de las células epiteliales con funciones excretoras, tales como de recubrimiento en colon, intestino delgado, conductos pancreáticos, pequeños conductos de la bilis y túbulo proximales del riñón [21][22].

MDR1 presenta amplia especificidad de sustratos por fármacos estructuralmente diferentes y por consiguiente, modula la resistencia a una variedad de medicamentos, incluidos los alcaloides de la *Vinca*, antraciclina, epipodofilotoxinas (alcaloides naturales), taxoles, actinomicina D, glucósidos cardíacos, agentes inmunosupresores, glucocorticoides y los inhibidores de la proteasa anti VIH [23][24].

#### **4. El factor nuclear $\kappa$ B**

La activación de una variedad de vías y factores de transcripción incluyendo FOXO3a, PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B y la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), así como la disminución en la expresión de la HSP27 se ha implicado en la regulación positiva de MDR1 [25-27]. En nuestro grupo de trabajo se ha determinado que, el tratamiento con doxorubicina 0.5  $\mu$ g/ml induce la translocación

de NF- $\kappa$ B (p65) y la sobre-expresión de MDR1 en la línea celular de leucemia linfoblástica aguda RS4;11, lo que sugiere una posible participación de NF- $\kappa$ B (p65) en el desarrollo del fenotipo de multirresistencia a fármacos [28].

La familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B regula la expresión de una gran variedad de genes que están involucrados en procesos como respuestas inflamatorias e inmunitarias de la célula, crecimiento celular, y desarrollo. Los factores de transcripción de la familia NF- $\kappa$ B se activan como respuesta a una variedad de señales, incluyendo citocinas, agentes patógenos, lesiones, y otras condiciones de estrés. La activación de las proteínas NF- $\kappa$ B está estrechamente regulada, y la activación inapropiada de las vías de señalización se ha relacionado con la autoinmunidad, la inflamación crónica, y varios tipos de cáncer [29].

La familia de factores de transcripción de NF- $\kappa$ B, consta de cinco subunidades diferentes: RelA (p65), c-Rel, RelB, p50/NF- $\kappa$ B1 y p52/NF- $\kappa$ B2 [30], los cuales se ha descrito que participan en el desarrollo de multirresistencia a fármacos [31].

En cultivo celulares no estimulados, NF- $\kappa$ B se encuentra unido a una proteína inhibidora, I $\kappa$ B, enmascarando la señal de localización nuclear (NLS) de NF- $\kappa$ B, secuestrando en el complejo NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B en el citoplasma, evitando que se una al ADN. La activación de la señalización de NF- $\kappa$ B se inicia por estímulos extracelulares. Estos estímulos son reconocidos por receptores y se transmiten dentro de la célula, donde proteínas adaptadoras de señalización inician una cascada de señalización. Estas cascadas de señalización culminan en la

activación de la cinasa de I $\kappa$ B (IKK). IKK fosforila la subunidad I $\kappa$ B del complejo NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B en el citoplasma. Esta fosforilación marca I $\kappa$ B para la degradación por el proteosoma y libera a NF- $\kappa$ B del complejo inhibidor. A continuación, las proteínas NF- $\kappa$ B son liberadas y transportadas al núcleo donde se unen a sus secuencias blanco y activan la transcripción de genes [32] [33].

## **5. miRNAs en la resistencia a fármacos.**

Además de la regulación transcripcional mediada por factores de transcripción, actualmente se ha determinado que distintos miRNAs regulan de manera post-transcripcional a MDR1 [34]. Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante de 18 a 24 nucleótidos (nt) de longitud que están evolutivamente conservados, tienen un papel central como represores post-transcripcionales de la expresión de genes actuando sobre el mRNA, al unirse a elementos de reconocimiento del miRNA (sitios MRE) [35].

La transcripción de los genes de los miRNAs está mediada por RNA polimerasa II o RNA polimerasa III lo que genera un miRNA primario (pri-miRNA), de cientos a miles de nucleótidos de longitud. La mayoría de los pri-miRNAs humanos contienen una estructura de tallo-horquilla de 33 pares de bases, un bucle terminal, y dos regiones de una sola cadena que flanquean corriente arriba y corriente abajo la horquilla. Para la maduración del miRNA, el pri-miRNA pasa por varios pasos de escisión y modificación. El pri-miRNA es escindido primero por el



complejo microprocesador nuclear formado por la RNAsa III (Drosha) y DGCR8, produciendo el precursor pre-miRNA, que es de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud [36]. En este proceso, el tallo de doble cadena y las regiones flanqueantes no apareadas son críticos para la unión de DGCR8 y la escisión de Drosha. A continuación, el pre-miRNA se transporta al citoplasma por el factor de exportación nuclear exportina 5, que se une al pre-miRNA [37]. En el citoplasma, otra RNAsa III (Dicer) en complejo con las proteínas de unión al RNA de doble cadena TRBP, rompen la horquilla de pre-miRNA y produce un dúplex de RNA de 22 nucleótidos de longitud. Entonces, bajo la regulación de Ago2, el dúplex de RNA se disocia a una sola hebra: hebra guía funcional que es complementario al mRNA blanco, y la hebra pasajera que es degradada [38] (Figura 1).

La hebra guía funcional, el miRNA maduro, se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y guía al RISC al mRNA blanco. Comúnmente los miRNAs maduros regulan la expresión génica mediante la unión a la región no traducida 3' (3'-UTR) del mRNA blanco, que conduce a la represión de la traducción o degradación de mRNA, dependiendo del grado de complementariedad [39].

Los miRNAs están involucrados en la regulación de procesos biológicos críticos, incluyendo el ciclo celular, la diferenciación, el desarrollo, y la apoptosis [40]. Los datos recientes indican que los miRNAs están desregulados en padecimientos, tales como diabetes, enfermedades del corazón y el cáncer [41].

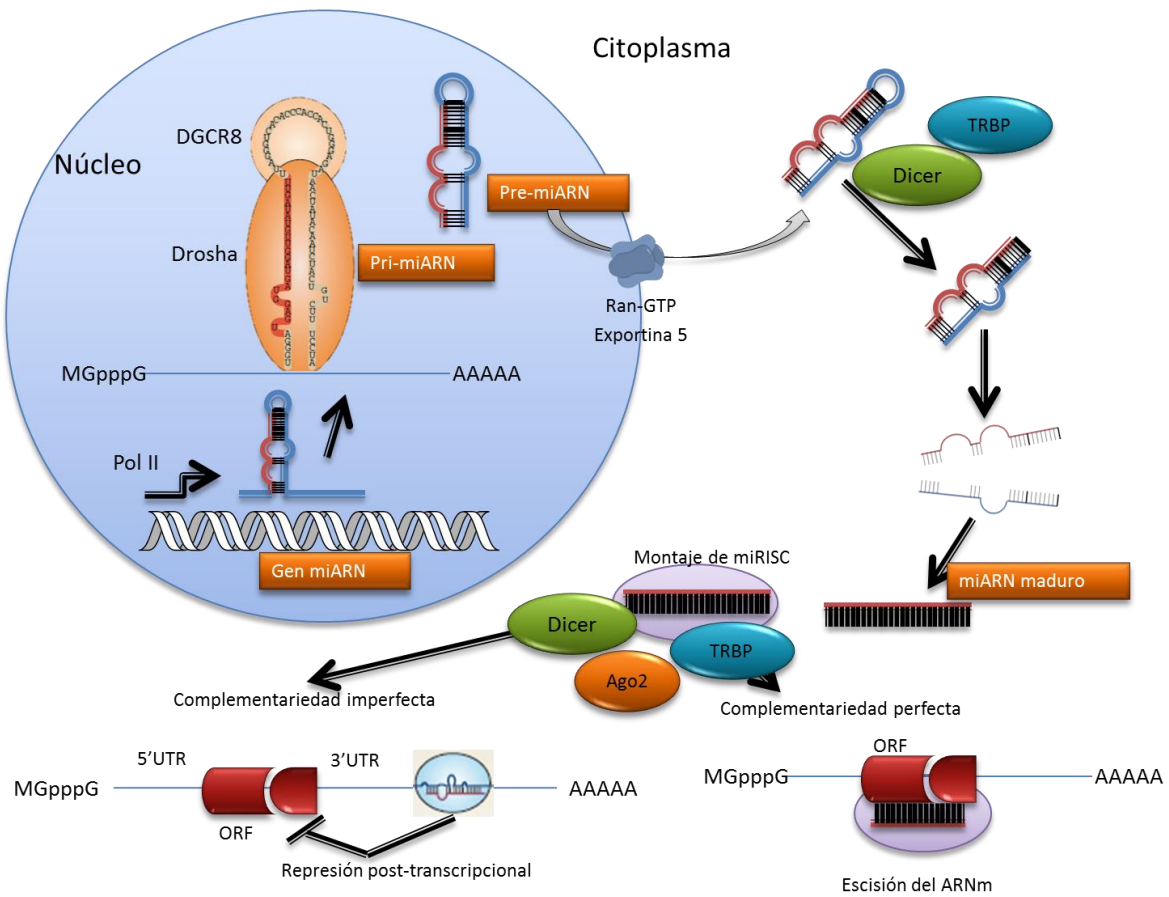


Figura 1. Biogénesis de los microRNAs [50][42].

## 6. miRNAs en la regulación transcripcional.

Recientemente se ha descrito que la regulación a través de miRNAs también puede ser de manera transcripcional, ya que se ha descrito que los miRNAs pueden contener señales de localización nuclear, que les permitan tener un papel regulador en el núcleo, además de la regulación post-transcripcional que realizan [43]. Como ejemplo de ello en el trabajo de Matsui M, se describió la regulación del promotor de COX-2 a través de un lncRNA (que contiene dos sitios de unión para miR-589). Se determinó que la unión de miR-589 al RNA promotor recluta a

Ago2 y GW182 induciendo la activación transcripcional de COX-2, que se asocia con un aumento en la tri-metilación de la lisina 4 en la histona 3 H3K4me3 y la acetilación de la histona 4 H4ac, que se asocian con la activación de genes [44].

También se ha descrito que miR-320, el cual es transcrito a partir del promotor de POLR3D, transcripcionalmente silencia el gen POLR3D induciendo silenciamiento génico transcripcional (TGS) en *cis*, al dirigir la asociación de Ago1, EZH2, un componente del grupo polycomb (PcG) y la tri-metilación de la lisina 27 en la histona 3 H3K27me3 con el promotor de POLR3D [45]. La regulación epigenética en *trans* por los miRNAs fue descrita por Younger *et al.*, al observar que varios miRNAs con blancos pronosticados en el promotor del receptor de progesterona (PR) pueden silenciar su expresión mediante la inducción de la metilación de la lisina 9 en la histona 3 H3K9me y el reclutamiento de Ago2, pero no Ago1, a los sitios blanco [46].

Además de lo ya descrito también se ha reportado que determinados miRNAs pueden regular los mismos genes blanco post-transcripcionalmente y epigenéticamente. Por ejemplo, miR-223 es conocido por regular a la baja el factor nuclear IA (NFI-A) por la unión al 3'UTR de NF1-A, que conduce a granulopoyesis en células madre hematopoyéticas [47]. En un estudio realizado por Zardo *et al.*, se determinó que miR-223, dirige a las proteínas del grupo de polycomb (PcG) a un sitio blanco en el promotor de NF1-A para inducir el silenciamiento de la cromatina, caracterizado por una disminución en H3K4me3 y un aumento en H3K27me3 y el reclutamiento de miembros de la familia PcG YY1 y SUZ12, durante la granulopoyesis inducida por ácido retinoico (RA) [48].

Recientemente se reportó que miR-138 puede modular el fenotipo de MDR en células de leucemia promielocítica aguda HL-60/VDR, a través de una regulación transcripcional del gen de MDR1, así como por la sobre-expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 [49]. Sin embargo, no existe ninguna evidencia como los reportes anteriormente descritos de la regulación transcripcional mediada por miRNAs que demuestre cómo miR-138 podría estar regulando el promotor de MDR1.

#### **7. miR-138 en la regulación del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos.**

Se ha descrito que miR-138 actúa como un supresor de tumores, al bloquear la transición del ciclo celular en carcinoma hepatocelular (HCC) por la degradación de ciclina D3 (CCND3) [50]. También se ha observado su participación en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), la transfección ectópica de miR-138 en distintas líneas celulares de HNSCC suprime la invasión celular, deteniendo el ciclo celular e induciendo apoptosis. En conjunto estos reportes sugieren que miR-138 juega un papel en la mediación de algunas de las funciones fisiológicas y patológicas del tumor [51]. El primer reporte en examinar el papel de miR-138 en la modulación del MDR en leucemia, fue el descrito por Zhao *et al.*, un reporte más reciente donde miR-138 se asocia al fenotipo de MDR, es el descrito por Yi Gao *et al.*, donde identifican nuevos miRNAs implicados en la resistencia a gefitinib. Al generar una línea celular resistente a gefitinib, PC9GR, se identificaron varios miRNAs que son expresados de manera aberrante en estas

células en comparación con las células PC9 (WT). Uno de los miRNAs regulado a la baja fue el miR-138-5p. Estudios funcionales demostraron que la sobre-expresión de miR-138-5p sensibiliza a las células PC9GR y las células H1975 (otra línea celular resistente a gefitinib). Este efecto puede ser imitado por la supresión del receptor acoplado a la proteína G 124 (GPR124), que está dirigido directamente por miR-138-5p [52]. Lo cual sugiere que miR-138 es una pieza clave en la regulación del fenotipo de multirresistencia a fármacos.

## **8. La regulación post-transcripcional de MDR1.**

La regulación post-transcripcional de MDR1 por los miRNAs puede ser por dos vías distintas: una regulación directa, en donde el miRNA se une al 3'-UTR del mRNA de MDR1 y de una manera indirecta, donde no necesariamente se une al 3'-UTR del mRNA de MDR1, pero su función se ejerce sobre otros mRNA que actúan como intermediarios en su regulación [53].

Ejemplos de miRNAs que regulan directamente a MDR1:

Kovalchuk *et al.*, demostró que miR-451 regula la expresión de MDR1 a través de un sitio de unión único situado en los nucleótidos 4742-4763 dentro del 3'-UTR del mensajero de MDR1. El experimento se realizó con la línea celular MCF-7 resistente a la doxorubicina, donde la región 3'-UTR de MDR1 se clonó en un vector acoplado a luciferasa observando que la expresión disminuía cuando miR-451 se sobre-expresaba. En contraste, los niveles de luciferasa se restauraron

cuando se utilizó un antagómiro de miR-451, lo que sugiere la regulación directa a través del sitio de unión en el 3'-UTR del mensajero de MDR1 [54].

En un estudio de Feng *et al.*, en células K562 de leucemia resistentes a la doxorubicina, se encontró que MDR1 es regulado a través de un sitio putativo de unión a miR-331-5p. Sus resultados mostraron que en presencia del RNA sintético de miR-331-5p, la expresión de luciferasa disminuye ~40% en comparación con el control negativo. Este estudio demostró la regulación en el 3'-UTR del mensajero de MDR1 por miR-331-5p, que ilustra de nuevo la regulación canónica por miRNAs [55].

Ejemplos de miRNAs que regulan indirectamente a MDR1:

Bourguignon *et al.*, observó que en presencia de ácido hialurónico (HA) los niveles de miR-21 aumentan a través de la fosforilación de Nanog, induciendo una disminución de la proteína de muerte celular programada 4 (PDCD4), esto tiene como consecuencia la liberación de eIF4A [34]. Como ya se ha descrito PDCD4 actúa como un supresor de tumor inhibiendo el proceso traduccional como resultado del secuestro directo de eIF4A [56], su liberación mediada por miR-21 induce un aumento en la tasa de traducción de diversos transcritos incluyendo MDR1 [34].

Hofmann *et al.*, demostraron que miR-125b tiene un efecto de represión traduccional en la proteína de c-Raf, sin modificar los niveles del mRNA [57]. Por otra parte se describió que la activación del promotor MDR1 ocurre a través de

una vía de señalización que involucra a c-Raf, lo cual sugiere que la expresión de MDR1 está afectada indirectamente por miR-125b como resultado de los cambios en los niveles de la proteína c-Raf [53].

### **9. La regulación de MDR1 por miR-138.**

Como se mencionó reportes previos han descrito que la regulación transcripcional mediada por los miRNAs, se ha determinado mediante el análisis de las regiones promotoras en busca de posibles sitios de unión a miRNAs. Por lo que en nuestro grupo de trabajo se realizó un ensayo *in-silico*, mediante el software microPIR [58], para determinar si la región promotora de MDR1 tiene sitios de unión para miR-138. Al respecto, se observó que MDR1 no posee ningún sitio de unión para miR-138, sugiriendo que la regulación puede ser a través de una regulación indirecta, que involucra la modulación post-transcripcional de proteínas que puedan regular el promotor de MDR1 (Anexo 1).

Aunado a esto, el grupo de Gong H. demostró que la regulación a la baja de miR-138 induce una actividad sostenida de NF- $\kappa$ B (p65) y una progresión del tumor en el carcinoma esofágico de células escamosas, al regular negativamente la expresión de las proteínas FLOT-1, FLOT-2 y Caveolina 1, las cuales son necesarias para la formación de las balsas lipídicas y el reclutamiento del receptor de TNF- $\alpha$  (TNFR) [59]. Estos datos muestran que miR-138 tiene un papel clave en la regulación NF- $\kappa$ B.

De acuerdo a dichos antecedentes miR-138 podría estar regulando al promotor de *MDR1* de una manera indirecta al regular de manera directa al mensajero de NF- $\kappa$ B, ya que se ha descrito su participación en el desarrollo del fenotipo MDR al regular positivamente al promotor de *MDR1* [60].

Sin embargo, aún no existen reportes de una regulación directa de miR-138 sobre el mensajero de NF- $\kappa$ B (p65). Interesantemente, mediante un análisis *in-silico*, se encontró que el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65), presenta un sitio de unión para miR-138, por lo que resulta razonable pensar, que miR-138 podría estar participando en la regulación post-transcripcional de NF- $\kappa$ B (p65) de manera directa, una regulación que hasta el momento no ha sido reportada y que podría explicar la regulación ejercida sobre *MDR1*, previamente reportada por Zhao *et al.*



#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El fenotipo de multirresistencia a drogas es la causa principal de falla en la quimioterapia, comúnmente a causa de la sobre-expresión de la glicoproteína MDR1. Se sabe que NF- $\kappa$ B (p65) participa en la regulación de MDR1 en células leucémicas RS4;11 posterior al tratamiento por doxorubicina. Mediante un análisis *in silico*, empleando algoritmos de microRNA.org y Target Scan Human se determinó que 3'-UTR del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65) presenta un sitio de unión a miR-138. Sin embargo, no existen reportes donde se sugiera: 1) Si existe una regulación directa de miR-138, sobre el mRNA del factor transcripcional NF- $\kappa$ B (p65) y por ende un efecto sobre los niveles de expresión y 2) Si esta regulación post-transcripcional, está involucrada en el desarrollo del fenotipo de multirresistencia a fármacos. Lo anterior, permitirá conocer un nuevo mecanismo de regulación pos-transcripcional, a través de la modulación de NF- $\kappa$ B (p65) por miR-138 y poder demostrar más adelante, si dicho mecanismo puede explicar tal fenómeno de resistencia a múltiples fármacos.

#### **V. HIPÓTESIS**

Si el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) posee al menos un sitio de unión para miR-138, entonces existirá una regulación directa de miR-138 sobre la expresión de p65 y un efecto indirecto sobre la expresión de MDR1.

## **VI. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la regulación post-transcripcional de NF- $\kappa$ B (p65) mediada por miR-138, en las líneas celulares T98 y AD-293.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Determinar el nivel de expresión de miR-138 y NF- $\kappa$ B (p65) en las líneas celulares T98 y AD-293.
2. Amplificar y clonar la región 3'-UTR del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65), en el vector psiCHECK-2, así como generar un vector de expresión para miR-138.
3. Evaluar la interacción de miR-138 sobre el 3'-UTR del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65), mediante ensayos reporteros de luciferasa.
4. Mutar el sitio de unión de miR-138 sobre el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) y evaluar nuevamente la actividad post-transcripcional.
5. Evaluar el efecto de la sobre-expresión de miR-138, sobre la disminución del transcrito y de la proteína de p65.
6. Inhibir la función de miR-138 mediante un antagoniro comercial y evaluar el efecto sobre NF- $\kappa$ B (p65).

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### **Modelo celular.**

La línea celular AD-293 es un derivado de la línea celular HEK293 comúnmente utilizado, con la mejora de la adherencia celular y con propiedades de formación de monocapas. Las células HEK293 son células de riñón embrionario humano transformadas por compartir el DNA del adenovirus tipo 5 [61]. Fueron cultivadas en medio RPMI con 3 % de SFB mas antibiótico, a 37° C y con 5 % de CO<sub>2</sub>.

La línea celular T98 son células iniciadoras de glioma por lo cual presenta una alta expresión de miR-138, ya que funciona como un oncógeno. Fueron cultivadas en medio DMEM con 5 % de SFB mas antibiótico, a 37° C y con 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **Expresión de miR-138.**

Los niveles relativos de expresión de miR-138 en las células AD-293 y T98 se determinaron por RT-qPCR. El RNA total se extrajo con el kit comercial “SV Total RNA Isolation System” (Promega), posteriormente para la obtención de cDNA se tomaron 300 ng del RNA total y se realizó la transcripción inversa de microRNAs mediante “TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)”, todo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados para la retro transcripción fueron: 5'-GCG ACT GTT CCT CTC GCA ACG GCC TG-3' para miR-138-RT y 5'-GCG ACT GTT CCT CTC TTC CTC TGT GT-3' para U6-RT (Integrated DNA Technologies) todo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el cDNA se realizó una dilución 1:100 en H<sub>2</sub>O LN y de esta dilución se tomaron 1.33 µl para la reacción de PCR en tiempo real, utilizando el sistema “Taqman Universal Master Mix II (Applied Biosystems)” como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Reacción de RT-qPCR para miR-138 y U6.

Reactivo	Una reacción	Tres reacciones y control
Master mix II	10µl	40µl
miR-138 sense 5'-CGAGCTGGTGGTTGTGAAT-3'	2.5µl	10µl
miR-antisense (universal) 5'-GACTGTTCTCTCTTCCTC-3' U6-sense 5'-CGGAAGGATGACACGCAA-3'	2.5µl	10µl
cDNA	1.33µl	4µl
Sonda Taq Man	5µl	20µl
H2O LN	3.67µl	14.68µl
Volumen final	25µl	100µl

Los parámetros del PCR fueron los siguientes: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos, 40 ciclos de 95° C por 15 segundos y 60° por 1 minuto, por ultimo 25° C por 10 minutos, mediante el uso el termociclador Mx3000P qPCR System

La expresión relativa de miR-138 se calculó utilizando el CT que es definido como el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral y mediante la fórmula  $2^{-\Delta CT}$  donde  $\Delta CT = (CT \text{ gen de interés} - CT \text{ gen control})$ . Como control interno se utilizó U6, un RNA pequeño nuclear (snRNA), el cual se destaca por su alto nivel de conservación y además de que nuestros distintos tratamientos no modifican la expresión de U6 lo cual lo convierte en un buen control endógeno [62]. Una vez obtenidos los valores de cambio en la expresión se realizó el análisis estadístico mediante el programa Graphpad prism.

## Expresión del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65).

La expresión relativa del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65) en las células AD-293 y T98 se determinaron por RT-qPCR. El RNA total se extrajo como se menciono anteriormente, posteriormente para la obtención de cDNA se tomó 300 ng del RNA total y se realizó transcripción inversa mediante “SuperScript” II Reverse Transcriptase” (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el cDNA se procedió a realizar el PCR en tiempo real, utilizando el sistema comercial “Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG” (Invitrogen) como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Reacción del RT-qPCR para NF- $\kappa$ B (p65) y  $\beta$ -Actina (control endógeno).

Reactivo	Reacción problema (Vol. Final por reacción 25 $\mu$ l)	Reacción control (Vol. Final por reacción 25 $\mu$ l)
Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG	37.5 $\mu$ l	-
Fw-101-p65-RT (10 $\mu$ M) 5'-TAGGAAAGGACTGCCGGGAT-3'	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
B-actina-F (10 $\mu$ M) 5'-ACACCCCAGCCATGTACGTT-3'		
P65-101-Rev-RT (10 $\mu$ M) 5'-CCGCTTCTTCACACACTGGA-3'	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
B-actina-Rev (10 $\mu$ M) 5'-TCACCGGAGTCCATCACGAT-3'		
cDNA	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l
H2O LN	28.5 $\mu$ l	66 $\mu$ l
Volumen final	75 $\mu$ l	75 $\mu$ l
Los parámetros del PCR fueron los siguientes: 50° C por 2 minutos, 95° C por 2 minutos, 40 ciclos de 95° C por 15 segundos y 60° por 30 segundos, por ultimo 25° C por 10 minutos mediante el uso del termociclador “Mx3000P qPCR		

La expresión relativa de NF- $\kappa$ B se calculó utilizando la misma fórmula que para miR-138,  $2^{-\Delta CT}$ . Como gene control interno para normalizar los datos se utilizó  $\beta$ -Actina. El análisis estadístico se realizó con el programa Graphpad prism.

### Amplificación de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65).

La región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) se amplificó mediante PCR punto final, a partir de DNA genómico de individuos sanos, el cual fue extraído con el uso de kit "QIAamp DNA Blood Midi Kit" (Quiagen). Para la PCR se usó el kit "One Taq<sup>TM</sup> Hot Start Quick-load" (New England Biolabs) y se amplificó una región de 803pb como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Reacción de amplificación de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65).

Reactivos	Reacción 1	Reacción control
One Taq Hot Start	12.5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l
RelA-XhoI-3'-UTR (10mM) 5'-CTCGAGGCTGAGTCAGATCAGCTCCTAAG-3' XhoI Tm= 62.5°C 29nts	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
NotI-3'-UTR-RelA (10mM) 5'- GCGGCCGCCTAGCCAGCTTGGCAACAG-3' NotI Tm=70.9°C 27nts	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
Templado de DNA	2.8 $\mu$ l	-
H <sub>2</sub> O LN	8.7 $\mu$ l	11.5 $\mu$ l
Volumen final	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94° C por 30 segundos, 30 ciclos de desnaturalización 94° C por 30 segundos, alineamiento 65° C por 60 segundos, extensión a 68° C por 1 minuto y por último la extensión final a 68° C por 1 minuto.		

El amplicón de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 11).

En la figura 2, se observa la secuencia de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) y el sitio de unión para miR-138 (verde), los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron RelA-*Xho*I-3'-UTR (azul) y *Not*I-3'-UTR-RelA (rojo) todo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65).

Numero de acceso: NM\_021975.3

Descripción: v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (RELA), transcript variant 1, mRNA

Cromosoma: 11

Localización en el genoma: 65655000-65653596

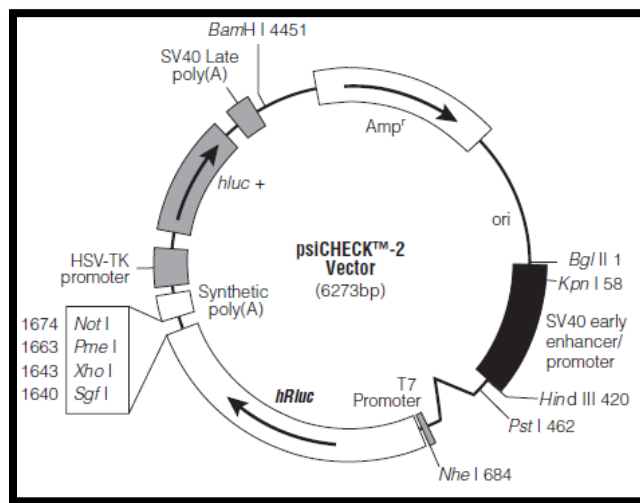
```
TCTGAGTCAGATCAGCTCCTAAGGGGGTGACGCCTGCCCTCCCCAGAGCACTGGGTTGCAGGGGATTGAA
GCCCTCCAAAAGCACTTACGGATTCTGGTGGGGTGTGTTCCAAGTCCCCCAACTTTGTGGATGTCTTCCTT
GGAGGGGGGAGCCATATTTTATTCTTTTATTGTCAGTATCTGTATCTCTCTCTCTTTTGGAGGTGCTTAAGC
AGAAGCATTAACTTCTCTGGAAAGGGGGGAGCTGGGGAAACTCAAACTTTTCCCCTGTCCTGATGGTCAGC
TCCCTTCTCTGTAGGGAAGTCTGGGGTCCCCATCCCCATCCTCCAGCTTCTGGTACTCTCCTAGAGACAGAA
GCAGGCTGGAGGTAAGGCCTTTGAGCCCACAAAGCCTTATCAAGTGTCTCCATCATGGATTACATTACAGCT
TAATCAAATAACGCCCCAGATACCAGCCCCTGTATGGCACTGGCATTGTCCCTGTGCCTAACACCAGCGTT
TGAGGGGCTGGCCTTCTGCCCTACAGAGGTCTCTGCCGGCTTTTCTTGCTCAACCATGGCTGAAGGAAA
CCAGTGCAACAGCACTGGCTCTCTCCAGGATCCAGAAGGGGTTTGGTCTGGGACTTCTTGCTCTCCCTCTT
CTCAAGTGCCTTAATAGTAGGGTAAGTTGTTAAGAGTGGGGGAGAGCAGGCTGGCAGCTCTCCAGTCAGG
AGGCATAGTTTTTACTGAACAATCAAAGCACTTGGACTCTTGCTCTTCTACTCTGAACTAATAAATCTGTTG
CCAAGCTGGCTAG
```

**Figura 2. Región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65).** Se observa la secuencia del 3'-UTR de NF- $\kappa$ B, los primers utilizados para la amplificación y el sitio de unión a miR-138, además de la localización en el genoma y la longitud.

### Ligación de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) en el vector psiCHECK<sup>TM</sup>-2.

Para proceder a la ligación de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) en el vector psiCHECK<sup>TM</sup>-2 (Promega) (Figura 3), este fue digerido con las enzimas *Xho*I/*Not*I para linearizar el vector, por 3 horas a 37°C y posteriormente se procedió a purificar. Una vez purificado se procedió a la ligación por medio de la enzima T4 DNA ligasa como se describirá posteriormente (Tabla 8).

El ADN plasmídico fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) y analizado después de la linearizarlo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, para determinar que tuvieran el inserto, primeramente se linearizaron por medio de una enzima que solo tuviera un sitio de escisión, tanto el plásmido psiCHECK™-2 vacío como el plásmido ya con el inserto que fue purificado y por medio del tamaño se determinó si poseía el inserto.



**Figura 3. Mapa del vector psiCHECK™-2.** La región 3'-UTR de NF-κB (p65) se clona en la rúa abajo del gen de luciferasa en la región múltiple de clonación (1636–1680) mediante los sitios XhoI/NotI. Promotor/potenciador temprano de SV40 (7-425), intrón quimérico (489-621), promotor de la RNA polimerasa T7 (666-684), gen sintético de *Renilla* luciferasa (*hRLuc*) (694-1629), poly A sintética (1688-1736), promotor HSV-TK (1744-2496), gen sintético de *Luciferasa* luciferasa (*hLuc+*) (2532-4184), poly A tardío de SV40 (4219-4440) y región codificante para β-lactamasa (*Amp<sup>r</sup>*) (4587-5447).

### Secuenciación de la región 3'-UTR de NF-κB (p65).

La reacción de secuenciación se realizó mediante el kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems), como se muestra en la tabla 4.



**Tabla 4.** Reacción de secuenciación de la región 3'-UTR de NF-κB (p65).

Reactivos	Reacción F	Reacción R
DNA	400 ng	400 ng
oligonucleótidos	3'-UTR de NF-κB (p65)-F 5'-CTCGAGGCTGAGTCAGATCAGCTCCTAAG-3' 10 pg	3'-UTR de NF-κB (p65)-R 5'-GCGGCCCGCCTAGCCAGCTTGGCAACAG-3' 10 pg
Buffer 5x	2 µl	2 µl
Big Dye v 3.1	2.5µl	2.5µl
Vol. final	20 µl	20 µl
Los parámetros del PCR fueron los siguientes: 96° C por 1 minuto, 25 ciclos de 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos, 60° por 4 minutos y mantener a 4° C.		

Posteriormente esta reacción se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml para la precipitación con EDTA-ETOH para la limpieza de las reacciones de secuenciación. Brevemente se agregó 5µl de EDTA 125 nM a pH 8 y 60 µl de ETOH absoluto, se mezcló y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a máxima velocidad por 20 minutos, se removió el sobrenadante, eliminando todo el líquido posible y se lavó con 250µl de ETOH al 70 %, invirtiendo los tubos. Posteriormente, se centrifugaron las reacciones a máxima velocidad por 5 minutos y se retiró el sobrenadante y se realizó otro lavado con ETOH al 70 %. Por último se retiró todo el sobrenadante y se dejó secar completamente la reacción por 15 minutos. La reacción de secuenciación fue sometida a un secuenciador automático ABI Prism 3200 (AppliedBiosystems).

## Eliminación del sitio de unión para miR-138 sobre el 3'-UTR de NF-κB (p65).

Con la finalidad de eliminar el sitio de unión de miR-138 en el 3'-UTR de NF-κB (p65), se diseñaron oligonucleótidos mediante la herramienta "QuikChange Primer Design" (Agilent Technologies), de acuerdo a las instrucciones del fabricante como se muestra en la figura 4.

Primer sequences:				
Primer Name	Primer Sequence (5' to 3')			
del470-478	5'-attgtccctgtgcctgtttaggggctggc-3'			
del470-478-antisense	5'-gccagccctcaaacaggcacaggacaat-3'			
Oligonucleotide information:				
Primer Name	Length (nt.)	Tm	Duplex Energy at 68 °C	Energy Cost of Mismatches
del470-478	30	80.27°C	-38.47 kcal/mole	36.21%
del470-478-antisense	30	80.27°C	-43.81 kcal/mole	31.22%
Primer-template duplexes:				
Primer Name	Primer-Template Duplex			
del470-478	5' - attgtccctgtgcct-----gtttgaggggctggc-3'			
	ccgtaacaggacacggattgtggtcgcaaaactccccgacggaa			
	ggcattgtccctgtgcctaacaccagcgttttgaggggctggcctt			
del470-478-antisense				
	3' - taacaggacacgga-----caaaactccccgacgg-5'			

**Figura 4. Secuencia de oligonucleótidos para eliminar el sitio de unión a miR-138 en el 3'-UTR de NF-κB (p65).** Los oligonucleótidos se diseñaron de acuerdo a las especificaciones del programa, se eliminaron 8 nucleótidos correspondientes a la secuencia "semilla" de miR-138 sobre la región 3'-UTR de NF-κB (p65).

Posteriormente se realizó la eliminación del sitio de unión mediante el kit "QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies)" como se muestra en la tabla 5, esta técnica primeramente sintetiza la cadena mutante realizando un PCR, primero se desnaturaliza el DNA plantilla en este caso nuestro plásmido con el inserto. Posteriormente con los oligonucleótidos diseñados que contienen la eliminación del sitio de unión a miR-138 se alinean y se extienden por medio de la enzima pfU Ultra DNA polimerasa.

**Tabla 5.** Reacción para la eliminación del sitio de unión a miR-138 en la región 3'-UTR de NF-κB (p65).

Reactivo	Reacción
Buffer de reacción	5µl
Templado de ADN (10ng)	5µl
Primer Sense-Del470/478-RelA 5'-ATTGTCCCTGTGCCTGTTGAGGGGCTGGC-3' Tm=68.7° C                      30 nts	0.8µl
Primer Del470/478 RelA As 5'-GCCAGCCCTCAAACAGGCACAGGGACAAT-3' Tm=68.7° C                      30 nts	1.01µl
dNTPs	1µl
Quick solution	3µl
H <sub>2</sub> O LN	34.14µl
Volumen final	50µl
Las condiciones de amplificación fueron los siguientes: 95° C por 1 minuto, 18 ciclos de 95° C por 50 segundos, 60° C por 50 segundos, 68° por 7 minutos y por ultimo 68° C por 7 minutos. A continuación la reacción se colocó en hielo.	

Una vez mezclados todos los reactivos se agregó por último 1µl de pfU polimerasa HF DNA y se mezcló adecuadamente. Posteriormente al terminar la reacción de PCR se agregó 1µl de la enzima de restricción *DpnI* la cual realiza la digestión del DNA parental metilado y hemimetilado, se mezcló suavemente y se incubó a 37° C durante 1 hora. Se realizó la transformación en bacterias DH5α XL20 Gold después de la incubación, mediante choque térmico a 42 °C. Las transformantes se plaquearon en platos con agar Luria-Bertani (LB), con ampicilina 100 µg/ml. Una vez obtenidas las colonias se seleccionaron 2 para purificar el ADN plasmídico por el sistema comercial "PureYield TM plasmid midiprep system" (Promega), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN plasmídico

fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific) y analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

Después del análisis del ADN plasmídico se realizó la reacción de secuenciación como ya se describió anteriormente y solamente usando el primer antisentido para verificar que el sitio de unión a miR-138 fue eliminado y que la secuencia de nucleótidos no tuviera cambio alguno.

### **Amplificación de la secuencia precursora de miR-138.**

La región precursora de miR-138 se amplificó mediante PCR punto final, a partir de DNA genómico de un individuo sano, el cual se obtuvo previo consentimiento informado. El DNA fue extraído mediante “QIAamp DNA Blood Midi Kit” (Quiagen) y mediante el uso del sistema “Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” (Thermo Scientific) como se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6.** Reacción de PCR punto final para amplificar al precursor de miR-138.

Reactivos	Reacción 1	Reacción control
H <sub>2</sub> O LN	29.2µl	33.5µl
5x phusion HF Buffer	10µl	10µl
10mM dNTPs	1µl	1µl
miR-138-2-F (10mM) 5'- <b>GGATCCGGAAGGTGTTGTATGGGTTCC</b> -3' <b>BamHI</b> Tm= 63.2 °C 26nts	2.5µl	2.5µl
miR-138-2-R (10mM) 5'- <b>GAATTCGCTTTCACACACAGACTCCCAC</b> -3' <b>EcoRI</b> Tm=63.7 °C 28nts	2.5µl	2.5µl
AND genómico (100ng)	4.3µl	-
Phusion AND polimerasa	0.5µl	0.5µl
Volumen final	50µl	50µl
Los parámetros del PCR fueron los siguientes: desnaturalización inicial 98° C por 30 segundos, 30 ciclos de desnaturalización 98° C por 10 segundos, alineamiento 67.5° C por 30 segundos, extensión 72° por 30 segundos y por último la extensión final a 72° C por 30 segundos.		

El amplicón del precursor de miR-138 se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 16).

La región obtenida fue un fragmento de 255pb (Figura 5), de las cuales 84 pb corresponden al precursor de miR-138 color morado. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron miR-138-F (azul) y miR-138-R (rojo) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Figura 5).

El vector plvx-shRNA 2 posee un promotor pol III y debido a que los miRNAs son transcritos por pol II, se tomaron 171 pb extras para poder mimetizar a un tRNA que tiene una estructura similar y es transcrito por los promotores pol III.

## Hsa-miR-138-2

Numero de acceso: MI0000455

Descripción: Homo sapiens miR-138-2 tallo-bucle

Tipo: intergénico

Cromosoma: 16

Localización en el genoma 56892430-56892513 [+]

Longitud del precursor: 84 nt

```
CCCCATGAACATCAAGTCTGTGAGCCCCTGTGGGCAGGGACCCAGATTCCACCATATGCACCCCTGAGCCC  
TGGTGCCATACTGGCCTGGGGGAGCCATTGGTTGGGGAAGGTGTTGTATGGGTTTCATCACTGTCTCAAAC  
CGGAGGAGCCACAGCCCAGAGGAGGAAGCCGGCGGAGTTCTGGTATCGTTGCTGCAGCTGGTGTGTGA  
ATCAGGCCGACGAGCAGCGCATCCTCTTACCCGGCTATTTACGACACCAGGGTTGCATCATACCCATCCT  
CTCCAGGCGAGCCTCGTGGGACCGGGCCGGACGCAAGGACCTGGGGATGGGGTTGGGGTGGGAGTCTGT  
GTGTGAAAGC
```

**Figura 5. Precursor de miR-138.** Se observa la secuencia y los primers utilizados para la amplificación, además de la localización en el genoma y la longitud del precursor de miR-138 humano.

### Ligación del precursor de miR-138 en el vector pGEM T-Easy.

Para proceder con la ligación de miR-138 en el vector intermediario pGEM T-Easy (Promega) (Figura 6) fue necesario adicionar un tracto de adeninas a cada extremo del amplicon y de esta forma pudiera ligarse al vector pLVX-shRNA-2, debido a que la polimerasa utilizada para amplificar a miR-138 (*Pfu* DNA Polymerase), genera extremos romos. Primeramente se purificó la reacción de PCR con “PureLink PCR purification kit” (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente a la purificación se realizó una reacción de PCR con la enzima “Taq ADN polimerasa” (Invitrogen) como se muestra en la tabla 7, para la adición de las adeninas.

**Tabla 7.** Reacción para la adición de la cola de poly A.

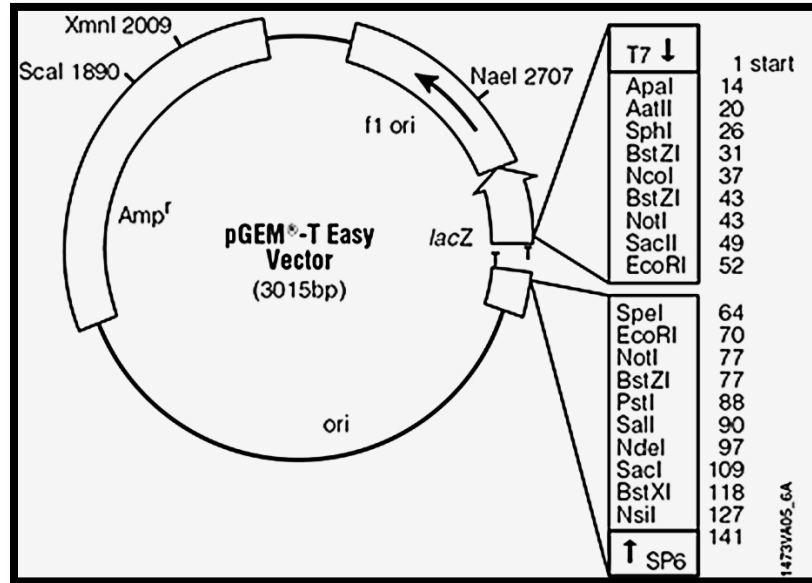
<b>Buffer 10x</b>	<b>5µl</b>
<b>DNA que se obtuvo de la PCR</b>	39.5 µl
<b>Taq DNA polymerasa</b>	0.5 µl
<b>Volumen final</b>	50µl

Se incubó por 20 minutos a 72°C y se procedió a purificar la banda del gel mediante el kit “PureLink™ Quick Gel Extraction” (Invitrogen). Una vez purificado se procedió a ligarlos por medio de la reacción en la tabla 8.

**Tabla 8.** Reacción de ligación del precursor de miR-138 en el vector pGEM-T Easy.

<b>Buffer de ligación 2X</b>	<b>5µl</b>
<b>pGEM-T Easy vector (Promega) (50ng)</b>	1µl
<b>Producto de PCR purificado</b>	5µl
<b>Ligasa T4 (New England Biolabs) (3u/µl)</b>	1µl
<b>Volumen total de reacción</b>	12µl

Posteriormente la reacción se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 hora, y transcurrido ese tiempo se dejó a 4°C por 16 horas.



**Figura 6. Mapa del vector pGEM-T Easy.** La región precursora de miR-138 se clonó en el vector intermediario pGEM-T Easy para facilitar la sub-clonación en el vector pLVx-shRNA2. T7 sitio de inicio de la transcripción de la RNA polimerasa (1), promotor de la RNA polimerasa SP6 (-17 a +3) (139-158), sitio de inicio de la transcripción de la RNA polimerasa SP6 (141), sitio de unión del oligonucleótido de secuenciación inverso pUC/M13 (176-197), codón de inicio *lacZ* (180), operador *lac* (200-216), región codificante de  $\beta$ -lactamasa (1337-2197), región f1 del fago (2380-2835), secuencias del operón *lac* (2836-1996, 166-395), sitio de unión del oligonucleótido de secuenciación sentido pUC/M13 (2949-2972) y promotor de la RNA polimerasa T7 (-17 a +3) (2999-9).

Posterior a la incubación se procedió a la transformación de las bacterias DH5 $\alpha$ , mediante choque térmico a 42 °C. Las transformantes se plaquearon en platos con agar Luria-Bertani (LB), con ampicilina 100  $\mu$ g/ml. Al momento de utilizar las placas se adicionó 100  $\mu$ l (100mM) de isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido (IPTG) y 20 $\mu$ l (50mg/ml) de 5-bromo-4-clo-ro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (XGAL), se incubaron a 37 °C durante 16 h. Después de este tiempo, se seleccionaron 3 colonias blancas debido a que mediante el uso de vectores como pGEM-T estas contienen el inserto, posteriormente se purificó el ADN plasmídico por el sistema comercial



“PureYield™ plasmid midiprep system” (Promega), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN plasmídico fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific) y analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, como ya se describió anteriormente.

### **Ligación del precursor de miR-138 en el vector pLVx-shRNA2.**

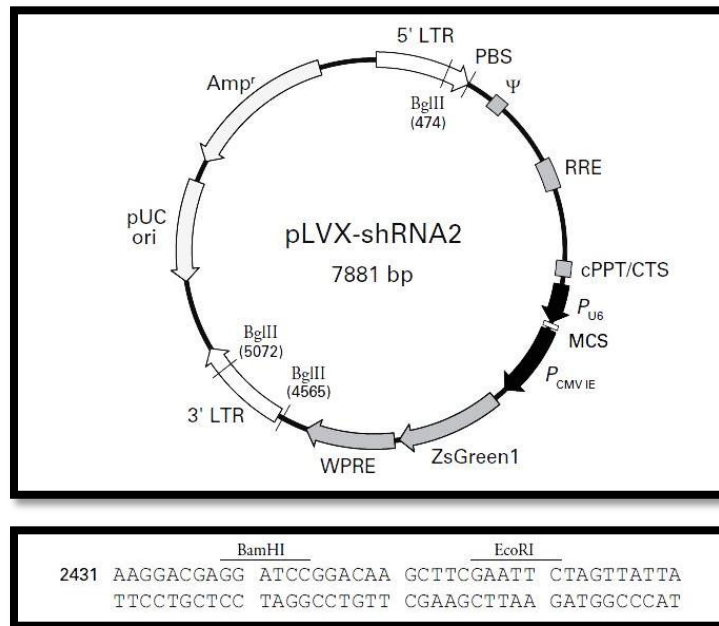
Para proceder con la ligación del precursor de miR-138 en el vector pLVx-shRNA2 (Clontech) (Figura 7), se realizó restricción con las enzimas *BamHI/EcoRI* para poder liberar el fragmento que contiene el precursor de miR-138 del vector intermediario de igual manera se realizó la restricción del vector pLVx-shRNA 2. Para ello se dejó incubando el vector pGEM-T Easy con el precursor de miR-138 que fue clonado, por 3 horas a 37°C y posteriormente se procedió a purificar. Una vez purificado el precursor de miR-138 se procedió a ligarlo en el vector pLVx-shRNA 2 de 7.8kb (Clontech) y por medio de la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs), como se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9.** Reacción de ligación del precursor de miR-138 en el vector pLVx-shRNA2.

DNA plasmídico	10µl
pLVx-shRNA2 7.8kb (Clontech)	2µl
Buffer 10x	1.5µl
T4 DNA ligasa (New England Biolabs) (3u/µl)	1µl
H <sub>2</sub> O	0.5µl
Total	15µl

Se dejó incubando 16 horas a temperatura ambiente, posteriormente se colocó 1 hora a 37°C y se realizó la transformación en bacterias DH5α, mediante choque

térmico a 42 °C. Las transformantes se plaquearon en platos con agar Luria-Bertani (LB), con ampicilina 100 µg/ml. Una vez obtenidas las colonias se seleccionaron 2 para purificar el ADN plasmídico por el sistema comercial “PureYield™ plasmid midiprep system (Promega)”, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN plasmídico fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific) y analizado después de ser linearizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % como ya se describió anteriormente.



**Figura 7. Mapa del vector pLVX-shRNA2.** La región precursora de miR-138 se clonó en la región múltiple de clonación (MSC) en los sitios *Bam*HI/*Eco*RI. Promotor U6 humano dependiente de RNA polimerasa III ( $P_{U6}$ ), proteína verde fluorescente (ZsGreen1), promotor temprano del citomegalovirus humano activo constitutivamente ( $P_{CMV IE}$ ), elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), elemento de respuesta a Rev (RRE), tracto de polipurina/elemento de secuencia de terminación central (cPPT/CTS), origen de replicación (pUC) y gen de resistencia a ampicilina para *E. coli* ( $Amp^r$ ) para la propagación y selección de bacterias.

### **Secuenciación del precursor de miR-138.**

La reacción de secuenciación se realizó mediante el kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems), como ya se describió anteriormente. La reacción de secuenciación fue sometida a un secuenciador automático ABI Prism 3200 (AppliedBiosystems).

### **Ensayos reporteros de luciferasa en células T98 y AD-293.**

Para realizar los ensayos reporteros de luciferasa se utilizaron las células T98 de glioblastoma multiforme humano (T98G [T98-G] (ATCC® CRL-1690™), que expresan endógenamente miR-138 [63] las cuales se plaquearon a una densidad de  $4.5 \times 10^4$  células por pozo, en una placa multipozos de 24. Al día siguiente se transfectaron 50ng de los plásmidos reporteros 3'-UTR silvestre (WT) y el 3'-UTR mutado (MUT), como control negativo se utilizó 10 nM de los oligonucleótidos modificados químicamente “miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Negative Controls” (Thermo Scientific).

Las células AD-293 de riñón embrionario humano (Stratagene), fueron co-transfectadas con 50ng y 2µg, respectivamente, de los plásmidos reporteros 3'-UTR silvestre (WT) más el plásmido que sobre-expresa a miR-138 (pLVX-miR-138) y el 3'-UTR mutado (MUT) más el plásmido pLVX-miR-138, ya que estas células no se ha reportado que expresen endógenamente este miRNA. Para el control de especificidad, las células AD-293 se transfectarán con 10nM de “miRIDIAN Mimic Negative Control” (Thermo Scientific), el cual está basado en

dos secuencias de miRNAs de *C. elegans*, que tiene una mínima identidad con genes humanos.

La transfección se realizó con 2µl del reactivo Turbofect (Thermo Scientific), por cada reacción, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células fueron incubadas 24h a 37 °C con la mezcla de transfección (turbofect + DNA plásmídico).

Posteriormente a la transfección, se realizó el ensayo de luciferasa mediante el kit “Steady-Glo® Luciferase Assay System” (Promega). Las células fueron lavadas con PBS y se despegaron con 200 µl de buffer de lisis pasivo 1X, durante 15 minutos en agitación. El lisado fue transferido a microtubos de 1.5 ml y centrifugados a máxima velocidad por 30 segundos. Después el lisado se transfirió a un tubo nuevo, en otro microtubo se colocaron 100 µl del reactivo LARII y después se agregó 20µl del lisado y se evaluó la actividad de la luciferasa de luciérnaga por medio del luminómetro “Glomax Multi JR Detection System” (Promega). Una vez obtenido el valor de “fyrefly” el mismo tubo con la mezcla del reactivo LARII y el lisado, se le agregó 100µl del reactivo Stop and Glo, se vortexó brevemente y se evaluó la actividad de luciferasa de renilla.

La normalización de los datos obtenidos se realizó obteniendo los promedios de tres experimentos con tres replicas cada uno del valor de renilla y de luciérnaga. Una vez obtenidos, se dividió el promedio de renilla/luciérnaga y los datos de cada muestra, se dividieron entre los datos del vector vacío psiCHECK™-2.

## **Ensayos de western blot para evaluar el cambio en la expresión de NF- $\kappa$ B (p65).**

Para realizar los ensayos de western blot se utilizaron extractos totales de proteína de las células AD-293, las cuales fueron transfectadas con miR-138, RNA horquillado scramble y miR-223 que fue utilizado como control de especificidad ya que el 3'-UTR del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65) no posee sitios de unión para este miRNA. Para ello las células cultivadas transfectadas con miR-138, scramble y miR-223 fueron cosechadas 24 horas post-transfección. Posteriormente las células fueron centrifugadas 6,000 rpm por 2 minutos, eliminado el medio de cultivo y el botón celular se lisó mediante el buffer "RIPA" (Cell signaling) más el inhibidor de proteasas recién añadido (complete mini EDTA-free-Roche). El lisado celular se incubó en hielo por 20 minutos y se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos, recuperando el sobrenadante. La determinación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford y para la realización del western blot se tomaron 20  $\mu$ g de proteína por muestra.

El lisado celular (20  $\mu$ g) se mezcló con buffer de muestra (Tris, SDS al 10%, glicerol, azul de bromofenol y H<sub>2</sub>O LN) y se incubó 5 minutos a 95°C y luego se separó en un SDS-PAGE de 7.5%. Después de separar las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF pre-tratada con metanol por 1 minuto e incubadas posteriormente con buffer de transferencia (Tris, glicina y metanol), por 15 minutos. Las membranas se bloquearon con 5% de leche seca sin grasa, en PBS que contenía 0.05% de Tween-20 (PBST), durante una hora, a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron durante una hora con el

anticuerpo para control de carga TFIIIB (C-18 sc-225 Santa cruz) a una dilución 1:100. Después, las membranas fueron lavadas 5 veces por 5 minutos con PBST. Posteriormente se incubaron las membranas por 1 hora con el anticuerpo Anti-NFκB p65 ab7970 (Abcam), a una dilución de 1:2000, a temperatura ambiente. Se realizaron los mismos lavados con PBST y después se incubó por 45 minutos con el anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit HRP (sc-2004), a una dilución 1:200 más 1µl del marcador para proteína “Precision protein™ StrepTactin-HRP Conjugate” (BioRad). A continuación, se lavaron las membranas y las proteínas se visualizaron utilizando el reactivo “Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048” (Santa Cruz) y el sistema de detección “C-DiGit® Blot Scanner” (LI-COR).

## **VIII. RESULTADOS**

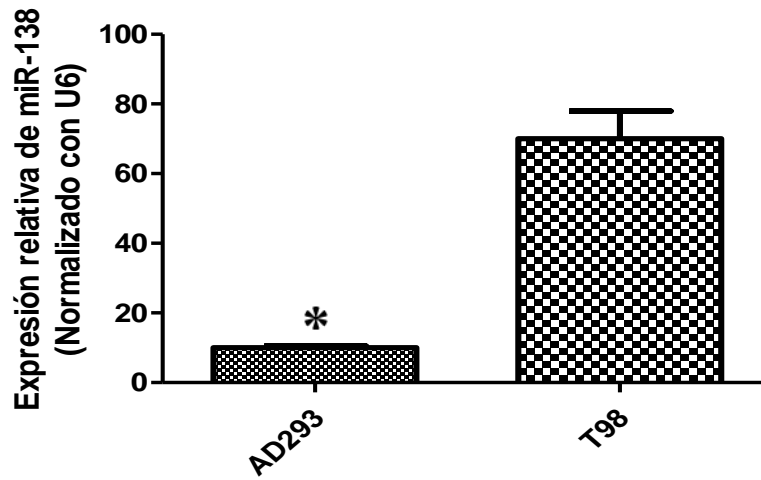
### **DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE EXPRESIÓN DE MIR-138 y NF- $\kappa$ B (p65).**

#### **1. Expresión de miR-138 en las líneas celulares T98 y AD-293.**

Debido a que la expresión de miR-138 en la línea celular AD-293 no se ha reportado, nos dimos a la tarea de evaluar su nivel de expresión por RT-qPCR. Posteriormente se comparó la expresión de miR-138 en la línea celular AD-293 con la línea T98 las cuales expresan de manera endógena miR-138 (Figura 8).

Se ha descrito que miR-138 en las células T98 promueve la gliomagénesis favoreciendo el crecimiento y la supervivencia de las células iniciadoras del tumor con el potencial de auto-renovación, por lo que se ha propuesto como un marcador pronóstico potencial en los pacientes con glioblastoma [64].

Nuestros resultados mostraron que la expresión de miR-138 en la línea celular T98 es de 6 veces más comparada con la línea celular AD-293.

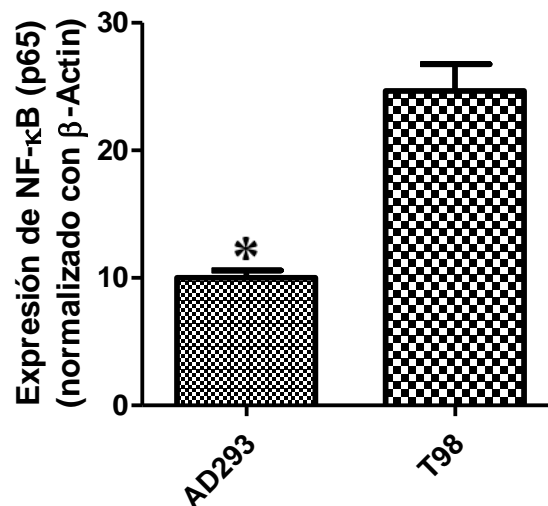


**Figura 8. Expresión de miR-138 en líneas celulares T98 y AD-293.** La expresión de miR-138 en células T98 y AD-293 se determinó por RT-qPCR mediante el sistema comercial Applied Biosystems. Se representa el resultado de tres replicas biológicas independientes después de la normalización con el control endógeno U6 (\* $p=0.0016$ ).



## 2. Expresión de NF-κB (p65) en las líneas celulares T98 y AD-293.

Para determinar si la expresión endógena de miR-138 tiene un efecto en los niveles endógenos de expresión de NF-κB en ambas líneas celulares se evaluó mediante RT-qPCR, la expresión de NF-κB. Determinando que los niveles de NF-κB (p65) en la línea celular AD-293 es de 2.5 veces más comparada con la línea celular T98 (Figura 9).



**Figura 9. Determinación de los niveles de NF-κB (p65) en la línea celular T98 y AD-293.** La expresión de NF-κB (p65) y β-actina en células T98 y AD-293 se determinó por RT-qPCR, mediante el sistema comercial SYBR Green. Se muestra los niveles de expresión en términos de porcentaje de NF-κB (p65) después de la normalización con el control endógeno β-actina, (\* $p=0.0026$ ).

## AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE VECTORES

### 3. Construcción del vector psi-3'-UTR-p65.

Para realizar la amplificación de la secuencia del 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar 803 pb de las cuales 782 pb corresponden al 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) más 21 pb del exón que se encuentra río arriba del 3'-UTR. La secuencia para el diseño de los primers fue obtenida en la base de datos NCBI (NM\_021975, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_021975.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_021975.3)), posteriormente se amplificó con la finalidad de evaluar la posible interacción de miR-138 sobre la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65).

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR se muestra en la figura 10.

A)

**Oligos usados para amplificar**

**RelA-XhoI-UTR-3'**

**5'-CTCGAGGCTGAGTCAGATCAGCTCCTAAG-3'**

Tm= 62.5°C 29nts

**NotI-UTR-3'-RelA**

**5'-GCGGCCGCCTAGCCAGCTTGCAACAG-3'**

Tm=70.9°C 27nts

**5'-TCT GAG TCA GAT CAG CTC CTA AG** GGG TGA CGC CTG CCC TCC CCA GAG

CAC TGG GTT GCA GGG GAT TGA AGC CCT CCA AAA GCA CTT ACG GAT TCT GGT GGG GTG TGT  
TCC AAC TGC CCC CAA CTT TGT GGA TGT CTT CCT TGG AGG GGG GAG CCA TAT TTT ATT CTT  
TTA TTG TCA GTA TCT GTA TCT CTC TCT CTT TTT GGA GGT GCT TAA GCA GAA GCA TTA ACT  
TCT CTG GAA AGG GGG GAG CTG GGG AAA CTC AAA CTT TTC CCC TGT CCT GAT GGT CAG CTC  
CCT TCT CTG TAG GGA ACT CTG GGG TCC CCC ATC CCC ATC CTC CAG CTT CTG GTA CTC TCC  
TAG AGA CAG AAG CAG GCT GGA GGT AAG GCC TTT GAG CCC ACA AAG CCT TAT CAA GTG TCT  
TCC ATC ATG GAT TCA TTA CAG CTT AAT CAA AAT AAC GCC CCA GAT ACC AGC CCC TGT ATG  
GCA CTG GCA TTG TCC CTG TGC CTA **ACA CCA GGG** TTT GAG GGG CTG GCC TTC CTG CCC  
TAC AGA GGT CTC TGC CGG CTC TTT CCT TGC TCA ACC ATG GCT GAA GGA AAC CAG TGC AAC  
AGC ACT GGC TCT CTC CAG GAT CCA GAA GGG GTT TGG TCT GGG ACT TCC TTG CTC TCC CTC  
TTC TCA AGT GCC TTA ATA GTA GGG TAA GTTG TTA AGA GTG GGG GAG AGC AGG CTG GCA  
GCT CTC CAG TCA GGA GGC ATA GTT TTT ACT GAA CAA TCA AAG CAC TTG GAC TCT TGC TCT  
TTC TAC TCT GAA CTA ATA AAT **CTG TTG CCA AGC TGG CTA G-3'**

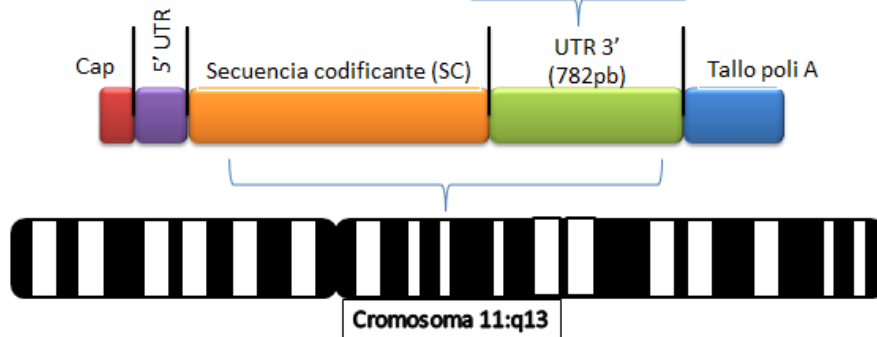
**Sitio blanco de miR-138**

**hsa-miR-138/RELA Alignment**

```
3' gccGGACUAAGUGUUGGUCGa 5' hsa-miR-138
      ||||| | | :|||
458:5' gucCCUG-UGCCUAACACCAGCg 3' RELA
```

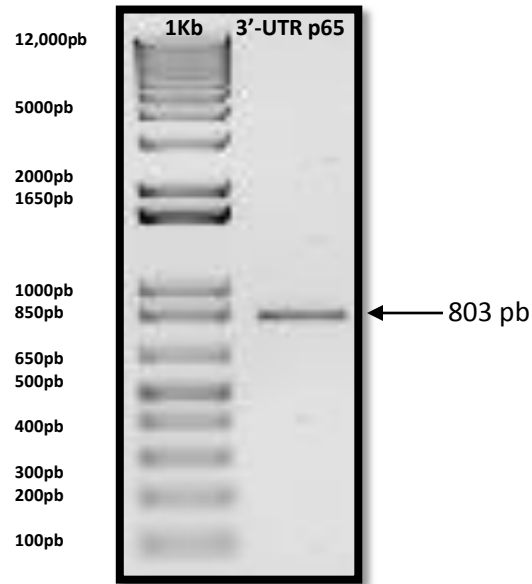
Se amplificaron 803 pb

B)



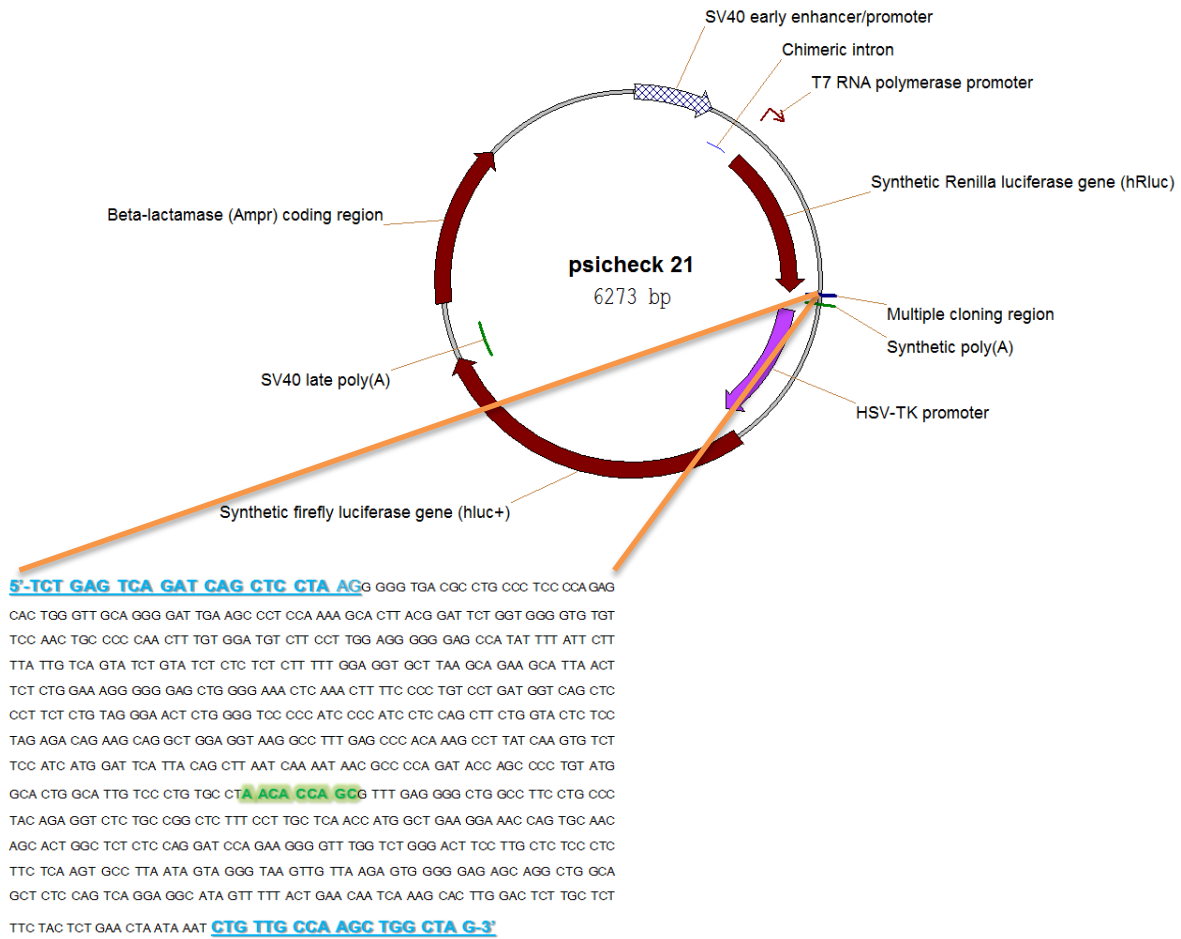
**Figura 10. Representación esquemática del 3'-UTR de NF-κB (p65).** A) Secuencia correspondiente al 3'-UTR de NF-κB (p65), se muestra los oligonucleótidos diseñados para la amplificación y la secuencia de unión a miR-138. B) Se muestra la ubicación del gen NF-κB (p65) dentro de la región q13 en el cromosoma 11, además de la ubicación del 3'-UTR de NF-κB (p65) correspondiente a 782 pb.

Posteriormente, se realizó la amplificación del 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) con el uso de ADN genómico por PCR punto final, en donde se obtuvo la banda esperada de 803pb (Figura 11).



**Figura 11. Amplificación de la secuencia de la región 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65).** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se muestra una banda de ~803 pb, correspondiente a la secuencia 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65), obtenida por PCR punto final, usando el sistema comercial OneTaq Hot Start Quick-Load.

Una vez obtenido el amplicón del 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) se procedió a clonarlo en el vector psiCHECK-2, por lo cual se realizó la digestión del amplicon correspondiente al 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) y del vector psiCHECK-2 para linealizarlo, con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*. Posteriormente el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) se ligó río abajo del gen de luciferasa en el vector psiCHECK-2 (Figura 12).



**Figura 12: Mapa del vector psiCHECK-2 y sitio de clonación múltiple (MCS).** La secuencia del 3'-UTR de NF-κB (p65) se clonó río abajo del gen de luciferasa en los sitios *XhoI/NotI* mediante clonación sitio dirigida.

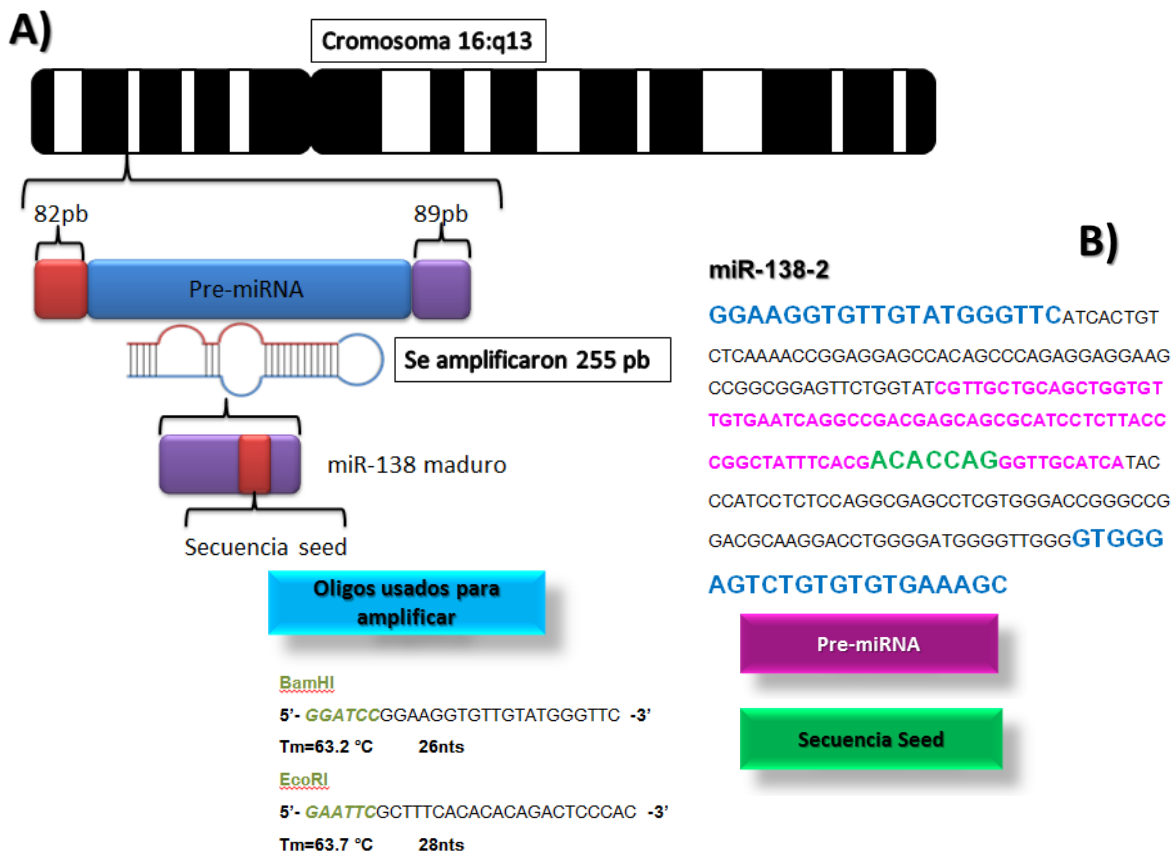
Posteriormente, las clonas recombinantes fueron analizadas por restricción enzimática *XhoI/NotI* y la integridad de la secuencia fue verificada por secuenciación capilar (Figura 13). Observando que no existía cambio en la secuencia de la región blanco de miR-138 con respecto a la secuencia original.





## 5. Clonación de miR-138 en el vector pLVx-shRNA 2 (pLVx-miR-138)

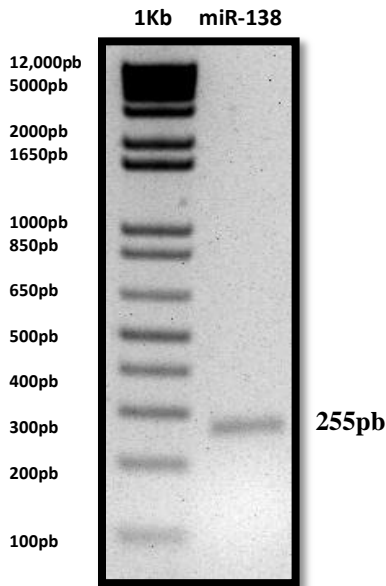
Para generar el vector que permitiera sobre-expresar a miR-138, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia precursora de este miRNA, correspondiente a 84pb a partir de DNA genómico de humano (Figura. 15). La región obtenida fue un fragmento de 255 pb de las cuales 84 pb corresponden al precursor de miR-138 más 171 pb extras que nos permitió mimetizar un tRNA como se describió anteriormente en material y métodos.



**Figura 15. Representación del precursor de miR-138.** A) Se muestra la ubicación del gen de miR-138 dentro de la región q13 en el cromosoma 16, además de la ubicación del precursor de miR-138 correspondiente a 84pb. B) Secuencia correspondiente al precursor de miR-138 se muestra los oligonucleótidos diseñados para la amplificación y se resalta el sitio de reconocimiento de la secuencia “seed” de miR-138, en color verde.

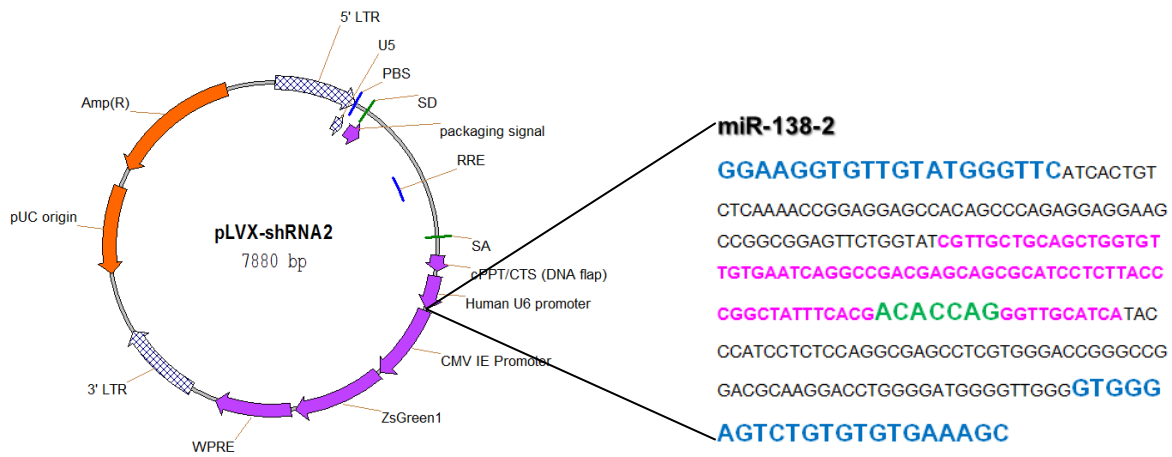


El amplicón de 255pb, el cual contiene la secuencia precursora de miR-138 se obtuvo por PCR punto final, en donde se amplificó la banda esperada, a una temperatura de 67.5° C de alineamiento (Figura 16).



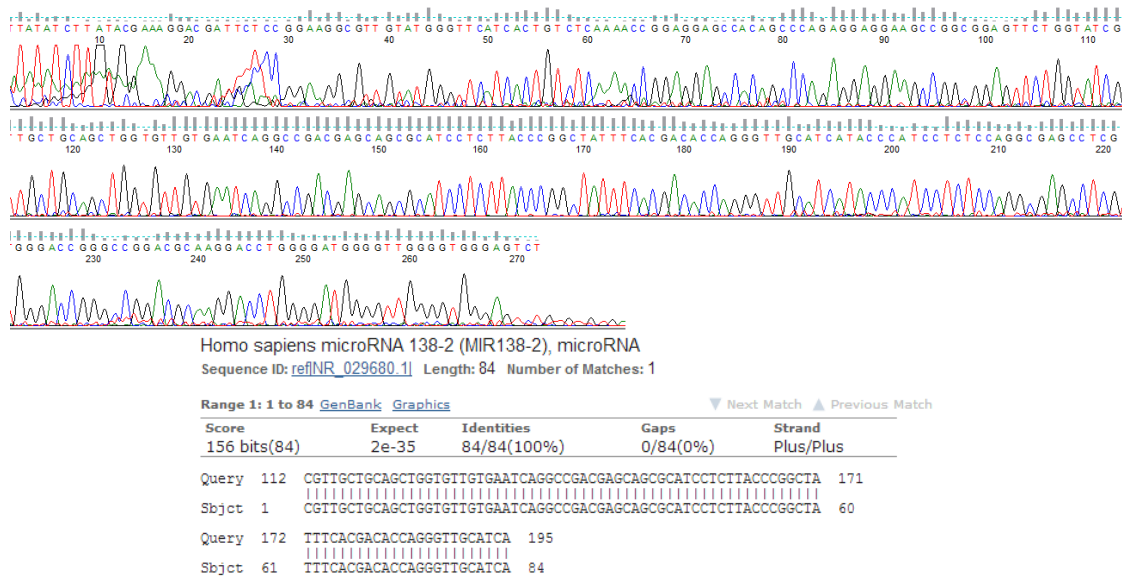
**Figura 16. Amplificación de la secuencia precursora de miR-138.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se muestra una banda de ~255pb, correspondiente a la secuencia precursora de miR-138, obtenida por PCR punto final.

Una vez obtenido el amplicón de miR-138, se procedió a clonarlo en el vector PGEM T-Easy, un vector intermediario usado para facilitar la liberación del fragmento y posteriormente sub-clonarlo en el vector pLVx-shRNA2/*BamHI/EcoRI*, mediante clonación sitio-dirigida (Figura 17).



**Figura 17: Mapa del vector pLVx-shRNA2 y sitio de clonación múltiple (MCS).** La secuencia del precursor de miR-138 se clono en los sitios BamHI/EcoRI río abajo del promotor Pol III U6.

Posteriormente, las clonas recombinantes fueron analizadas por restricción enzimática *BamHI/EcoRI* y la integridad de la secuencia fue verificada por secuenciación capilar (Figura 18). En la parte inferior se observa el análisis de Blast realizado con la secuencia obtenida del electroferograma, para confirmar un 100% de identidad en nucleótidos.



**Figura 18: Análisis de la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región precursora de miR-138.** Electroferograma de la secuencia de nucleótidos correspondientes a los 84pb de la región 3' de la secuencia precursora de miR-138. Esta secuencia fue obtenida con el oligonucleótido 5'-GAATTCGCTTTACACACAGACTCCCAC-3'.

## 6. Efecto regulatorio de la sobre-expresión de miR-138 sobre el 3'-UTR de NF-κB (p65) en la línea celular T98 y AD293.

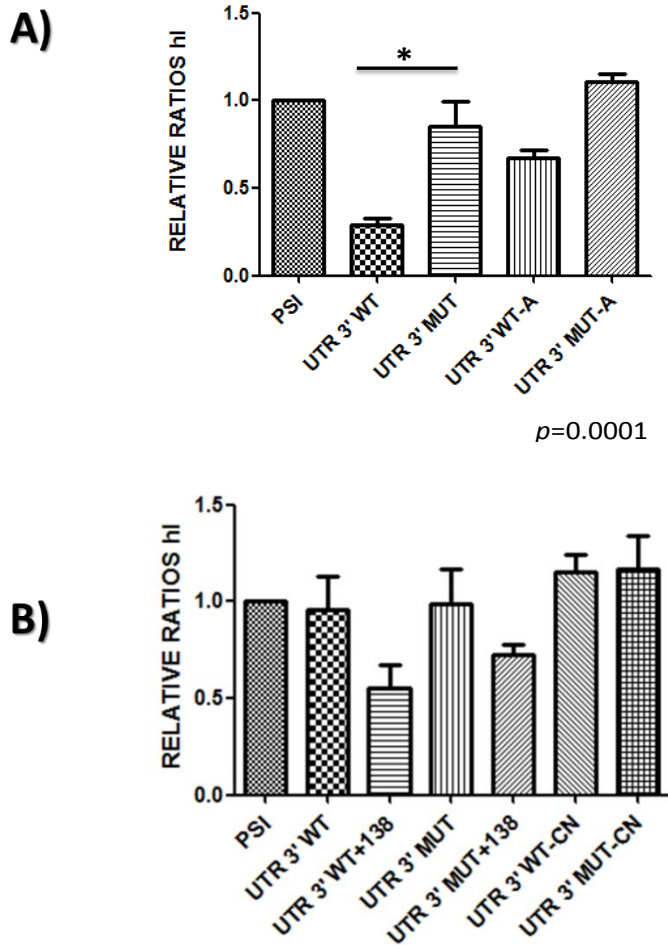
Para evaluar la regulación post-transcripcional de miR-138 sobre el sitio de unión en la región 3'-UTR de NF-κB (p65), se realizó la transfección del vector que expresa el 3'-UTR WT de NF-κB (p65), el 3'-UTR MUT (mutando el sitio de unión para miR-138) de NF-κB (p65) y el antagómiro de miR-138, en células T98 que expresan de manera endógena miR-138.

Mientras que la línea celular AD-293 que no expresa miR-138 se co-transfectó ya sea con el 3'-UTR WT y el 3'-UTR MUT más el vector de sobre-expresión de miR-138 (pLVX-mirR-138) y como control negativo se usó un miRNA de *C. elegans* el

cual está descrito que poseen mínima identidad de secuencia con secuencias de humanos, rata y ratón. El vector de expresión pLVX-miR-138 no fue usado en las células T98 debido a la expresión endógena de miR-138.

El vector psiCHECK-2 posee el gen reportero que codifica para la proteína luciferasa de *Renilla sp.* (hRLuc), además de contar con un segundo gen reportero codificante para luciferasa de luciérnaga (hLuc). Este vector posee un promotor distinto a hRLuc, el promotor del gen de la timidina cinasa del virus del herpes simplex HSV-TK (del inglés “herpes simplex virus thymidine kinase promoter”), por lo que tiene la capacidad de emitir luz independiente de la correcta transcripción del hRLuc y del inserto 3'-UTR, de tal modo que hRLuc emite señal fluorescente de fondo que permite normalizar la señal del gen reportero hLuc y corregir la variabilidad de la transfección. Posterior a normalización se observó que existen diferencias significativas al probar la eficiencia de las construcciones 3'-UTR-WT y el 3'-UTR-MUT solo para la línea celular T98 (Figura 19-A). Esto sugiere que miR-138 se une al 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65), en la línea celular T98.

En el caso de la línea celular AD-293 aunque se puede observar una mínima disminución, no se observó diferencia significativa entre las células co-transfectadas con el 3'-UTR WT mas miR-138, comparado con las células co-transfectadas con el 3'-UTR MUT mas miR-138 (Figura 19-B).

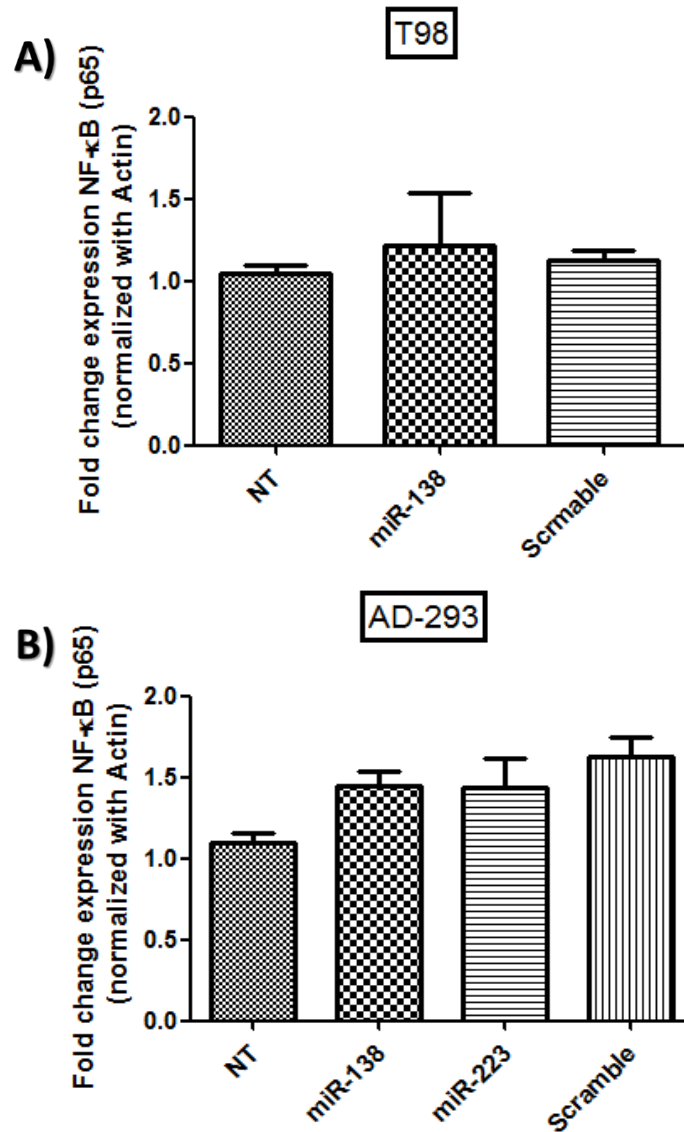


**Figura 19: Regulación post-transcripcional de miR-138 sobre NF-κB (p65).** A) Células T98 transfectadas con el vector vacío psichack-2 de Promega (PSI), 3'-UTR WT de NF-κB (p65), 3'-UTR MUT de NF-κB (p65) y la co-transfección del antagonismo de miR-138 más el 3'-UTR WT (3'-UTR WT-A) y el 3'-UTR MUT (3'-UTR MUT-A). B) Células AD-293 transfectadas con el vector vacío psichack-2 (PSI), co-transfectadas con el 3'-UTR WT de NF-κB (p65) y 3'-UTR MUT de NF-κB (p65) más el vector pLVX-miR-138 y la co-transfección de con el control negativo más el 3'-UTR WT y MUT (3'-UTR WT-CN y 3'-UTR MUT-CN). La actividad de la luciferasa de renilla (hRLuc) de cada muestra se evaluó 24 h después de la transfección y se normalizó con la actividad de luciferasa de luciérnaga (hLuc+). Se puede observar que hay diferencias significativas entre el 3'-UTR WT y el 3'-UTR MUT solo en la línea celular T98.

## **7. Efecto de mir-138 en la expresión del mensajero de NF- $\kappa$ B (p65) en células T98 y AD-293.**

Posteriormente a la evaluación de la unión de miR-138 sobre el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B en la línea celular T98 y AD-293, se evaluó por RT-qPCR si la sobre-expresión de miR-138 tiene un efecto sobre el mensajero de NF- $\kappa$ B. Para ello, se transfectaron las líneas T98 y AD-293 con el mimic de miR-138 y el plásmido pLVX-miR-138 respectivamente. Para determinar que el efecto de miR-138 es específico en la disminución del mensajero de NF- $\kappa$ B, se transfectó la línea celular T98 con el plásmido que expresa un miRNA scramble (pLVX-Scramble, plásmido previamente construido en nuestro grupo de trabajo) y la línea AD-293 con el plásmido scramble y con el plásmido pLVX-miR-223 (pLVX-miR-223), este último fue utilizado para control de especificidad debido a que el análisis del 3'-UTR del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65) se observó que no existía ningún sitio de unión para este miRNA (Anexo 1-Figura 24).

Se determinó que después de la transfección de los plásmidos no existe disminución en el nivel del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65), sugiriendo que la sobre-expresión de miR-138 no tiene ningún efecto en los niveles del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65) (Figura 20).



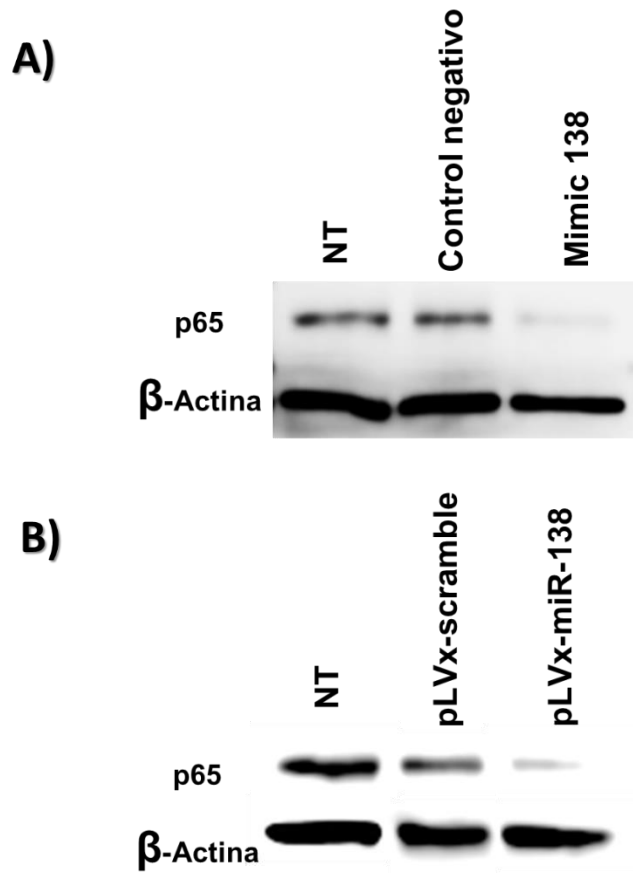
**Figura 20: Efecto de la sobre-expresión de miR-138 sobre el mensajero de NF-κB (p65).** A) Células T98 no tratadas (NT) o transfectadas con el mimico de miR-138 y el plásmido pLVX-scramble. B) Células AD-293 no tratadas (NT) o transfectadas con el vector pLVx-miR-138, miR-223 y scramble. El mensajero de NF-κB se evaluó 24 horas después de la transfección de los plásmidos. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes que fueron normalizados con β-actina.

**8. Efecto de miR-138 sobre la expresión de la proteína NF- $\kappa$ B (p65) en la línea celular T98 y AD-293.**

Después de determinar que el nivel del transcrito de NF- $\kappa$ B (p65) no es modificado por la sobre-expresión de miR-138 en ambas líneas celulares, se procedió a evaluar los niveles de la proteína de NF- $\kappa$ B (p65) por medio de western blot, a partir de extractos totales después de la transfección del mimic de miR-138, en la línea T98 y el plásmido pLVX-miR-138 en la línea celular AD-293 (Figura 21).

Se observó que después de la transfección del mimic de miR-138 y el vector de expresión pLVX-miR-138 en las líneas celulares T98 y AD-293 respectivamente, la presencia de la proteína NF- $\kappa$ B (p65) disminuyó significativamente, comparado con las células sin tratamiento (NT) y el control negativo.



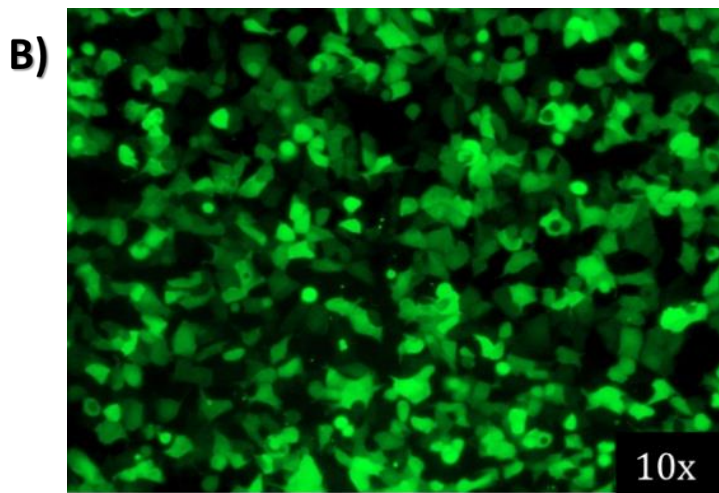
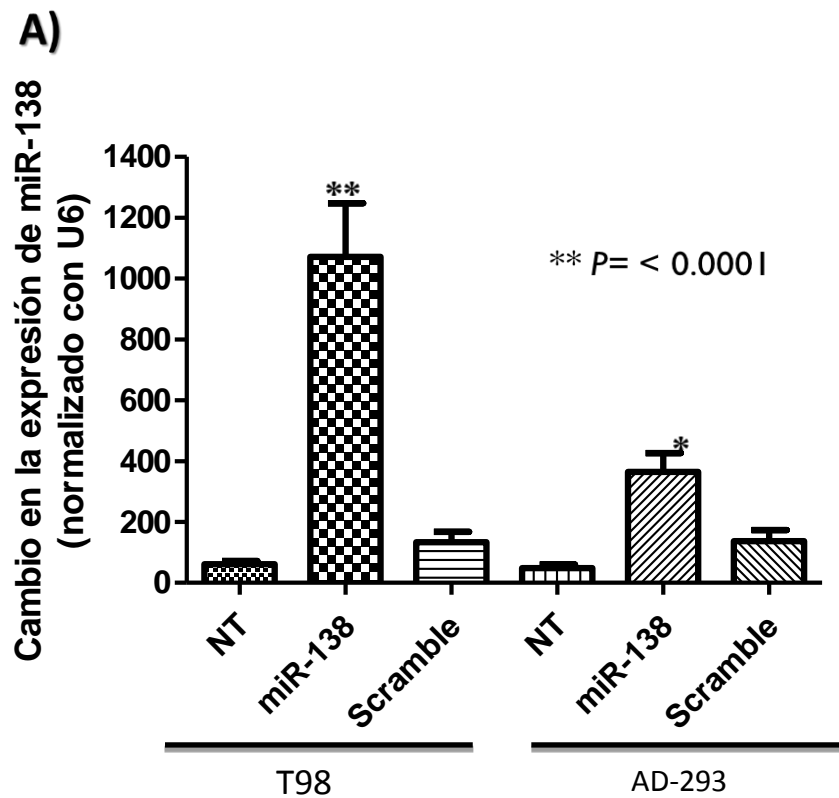


**Figura 21: Efecto de miR-138 en la expresión de la proteína NF- $\kappa$ B (p65).** A) Análisis de western blot para NF- $\kappa$ B (p65) en extractos totales de células T98, después de la transfección con 100 nM del mimic miR-138 y 100 nM del control negativo. B) Análisis de western blot para NF- $\kappa$ B (p65) en extractos totales en células AD-293 después de la transfección con 4 $\mu$ g los vectores de expresión pLVX-scramble y pLVX-miR-138. B-actina fue usado como control de carga.

**9. Determinación de la expresión de miR-138 en células T98 y AD-293 después de la transfección.**

Posteriormente a la evaluación del mensajero y de la proteína de NF- $\kappa$ B (p65) en las líneas celulares T98 Y AD293, se procedió a determinar por RT-qPCR si las líneas celulares expresaban miR-138, después de la transfección tanto del mimic de miR-138 y del vector pLVX-miR-138 la sobre-expresión de miR-138 (Figura 22).

Se observa que la expresión de miR-138 después de la transfección con el mimic de miR-138 es de hasta 1000 veces más comparada con las células sin tratamiento y de 600 veces más comparada con la línea celular AD-293 después de la transfección del plásmido pLVX-miR-138.



**Figura 22: Evaluación de la sobre-expresión de miR-138 después de la transfección con el mimico de miR-138 y el plásmido pLVx-miR-138.** A) RT-qPCR para determinar la expresión de miR-138 en células T98 y Ad-293. Resultado de tres experimentos independientes que se obtuvieron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$   $\Delta\Delta CT = ((Ct \text{ gen de interés NT} - Ct \text{ gen control NT}) - (Ct \text{ gen de interés T} - Ct \text{ gen control T}))$ . Como control endógeno se utilizó la expresión del RNA pequeño nuclear U6. B) Imagen donde se muestra la línea celular AD-293 después de la tranfección del plásmido pLVx-miR-138 donde se observa la eficiencia de transfección.

## IX. DISCUSIÓN

Se ha descrito que MDR1 es regulado de manera transcripcional por distintos factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (p65) [65] y de manera post-transcripcional por miRNAs [53]. La importancia de la función y disfunción de miRNAs en diversas enfermedades humanas como el cáncer sugiere que la modulación de la expresión de los genes de los miRNAs puede servir como una novedosa modalidad terapéutica para tales enfermedades [66].

Además de la determinación del silenciamiento génico post-transcripcional, también se ha descrito que los miRNAs se unen en regiones evolutivamente conservadas en los promotores de genes blancos. Donde funcionan como un interfaz crítico entre los complejos de remodelación de la cromatina y el genoma para el silenciamiento génico transcripcional [67]. Un ejemplo de esta regulación fue descrita por Xiaohong Zhao el cual describió por primera vez la participación de miR-138 en la regulación transcripcional de MDR1, al evaluar en células de leucemia (HL-60/VCR), que la transfección de distintas concentraciones del mimic de miR-138 resulta en una disminución en la actividad del promotor de MDR1 [54].

Aunque el mecanismo de esta posible regulación transcripcional no fue descrito, estos resultados demuestran la importante participación de miR-138 en la regulación de la resistencia a fármacos por la modulación de MDR1. Es por ello que en nuestro grupo de trabajo quiso investigar si la región promotora de MDR1 posee sitios de unión a miR-138, ya que se ha descrito que la presencia de sitios

de unión en la región promotora es un determinante clave para la regulación transcripcional mediada por miRNAs [45] [68].

Mediante la herramienta microPIR (microRNA-Promotor recursos de interacción), una base de datos que facilita la exploración exhaustiva de sitios putativos de miRNAs, dentro de los promotores de genes del genoma humano [58], se determinó que la región promotora de MDR1 no posee sitios de unión para miR-138 (Anexo 1-Figura 23).

Este resultado sugiere que la regulación puede ser a través de una regulación indirecta, que involucra la modulación post-transcripcional de proteínas que puedan modular el promotor de MDR1 [66]. Al evaluar mediante las herramientas bioinformáticas microRNA.org y Target Scan Human, los 3'-UTR de los mensajeros de los factores de transcripción que se ha descrito regulan al promotor de MDR1 [60], se encontró un solo sitio para miR-138 únicamente para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (p65) (Anexo 1-Figura 24 y 25). Existe un reporte donde se sugiere que la inhibición de miR-138, induce una actividad sostenida de NF- $\kappa$ B (p65) y una progresión del tumor en el carcinoma esofágico de células escamosas, al regular negativamente la expresión de las proteínas FLOT-1, FLOT-2 y Caveolina 1. Estas proteínas son necesarias para la formación de las balsas lipídicas y el reclutamiento del receptor de TNF- $\alpha$  (TNFR) [60]. Estos resultados, nos permitieron sugerir en parte, que miR-138 podría estar participando en la regulación directa de NF- $\kappa$ B (p65).

En múltiples tipos de cáncer miR-138 se ha observado regulado a la baja, lo que contribuye a la proliferación e invasión, inhibiendo la apoptosis por distintos mecanismos [51,69]. Sin embargo, en las células madre glioma iniciadoras del tumor (GSC) se ha determinado la sobre-expresión de miR-138 en comparación con los tejidos no neoplásicos, y la regulación positiva de miR-138 se asocia con la recurrencia del tumor y la supervivencia [64]. Estos hallazgos indican que miR-138 funciona como un supresor de tumor y un oncógeno en función del tipo de tumor. En el caso de nuestro modelo celular, T98 pertenece a las células iniciadoras de glioma por lo cual presenta una alta expresión de miR-138 al funcionar como un oncógeno [64]. Esto nos facilitó la evaluación del papel de miR-138, sobre la regulación post-transcripcional de NF- $\kappa$ B (p65) en un contexto celular de expresión endógena para este miRNA.

Los resultados de los ensayos de luciferasa en la línea celular T98, proveen evidencia de que miR-138 se une de manera directa al mensajero de NF- $\kappa$ B (p65), al observar que después de la transfección con el plásmido psi-3'-UTR-p65 WT la actividad de luciferasa disminuye y no se inhibe al transfectar las células con el plásmido psi-3'-UTR-p65 MUT (Figura 19-A). Estos resultados nos muestran que miR-138 regula de manera negativa la expresión de NF- $\kappa$ B (p65) (Figura 21) al unirse de manera directa al 3'-UTR de su mensajero y de manera específica ya que después de la eliminación del sitio de unión a miR-138 la actividad de luciferasa no disminuye (Figura 19-A).

En el caso de la línea celular AD-293, no se pudo observar una diferencia significativa después de la co-transfección de los plásmidos pLVx-miR-138 más el

psi-3'-UTR-p65 WT o psi-3'-UTR-p65 MUT (Figura 19-B). Existen diversas razones que podrían explicar porque no se observó el mismo comportamiento en la línea celular AD-293 que en la T98, no podemos asegurar que el precursor de miR-138 este activo en la célula o que la maquinaria de procesamiento y maduración de los miRNAs en la línea celular AD-293 trabaje adecuadamente. Otra posibilidad es que al realizar la co-transfección la eficiencia disminuye, como ya se ha descrito existen distintos factores que van a determinar la eficiencia de transfección como: la concentración del DNA, la viabilidad celular, la confluencia, el número de pases y el tiempo. Haciendo difícil asegurar la captación y activación de la molécula del miRNA en sistemas de expresión basados en plásmidos [4\*], lo cual provoco una mayor dispersión en nuestros datos no pudiendo observar el mismo efecto que en la línea celular T98, donde la expresión de miR-138 es endógena y solo se realizó una sola transfección.

Por otra parte, se demostró que la sobre-expresión de miR-138 por la transfección del mimic de miR-138 y el plásmido pLVx-miR-138 en la línea celular T98 y AD-293, respectivamente, no tiene efecto en los niveles del mensajero de NF- $\kappa$ B (p65) después de 24 horas post-transfección (Figura 20-A y 20-B). No obstante, al evaluar los niveles de la proteína de NF- $\kappa$ B (p65) mediante western blot, se determinó que la sobre-expresión de miR-138 en ambas líneas celulares induce una disminución significativa en la proteína de NF- $\kappa$ B (p65) (Figura 21-A y 21-B). Por lo tanto, esto sugiere fuertemente que miR-138 regula la expresión de NF- $\kappa$ B (p65) a través de la represión traduccional del mRNA por la unión directa al 3'-UTR del mensajero de NF- $\kappa$ B (p65) y no por la degradación del transcrito.

Una posibilidad a considerar, es que varios factores pueden ocultar el efecto de los miRNAs cuando se evalúan los niveles del mRNA, así como de la proteína que estos codifican, dependiendo del tiempo de análisis del experimento. Por ejemplo, la velocidad de unión de RNAs pequeños a la proteína AGO parece ser ~ 10 horas [70,71] y la mediana de la vida media de las proteínas de mamíferos es ~ 48 horas [72]. La magnitud de los cambios a nivel de proteínas que se pueden observar entre los blancos de los miRNA, depende del diseño y el momento del experimento [89]. Selbach *et al.*, demostró que en un lapso de 8 horas, después de la transfección de un miRNA, muchos blancos fueron regulados sólo a nivel de proteínas, pero en un periodo de tiempo más largo (32 horas), los niveles del mRNA y de la proteína correlacionaban [73]. A causa de estos reportes decidimos evaluar si a 48 horas existía un cambio en los niveles del mensajero de NF- $\kappa$ B (p65), después de la transfección del pLVX-shRNA-2 en la línea celular AD-293 (Anexo 1-Figura 28). De manera similar no se observó ninguna disminución en el mensajero de NF- $\kappa$ B (p65), por lo cual se decidió no evaluar a periodos de tiempos más largos (36 y 48 horas) los niveles del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65).

Además, se ha reportado que los nucleótidos que flanquean las regiones “semillas”, afectan el nivel de degradación del mRNA por los miRNAs [74,75] y que estos efectos también están involucrados en la represión de la síntesis de la proteína. En los RNAs interferentes pequeños (siRNAs), la perfecta complementariedad de sus blancos, induce la escisión del mRNA, entre los nucleótidos 10 y 11. Contrariamente, se ha observado que un apareamiento erróneo en esta región, reduce fuertemente la escisión del mRNA [76,77]. Esto se



demonstró mediante construcciones reporteras, en donde la interacción siRNA-mRNA con apareamientos erróneos entre los nucleótidos 9-11 del siRNA son principalmente reprimidos a nivel de la proteína, con poco o ningún efecto en el transcrito [78]. Selbach *et al.*, demostró utilizando miRNAs, que los mRNA que contienen al menos un apareamiento erróneo, solo fueron reprimidos a nivel de proteína. Por lo tanto, a pesar de que los apareamientos erróneos son perjudiciales para la escisión del mRNA mediada por los siRNA, estos correlacionan con un incremento en la represión de la producción de las proteínas por miRNAs [92].

Al realizar el análisis de la región del sitio de unión de miR-138 sobre el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B (p65) (Anexo 1-Figura 26), se determinó que los nucleótidos 9-11 poseen apareamientos incorrectos. Lo anterior podría explicar la disminución de los niveles de la proteína de NF- $\kappa$ B (p65) que obtuvimos, sin ningún efecto en los niveles del transcrito, en donde después de transfectar miR-138, podría existir un apareamiento incorrecto de estos nucleótidos, que son esenciales en el reconocimiento por proteínas argonautas para la escisión del mRNA [79].

Ikemura Kenji (2012) observó un fenómeno similar al determinar que miR-451 regula negativamente a MDR1, a través de la represión traduccional del mRNA de MDR1 [80]. Además se han descrito reportes similares en donde la unión del miRNA no necesariamente degrada el mensajero blanco, pero su unión a este tiene un efecto en los niveles de la proteína (Anexo 1-Tabla 10) [81].

Posteriormente, para determinar que la sobre-expresión de miR-138 induce la disminución en la proteína NF- $\kappa$ B (p65) sin modificar la expresión de mensajero, fue necesario evaluar que los niveles de miR-138 se modificaron después de la transfección con el mimic de miR-138 y el plásmido pLVX-miR-138 en ambas líneas celulares (Figura 22-A Y 22-B). Nuestros resultados indican que en la línea celular T98, los niveles de miR-138 aumentan hasta mil veces más, comparado con las no transfectadas y 600 veces más comparadas con las células AD-293, transfectadas con el plásmido pLVx-miR-138. Estos resultados pueden atribuirse a que el mimic de miR-138 es una molécula de ARN de doble cadena, diseñados para imitar miRNAs endógenos maduros cuando se introduce en las células, además de que son permeables a la célula y con estas moléculas puede obtenerse un 100% de eficiencia de transfección en células inmortalizadas [4\*]. Por otro lado, el plásmido pLVX-miR-138 contiene el precursor de miR-138 y debido a que las reglas para la maduración y la activación de los miRNAs desde pri-miRNAs y pre-miRNAs no se entienden completamente, es difícil asegurar la captación y activación de la molécula del miRNA en sistemas de expresión basados en plásmidos [4\*]. Probablemente esta menor expresión observada en la línea celular AD-293 es la razón por la cual no se observa una diferencia significativa en los ensayos de luciferasa.

Hoy en día distintos modelos han sido propuestos para determinar el silenciamiento génico por los miRNAs, los cuales se pueden dividir en tres estados: el pre-traducciona, co-traducciona y post-traducciona [79,82]. Los mecanismos descritos pre-traduccionales son divididos en tres, la degradación de

mRNA mediado por miRNPs que reclutan varios factores y enzimas. La competencia por la estructura cap y la inhibición de la formación del “loop” cerrado, estos dos mecanismos regulados por proteínas argonautas que compiten con proteínas de unión a cap (CBPs) y la unión de elf4E [82].

Los mecanismos post-traduccionales donde los miRNPs evitan la elongación y la terminación de la traducción, normalmente involucran la degradación de la proteína y su retención. Dentro de estos se encuentra la inhibición de la unión de la subunidad ribosomal o la disociación prematura del ribosoma, la terminación prematura o una elongación más lenta y la retención del mRNA blanco de la maquinaria para la traducción, normalmente almacenados en cuerpos P. Otro posible mecanismo, es una regulación co-traducional, donde la proteína naciente es degradada por la actividad de proteasas [82].

Aunque no hay que descartar que cualquiera de los mecanismos descritos anteriormente pudieran estar sucediendo, uno de los cuales se tiene mayor evidencia, es la complementariedad que presenta miR-138 sobre el 3'-UTR de NF- $\kappa$ B ya que anteriormente se pensaba que los miRNAs en animales, solo reprimen sus blancos a nivel traduccional, con poca o ninguna influencia en la abundancia del mRNA. Al contrario de las plantas, los miRNAs actúan promoviendo la escisión del blanco y su degradación. Estas diferencias en la regulación del blanco entre las plantas y los animales se derivan del hecho que el apareamiento de bases entre miRNAs y sus objetivos es mucho menos extenso en los animales que en las plantas [79].

En cuanto a la expresión de la proteína MDR1, solamente se evaluó los niveles basales en la línea celular T98 (Anexo 1-Figura 27), observando que su expresión está localizada en parte de la membrana celular, citoplasma y una mayor parte en el nucleó corroborando lo que ya se ha descrito [83-86]. Aunque el efecto sobre la proteína MDR1 no fue evaluada después de modular la expresión de NF- $\kappa$ B (p65) por la sobre-expresión de miR-138, se espera que de igual forma los niveles de la proteína MDR1 disminuyan, sugiriendo que miR-138 participa en la regulación del desarrollo del fenotipo de multirresistencia a fármacos, al regular de manera directa la expresión de NF- $\kappa$ B (p65) y de manera indirecta a MDR1.

## **X. CONCLUSIONES**

- Con estos resultados se sugiere que miR-138 se une directamente al 3'-UTR del mRNA de NF- $\kappa$ B (p65), en la línea celular T98 y AD-293, induciendo represión traduccional, sin modificar los niveles del transcrito de NF- $\kappa$ B (p65).
- Lo anterior podría explicar parcialmente, que la modulación de la expresión de MDR1 por miR-138, es a través de una regulación post-transcripcional sobre NF- $\kappa$ B (p65) y no directamente sobre la región promotora de MDR1 como había sido sugerido.

## **XI. PERSPECTIVAS**

- Evaluar el efecto sobre los niveles de la proteína y del mensajero de MDR1 después de la sobre-expresión de miR-138 en las células T98 y AD-293.
- Comparar el efecto inhibitorio de miR-138 con el inhibidor comercial Bay117082 sobre NF- $\kappa$ B (p65) mediante western blot.

## XII. LITERATURA CITADA

1. Salinas S, Gov N (2009) The complexity of living: when biology meets theory. *EMBO reports* 10: 953-957.
2. Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Lankelma J (2006) Cancer: a Systems Biology disease. *Biosystems* 83: 81-90.
3. Park J, Lee DS, Christakis NA, Barabasi AL (2009) The impact of cellular networks on disease comorbidity. *Mol Syst Biol* 5: 262.
4. Little MP (2010) Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. *Biol Direct* 5: 19; discussion 19.
5. Gentles AJ, Gallahan D (2011) Systems biology: confronting the complexity of cancer. *Cancer Res* 71: 5961-5964.
6. Sonnenschein C, Soto AM (2011) Why systems biology and cancer? *Semin Cancer Biol* 21: 147-149.
7. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2: 48-58.
8. Lehnert M (1996) Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur J Cancer* 32A: 912-920.
9. Angel Correa RD. Estimación del porcentaje de linfoblastos para diagnóstico precoz de leucemia haciendo uso de técnicas de visión artificial. Universidad Cooperativa de Colombia, Bogotá D.C; 2010.
10. Perez-Saldivar ML, Fajardo-Gutierrez A, Bernaldez-Rios R, Martinez-Avalos A, Medina-Sanson A, et al. (2011) Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 11: 355.
11. Sánchez-Suárez P. y Benitez-Bribiesca L. Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. *Cancerología* 1. 2006: 187-199
12. Longley DB, Johnston PG (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of Pathology* 205: 275-292.
13. Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, et al. (1992) Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* 52: 6885-6889.
14. Houghton JA, Houghton PJ (1983) Elucidation of pathways of 5-fluorouracil metabolism in xenografts of human colorectal adenocarcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19: 807-815.
15. Pommier Y, Kohlhagen G, Kohn KW, Leteurtre F, Wani MC, et al. (1995) Interaction of an alkylating camptothecin derivative with a DNA base at topoisomerase I-DNA cleavage sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8861-8865.
16. Fan S, el-Deiry WS, Bae I, Freeman J, Jondle D, et al. (1994) p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res* 54: 5824-5830.
17. Letai AG (2008) Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer* 8: 121-132.
18. Yang F, Li QJ, Gong ZB, Zhou L, You N, et al. (2013) MicroRNA-34a Targets Bcl-2 and Sensitizes Human Hepatocellular Carcinoma Cells to Sorafenib Treatment. *Technol Cancer Res Treat*.
19. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13: 714-726.
20. Sissung TM, Baum CE, Kirkland CT, Gao R, Gardner ER, et al. (2010) Pharmacogenetics of membrane transporters: an update on current approaches. *Mol Biotechnol* 44: 152-167.

21. Kartner N, Riordan JR, Ling V (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221: 1285-1288.
22. Choi C-H (2005) ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International* 5: 1-13.
23. Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Tanaka K, Yasuhara M, et al. (1993) Digoxin-cyclosporin A interaction: modulation of the multidrug transporter P-glycoprotein in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 1614-1619.
24. Harris DP, Bandyopadhyay S, Maxwell TJ, Willard B, DiCorleto PE (2014) Tumor necrosis factor (TNF)-alpha induction of CXCL10 in endothelial cells requires protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)-mediated nuclear factor (NF)-kappaB p65 methylation. *J Biol Chem* 289: 15328-15339.
25. Kanagasabai R, Krishnamurthy K, Druhan LJ, Ilangovan G (2011) Forced expression of heat shock protein 27 (Hsp27) reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated drug efflux and MDR1 gene expression in Adriamycin-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 286: 33289-33300.
26. Zhao BX, Sun YB, Wang SQ, Duan L, Huo QL, et al. (2013) Grape seed procyanidin reversal of p-glycoprotein associated multi-drug resistance via down-regulation of NF-kappaB and MAPK/ERK mediated YB-1 activity in A2780/T cells. *PLoS ONE* 8: e71071.
27. Hui RC, Gomes AR, Constantinidou D, Costa JR, Karadedou CT, et al. (2008) The forkhead transcription factor FOXO3a increases phosphoinositide-3 kinase/Akt activity in drug-resistant leukemic cells through induction of PIK3CA expression. *Mol Cell Biol* 28: 5886-5898.
28. Hernández, F. R. (2012) Evaluación de la actividad transcripcional de NF-kB sobre la región promotora del gen YY1 usando como modelo la línea celular RS4;11 despues del tratamiento con doxorubicina. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
29. Basseres DS, Baldwin AS (0000) Nuclear factor-[kappa]B and inhibitor of [kappa]B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25: 6817-6830.
30. Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132: 344-362.
31. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*. 2003; 22(1):90-7
32. Hoesel B, Schmid JA (2013) The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 12: 86.
33. Napetschnig J, Wu H (2013) Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys* 42: 443-468.
34. Bourguignon LY, Spevak CC, Wong G, Xia W, Gilad E (2009) Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells. *J Biol Chem* 284: 26533-26546.
35. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
36. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432: 231-235.
37. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98.



38. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11: 228-234.
39. Li Y, Kong D, Wang Z, Sarkar FH (2010) Regulation of microRNAs by natural agents: an emerging field in chemoprevention and chemotherapy research. *Pharm Res* 27: 1027-1041.
40. Okamura K (2012) Diversity of animal small RNA pathways and their biological utility. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3: 351-368.
41. Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, Fabbri M, Volinia S, et al. (2009) MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 114: 5331-5341.
42. Tang R, Zen K (2011) Gold glitters everywhere: nucleus microRNAs and their functions. *Frontiers in Biology* 6: 69-75.
43. Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT (2007) A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 315: 97-100.
44. Matsui M, Chu Y, Zhang H, Gagnon KT, Shaikh S, et al. (2013) Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes. *Nucleic Acids Res* 41: 10086-10109.
45. Kim DH, Saetrom P, Snove O, Jr., Rossi JJ (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16230-16235.
46. Younger ST, Corey DR (2011) Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Res*.
47. Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, et al. (2005) A microcircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 123: 819-831.
48. Zardo G, Ciolfi A, Vian L, Starnes LM, Billi M, et al. (2012) Polycombs and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional control of target gene expression. *Blood* 119: 4034-4046.
49. Zhao X, Yang L, Hu J, Ruan J (2010) miR-138 might reverse multidrug resistance of leukemia cells. *Leukemia research* 34: 1078-1082.
50. Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT (2012) MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 33: 1113-1120.
51. Liu X, Jiang L, Wang A, Yu J, Shi F, et al. (2009) MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 286: 217-222.
52. Gao Y, Fan X, Li W, Ping W, Deng Y, et al. (2014) miR-138-5p reverses gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells via negatively regulating G protein-coupled receptor 124. *Biochem Biophys Res Commun* 446: 179-186.
53. Toscano-Garibay JD, Aquino-Jarquín G (2012) Regulation exerted by miRNAs in the promoter and UTR sequences: MDR1/P-gp expression as a particular case. *DNA Cell Biol* 31: 1358-1364.
54. Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Illynskyy Y, Tryndyak VP, et al. (2008) Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther* 7: 2152-2159.
55. Feng DD, Zhang H, Zhang P, Zheng YS, Zhang XJ, et al. (2011) Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *J Cell Mol Med* 15: 2164-2175.
56. Yang HS, Cho MH, Zakowicz H, Hegamyer G, Sonenberg N, et al. (2004) A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pdc4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A. *Mol Cell Biol* 24: 3894-3906.

57. Hofmann MH, Heinrich J, Radziwill G, Moelling K (2009) A short hairpin DNA analogous to miR-125b inhibits C-Raf expression, proliferation, and survival of breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7: 1635-1644.
58. Piriyaopongsa J, Bootchai C, Ngamphiw C, Tongshima S (2012) microPIR: An Integrated Database of MicroRNA Target Sites within Human Promoter Sequences. *PLoS ONE* 7: e33888.
59. Gong H, Song L, Lin C, Liu A, Lin X, et al. (2013) Downregulation of miR-138 sustains NF-kappaB activation and promotes lipid raft formation in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 19: 1083-1093.
60. Labialle S, Gayet L, Marthinet E, Rigal D, Baggetto LG (2002) Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem Pharmacol* 64: 943-948.
61. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.
62. Dunn EA, Rader SD (2010) Secondary structure of U6 small nuclear RNA: implications for spliceosome assembly. *Biochem Soc Trans* 38: 1099-1104.
63. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS (2005) MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research* 65: 6029-6033.
64. Chan XH, Nama S, Gopal F, Rizk P, Ramasamy S, et al. (2012) Targeting glioma stem cells by functional inhibition of a prosurvival oncomiR-138 in malignant gliomas. *Cell Rep* 2: 591-602.
65. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, et al. (2000) NF- $\kappa$ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 22: 90-97.
66. Li Z, Rana TM (2014) Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov* 13: 622-638.
67. Zardo G, Ciolfi A, Vian L, Billi M, Racanicchi S, et al. (2012) Transcriptional targeting by microRNA-polycomb complexes: a novel route in cell fate determination. *Cell Cycle* 11: 3543-3549.
68. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008) MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1608-1613.
69. Liu X, Lv X-B, Wang X-P, Sang Y, Xu S, et al. (2012) MiR-138 suppressed nasopharyngeal carcinoma growth and tumorigenesis by targeting the CCND1 oncogene. *Cell Cycle* 11: 2495-2506.
70. Hausser J, Syed AP, Selevsek N, van Nimwegen E, Jaskiewicz L, et al. (2013) Timescales and bottlenecks in miRNA-dependent gene regulation. *Mol Syst Biol* 9: 711.
71. Ohrt T, Mutze J, Staroske W, Weinmann L, Hock J, et al. (2008) Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC in vivo in human cells. *Nucleic Acids Res* 36: 6439-6449.
72. Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, et al. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337-342.
73. Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, et al. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455: 58-63.
74. Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, et al. (2007) Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* 13: 1894-1910.
75. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, et al. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27: 91-105.
76. Haley B, Zamore PD (2004) Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 11: 599-606.

77. Schwarz DS, Ding H, Kennington L, Moore JT, Schelter J, et al. (2006) Designing siRNA That Distinguish between Genes That Differ by a Single Nucleotide. *PLoS Genet* 2: e140.
78. Aleman LM, Doench J, Sharp PA (2007) Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA* 13: 385-395.
79. Huntzinger E, Izaurralde E (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12: 99-110.
80. Ikemura K, Yamamoto M, Miyazaki S, Mizutani H, Iwamoto T, et al. (2013) MicroRNA-145 Post-transcriptionally Regulates the Expression and Function of P-glycoprotein in Intestinal Epithelial Cells. *Molecular Pharmacology* 83: 399-405.
81. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9: 102-114.
82. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M (2014) Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics* 2014: 970607.
83. Baldini N, Scotlandi K, Serra M, Shikita T, Zini N, et al. (1995) Nuclear immunolocalization of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines showing similar mechanisms of doxorubicin distribution. *Eur J Cell Biol* 68: 226-239.
84. Molinari A, Cianfriglia M, Meschini S, Calcabrini A, Arancia G (1994) P-glycoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells. *Int J Cancer* 59: 789-795.
85. Sognier MA, Zhang Y, Eberle RL, Sweet KM, Altenberg GA, et al. (1994) Sequestration of doxorubicin in vesicles in a multidrug-resistant cell line (LZ-100). *Biochem Pharmacol* 48: 391-401.
86. Bour-Dill C, Gramain MP, Merlin JL, Marchal S, Guillemin F (2000) Determination of intracellular organelles implicated in daunorubicin cytoplasmic sequestration in multidrug-resistant MCF-7 cells using fluorescence microscopy image analysis. *Cytometry* 39: 16-25.

## Referencias electrónicas.

1\*. Instituto nacional del Cáncer. <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>

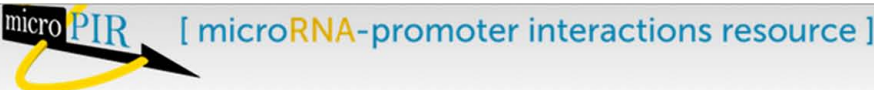
2\*. Sociedad Americana del cáncer. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy>.

3\* Clontech, Lentiviral shRNA Vector Systems (for RNAi) [http://www.clontech.com/MX/Products/Viral\\_Transduction/Lentiviral\\_Vector\\_Systems/shRNA?sitex=10028:22372:US](http://www.clontech.com/MX/Products/Viral_Transduction/Lentiviral_Vector_Systems/shRNA?sitex=10028:22372:US)

4\* Life Technologies Technotes <http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/references/ambion-tech-support/microrna-studies/tech-notes/precursor-mirnas-for-successful-mirna-functional-studies.html>

### XIII. ANEXO 1

Figura 23. Análisis *in silico* de la región promotora de MDR1 mediante la herramienta microPIR.



**List of target genes of mRNA hsa-mir-138**

No	Gene symbol (Gene ID)	Gene name	OMIM ID	Biding site on sense strand
35	ABCA2 (20)	ATP-biding cassette sub-family A member 2	600047	1
36	ABCA3 (21)	ATP-biding cassette sub-family A member 3	601615	1
37	ABCA5 (23461)	ATP-biding cassette sub-family A member 5	612503	2
38	ABCA6 (23460)	ATP-biding cassette sub-family A member 6	612504	1
39	ABCA7 (10347)	ATP-biding cassette sub-family A member 7	605414	1
40	ABCA9 (10350)	ATP-biding cassette sub-family A member 9	612507	1
41	ABCB10 (23456)	ATP-biding cassette sub-family B member 10,	605454	1
42	ABCB11 (8647)	bile salt export pump	603201	1
43	ABCB5 (340273)	ATP-biding cassette sub-family B member 5	611785	1
44	ABCA6 (10058)	ATP-biding cassette sub-family B member 6,	605452	1
45	ABCB7 (22)	ATP-biding cassette sub-family B member 7,	300135	1
46	ABCB8 (11194)	ATP-biding cassette sub-family B member 8,	605464	1
47	ABCB9 (23457)	ATP-biding cassette sub-family B member 9	605453	1
48	ABCC1 (4363)	Multidrug resistance-associated protein 1	158343	1

Figura 24. Análisis *in silico* mediante la herramienta microRNA.org, de la región 3'-UTR del mensajero de NF-κB (p65): predicción del sitio de unión a miR-138.

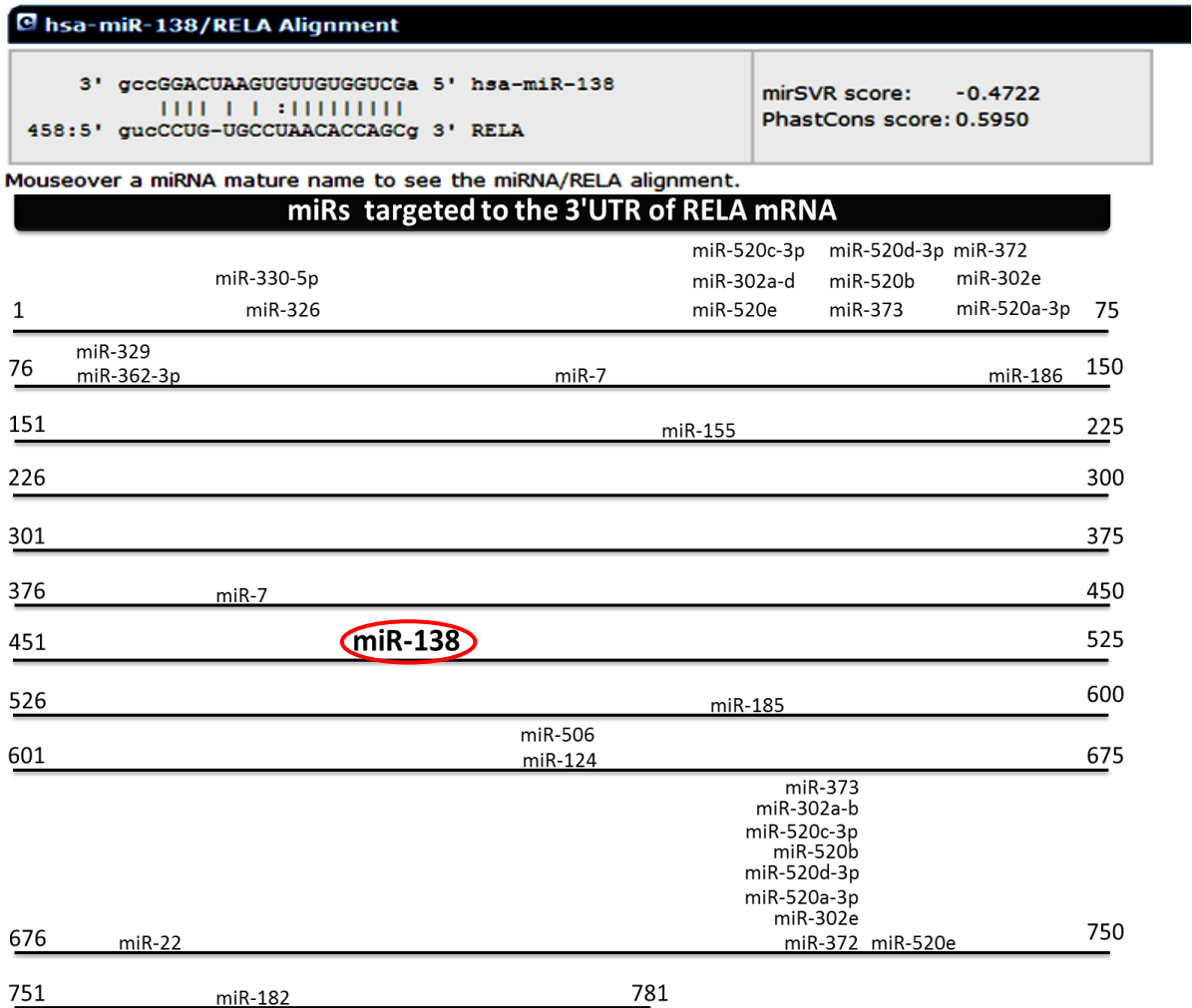




Tabla 10. Blancos de distintos miRNAs, donde su represión se asocia con ninguna o sólo una mínima degradación del mRNA.

miRNA	mRNA blanco	Tipo celular	Referencia
miR-133	Factor de respuesta a suero	C2C12 mioblastos	1
miR-181	Hox-A11	C2C12 mioblastos	2
miR-122	Transportador 1 de aminoácidos catiónicos (CAT-1) y mRNA reportero con CAT-1 3'-UTR	Huh7 células de hepatoma	3
miR-30	mRNA reportero mFmr1 3'-UTR	HepG2 células de hepatoma	4
miR-223	NFI-A	Granulocitos humanos	5
Let-7	NRAS Lin-41	Hela células de carcinoma cervical	6 y 7
miR-1	Histona desacetilasa 4 (HDAC4)	C2C12 mioblastos	1

Literatura citada.

1. Chen, J.F. et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genet.* **38**, 228-33 (2006).
2. Naguibneva, I. et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature Cell Bio.* **8**, 278-84 (2006).
3. Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I. & Filipowicz, W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**, 1111-24 (2006).
4. Nakamoto, M., Jin, P., O'Donnell, W.T. & Warren, S.T. Physiological identification of human transcripts translationally regulated by a specific microRNA. *Hum. Mol. Genet* **14**, 3813-21 (2005).
5. Fazi, F. et al. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* **123**, 819-31 (2005).
6. Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J. & Nilsen, T.W. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Struct. Mol. Biol.* **13**, 1102-7 (2006).
7. Nottrott, S., Simard, M.J. & Richter, J.D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Struct. Mol. Biol.* **13**, 1108-14 (2006).



Figura 26. Análisis de los nucleótidos 9-11 necesarios para el reconocimiento y escisión por proteínas argonautas en la interacción de miR-138 sobre el 3'-UTR de NF-κB (p65). Imagen modificada de referencia [98].

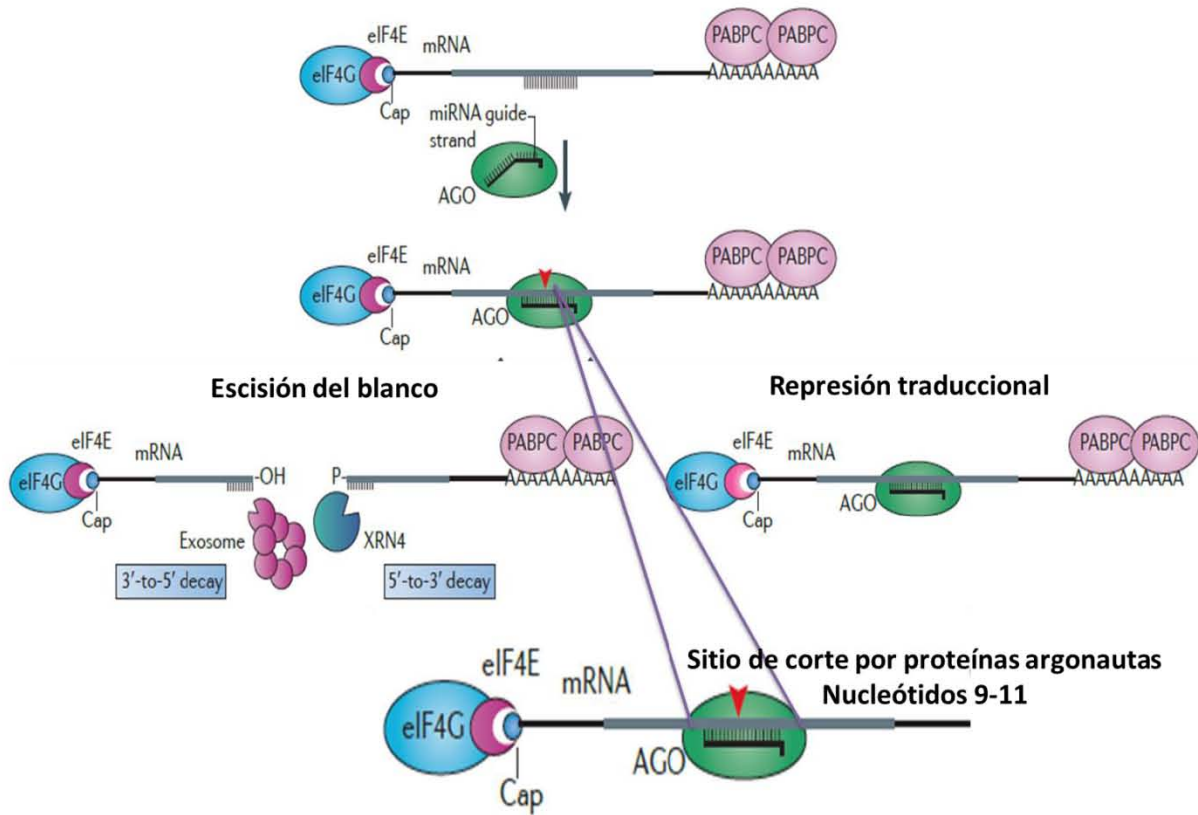
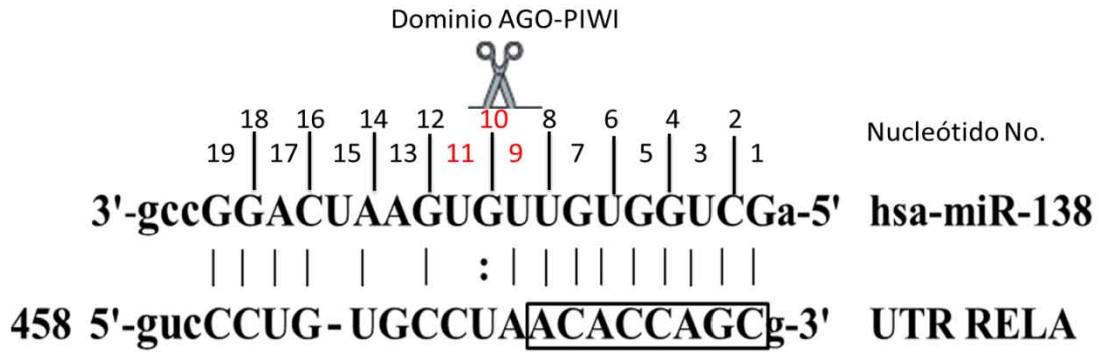


Figura 27. Evaluación de la expresión de MDR1 en la línea celular T98 para determinar la distribución de la proteína, mediante microscopia confocal después de la transfección con miR-138 y el control negativo.

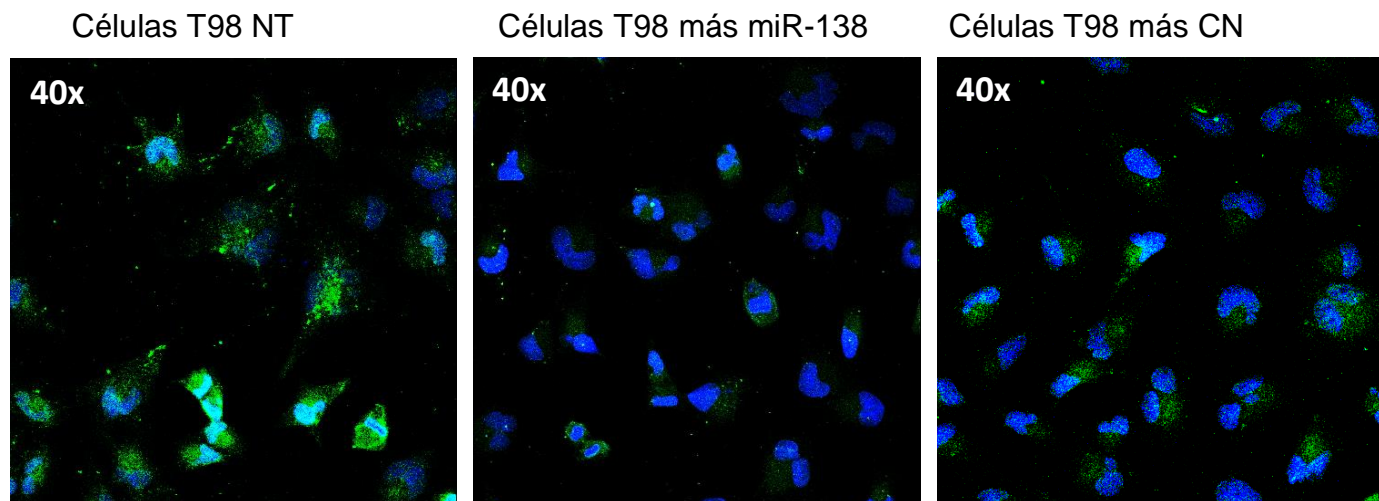


Figura 28. Evaluación de la expresión del RNA mensajero de NF-kB (p65), a 48 horas de transfección del plásmido pLVX-miR-138 en células AD-293 y de la transfección del mimic de miR-138 en células T98.

