



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

**ESTUDIO DEL MicroRNAoma DEL GUSANO NEMATODO
Caenorhabditis elegans: CLASIFICACIÓN, CONTEXTO GENÓMICO Y
COMPARACIÓN DE SUS MicroRNAs CON MicroRNAs DE HUMANO**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE: LICENCIADO EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA: ROBERTO CARLOS MARTÍNEZ PADILLA

**TUTOR PRINCIPAL: DR. JUAN MIRANDA RÍOS (INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS)**

MIEMBROS DEL CÓMITE TUTORAL:

PRESIDENTE: DRA. ROSA E. NAVARRO GONZÁLEZ

VOCAL: DR. LUIS A. VACA DOMÍNGUEZ

SECRETARIO: DR. JUAN MIRANDA RÍOS

SUPLENTE 1: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SUPLENTE 2: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018.





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.

TRAYECTORIA

Roberto Carlos estudió la **Licenciatura en Investigación Biomédica Básica (LIBB)**. Durante su formación universitaria trabajó en tres laboratorios. Trabajó en un laboratorio dedicado a comprender la biogénesis de proteínas mitocondriales en el Instituto de Fisiología Celular. Trabajó en el laboratorio del Director de la Facultad de Química con proteínas de ciclo celular de plantas. Realizó una estancia en el laboratorio en el que hoy en día se encuentra, dedicado a entender la regulación de la expresión genética en enfermedades multifactoriales como la Obesidad Infantil y la Diabetes Mellitus tipo II motivo por el cual en el último año de su Carrera decidió realizar su tesis en este laboratorio para estudiar los microRNAs de humano y su participación en estas enfermedades multifactoriales. En los cuatro años de Carrera ha conocido distinguidos investigadores, expertos en sus áreas, una experiencia realmente única. Ha asistido a Congresos Nacionales de Bioquímica de animales y plantas realizados por la Facultad de Medicina y Facultad de Química; a Congresos sobre Genómica Estructural, Comparativa y Funcional, su aplicación en las enfermedades multifactoriales, en el Centro de Ciencias Genómicas y en el Centro Médico Nacional Siglo XXI. También ha participado en el curso teórico-práctico "Introducción a la comunicación pública de las matemáticas" impartido por el Instituto de Matemáticas de la UNAM. Ha sido expositor invitado en su Carrera, en la Carrera de Biología de la Facultad de Ciencias y en la Preparatoria #5 "José Vasconcelos", para dar pláticas sobre "Biogénesis mitocondrial", "Metabolismo mitocondrial", "Los microRNAs y su participación en enfermedades multifactoriales como el Cáncer" y "La probabilidad en la herencia de las enfermedades tipo Mendelianas". Esto demuestra el interés que tiene por transmitir el conocimiento a las futuras generaciones.

El presente trabajo lo realizó en la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría 4to piso, en la Unidad de Genética de la Nutrición (UGN) bajo la tutela del Dr. Juan Miranda Ríos. Con la estancia de cuatro años en este grupo ha presentado en cuatro ocasiones sus resultados en forma de cartel en las Reuniones Anuales de Alumnos de la LIBB, en la Celebración de los 40 años de la misma y en 2017 en el II Foro Estudiantil de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a **UGN, Pediatría, Biomédicas, Medicina, Prepa 5** y a mi casa la **UNAM**.

Gracias **tutor Dr. Miranda** por la confianza y por transmitirme el gusto por los microRNAs.

Gracias por las observaciones y los valiosos comentarios del **Dr. Victor Ambros** (uno de los descubridores de los microRNAs).

Gracias **Dr. Becerra** por su comentario en alguna clase: una persona que habla tan bien de let-7 o de los microRNAs es porque realmente ama a los microRNAs.

Gracias lab. 2 de UGN: **Laura, Marta, Gus, Laura P.**

Gracias **Jonathan** por tu apoyo y de forma especial tu comentario de aquella tarde de viernes que cito: "hacer una comparación de regiones-semillas se me hace un método elegante".

Gracias **Dr. Zentella** por transmitirme el gusto y la dedicación para impartir clases, por todo su apoyo, su amistad y por abrirme las puertas de su casa.

Gracias **Dr. Santibáñez** por su pensamiento que tiene sobre la ciencia y por brindarme la visión que hoy tengo sobre las enfermedades multifactoriales.

Gracias **Dr. Soto** y al **Dr. González** porque influyeron en mi para realizar un análisis global de los microRNAs.

Gracias a mis maestros: **Dr. Vázquez, Dr. Lazcano, Dra. Lara, Dr. Peña, Dra. Martínez, Dr. Padilla, Dr. Dávila, Fontanelli, Jorge Z., Elpidio, Myngiar, Rodolfo, Carlos Romero, Teresita de Labardini, Gisselle Hofmann, Socorro, Tavizón.**

Gracias **maestra Cecilia** por apoyarme en uno de los momentos más difíciles de mi vida.

Gracias **maestra Ruth** por apoyarme en los temas de inglés.

Gracias a **las generaciones** de *C. elegans*, a los **animales experimentales** y a los **pacientes** de los cuales se han podido obtener diferentes muestras para estudiar a los microRNAs.

Gracias a todo **el mundo** de los microRNAs que han depositado sus secuencias en miRBase ya que sin esa información no hubiera sido posible este trabajo.

Gracias al **personal** de la biblioteca de Biomédicas: Laura, Fabiola, Claudia, Janet y Luis, así como a las licenciadas Lucía Brito y Martha Cariño.

Gracias **Doña Mary** por hacer amena mi estancia en la biblioteca de Biomédicas.

Gracias **Cynthia e Irene** por estar conmigo en las frustraciones, gracias por ser mi familia.

Gracias **Adrián, Andrea, Dominique, Betty, Arlen y Alberto**, por todo su apoyo en la carrera, por las discusiones, las fiestas, las pizzas, el fútbol, por compartir su conocimiento, gracias amigos, los admiro.

Gracias **Gil y Miroslava** por ser mis mejores amigos.

Gracias **Sharon** porque hiciste que me gustara la biología.

Gracias **Geo** por el apoyo en la edición del formato del escrito y gracias **Akram** por la asesoría en la elaboración de árboles filogenéticos.

Gracias **Maga, Oz, Josué, Hugo, Miriam, Rubí, Pepex, Kary**, a **los Luna, los Valdespino, los Reyes, los García**, a los **434, los 506, los 609**, a las **generaciones #43 y #44** de mi carrera, a **the lunaticos**, a los **pHs** y a mis **alumnos**.

DEDICATORIA

Dedicada a ti **madre** porque te amo. Este regalo es para ti porque me has apoyado tú sola en toda mi vida. No cualquier mujer hace lo que has logrado, sin duda este trabajo no es solo mío sino completamente tuyo, este trabajo es el reflejo de todos los días en que no he estado. Dedicada a ti **Pepe**, gracias por todos los viajes lunáticos, por todo el apoyo y todo el conocimiento brindado en estos años. Dedicada a **Abigail** y a **Luz Divina** porque simplemente las amo, me hacen mucha falta. Dedicada a ti **Jareny** porque has confiado en mí, espero siempre contar en mi vida contigo, gracias por todo. Dedicada a mis mascotas porque oyeron mis frustraciones: a mi difunto perro **Shark** y a mi gata **Sharris**. Dedicada a la **Dra. Barbara Mc Clinton** porque con su trabajo nos enseñó que la gente adelantada a su tiempo por lo general es la que termina cambiando la visión del mundo.

La sensación que tengo cuando descubro algo que nadie ha visto jamás es similar a la que he sentido cuando me he enamorado: es indescriptible.



Vida de un *C. elegans*. Hecho por Georgina Luna en 2016.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
1.-INTRODUCCIÓN	6
2.-ANTECEDENTES	22
3.-JUSTIFICACIÓN	23
4.-OBJETIVOS	23
5.-ESTRATEGIA DE TRABAJO	24
6.-METODOLOGÍA	25
7.-RESULTADOS	35
8.-DISCUSIÓN	67
9.-CONCLUSIONES	80
10.-PERSPECTIVAS	81
11.-BIBLIOGRAFÍA	82
12.-ANEXOS	89

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron diferentes aspectos de los microRNAs del nematodo *Caenorhabditis elegans* y de humano usando la información de la base de datos miRBase versión 21 (<http://www.mirbase.org/>): 1) Reclasificación y contexto genómico de los microRNAs de *C. elegans*; 2) Curación sobre la nomenclatura, número de secuencias reportadas y evidencia que apoya la existencia de los microRNAs maduros de *C. elegans* y de humano; 3) Búsqueda de microRNAs homólogos de *C. elegans* en varios organismos bilateria; 4) Agrupación de los microRNAs de *C. elegans* y los de humano en familias; 5) Estudio específico de las familias de let-7, lin-4/miR-125, miR-1, miR-9/miR-75, miR-34, miR-35, miR-100/miR-51 y miR-124.

1) En miRBase para *C. elegans* se tiene registro de 250 microRNAs precursores de los cuales aquí se reclasificaron a 140 como intergénicos (56%), 70 como intrónicos (28%), 5 como exónicos (2%) y 35 como antisentido (14%). 2) Para la curación de los datos de miRBase sobre *C. elegans* y humano, se creó una base de datos donde se almacenaron las secuencias de nucleótidos de 447 microRNAs maduros del nematodo y de 2813 de humano, con la nomenclatura que miRBase sugiere, haciendo énfasis en el brazo 5p o 3p del cual proviene cada uno. Aquí se corrigió la nomenclatura de 53 de 447 (12%) de los microRNAs maduros del nematodo y 902 de 2813 (32%) de humano. Se encontró que 424 de 447 (95%) de los microRNAs maduros del nematodo y 2272 de 2813 (80%) de los de humano tienen evidencias experimentales que sugieren que existen. 3) Por otra parte, se encontró que *C. elegans* tiene microRNAs homólogos de las familias de let-7, lin-4/miR-125, miR-1, miR-9/miR-75, miR-34, miR-100/miR-51 y miR-124, con organismos bilateria. De manera interesante estas familias en humanos se han asociado a diferentes enfermedades multifactoriales. 4) Posteriormente se agruparon familias de microRNAs maduros en *C. elegans* y en humano usando el criterio de región-semilla idéntica (posición 2-7). Se encontró que 161 de 447 (36%) de los microRNAs maduros de *C. elegans* y 1932 de 2813 (69%) de los microRNAs de humano, se agrupan en 55 y 624 familias respectivamente. Entre los 2 organismos se formaron 160 familias donde 226 de 447 (50%) de los microRNAs maduros de *C. elegans* presentan una región-semilla idéntica que también se encuentra en 332 de 2813 (12%) microRNAs maduros de humano. 5) Por último, se analizó la familia de cel-miR-35 y su relación con hsa-miR-181d-3p porque presentaron la misma región-semilla. Se encontró que todos estos microRNAs presentan sitios de hibridación similares con *gld-1* (gen del nematodo) y *NANOS3-003* (gen de humano). Estos últimos 2 genes pertenecen a la familia de *NANOS*, una familia que participa en la diferenciación de las células de la línea germinal.

ABREVIATURAS

*miR-X	miRNA que no se ha citado en la literatura como miembro de una familia en la que aquí se agrupó
**miR-X	miRNA de cualquier organismo bilateria excepto de <i>C. elegans</i> y humano
454	Pirosecuenciación o secuenciación cuatro cincuenta y cuatro
5' y 3' UTR	Región del 5' y 3' no traducido
12h	12 horas
18S	rRNA 18S
Act5C	Actina 5C
AGO	Proteína Argonauta
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl-2	Linfoma 2 de células B
BH3	Dominio homólogo a Bcl-2
CACCGG	Región-semilla de la familia de cel-miR-35
CDC	"Cell division cycle"
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
Cel	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cel-miR-35	Familia de los miRNAs maduros de miR-35 de <i>C. elegans</i> : miR-35-3p, -36-3p, -37-3p, -38-3p, -39-3p, -40-3p, -41-3p, -42-3p
cel-miR-51	Familia de los miRNAs maduros de miR-51 de <i>C. elegans</i> : miR-51-5p, -52-5p, -53-5p, -54-3p, -55-3p y -56-3p
cel-miR-58	Familia de los miRNAs maduros de miR-58 de <i>C. elegans</i> : miR-58-3p, -80-3p, -81-3p, -82-3p y miR-1834-3p ahora llamado miR-58b-3p
cel-mirc-35	Clúster del gen o precursor de mir-35 en <i>C. elegans</i> : mir-35, mir-36, mir-37, mir-38, mir-39, mir-40, mir-41
cel-mirc-42	Clúster del gen o precursor mir-42 en <i>C. elegans</i> : mir-42, mir-43, mir-44
ceRNAs	RNAs endógenos competitivos
CIBIOGEM	Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados
CLIP	"Cross-linking immunoprecipitation"
CLIP-seq	Secuenciación de alto rendimiento acoplada a CLIP
CoREST	Compañero de REST

Cox1	Subunidad 1 de la citocromo <i>c</i> oxidasa o Complejo IV de la cadena transportadora de electrones
CTCF	"CCCTC-binding Factor"
DAF	Gen tipo daf: formación de dauer anormal
DGCR8	Región crítica de la proteína 8 del síndrome DiGeorge
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2F	Factor de transcripción
Egl-1	Gen tipo egl: colocación defectuosa de huevos
EMBL-EBI	Instituto Europeo de Bioinformática que forma parte del Laboratorio Europeo de Biología Molecular
Fbxw11	Caja F con dominios repetidos de WD.
FoxG1	Caja G1 "forkhead"
ftz-fl	Factor de transcripción ftz
gld-1	Gen tipo gld: defecto en el desarrollo de la línea germinal
GFP	Proteína verde fluorescente
GTP	Guanosín trifosfato
hbl-1	Homólogo a hunchback
Hes1	Factor de transcripción que pertenece a la familia de bhlh
HMGA2	Proteína que pertenece al grupo de alta movilidad (HMG) "AT-hook 2"
Hsa	<i>Homo sapiens</i>
hsa-miR-548a	Familia de los miRNAs maduros de miR-548a de humanos: miR-548a-3-5p, -ab-5p, -ad-5p, -ae-2-5p, -ak-5p, -am-5p, -ap-5p, -aq-5p, -ar-5p, -as-5p, -au-5p, -av-5p, -ay-5p, -b-5p, -bb-5p, -c-5p, -d-1-5p, -d-2-5p, -h-1-5p, -h-2-5p, -h-3-5p, -h-4-5p, -i-1-5p, -i-2-5p, -i-3-5p, -i-4-5p, -j-5p, -k-5p, -l-5p, -o-2-5p, -w-5p, -y-5p, -559-5p, -8054-5p
ICA	Inferido por análisis computacional
IDA	Inferido por ensayo directo
IE	Inferido por experimento
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento 1 similar al de insulina
IR	Receptor de insulina
IRS-2	Substrato 2 del receptor de insulina
iTOL	Árbol de la vida interactivo
Kb	Kilobases

KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto
let	Gen tipo let: letal
lin	Gen tipo lin: linaje celular anormal
lncRNA	RNA largo no codificante
MEF2	Factor 2 potenciador de miocitos
MET	Receptor de membrana que pertenece a la familia de cinasas de tirosina
miRAP	miRNA etiquetado y purificado por afinidad
miRNA	microRNA
miRNA*	miRNA estrella
mRNA	RNA mensajero
ncRNA	RNA no codificante
ND1	NADH deshidrogenasa 1
Nhl-2	"ring finger b-box coiled coil"
nt	Nucleótidos
ORF	Marco abierto de lectura
P	Promotor
p53	Proteína denominada el "guardián del genoma"
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Cinasa 3 de fosfoinositidos
piRNA	RNA que se asocia a PIWI
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	Transcrito primario de un miRNA
Qki	Proteína "quakin" de unión a RNA
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativo
RAKE	"RNA-primed, array-based Klenow enzyme"
Rb	Proteína del retinoblastoma
Rbms3	Proteína con motivo de unión a RNA de interacción con cadena sencilla
REST	"RE1-Silencing Transcription factor"
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico

RNA pol II	RNA polimerasa II
RNasa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPM	Número promedio de lecturas por millón
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	Transcripción reversa y PCR
SAGE	Análisis en serie de la expresión genética
siRNA	RNA pequeño de interferencia
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SOLiD	Secuenciación por ligación y detección de oligonucleótidos
STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3
sup-26	Gen tipo sup: supresor
Tlx	Receptor nuclear que pertenece a la familia de Nr2E1
TRBP	Proteína TAR de unión a RNA
Trim45	Proteína que contiene un dominio tripartito
tRNA	RNA de transferencia
UNC	Gen tipo UNC: desordenado
XO	Nematodo macho
XX	Nematodo hermafrodita
wg	Wingless

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-Definición de la palabra gen.

1.1.1.-Incorporación de la palabra gen.

El botánico Gregor Mendel en el siglo XIX propuso que existen entidades "discretas" de la herencia que se transmiten de padres a hijos usando como modelo de estudio el chícharo. Su trabajo fue retomado por Wilhelm Johannsen quien en 1909 le incorporó la palabra gen (del griego "que origina"). Sin embargo, ellos no describieron su naturaleza física [1].

1.1.2.-El gen desde el punto de vista del Dogma Central de la Biología Molecular.

Después de la descripción de la doble hélice por Watson y Crick en 1953 se sugirió que los genes se encuentran físicamente en el DNA [2]. Crick en 1958 enunció lo que se conoce como el Dogma Central de la Biología Molecular, el cual menciona que existe un flujo de información en la célula de DNA a proteína, teniendo como intermediario a la molécula del RNA. El DNA es transcrito a una molécula de RNA que contiene un mensaje específico que se traduce a una proteína particular [3]. Más adelante, se comprendió que el DNA y el RNA pueden replicarse (ver **figura 1**). Después se observó que el flujo inverso de la información genética solo ocurre de RNA a DNA, proceso llamado transcripción inversa [5]. Con este Dogma el concepto de gen se modificó y se describió como una secuencia delimitada en el genoma que codifica a una enzima, una proteína o que se transcribe a una molécula funcional como el RNA ribosomal (rRNA) o RNA de transferencia (tRNA) que participan directamente en la traducción de las proteínas [1]. Este concepto dejó en claro que la definición de gen tendría que estar relacionada con las proteínas ya que en ese tiempo se tenía mejor comprendido que eran las biomoléculas que realizan las funciones celulares y por lo tanto debieran tener un papel importante en la herencia.



Figura 1.-El Dogma Central de la Biología Molecular. Abreviaturas. DNA: Ácido desoxirribonucleico. RNA: Ácido ribonucleico. Ver detalles en el Texto. Modificado de CIBIOGEM en 2016 [4].

1.1.3.-El concepto de gen a partir del Proyecto del Genoma Humano.

En el año 2000 se liberó el primer borrador del genoma humano y proporcionó una cantidad grande de información [1]. Se destacó que cerca del 1% de todo el genoma humano se traduce a proteínas, el 24% son regiones intrónicas y el 75% restante se comparte con regiones repetidas y regiones intergénicas [6]. Con esta información, en el 2002 se modificó el concepto de gen por la Organización de Nomenclatura del Genoma Humano y se definió como un segmento en el DNA que contribuye a una función/fenotipo [1]. Estudios posteriores han demostrado que el 97% del genoma humano se transcribe a diferentes tipos de RNAs, lo que sugiere que esta biomolécula tiene un papel importante en la herencia y no solamente es una molécula intermediaria en el flujo de la información genética [7-9]. Por este motivo, en este estudio se usará la siguiente definición de gen: segmento de DNA que es transcrito a una molécula de RNA que es funcional [6].

1.1.4.-La molécula de RNA.

El RNA es una macromolécula de ácido ribonucleico que realiza una variedad de funciones en las células [9]. Los RNAs se pueden clasificar en: los que codifican a proteínas y los que no (ver **figura 2**). Los RNAs mensajeros (mRNAs) son los RNAs que codifican a proteína. Los demás, son RNAs no codificantes (ncRNAs). Entre ellos se encuentran los RNAs "house-keeping" o estructurales, como los rRNAs y los tRNAs que están relacionados directamente con la traducción. También dentro de los ncRNAs están los reguladores de la expresión genética que se dividen en 2 grandes grupos de acuerdo al número de nucleótidos (nt) que tienen: largos (>200 nt) y pequeños (<50 nt) [11]. Ejemplos de RNAs largos no codificantes son los RNAs endógenos competitivos (ceRNAs) y los RNAs circulares. Ejemplos de los RNAs pequeños no codificantes son los microRNAs (miRNAs), los RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) y los RNAs que se asocian a PIWI (piRNAs) [10]. Este estudio se enfocará en los microRNAs.

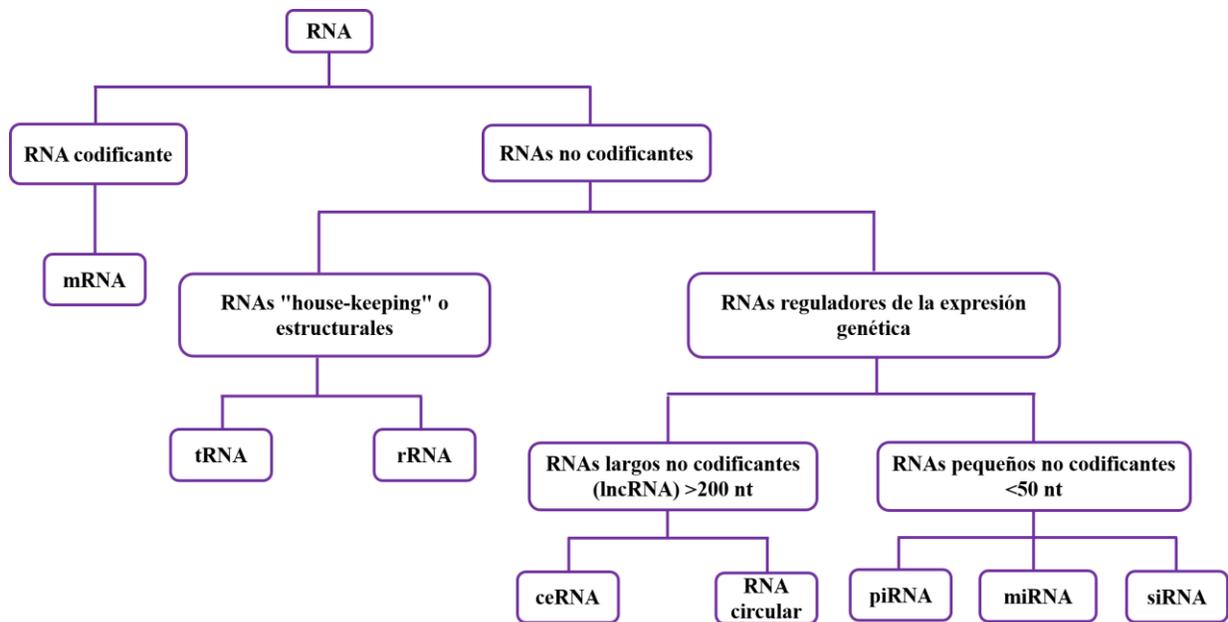


Figura 2.-Ejemplos de tipos de RNAs. Ver detalles en el texto. Modificado de García, L. en 2016 [10,11].

1.2.-El microRNAoma.

1.2.1.-Definición de los microRNAs (miRNAs).

El microRNAoma es el estudio completo de los microRNAs que se conocen de un organismo [12]. Los miRNAs son ncRNAs de longitud ~22 nt que regulan la expresión genética a varios niveles. Su función mejor conocida es la de ser reguladores negativos de la traducción hibridando con secuencias complementarias en el 3' UTR de mRNAs [13]. Se calcula que cerca del 60% de todos los mRNAs de humano están regulados por miRNAs [14]. El papel de los miRNAs es indispensable para mantener un equilibrio en el organismo ya que participan en procesos biológicos importantes como son la proliferación celular, la apoptosis, el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y el metabolismo [15-17]. Actualmente se tienen registros de sus perfiles de expresión en diferentes fluidos corporales como en suero, plasma, saliva, orina, líquido amniótico, entre otros, sugiriendo que se expresan de manera tejido-específica [15]. Por todas estas observaciones se ha propuesto a los miRNAs como reguladores maestros de la expresión genética [15].

1.2.2.-Clasificación de los miRNAs.

Los miRNAs se clasifican de acuerdo a su contexto genómico (localización en el genoma) en intergénicos, intrónicos, exónicos y antisentido. En los genomas los de mayor abundancia son los intergénicos y los de menor presencia son los exónicos [18]. Los intergénicos se encuentran en la distancia que comprende el codón de término de un gen codificante y el codón de inicio del siguiente gen codificante como se observa en la **figura 3a**. Los intrónicos están embebidos en la región de un mRNA que al procesarse se retira y no forma parte del mRNA maduro, mientras que los exónicos son las regiones que sí forman parte de él [20]. También se conocen miRNAs exónicos que provienen de ncRNAs como tRNAs, lncRNAs, entre otros [21]. Los miRNAs intrónicos y exónicos son también llamados miRNAs sentido o antisentido con respecto al gen hospedero en el que están embebidos. Los miRNAs sentido se transcriben junto con el gen hospedero como se muestra en la **figura 3b**. Los miRNAs antisentido se transcriben de forma independiente al gen hospedero porque se encuentran en la hebra complementaria como se observa en la **figura 3c**, motivos por los cuales en este estudio se usará como una nueva categoría [19]. Todos los tipos de miRNAs comparten la característica que para su transcripción están regulados por un promotor (P), los intergénicos y los antisentido tienen su propio promotor como se observa en las **figuras 3a** y **3c** mientras que el promotor de los intrónicos y exónicos es el promotor del gen hospedero en el que se encuentran embebidos como se muestra en la **figura 3b** [18]. Además, los intergénicos, los intrónicos y los antisentido tienen la característica de ser transcritos en unidad o en clúster (ver la **figura 3**) [19].

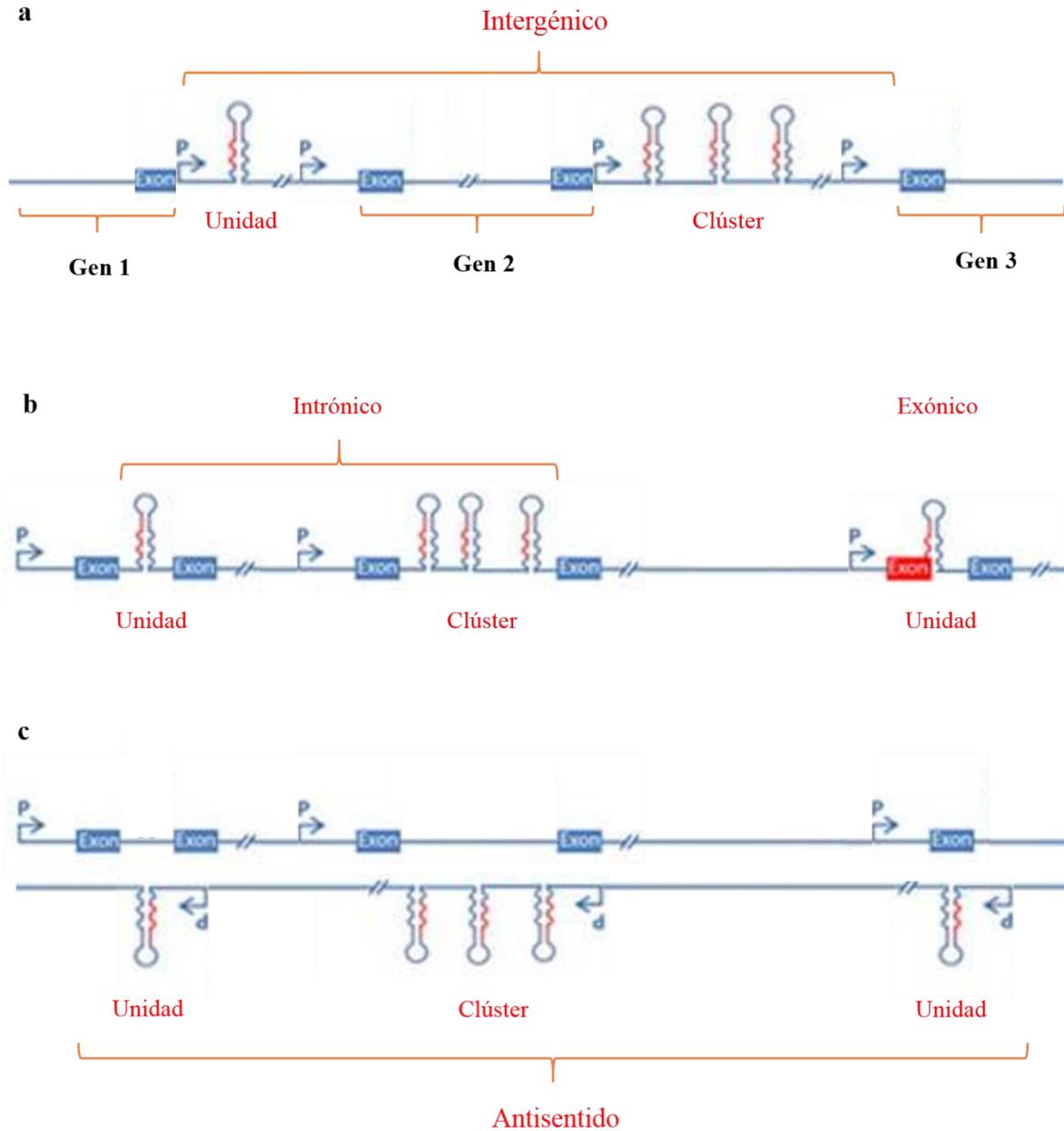
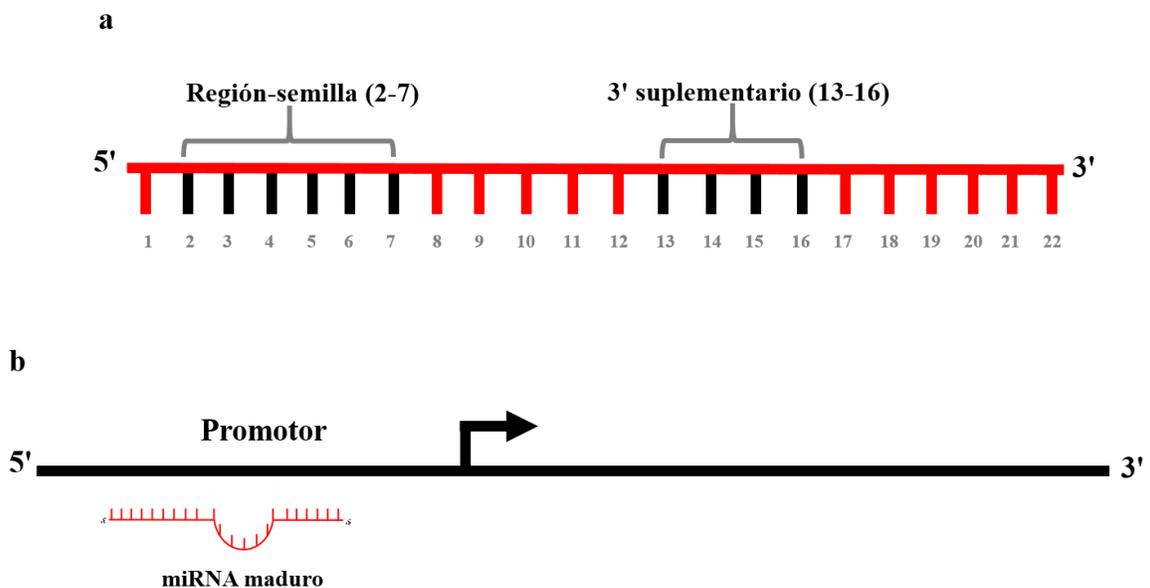


Figura 3.-Clasificación de los miRNAs de acuerdo a su contexto genómico. a Tipos de miRNAs intergénicos. **b** Tipos de miRNAs intrónicos y exónicos. **c** Tipos de miRNAs antisentido. Ver detalles en el texto. Modificado de Chandan, K. 2015 [11,18,19].

1.2.3.-Biogénesis general de los miRNAs de animales.

La biogénesis de los miRNAs inicia en el núcleo, son transcritos principalmente por la RNA pol II como se ilustra en la **figura 4** [18]. Este primer transcrito denominado pri-miRNA forma una estructura característica llamada tallo y asa u horquilla. Sufre modificaciones cotranscripcionales y postranscripcionales como la adición de un cap en el extremo 5' y la adición de una cola de poli-A en el 3' como sucede en los mRNAs [22]. Después es reconocido por el complejo microprocesador conformado principalmente por las proteínas Drosha y DGCR8. Drosha es una RNasa de tipo III que quita las modificaciones de la horquilla "escaneando" la longitud del tallo y corta en la región más distal del asa dejando un RNA de doble cadena con un extremo 3' libre con 2 nt salientes y un monofosfato en el extremo 5' [23]. A este nuevo precursor se le conoce como pre-miRNA y es llevado al citoplasma por la exportina 5 dependiente de Ran-GTP. Una vez en el citoplasma es reconocido por las proteínas TRBP y Dicer (ver **figura 4b**) [18]. Dicer es otra RNasa de tipo III que quita el asa del tallo dejando un dúplex. Dicer corta el pre-miRNA aproximadamente 22-nt a partir del extremo que Drosha estableció. Al igual que Drosha, Dicer deja un extremo 3' libre con 2-nt salientes y un monofosfato en el extremo 5' [23]. Después se une la proteína argonauta (AGO) que juntos forman el complejo de silenciamiento mediado por RNA (RISC). AGO selecciona la hebra que será la encargada de realizar la función mientras que la otra por lo general es degradada. Esta última hebra se citaba en la literatura como hebra pasajera o miRNA* (miRNA estrella) ya que se consideraba que no tenía una función biológica [18]. La era de la secuenciación masiva ha demostrado que las 2 hebras pueden ser funcionales y por ello se prefiere usar una nomenclatura acorde al pre-miRNA: como se observa en la **figura 4c**, el pre-miRNA es un dúplex donde se distinguen los extremos 5' y 3'. Este dúplex contiene 2 hebras también llamadas brazos. El miRNA maduro que proviene del brazo que está próximo al extremo 5' es llamado 5p y el que está próximo al 3' es llamado 3p [24].

Los miRNAs regulan la expresión genética a diferentes niveles. Se ha visto que pueden hibridar con secuencias complementarias de promotores de diferentes genes favoreciendo o reprimiendo su transcripción como se muestra en la **figura 5b** [15]. Se han visto implicados en la biogénesis de otros miRNAs favoreciendo o inhibiendo el procesamiento de Drosha sobre pri-miRNAs como se ejemplifica en las **figuras 5c y 5d** [22]. La función mejor conocida de los miRNAs es la de ser reguladores negativos de la traducción impidiendo la circularización de los mRNAs, promoviendo su degradación u obstaculizando su unión con los ribosomas para evitar su traducción como se ejemplifica en la **figura 5e** [13]. Para realizar este tipo de funciones por lo general hibridan con secuencias repetidas en el 3' UTR del mRNA blanco [13]. También se ha demostrado que los miRNAs pueden ayudar en la unión entre el ribosoma y el mRNA, hibridando con secuencias ya sea en el 5' UTR o en el 3' UTR del mRNA lo que favorece la traducción del mRNA como se muestra en la **figura 5f** [15]. Por otra parte, se ha descrito que varios miRNAs son secuestrados por ceRNAs y por RNAs circulares como se muestra en la **figura 5g**. Este tipo de RNAs son también llamados RNAs esponjas ya que impiden que estos miRNAs realicen sus funciones moleculares aunque también se ha estudiado que otro tipo de miRNAs pueden favorecer la degradación de estos RNAs esponjas liberando miRNAs secuestrados como se muestra en la **figura 5h** [7,27].



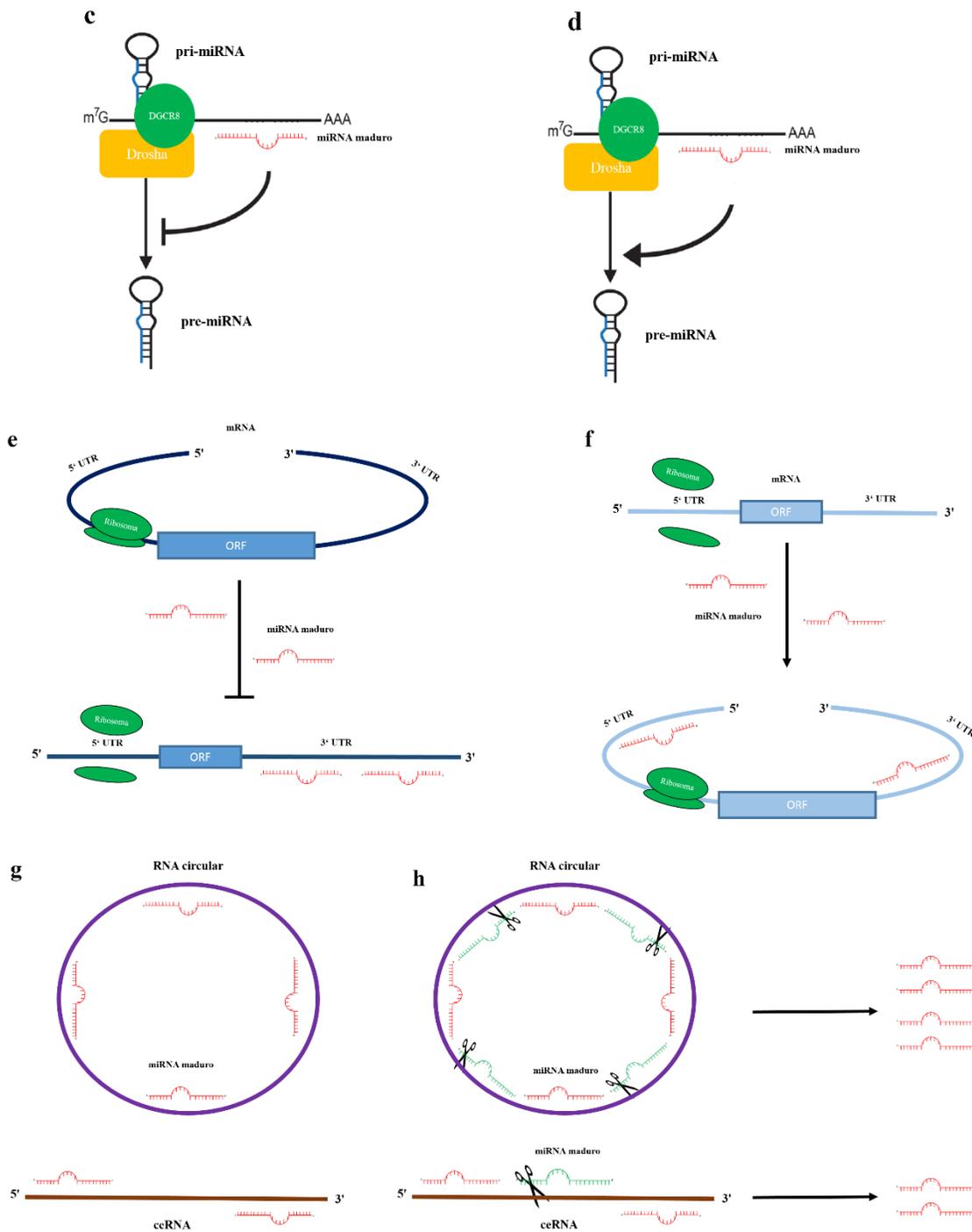


Figura 5.-Modelos de las funciones moleculares de los miRNAs de animales. **a** Cuerpo de un miRNA maduro. **b** miRNA que hibrida con secuencias promotoras. **c** miRNA que hibrida con un pri-miRNA e inhibe el procesamiento por Drosha. **d** miRNA que hibrida con un pri-miRNA y favorece el procesamiento por Drosha. **e** miRNA como regulador negativo de la traducción. **f** miRNA como regulador positivo de la traducción. **g** miRNAs secuestrados por RNAs esponjas. **h** Liberación de miRNAs secuestrados por otro tipo de miRNAs. Abreviaturas. DGCR8: Región crítica de la proteína 8 del síndrome DiGeorge. 5' y 3' UTR: Región del 5' y 3' no traducido. ORF: Marco abierto de lectura. ceRNA: RNA endógeno competitivo. Ver detalles en el texto. Modificado de las siguientes referencias [7,13,15,22,26,27].

1.2.5.-Los miRNAs a nivel evolutivo.

El estudio de las funciones de los miRNAs maduros de animales ha sugerido que la región-semilla es importante ya que si no se encuentra presente, el miRNA no puede regular a sus blancos, por este motivo se considera que la región-semilla tiene una presión de selección lo cual le impide sufrir una mutación y por lo tanto no cambia su secuencia [15,28,29]. Por tal motivo, los miRNAs se pueden agrupar en familias si presentan regiones-semillas idénticas [30]. Las familias pueden estar formadas por miRNAs homólogos de una misma especie o de diferentes especies [31]. Los orígenes de los miRNAs homólogos de la misma especie se explican porque tienen un ancestro en común que presentó al menos una duplicación genética de manera local (en tándem) o de manera no local donde la ubicación del nuevo miRNA por lo general es de manera remota en el cromosoma o incluso está en otro cromosoma con respecto al miRNA ancestral [31]. Si un miRNA ancestral tuvo varias funciones y se duplica, sus funciones se dividen en las copias que se generaron, a esto se conoce como proceso de subfuncionalización. En cambio, si una de las copias del miRNA ancestral adquiere una función novedosa consecuencia de la acumulación de mutaciones, se conoce como proceso de neofuncionalización. Los procesos tanto de subfuncionalización como neofuncionalización son considerados los principales causantes de la aparición de nuevos miRNAs [31].

Los primeros 2 miRNAs descubiertos fueron *lin-4* y *let-7*. *Lin-4* fue descrito por el Dr. Victor Ambros y colaboradores en 1993 [32]. *Let-7* fue descrito por el Dr. Gary Ruvkun y colaboradores en el 2000 [33,34]. El grupo del Dr. G. Ruvkun descubrió que *let-7* está presente en todos los bilateria (organismos con simetría bilateral) incluso en humano, lo que propició un gran interés en la comunidad científica por conocer las funciones de este tipo de RNAs [34]. El descubrimiento de *lin-4* y *let-7* se realizó al estudiar mutantes del nematodo *Caenorhabditis elegans* donde se observó que la ausencia de estos miRNAs afectan gravemente su desarrollo produciendo nematodos infértiles, lo que generó gran interés por conocer las funciones de este tipo de RNAs pequeños no codificantes [32,33].

1.3.-El nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

1.3.1.-Ciclo de vida de *C. elegans*.

C. elegans es un nematodo (gusano redondo) de vida libre de longitud promedio de 1 mm en etapa adulta [35]. Es un organismo eutélico, es decir, tiene el mismo número de células somáticas en etapa adulta. Tiene 2 sexos uno hermafrodita (XX) y otro macho (XO) donde predominan los primeros. Esto le da la posibilidad de autofecundarse o cruzarse por reproducción sexual [35]. Presenta un ciclo de vida corto como se ilustra en la **figura 6**. Tiene un desarrollo embrionario que ocurre en 2 fases: la primera fase llamada *in utero* ocurre en las horas iniciales de su desarrollo donde el cigoto se convierte en un embrión con un número aproximado de 30 células y es expulsado por la madre; la segunda fase se lleva de forma independiente a la madre denominada *ex utero*. Después presenta 4 etapas larvarias (L1, L2, L3, L4) y prosigue a una etapa adulta con la capacidad de reproducirse. Su promedio de vida es de 2 a 3 semanas a 20 °C [36].

Es alimentado en el laboratorio principalmente de una cepa modificada de *Escherichia coli* (OP50) auxótrofa a uracilo [35]. Cuando se encuentra en ausencia de alimento en L1, entra en una fase reversible de crecimiento denominada diapausa [36]. Si se alimenta prosigue su crecimiento normal. Si la privación de alimento hacia la etapa final de L1 persiste, detiene su crecimiento y entra a una fase alterna denominada dauer (del alemán que significa duración) [37]. La morfología que presenta en esta fase es distinguible porque se encuentran las larvas comprimidas y poseen una cutícula altamente especializada. Su faringe se constriñe y no bombea [37,38]. Estos gusanos pueden permanecer en dauer por semanas o incluso meses. Cuando se realimentan llegan a la etapa L4 para proseguir su desarrollo. Otras influencias ambientales que pueden favorecer el dauer son la sobrepoblación y las temperaturas altas (ver **figura 6**) [39].

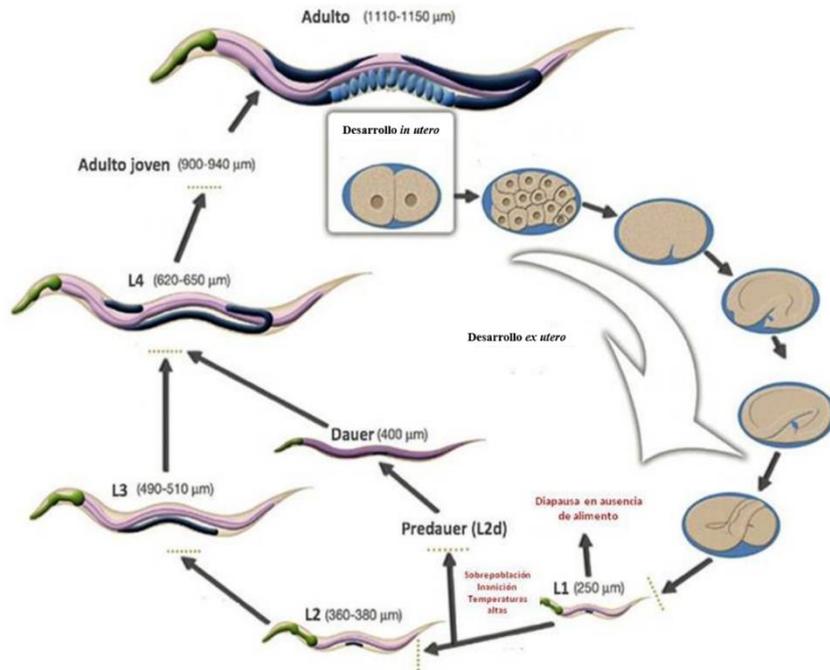


Figura 6.-Ciclo de vida de *C. elegans*. La longitud del animal está junto al nombre de cada etapa de su vida, en micrómetros (μm). Abreviaturas. L1, L2, L3, L4: Etapa larvaria 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Ver detalles en el texto. Modificado de Wormatlas en 2016 [36].

1.3.2.-Historia de *C. elegans* como modelo de estudio en el área de las Ciencias Biomédicas.

La primera descripción de este nematodo fue por la zoóloga francesa Émile Maupas en 1900. Desde ese momento aparece en la literatura. La zoóloga Maupas clasificó el Filo Nematoda, a este nematodo lo clasificó en el género *Caenorhabditis* y en la especie *C. elegans*, como se muestra en la **tabla 1** [40]. La cepa que es usada en los laboratorios, se extrajo de una composta en una granja de hongos en 1950 en Bristol, Reino Unido [41]. En los años 60's se incorporó como modelo de estudio en el área de Biología del Desarrollo [42]. Es el primer eucarionte multicelular del cual se obtuvo su genoma secuenciado en 1998 [43]. Su manipulación en el laboratorio es fácil porque es un gusano no patógeno y se alimenta con medios definidos que contienen nutrientes similares que consume el humano [44]. Se han descrito 15 vías de señalización en el nematodo que también se encuentran en humanos, de las cuales varias pertenecen al desarrollo embrionario. Otra vía de señalización de interés actual y que está presente en el nematodo es la vía de señalización de la insulina [35]. También se encuentran las mismas vías metabólicas de síntesis y

degradación tanto de carbohidratos como de lípidos que hay en humanos, lo que lo hace un buen modelo de estudio en nutrigenómica [35].

El uso de este gusano como modelo de estudio permitió que diferentes investigadores obtuvieran el Premio Nobel en la categoría de Fisiología y Medicina como se describirá a continuación. En el 2002 compartieron este Premio Nobel los Doctores Sydney Brenner, John Sulston y Robert Horvitz. Le fue otorgado al Dr. S. Brenner por implementar a *C. elegans* como modelo de estudio para entender las bases de la genética del desarrollo neuronal siendo el primero en generar cepas mutantes del nematodo [42]. Fue otorgado al Dr. J. Sulston por sus aportaciones en la genética de *C. elegans* y por estudiar los linajes celulares que tiene cada célula a partir del cigoto hasta el gusano adulto [35]. Fue otorgado al Dr. R. Horvitz por describir por primera vez que existe un programa genético en las células que promueve una muerte celular programada llamada apoptosis [35]. En la misma categoría en el 2006 fue otorgado el Premio Nobel a los Doctores Andrew Fire y Craig Mello por la implementación de la tecnología del RNA de interferencia [35]. Además, fue otorgado el Premio Nobel de Química al Dr. Martin Chalfie en el 2008 por generar nematodos transgénicos incorporando al gen reportero GFP o proteína verde fluorescente [35].

Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Rhabditida
Familia	Rhabditidae
Género	<i>Caenorhabditis</i>
Especie	<i>C. elegans</i>

Tabla 1.-Taxonomía de *C. elegans* [40].

1.3.3.-*C. elegans* como modelo de estudio para la comprensión de la regulación de la expresión genética que existe en las enfermedades multifactoriales.

Las enfermedades denominadas multifactoriales se caracterizan porque su etiología no puede ser explicada solo por el componente genético del paciente ni solo la interacción del paciente con el medioambiente, sino que es el resultado de la intersección entre estos 2 componentes, donde el medio ambiente puede modular la expresión genética del paciente como se ilustra en la **figura 7** [45]. Ejemplo de estas enfermedades son la Obesidad, el Parkinson y el Alzheimer, las cuales son estudiadas por varios grupos en el mundo usando como modelo de estudio a *C. elegans* [46]. En este nematodo se puede estudiar cómo se modula su expresión genética ante distintas condiciones de estrés. También se pueden generar nematodos carentes de diferentes genes y conocer si tienen una relevancia funcional ante las diferentes condiciones de estrés en las que se sometan al nematodo [47]. Además, se pueden estudiar las repercusiones que tienen las distintas condiciones de estrés y/o la ausencia de diferentes genes a nivel transgeneracional [48].

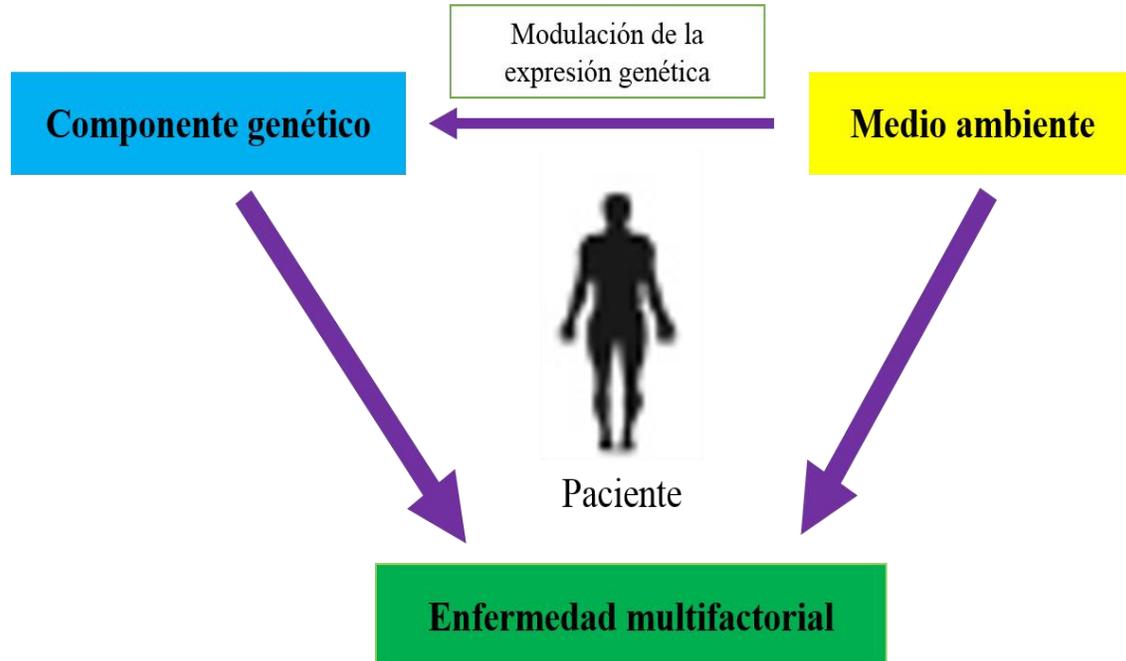


Figura 7.-Etiología de las enfermedades multifactoriales. Ver detalles en el texto. Dibujo modificado de Meunier, J. 2013 [17,45].

1.3.4.-*C. elegans* tiene miRNAs cuyos homólogos en humano se han relacionado con enfermedades multifactoriales.

Varios miRNAs de humano como let-7, miR-125, miR-1, miR-9, miR-34, miR-100 y miR-124, se han asociado a diferentes enfermedades multifactoriales como la Obesidad, la progresión de diferentes tipos de tumores, la metástasis, enfermedades del corazón y enfermedades del cerebro, como se muestra en la **tabla 2** [12,15]. De manera interesante estos miRNAs tienen homólogos en *C. elegans* que se conocen como let-7, lin-4, miR-1, miR-75, miR-34, miR-51 y miR-124, respectivamente.

miRNA	Anotación
Let-7	Se ha visto desregulada su expresión en distintos tipos de cáncer [49].
miR-125	En un estudio de meta-análisis se encontró que en sangre de pacientes de personas obesas está disminuida su concentración [50].
miR-1	Se ha sugerido que tiene un papel en enfermedades del corazón como infarto y arritmias [25].
miR-9	Está implicado en patologías cerebrales humanas. Participa en la progresión de cáncer en el cerebro [51].
miR-34	Pertenece a la red supresora de p53 y se ha sugerido que su desregulación está implicada en el desarrollo de algunos tipos de cáncer [25].
miR-100	Se ha descrito que tiene un papel en la regulación de la apoptosis en células de cáncer de mama [52].
miR-124	Se ha sugerido que inhibe la vía de señalización del factor de transcripción STAT3 en gliomas de cáncer de mama. Esta inhibición suprime una respuesta inmunosupresora [12].

Tabla 2.-miRNAs de humano que presentan miRNAs homólogos en *C. elegans* y que se han asociado a enfermedades multifactoriales. Abreviaturas. p53: proteína denominada el "guardián del genoma". STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3.

1.4.-Bases de datos.

1.4.1.-Las bases de datos como herramientas bioinformáticas.

Una base de datos es un tipo de almacén que permite guardar grandes cantidades de información de forma organizada que después se puede acceder a ella de manera sencilla [53]. Los estudios actuales que generan una cantidad grande de datos como las secuenciaciones masivas han hecho que cobre una mayor relevancia la parte bioinformática y la creación de diversas bases de datos, presentando un nuevo reto para su correcto análisis e interpretación biológica [54]. Para este estudio se usaron principalmente 3 bases de datos: 1.-miRBase, 2.-Wormbase y 3.-RegulonDB. En la **tabla 3** se resume la información que se utilizó de cada una.

Base de datos	Descripción	Enlace
miRBase versión 21	Almacena más de 20 000 secuencias de nucleótidos de miRNAs precursores y maduros de 223 especies y permite su descarga de forma rápida. Proporciona la estructura secundaria de los miRNAs precursores. Presenta la clasificación de los miRNAs, su contexto genómico, enlaces a bases de datos para la predicción de blancos y enlaces de los artículos que han descubierto a cada miRNA.	http://www.mirbase.org/
Wormbase versión WS253	Almacena información sobre <i>C. elegans</i> y nematodos relacionados. Cuenta con la descripción de más de 30 000 genes codificantes y no codificantes de <i>C. elegans</i> . Además, proporciona su ubicación exacta en mapas genómicos.	http://www.wormbase.org/
RegulonDB versión 9.1	Es un modelo de la regulación del genoma de <i>Escherichia coli K-12</i> realizada por el grupo de Investigación del Dr. Julio Collado, del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. Clasifica el tipo de evidencia que apoya la existencia de los diferentes genes que reporta.	http://regulondb.ccg.unam.mx/

Tabla 3.-Resumen de la información que se ocupó de las bases de datos miRBase, Wormbase y RegulonDB.

2.-ANTECEDENTES

miRBase es la principal fuente de información para los miRNAs en el mundo. Tiene reportado para *C. elegans* 250 miRNAs precursores y 434 miRNAs maduros, y para humanos 1881 miRNAs precursores y 2588 miRNAs maduros [25]. Sin embargo, presenta desactualizaciones como las siguientes: un mismo miRNA puede estar clasificado como intrónico, exónico o antisentido; en su nomenclatura puede o no, presentar su brazo (5p o 3p), lo cual provoca confusiones al momento de consultar su secuencia de nucleótidos; y puede que no se mencionen los homólogos que se le han sugerido en la literatura [25].

El Dr. Eugene Berezikov en el 2011 publicó una revisión sobre la distribución de miRNAs en el reino animal. Mencionó que los estudios de secuenciación masiva han mostrado que los miRNAs* de los invertebrados *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*, se agrupan en familias con funciones relevantes, lo que sugiere que tienen una importancia biológica [31]. Sin embargo, mencionó que hay pocos ejemplos de miRNAs* de vertebrados con esta característica [31]. Usó la información registrada en una versión anterior a la actual de miRBase, lo que sugiere que en la versión actual hay miRNAs* de vertebrados que se pueden agrupar en familias con funciones relevantes [31].

En el área de *C. elegans*, el grupo de la Dra. Mónica Driscoll sugirió que 73 de 139 miRNAs maduros de *C. elegans* (52%), presentan homología con los de humano [55]. Por su parte, el grupo del Dr. R. Horvitz sugirió que 30 de 136 miRNAs precursores de *C. elegans* (22%), presentan homología con los de humano [56]. Sin embargo, sus resultados fueron diferentes entre sí y estudiaron un número menor de miRNAs comparado con el número actual reportado en miRBase, lo que sugiere que pueden existir otros miRNAs que presenten homología entre *C. elegans* y humano.

Por último, en nuestro laboratorio se estudiaron miRNAs que cambiaron su acumulación al someter larvas L4 de *C. elegans* a un ayuno de 12 horas (12h) [10,57]. Se encontró que varios miRNAs tuvieron una acumulación diferencial destacando a los miembros del clúster cel-miRc-35 que se acumularon desde 6 hasta 20 veces, lo que sugiere un papel muy importante para estos miRNAs en dicha condición experimental [10,57]. Sin embargo, se desconocen sus funciones moleculares y si presentan homólogos en humano.

3.-JUSTIFICACIÓN

Los miRNAs son biomoléculas consideradas como reguladores maestros de la expresión genética. Sin embargo, es complicado y casi imposible estudiar sus funciones moleculares en humanos por ello se quiere conocer miRNAs de humano que presenten homólogos en organismos modelo como *C. elegans*, que ha brindado un gran conocimiento en la parte Biomédica y donde se pueden estudiar sus funciones moleculares.

4.-OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ✓ Reclasificar, localizar los miRNAs de *C. elegans* y comparar sus miRNAs con los miRNAs de humano.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Reclasificación de los miRNAs de *C. elegans* en intergénicos, intrónicos, exónicos y antisentido.
- ✓ Localización de los miRNAs de *C. elegans* en su contexto genómico.
- ✓ Comparación de los miRNAs maduros de *C. elegans* con los miRNAs maduros de humano.

5.-ESTRATEGIA DE TRABAJO

Se generará una base de datos en diferentes documentos de Excel para los miRNAs de *C. elegans* y de humano donde se obtendrá información de manera manual de las bases de datos miRBase y Wormbase. Esta información se considerará como datos y se estudiará en diferentes categorías como se muestra en la **figura 8**. Para los miRNAs de *C. elegans* se estudiará su reclasificación, su contexto genómico y la homología que presentan sus miRNAs con miRNAs de diferentes especies. Tanto para los miRNAs de *C. elegans* como de humano, se estudiará su nomenclatura, la evidencia que apoya su existencia y los miRNAs homólogos entre los 2 organismos. Todos los datos se convertirán en porcentajes para dar una interpretación global de cada categoría. Por último, se estudiarán familias de miRNAs particulares que estén presentes tanto en *C. elegans* como en humano.



Figura 8.-Esquema general de la estrategia de trabajo.

6.-METODOLOGÍA

6.1.-Reclasificación de los miRNAs de *C. elegans*.

Se obtuvieron de miRBase los nombres de los miRNAs precursores de *C. elegans*, después se buscaron en los mapas genómicos que proporciona la base de datos Wormbase y posteriormente se reclasificaron en intergénicos, intrónicos, exónicos y antisentido, comparando su contexto genómico con lo presentado en la **figura 3**. Para la presentación final de los datos se registró el número total de miRNAs que son intergénicos, intrónicos, exónicos y antisentido. Después, estos números se convirtieron en porcentaje tomando como 100% el número total de precursores encontrados. Por último, se ubicaron los miRNAs precursores en cada 1 de los 6 cromosomas que tiene *C. elegans* y se convirtieron en porcentaje para conocer su distribución global en el genoma del nematodo. Se tomó como 100% el número total de precursores encontrados.

6.2.-miRNAs de *C. elegans* que están en clúster en su genoma.

Se buscó en los mapas genómicos obtenidos de Wormbase el contexto genómico de cada uno de los miRNAs precursores y se identificaron aquellos que se encuentran en clúster. Un clúster cumple con los siguientes criterios: está conformado por al menos 2 precursores, entre cada precursor existe una distancia <10 Kilobases (Kb) como lo reporta miRBase, se encuentran en la misma hebra y entre ellos no hay otro promotor [25,58]. Después se graficó la frecuencia del número de miembros que tiene cada clúster encontrado. Por último se graficó el porcentaje total de clúster que tiene cada cromosoma usando como 100% el número total de clúster encontrados.

6.3.-Actualización de la nomenclatura de los miRNAs maduros de *C. elegans* y de humano.

miRBase tiene una nomenclatura para los diferentes niveles de maduración de los miRNAs que tiene almacenados como se explica a continuación. Los nombres están compuestos por 4 partes como se muestran en la **figura 9**: la primera parte (A) indica la abreviatura del nombre científico del organismo, ejemplos: *Caenorhabditis elegans* (*cel*), *Homo sapiens* (*hsa*). La segunda parte (B) se escribe la palabra mir o miR. Cuando se escribe la "r" se

hace referencia al gen o al precursor. Cuando se escribe la "R" se hace referencia al miRNA maduro. La tercera parte (C) proporciona una mayor información. Primero se agrega el nombre del miRNA que es un número que se asigna de forma secuencial que a su vez depende de 2 criterios: si es un nuevo miRNA descrito se le asigna el siguiente número del mayor que se tenga registro. En caso de existir un miRNA homólogo se le asigna el mismo número que éste tenga. Después se anotan números o letras dependiendo de los siguientes criterios: se agrega un número secuencial si los miRNAs maduros son idénticos pero provienen de precursores diferentes. Para evitar confusiones entre los números de la tercera parte se agrega un nuevo "-" entre ellos. En cambio, se agregan letras secuenciales si son secuencias precursoras muy parecidas. La última parte de la nomenclatura (D) solo es para los miRNAs maduros. Para citar un miRNA maduro se tiene que mencionar el brazo (5p o 3p) de acuerdo a su ubicación en el precursor, como se especificó en la **figura 4c**. Las excepciones para la nomenclatura son let-7, lin-4 y los primeros miRNAs que se descubrieron ya que la segunda y tercera parte no cambia porque conservan su nombre original [24].

Para citar clúster, en el nombre de los miRNAs se agrega una letra "c" en la segunda parte (B) como la que está encerrada en color morado en la **figura 9** [21]. Esta letra puede usarse tanto en miRNAs precursores como en miRNAs maduros para reemplazar a todos sus miembros. El clúster lleva el nombre del miembro con el menor número como se muestra en el siguiente ejemplo y en caso de miRNAs maduros si se define los brazos que tiene el clúster no es necesario mostrarlos en la abreviatura. cel-miRc-35: miR-35-3p, -36-3p, -37-3p, -38-3p, -39-3p, -40-3p, -41-3p [21].

En este estudio se obtuvieron de miRBase de forma manual las secuencias de nucleótidos de los miRNAs maduros de *C. elegans* y de humanos, se registraron con el nombre que tienen en miRBase y se comparó su nomenclatura con la **figura 9** para conocer si tiene las 4 partes. En caso de no tener las 4 partes se completó señalando con un color diferente la parte que se modificó. Para la presentación final se consideraron como datos los miRNAs maduros a los que se completó su nomenclatura y se convirtieron en porcentajes tomando como 100% el número total de miRNAs maduros almacenados para cada organismo.

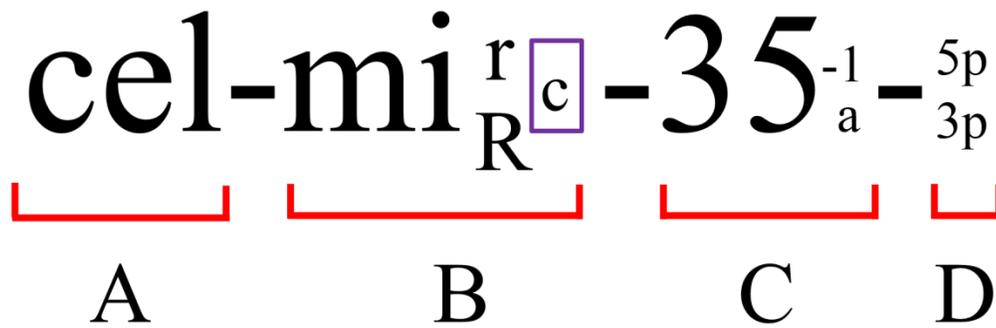


Figura 9.-Nomenclatura de los miRNAs. El nombre de un miRNA maduro está compuesto por 4 partes resaltadas por las letras A, B, C y D. A: organismo. B: mir o miR. C: La parte con mayor información. Primero lleva un número secuencial de acuerdo a su descubrimiento. Después puede llevar un número o una letra del abecedario. D: solo para miRNAs maduros se agrega el brazo 5p o 3p. Letra "c" encerrada en color morado se usa para mencionar que es un clúster. Ver detalles en el texto [21,24].

6.4.-Clasificación de las evidencias experimentales e inferencias bioinformáticas que apoyan la existencia de los miRNAs maduros.

Se hizo una lista de la nomenclatura que usa la base de datos RegulonDB para clasificar las evidencias experimentales e inferencias bioinformáticas que apoyan la existencia de los diferentes genes que reporta (ver **anexo 1** [59]). Posteriormente con los datos reportados en miRBase se realizó una lista de los miRNAs maduros de *C. elegans* y de humanos anotando las metodologías empleadas para el descubrimiento de cada uno. Se clasificaron estas metodologías en categorías utilizando las abreviaturas de la nomenclatura de RegulonDB como se resume en la **tabla 4**. Para su presentación final, se consideraron como datos a cada miRNA clasificado en una categoría. Se sumaron los datos dependiendo de la categoría en la que se ubicaron y se convirtieron en porcentaje tomando como 100% el número total de miRNAs que se almacenaron para cada organismo.

Organismo	Metodología empleada	Categoría (abreviatura de RegulonDB)
<i>C. elegans</i>	Northern Blot, PCR, Clonado.	IDA
	Illumina, CLIP-seq, 454, SOLiD.	IE
	MiRscanII, miRDeep2.	ICA
Humano	Northern Blot, PCR, Clonado, qRT-PCR, RT-PCR.	IDA
	Illumina, CLIP-seq, 454, SOLiD, "Array-cloned", Microarreglo, SAGE, RAKE, Clonado-miRAP.	IE
	MiRscan, MiRscanII, miRDeep2, Por similitud con otro organismo, Meta-análisis.	ICA

Tabla 4.-Abreviaturas de la nomenclatura de RegulonDB usadas en este estudio. Abreviaturas: IDA: Inferido por ensayo directo. IE: Inferido por experimento. ICA: Inferido por análisis computacional.

6.5.-Elaboración de árboles filogenéticos.

Se estudiaron diferentes organismos invertebrados y vertebrados que están registrados en miRBase como se muestra en la **tabla 5**. Los nematodos presentados en la **tabla 5** fueron seleccionados porque están cercanos filogenéticamente con *C. elegans*. Los demás organismos presentados en la **tabla 5** fueron evaluados en la revisión del Dr. E. Berezikov en el 2011 excepto el pollo *Gallus gallus* y la rana *Xenopus tropicalis* [31]. El pollo y la rana se seleccionaron porque son modelos de estudio en biología del desarrollo y porque son organismos vertebrados cercanos filogenéticamente al humano [25].

Para todos estos organismos se descargaron del "GenBank" (banco de genes) las secuencias de nucleótidos de DNA de las subunidades pequeñas de los ribosomas 18S [60]. Como se muestra en la **tabla 5**, se obtuvieron secuencias 18S completas y parciales de este gen en los diferentes organismos evaluados. Solo en la planaria *Schmidtea mediterranea* no se encontró su secuencia. Después con estas secuencias se realizó un alineamiento múltiple en EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) y se generó un árbol filogenético con el algoritmo de "Neighbor joining" [61,62]. Este algoritmo genera una matriz de distancia entre cada organismo o taxón. Calcula las distancias que hay entre cada taxón y une los que están más cercanos formando una topología denominada árbol [62]. Para terminar, se editaron los árboles filogenéticos obtenidos con la herramienta iTOL (<http://itol.embl.de/>) para su presentación final [63].

Bilateria

Vertebrados

Invertebrados

Nematodos

Organismo evaluado	Secuencia 18S encontrada	Acceso
<i>Homo sapiens</i> (humano)	Completa	NR_003286.2
<i>Mus musculus</i> (ratón)	Completa	NR_003278.3
<i>Gallus gallus</i> (gallina)	Parcial	DQ018752.1
<i>Danio rerio</i> (pez cebra)	Parcial	FJ915075.1
<i>Xenopus tropicalis</i> (rana)	Parcial	M32847.1
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca de la fruta)	Completa	NR_133559.1
<i>Ascaris suum</i>	Parcial	KM079654.1
<i>Brugia malayi</i>	Parcial	AF036588.1
<i>Caenorhabditis brenneri</i>	Parcial	U13930.1
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	Completa	JN636061.1
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Completa	NR_000053.1
<i>Caenorhabditis remanei</i>	Parcial	U13931.1
<i>Haemonchus contortus</i>	Parcial	KM586650.1
<i>Pristionchus pacificus</i>	Parcial	JQ699287.1
<i>Panagrellus redivivus</i>	Parcial	AF0803007.1
<i>Strongyloides ratti</i>	Parcial	AB923889.1
<i>Lottia gigantea</i> (molusco)	Parcial	KP274858.1
<i>Schmidtea mediterranea</i> (planaria)	No encontrada	
<i>Nematostella vectensis</i> (anémona)	Completa	AF254382.1

Tabla 5.-Número de acceso en el "GenBank" para el gen rRNA 18S de los organismos evaluados en este estudio [60].

6.6.-Búsqueda de miRNAs precursores de *C. elegans* que presenten homología con los miRNAs precursores de diferentes organismos.

Se buscaron en miRBase y Wormbase el nombre de cada uno de los miRNAs precursores de *C. elegans* en los diferentes organismos anotados en la **tabla 5** [25,64]. Si un miRNA precursor tiene copias en los organismos evaluados se tomaron en cuenta para el estudio. Además, si estos precursores tienen otro nombre como se muestra en la **tabla 6** también se incorporaron. Después los miRNAs encontrados en cada organismo se consideraron como datos para obtener 2 porcentajes de similitud como se menciona a continuación.

Porcentaje de similitud de *C. elegans* con el organismo comparado: número total de precursores de *C. elegans* que presentaron homología con los precursores de determinado organismo, se usó como 100% el número total de precursores que tiene *C. elegans*.

Porcentaje de similitud con respecto a *C. elegans*: número total de precursores de cada organismo evaluado que presentan homología con los precursores de *C. elegans*, se usó como 100% el número total de precursores que tiene dicho organismo.

miRNA de <i>C. elegans</i>	Nombre en invertebrados	Nombre en vertebrados
<i>lin-4, mir-51, mir-57</i>	<i>lin-4, mir-125, mir-10, mir-100</i>	<i>lin-4, mir-125, mir-10, mir-99, mir-100</i>
<i>mir-2</i>	<i>mir-13</i>	
<i>mir-46</i>	<i>mir-281</i>	
<i>mir-72</i>	<i>mir-31</i>	<i>mir-31</i>
<i>mir-74</i>		<i>mir-185</i>
<i>mir-76</i>	<i>mir-76</i>	<i>mir-187</i>
<i>mir-79</i>	<i>mir-79</i>	<i>mir-9</i>
<i>mir-80</i>		<i>mir-143</i>
<i>mir-90</i>		<i>mir-190</i>
<i>mir-124</i>	<i>mir-124, mir-183</i>	<i>mir-124, mir-183</i>
<i>mir-234</i>	<i>mir-137</i>	<i>mir-137</i>
<i>mir-235</i>	<i>mir-25, mir-92</i>	<i>mir-25, mir-32, mir-92</i>
<i>mir-236</i>	<i>mir-8</i>	<i>mir-200b, mir-141, mir-429</i>
<i>mir-238</i>	<i>mir-12</i>	
<i>mir-240</i>		<i>mir-193</i>
<i>mir-241</i>		<i>mir-196</i>
<i>mir-254</i>		<i>mir-19</i>
<i>mir-256</i>		<i>mir-206</i>

Tabla 6.-miRNAs precursores de *C. elegans* que en miRBase y en Wormbase tienen otro nombre en invertebrados y vertebrados. Los lugares vacíos significan que ese miRNA no se encontró en esas especies. La clasificación de animales invertebrados y vertebrados se presenta en la **tabla 5** [25,64].

6.7.-Búsqueda en Excel de familias de miRNAs que tiene *C. elegans* y humano.

A partir de las secuencias de nucleótidos de los miRNAs maduros de cada organismo, se obtuvieron manualmente las regiones-semillas (posición 2-7) y se distinguieron por un código de colores: rojo si son miRNAs 5p y azul si son miRNAs 3p. En un documento de Excel se creó una columna de regiones-semillas. Se utilizó la opción "ordenar y filtrar" de la barra de herramientas para identificar el número de veces que se repite cada región-semilla en la columna. Una vez identificadas las regiones-semillas repetidas, se agruparon en familias los miRNAs maduros de donde proviene cada una. Se agruparon familias de miRNAs maduros para *C. elegans*, para humanos y entre los 2 organismos de manera similar al trabajo del grupo del Dr. R. Horvitz en el 2010 [56].

Los miRNAs maduros que forman parte de una familia se consideraron como datos y se sumaron para obtener el número total de miRNAs que se agruparon en familias. Después se convirtieron en porcentaje usando como 100% el número total de miRNAs almacenados para cada organismo. Además, se graficó la frecuencia del número de miembros que tiene cada familia reportada para *C. elegans* y para humano. En el caso de las familias formadas a partir de los miRNAs que tienen regiones-semillas tanto en *C. elegans* como en humano, se obtuvieron 2 porcentajes de similitud:

Porcentaje de similitud de *C. elegans* con humano. Menciona el porcentaje de los miRNAs maduros de *C. elegans* que tuvieron una región-semilla idéntica con los miRNAs maduros de humano. Se usó como 100% el número total de miRNAs almacenados para *C. elegans*.

Porcentaje de similitud de humano con *C. elegans*. Menciona el porcentaje de los miRNAs maduros de humano que tuvieron una región-semilla idéntica con los miRNAs maduros del nematodo. Se usó como 100% el número total de miRNAs almacenados para humano.

6.8.-Información concentrada para cada familia formada.

Las familias reportadas en este estudio se almacenaron en documentos de Excel con la siguiente información como se ejemplifica en la **tabla 7**. En la primera columna se agregó el nombre del miRNA maduro; después la secuencia de nucleótidos que tiene resaltando la región-semilla en rojo si es un brazo 5p o en azul si es un brazo 3p. Se añadieron el nombre de los cromosomas en los que se encuentran para tener un panorama en general de su contexto genómico (si fueron secuencias idénticas y estuvieron en los mismos cromosomas, se buscó en los mapas genómicos de Wormbase o Ensembl su contexto genómico para conocer si las secuencias empalman o son diferentes [64,65]). Se anotó la familia a la que pertenecen y que está reportada en miRBase. Después se sugirió un nombre para la familia, agregando el prefijo "miR" para resaltar que la relación de los miembros es a nivel de miRNAs maduros. En la última columna se anotaron las abreviaturas usadas en el presente estudio para saber el tipo de evidencia que apoya la existencia de cada miRNA maduro.

Se sugirió un nombre a cada familia tomando en cuenta lo que está reportado en miRBase pero se dio prioridad a los siguientes criterios: se nombró de forma similar a lo reportado en el trabajo del grupo del Dr. R. Horvitz en el 2010 [56]. La familia lleva el nombre del miembro con el menor número y no se mencionan los brazos, como se muestra en el siguiente ejemplo. Familia de cel-miR-35: miR-35-3p, -36-3p, -37-3p, -38-3p, -39-3p, -40-3p, -41-3p y -42-3p. Para las familias que tienen miRNAs de *C. elegans* y humano, se sugirieron dos nombres, uno con respecto a las familias de *C. elegans* y otro con respecto a las familias de humano como se ejemplifica en la **tabla 7**. Si los nombres se repitieron se sugirió el nombre del siguiente miembro de la familia buscando que no se repitiera en ninguna otra familia.

miRNA maduro	Secuencia madura	Cromosoma en el que se localiza	Familia (miRBase)	Nombre de la familia (propuesta)		Tipo de evidencia
cel-miR-4929-3p	AAUGCACCACAUCUUACGCUCA	II				IE
hsa-miR-501-3p	AAUGCACC CGGGCAAGGAUUCU	X	mir-500	miR-4929	miR-501	IDA
hsa-miR-502-3p	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUCA	X	mir-500			IDA

Tabla 7.-Ejemplo de la información que se concentró para las familias de miRNAs almacenadas. Abreviaturas. IE: Inferido por experimento. IDA: Inferido por ensayo directo. Ver detalles en el texto.

6.9.-Estudio de la familia de cel-miR-35 y del miRNA hsa-miR-181d-3p.

Se encontraron nuevas familias de miRNAs entre el nematodo y el humano, aquí se estudió la familia de cel-miR-35 y su relación con el miRNA hsa-miR-181d-3p. Estos miRNAs se clasificaron de acuerdo a su contexto genómico. Después se buscaron miembros de la familia de miR-35 en los diferentes organismos invertebrados y vertebrados mostrados en la **tabla 5** y se registró el número total de miRNAs que tiene cada organismo. Para los organismos que no tienen miembros reportados de esta familia, se almacenaron las secuencias de nucleótidos de sus miRNAs precursores obtenidas de miRBase en un documento de Excel y se usó de la barra de herramientas la opción "Buscar" para localizar la secuencia de la región-semilla [25]. Después se compararon los precursores candidatos que tienen esa región-semilla con la estructura secundaria proporcionada por miRBase para localizar su ubicación en el precursor y observar si está en un brazo que probablemente produzca un miRNA maduro con esta región-semilla [25]. Si es un miRNA candidato se incluyó en el registro. Para el miRNA hsa-miR-181d-3p se buscó como mir-181d en miRBase y se obtuvo una lista de organismos con este miRNA precursor [25]. Después se seleccionaron aquellos miRNAs precursores que tienen una región-semilla idéntica a la de hsa-miR-181d-3p y se registraron el número total de precursores que tiene cada organismo.

Después se compararon las secuencias de nucleótidos de los miembros de la familia de cel-miR-35 y de hsa-miR-181d-3p. Para ello se buscaron que los nucleótidos de hsa-miR-181d-3p estuvieran en la misma posición y fueran idénticos en al menos un miembro de la familia de cel-miR-35. Se pintaron de color azul los nucleótidos que están en la región-semilla y en color verde los nucleótidos repetidos que no forman parte de la región-semilla.

Se buscó en la literatura blancos reportados o predichos para la familia de cel-miR-35 y para hsa-miR-181d-3p. Para los blancos reportados para la familia cel-miR-35 se buscaron sus homólogos de humano en la base de datos KEGG y posteriormente se obtuvieron sus secuencias de nucleótidos en el "GenBank" [60,66]. Como *hsa-mir-181d* se encuentra embebido en un gen llamado *NANOS3-003*, también se obtuvo del "GenBank" su secuencia de nucleótidos [65]. Los números de acceso en el "GenBank" para todos estos genes se muestran en la **tabla 8** [60]. Todas las secuencias de nucleótidos se guardaron en

formato FASTA en documentos de Word. Con la opción "Buscar" de Word, se buscaron las secuencias complementarias que pudieran hibridar con la región-semilla de hsa-miR-181d-3p. Por último, se generaron imágenes donde se muestra la predicción de la hibridación de los blancos de la familia de cel-miR-35 y de hsa-miR-181d-3p. Para ello se modificaron las imágenes que se presentan en las siguientes referencias y/o se hicieron nuevas imágenes dependiendo de los blancos que están reportados en la literatura o fueron sugeridos por el presente estudio [67-71].

Gen	Número de acceso
<i>Qki</i>	NM_206854.2
<i>Fbxw11</i>	NC_000005.10
<i>Rbms3</i>	NM_001003792.2
<i>BH3</i>	XM_017025917.1
<i>Trim45</i>	NC_000001.11
<i>Rb</i>	NM_000321
<i>NANOS3-003</i>	NC_000019.10

Tabla 8.-Número de acceso en el "GenBank" para *Qki*, *Fbxw11*, *Rbms3*, *BH3*, *Trim45*, *Rb* y *NANOS3-003* [60].

6.10.-Búsqueda bibliográfica sobre los miembros de las familias de let-7, lin4/miR-125, miR-1, miR-9/miR-75, miR-34, miR-100/miR-51 y miR-124.

Se hizo una búsqueda bibliográfica en miRBase, Wormbase, además en revisiones y artículos publicados entre 2015 y principios de 2017, para las siguientes familias: let-7, lin4/miR-125, miR-1, miR-9/miR-75, miR-34, miR-124 y miR-100. Se seleccionaron estas familias porque tienen miembros tanto en *C. elegans* como en humanos, además como se mostró en la **tabla 2** del **apartado 1.3.4** de la introducción, los miembros de las familias que están en humano, se han visto implicados en diferentes enfermedades multifactoriales. Para todos estos miRNAs se buscó literatura que mencionara sus funciones moleculares y sus funciones biológicas. También se buscó información de sus homólogos en otras especies que no fueran *C. elegans* y humano. Para su presentación final se generaron tablas donde se compararon sus secuencias de nucleótidos, resaltando la región-semilla (rojo si es 5p y azul si es 3p) así como en verde nucleótidos que estén en la misma posición tanto en el nematodo como en humano. Además, se compararon sus funciones reportadas en los 2 organismos.

7.-RESULTADOS

7.1.-Reclasificación de los miRNAs de *C. elegans* a partir de su contexto genómico.

Se inició este trabajo estudiando los miRNAs de *C. elegans*. Para este organismo se tienen reportados en miRBase versión 21, 250 miRNAs precursores [25]. Como se observa en la **figura 10a** si se suma cada tipo de miRNA clasificado en miRBase como intergénico, intrónico, exónico y antisentido, se obtiene el número 316, número distinto a 250 registrado en miRBase. Como estos números no son iguales se reclasificaron todos los miRNAs. Para ello se buscó en los mapas genómicos que proporciona Wormbase a cada miRNA precursor en su contexto genómico y se comparó con la **figura 3** para clasificar a cada miRNA en una categoría. Con este nuevo criterio se obtuvo lo que muestran las **figuras 10b** y **10c**. Como se muestra en la **figura 10b**, se reclasificaron a 140 miRNAs como intergénicos, 70 miRNAs como intrónicos, 5 miRNAs como exónicos y 35 miRNAs como antisentido. Sumados estos números se obtiene 250, el mismo número registrado en miRBase. Después, estos números se convirtieron en porcentaje y se obtuvo lo que se muestra en la **figura 10c**. Se observó que 56% de los miRNAs son intergénicos, 28% son intrónicos, 2% son exónicos y 14% son antisentido. Por último, se obtuvo el número total de miRNAs precursores que tiene cada 1 de los 6 cromosomas de *C. elegans*. En la **figura 10d** se graficó el porcentaje total de miRNAs precursores que tiene cada cromosoma y se observó que todos los cromosomas contienen precursores destacando el cromosoma X que tiene el mayor porcentaje (28%).

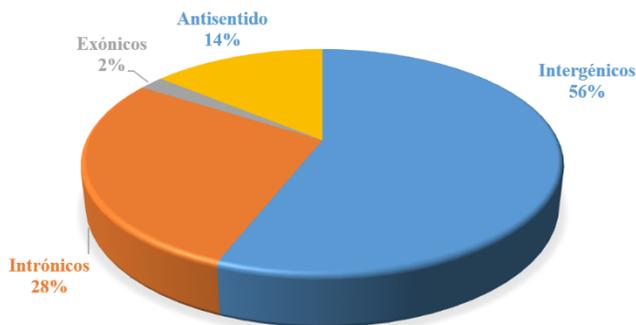
a

Intergénicos	Intrónicos	Exónicos	Antisentido	Total	Total en miRBase				
121	+	110	+	38	+	47	=	316	250

b

Intergénicos	Intrónicos	Exónicos	Antisentido	Total	Total en miRBase				
140	+	70	+	5	+	35	=	250	250

c



d

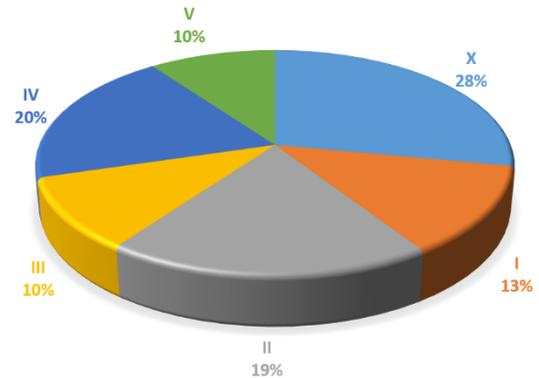


Figura 10.-Números y porcentajes obtenidos de los miRNAs precursores de *C. elegans* reclasificados a partir de su contexto genómico. a Tabla que muestra el número total de cada tipo de precursor usando la clasificación reportada en miRBase. **b** Tabla que muestra el número total de cada tipo de precursor y **c** gráfico circular que presenta el porcentaje global de los precursores usando el criterio de clasificación implementado en el presente estudio. **d** Gráfico circular que muestra el porcentaje global de los precursores que se encuentran en los 6 cromosomas del nematodo. Ver detalles en el texto.

7.2.-miRNAs de *C. elegans* que se encuentran en clúster en su genoma.

Se ha descrito que varios miRNAs pueden transcribirse en clúster por lo cual se contó el número total que tiene *C. elegans* [18]. Para ello se localizaron a los miRNAs en su contexto genómico, después se seleccionaron los que están en clúster y que cumplieron con los siguientes criterios: un clúster tiene al menos 2 precursores, la distancia entre precursores es <10Kb, se encuentran en la misma hebra y entre ellos no existe otro promotor. Se encontraron registrados en miRBase 34 clúster mientras que en el presente estudio con los criterios implementados se registraron 26 como se muestra en la **figura 11a**.

De estos 26 clúster, 18 están conformados por 2 miembros y solo 1 presenta el mayor número de miembros que es cel-mirc-35 con 7 miembros (ver **figura 11b**). Por último se buscaron los clúster en los 6 diferentes cromosomas del nematodo y se encontró que en todos los cromosomas hay clúster destacando que el cromosoma X es el que contiene el mayor porcentaje de ellos (42%) como se muestra en la **figura 11c**.

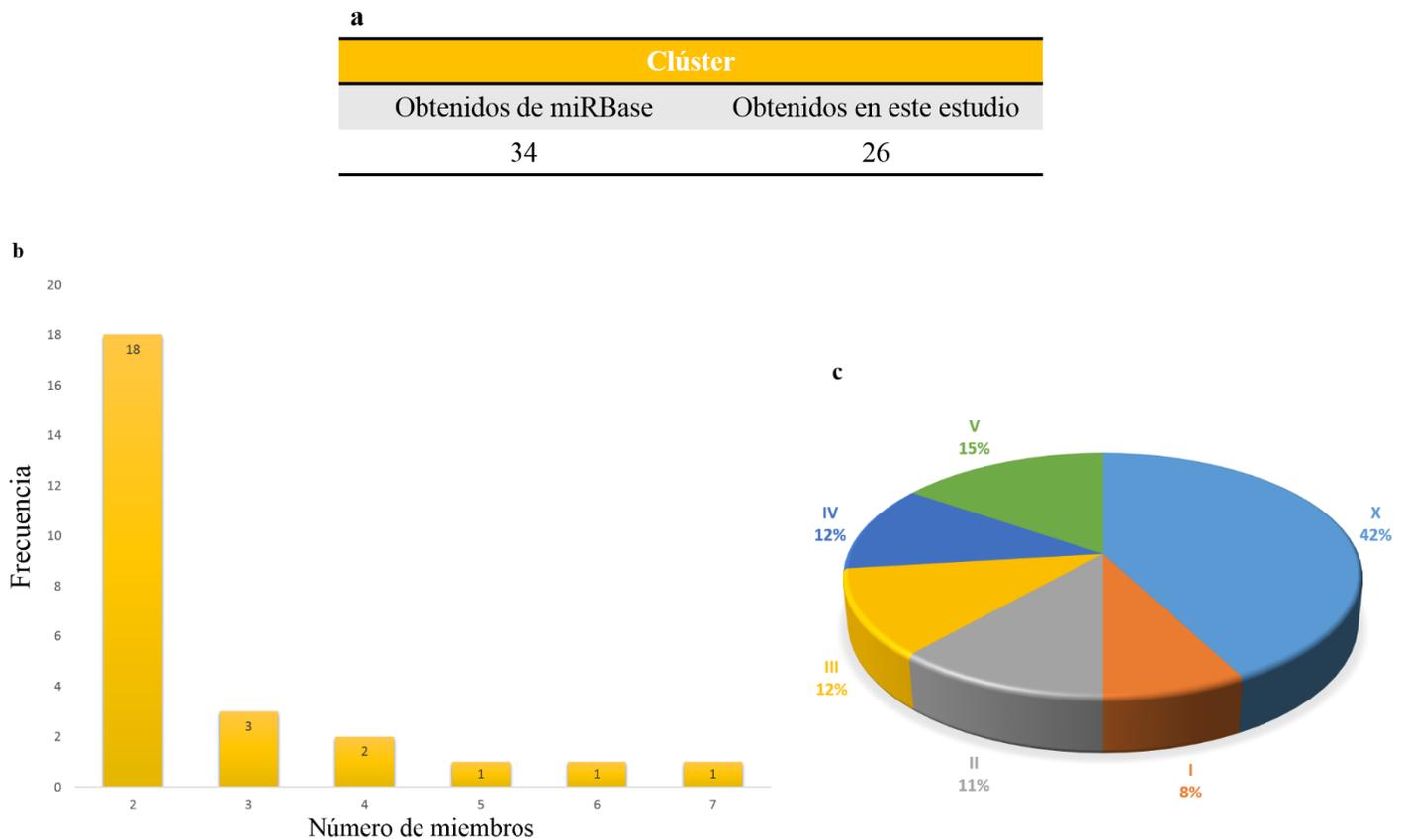


Figura 11.-Números y porcentajes de miRNAs de *C. elegans* que se encuentran en clúster. a Tabla que compara el número de clúster reportados en miRBase y los reportados en el presente estudio. **b** Histograma que muestra la frecuencia del número de miembros que tiene cada clúster. **c** Gráfico circular que muestra el porcentaje de clúster que tiene cada 1 de los 6 cromosomas del nematodo. Ver detalles en el texto.

7.3.-Generación de una base de datos que contiene las secuencias de nucleótidos de los miRNAs maduros de *C. elegans* y de humano.

Una vez conocido el contexto genómico de los miRNAs de *C. elegans*, se continuó con la generación de una base de datos donde se almacenó de manera manual las secuencias de nucleótidos de cada miRNA maduro de *C. elegans* y de humano registradas en miRBase. Durante su almacenamiento, se encontró una desactualización de la información de miRBase por lo cual se curó. Los resultados obtenidos por la curación se presentan en los siguientes **3 apartados**: 1) número total de miRNAs maduros almacenados, 2) nomenclatura correcta para los miRNAs maduros y 3) evidencia que apoya la existencia de cada miRNA maduro. En este **primer apartado** se muestra el número total de miRNAs maduros almacenados.

Se almacenaron para *C. elegans* 447 miRNAs maduros y para humanos 2813 miRNAs maduros como se muestra en las **figuras 12a y 12b**. Estos números son diferentes a los 434 y 2588 que reporta miRBase de *C. elegans* y de humano respectivamente. La explicación del por qué los números son distintos es porque se descargó la secuencia de nucleótidos de cada miRNA de manera individual. Se hizo de esta manera porque hay miRNAs con secuencias idénticas y si se descargan juntas como se muestra en el ejemplo de la **figura 12c**, miRBase proporciona solo una secuencia. En este ejemplo el miRNA hsa-mir-1302 está en multicopia en el genoma de humano. Si se seleccionan estas copias y se le pide a la base de datos que proporcione las secuencias de nucleótidos de los miRNAs maduros, arroja solo una secuencia en representación de las 11 copias (ver **figura 12c**). Como se observa en la imagen de la izquierda de la **figura 12c**, las copias tienen un distinto contexto genómico, lo que sugiere que son copias de un miRNA ancestral [31]. Por este motivo se continuó trabajando con los números obtenidos a partir de las secuencias almacenadas.

a

miRNAs maduros de <i>C. elegans</i>	
miRNAs maduros reportados en miRBase	miRNAs maduros almacenados
434	447

b

miRNAs maduros de humano	
miRNAs maduros reportados en miRBase	miRNAs maduros almacenados
2588	2813

c

miRNA precursor	Nombre de acceso rápido	RPM	Cromosoma	Contexto genómico		Hebra	Confianza	Extraer
				Inicio	Final			
hsa-mir-1302-1	MI0006362	30.1	chr12	112695034	112695176	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-10	MI0015979	178	chr15	101960459	101960596	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-11	MI0015980	193	chr19	71973	72110	+	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-2	MI0006363	193	chr1	30366	30503	+	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-3	MI0006364	178	chr2	113582959	113583096	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-4	MI0006365	192	chr2	207269275	207269424	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-5	MI0006366	56.8	chr20	50614636	50614785	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-6	MI0006367	40.4	chr7	18127220	18127309	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-7	MI0006368	34.7	chr8	141786242	141786313	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-8	MI0006369	31.9	chr9	97363554	97363681	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>
hsa-mir-1302-9	MI0015978	193	chr9	30144	30281	+	-	<input checked="" type="checkbox"/>

Get selected sequences:
 Select sequences and output type, then click "Fetch Sequences": Mature sequence Unaligned fasta format
Fetch Sequences Select all Reset

Figura 12.-Número de secuencias de nucleótidos de miRNAs maduros de *C. elegans* y de humano que fueron almacenadas. a y b Tablas que muestran el número de secuencias de nucleótidos de miRNAs almacenados para *C. elegans* y para humano respectivamente. c Ejemplo del acceso facilitado por miRBase para la secuencia de nucleótidos de un miRNA que está en multicopia. Figura c, modificada de miRBase versión 21 en 2017 [25]. Abreviaturas. RPM: número promedio de lecturas por millón. Ver detalles en el texto.

7.4.-Registro de los miRNAs maduros de *C. elegans* y de humano con su nomenclatura correcta.

Cada secuencia de nucleótidos almacenada se anotó en su nomenclatura si proviene de un brazo 5p o 3p. Se encontraron miRNAs registrados en miRBase con una nomenclatura completa y otros con nomenclatura incompleta donde no se menciona de qué brazo provienen. Los miRNAs con nomenclatura completa están reportados como se ejemplifica en la **figura 13b** (cuadros del lado derecho) mientras que aquellos que presentan una nomenclatura incompleta se encuentran registrados como el ejemplo de la **figura 13c** (cuadro del lado derecho). Se encontró que 53 de 447 (12%) de los miRNAs maduros de *C. elegans* y 902 de 2813 (32%) de los miRNAs maduros de humano tienen su nomenclatura incompleta en miRBase (ver **figura 13a**). Para estos miRNAs se corrigió su nomenclatura sugiriendo el brazo 5p o 3p de la siguiente forma: se buscó la secuencia madura en la estructura secundaria del precursor obtenida de miRBase como se señala en la **figura 13c**. Después, se observó para cada secuencia madura su cercanía con los extremos 5' y 3' y a partir de ello se anotó si eran 5p o 3p en color morado como se muestra en el cuadro inferior de la **figura 13c**.

a

miRNAs maduros con nomenclatura incompleta		
<i>C. elegans</i>	53 de 447	12%
Humano	902 de 2813	32%

b

The figure shows the secondary structure of the hsa-let-7a precursor miRNA. The stem-loop structure is displayed with the 5' and 3' ends. The mature sequence for hsa-let-7a-5p is shown as 6'-UGGGGAGAGUAGGUUGUAAGUU-3' (with the 5' end highlighted in purple). The mature sequence for hsa-let-7a-3p is shown as 57'-CUUACAACUACUGUCUUC-3' (with the 3' end highlighted in purple). The accession numbers MIMAT000062 and MIMAT004481 are provided for each mature sequence, along with a 'Get sequence' button.

c

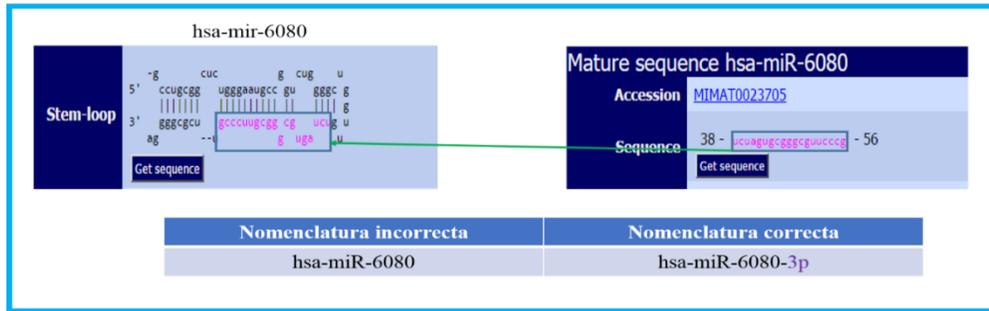


Figura 13.-Números y porcentajes de miRNAs maduros de *C. elegans* y de humano de los que se completó su nomenclatura. a Tabla que muestra el número y porcentaje total de miRNAs que se completó su nomenclatura. **b** Ejemplo de un miRNA obtenido de miRBase que tiene una nomenclatura completa. **c** Ejemplo de un miRNA maduro obtenido de miRBase que tiene una nomenclatura incompleta y que se muestra cómo se completó la misma. Simbología: fecha verde señala la comparación de la secuencia del miRNA maduro y su posición en el pre-miRNA. Figuras de **b** y de **c**, modificadas de miRBase versión 21 en 2016 [25].

7.5.-Registro de la evidencia experimental y de la inferencia bioinformática que apoya la existencia de los miRNAs maduros de *C. elegans* y los de humano.

Durante la descarga de las secuencias de los miRNAs maduros se notó que su evidencia experimental ha sido generada por diferentes metodologías y varios miRNAs solo se han inferido de manera bioinformática. Se notó que la evidencia experimental ha sido generada a su vez por 2 tipos de enfoques: experimentos puntuales y experimentos de tipo masivo. Por su parte, las inferencias bioinformáticas tienen la característica en común de predecir miRNAs en diferentes especies con diferentes programas computacionales. Con estas observaciones y usando las abreviaturas de la base de datos RegulonDB (ver **anexo 1** y **tabla 4**) se clasificó a cada miRNA en una categoría [59]. A continuación, se explica el uso de las abreviaturas para cada una de las categorías en los que fueron clasificados los miRNAs. Inferido por ensayo directo (IDA): se utilizó para integrar a todos aquellos experimentos puntuales donde se quiso conocer un miRNA en particular, como por ejemplo Northern Blot, qRT-PCR, etc. Inferido por experimento (IE): se agruparon estudios con un enfoque masivo, como secuenciaciones masivas o microarreglos. Inferido por análisis computacional (ICA): se agruparon aquellos miRNAs que solo se han inferido de forma bioinformática pero que no se han buscado por métodos experimentales. Todos estos datos se sumaron dependiendo a la categoría a la que pertenecen y se presentaron los datos

finales en los Diagramas de Venn de la **figura 14**. En esta **figura** los Diagramas de Venn tienen 2 conjuntos, IDA e IE. Estos conjuntos representan la evidencia experimental (IDA \cup IE) mientras que lo que no está en ellos representa la inferencia computacional o bioinformática (ICA). Se observó que 424 de 447 (95%) de los miRNAs maduros de *C. elegans* y 2272 de 2813 (80%) de los miRNAs de humano, tienen al menos una evidencia experimental que apoya su existencia. Dentro de la evidencia experimental se observó que 113 de 447 (25%) de los miRNAs maduros de *C. elegans* se han estudiado por experimentos directos (IDA) mientras que para humano son 777 de 2813 (27%) miRNAs maduros. Por otra parte, los miRNAs maduros que se han encontrado por estudios masivos (IE) en *C. elegans* han sido 411 de 447 (92%) mientras que para los miRNAs maduros de humano han sido 1732 de 2813 (61%). Como hay miRNAs que se han descubierto tanto por estudios directos como por estudios experimentales masivos se sugirió que tienen una evidencia robusta. Se observó que para *C. elegans* 100 de 447 (22%) tienen una evidencia robusta mientras que los de humano son 237 de 2813 (8%), como se observa en las intersecciones mostradas en los Diagramas de Venn o en las tablas donde se presentan como IDA \cap IE.

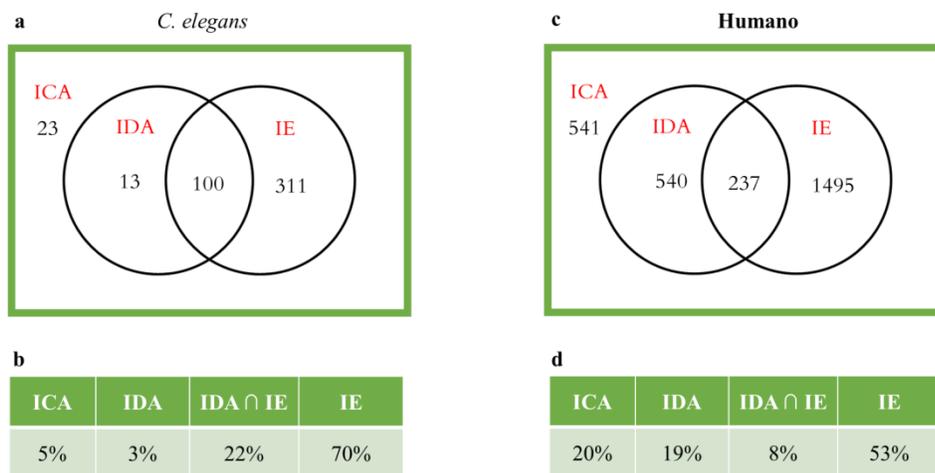
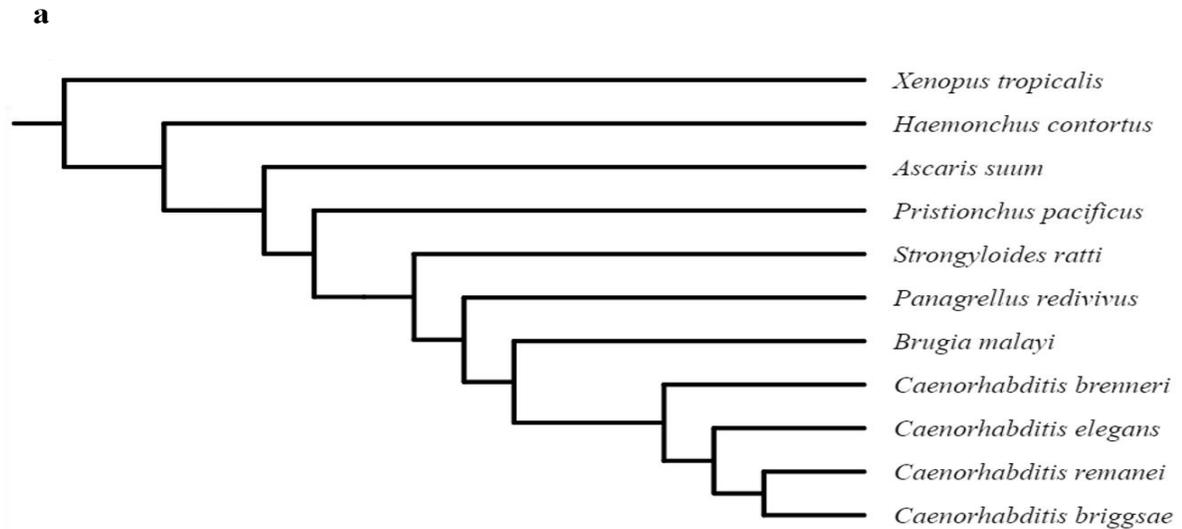


Figura 14.-Números y porcentajes de miRNAs maduros de *C. elegans* y de humano clasificados en una categoría de acuerdo a la evidencia experimental que apoya su existencia. **a** Diagrama de Venn y **b** tabla que muestran los números y porcentajes respectivamente de los miRNAs del nematodo que se clasificaron en las diferentes categorías. **c** Diagrama de Venn y **d** tabla que muestran los números y porcentajes respectivamente de los miRNAs de humano que se clasificaron en las diferentes categorías. Abreviaturas. IDA: Inferido por ensayo directo. IE: Inferido por experimento. ICA: Inferido por análisis computacional. Ver detalles en el texto.

7.6.-miRNAs precursores de *C. elegans* que presentan homología con los miRNAs precursores de los organismos del Filo Nematoda.

Después del almacenamiento de las secuencias de nucleótidos se continuó su comparación para encontrar miRNAs candidatos entre *C. elegans* y humano que puedan ser homólogos. Para ello se siguió una estrategia general usada en estudios evolutivos, primero se comparó con organismos cercanos filogenéticamente al organismo de interés y después con organismos alejados. Aquí se estudiaron primero nematodos y después organismos alejados filogenéticamente a *C. elegans*. En esta parte del estudio se trabajó con la información reportada en miRBase y Wormbase, utilizando solo a los miRNAs precursores. Para la última parte de este estudio comparativo, se analizaron los miRNAs maduros que habían sido previamente almacenados. En este **apartado** se muestran los resultados obtenidos sobre las familias de miRNAs reportadas que hay en el Filo Nematoda.

En la **figura 15a** se muestra un árbol filogenético construido a partir del gen rRNA 18S de todos los miembros del Filo Nematoda disponibles en miRBase y está la rana *Xenopus tropicalis* como un organismo alejado a este Filo. Se observó que los organismos del género *Caenorhabditis* se agrupan en ramas cercanas a *C. elegans* sugiriendo que tienen una cercanía filogenética mientras que los demás organismos no, sugiriendo que están alejados filogenéticamente de éste. Después en la **figura15b** se agregó una tabla con 2 porcentajes de similitud donde se observó que todos los nematodos presentan miRNAs homólogos con *C. elegans*. El primer porcentaje se obtuvo a partir de los miRNAs precursores de *C. elegans* que presentan homología con los miRNAs precursores de cada nematodo presentado. Se encontró que *C. elegans* tiene un mayor porcentaje de similitud con el nematodo *Caenorhabditis briggsae* (43%) mientras que con el que tiene el menor porcentaje de similitud es con el nematodo *Strongyloides ratti* (16%). El segundo porcentaje se obtuvo a partir de los miRNAs precursores que tiene cada nematodo y que presentan homología con los miRNAs de *C. elegans*. Se encontró que los miembros del género *Caenorhabditis* tienen un mayor porcentaje de similitud con *C. elegans* (en promedio 81%), comparando sus porcentajes con los demás nematodos, lo que confirma que están cercanos filogenéticamente como muestra en la **figura 15a**.



b

	Organismo	Porcentaje de similitud de:	
		<i>C. elegans</i> con este organismo	este organismo con <i>C. elegans</i>
	<i>Ascaris suum</i>	20%	48%
	<i>Brugia malayi</i>	16%	30%
	<i>Caenorhabditis brenneri</i>	38%	82%
	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	43%	81%
	<i>Caenorhabditis remanei</i>	42%	80%
	<i>Haemonchus contortus</i>	20%	22%
	<i>Pristionchus pacificus</i>	22%	18%
	<i>Panagrellus redivivus</i>	21%	19%
	<i>Strongyloides ratti</i>	16%	28%

Figura 15.-Porcentajes de similitud con respecto a miRNAs precursores de *C. elegans* que presentan homología con los miRNAs precursores de miembros del Filo Nematoda. a Árbol filogenético del Filo Nematoda. **b** Tabla que muestra porcentajes de similitud. Primera columna: imagen representativa del organismo evaluado y su nombre científico. Segunda y tercera columna: muestran 2 porcentajes de similitud. Las imágenes no están a escala y fueron tomadas de las referencias que se citan a continuación [72-79]. Ver detalles en el texto.

7.7.-miRNAs precursores de *C. elegans* que presentan homología con los miRNAs precursores de organismos que no pertenecen a su Filo.

Después se buscaron los miRNAs de *C. elegans* que presentan homología con miRNAs de organismos que no pertenecen a su Filo. Se analizaron a los siguientes organismos bilaterias: la planaria *Schmidtea mediterranea*, el molusco *Lottia gigantea*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la rana *X. tropicalis*, el pez cebra *Danio rerio*, el pollo *Gallus gallus*, el ratón *Mus musculus* y el humano (*Homo sapiens*). Además, se analizó un organismo no bilateria que es la anémona *Nematostella vectensis*. Se elaboró un árbol filogenético con estos organismos, pero se obtuvo un árbol que mezcló organismos invertebrados con vertebrados (**datos no mostrados**).

Se prosiguió a estudiar la homología de los miRNAs precursores de *C. elegans* y se obtuvo lo que se muestra en la **figura 16**. En esta **figura** se graficaron los porcentajes de similitud obtenidos. Se añadió el porcentaje de similitud de *C. briggsae* como representante del Filo Nematoda. Se encontró que todos estos organismos presentan miRNAs precursores homólogos con *C. elegans*. En la **figura 16a** se graficó el porcentaje de similitud que tiene *C. elegans* con los demás organismos evaluados y se observó que *C. elegans* tienen un porcentaje de similitud en promedio del 11% excepto con el nematodo *C. briggsae* y con la anémona *N.vectensis*. Con esta anémona tiene un porcentaje de similitud del 1%. En la **figura 16b** se graficaron los porcentajes de similitud que tiene cada organismo evaluado, con *C. elegans*. El molusco *L. gigantea* es el organismo alejado al Filo Nematoda que tiene el mayor porcentaje de similitud (41%). También se observó en la **figura 16b** que los vertebrados *X. tropicalis* y *D. rerio* tienen un mayor porcentaje de similitud con *C. elegans* comparando con el porcentaje de similitud obtenido del invertebrado *D. melanogaster* (30%, 26% y 11% respectivamente).

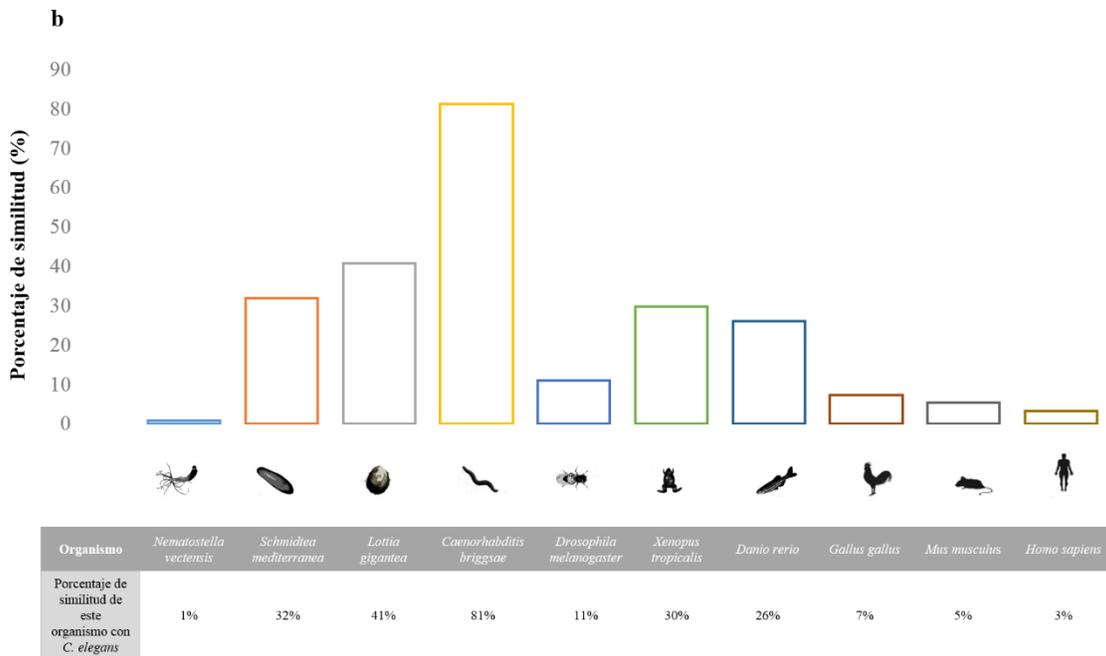
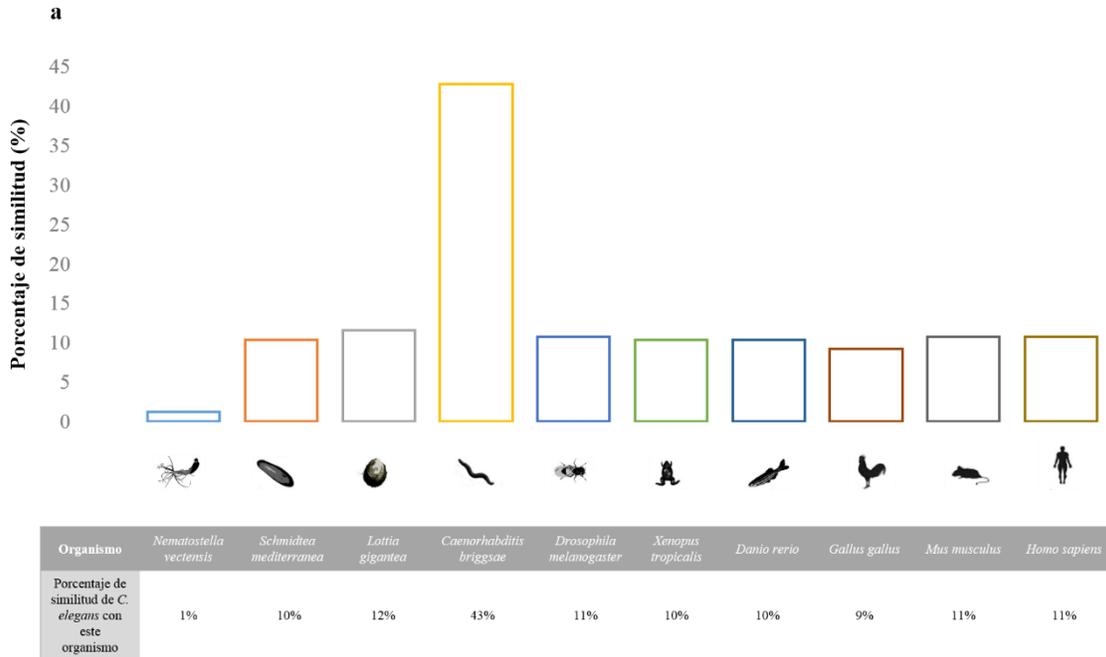


Figura 16.-Porcentajes de similitud con respecto a miRNAs precursores de *C. elegans* que presentan homología con los miRNAs precursores de organismos alejados a su Filo. a Histograma y tabla que muestran los porcentajes de similitud de *C. elegans* con cada organismo evaluado. **b** Histograma y tabla que muestran los porcentajes de similitud de cada organismo con *C. elegans*. Las imágenes no están a escala. Las imágenes se tomaron y se modificaron de las siguientes referencias [17,80-85]. Ver detalles en el texto.

7.8.-Familias de miRNAs maduros en *C. elegans* y en humano.

Se buscaron miRNAs homólogos entre *C. elegans* y humano utilizando las secuencias de nucleótidos de los miRNAs maduros previamente almacenadas. Se obtuvo la región-semilla (2-7) de todos los miRNAs 5p y 3p, y se agruparon en familias. En los siguientes **2 apartados** se expondrán los resultados que se obtuvieron. En este **primer apartado** se presentarán los resultados de las familias de miRNAs que se registraron para cada organismo.

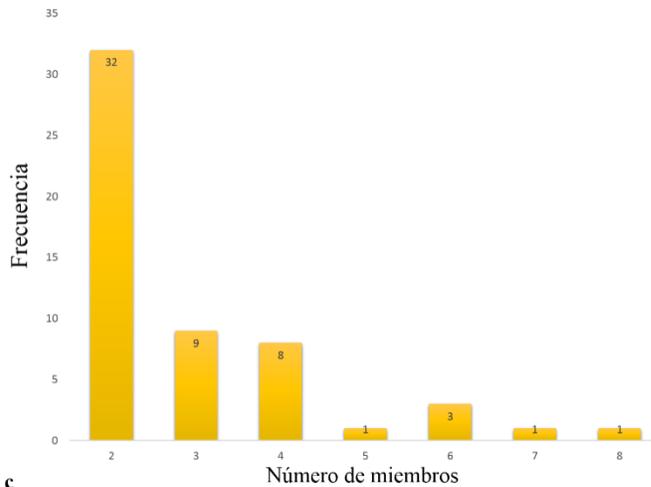
Con el criterio de región-semilla idéntica se agruparon en *C. elegans* 161 de 447 miRNAs maduros en 55 familias como se muestra en la **figura 17a**. Estos grupos contienen al 36% de todos los miRNAs maduros de este nematodo. Para humanos se agruparon 1932 de 2813 miRNAs maduros en 624 familias que representan el 69% (ver **figura 17a**). En los 2 organismos se encontró que las familias con mayor frecuencia son las que tienen 2 miembros como se observa en las **figuras 17b y 17c**. En *C. elegans* se agruparon 32 familias con 2 miembros (más de la mitad de las familias) y en humanos 340 familias (cerca de la mitad de todas las familias). La familia con el mayor número de miembros en *C. elegans* fue cel-miR-35 con 8 miembros mientras que en humano fue hsa-miR-548a con 35 miembros.

Cada familia formada se almacenó con información como se ejemplificó en la **tabla 7** del **apartado 6.8** de la metodología. Se sugirió un nombre a cada familia comparando con lo reportado en miRBase, así como también se comparó la evidencia experimental y la inferencia bioinformática que apoya la existencia de cada miRNA agrupado. Se encontró para cada familia distinta información como la siguiente: hubo familias que todos sus miembros se han estudiado de forma experimental, en otras familias sus miembros solo se han predicho y otras familias tienen miembros tanto predichos como validados de forma experimental.

a

Familias de miRNAs maduros		
Organismo	<i>C. elegans</i>	Humano
Número de familias	55 familias	624 familias
miRNAs totales	161 de 447 miRNAs maduros	1932 de 2813 miRNAs maduros
Porcentaje	36% de los miRNAs totales	69% de los miRNAs totales

b



c

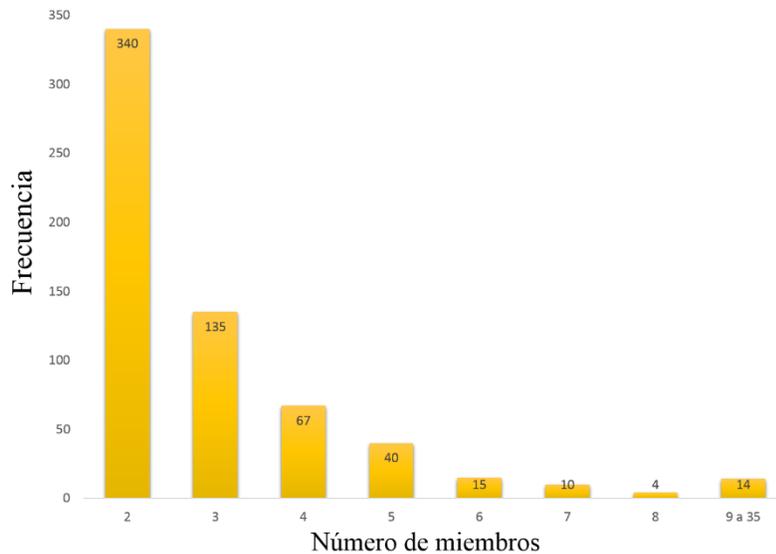


Figura 17.-Número de familias de miRNAs maduros presentes en *C. elegans* y humano. **a** Tabla que muestra los números y porcentajes de las familias de miRNAs de cada organismo. **b** y **c** Histogramas que muestran la frecuencia del número de miembros que tiene cada familia, en *C. elegans* y humano respectivamente. Ver detalles en el texto.

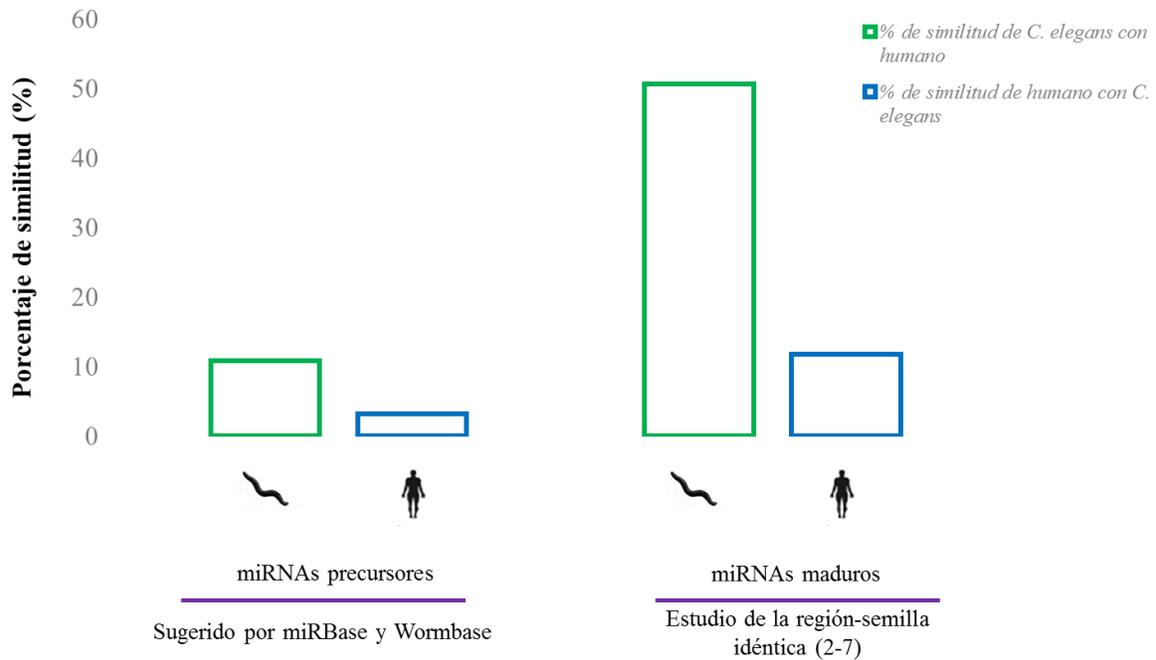
7.9.-Familias de miRNAs maduros que tienen miRNAs tanto de *C. elegans* como de humano.

Usando la misma estrategia para agrupar familias para *C. elegans* y para humano, se agruparon familias que tuvieron miRNAs maduros de los 2 organismos. Se encontraron **160 familias** con diferente número de miembros en los 2 organismos y se anotaron en el **anexo 3**. En este **anexo** se presenta el nombre de cada miRNA encontrado y la región-semilla que se analizó.

En cuanto a números y porcentajes totales se encontró lo que se presenta en la **figura 18**. En el histograma de la **figura 18a** las barras verdes muestran el porcentaje de similitud que tiene *C. elegans* con el humano y las barras azules muestran el porcentaje de similitud que tiene el humano con *C. elegans*. Primero se graficaron los porcentajes de similitud obtenidos en la **figura 16** que corresponden a un análisis realizado con el uso de las bases de datos miRBase y Wormbase. Como se observa en las primeras 2 barras de la **figura 18a**, usando estas bases de datos se sugiere que el 11% de los miRNAs de *C. elegans* presentan homología con el 3% de los miRNAs de humano. En las barras de lado derecho de la **figura 18a** se graficó el porcentaje de similitud a partir de miRNAs maduros que presentan una región-semilla idéntica tanto en *C. elegans* como en humano. Se encontró que el 50% de los miRNAs maduros de *C. elegans* contienen una región-semilla que también se encontró en el 12% de los miRNAs maduros de humano. El 50% se obtuvo de 226 de 447 miRNAs maduros y el 12% se obtuvo de 332 de 2813 miRNAs maduros como se muestra en la **figura 18b**.

Cada familia formada se almacenó como se ejemplificó en la **tabla 7** del **apartado 6.8** de la metodología. Para cada familia la información de la clasificación de la evidencia que apoya la existencia de cada miRNA fue similar a la que se obtuvo para las familias de cada organismo por separado, pero además se encontraron varias familias que los miembros de un organismo solo se han inferido de manera bioinformática mientras que los miembros del otro organismo tienen al menos una evidencia experimental. Hubo familias donde sus miembros en los 2 organismos solo se han predicho de forma bioinformática pero en otros organismos se han visto de manera experimental.

a



b

Números y porcentajes totales	
<i>C. elegans</i>	Humano
226 de 447 miRNAs maduros	332 de 2813 miRNAs maduros
50% de similitud	12% de similitud

Figura 18.-Comparación de los datos de miRBase y Wormbase con este estudio sobre los miRNAs de *C. elegans* que se agrupan en familias con los miRNAs de humano. a Histograma que muestra 2 porcentajes de similitud: 1) usando solo las bases de datos y 2) comparando la región-semilla de los miRNAs. **b** Tabla que muestra el número y porcentaje de miRNAs maduros de *C. elegans* y de humano que tienen la misma región-semilla. Código de colores. Barra verde: Porcentaje de similitud de los miRNAs de *C. elegans* con los de humano. Barra azul: Porcentaje de similitud de los miRNAs de humano con los de *C. elegans*. Las imágenes no están a escala. Las imágenes se tomaron y se modificaron de las siguientes referencias [17,75]. Ver detalles en el texto.

7.10.-Documentos de la base de datos generada en el presente estudio.

Con todos los resultados expuestos hasta ahora se terminó la base de datos. Esta base de datos consta de distintos documentos con diferentes títulos como se presenta en la **tabla 9**. La información que contienen los documentos 6, 7 y 9 no ha sido expuesta en los resultados hasta el momento. El documento 6 tiene información general de los genes hospederos de los miRNAs intrónicos y exónicos, destacando su participación en el metabolismo o en diferentes procesos celulares del nematodo. El documento 7 tiene almacenado los clúster identificados y el nombre propuesto para cada uno, usando la nomenclatura actual resumida en la **figura 9** del **apartado 6.3**. El documento 9 tiene una comparación del número de blancos que se predicen para los miRNAs maduros de *C. elegans* en diferentes bases de datos, destacando que para varios de sus miRNAs se desconocen sus blancos.

En los documentos 12-14 se encuentran registradas las familias reportadas. En este estudio se encontraron 2 tipos de familias: 1) familias ya reportadas en la literatura con nuevos miembros y 2) nuevas familias. Para la última parte de este trabajo, se estudiaron varias familias de los 2 tipos que son de interés actual en nuestro laboratorio.

Documento	Contenido
1	Información registrada en miRBase sobre los miRNAs de <i>C. elegans</i> .
2	Clasificación de miRNAs precursores de <i>C. elegans</i> a partir de lo reportado en miRBase.
3	miRNAs precursores intergénicos de <i>C. elegans</i> obtenidos en este estudio.
4	Clasificación de los miRNAs precursores de <i>C. elegans</i> con el criterio de este estudio.
5	Números totales de los miRNAs precursores de <i>C. elegans</i> clasificados con el criterio de este estudio.
6	Información de los genes hospederos de los miRNAs intrónicos y exónicos de <i>C. elegans</i> .
7	Los clúster que tiene <i>C. elegans</i> .
8	miRNAs precursores de <i>C. elegans</i> que tienen miRNAs homólogos en diferentes organismos.
9	Número de blancos predichos para los miRNAs maduros de <i>C. elegans</i> .
10	Actualización de la nomenclatura de los miRNAs maduros de <i>C. elegans</i> y de humano.
11	Clasificación de la evidencia experimental de los miRNAs maduros de <i>C. elegans</i> y de humano.
12	Familias de miRNAs maduros de <i>C. elegans</i> .
13	Familias de miRNAs maduros de humano.
14	Familias de miRNAs maduros que tienen miembros tanto de <i>C. elegans</i> como de humano.

Tabla 9.-Nombre de los documentos de la base de datos generada en este estudio.

7.11.-miRNAs maduros que tienen una acumulación diferencial en un ayuno de 12h en el estadio larvario L4 de *C. elegans* que presentan una región-semilla idéntica con miRNAs maduros de humano.

En nuestro laboratorio se hizo secuenciación masiva de miRNAs. Las muestras se obtuvieron de gusanos L4 en un ayuno de 12h y de controles normales en el mismo estadio de desarrollo. La secuenciación masiva arrojó una lista de miRNAs maduros de los cuales 15 cambiaron su acumulación de forma positiva (+) o negativa (-) 4 veces comparado al control, de manera significativa [10,57]. En el presente estudio se buscaron sus regiones-semillas en los miRNAs maduros de humano y se encontró que 11 de los 15 miRNAs presentaron una región-semilla idéntica con miRNAs maduros de humano (ver **tabla 10**). Se notó que casi todos los miRNAs de *C. elegans* tienen una región-semilla en el mismo brazo que los miRNAs de humano excepto cel-miR-39-5p y cel-miR-246-3p (ver **tabla 10**). También se notó que el tipo de evidencia que apoya la existencia de cada miRNA de humano es de tipo experimental excepto para hsa-miR-203a-5p porque solo se ha inferido de forma bioinformática (ver **tabla 10**).

miRNA maduro de cel	Secuencia del miRNA maduro	miRNA maduro de hsa	Evidencia que apoya la existencia del miRNA de hsa
miR-35-3p (+) miR-36-3p (+) miR-37-3p (+) miR-38-3p (+) miR-39-3p (+) miR-40-3p (+) miR-41-3p (+)	UCACCGGUGGAAACUAGCAGU UCACCGGUGAAAAUUCGCAUG UCACCGGUGAACACUUGCAGU UCACCGGAGAAAAACUGGAGU UCACCGGUGUAAAUACAGCUUG UCACCGGUGUACAUCAGCUAA UCACCGGUGAAAAUACCCUA CACCGGGGGAUGAAUGUCAC	miR-181d-3p	Secuenciación masiva.
miR-39-5p (+)	AGCUGAUUUCGUCUUGGAAUA UGCUGAUGGCAGAUUCGGUCUG	miR-8075-3p	Secuenciación masiva.
miR-41-5p (+)	GGUGGUUUUCUCUGCAGUGAUA AGUGGUUCUAACAGUUAACAGUU GGUGGUUGAGGCUCGAGUAAGU	miR-203a-5p miR-1273g-5p	Inferido de forma bioinformática. RT-PCR.
miR-240-5p (+)	CGAGGAUUUUGAGACUAGAAUGC AGAGGAUACCCUUGUAUGUU AGAGGAUACCCUUGUAUGUU UGAGGAUGGAUAGCAAGGAAGCC UGAGGAUUGGCAGGGAAAGGGGA	miR-1185-1-5p miR-1185-2-5p miR-3605-5p miR-3679-5p	Clonación. Clonación. Secuenciación masiva. Secuenciación masiva.
miR-246-3p (+)	UUACAUGUUCGGGUAGGAGC AUACAUGUCAGAUUGUAUGCC	miR-4666a-5p	Secuenciación masiva.
miR-34-3p (+)	ACGGCUACCUUCACUGCCACCC		
miR-4813-5p (+)	AGACUAUCUAGGAAAUUUGAACU		
miR-85-5p (-)	CCGAUUUUUCAUAGUUUGAAAC		
let-7-3p (-)	CUAUGCAUUUUUCACCUUACC		

Tabla 10.-miRNAs maduros de *C. elegans* que cambiaron su acumulación de forma significativa en una condición de ayuno de 12h en L4 que presentan una región-semilla que se encuentra en miRNAs maduros de humano. La primera columna contiene los miRNAs de *C. elegans*; la segunda columna la secuencia de nucleótidos de cada miRNA maduro y se resalta con rojo o azul la región-semilla encontrada en los 2 organismos; la tercera columna contiene los miRNAs de humano y la cuarta columna la evidencia que apoya la existencia de cada miRNA de humano. Abreviaturas: cel: *C. elegans*, hsa: *H. sapiens*. Ver detalles en el texto.

7.12.-Clasificación de la familia de cel-miR-35 y de hsa-mir-181d.

En la **tabla 10** resaltó que los miembros del clúster cel-miRc-35 tuvieron una región-semilla idéntica con el miRNA hsa-miR-181d-3p. Previamente en el **apartado 7.2** se enunció que cel-miRc-35 es el clúster que tiene el mayor número de miembros en *C. elegans* con 7 miembros y en el **apartado 7.8** se mencionó que la familia de miRNAs más grande que tiene *C. elegans* es la de cel-miR-35 con 8 miembros. Con estas observaciones se deseó conocer a fondo sobre esta familia. Para iniciar se compararon las clasificaciones de la familia cel-miR-35 y de hsa-miR-181-3p de acuerdo a su contexto genómico. Como se muestra en la **figura 19a** la familia *cel-mir-35* se encuentra en 2 clúster distribuidos en el cromosoma II, el primero es *cel-mirc-35* mientras que el segundo es *cel-mirc-42* (*mir-42*, -43 y -44, donde *mir-43* y -44 no pertenecen a esta familia). En miRBase están clasificados como intrónicos y exónicos antisentido de los genes *Y62F5A.9* y *ZK930.9* respectivamente [25]. Estos 2 clúster fueron nombrados intergénicos porque sobre los genes *Y62F5A.9* y *ZK930.9* no hay información disponible. Para *hsa-mir-181d* se buscó su clasificación en Ensembl porque proporciona mapas genómicos de humano [65]. Se encontró localizado en el cromosoma 19 de humano, clasificado como exónico embebido en el cuerpo de un gen que se transcribe a un ncRNA llamado *NANOS3-003*, y está en clúster con *hsa-mir-181c* como se muestra en la **figura 19b** [65]. El miRNA *hsa-mir-181c* no presenta la región-semilla CACCGG de la familia de cel-miR-35 y de hsa-miR-181d-3p.

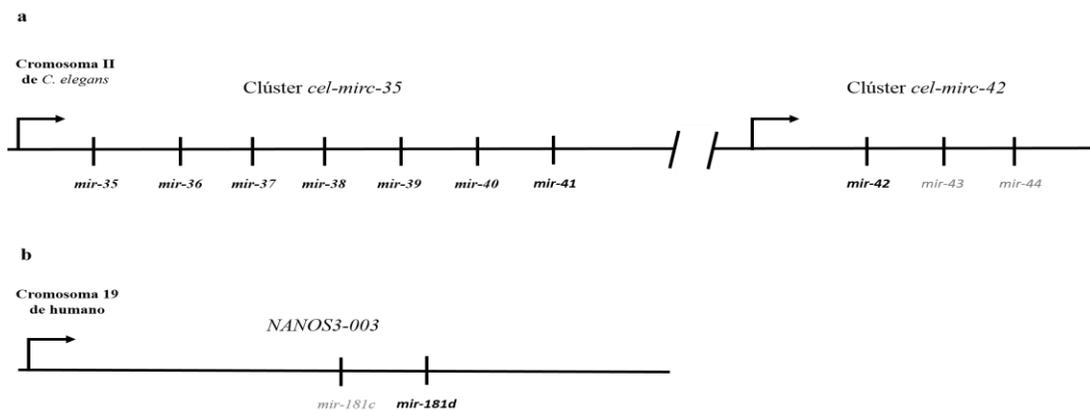


Figura 19.-Clasificación de la familia *cel-mir-35* y de *hsa-mir-181d*. **a** clúster de *cel-mirc-35* y de *cel-mirc-42*. **b** ncRNA *NANOS3-003* tiene embebido a *hsa-mir-181c* y *hsa-mir-181d*. Código de colores. Nombres resaltados en negro son miRNAs que tienen una región-semilla CACCGG. Nombres en gris son miRNAs que no tienen una región-semilla CACCGG. Ver detalles en el texto [65].

7.13.-miRNAs homólogos de la familia cel-miR-35 y de hsa-mir-181d en organismos bilateria.

Se buscaron miRNAs con la región-semilla CACCGG en los organismos estudiados en las **figuras 15 y 16**. Se encontraron miembros de la familia de miR-35 en todos los nematodos y en la planaria *S. mediterranea*. Como se muestra en la **tabla 11**, los nematodos tienen varios miRNAs con esta región-semilla destacando que los *Caenorhabditis* tienen el mayor número de miRNAs, comparando con los demás organismos presentados en esta **tabla**. Después se descargaron los miRNAs precursores de los organismos evaluados en la **figura16** excepto para la planaria *S. mediterranea*. Se buscó en estos precursores la región-semilla CACCGG y se encontró en el molusco *L. gigantea* a los miRNAs precursores lgi-mir-96b y lgi-mir-182 con una secuencia CACCGG en el brazo 3p. También se encontró en el pez cebra al miRNA precursor dre-mir-731 que presenta la misma secuencia en el brazo 3p. Después se buscó en miRBase el miRNA precursor mir-181d y se encontró un miRNA precursor en casi todos los organismos vertebrados señalados en la **tabla 11** excepto en el pez cebra. En estos precursores se buscó la región CACCGG y se encontró en el brazo 3p. Para todos estos miRNAs precursores encontrados excepto lgi-mir-96b, se encontró una G contigua a la región-semilla CACCGG, la misma característica que presentan todos los miembros de cel-miRc-35 y hsa-miR-181d-3p (ver **tabla 10**).

		Organismo	Número de precursores que tienen la región-semilla CACCGG	
		Bilateria	Vertebrados	<i>Homo sapiens</i> (humano)
<i>Gorilla gorilla</i> (gorila)	1			
<i>Pan troglodytes</i> (chimpancé)	1			
<i>Macaca mulatta</i> (macaco)	1			
<i>Rattus norvegicus</i> (rata)	1			
<i>Mus musculus</i> (ratón)	1			
<i>Cricetulus griseus</i> (hámster de China)	1			
<i>Tupaia chinensis</i>	1			
<i>Danio rerio</i> (pez cebra)	1			
Invertebrados	Nematodos		<i>Ascaris suum</i>	6
			<i>Brugia malayi</i>	4
			<i>Caenorhabditis brenneri</i>	26
		<i>Caenorhabditis briggsae</i>	29	
		<i>Caenorhabditis elegans</i>	8	
		<i>Caenorhabditis remanei</i>	20	
		<i>Haemonchus contortus</i>	5	
		<i>Pristionchus pacificus</i>	6	
		<i>Panagrellus redivivus</i>	6	
		<i>Strongyloides ratti</i>	3	
		<i>Lottia gigantea</i> (molusco)	2	
		<i>Schmidtea mediterranea</i> (planaria)	3	

Tabla 11.-Organismos bilateria que tienen miRNAs precursores con la región-semilla CACCGG. Ver detalles en el texto.

7.14.-Blancos reportados de forma bioinformática o de manera experimental para la familia de cel-miR-35 y para hsa-miR-181d-3p.

Se compararon los blancos registrados para la familia de cel-miR-35 y para hsa-miR-181d-3p. Para ello se utilizó el documento 9 que se muestra en la **tabla 9** para buscar el número de blancos que se han predicho para la familia de cel-miR-35. Se comparó el número de blancos predichos con los blancos reportados experimentalmente hasta la fecha para esta familia y se encontró lo que se ilustra en la **figura 20**. Para la familia de cel-miR-35 se encontró que por métodos bioinformáticos en la base de datos TargetScanWorm se le predicen 89 mRNAs blancos [67]. De manera experimental se han sugerido 6 blancos como se muestra en la **figura 20a**. En la **figura 20b** se agregó el tipo de regulación que tiene la familia de cel-miR-35 sobre estos blancos. Después se buscaron blancos predichos por métodos bioinformáticos o blancos sugeridos de manera experimental para hsa-miR-181d-3p pero no se encontró ningún registro como se muestra en la **figura 20c** por lo tanto no se puede comparar ningún blanco.

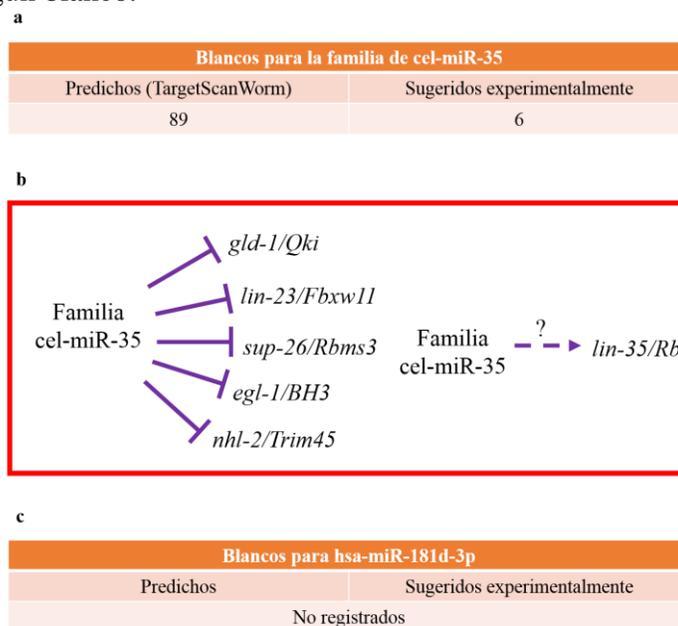


Figura 20.-Blancos predichos y validados para la familia de cel-miR-35 y para hsa-miR-181d-3p. a Resumen del número de blancos predichos en TargetScanWorm y los validados experimentalmente para la familia cel-miR-35. **b** Tipo de regulación de los blancos sugeridos experimentalmente para la familia de cel-miR-35. **c** Resumen de los blancos predichos o sugeridos de manera experimental para hsa-miR-181d-3p. Ver detalles en el texto. **a** y **c** información tomada de las siguientes referencias [25,67]. **b** información tomada de las siguientes referencias [67-71,86-88].

7.15.-Blancos sugeridos en la literatura para la familia de cel-miR-35 y predichos para hsa-miR-181d-3p.

Se realizó una comparación de las secuencias de nucleótidos de los miembros de la familia de cel-miR-35 con hsa-miR-181d-3p. Como se muestra en la **figura 21a** además de tener la región-semilla idéntica, hay nucleótidos (en color verde) que están en la misma posición comparando el miRNA de humano con los miembros de la familia de cel-miR-35. Después se realizó una predicción de blancos para hsa-miR-181d-3p. Para ello se buscó la región con la que hibrida la región-semilla CACCGG. Como se observa en la **figura 21b** las predicciones bioinformáticas de cel-miR-35-3p con sus blancos reportados de forma experimental *lin-23*, *sup-26*, *egl-1* y *nhl-2*, muestran la secuencia con la que hibrida la región-semilla CACCGG [67-70]. Sin embargo, *gld-1* no tiene una hibridación igual a los demás blancos y en el caso de *lin-35* no se encontró ninguna predicción [68,86]. Después se buscaron los homólogos en humanos de todos los blancos sugeridos para la familia cel-miR-35 y se buscó en sus secuencias de nucleótidos la región complementaria para la región-semilla CACCGG, pero no se encontró presente en ninguno de ellos. Por último, se realizó una predicción bioinformática sobre la hibridación entre hsa-miR-181d-3p y su gen hospedero *NANOS3-003*. Este gen se sugiere que se transcribe a un ncRNA [65]. Como se muestra en la **figura 21c** se encontraron 3 posibles sitios de hibridación de hsa-miR-181d-3p con este ncRNA lo que sugiere que puede ser regulado por este ncRNA, puede regularlo o ambos. Como se mostró en la **figura 19b**, *NANOS3-003* tiene embebido 2 miRNAs: *hsa-mir-181c* y *hsa-mir181d*. En la **figura 21c** se señaló la ubicación de estos miRNAs con las rayas amarillas y destacó que están cercanos al segundo sitio que se predice que puede hibridar con hsa-miR-181d-3p.

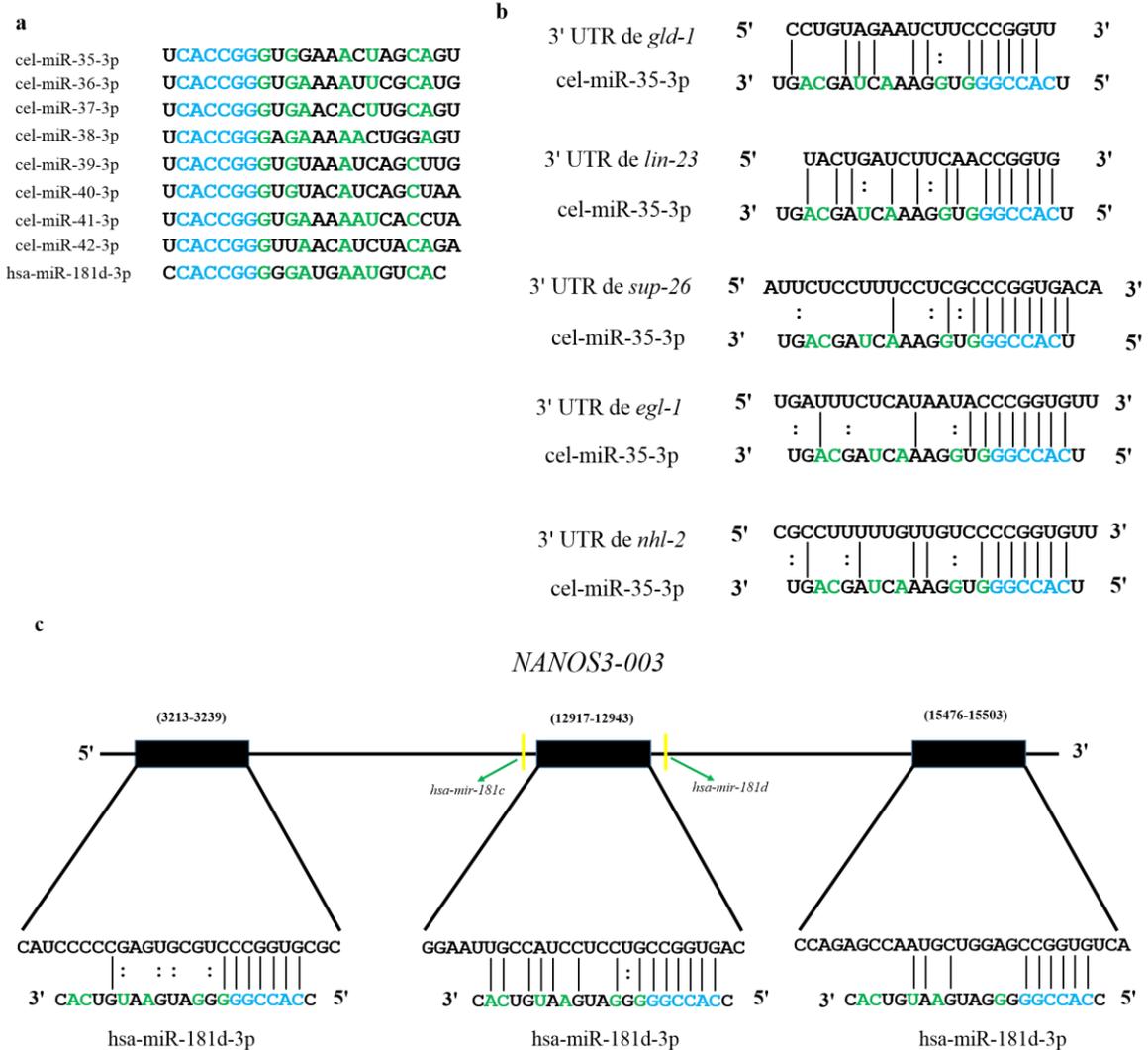


Figura 21.-Predicción bioinformática de blancos para la familia de cel-miR-35 y para hsa-miR-181d-3p.

a Comparación de secuencias de nucleótidos de la familia de cel-miR-35 y de hsa-miR-181d-3p **b** Predicción de la hibridación de cel-miR-35 con secuencias en el 3' UTR de los mRNAs de *gld-1*, *lin-23*, *sup-26*, *egl-1* y *nhl-2*. **c** Esquema que muestra los sitios del ncRNA *NANOS3-003* que pueden hibridar con hsa-miR-181d-3p. Código de colores. Azul: región-semilla. Verde: nucleótido que está presente en la misma posición comparando los miRNAs del nematodo con el de humano y que no es parte de la región-semilla. Simbología. Una raya "I" muestra un apareamiento tipo Watson y Crick. Dos puntos ":" representa un apareamiento débil no Watson y Crick. Rayas amarillas y flechas verdes señalan la ubicación de los miRNAs precursores *hsa-mir181c* y *hsa-mir181d*. Los números entre paréntesis señalan las regiones que abarcan los sitios utilizados para mostrar la hibridación que presenta *NANOS3-003* con hsa-miR-181-3p. Figuras de **b** se modificaron de las siguientes referencias [67-70]. Ver detalles en el texto.

7.16.-Funciones reportadas para la familia de let-7 en *C. elegans* y en humano.

Por último, se analizaron las siguientes familias: let-7, lin4/miR-125, miR-1, miR-9/miR-75, miR-34, miR-100/miR-51 y miR-124 lo cual se expondrá en los siguientes **apartados**. En cada **apartado** se menciona la información que tienen las **tablas 12-18**. Estas **tablas** contienen lo siguiente: el gen miRNA (nombre con el que se conoce en *C. elegans* y en humano). Se presentan las secuencias de nucleótidos de los miRNAs maduros citados y se señala en ellas la región-semilla dependiendo del brazo al que se hace referencia (rojo si es 5p y azul si es 3p). Además, se remarcan con verde los nucleótidos que están en la misma posición comparando las secuencias de nucleótidos de los miRNAs de los 2 organismos. Se anota información generada para cada miRNA que puede tener lo siguiente: etapa de desarrollo en la que se expresa, enfermedades en las que ha sido relacionado, blancos sugeridos o comprobados en la literatura. Cada **tabla** está ordenada para presentar en las primeras filas los miRNAs de *C. elegans* y después los de humano. Los miRNAs maduros que tienen un asterisco antes del nombre (*miR-X) son nuevos miembros de la familia que se encontraron en este estudio, mientras que los que tienen 2 asteriscos antes del nombre del miRNA (**miR-X), significa que ese miRNA no pertenece a los organismos de interés pero se añadió información que se obtuvo de otro organismo.

En este **apartado** se expondrán los resultados obtenidos para la familia de let-7. Se encontraron diferentes miembros de su familia presentes en los organismos bilateria estudiados en las **figuras 15 y 16**. Para la familia de let-7 en *C. elegans* se encontraron 7 miembros ya reportados en la literatura, mientras que en humanos se encontraron 13 como se muestra en la **tabla 12** de los cuales miR-202-3p, miR-4458-5p y miR-4500-3p no se han reportado parte de esta familia. Esta familia fue la más grande que se obtuvo ordenando regiones-semillas entre los 2 organismos. Los miRNAs que tienen el nombre de let-7 en la **tabla 12**, son idénticos en los 22-nt o solo presentan máximo 4 nucleótidos diferentes. En cuanto a funciones se encontró que la familia de let-7 participa en procesos de diferenciación [64,90,91]. Como se muestra en la **tabla 12** se encontró que regula de forma negativa varios mRNAs que participan en la proliferación celular en distintos tipos celulares en humanos, además participa en la regulación de la vía de la insulina en humanos [90-91].

Gen miRNA	miRNA maduro	Secuencia madura	Información	
let-7	cel	let-7-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU ✓ let-7: necesario para la transición de larvas L4 a gusanos adultos, además de ser importante para la viabilidad [64].	
		miR-48-5p	UGAGGUAGGCUCAGUAGAUGCGA ✓ let-7: se une al 3' UTR de <i>lin-41</i> , regula de manera negativa su traducción en L4 y en etapa adulta [64].	
		miR-84-5p	UGAGGUAGUAUGUAAUUGUAGA ✓ miR-48: controla las decisiones del destino celular de la vulva y la hipodermis durante el desarrollo larvario [64].	
		miR-241-5p	UGAGGUAGGUGCGAAUGA ✓ miR-84 y miR-241: controlan la transición L2/L3 y la transición larvaria a adulto [64].	
		miR-793-3p	UGAGGUUCUUAGUUAGACAGA ✓ miR-84: su sobreexpresión ocasiona anomalías en la vulva [64].	
		miR-794-5p	UGAGGUAUCAUCGUUGUCACU ✓ let-7, miR-48 y miR-241: presentan sitios de unión en los 3' UTR de <i>DAF-12</i> y <i>hbl-1</i> [26].	
		miR-795-5p	UGAGGUAGAUUGAUCAGCGAGCUU ✓ let-7: regula de forma positiva el procesamiento del pri-miRNA de let-7 dependiente de Drosha [22].	
	hsa	let-7a-1-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	Familia de let-7: se ha sugerido que regula varios aspectos del metabolismo de la glucosa [89]. let-7b: en células β del páncreas regula junto con miR-124 la secreción de insulina [89]. let-7: se sugiere que en hepatocitos puede disminuir la acción de la insulina. Desregula la vía de señalización de PI3K regulando de forma negativa la traducción del receptor de insulina (<i>IR</i>), el receptor del factor de crecimiento-1 similar al de insulina (<i>IGF-1R</i>) y el sustrato-2 del receptor de insulina (<i>IRS-2</i>) [89]. Familia de let-7: reprime el ciclo celular regulando de forma negativa la traducción de genes que promueven la proliferación como <i>CDK6</i> , <i>CDC25A</i> y <i>CDC34</i> [89]. let-7: se ha sugerido que regula la diferenciación de adipocitos [90]. let-7: se ha reportado que es un miRNA supresor tumoral que puede regular de forma negativa a oncogenes como <i>Ras</i> , <i>Myc</i> , <i>HMG2</i> y <i>ciclina D</i> [91].
		let-7a-2-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	
		let-7a-3-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	
		let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU	
		let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU	
		let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	
		let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	
		let-7f-1-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	
		let-7f-2-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	
		let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	
		let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU	
		miR-98-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUAUUGUU	
*miR-202-3p	AGAGGUUAGGGCAUGGGAA			
*miR-4458-5p	AGAGGUAGGUGUGGAAGAA			
*miR-4500-3p	UGAGGUAGUAGUUUCUU			

Tabla 12.-Familia de let-7. *miRNA que no se ha reportado como miembro de esta familia. Abreviaturas. 3' UTR: Región del 3' no traducido. let: gen tipo letal. lin: linaje celular anormal. DAF: formación de dauer anormal. hbl: homólogo a hunchback. PI3K: Cinasa 3 de fosfoinositidos. CDK: cinasa dependiente de ciclina. CDC: "Cell división cycle". HMG2: Proteína que pertenece al grupo de alta movilidad (HMG) "AT-hook 2". Ver detalles en el texto.

7.17.-Funciones reportadas para la familia de lin4/miR-125 en *C. elegans* y en humano.

Para esta familia se encontraron diferentes miembros de su familia presentes en los organismos bilateria estudiados en las **figuras 15 y 16**. En *C. elegans* se encontraron solo 2 miembros como está reportado en la literatura, mientras que en humanos se registraron 6 miembros como se ve en la **tabla 13** de los cuales miR-345-3p, miR-4319-5p y miR-4732-3p no se han reportado que sean miembros de esta familia. Se encontró que lin-4-5p y las 3 copias de miR-125 son idénticos en los primeros 11-nt. Además, estos 4 miRNAs, junto con miR-237-5p y miR-4319-5p son idénticos en sus primeros 8-nt. Como se muestra en la **tabla 13** se encontró que lin-4-5p en el nematodo es importante para la especificación del destino celular en los linajes neuronales y la hipodermis mientras que en humanos, las copias de miR-125 se han estudiado en diferentes tipos de cáncer y se ha sugerido que puede tener funciones tanto promotoras como supresoras [64,92,93].

Gen miRNA	miRNA maduro	Secuencia madura	Información	
lin-4 / miR-125	cel	lin-4-5p	UCCUGAGACCUC AAGUGUGA	✓ lin-4: regula de forma negativa la traducción de <i>lin-14</i> uniéndose a regiones repetidas que están en el 3' UTR de este mRNA [32].
		miR-237-5p	UCCUGAGAAUUCUGAACAGCU	✓ lin-4: es necesario para la temporalización de la especificación del destino celular en los linajes neuronales y la hipodermis durante el desarrollo post-embionario [64].
	hsa	miR-125a-5p	UCCUGAGACCCUUAACUGUGA	✓ miR-125a, miR-125b-1 y miR-125b-2: en diferentes tipos de cáncer pueden tener funciones tanto promotoras como supresoras. Se sugiere que pueden regular a una serie de blancos como factores de transcripción, metaloproteasas de matriz extracelular, miembros de la familia <i>Bcl-2</i> entre otros, lo que puede conducir a una proliferación anormal, metástasis e invasión de células [92].
		miR-125b-1-5p	UCCUGAGACCCUAAUCUGUGA	
		miR-125b-2-5p	UCCUGAGACCCUAAUCUGUGA	
		*miR-345-3p	GCCUGAACGAGGGGUCUGGAG	✓ miR-125a, miR-125b-1 y miR-125b-2: desempeñan un papel de defensa importante en el sistema inmunológico del hospedero, especialmente en respuesta a infecciones bacterianas o virales [92].
		*miR-4319-5p	UCCUGAGCAAAGCCAC	✓ miR-125b-1: se ha sugerido en líneas celulares de cáncer de mama que la proteína CTCF puede regular su transcripción [93].
		*miR-4732-3p	GCCUGACCGUCUGUUCUG	

Tabla 13.-Familia de lin-4/miR-125. *miRNA que no se ha reportado como miembro de esta familia. Abreviaturas. 3' UTR: Región del 3' no traducido. lin: linaje celular anormal. Bcl-2: Linfoma 2 de células B. CTCF: "CCCTC-binding Factor". Ver detalles en el texto.

7.18.-Funciones reportadas para la familia de miR-1 en *C. elegans* y en humano.

Para la familia de miR-1 se encontraron diferentes miembros de su familia presentes en casi todos los organismos bilateria estudiados en las **figuras 15** y **16** excepto en el nematodo *B. malayi*. Para esta familia se encontraron 4 miembros tanto en *C. elegans* como en humano como se muestra en la **tabla 14**. En *C. elegans* los miRNAs miR-796-5p y miR-1819-3p no se han reportado como miembros de esta familia y en humanos solo miR-613-3p, no se ha reportado que forme parte de esta familia. Aquí se encontró que casi todos los miRNAs son idénticos en los primeros 7-nt excepto miR-613-3p. Los miRNAs llamados miR-1 de los 2 organismos presentan secuencias idénticas en los primeros 21-nt mientras que el miRNA miR-206-3p presenta sus primeros 10-nt idénticos con los de miR-1. Como se muestra en la **tabla 14**, los miRNAs llamados miR-1 se ha sugerido que tienen funciones en células musculares de *C. elegans*, de humano y de ratones [64,95,96].

Gen miRNA	miRNA maduro	Secuencia madura	Información	
miR-1	cel	miR-1-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA	<ul style="list-style-type: none"> ✓ miR-1: su actividad es necesaria para funciones pre y post-sinápticas en las uniones neuromusculares. Los blancos post-sinápticos son los mRNAs de los receptores nicotínicos de acetilcolina <i>UNC-29</i> y <i>UNC-63</i> y el factor de transcripción de músculo <i>MEF-2</i> [64]. ✓ miR-206: se sugiere que puede inhibir la Transición Epitelio-Mesénquima de líneas celulares de cáncer de pulmón [94]. ✓ miR-206: regula de forma negativa la traducción del oncogén <i>MET</i> [94]. ✓ **miR-1: tiene una función miogénica, se sobreexpresa en músculo esquelético y en el corazón de pollo [95]. ✓ **miR-206: se sugiere que tiene función miogénica. En ratón y aves se sugiere que se expresa en músculo esquelético [95]. ✓ **miR-1: en cultivos primarios de músculo liso de ratón se sugiere que favorece la diferenciación promoviendo la traducción de 2 proteínas que forman parte de diferentes complejos de la cadena transportadores de electrones de la mitocondria. <i>ND1</i> (NADH deshidrogenasa, complejo I) y <i>Cox1</i> (proteína del Complejo IV) [96].
		miR-256-3p	UGGAAUGCAUAGAAGACUGUA	
		*miR-796-5p	UGGAAUGUAGUUGAGGUUAGUAA	
		*miR-1819-3p	UGGAAUGAUUGAGCUUGAUGGA	
	hsa	miR-1-1-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	
		miR-1-2-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	
		miR-206-3p	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	
		*miR-613-3p	AGGAAUGUUCUUCUUGCC	

Tabla 14.-Familia de miR-1. *miRNA que no se ha reportado como miembro de esta familia. **miRNA que pertenece a otra especie. Abreviaturas. UNC: desordenado. MEF2: Factor 2 potenciador de miocitos. MET: Receptor de membrana que pertenece a la familia de cinasas de tirosina. Ver detalles en el texto.

7.19.-Funciones reportadas para la familia de miR-9/miR-75, en *C. elegans* y en humano.

Para la familia de miR-9/miR-75 se encontraron diferentes miembros de su familia presentes en casi todos los organismos bilateria estudiados en las **figuras 15 y 16** excepto en los nematodos *B. malayi*, *P. redivivus* y *S. ratti*. Se encontraron 2 miRNAs en *C. elegans* y 3 en humanos como se muestra en la **tabla 15**, todos han sido reportados en la literatura. Casi todos los miRNAs excepto miR-75-3p, son idénticos en los primeros 10-nt. Como se muestra en la **tabla 15**, se ha sugerido en vertebrados que esta familia participa en la diferenciación neuronal mientras que en el nematodo se desconoce su función [25,51,64].

Gen miRNA	miRNA maduro	Secuencia madura	Información
miR-9 / miR-75	cel miR-75-3p	UUAAGCUACCAACCGGUUCA	✓ miR-75 y miR-79: se expresan durante las etapas larvarias del gusano [64].
	miR-79-3p	AUAAAGCUAGGUUACCAAAGCU	✓ miR-79: el pre-miRNA disminuye su acumulación 9 veces en una condición de ayuno de 12h en la etapa larvaria L4 [10,57].
	hsa miR-9-1-3p	AUAAAGCUAGAUACCGAAAGU	✓ miR-9: se ha sugerido que puede regular de forma negativa la traducción del factor de transcripción REST y su pareja CoREST [25].
	hsa miR-9-2-3p	AUAAAGCUAGAUACCGAAAGU	✓ miR-9: se ha visto desregulado en células derivadas de células progenitoras de neurona obtenidas de pacientes con Esquizofrenia [97].
	miR-9-3-3p	AUAAAGCUAGAUACCGAAAGU	✓ **miR-9: en vertebrados se expresa en cantidades altas en el cerebro, se sugiere que puede regular la diferenciación neuronal [25].
			✓ **miR-9: se ha sugerido que tiene un papel importante en el balance de la proliferación celular en las poblaciones neuronales progenitoras embrionarias. Se han sugerido como blancos a <i>FoxG1</i> , <i>Hes1</i> y <i>Tlx</i> [51].

Tabla 15.-Familia de miR-9/miR-75. **miRNA que pertenece a otra especie. Abreviaturas. REST: "RE1-Silencing Transcription factor". CoREST: Compañero de REST. FoxG1: Caja G1 "forkhead". Hes1: Factor de transcripción que pertenece a la familia de bhlh. Tlx: Receptor nuclear que pertenece a la familia de Nr2E1. Ver detalles en el texto.

7.20.-Funciones reportadas para la familia de miR-34 en *C. elegans* y en humano.

Para la familia miR-34 se encontraron diferentes miembros de su familia presentes en casi todos los organismos bilateria estudiados en las **figuras 15** y **16** excepto en la planaria *S. mediterranea*. En *C. elegans* se encontraron 3 miembros donde miR-1824-5p y miR-4933-5p no se han reportado como miembros de la familia mientras que en humanos se encontraron 5 miembros donde miR-499a-5p, miR-499b-5p y miR-548au-3p tampoco se han sugerido como miembros de esta familia (ver **tabla 16**). Aquí se encontró que miR-34-5p, miR-34c-5p y miR-449b-5p son idénticos en los primeros 9-nt. También se encontró que miR-1824-5p, miR-4933-5p, miR-34a-5p y miR-499a-5p, son idénticos en los primeros 8-nt. Las funciones mejor caracterizadas en humanos para la familia de miR-34 es la de trabajar de forma sinérgica con p53 el "guardián del genoma". También se ha estudiado que p53 favorece su transcripción y su correcto procesamiento durante su biogénesis [98].

Gen miRNA	miRNA maduro	Secuencia madura	Información	
miR-34	cel	miR-34-5p	AGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUG	<ul style="list-style-type: none"> ✓ miR-34: su delección y sobreexpresión conduce a una respuesta deteriorada ante los tipos de estrés de aumento de temperatura y el sometimiento a dauer. Se sugiere que esto se debe parcialmente por perturbaciones en la expresión de DAF16/FOXO, miembro de la vía de señalización de la insulina [47]. ✓ miR-34: se sugiere que su expresión está regulada por la vía de señalización de la insulina mediante un bucle de retroalimentación negativa entre miR-34 y DAF16 [47].
		*miR-1824-5p	UGGCAGUGUUCUCCCCAACUU	
		*miR-4933-5p	UGGCAGUGACCUAUUCUGGCCA	
	hsa	miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	✓ miR-34: favorece el arresto del ciclo celular, promueve la apoptosis, promueve la diferenciación, inhibe la transición Epitelio-Mesénquima y la invasión celular [98].
		miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUAGCUGAUUGC	✓ miR-34a y miR-34c: p53 regula de forma positiva su expresión [98].
		*miR-449a-5p	UGGCAGUGUUAUUGUAGCUGGU	✓ miR-34a: se ha sugerido que es un regulador negativo del oncogén <i>Mye</i> en neuroblastomas [12].
		*miR-449b-5p	AGGCAGUGUUAUUGUAGCUGGC	✓ miR-34a: induce el arresto celular y la apoptosis regulando de manera negativa la traducción de <i>Bcl-2</i> (proteína antiapoptótica) en neuroblastomas [12].
	*miR-548au-3p	UGGCAGUACUUUUGCACCAG	<ul style="list-style-type: none"> ✓ miR-548: gen que se encuentran en los genomas de primates. Se ha sugerido que la familia puede regular a distintos tipos de blancos porque varios miembros presentan polimorfismos [25,99]. ✓ **miR-34: en abejas se ha sugerido que se expresa en la embriogénesis y que regula a los mRNAs de los genes <i>eve-skipped</i>, <i>hairy</i>, <i>ftz-fl</i>, <i>wg</i> y <i>Act5C</i>. Estos genes son importantes para la segmentación de insectos [100]. 	

Tabla 16.-Familia de miR-34. *miRNA que no se ha reportado como miembro de esta familia. **miRNA que pertenece a otra especie. Abreviaturas. DAF: formación de dauer anormal. p53: Proteína denominada el "guardián del genoma". Bcl-2: Linfoma 2 de células B. ftz-fl: Factor de transcripción ftz. wg: Wingless. Act5C: Actina 5C. Ver detalles en el texto.

7.21.-Funciones reportadas para la familia de miR-100/miR-51 en *C. elegans* y en humano.

Para la familia miR-100/miR-51 se encontraron miembros de su familia en casi todos los organismos estudiados en las **figuras 15** y **16** excepto en el nematodo *S. ratti*. Se encontraron en *C. elegans* 6 miembros y en humanos 3 miembros como se muestra en la **tabla 17**, todos han sido reportados en la literatura. Se encontró que todos los miRNAs presentados en esta **tabla** son idénticos en los nucleótidos que están en la posición 2-8. Se observó que los miRNAs del nematodo miR-52-5p y miR-53-5p, son idénticos en los primeros 10-nt así como también son idénticos en los primeros 10-nt los miRNAs miR-54-3p y miR-56-3p. También se observó que los miRNAs de humano miR-99a-5p y miR-100-5p son casi idénticos en los 22-nt. En el gusano se ha descrito que la ausencia de esta familia generan nematodos que son letales embrionarios mientras que los miRNAs de humano se han visto implicados en diferentes tipos de cáncer [52,56,102].

Gen miRNA	miRNA maduro	Secuencia madura	Información	
miR-100 / miR-51	cel	miR-51-5p	UACCCGUAGCUCCUAUCCAUGUU	✓ Familia de miR-51: la carencia de todos los miembros genera gusanos letales embrionarios [56]. ✓ Familia de miR-51: se ha sugerido que participan en la formación entre la boca y la faringe [56,101].
		miR-52-5p	CACCCGUACAU AUGUUUCCGUGCU	
		miR-53-5p	CACCCGUACAUUUGUUUCCGUGCU	
		miR-54-3p	UACCCGUAAUCUUCAUAAUCCGAG	
		miR-55-3p	UACCCGUAAAGUUUCUGCUGAG	
		miR-56-3p	UACCCGUAAUGUUUCCGUGAG	
	hsa	miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	✓ miR-100: se sugiere que tiene un papel en la regulación de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama [52].
		miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	✓ miR-100: la alteración de su expresión desfavorece la inducción de Linfocitos T a Linfocitos T reguladores [102].
		miR-100-5p	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	✓ **miR-100: se ha sugerido que está presente en todos los bilateria y en la anémona <i>Nematostella vectensis</i> (organismo no bilateria) [31].

Tabla 17.-Familia de miR-100/miR-51. **miRNA que pertenece a otra especie. Ver detalles en el texto.

7.22.-Funciones reportadas para la familia de miR-124 en *C. elegans* y en humano.

Para la familia de miR-124 se encontraron diferentes miembros de su familia presentes en los organismos bilateria estudiados en las **figuras 15** y **16**. Se encontró solo un miembro en *C. elegans* mientras que en humanos se encontraron 7 miembros como se muestra en la **tabla 18**. En humanos miR-506-3p, miR-3714-5p, miR-3910-1-3p y miR-3910-2-3p no se han reportado en la literatura como miembros de esta familia. En esta **tabla** los miRNAs nombrados como miR-124 son idénticos en los primeros 20-nt. También se observó que los miRNAs nombrados miR-124-3p y miR-506-3p, son idénticos en los primeros 8-nt. Esta familia se ha sugerido en vertebrados que participa en la diferenciación neuronal [25,103]. En el nematodo se ha observado que su ausencia reduce la esperanza de vida [64].

Gen miRNA	miRNA maduro	Secuencia madura	Información	
miR-124	cel	miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA	✓ miR-124: su carencia provoca que aumenten las especies reactivas de oxígeno (ROS), disminuyan los niveles de ATP y reduce la esperanza de vida del gusano [64].
		miR-124-1-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	
		miR-124-2-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	
		miR-124-3-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	✓ miR-124: en células β del páncreas junto con let-7b regula la secreción de insulina [89].
	hsa	*miR-506-3p	UAAGGCACCCUUCUGAGUAGA	✓ miR-124: varios reportes sugieren que participa en la diferenciación neuronal y otros reportes sugieren que no [25].
		*miR-3714-5p	GAAGGCAGCAGUGCUCUCCUGU	✓ miR-124: se ha sugerido que regula de forma negativa la traducción de <i>CDK6</i> [103].
		*miR-3910-1-3p	AAAGGCAUAAAACCAAGACA	✓ **miR-124: se ha sugerido en pez cebra que interviene en la diferenciación neuronal [103].
		*miR-3910-2-3p	AAAGGCAUAAAACCAAGACA	

Tabla 18.-Familia de miR-124. *miRNA que no se ha reportado como miembro de esta familia. **miRNA que pertenece a otra especie. Abreviaturas. ATP: Adenosín trifosfato. CDK: cinasa dependiente de ciclina. Ver detalles en el texto.

8.-DISCUSIÓN

8.1.-Uso de bases de datos para el estudio de los microRNAs.

En este estudio se utilizaron principalmente las bases de datos miRBase y Wormbase [25,64]. Destacó que la información reportada en estas bases de datos para un mismo miRNA era en pocos casos similar, motivo por el cual se generó una nueva base de datos en Excel concentrando toda esta información. Sin embargo, un reporte de la revista "Science" menciona que Excel modifica algunos archivos ya que ciertos símbolos usados en el lenguaje científico pueden tener un significado predeterminado en Excel [104]. Por ello, la curación detallada de la información para cada miRNA fue un gran acierto en este estudio. Sin embargo, la información aquí registrada de cada miRNA no es la única, por lo que se tendrá que actualizar en el futuro.

En este estudio se crearon imágenes propias para la predicción de la hibridación de los miRNAs con sus blancos (ver **figura 21b**), por lo siguiente: para la familia de cel-miR-35 se encontraron en varias bases de datos y en artículos, predicciones con errores ya que muestran secuencias de nucleótidos que no corresponden a los RNAs que citan; pueden mostrar secuencias incompletas; algunos trabajos presentan secuencias de nucleótidos con Timinas (T) en vez de Uracilo (U) lo que sugiere que la familia puede regular al gen hibridando con secuencias de DNA, lo que no se ha comprobado; también se encontró que en algunas imágenes se presentan predicciones donde se sugiere que pueden existir puentes de hidrógenos entre Timinas (T) y Guaninas (G) lo que no es posible e incluso en otros trabajos no se encontró ninguna predicción [68-71,86-88]. Por ello, es importante analizar las figuras que muestren la predicción de la hibridación de los miRNAs con sus blancos y que se publicarán en bases de datos o en artículos

8.2.-Reclasificación y contexto genómico de los miRNAs de *C. elegans*.

Los miRNAs de *C. elegans* fueron reclasificados de acuerdo a su contexto genómico ya que reclasificarlos de otra manera como por ejemplo, funciones moleculares o celulares, actualmente no es posible porque se desconoce la función de la gran mayoría de los miRNAs o porque a veces un mismo miRNA participa en distintos procesos biológicos como se ejemplifica en las **tablas 12-18**.

La clasificación de los miRNAs en miRBase es confusa como se demostró en las **figuras 10a y 10b**, ya que hay varios miRNAs clasificados como intrónicos, exónicos y antisentido. Reportes actuales sugieren que los miRNAs antisentido se transcriben por un promotor independiente al del gen hospedero, porque están ubicados en la hebra complementaria como se muestra en la **figura 3c**, por este motivo se consideró a estos miRNAs en una categoría distinta a los intrónicos y exónicos [19,105]. También para el conteo de clúster en *C. elegans*, se usó un criterio similar donde todos los miembros del clúster deben de estar en la misma hebra lo que sugiere que se transcriben juntos [58]. Este criterio no es usado en miRBase [25]. Por otra parte, se ha descrito en la literatura que los miRNAs intrónicos pueden ser regulados por el promotor de los genes hospederos en los que están embebidos [18,19]. A pesar de esto, existe evidencia experimental que sugiere que algunos miRNAs intrónicos son transcritos por promotores alternativos de forma independiente al promotor del gen hospedero [106-108]. Sin embargo, en *C. elegans* no se encontró ningún ejemplo.

El grupo del Dr. Eugene Berezikov en el 2010 sugirió que el 20% de los miRNAs de *C. elegans* eran intrónicos usando la versión 13 de miRBase [107]. En el presente estudio usando la versión 21 de miRBase se sugiere que son el 28%. Los porcentajes son distintos porque actualmente hay un mayor número de miRNAs reportados [25]. En el 2011 el Dr. E. Berezikov mencionó que había pocos ejemplos de miRNAs exónicos y se desconocían sus funciones [31]. En este estudio se encontró que el 2% de lo miRNAs de *C. elegans* son exónicos de genes codificantes, tienen evidencias experimentales que apoyan su existencia pero no se han asociado con alguna función. Actualmente se han descrito miRNAs exónicos que provienen de genes no codificantes, como por ejemplo hsa-miR-181d-3p (ver **figura 19b**) pero en *C. elegans* no se encontró ningún ejemplo [21,65].

8.3.-miRNAs en multicopia.

En este trabajo se almacenó un mayor número de miRNAs de *C. elegans* y de humano, comparado con lo registrado en miRBase (ver **figura 12**). Se descargaron de forma manual las secuencias de nucleótidos y se encontraron miRNAs con secuencias de nucleótidos idénticas (miRNAs en multicopia). Si bien se pudo trabajar solo con una copia de un miRNA en representación de las demás, ya que en cuanto a función molecular pueden

hibridar con las mismas secuencias complementarias, se decidió trabajar con todas las copias porque sus miRNAs precursores tienen un contexto genómico distinto, sugiriendo que tuvieron un ancestro en común que sufrió al menos una duplicación genética de manera local (en tándem) o no local [31]. Además, la duplicación genética sugiere que un gen ancestral pudo tener varias funciones y al duplicarse, las nuevas copias se dividieron las funciones o alguna copia adquirió una nueva función (procesos de subfuncionalización o neofuncionalización respectivamente) [31]. Además, los miRNAs precursores pueden tener diferentes promotores y ser expresados de manera tejido-específica, ante distintas condiciones medioambientales, en los diferentes estadios del desarrollo de los organismos que los contienen [15,47,91]. Por lo tanto, las copias de un miRNA reflejan otro nivel de análisis que no se lograría visualizar si se estudiara una sola copia.

8.4.-Nomenclatura de los miRNAs maduros.

En el área de los miRNAs existe un debate sobre su nomenclatura como se discutirá en este **apartado**. Por un largo tiempo se observó que un pre-miRNA genera 2 miRNAs maduros de los cuales uno tenía una mayor estabilidad y por tal motivo se asociaba al gen miRNA y al miRNA maduro. El otro miRNA se encontraba degradado y por ello se describía como hebra transitoria, pasajera o miRNA* porque se creía que no tenía relevancia biológica [31]. Sin embargo, con la era de la secuenciación masiva se ha sugerido que las 2 hebras pueden tener funciones relevantes dependiendo del tejido donde son expresados [10,57,109,110]. Para evitar confusiones miRBase trató de unificar la nomenclatura [24]. Sugirió usar la nomenclatura que se explicó en el **apartado 6.3** de la metodología. Sin embargo, durante la descarga de cada secuencia de nucleótidos se tuvo que corregir la nomenclatura de varios miRNAs porque estaba incompleta en miRBase como se demostró en el **apartado 7.4**.

Hoy en día es importante citar el brazo correcto de un miRNA maduro porque permite localizarlo en bases de datos de forma rápida y evita atribuirle una función a un brazo que no es el correcto. Para que quede clara la importancia de citar los brazos correctos se expondrán a continuación 2 ejemplos: 1) como se muestra en la **figura 19b**, *NANOS3-003* tiene embebido 2 miRNAs llamados *hsa-mir-181c* y *hsa-mir-181d*. Los 2 miRNAs tienen el mismo nombre de *mir-181* ya que pertenecen a una familia que tiene 4

miembros: *mir-181a*, *mir-181b*, *mir-181c* y *mir-181d* [25]. Todos estos miRNAs presentan brazos 5p con una región-semilla idéntica, sin embargo, los brazos 3p tienen distintas regiones-semillas [25]. 2) El clúster de cel-miRc-35 se ha descrito que todos sus miembros son brazos 3p. Como se muestra en la **tabla 10**, cel-miR-39-3p y cel-miR-41-3p tienen una región-semilla idéntica a la de cel-miR-35-3p pero los miRNAs cel-miR-39-5p y cel-miR-41-5p que provienen del mismo pre-miRNA tienen distintas regiones-semillas. Estos ejemplos muestran que los 2 miRNAs maduros que provienen de un mismo pre-miRNA tienen un "código diferente" a nivel de secuencia de nucleótidos, lo que sugiere que pueden regular a diferentes blancos y por lo tanto, pueden repercutir de diferente forma en un proceso celular. Esto plantea preguntas como la siguiente: si en general una de las 2 hebras se degrada en una condición experimental ¿qué sucedería si no fuera degradada?

En el 2015 P. Batzel y colaboradores sugirieron cambiar la nomenclatura para los miRNAs de humano, de ratón y de pez cebra, haciendo más complicado la búsqueda de miRNAs [21]. Sugirieron acortar el nombre del miRNA usando una nomenclatura que combina letras mayúsculas y minúsculas, sin guiones y sin mencionar la especie porque el tipo de combinación de letras es particular para cada especie. Sin embargo, esa nomenclatura sugerida solo es válida para estos 3 organismos mientras que para los demás se sugiere conservar la que ha sido propuesta por miRBase u otra base de datos [21]. Por lo tanto, se sugiere tomar precauciones al citar a los miRNAs maduros.

8.5.-Evidencias experimentales e inferencias bioinformáticas que apoya la existencia de los miRNAs maduros de *C. elegans* y de humano.

Una secuencia de nucleótidos obtenida por condiciones experimentales presenta un gran valor informativo, comparado con aquellas secuencias que solamente han sido inferidas de manera bioinformática. Se ha demostrado que la biogénesis de los miRNAs es más compleja a lo presentado en la **figura 4** ya que cada paso está regulado por diferentes proteínas que permiten o inhiben el procesamiento de Drosha y Dicer sobre los miRNAs, así como también se ha sugerido que otros miRNAs como let-7 participan en la biogénesis (ver **figuras 5c**, **5d** y **tabla 12**) [14,22]. Por ello, tener una secuencia de nucleótidos de manera experimental, sugiere que la secuencia final proviene de un precursor que tuvo una biogénesis altamente regulada. En el caso de las secuenciaciones masivas, el número de

lecturas obtenidas permite tener una alta fidelidad en cuanto a la secuencia del miRNA maduro pero no brinda información sobre su biogénesis [25]. Por otra parte, las secuencias de nucleótidos inferidas de manera bioinformática no siempre pueden ser correctas como lo sugirió en 2017 el grupo del Dr. E. Munthe. Este grupo observó por secuenciaciones masivas que hsa-miR-34b-5p presenta la región-semilla idéntica a la de la familia de miR-34 [111]. En el presente estudio, hsa-miR-34b-5p no se agrupó con esta familia porque la secuencia de nucleótidos obtenida en miRBase muestra una región-semilla distinta a la de la familia de miR-34, por ello no se muestra en la **tabla 16**. Además, en el presente estudio se encontró que en miRBase está anotada su secuencia como predicha.

Varios miRNAs se han inferido de forma bioinformática en *C. elegans* y humano gracias a la comparación de las secuencias de nucleótidos de miRNAs de diferentes especies [108]. Los miRNAs homólogos en otras especies, tienen al menos una evidencia experimental mientras que en *C. elegans* y en humano no. Por ello, esos miRNAs pueden ser reales en estos 2 organismos pero aún no se han encontrado las condiciones experimentales donde se expresen sugiriendo que tienen un papel específico o en el caso de humano, su expresión es en órganos de difícil acceso e incluso en un momento determinado del estadio de desarrollo [15,47]. Son varios factores que pueden favorecer su transcripción y que hacen aún más complejo conocerlos de forma experimental. Por ello, hacer estudios comparativos permite evaluar miRNAs homólogos en modelos de estudio donde puede validarse la existencia del miRNA así como conocer sus funciones moleculares, motivos por los cuales es importante incorporar la parte evolutiva a este tipo de estudios [112].

8.6.-Homología de los miRNAs precursores de *C. elegans* con miRNAs precursores de diferentes organismos bilateria.

Por lo expuesto en el párrafo anterior se buscaron miRNAs candidatos entre *C. elegans* y humano que pueden ser homólogos y que por lo tanto puedan tener funciones moleculares similares en procesos biológicos básicos que comparten los 2 organismos como proliferación celular, diferenciación, metabolismo, etc. Se inició este estudio con una estrategia general del área evolutiva, se analizaron primero organismos cercanos filogenéticamente a *C. elegans* y después alejados a él. Con la información reportada en miRBase y Wormbase se encontró que varios miRNAs están agrupados en diferentes

familias y que varios de sus miembros tienen distintos nombres en invertebrados y vertebrados como se registró en la **tabla 6**. Varios miRNAs están en multicopia, los cuales fueron consideradas todas las copias por los motivos discutidos en el **apartado 8.3**. Se demostró con la **figura 18a** que utilizando solamente la información reportada en las bases de datos, se obtiene un alcance menor que el que se puede obtener si se agrupan de forma manual los miRNAs en familias por lo que se menciona lo siguiente: **las siguientes conclusiones son parcialmente ciertas**.

El Dr. E. Berezikov en el 2011 publicó una revisión sobre los miRNAs del reino animal con la información de miRBase versión 17 [31]. En el presente estudio se encontró que la versión 21 cuenta con un mayor número de precursores para los organismos que él utilizó (ver **anexo 2**). Aquí se estudiaron varios organismos que mencionó que presentaron homólogos con *C. elegans* y también aquellos que no presentaron homólogos. Sin embargo, lo que se encontró aquí es similar a lo que él reportó [31]. Por otra parte, el Dr. E. Berezikov no evaluó todos los nematodos que aquí se estudiaron [31]. Aquí se encontró que *C. elegans* presenta un porcentaje de similitud mayor con organismos del género *Caenorhabditis* lo que sugiere que estos miRNAs son relevantes para este género (ver **figuras 15 y 16**). De manera interesante se encontró que los miRNAs de *C. elegans* pueden ser solo una copia o pocas copias, comparando con los miRNAs de los *Caenorhabditis*. Un ejemplo fue la familia de miR-35 como se muestra en la **tabla 11**. Se encontraron resultados similares comparando a los vertebrados *Xenopus tropicalis* y pez cebra *Danio rerio* con el invertebrado *D. melanogaster* (ver **figura 16b**). Se encontró que los miRNAs homólogos por lo general son los mismos pero en *X. tropicalis* y *D. rerio* se encuentran en multicopia sugiriendo que en esos organismos sufrieron procesos de duplicación genética mientras que en *D. melanogaster* no sucedió. Por estas observaciones se propone evaluar otras regiones en su contexto genómico que sean similares, conocer y comparar sus funciones moleculares, algo similar a lo presentado en las **tablas 12-18**, y sugerir si se generaron procesos de subfuncionalización o neofuncionalización [31].

8.7.-Familias de los miRNAs maduros de *C. elegans* y de humano.

Para formar familias de miRNAs se analizó la región-semilla 2-7 de los miRNAs maduros 5p y 3p por los siguientes motivos: 1) El Dr. J. Vogel y colaboradores publicaron que la región-semilla de diferentes RNAs de bacterias, arqueas y eucariontes, tienen 2 principios comunes para la presentación de secuencias de DNA o RNA blanco. Para los miRNAs el primer principio sugiere que la región-semilla se presenta en AGO favoreciendo un cambio de conformación que le permite interactuar con diferentes blancos y el segundo principio sugiere que se favorece el acoplamiento con su blanco lo que provoca un nuevo cambio de conformación en AGO lo que permite que lleve a cabo su función [113]. 2) Se ha propuesto que el 60% de los 3' UTR de los mRNAs de diferentes especies de mamíferos son complementarios con la región-semilla 2-7, lo que sugiere que estas regiones están sujetas a una presión selectiva y por lo tanto no pueden cambiar [29]. 3) El grupo del Dr. R. Horvitz en el 2010 demostró con experimentos *in vivo* en *C. elegans* que los miRNAs que se agrupan en familias a partir de la región-semilla 2-7 tienen una función redundante. Esto lo comprobó haciendo rescate de función incorporando a un solo miembro en mutantes con delección completa de las familias de cel-miR-35, cel-miR-51 y cel-miR-58 [56]. Esto demuestra que la región-semilla 2-7 es indispensable para la función molecular de los miRNAs. 4) En 2011 el Dr. E. Berezikov mencionó que por medio de los estudios de secuenciación masiva, varios miRNAs* en la mosca de la fruta *D. melanogaster* y en *C. elegans* se agrupaban en familias y tenían funciones relevantes [31]. Por este motivo se estudiaron las regiones-semillas de los brazos 5p y 3p tomando en cuenta a los miRNAs*. Se recolectaron las regiones-semillas manualmente y se distinguieron por un código de colores que usó el Dr. E. Berezikov [31]. Se usó este código ya que permite distinguir la región-semilla en el cuerpo del miRNA y reconocer de manera rápida si es 5p (rojo) o 3p (azul) como ejemplifica en las **tablas 12-18**.

Se encontró que el 36% de los miRNAs maduros de *C. elegans* se organizan en 55 familias, porcentaje diferente al 10% sugerido por el Dr. E. Berezikov en el 2011 y número mayor a 23 sugerido por el grupo del Dr. R. Horvitz en 2010 [31,56]. En humanos se encontró que el 69% de sus miRNAs maduros registrados en miRBase se agrupan en 624

familias, porcentaje mayor al 33% sugerido por el Dr. E. Berezikov y número mayor a 239 sugerido por el grupo de Dr. H. Kaessmann en 2013 [17,31]. Los números y porcentajes son distintos porque hay un mayor número de secuencias almacenadas en miRBase versión 21, comparada a las versiones anteriores que estos grupos utilizaron. Por otra parte, los miRNAs que no fueron agrupados en familias con otros miRNAs de la misma especie, pueden ser importantes. Por ejemplo, *mir-124* en *C. elegans* tiene un miembro y cuando se hace una mutante carente de este gen, reduce la esperanza de vida del gusano (ver **tabla 18**). Además, *mir-124* está presente en organismos bilateria e incluso en multicopia lo que resalta su importancia biológica (ver **tabla 18**) [25,64]. Como se muestra en el **anexo 2**, con las actualizaciones de miRBase aumenta el número de miRNAs almacenados, por lo que seguramente no se conocen todos los miRNAs de un organismo y probablemente haya nuevas familias que se agrupen con los miRNAs que aquí no fueron agrupados [25,31].

Por otra parte, los miRNAs de *C. elegans* que se agrupan en familia con los miRNAs de humano son 226 de 447 (50%), porcentaje menor a 52% sugerido por el grupo de la Dra. M. Driscoll en el 2008 [55]. Este grupo obtuvo su porcentaje a partir de 73 de 139 miRNAs maduros. Ellos consideraron como miRNAs homólogos aquellos que tenían al menos 7-nt contiguos idénticos en los primeros 10-nt del cuerpo de los miRNAs [55]. Sin embargo, no hicieron algún experimento motivo por el cual se prefirió usar el criterio empleado por el grupo de Dr. R. Horvitz en 2010 [56]. Este último grupo obtuvo un 22% que es diferente al 50% obtenido en el presente estudio [56]. La diferencia de estos porcentajes se explica porque actualmente hay un mayor número de secuencias registradas en miRBase y porque ellos no estudiaron los miRNAs*.

El estudio de las regiones-semillas de miRNAs*, mostró que varios miRNAs* de humano se agrupan en familias, sugiriendo que tienen funciones relevantes por lo que se propone estudiar los miRNAs* de vertebrados, para conocer si está presente esta característica y conocer si tienen funciones relevantes como los miRNAs* de invertebrados [31]. Poco se conoce sobre las funciones de los miRNAs*, se ha sugerido que pueden regular a diferentes blancos en determinadas condiciones experimentales o en diferentes tejidos, lo cual apoya que son igual de importantes como los miRNAs con mayor estabilidad [31,109,110]. Otra posible función que pueden tener es favorecer la estabilidad

del precursor durante su biogénesis porque si esto no sucede, no se pueden procesar de forma correcta los brazos que dan origen a los miRNAs maduros mejor caracterizados [31].

8.8.-El estudio del cuerpo del miRNA maduro y de los RNAs esponjas para la búsqueda de miRNAs homólogos.

La literatura de los últimos años cita la longitud de la región-semilla de los miRNAs maduros de la posición 2-8. Sin embargo, como se ha mencionado la región-semilla 2-7 es suficiente para su función como lo demostró el grupo del Dr. R. Horvitz en 2010 [28,56]. Se sugiere que si el nucleótido 8 está presente en todos los miembros de una familia o el nucleótido 8 no es el mismo pero el primero lo es (posición 1), se puede tener un mayor argumento para sugerir que los miRNAs son homólogos [29]. Los miRNAs maduros que en el presente estudio se han agrupado en nuevas familias entre los 2 organismos, se sugiere que son resultado de una convergencia evolutiva (genes similares que se encuentran en el presente que no comparten un ancestro en común [114]) excepto los miembros de las familias de let-7, lin-4/miR-125, miR-1, miR-9/miR-75, miR-34, miR-35, miR-100/miR-51 y miR-124 que fueron analizados en la última parte de este estudio. No se puede determinar que tienen un ancestro en común como se discutirá en este **apartado**.

Existen miRNAs maduros similares en todo su cuerpo pero presentan polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la región-semilla [31]. Un ejemplo es el miRNA hsa-mir-548 que en miRBase están reportados 53 miembros de su familia mientras que en el presente estudio se obtuvieron 35 miRNAs 5p, siendo la familia más grande registrada para humanos como se mencionó en el **apartado 7.8** [25]. Es por esto que en el **anexo 3** y en la **tabla 16** hay familias que presentan miembros con el nombre de miR-548. Por otra parte, las predicciones bioinformáticas para miRNAs de diferentes mamíferos sugieren que la región-semilla 2-7 puede regular varios 3' UTRs de mRNAs y que presentan homología entre varias especies, mientras que otras regiones del miRNA maduro no presentan homología [29]. Sin embargo, el grupo de la Dra. Amy Pasquinelli ha descrito con experimentos *in vivo* de miRNAs maduros de *C. elegans* la importancia de la región 3' suplementario (nucleótidos en la posición 13-16 del miRNA maduro). Ha descrito que esta

región permite una mejor estabilidad del miRNA con su mRNA blanco [26]. Este grupo concluyó que para la especificidad de blancos se prefieren diferentes 3' suplementario [26].

Junto con estos trabajos experimentales, se ha reportado que hay regiones-semillas llamadas no canónicas (regiones-semillas que no están en la posición 2-7 del miRNA maduro) que junto con nucleótidos que están hacia el extremo 3' pueden hibridar y regular a sus blancos [115]. Un ejemplo es cel-miR-35-3p que regula al mRNA de *gld-1* como se ilustra en la **figura 21b** [68]. Por este motivo las regiones-semillas no canónicas se tendrán que tomar en cuenta en futuros estudios sobre homología de miRNAs.

Si la región-semilla está sujeta a una presión de selección podría esperarse que las regiones complementarias con las que hibridan también lo estén, por lo que la predicción de blancos puede ayudar en el estudio de la homología de los miRNAs [29]. Sin embargo, los reportes actuales sobre las funciones moleculares de los miRNAs comprenden a otros blancos menos caracterizados como se muestra en la **figura 5** lo que hace aún más compleja esta área [15,116]. Un área nueva que ha surgido es la de los RNAs esponjas de miRNAs. Estos RNAs esponjas se sintetizan de forma exógena o endógena, secuestran a los miRNAs e impiden que realicen sus funciones moleculares [117,118]. De manera novedosa se ha visto que algunos RNAs esponjas pueden ser blancos de miRNAs, lo que pone en manifiesto que aún no se conocen todos los tipos de blancos que pueden tener los miRNAs (ver **figura 5**) [27]. Todo lo expuesto en este **apartado** demuestra la complejidad sobre el estudio de la homología de los miRNAs.

Finalmente, se resalta que usando el criterio de región-semilla idéntica 2-7, se formaron 160 familias entre los miRNAs de *C. elegans* y los de humano, lo que sugiere que esta coincidencia no es del todo azarosa (ver **anexo 3**). Se tendrá que buscar si estas familias están presentes a lo largo de todos los bilaterias. Hasta este momento se concluye que la relación que tienen los miRNAs agrupados en familia es a nivel funcional porque probablemente hibriden sus regiones-semillas con las mismas secuencias complementarias de los mismo blancos pero presentarán distintos tipos de hibridación dependiendo de sus 3' suplementario como lo sugiere el grupo de la Dra. A. Pasquinelli [26].

8.9.-La familia de cel-miR-35 y su relación con el miRNA hsa-miR-181d-3p.

La familia de cel-miR-35 es de interés actual en el área como se expondrá en este párrafo: la ausencia de la familia en el nematodo exhibe efectos pleiotrópicos [88] (gen causante de diversos fenotipos no relacionados [119]). Se ha observado que si se generan nematodos carentes de todos los miembros de cel-miR-35, es letal en estado embrionario [56]. Se ha sugerido que la familia tiene funciones importantes durante la embriogénesis y en un ayuno de 12h en L4 donde se acumulan los miembros de cel-miRc-35 desde 6 hasta 20 veces [10,57,64]. Comprender las redes de regulación de esta familia es de gran interés en el área como lo ha sugerido el grupo del Dr. V. Ambros en 2017 [88]. Se ha sugerido que regula de forma negativa a *lin-23/fbxw11* durante la proliferación celular del intestino [68]. Se ha propuesto que puede regular a *sup-26/rbms3* en embriones en respuesta a hipoxia [70]. También se ha reportado que la familia cel-miR-35 coopera con la familia cel-miR-58 para regular de manera negativa la traducción de *egl-1/BH3* (gen proapoptótico) para evitar la muerte celular de células madre programadas para morir durante la embriogénesis [87]. También el grupo del Dr. V. Ambros ha sugerido que regula a *sup-26* y *nhl-2* en el cambio de sexo de gusanos machos a hermafroditas [88].

A pesar de la información generada en el área, no se ha sugerido que la familia de cel-miR-35 presente homólogos en humanos. El presente estudio es el primer reporte que lo sugiere. Aquí se encontró que presenta homología con el miRNA hsa-miR-181d-3p de humano (ver **figura 21a** y **tabla 11**). De forma interesante se encontró que la familia cel-miR-35 y hsa-miR-181d-3p, tienen secuencias complementarias con los RNAs de *gld-1/Qki* y *NANOS3-003* respectivamente. Estos 2 genes pertenecen a la familia de *NANOS* [64,65,120]. *gld-1* codifica a una proteína de unión a RNA que participa en la ovogénesis en el nematodo [64]. *NANOS3-003* es similar en secuencia a la familia de *NANOS3* que participa en la espermatogénesis [120]. *NANOS3-003* está clasificado en Ensembl como un ncRNA, se desconocen sus funciones y su relación con los miRNAs que tiene embebidos (*hsa-mir181c* y *hsa-mir181d*) [65]. En el presente estudio se predijeron 3 posibles sitios de hibridación de hsa-miR-181d-3p sobre este ncRNA como se muestra en la **figura 21c**, lo que se tendrá que demostrar de forma experimental en futuros proyectos. Hasta el momento se concluye que la familia de cel-miR-35 y hsa-miR-181d-3p son homólogos.

8.10.-La familia de cel-miR-35 y su relación con la proteína lin-35/Rb.

Rb (proteína del Retinoblastoma) es un supresor tumoral de interés en el área biomédica como se discutirá a continuación: se describió en retinoblastomas de niños y actualmente se tiene reportado que estos niños pueden presentar otros tipos de cáncer que si bien puede ser por su predisposición genética, el tiempo que tiene que transcurrir para que se lleven a cabo es un período largo, sugiriendo que en otros tejidos la ausencia de la proteína Rb no es crucial y es necesario que se acumulen una serie de factores tanto medioambientales como mutaciones en otros genes que permitan la progresión de diferentes tipos de cáncer, lo antes mencionado es un ejemplo de la etiología de una enfermedad multifactorial (ver **figura 7**) [121]. Por otra parte, se ha sugerido que en los retinoblastomas se da un cambio de expresión diferencial de miRNAs, lo que propone una regulación positiva o negativa de Rb sobre ellos, un tema poco explorado [122]. La función mejor conocida de Rb es la de ser regulador del punto de restricción del ciclo celular de la transición "G1/S", un punto decisivo en las células que entrarán a proliferación o a diferenciación [123]. Se ha sugerido también que Rb puede cumplir otras funciones fuera del ciclo celular como ser un remodelador de la cromatina [123]. Sin embargo, poco se conoce sobre la regulación de su transcripción y su traducción. En *C. elegans* la función mejor caracterizada de lin-35/Rb es la de ser un regulador negativo de la proliferación mediada por la vía de Ras en las células que se diferencian a vulva y se ha sugerido que tiene un papel importante en la vía de señalización de la insulina, pero aún no son claras todas sus funciones en el nematodo [124,125].

En la literatura se sugiere una vía de regulación de la familia de cel-miR-35 que favorece la acumulación de la proteína lin-35/Rb (ver **figura 20b**) [68,86]. Son pocos los trabajos que sugieren que los miRNAs favorecen la traducción de proteínas por lo cual hace interesante evaluar esta vía [15,96]. En el presente estudio no se encontraron secuencias complementarias de la familia de cel-miR-35 y hsa-miR-181d-3p con lin-35/Rb, lo cual sugiere que estos miRNAs no pueden regular de forma directa a lin-35/Rb. Se ha sugerido en el nematodo que existe un regulador río arriba de lin35/Rb que inhibe su traducción que a su vez está regulado de forma negativa por la familia de cel-miR-35 pero se desconoce quién es [68].

8.11.-Características generales de las familias de let-7, lin-4/miR-125, miR-1, miR-9/miR-75, miR-34, miR-100/miR-51 y miR-124.

En las **tablas 12-18** se presentó información de las funciones de las familias de let-7, lin-4/miR-125, miR-1, miR-9/miR-75, miR-34, miR-100/miR-51 y miR-124. A nivel evolutivo se encontró información importante ya que algunos organismos bilateria no tienen miembros de estas familias, lo que puede explicarse por las siguientes 2 hipótesis: 1) esos miRNAs no fueron relevantes para estos organismos y los perdieron; 2) existen miembros en estos organismos que aún no han sido descubiertos.

En las **tablas 12-18** los miRNAs señalados con un asterisco (*miRNA-X), son miRNAs que aún no se han citado como miembros de las familias donde fueron ubicados en el presente estudio. Aquí se alinearon con los miembros ya caracterizados y se encontró que varios presentan nucleótidos en las mismas posiciones por lo que se concluyó que comparten un miRNA ancestral con la familia.

Para terminar esta discusión, las **tablas 12-18** demuestran que falta mucho por conocer sobre los miRNAs. Falta conocer a fondo la regulación de la expresión de cada miRNA maduro desde el estado de metilación de sus promotores hasta su correcto procesamiento durante su biogénesis [14,103]. Estas **tablas** sugieren que se tiene que estudiar la ubicación subcelular de cada miRNA, cómo se transporta tanto dentro como fuera de la célula, incluso en diferentes tejidos [15,96]. Se tendrá que conocer las funciones de cada miembro de las familias reportadas, si participan en los mismos procesos celulares o en diferentes, así como conocer bajo qué tipos de estrés se expresan [47,64,89,95]. Se deberá conocer qué tipo de funciones moleculares realizan, los diferentes niveles a los que regulan la expresión genética, si trabajan solos o cooperan con otros miRNAs para regular diferentes blancos [7,13,15,22,27,87,89]. También se tendrá que comparar la información obtenida en diferentes especies sobre el mismo gen y conocer si son la mismas o son diferentes [12,10,25,47,89,100]. Toda esta información podrá ser extrapolada a sus homólogos en humanos que estén participando en las diferentes enfermedades multifactoriales donde se han visto involucrados como el Cáncer, la Obesidad, el Parkinson y el Alzheimer, enfermedades de interés actual en el área de las Ciencias Biomédicas [15].

9.-CONCLUSIONES

- ✓ En miRBase versión 21 se tienen registrados 250 miRNAs precursores para *C. elegans* y 1881 para humanos mientras que se pueden obtener de manera manual las secuencias de nucleótidos de 447 miRNAs maduros de *C. elegans* y 2813 de humanos.
- ✓ En *C. elegans* 140 miRNAs son intergénicos (56%), 70 son intrónicos (28%), 5 son exónicos (2%) y 35 son antisentido (14%).
- ✓ En *C. elegans* 424 de 447 (95%) de sus miRNAs maduros y en humanos 2272 de 2813 (80%) de sus miRNAs maduros, se han descubierto en condiciones experimentales.
- ✓ Los miRNAs precursores de *C. elegans* presentan homología con los miRNAs precursores de nematodos, de moscas, de moluscos, de planarias y de vertebrados.
- ✓ Con el criterio de región-semilla idéntica (2-7), 161 de 447 (36%) de los miRNAs maduros de *C. elegans* y 1932 de 2813 (69%) de los miRNAs maduro de humano se agrupan en 55 y 624 familias respectivamente.
- ✓ Con el criterio de región-semilla idéntica (2-7), 226 de 447 (50%) de los miRNAs maduros de *C. elegans* se agrupan en 160 familias con 332 de 2813 (12%) de los miRNAs maduros de humano.
- ✓ En *C. elegans* el clúster con el mayor número de miembros es cel-miRc-35 con 7 miembros mientras que la familia más grande es cel-miR-35 con 8 miembros.
- ✓ La familia de cel-miR-35 presenta homología con miRNAs de nematodos, planarias, moluscos, vertebrados como el pez cebra y en mamíferos, incluso con el miRNA de humano llamado hsa-miR-181d-3p que se desconoce su función.

- ✓ La familia de cel-miR-35 y hsa-miR-181d-3p presentan sitios de hibridación con *gld-1* y *NANOS3-003*, genes que pertenecen a la familia de *NANOS*, una familia de genes que participa en la diferenciación de las células de la línea germinal.
- ✓ Las familias de let-7, lin-4/miR-125, miR-1, miR-9/miR-75, miR-34, miR-100/miR-51 y miR-124, tienen miRNAs homólogos en diferentes organismos bilateria destacando que en humano se han asociado a diferentes enfermedades multifactoriales.

10.-PERSPECTIVAS

- ✓ Actualizar la base de datos aquí generada sobre los miRNAs de *C. elegans* y de humano. Esta base de datos deberá tener sus miRNAs clasificados, presentar la evidencia experimental que apoya su existencia de manera actualizada, mencionar los miRNAs que presentan homología entre las 2 especies y deberá comparar las funciones que tiene cada miRNA en cada especie.
- ✓ Subir a la red esta base de datos y que esté disponible de manera gratuita.
- ✓ Hacer redes moleculares de los miRNAs de humano que se han visto implicados en diferentes enfermedades multifactoriales con sus blancos sugeridos y posteriormente analizarlas con experimentos *in vivo* en el nematodo.
- ✓ Agrupar en familias con el criterio de región-semilla idéntica (2-7), miRNAs de diferentes especies tanto invertebrados como vertebrados, así como alinear las secuencias de nucleótidos de estos miRNAs.
- ✓ Estudiar la relación funcional y evolutiva de la familia de cel-miR-35 y del miRNA hsa-miR-181d-3p.
- ✓ Estudiar la relación funcional y evolutiva de la familia de cel-miR-35 y lin-35/Rb.

11.-BIBLIOGRAFÍA

1. Ramírez, J. et al. (2016). *Gen: unidad estructural y funcional de la herencia* de Genómica estructural y funcional en las enfermedades multifactoriales. LEEA 1ra edición. México. pp. 15-45.
2. Watson, J. D. et al. (1953). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, (171): pp. 737-8.
3. Crick, F. (1970). Central dogma of molecular Biology. *Nature*, (227): pp. 561-63. DOI: 10.1038/227561a0.
4. URL:
<http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/ninos/Experimento%20o%20Actividad%20del%20mes.html>
5. Krebs, J. et al. (2014). *Genes are DNA* of Lewin's Genes XI. Jones & Bartlett Learning. 11th edition. United States of America. pp. 14-15.
6. Krebs, J. et al. (2014). *Genome sequences and Gene Numbers* of Lewin's Genes XI. Jones & Bartlett Learning. 11th edition. United States of America. pp. 120-30.
7. Reena, V. K., and Subbaya, S. (2014). Competing endogenous RNAs (ceRNAs): new entrants to the intricacies of gene regulation. *Frontiers in genetics, Review*, 5(8): pp. 1-9. DOI: 10.3389/fgene.2014.00008.
8. Tisseur, M., K., M., and Morillon, A. (2011). Pervasive transcription. Lessons from yeast. *Biochimie, Review*, 93: pp. 18-96. DOI: 10.1016/j.biochi.2011.07.001.
9. Krebs, J. et al. (2014). *Regulatory RNA* of Lewin's Genes XI. Jones & Bartlett Learning. 11th edition. United States of America. pp. 872-93.
10. García, L. (2016). Estudio de la función de microRNAs expresados en condiciones de ayuno en *Caenorhabditis elegans*. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM México.
11. Nie, L. et al. (2012). Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. *Am J Transl Res, Review*, 4(2): pp. 127-50. ISSN: 1943-8141/AJTR1202001.
12. Berindan, I., et al. (2014). MicroRNAome genome: a treasure for Cancer Diagnosis and Therapy. *CA CANCER J CLIN*, 64: pp. 311-36. DOI: 10.3322/caac.21244.
13. Carthew, R. and Sontheimer, E. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell, Review*, 136(6):pp. 642-55. DOI: 10.1016/j.cel.2009.01.035.
14. Ha, M. and Kim, N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature, Review*, 15: pp. 509-24. DOI: 10.1038/nrm3838.
15. Ramírez, J. et al. (2016). *Aspectos moleculares de los microARNs y MiRNómica* de Genómica estructural y funcional en las enfermedades multifactoriales. LEEA 1ra edición. México. pp. 449-81.
16. García, L., Pérez, M. and Miranda, J. (2013). The emerging role of microRNAs in the regulation of gene expression by nutrients. *Journal of Nutrigenetics Nutrigenomics, Review*, 6: pp. 16-31. DOI: 10.1159/000345826.

17. Meunier, J. et al. (2013). Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Research*, 23: pp. 34-45. DOI: 10.1101/gr.140269.112.
18. Chandan, K. (2015). *MicroRNA biogenesis in regenerative Medicine* in MicroRNA in regenerative Medicine. Elsevier. pp. 3-46.
19. Martínez, N. et al. (2008). Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity. *Genome Research*, 18: pp. 2005-15. DOI: 10.1101/gr.083055.108.
20. Krebs, J. et al. (2014). *Glossary of Lewin's Genes XI*. Jones & Bartlett Learning. 11th edition. United States of America. pp. 894-918.
21. Batzel, P. et al. (2015). miRNA nomenclature: a view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants. *Trends in Genetics, Review*, 31(11): pp. 613-26. DOI: 10.1016/j.tig.2015.09.002.
22. Finnegan, E. F. and Pasquinelli, A. E. (2013). microRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Biochem Mol Biol., Review*, 48(1): pp. 51-68. DOI: 10.3109/10409238.2012.738643.
23. Flores, C., F. (2009). Caracterización de los mecanismos de acción de microRNAs. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas Instituto de Fisiología Celular, UNAM México.
24. Jones, G. et al. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34: D140-4. DOI: 10.1093/nar/gkj112.
25. URL: <http://www.mirbase.org/>
26. Broughton, J., P., et al. (2016). Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity. *Molecular Cell* 64: pp. 1-14. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.09.004.
27. Luengo, G. et al. (2013). CircRNA: esponjas moleculares de microRNAs, ¿futuro terapéutico en cáncer? *Eubacteria, Revisión*, 32: pp. 1-12. ISSN: 1697-0071.
28. Brennecke, J. et al. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology* 3(3): pp. 0404-18. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030085.
29. Bartel, D. P. et al. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19: pp. 92-105. DOI: 10.1101/gr.082701.108.
30. Bartel, D. (2009). MicroRNA target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): pp. 215-33. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
31. Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature, Review*, 12: pp. 846-60. DOI: 10.1038/nrg3079.
32. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementary to *lin-14*. *Cell*, 75: pp. 843-54.
33. Reinhart, B. J. et al. (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403: pp. 901-6. DOI: 10.1038/35002607.
34. Pasquinelli, A., E. et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408: pp. 86-9. DOI: 10.1038/35040556.
35. URL: <http://www.wormbook.org/>
36. URL: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>

37. Cassada, R.C. and Russell, R.L. (1975). The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 46(2): 326-42.
38. Vowels, J.J. and Thomas, J.H. (1992). Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 130(1): pp. 105-23.
39. Golden, J.W. and Riddle, D.L. (1984). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev. Biol.*, 102(2): pp. 368-78.
40. Maupas, É. (1900). Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* 8: pp. 463-624.
41. Félix, M. A., and Braendle, C. (2010). The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 20(22): pp. R965-9. DOI: 10.1016/j.cub.2010.09.050.
42. Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1): pp. 71-94.
43. Consortium, T. C. elegans S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396): pp. 2012-18. DOI: 10.1126/science.282.5396.2012.
44. Liu, J. et al. (2013) Advance in research of microRNA in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cellular Biochemistry, Review*, 114: pp. 994-1000. DOI: 10.1002/jcb.24448.
45. Ramírez, J. et al. (2016). Estrategias para la identificación de Loci y genes involucrados de Genómica estructural y funcional en las enfermedades multifactoriales. LEEA 1ra edición. México. pp. 275-86.
46. Baumeister, R., Ge L. (2002). The worm in us *Caenorhabditis elegans* as a model of human disease. *Trends Biotechnol.*, 20(4): pp. 147-8.
47. Isik, M. et al. (2016). MicroRNA mir-34 provides robustness to environmental stress response via the DAF-16 network in *C. elegans*. *Scientific Reports* 6: pp. 1-11. DOI: 10.1038/srep36766.
48. Rankin, C. H. (2015). A review of transgenerational epigenetics for RNAi, longevity, germline maintenance and olfactory imprinting in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Experimental Biology, Retview*, 218: pp. 41-49. DOI: 10.1242/jeb.108340.
49. Boyerinas, B. et al. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-Related Cancer, Review*, 17: pp. F19-F36. DOI: 10.1677/ERC-09-0184.
50. Villard, A. et al. (2015). Diagnostic value of Cell-free circulating microRNAs for Obesity and Type 2 Diabetes: a meta-analysis. *J Mol Biomark Diagn* 6(6): pp. 1-21. DOI: 10.4172/2155-9929.1000251.
51. Coolen, M. et al. (2013). miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience, Review*, 7: pp. 1-11. DOI: 10.3389/fncel.2013.00220.
52. Gong, Y. et al. (2015). The role of miR-100 in regulating apoptosis of breast cancer cells. *Nature, Scientific reports*, 5: pp. 1-13. DOI: 10.1038/srep11650.
53. URL: <http://www.maestrosdelweb.com/que-son-las-bases-de-datos/>
54. Ramírez, J. et al. (2016). Nutrigenética y nutrigenómica de Genómica estructural y funcional en las enfermedades multifactoriales. LEEA 1ra edición. México. pp. 363-68.

55. Ventoso, C. et al. (2008). Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and Human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS ONE*, 3(7): pp. 1-23. DOI: 10.1371/journal.pone.0002818.
56. Saavedra, E. and Horvitz, R. (2010). Many families of *Caenorhabditis elegans* microRNAs are not essential for development or viability. *Curr Biol.*, 20(4): pp. 367-73. DOI: 10.1016/j.cub.2009.12.051.
57. García, L., Miranda, J. et al. (2015). High-Throughput profiling of *Caenorhabditis elegans* starvation-responsive microRNAs. *PLoS ONE* 10(11): pp. 1-22. DOI: 10.1371/journal.pone.0142262.
58. Wang, y. et al. (2016). microRNAs in the same clusters evolve to coordinately regulate functionally related genes. *Mol. Biol. Evol.*, 33(9): pp. 2232-47. DOI: 10.1093/molbev/msw089.
59. Gama, S. et al. (2016). RegulonDB version 9.0: high-level integration of gene regulation, coexpression, motif clustering and beyond. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1): pp. D133-43. DOI: 10.1093/nar/gkv1156.
60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
61. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleo/>
62. URL: <http://www.ebi.ac.uk/>
63. Letunic and Bork. (2016). iTOL. *Nucleic Acids Res* DOI: 10.1093/nar/gkw290.
64. URL: <http://www.wormbase.org/>
65. URL: <http://www.ensembl.org/index.html>
66. URL: <http://www.genome.jp/kegg/>
67. Jan, C. et al. (2011). Formation, regulation and evolution of *Caenorhabditis elegans* 3' UTRs. *Nature*, 469: pp. 97-101. DOI: 10.1038/nature09616.
68. Lui, M. et al. (2011). *mir-35* is involved in intestine cell G1/S transition and germ cell proliferation in *C. elegans*. *Cell Research, Nature*, 21: pp. 1605-18. DOI: 10.1038/cr.2011.102.
69. McJunkin, K. and Ambros, V. (2014). The Embryonic *mir-35* family of microRNAs promotes Multiple Aspects of Fecundity in *Caenorhabditis elegans*. *G3*, 4: 1747-54. DOI: 10.1534/g3.114.011973.
70. Kagias, K. and Pocock, R. (2015). microRNA regulation of the embryonic hypoxic response in *Caenorhabditis elegans*. *Nature, Scientific Reports*, 5: pp. 1-9. DOI: 10.1038/srep11284.
71. Ortiz, L. (2013). Estudio de los efectos de una dieta alta en glucosa y/o colesterol sobre el fenotipo y sobre la expresión de los microRNAs miR-34 y miR-35 y del gen *gld-1* en un modelo de *C. elegans*. Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM México.
72. URL: <http://www.vetparasitology.ugent.be/page34/index.html>
73. URL: https://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2014/stalsber_kass/reproduction.htm
74. URL: <http://genome.wustl.edu/genomes/detail/caenorhabditis-brenneri>

75. URL: <http://caenorhabditis.bio.ed.ac.uk/home/download>
76. URL: <http://www.moredun.org.uk/research/research-@-moredun/parasitic-worms/nematode-vaccines>
77. URL: <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/news/threadworms-throughout-time/>
78. URL: <http://faculty.ucr.edu/~pdeley/vce/Panagrellus/redivivus/thumbs.html>
79. URL: http://www.wormbook.org/chapters/www_genomesStrongyloides.2/strongyloides.2.html
80. URL: <https://uni.no/en/news/2014/12/02/sea-anemones-masters-producing-new-nerve-cells>
81. URL: <http://genome.wustl.edu/genomes/detail/schmidtea-mediterranea>
82. URL: <http://www8.nos.noaa.gov/onms/Park/Parks/SpeciesCard.aspx?refID=4&CreatureID=130&pID=3>
83. Mensch, J. (2009). Identificación y caracterización de genes con variación natural para el tiempo de desarrollo a partir de mutantes heterocrónicos de *Drosophila*. Programa de doctorado en el área de Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.
84. Gilchrist, M. et al. (2004). Defining a large set of full length clones from a *Xenopus tropicalis* EST project. *Dev. Biol.*, 271: pp. 498-516.
85. URL: <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/solutions/zebrafish>
86. Massirer, K. B. et al., (2012). The miR-35-41 Family of microRNAs regulates RNAi sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Plos genetics*, 8(3): pp. 1-10. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002536.
87. Sherrard, R. et al. (2017). miRNAs cooperate in apoptosis regulation during *C. elegans* development. *Genes & development* 31: pp. 209-22. DOI: 10.1101/gad.288555.116.
88. McJunkin, K. and Ambros, V. (2017). A microRNA family exerts maternal control on sex determination in *C. elegans*. *Genes & development* 31(4): pp. 442-37. DOI: 10.1101/gad.290155.116.
89. Dumortier, O. et al. (2013). MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. *Cell, metabolism, Review*, 18: pp. 312-24. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.06.004.
90. Sun, T. et al. (2009). MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 23(6): pp. 925-31. DOI: 10.1210/me.2008-0298.
91. Roush, S. and Slack J. (2008). The *let-7* family of microRNAs. *Cell press, Review*, 18(10): pp. 505-16. DOI: 10.1016/j.tcb.2008.07.007.
92. Sun et al. (2013). Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *Jornal of Hematology & Oncology, Review*, 6(6): pp. 1-8. DOI: 10.1186/1756-8722-6-6.
93. Cisneros, F. (2017). Papel de CTCF en la regulación transcripcional del *miR-125b-1* en líneas celulares de cáncer de mama. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM México.
94. Chen, Q. et al. (2016). miR-206 regulates cisplatin resistance and EMT in human lung adenocarcinoma cells partly by targeting MET. *Oncotarget* 7(17): pp. 24510-26. DOI: 10.18632/oncotarget.8229.

95. Sweetman, D. et al. (2006). FGF-4 signaling is involved in mir-206 expression in developing somites of chicken embryos. *Developmental Dynamics* 235: pp. 2185-91. DOI: 10.1002/dvdy.20881.
96. Leung, A. (2015). The whereabouts of microRNA actions: cytoplasm and beyond. *Trends in Cell Biology, Review*, 25(10): pp. 601-10. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.07.005.
97. Topol, A. et al. (2016). Dysregulation of miR-9 in a subset of Schizophrenia patient-derived neural progenitor cells. *Cell Reports*15: pp. 1024-36. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.03.090.
98. Rokavec, M. et al. (2014). The p53/miR-34 axis in development and disease. *Journal of Molecular Cell Biology, Review*, 6(3): pp. 214-30. DOI: 10.1093/jmcb/mju003.
99. Liang, T. et al. (2012). Genome-wide analysis of mir-548 gene family reveals evolutionary and functional implications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: pp. 1-8. DOI: 10.1155/2012/679563.
100. Freitas, F. C., et al. (2017). MicroRNA-34 directly targets pair-rule genes and cytoskeleton component in the honey bee. *Scientific Reports* 7: pp. 1-10. DOI: 10.1038/srep40884.
101. Shaw, W., R. et al. (2010). The conserved miR-51 microRNA family is redundantly required for embryonic development and pharynx attachment in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 185: pp. 897-905. DOI: 10.1534/genetics.110.117515.
102. Negi, V., et al. (2015). Altered expression and editing of miRNA-100 regulates iTreg differentiation. *Nucleic Acids Research*, 43(16):pp. 8057-65. DOI: 10.1093/nar/gkv752.
103. Chandan, K. (2015). *Epigenetic modification of microRNAs* in MicroRNA in regenerative Medicine. Elsevier. pp. 92-4.
104. URL: http://www.sciencemag.org/news/sifter/one-five-genetics-papers-contains-errors-thanks-microsoft-excel?utm_source=sciencemagazine&utm_medium=facebook-text&utm_campaign=excel-6950
105. Scot, H. et al. (2012). MiR-3120 is a mirror MicroRNA that targets heat shock cognate protein 70 and auxilin messenger RNAs and regulates clathrin vesicle uncoating. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(18): pp. 14726-33. DOI: 10.1074/jbc.M111.326041.
106. Isik, M., Korswagen, H. C. and Berezikov, E. (2010). Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Silence*, 1: pp. 1-9. DOI: 10.1186/1758-907X-1-5.
107. Ozsolak, F. et al. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 22: 3172-83. DOI: 10.1101/gad.1706508.
108. Ladewig, E. et al. (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Research*, 22: pp. 1634-45. DOI: 10.1101/gr.133553.111.
109. Tudden lham, L. et al. (2006). The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett.*,580: pp. 4214-17. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.080.
110. Rakoczy, J. et al. (2013). MicroRNAs-140-5p/140-3p modulate Leydig cell numbers in the developing mouse testis. *Biol. Reprod.*, 88(6): pp. 1-11. DOI: 10.1095/biolreprod.113.107607.
111. Munthe, E. et al. (2017). Analysis of the miR-34 family functions in breast cancer reveals annotation error of miR-34b. *Scientific reports, Nature*, 7(9655): pp. 1-10. DOI: 10.1038/s41598-017-10189-1.

112. Ulitsky, I. (2016). Evolution to the rescue: using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. *Nature, Review*, 17: pp. 601-15. DOI: 10.1038/nrg.2016.85.
113. Stanislaw A. G., et al. (2017). RNA-based recognition and targeting: sowing the seeds of specificity. *Nature, Review*, 18: pp. 215-29. DOI: 10.1038/nrm.2016.174.
114. Gareth, J. (2010). Molecular Evolution: Gene Convergence in Echolocating Mammals. 20: pp. R62-4. ISSN: 0960-9822.
115. Seok, H. et al. (2016). MicroRNA target recognition: insights from transcriptome-wide non-canonical interactions. *Minireview Mol. Cells* 39(5): pp. 375-81. DOI: 10.14348/molcells.2016.0013.
116. Place, R. F. et al. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *PNAS*, 105(5): pp.1608-13. DOI: 10.1073pnas.0707594105.
117. Barta, T. et al. (2016). miRNAsong: a web-based tool for generation and testing of miRNA sponge constructs *in silico*. *Scientific Reports*6: pp. 1-8. DOI: 10.1038/srep36625.
118. Thomson, D.W. and Dinger, M. E. (2016). Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nature, Review*, 17: pp. 272-83. DOI: 10.1038/nrg.2016.20.
119. URL: <http://ciencia.glosario.net/genetica/pleiotrop%EDa-5491.html>
120. Tsuda, M. et al. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*, 301: pp. 1239-41. DOI: 10.1126/science.1085222.
121. URL: <https://www.cancerquest.org/cancer-biology/cancer-genes>
122. Benavente, C. and Dyer, M. A. (2015). Genetics and epigenetics of human Retinoblastoma. *Annu. Pathol. Mech. Dis. Review*, 10: pp. 547-62. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012414-040259.
123. Dick, F. A. and Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature, Review*, 14: pp. 297-306. DOI: 10.1038/nrm3567.
124. Lu, X. and Horvitz, R. (1998). *lin-35* and *lin-53*, two genes that antagonize a *C. elegans* Ras pathway, encode proteins similar to Rb and its binding protein RbAp48. *Cell, Press* 95: pp. 98-91. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81722-5.
125. Mingxue, C. et al. (2013). The tumor suppressor Rb critically regulates starvation-induced stress response in *C. elegans*. *Curr Biol.*, 23(11): pp. 975-80. DOI: 10.1016/j.cub.2013.04.046.

12.-ANEXOS

Abreviatura	Significado
IE	Inferido por experimento
IDA	Inferido por ensayo directo
IMP	Inferido por fenotipo mutante
IGI	Inferido por interacción genética
IEP	Inferido por patrón de expresión
ICA	Inferido por análisis computacional
IPI	Inferido por interacción física

Anexo 1.-Nomenclatura de la clasificación del tipo de evidencia que tiene registrada la base de datos RegulonDB que apoya la existencia de los genes que reporta [59].

Especie	miRBase versión 17	miRBase versión 21
<i>N. vectensis</i>	49	141
<i>S. mediterranea</i>	148	148
<i>L. gigantea</i>	60	59
<i>C. briggsae</i>	*	175
<i>C. elegans</i>	207	250
<i>D. melanogaster</i>	238	256
<i>X. tropicalis</i>	*	192
<i>D. rerio</i>	358	346
<i>G. gallus</i>	*	740
<i>M. musculus</i>	720	1193
<i>H. sapiens</i>	1424	1881

Anexo 2.-Comparación del número de miRNAs precursores que tenía la versión 17 de miRBase con la versión 21. *Organismos no evaluados en la revisión del Dr. E. Berezikov en el 2011 [31].

miRNA maduro de <i>C. elegans</i>	Región- semilla 2-7	miRNA maduro de humano
let-7-5p, miR-48-5p, miR-84-5p, miR-241-5p, miR-794-5p, miR-795-5p.	GAGGUA	let-7a-1-5p, let-7a-2-5p, let-7a-3-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-1-5p, let-7f-2-5p, let-7g-5p, let-7i-5p, miR-98-5p, miR-4458-5p.
		miR-202-3p, miR-4500-3p.
lin-4-5p, miR-237-5p.	CCCUGA	miR-125a-5p, miR-125b-1-5p, miR-125b-2-5p, miR-4319-5p.
		miR-345-3p, miR-4732-3p.
lin-4-3p.	CACCUG	miR-3622a-3p, miR-3622b-3p, miR-6765-3p.
miR-796-5p.	GGAAUG	
miR-1-3p, miR-256-3p, miR-1819-3p.		miR-1-1-3p, miR-1-2-3p, miR-206-3p, miR-613-3p.
miR-34-5p, miR-1824-5p, miR-4933-5p	GGCAGU	miR-34a-5p, miR-34c-5p, miR-449a-5p, miR-449b-5p.
		miR-548au-3p.
miR-35-5p.	GCUGGU	miR-133a-1-5p, miR-133a-2-5p, miR-133a-2-5p, miR-138-1-5p, miR-138-2-5p.
		miR-6131-3p.
miR-35-3p, miR-36-3p, miR-37-3p, miR-38-3p, miR-39-3p, miR-40-3p, miR-41-3p, miR-42-3p.	CACCGG	miR-181d-3p.
miR-37-5p.	GUGGGU	miR-6748-5p, miR-6793-5p.
miR-38-5p, miR-5545-5p.	CCGGUU	
		miR-671-3p.
miR-39-5p.	GCUGAU	
		miR-8075-3p.
miR-40-5p.	GUGGAU	miR-376b-5p, miR-376c-5p, miR-3691-5p.
		miR-8056-3p.
miR-41-5p.	GUGGUU	miR-203a-5p, miR-1273g-5p.

miR-42-5p.	UGGGUG	miR-1262-5p, miR-6736-5p, miR-6741-5p.
		miR-4701-3p.
miR-43-5p.	ACAUCA	
		miR-499a-3p, miR-499b-3p.
miR-44-5p, miR-45-5p.	UGGAUG	
		miR-423-3p, miR-432-3p.
miR-46-5p, miR-47-5p.	AGAGAG	miR-6758-5p, miR-6856-5p.
miR-49-3p, miR-83-3p.	AGCACC	miR-29a-3p, miR-29b-1-3p, miR-29b-2-3p, miR-29c-3p, miR-6871-3p.
miR-50-5p.	GAUAUG	miR-190a-5p, miR-190b-5p.
miR-62-3p, miR-90-3p.		
miR-51-5p, miR-52-5p, miR-53-5p.	ACCCGU	miR-99a-5p, miR-99b-5p, miR-100-5p.
miR-54-3p, miR-55-3p, miR-56-3p.		
miR-51-3p.	AUGGAA	miR-3688-1-3p, miR-3688-2-3p.
miR-53-3p.	ACGGCA	miR-548al-3p, miR-4445-3p.
miR-54-5p.	GGAUAU	miR-3201-5p, miR-4791-5p.
miR-56-5p, miR-2213-5p.	GGCGGA	miR-25-5p.
miR-57-5p.	ACCCUG	miR-10a-5p, miR-10b-5p.
miR-58a-5p.	GCCCUA	
		miR-18b-3p.
miR-60-5p.	ACUGGA	miR-1243-5p.
miR-1823-3p.		miR-3654-3p.
miR-64-5p, miR-65-5p, miR-66-5p, miR-229-5p.	AUGACA	miR-425-5p.
miR-63-3p.		
miR-65-3p.	UGCUAC	miR-5089-3p.

miR-67-5p.	GCUCAU	
		miR-6847-3p.
	CACAAC	miR-5003-5p.
miR-67-3p.		
	AAUACG	miR-6082-5p.
miR-70-3p.		
miR-71-3p, miR-2953-3p.	AUCACU	hsa-miR-34c-3p.
miR-72-5p, miR-266-5p, miR-8187-3p, miR-8188-5p.	GGCAAG	miR-31-5p, miR-6809-5p.
miR-73-3p, miR-74-3p.		
miR-74-5p, miR-76-5p.	GGGCUU	miR-27a-5p.
miR-75-3p, miR-79-3p.	UAAAGC	miR-9-1-3p, miR-9-2-3p, miR-9-3-3p.
miR-77-5p.	AUGGUU	miR-758-5p.
		miR-218-2-3p.
	GGAGGC	miR-650-5p, miR-3612-5p.
miR-78-3p.		
miR-80-5p.	GCUUUC	miR-3160-1-5p, miR-3160-2-5p.
miR-83-5p.	CUGAAU	
		miR-4427-3p, miR-4680-3p, miR-5187-3p.
	UGGGCU	miR-1587-5p, miR-3620-5p.
miR-86-3p.		miR-1587-5p, miR-3620-5p, miR-4674-3p.
miR-90-5p.	GGCUUU	miR-3119-1-5p, miR-3119-2-5p.
	AAGGCA	miR-3714-5p.
miR-124-3p.		miR-124-1-3p, miR-124-2-3p, miR-124-3-3p, miR-506-3p, miR-3714-5p, miR-3910-1-3p, miR-3910-2-3p.
miR-228-5p.	AUGGCA	miR-183-5p.
miR-228-3p.	CGGAUC	miR-127-3p.

	GAAAGG	miR-6730-5p.
miR-229-3p.		miR-5681a-3p.
miR-231-5p.	UGACUG	miR-3136-5p, miR-4439-5p.
		miR-943-3p.
miR-231-3p, miR-787-3p.	AAGCUC	miR-99a-3p, miR-99b-3p, miR-6796-3p.
miR-232-5p.	CUGCAG	miR-1205-5p, miR-3158-1-5p, miR-3158-2-5p.
		miR-17-3p, miR-1184-1-3p, miR-1184-2-3p, miR-1184-3-3p.
miR-234-5p.	GGUAUU	miR-5681b-5p.
miR-234-3p.	UAUUGC	miR-137-3p.
	AUUGCA	miR-32-5p.
miR-235-3p.		miR-25-3p, miR-92a-1-3p, miR-92a-2-3p, miR-92b-3p, miR-363-3p, miR-367-3p.
miR-236-5p.	GUCUUA	miR-200c-5p.
		miR-550a-1-3p, miR-550a-2-3p, miR-550a-3-3p.
	AAUACU	miR-8084-5p.
miR-236-3p.		miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-429-3p.
miR-238-5p.	GGAUGU	miR-4764-5p.
miR-239a-3p.	GUGUCU	miR-4711-3p.
miR-240-5p.	GAGGAU	miR-1185-1-5p, miR-1185-2-5p, miR-3605-5p, miR-3679-5p.
mir-240-3p.	ACUGGC	miR-193a-3p, miR-193b-3p, miR-892b-3p.
miR-244-5p	CUUUGG	miR-9-1-5p, miR-9-2-5p, miR-9-3-5p.
miR-245-5p.	CUAUUU	
		miR-138-2-3p.
miR-245-3p.	UUGGUC	miR-133a-1-3p, miR-133a-2-3p, miR-133b-3p.
	UACAUG	miR-4666a-5p.
miR-246-3p.		

miR-247-5p.	AGAGAA	miR-3925-5p.
		miR-3123-3p.
miR-249-5p.	GCAACG	miR-891a-5p.
miR-253-5p.	UUUUCA	
		miR-335-3p.
miR-255-5p.	UAAGAA	
		miR-3653-3p.
miR-259-5p.	AAUCUC	miR-216a-5p, miR-216b-5p.
	AGCUUU	miR-208a-5p, miR-208b-5p.
miR-261-3p.		
	GCGGGU	miR-3621-5p, miR-3656-3p.
miR-264-3p.		
	GAGGGA	miR-3126-5p, miR-4510-5p, miR-6127-5p, miR-6129-5p, miR-6875-5p.
miR-265-3p.		miR-4419a-3p, miR-6130-3p, miR-6133-3p.
miR-268-5p, miR-269-5p.	GCAAGA	miR-4696-5p.
	GCAUGA	miR-6076-5p.
miR-270-3p.		miR-6797-3p.
	GUAGGC	miR-6806-5p.
miR-272-3p.		
miR-356b-5p.	GGUGAG	miR-4710-5p, miR-4792-5p.
miR-356b-3p.	UUGUUC	miR-375-3p, miR-6739-3p.
mir-357-3p, mir-786-3p.	AAUGCC	miR-365a-3p, miR-365b-3p.
miR-358-5p.	CCUGGC	miR-221-5p, miR-8073-5p.
miR-360-5p.	UGUGAC	
		miR-6808-3p.
miR-392-3p.	AUCAUC	miR-136-3p.

miR-787-5p.	AAGAUA	
		miR-4662a-3p.
miR-8191-5p.	CCCUGC	
miR-789-1-3p, miR-789-2-3p.		miR-6752-3p.
miR-790-5p.	UUGGCA	miR-96-5p, miR-182-5p, miR-1271-5p.
miR-791-3p, miR-8197-3p.		
miR-792-5p.	GAGAGU	
		miR-4693-3p.
miR-792-3p.	UGAAAU	miR-203a-3p.
miR-794-3p.	GAAAAC	miR-570-3p.
miR-798-3p.	AAGCCU	miR-7109-3p.
	UGUAAU	miR-2054-5p.
miR-1019-3p.		
miR-1021-5p.	AGUGAG	miR-3174-5p.
miR-1022-5p.	AGAUCA	miR-5694-5p.
miR-1819-5p.	AUCAUG	
		miR-96-3p, miR-2681-3p.
	ACCAUU	miR-6512-5p.
miR-1820-3p.		
miR-1822-3p.	AGCUGC	miR-22-3p.
miR-1828-3p.	CUGGAA	miR-875-3p, miR-6128-3p.
miR-1829a-5p.	AGGGGA	miR-6783-5p.
miR-1829b-3p, miR-1829c-3p, miR-4812-3p.	AACCAC	miR-6776-3p.
miR-1830-5p.	GAGGUU	miR-377-5p, miR-655-5p, miR-6086-5p.
	GUGGGC	miR-4417-5p.
miR-1832b-3p.		

	GAGGCU	miR-485-5p, miR-2467-5p, miR-6884-5p.
miR-1833-3p.		miR-3188-3p, miR-3975-3p.
miR-2207-5p.	GUGAAU	miR-1257-5p.
miR-2208a-5p, miR-2208b-5p, miR-2209a-5p, miR-2209c-5p.	AGUGUA	miR-4280-5p.
miR-2208b-3p.	UGCAGA	miR-1273h-3p, miR-3678-3p.
	GAGAUG	miR-1273f-5p, miR-4708-5p, miR-6088-5p.
miR-2209b-3p.		miR-143-3p, miR-4770-3p.
	AAAGAC	miR-7161-5p.
miR-2209c-3p.		miR-548u-3p.
miR-2210-3p.	AAAGUC	miR-6507-3p.
miR-2211-5p.	CUCCAU	miR-136-5p.
	AGUGGC	miR-3677-5p.
miR-2212-3p.		
miR-2215-5p.	CAGCAC	
		miR-383-3p, miR-3065-3p.
miR-2217a-5p, miR-2217b-2-5p, miR-2217b-3-5p, miR-2217b-4-5p.	AGAGUG	
		miR-5586-3p.
miR-2217a-3p.	CGACCC	miR-551a-3p, miR-551b-3p.
miR-2218a-5p.	AAACUA	miR-7844-5p.
miR-2220-5p.	UAAGAC	miR-499a-5p.
		miR-208a-3p, miR-208b-3p.
miR-4805-5p.	GCGGCA	miR-6820-5p.
miR-4805-3p.	AAUUUU	miR-590-3p.
miR-4810a-3p.	GAGUAU	miR-496-3p.
miR-4814-5p.	UCUCAA	miR-513c-5p, miR-514b-5p.

miR-4921-3p.	GUGCCA	miR-1227-3p.
miR-8206-5p.	AUAUAA	
miR-4922-1-3p, miR-4922-2-3p.		miR-410-3p.
	AAAGAG	miR-583-5p, miR-1276-5p, miR-4311-5p.
miR-4923a-3p.		
miR-4926-5p.	UAGGAG	
		miR-4266-3p.
miR-4927-5p.	UGGGUU	miR-3940-5p.
		miR-4507-3p, miR-6839-3p.
miR-4929-3p.	AUGCAC	miR-501-3p, miR-502-3p.
miR-4930-5p.	GCUGCC	
		miR-6882-3p.
miR-4931-3p.	CGCUGA	miR-6825-3p.
miR-4932-5p.	GGAUC	miR-638-5p.
		miR-4713-3p.
miR-4936-3p.	GCUUUG	miR-1251-3p.
miR-4937-5p.	UGGGUA	miR-1225-5p, miR-1229-5p.
miR-5546-5p.	CCCUUU	
		miR-6832-3p.
miR-5546-3p.	AAAAAU	miR-548c-3p.
	CCUAUC	miR-3927-5p.
miR-5547-3p.		
miR-5548-5p.	CCUUCU	miR-1248-5p.
		miR-1237-3p.
	GCCCUG	miR-3137-5p, miR-3173-5p, miR-7976-5p.
miR-5548-3p.		miR-146b-3p, miR-6799-3p.

miR-5549-5p.	UUGUGA	
		hsa-miR-758-3p.
miR-5550-5p.	CCCGCC	miR-4258-5p.
		miR-7108-3p.
miR-5550-3p.	AAAUGA	miR-1252-3p, miR-3646-3p.
miR-5552-5p.	GUAGUU	
miR-8196b-3p.		miR-4703-3p.
	CUGCCA	miR-6817-5p.
miR-5552-3p.		miR-4769-3p.
miR-5553-5p.	UGCCAC	
		miR-3064-3p, miR-4715-3p.
miR-5592-1-5p, miR-5592-2-5p.	GGCCCU	miR-1291-5p.
		miR-6775-3p, miR-6851-3p.
miR-5593-1-5p, miR-5593-2-5p.	AUGGCU	miR-135a-1-5p, miR-135a-2-5p, miR-135b-5p, miR-889-5p.
miR-5595-5p.	CUCUUU	miR-130b-5p.
miR-8186-1-5p, miR-8186-2-5p.	CUGCUC	
		miR-767-3p.
miR-8186-1-3p, miR-8186-2-3p.	AGCAAA	miR-548p-3p.
	AGUAGA	miR-411-5p.
miR-8188-3p.		
miR-8189-3p.	UGGCCU	miR-6878-3p.
miR-8190-5p.	GGGAAA	miR-4668-5p, miR-6733-5p, miR-6739-5p.
		miR-3153-3p.
	UUCCUA	miR-3685-5p.
miR-8190-3p.		miR-384-3p.
miR-8192-5p.	GGUCGA	miR-412-5p.

	GACACU	miR-3117-5p.
miR-8193-3p.		
	UAGAGG	miR-877-5p, miR-6866-5p.
miR-8195-3p.		miR-376a-1-3p.
miR-8197-5p.	GUGCUU	
		miR-636-3p.
miR-8200-5p.	GGCUCA	miR-4284-5p.
		miR-24-1-3p, miR-24-2-3p.
miR-8201-5p.	CUGGAU	miR-378j-5p, miR-6839-5p.
miR-8201-3p.	AUUACA	miR-6504-3p.
miR-8202-3p.	GAGACA	miR-4524a-3p.
miR-8206-3p.	UUCAGA	miR-3942-3p.
miR-8207-5p.	UGUCCU	
		miR-676-3p.
miR-8208-3p.	UGGUUC	miR-218-1-3p.
miR-8209-3p.	CUUCUU	miR-4778-3p.
miR-8210-5p.	GCCUUC	miR-4297-5p, miR-5581-5p.
miR-8211-3p.	CGGCUC	miR-6741-3p.
miR-8212-5p.	UGCUCA	
		miR-1178-3p.

Anexo 3.-Familias de miRNAs maduros que se encuentra su región-semilla tanto en *C. elegans* como en humano. Primera columna: nombre de los miRNAs maduros de *C. elegans*. Segunda columna: región-semilla encontrada. Tercera columna: nombre de los miRNAs maduros de humano.