



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

DISEÑO DE UN RNA ESPONJA PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN

DE MIR-223

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. REQUENEZ CONTRERAS JOSÉ LUIS

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

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICAS, UNAM.
DR. LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CD. MX. OCTUBRE, 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.

OFICIO CPCB/899/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de mayo de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **REQUEZ CONTRERAS JOSÉ LUIS** con número de cuenta 307203768, con la tesis titulada "**DISEÑO DE UN RNA ESPONJA PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE miR-223**", realizada bajo la dirección del **DR. GUILLERMO AQUINO JARQUÍN**:

Presidente: DR. JUAN MIRANDA RÍOS
Vocal: DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Suplente: DR. MIGUEL ÁNGEL VÁZQUEZ FLORES
Suplente: DR. LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 25 de septiembre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- Primeramente al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM.
- A los apoyos otorgados por el CONACYT durante los estudios de mi maestría.
- A los miembros del comité tutor, por el seguimiento hecho a este proyecto, por su ayuda y comentarios a culminar este proyecto.

Dr. Guillermo Aquino Jarquin.

Dra. Leticia Rocha Zavaleta.

Dr. León Patricio Martínez Castilla

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- A mis padres, por ser un gran ejemplo de perseverancia y darme su cariño, comprensión y apoyo incondicional.
- A mi familia: tíos, primos y hermanos, por acompañarme siempre y hacerme saber que puedo contar con ellos en todo momento.
- A Johana, por estar conmigo en las buenas y las malas, por escucharme y apoyarme todo el tiempo.
- Por último a mi asesor el Dr. Aquino, por su gran ayuda durante este proyecto para formarme como un gran investigador.

“Investigar es ver lo que todos ven y pensar lo que nadie ha pensado”

Albert Szent-Györgyi

Índice

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen.....	1
Abstract	2
1.- Introducción	2
1.1.- Los micro RNAs.....	2
1.2 Biogénesis de los miRNAs.....	3
1.3.- Mecanismo de acción de los miRNAs	5
1.4.- Estrategias de estudio de la función de los miRNAs	6
1.5.- RNAs competidores endógenos.....	8
1.6.- Micro RNA-223	12
2.-Justificación.....	14
3.-Hipótesis.....	14
4.-Objetivo general.....	14
4.1.-Objetivos particulares	14
5.-Estrategia experimental.....	15
.....	15
6.-Metodología.....	16
6.1.-Cultivo celular	16
6.2.-Diseño y construcción del vector de expresión para el RNA esponja.....	16
6.3.-Secuenciación por Método de Sanger	17
6.4.-Transfecciones	18
6.5.-Ensayos de luciferasa	18
6.6.-PCR en tiempo real (qPCR).....	19
6.7.-Western Blot	20
7.-Resultados y discusión	22
7.1.-Diseño y construcción de la secuencia de RNA esponja para miR-223.	22
7.2.-Validación del RNA esponja a través de ensayos de luciferasa	25
7.3.-Evaluación del nivel de expresión de miR-223 en presencia de Esp-223.....	28
7.4.-Construcción de un vector de expresión para inhibir a miR-223, basado en el 3'UTR de ABCB1.	31
7.5.-Efecto de mcherry-Esp-223 sobre miR-223 en células Jurkat.....	34

7.6.-Efecto de Esp-223 sobre blancos reportados de miR-223.....	36
8.-Conclusiones	40
9.-Perspectivas	41
10.-Literatura citada.....	42

Índice de figuras

Figura 1.- Biogénesis de los miRNAs ¹¹	4
Figura 2. Mecanismo de reconocimiento de los miRNAs ¹⁸	5
Figura 3. Mecanismo de acción de los miRNAs ¹⁸	6
Figura 4. Esquema de las moléculas usadas para el estudio de miRNAs ³¹	7
Figura 5.- Representación esquemática del pseudogen PTENP1 y su homólogo silvestre ⁴¹	9
Figura 6.- Representación esquemática del funcionamiento de un RNA esponja ³⁵	10
Figura 7.- Efecto de miR-223 sobre la proliferación de células Hela inyectadas en ratón ⁵³	13
Figura 8.- Esquema de la Secuencia de “Esp-223”	22
Figura 9. Sitios seleccionados para la clonación de ESP-223, en PLVX-SHRNA2.	24
Figura 10.- Validación de la clonación de la secuencia Esp-223	24
Figura 11.-Electroferograma de la secuencia de Esp-223 clonada en el plásmido PLVX-Esp-223.	25
Figura 12.-Mapa del plásmido PSI-CHECK.	26
Figura 13.- Restauración de la actividad de luciferasa por PLVX-Esp-223.	27
Figura 14.-Efecto de concentraciones crecientes de miR-223 y PSI-ABCB1 sobre la actividad de luciferasa.	28
Figura 15.- Efecto de Esp-223 sobre la expresión de miR-223.....	29
Figura16.- Mapa del plásmido PLVX-mCHERRY.	32
Figura 17.- Validación de la clonación de mCherry-Esp-223.....	33
Figura 18.- Eficiencia de transfección de los plásmidos Mcherry-esp-223 y miR223 en células AD-293.....	33
Figura 19.- Efecto de mCherry-Esp-223 sobre la expresión de miR-223 en AD-293.....	34
Figura 20.- Evaluación de la expresión de miR-223 en células JURKAT.	35
Figura 21.- Efecto de PSI-ABCB1 y mCherry-Esp-223 sobre la expresión de miR-223 en Jurkat.	36
Figura 22.- Efecto de miR-223 en la expresión de IGF-1R, IKK α y SP1	37
Figura 23.- Efecto de mCHERRY-Esp-223 y PSI-ABCB1 en la expresión de IGF-1R e IKK α	38

Índice de tablas

Tabla 1.- Características de algunos RNAs esponjas utilizados para inhibir la función de miRNAs.	11
Tabla 2.- Secuencias de oligonucleótidos diseñados para generar el RNA esponja.	17
Tabla 3.- Condiciones de reacción, para secuenciación capilar.	17
Tabla 4.- Secuencia de primers para secuenciar.	18
Tabla 5.- Condiciones de transfección, para ensayos de luciferasa.	18
Tabla 6.- Condiciones de reacción para generar cDNA.	19
Tabla 7.- Condiciones de reacción para qPCR.	19
Tabla 8.-Condiciones de Western Blot.	20

Resumen

Los microRNAs (miRNAs) son transcritos de aproximadamente 22 nucleótidos y recientemente se han encontrado una nueva clase de miRNAs que llegan hasta 80 nucleótidos, los cuales pueden regular la expresión genética a nivel transcripcional. Se ha reportado que aproximadamente 60% de los genes poseen al menos un sitio de unión para miRNAs, por lo que están involucrados en diversos procesos biológicos, por lo que han cobrado gran relevancia, tal es el caso de miR-223, cuya expresión está desregulado en diferentes enfermedades como influenza, hepatitis B, leucemia y algunos linfomas. Por otra parte nuestro grupo ha reportado que está relacionado con cuadros de quimio resistencia en leucemia a través de la regulación del gen MDR1.

El estudio de los miRNAs ha cobrado gran relevancia, por lo que se han desarrollado diferentes estrategias que permitan su estudio, los cuales incluyen sobre expresarlos o inhibirlos. Estas herramientas han evolucionado a lo largo del tiempo, pasando de secuencias sencillas como los antágonimos hasta llegar a los RNAs esponjas, denominadas así por su capacidad para absorber miRNAs. Este tipo de herramientas han demostrado gran eficiencia en la inhibición de la expresión de miRNAs, siendo ampliamente utilizadas en diversos estudios y varios modelos. miR-223 tiene gran relevancia al regular un gran número de genes como IGF-1R, IKK α , Foxo1A, participando en un gran número de procesos y siendo importante en diferentes enfermedades, por lo cual nos parece importante generar herramientas que nos permitan su estudio.

Debido a la gran eficiencia que se ha reportado de los RNA esponjas se decidió diseñar este un RNA esponja para el estudio de miR-223. Inicialmente se generó una construcción con 4 sitios de reconocimiento totalmente complementarios para miR-223, la cual fue clonada río abajo del gen que codifica para la proteína fluorescente verde. Sin embargo, los resultados de PCR en tiempo real, mostraron que este diseño era incapaz de inhibir a miR-223. Por esta razón, se generó una segunda construcción la cual poseía un solo sitio de reconocimiento parcialmente complementario a miR-223, con el cual se observó una inhibición significativa, con respecto al primer diseño, en células AD-293 y Jurkat. Este diseño fue capaz de reestablecer la expresión IKK α , un blanco reportado de miR-223, el cual fue observado mediante Western Blot en células AD-293, sin embargo este efecto no se pudo apreciar con los blancos IGF-1R y SP1.

Abstract

The microRNAs (miRNAs) are small RNAs of approximately 22 nucleotides and recently a new class of miRNAs have found that reach up to 80 nucleotides, which can regulate the genetic expression at a transcriptional level. It has been reported that approximately 60% of the genes possess at least one site of union for miRNAs, so they are involved in various biological processes, so they have gained great relevance, such is the case of MiR-223, whose expression is deregulated in different diseases such as influenza, hepatitis B, leukemia and some lymphomas. On the other hand, our group has reported in chemo resistance in leukemia through the regulation of the MDR1 gene.

The study of the miRNAs has gained great relevance, so we have developed different strategies that allow their study, which include about expressing or inhibiting them. These tools have evolved over time, passing from simple sequences like the Antágoiros to the Rnases Esponja, named for their ability to absorb miRNAs. This type of tools have shown great efficiency in the inhibition of the expression of miRNAs, being widely used in various studies and various models. MiR-223 has great relevance to regulating a large number of genes such as IGF-1r, IKK α , Foxo1A, participating in a large number of processes and being important in different diseases, so we think it is important to generate tools that allow us to study.

Due to the great efficiency that has been reported of the RNA sponges it was decided to design this one RNA sponge for the study of MiR-223. Initially a construction was generated with 4 sites of recognition totally complementary to MiR-223, which was cloned downstream of the gene that encodes for the fluorescent protein green. However, real-time PCR results showed that this design was incapable of inhibiting miR-223. For this reason, a second construction was generated which possessed a single site of recognition partially complementary to MiR-223, with which a significant inhibition was observed, with respect to the first design, in cells AD-293 and Jurkat. This design was able to reestablish the expression IKK α , a white reported from MiR-223, which was observed by Western Blot in cells AD-293, however this effect could not be seen with white IGF-1r and SP1.

1.- Introducción

1.1.- Los micro RNAs

El dogma central de la biología molecular actualmente establece que el flujo de la información genética va en dirección de moléculas de DNA, que son transcritas a moléculas de RNA, mismas que llevan el mensaje (mRNA) que será traducido a proteínas en el ribosoma. No obstante, no todos los transcritos de RNA codifican a proteínas, ejemplos de

estos son los RNA ribosomales (rRNA), los RNA de transferencia (tRNA), RNAs pequeños nucleares (snRNA), RNAs nucleolares (snoRNAs), entre otros¹.

Entre estos RNAs no codificantes se encuentran los micro RNAs (miRNAs), los cuales comprenden una gran familia de transcritos pequeños de aproximadamente 22 nucleótidos, aunque recientemente se han encontrado algunos que alcanzan los 80 nucleótidos, los cuales son altamente conservados entre especies^{2,3}. Los miRNAs han alcanzado gran relevancia debido principalmente a la capacidad de regular la expresión genética a nivel post transcripcional, a través de la complementariedad de bases con la región no traducible 3' (3'UTR) de los RNA mensajeros⁴.

El primer miRNA fue descubierto por Ambros y colaboradores en 1993, al encontrar a *lin-4*, un gen que no codificaba para una proteína, en cambio producía RNAs pequeños⁵. Se observó que estos RNAs tenían porciones complementarias en la región 3'UTR del transcrito de *lin-14*. Posteriormente se asoció la expresión de *lin-4* con la disminución de los niveles del transcrito de *lin-14*, que es fundamental en el desarrollo embrionario del nematodo *Caenorhabditis elegans*⁵.

Desde su descubrimiento, se han reportado una gran cantidad de miRNAs en diferentes especies. En humanos se estima que al menos un 60% de los genes codificantes tienen por lo menos un sitio de reconocimiento para un miRNA⁶. Esto sugiere que los miRNAs estén altamente involucrados en el mantenimiento de la homeostasis, regulando de forma muy precisa procesos como proliferación, diferenciación, muerte celular, entre muchos otros^{7,8}.

1.2 Biogénesis de los miRNAs

En animales se ha establecido una biogénesis canónica de los miRNAs, la cual podemos dividir en 2 fases principales, esquematizado en la figura 1. La primera fase se da en el núcleo, donde los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II o III, generando una estructura tallo-burbuja denominada pri-miRNA. Esta estructura es reconocida por la enzima Drosha, que realiza un corte en la base del tallo y que funciona como marca para ser reconocido por Exportina 5⁹, para luego ser exportado fuera del núcleo. En el citoplasma da lugar la segunda fase, en donde se lleva a cabo un segundo corte por la enzima Dicer, generando una molécula de RNA de doble cadena de aproximadamente 20 a 22 nucleótidos¹⁰. Por último, una de las 2 cadenas, la cual será llamada cadena guía, forma un complejo con la enzima Argonauta 2, al cual se le conoce como complejo de RNA inductor de silenciamiento (RISC), por sus siglas en inglés¹¹.

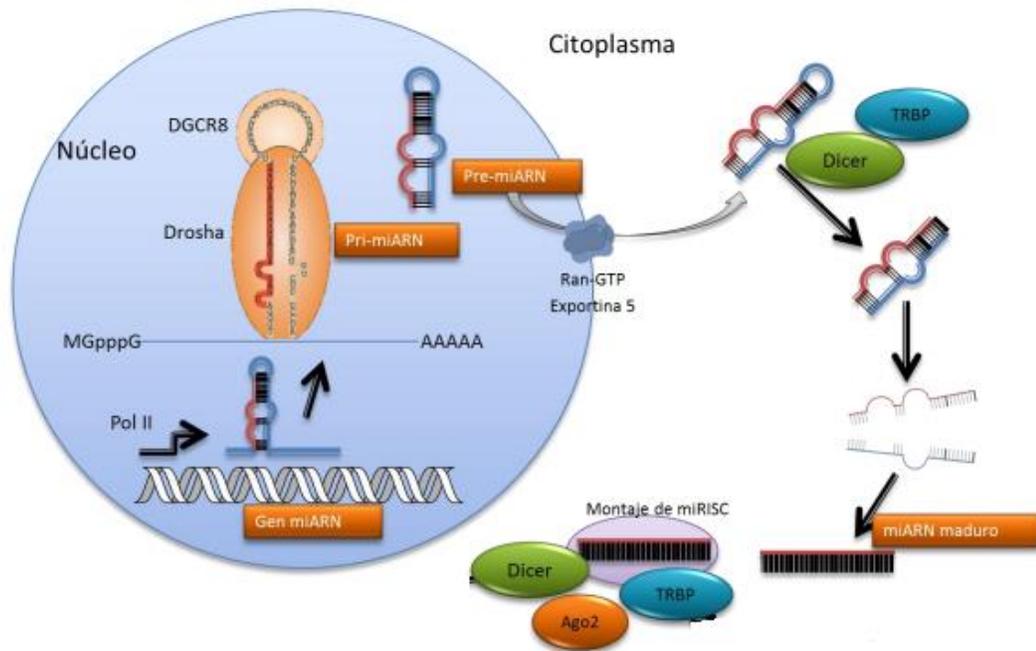


Figura 1.- Biogénesis de los miRNAs¹² Los microRNAs son transcritos por la polimerasa II o III, generando una estructura llamada pri-miRNA, la cual es reconocida por DROSHA, que genera un corte en la base del miRNA, generando un pre-miRNA. Posteriormente, este pre-miRNA es trasladado al núcleo por acción de exportina 5. Una vez en el citoplasma, se da un segundo corte por Dicer, dando como resultado un RNA de doble cadena de 22-24 nucleótidos. Por último, una de las cadenas se une a Argonauta, generando el complejo RISC.

En la actualidad se conocen diversas variaciones en la biogénesis canónica de los miRNAs, que pueden tener pasos adicionales o carecer de algunos de ellos, como el caso de los miRNAs que tienen su origen de los intrones de algunos transcritos, los cuales son independientes de Drosha al ser procesados por la maquinaria de splicing. A esta clase de miRNAs se les conoce como Mirtrones¹³, adicionalmente se han descrito algunos intrones que funcionan como miRNAs, y que son independientes tanto de Drosha como Dicer, al unirse directamente a Argonauta dentro del núcleo, posterior al proceso de Splicing³. Además se conocen miRNAs que pueden originarse de RNAs nucleolares e incluso de elementos transponibles¹⁴, este tipo de biogénesis se ha reportado en moscas, gusanos, humano, entre otros, no obstante es importante resaltar que estas rutas “no canónicas” son mucho menos comunes¹⁵.

1.3.- Mecanismo de acción de los miRNAs

Una vez que se forma el complejo RISC, el miRNA funciona como guía, al reconocer secuencias complementarias en la región 3'UTR de algún RNA mensajero específico, mediante interacciones Watson-Crick¹⁶, no obstante, se ha reportado que los miRNAs pueden interactuar con regiones 5', como promotores^{17,18}. En el caso de reconocimiento de la región 3'UTR, se ha reportado que los 7 nucleótidos que comprenden la región semilla del miRNA, la cual comienza en el segundo nucleótido del extremo terminal 5' del miRNA, son necesarios para que este tipo de interacción ocurra^{16,19}. Existen 2 formas por las cuales puede darse esta regulación, por degradación del mensajero o por represión de la traducción, siendo el grado de complementariedad entre el miRNA y el RNA mensajero, el factor que determinará uno u otro mecanismo¹⁶ (Figura 2). Cuando la complementariedad entre el miRNA y el mensajero es del 100%¹⁶, puede ser degradado por acción catalítica de la enzima Argonauta 2²⁰, este mecanismo es más frecuente en plantas que en animales²¹.

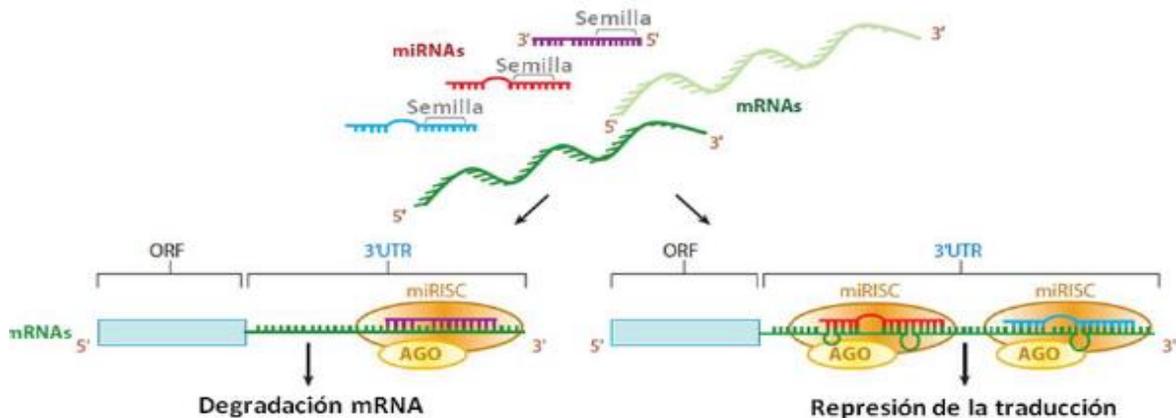


Figura 2. Mecanismo de reconocimiento de los miRNAs¹⁹

La regulación de la expresión se da de dos formas principalmente. Cuando la complementariedad entre el miRNA y su RNA mensajero es total, existe una degradación del RNA mensajero, por acción catalítica de Ago2, mientras que, cuando la complementariedad es imperfecta existe una represión traduccional.

Cuando la complementariedad entre la región semilla del miRNA y la región 3'UTR es menor, como se da en la mayoría de los casos en animales, se da una represión traduccional, que puede darse evitando la interacción del RNA mensajero con los ribosomas²² como se ejemplifica en la Figura 3.

Por otra parte, el complejo RISC puede generar un reclutamiento de las proteínas GW-182, que ayuda a la localización de los RNA mensajeros en los cuerpos P (P-bodies)²³, estos conglomerados de proteínas llamados P-bodies, son ricos en enzimas como las deadenilasas CCR4 y NOT, además de enzimas como DCP1 y DCP2 que son capaces de remover el CAP 5' del mensajero, promoviendo que posteriormente sean degradados por algunas exonucleasas, como Xrn1^{24,25}. No obstante, dentro de los P-bodies puede existir la represión traduccional del mensajero, sin que necesariamente exista su degradación. Se ha sugerido que esto puede ser debido al tipo de enzimas que actúan con el mensajero, que no permiten un acceso a las nucleasas, como es el caso de HUR y eIF4E-T, que actúan como represores de la traducción^{26,27}

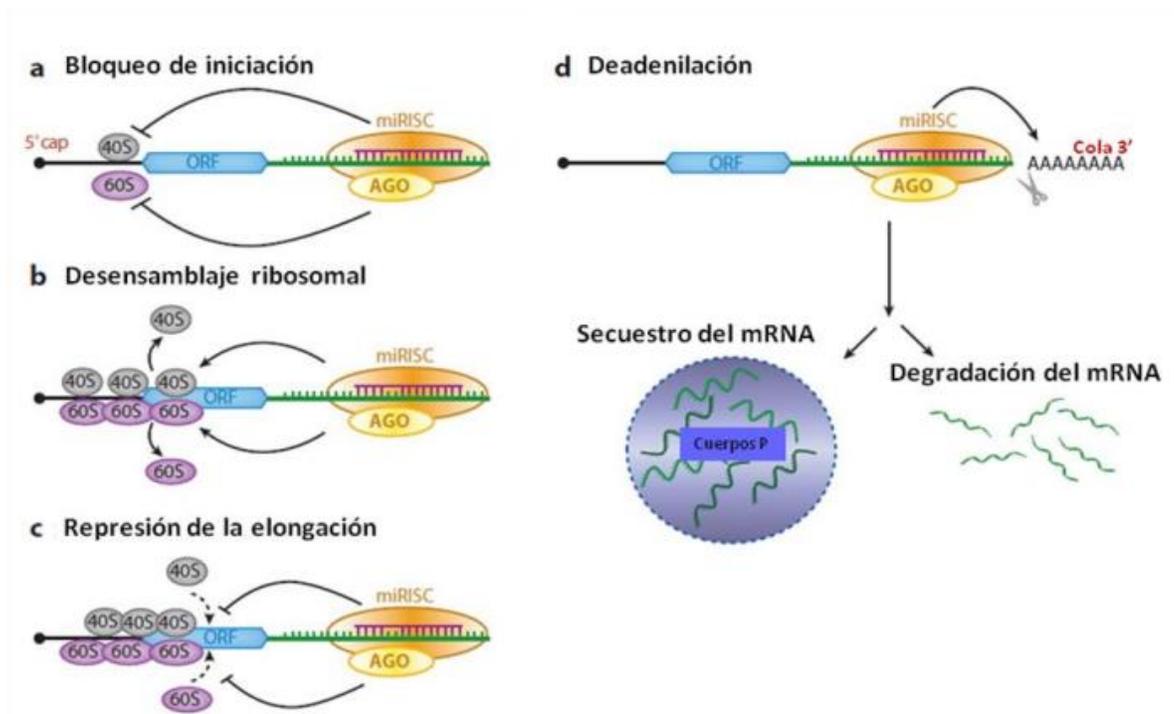


Figura 3. Mecanismo de acción de los miRNAs¹⁹

La represión de la expresión se puede dar por diferentes formas. A) Bloquear la interacción entre las unidades ribosomales y el CAP 5'. B) Disociación de las unidades ribosomales del RNA mensajero. C) Bloque del proceso de elongación, bloqueando interacción de unidades ribosomales. D) La deadenilación, puede generar un degradamiento del miRNA, por otra parte este miRNA, puede ser secuestrado en lo P-Bodies, donde puede sufrir una degradación o simplemente inhibir la traducción.

1.4.- Estrategias de estudio de la función de los miRNAs

Debido a la gran variedad de procesos biológicos en los cuales los miRNAs participan, no es de sorprender que el desajuste de su expresión se relacione con diferentes enfermedades como: cáncer, diabetes, artritis entre muchas otras, por lo que su estudio se ha vuelto de gran importancia²⁸.

Para entender mejor la función de los miRNAs, se ha tratado de manipularlos, ya sea sobre-expresándolos o inhibiendo su función, siendo esta última el tema de abordaje en este trabajo.

Para su inhibición se han desarrollado diferentes técnicas, que han evolucionado con el tiempo (Figura 4). Una de los primeros métodos fue denominado “Antágo-miro”, secuencias de LNA (Locked Nucleid Acid) que eran transfectadas desnudas en la célula, con la capacidad de unirse a los miRNAs evitando la interacción con su mensajero blanco²⁹. Una de las grandes desventajas de esta estrategia era la rápida degradación de los antágo-miros³⁰, la cual fue evitada gracias a marcas químicas que no permitían la degradación por exonucleasas (Figura 4). Con esta estrategia se logró incluso inhibir eficazmente a miR-122 y miR-16 *in vivo* en ratones³¹.

Posteriormente, se desarrolló otro tipo de herramientas llamadas “Decoys”, los cuales, al igual que los antágo-miros, pueden unirse a los miRNAs y secuestrarlos, con la gran diferencia, de que estos Decoys poseen una estructura secundaria, de tallo burbuja como se ilustra en la figura 4, que les permite ser más estables, sin necesitar de marcas químicas, además de poder contar en algunos casos, con más de un sitio para el reconocimiento del miRNA y de este modo aumentar su eficiencia al inhibir un miRNA³².

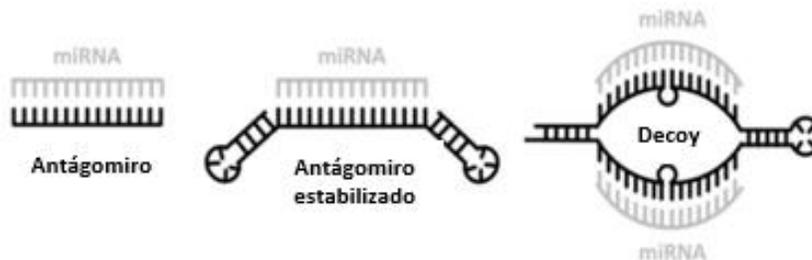


Figura 4. Esquema de las moléculas usadas para el estudio de miRNAs³²

Representación de las primeras moléculas utilizadas para el estudio de los miRNAs y su desarrollo para ser más eficientes.

Uno de los grandes problemas de estas herramientas, es la necesidad de administrar grandes cantidades constantemente, para lograr una buena inhibición, esto debido a que eran transfectadas desnudas en la célula³³. Con el tiempo estas secuencias se

expresaron a través de plásmidos³⁴, volviéndolos más eficientes debido a una expresión más prolongada en la célula.

1.5.- RNAs competidores endógenos.

A pesar de los grandes avances que se lograron con los “Antágotiros” y los “Decoys”, se tenía aun una gran desventaja, la cual era que estas herramientas podían inhibir a un solo determinado miRNA, lo cual ocasionaba problemas para familias de miRNAs que varían en sus secuencias semilla o RNAs mensajeros que eran reconocidos por más de un miRNA³⁵. De esta forma surgieron los RNAs “esponjas”, denominados así por su capacidad de “absorber” miRNAs³⁶.

El desarrollo de los RNAs esponja tiene su origen en los transcritos endógenos de la célula, que funcionan como competidores de miRNAs, como los pseudogenes OCT4P4, BCAS4, BRAFP1, CYP4Z2P³⁷, recientemente el caso de RNAs circulares como, cIRS-7, cir-ITCH, Sry, los cuales han sido reportados como competidores endógenos³⁷. Entre estos también podemos encontrar casos de RNAs largos no codificantes, como el caso de HOTAIR, cuya actividad de esponja sobre miR-148, acelera el procesos de migración en cáncer esofageal³⁸.

No obstante la gran cantidad de ejemplos que existen, cuando se habla de RNAs esponjas siempre se hace referencia al caso del pseudogen PTENP1^{35,36,39,40}. PTENP1 a diferencia de su alelo silvestre, tiene una mutación de sentido equivocado en el codón de la metionina que no le permite ser traducido⁴¹. Sin embargo, este comparte dentro de su región 3'UTR, cinco sitios de reconocimiento para miRNAs (Figura 5). Se ha observado que la expresión de PTENP1 se ve disminuida en cáncer de próstata, ocasionando que los niveles de PTEN, un supresor de tumores⁴¹, se reduzcan rápidamente debido a la regulación por miRNAs causando el aceleramiento del padecimiento. Por estas razones se ha denominado a PTENP1 como un competidor endógeno que tiene una gran importancia en la regulación de PTEN⁴².

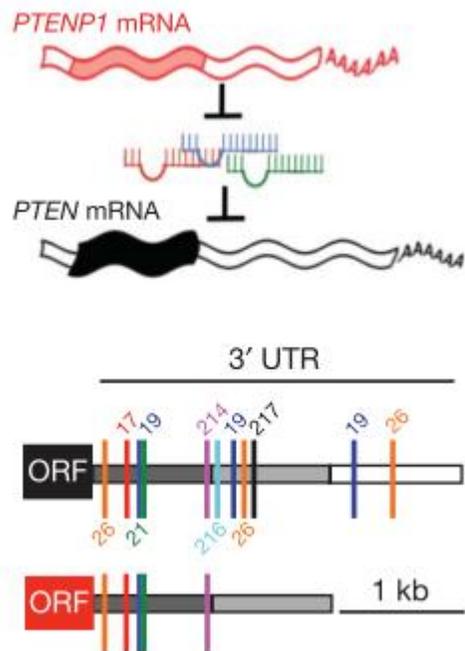


Figura 5.- Representación esquemática del pseudogen PTENP1 y su homólogo silvestre⁴². Se esquematiza al gen silvestre PTEN y su alelo el pseudogen PTENP1, que conserva sitios de reconocimiento de miRNAs, que le permiten competir por estos, para regular la expresión de PTEN.

Se ha adoptado el modelo de PTENP1, como un ejemplo a seguir para conseguir mayor éxito en la inhibición de los miRNAs por RNAs esponjas. Basándose en este modelo, se han agregado a los RNAs esponjas una mayor cantidad de sitios de reconocimiento y además de gran importancia, la capacidad de reconocer no solo a un tipo de miRNA, sino también, a miRNAs con secuencias diferentes⁴³. Este caso ha proporcionado una mayor eficiencia y un rango mayor de inhibición para diferentes miRNAs.

Por otra parte, siguiendo el modelo de PTENP1, surgió la estrategia de clonar no solo los RNAs esponja, así como, “Decoy”, río abajo de un gen reportero, como el gen luciferasa o una proteína fluorescente, imitando una región 3’UTR³²⁻³⁴. Con lo anterior se logró mayor eficiencia, debido a una mayor estabilidad del transcrito³⁴, además de aportar una forma de comprobar la interacción entre la esponja y el miRNA, ya sea, observando una disminución en la actividad de luciferasa o una disminución en la fluorescencia³⁹ (Figura 6).

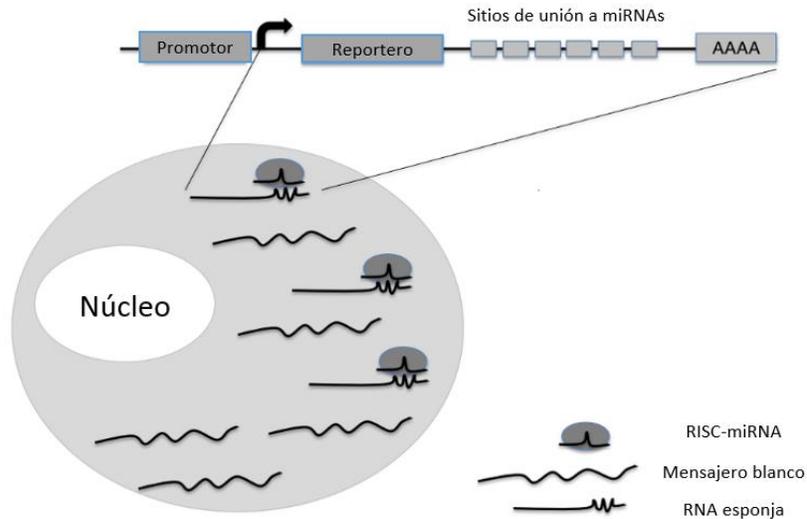


Figura 6.- Representación esquemática del funcionamiento de un RNA esponja³⁶

Se representa la estrategia de clonación de un RNA esponja, rio debajo de algún gen reportero, funcionando como una región 3'UTR. Que posteriormente compite en la célula contra otros RNA mensajeros, secuestrando al secuestrar al miRNA objetivo.

Todos estos ejemplos se han llevado con gran éxito a la práctica. Por ejemplo, en 2015 Jung y sus colaboradores reportaron un RNA Esponja de 20 sitios para miR-21, miR-155, miR-221/222, el cual fue clonado rio abajo del gen reportero de la proteína roja fluorescente³⁹. En este trabajo se evaluó el grado de inhibición comparando el número de sitios de entre 4 hasta 20, observando mayor eficiencia con un mayor número de sitios. Por otra parte, se comparó la eficiencia entre los sitios de reconocimiento que fueran total o parcialmente complementarios hacia el miRNA, en donde además de tener gran éxito en la disminución de sus cuatro miRNAs blancos, se observó que existía una mejor efecto en la esponja que poseía sitios que eran parcialmente complementarios hacia los distintos miRNAs³⁹.

Existen diversos ejemplos que han logrado tener una inhibición exitosa en diferentes modelos, generando RNAs esponjas con grandes variaciones, desde el número de sitios, el grado de complementariedad entre los sitios de reconocimiento y el miRNA, el tipo de vector utilizado para su control, de los cuales se da ejemplo de algunos de ellos en la tabla siguiente.

Tabla 1.- Características de algunos RNAs esponjas utilizados para inhibir la función de miRNAs.

<i>Micro RNA</i>	<i>Vector</i>	<i>Promotor</i>	<i>Reportero</i>	<i>Número de sitios</i>	<i>Modelo celular</i>
<i>miR-92</i>	Lentiviral	CMV	GFP	4 totalmente complementarios	Cultivo neuronal de rata ⁴⁴
<i>miR-133</i>	Adenoviral	CMV	GFP	2 totalmente complementarios	Cardiomiocitos de ratón ⁴⁵
<i>miR-21 y 140</i>	Lentiviral	U6	Ninguno	Uno a dos totalmente complementarios	HeLa ⁴⁶
<i>miR-144-451</i>	Lentiviral	U6	mCherry	4 Totalmente complementarios o no complementarios	Troncales de ratón ⁴⁷

Estos y otros muchos trabajos han permitido tomar en cuenta elementos que permiten llevar con mayor éxito el diseño de un RNA esponja.

Primeramente, se debe de considerar el número de sitios de reconocimiento, ya que si bien pueden aumentar la eficiencia, también pueden ocasionar el reconocimiento inespecífico de otros miRNAs³⁹.

Por otra parte, se sugiere que el tamaño de los espaciadores entre los sitios de reconocimiento de los miRNAs sea de entre 4-6 nucleótidos. Los que se han reportado con mayor eficiencia, sugieren el uso de interacciones débiles en estos espaciadores, que disminuyen las posibilidades de formación de estructuras secundarias, así como, la generación de sitios de reconocimiento inespecíficos³⁶. Adicionalmente se ha sugerido cambiar algunos nucleótidos o bien el número de nucleótidos, de los diferentes sitios y espaciadores, para evitar una probable recombinación, en RNAs esponja de gran longitud^{32,34,48}.

Por último, es recomendable el uso de sitios de reconocimiento parcialmente complementarios, lo que da mayor eficiencia en la inhibición. Esto se atribuye a que el RNA esponja no sea degradado catalíticamente por el complejo RISC¹⁸.

Debido al gran éxito de este tipo de estrategias, se decidió diseñar un RNA esponja para el estudio de miR-223.

1.6.- Micro RNA-223

El micro RNA 223 ha sido objetivo de muchos estudios debido a que se encuentra relacionado en una gran variedad de procesos, como inflamación⁴⁹, septicemia¹⁹, como parte fundamental en el funcionamiento del sistema hematopoyético. También se ha reportado en cáncer, como leucemia, cáncer gástrico, cáncer endometrial⁵⁰⁻⁵², donde está involucrado en procesos como metástasis, proliferación e incluso quimio resistencia⁴⁹.

miR-223 ha sido relacionado en procesos inmunes, en células T leucémicas de adulto, en donde se comprobó que su disminución provoca el aumento del blanco STAT1, lo cual promueve el aumento del complejo principal de inmuno-histocompatibilidad I, generando tumores más agresivos debido a que no pueden ser reconocidos por las células Natural Killer⁵². Por otra parte, se ha reportado que miR-223 es importante en la activación de neutrófilos, a través de la vía de $\text{Nf}\kappa\text{B}$ ⁵³. Esto se hizo a partir de la disminución de la expresión de miR-223 en embriones de pez cebra, mediante una esponja de 6 sitios no complementarios, observando una relación inversa entre la disminución de miR-223 y el aumento de neutrófilos acumulados en los embriones transducidos⁵³.

Además miR-223 ha sido asociado a enfermedades como el cáncer, en donde ha sido reportado como importante regulador de la proliferación celular a través de IGF-1R⁵⁴. En recientes trabajos a través de “Decoys” y “antagomiros”, se ha logrado la disminución de miR-223 en células de cáncer endometrial, la cual provoca el aumento de IGF-1R y a su vez un aceleramiento de la proliferación celular^{50,51}. Este mismo efecto se ha observado en ratones inyectados con células HeLa, donde la sobreexpresión de miR-223 provoca una disminución en el tamaño del tumor, en los ratones tratados con respecto a los no tratados⁵⁴ (Figura 7).

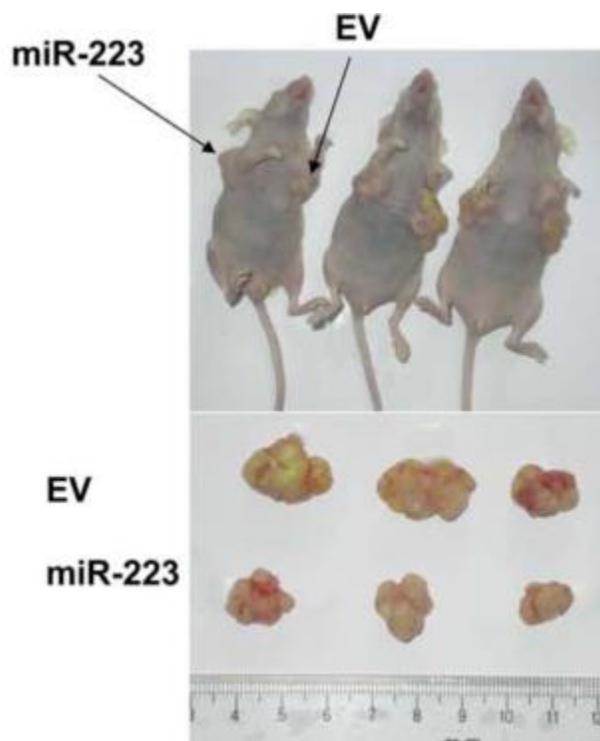


Figura 7.- Efecto de miR-223 sobre la proliferación de células Hela inyectadas en ratón⁵⁴. Ratones inyectados con células HELA, desarrollando tumores. Los ratones donde se expresaron miR-223, demostraron una disminución en la proliferación celular, mientras que aquellos con el control un vector vacío (EV), no mostraron cambios.

En células MCF7 de cáncer de mama y PC3 de cáncer de próstata, se ha observado que miR-223 es inducido por Celastrol, en donde al reducir los niveles de miR-223 mediante antagonistas para miR-223, se veía disminuida también la viabilidad de las células, sugiriendo a miR-223 como un blanco terapéutico para incrementar el efecto anticancerígeno del Celastrol⁵⁵.

Adicionalmente nuestro grupo ha reportado a miR-223 como un regulador directo del transcrito de *ABCB1/MDR1* (del inglés multidrug resistance). Esta proteína funciona como una bomba expulsora de agentes tóxicos fuera de la célula, entre estos algunos agentes quimioterapéuticos, por lo que en algunos tipos de cáncer como la leucemia linfoblástica aguda, promueve cuadros de quimio-resistencia, ocasionada por la baja expresión de miR-223⁵⁶.

2.-Justificación

Se ha demostrado que los miRNAs tienen gran relevancia en la homeostasis celular, y que su desregulación, se relaciona con diferentes enfermedades, tal es el caso de miR-223, cuya expresión anormal, afecta procesos importantes, en diferentes tipos de cáncer, así también como en enfermedades autoinmunes. Es por eso que generar herramientas como los RNA esponja, cuyo uso ha tenido gran éxito y eficacia en diferentes trabajos, cobra gran relevancia para el estudio de los miRNAs en un contexto celular.

3.-Hipótesis

Al generar un RNA esponja con sitios de reconocimiento para miR-223, se podrá disminuir sus niveles en la célula y modular el nivel de expresión de sus blancos.

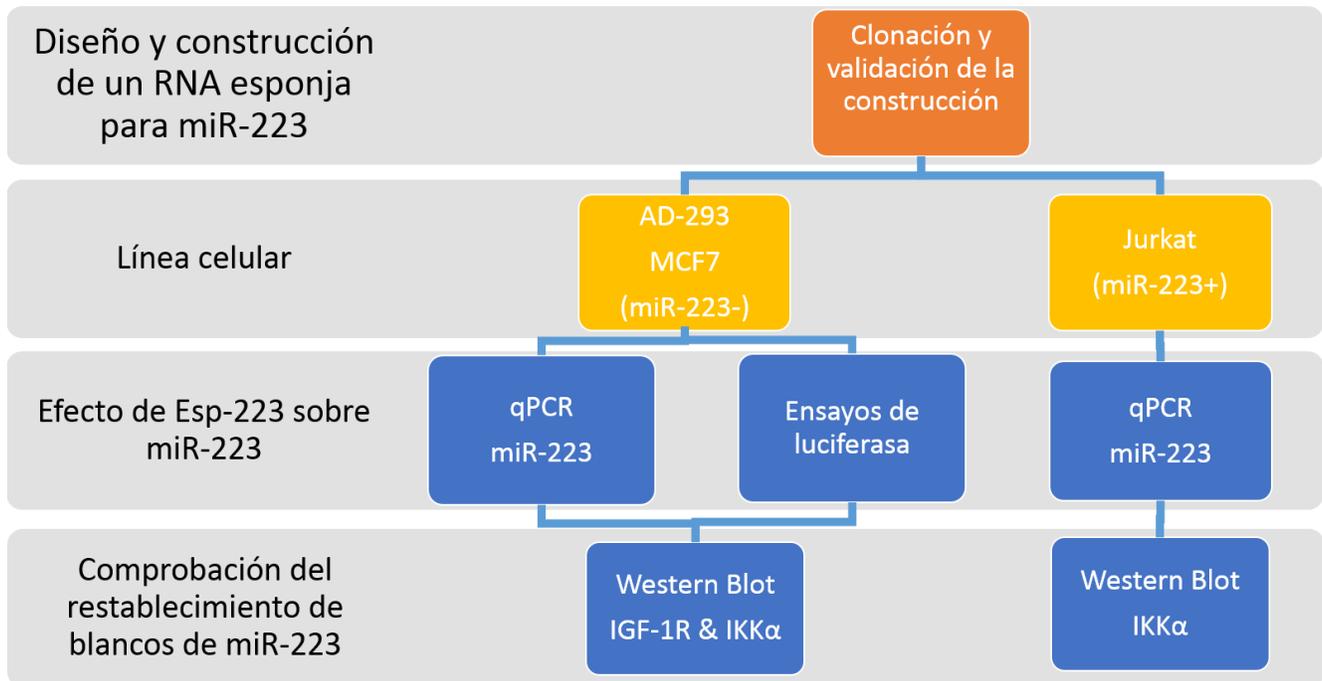
4.-Objetivo general

- Diseñar y construir un RNA esponja que sirva como herramienta molecular para modular la función de miR-223

4.1.-Objetivos particulares

- Diseñar y sintetizar un RNA esponja para miR-223. Clonar la secuencia que genera el RNA esponja en el plásmido PLVX-shRNA2
- Evaluar la función del RNA esponja a través de ensayos de luciferasa.
- Transfectar o transducir líneas celulares en suspensión y adherentes, para generar la expresión del RNA esponja.
- Evaluar la funcionalidad del RNA esponja, al examinar los niveles de miR-223
- Evaluar los niveles de RNA mensajeros blancos de miR-223, por en tiempo real
- Evaluar los niveles de proteína de dichos RNA mensajeros por Western Blot.

5.-Estrategia experimental



6.-Metodología

6.1.-Cultivo celular

La línea celular MCF7 fue donada amablemente por la Dra. Leticia Rocha (Departamento de Biología Molecular, Biomédicas, UNAM) en conjunto con la línea celular AD-293 (ATCC) utilizadas en el proyecto fueron mantenidas en medio Optimem Advanced (Gibco), suplementado con 3% de Suero fetal bovino (SFB), 1/100 U de Penicilina-estreptomicina (Gibco). Por otra parte la línea celular Jurkat se mantuvo en medio RPMI Advanced (Gibco) suplementado con 3% de Suero fetal bovino (SFB), 1/100 U de Penicilina-estreptomicina (Gibco) y 1/100 de L-Glutamina (Gibco). Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂.

6.2.-Diseño y construcción del vector de expresión para el RNA esponja

Para la construcción de nuestro RNA esponja, se diseñó un par de oligonucleótidos usando el programa, los cuales contendrían las secuencias de reconocimiento de miR-223. En la tabla 2 se muestran las secuencias de los pares de primers que se usaron. Para generar el inserto se mezclaron concentraciones equimolares de cada oligo [10uM], llevando la mezcla a un volumen final de 20uL. Posteriormente para hibridar ambos oligos y generar el inserto final, la mezcla se dejó en baño María a 95°C por 5 minutos, posteriormente el baño María se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que llegó a 25°C.

Para la clonación, ambos plásmidos fueron doblemente digeridos. PLVX-shRNA2 con las enzimas KpnI y PstI New England Biolabs, (NEB), mientras que PLVX-mCHERRY, fue digerido con XbaI y MluI (NEB). Las digestiones fueron hechas por separado, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La ligación de ambos insertos generados previamente, fueron clonados en sus respectivos vectores. La reacción de clonación se llevó a cabo con la enzima T4 DNA ligasa (NEB), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usó un ratio de 3:1, inserto/vector, para la ligación.

Posteriormente se realizó la transformación en bacterias competentes JM109 comerciales (Promega), mediante choque térmico a 42°C. Se tomaron 40uL de bacterias y se mezclaron con 5uL de la reacción de ligación, luego se dejaron incubando en hielo por 30 min. Posteriormente se dio el choque térmico a 42°C por 2 min, inmediatamente después se dejaron nuevamente en hielo por 3 min. A esta mezcla se agregó 1 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37°C agitando a 220 RPM. Por último las bacterias fueron centrifugadas por 30 seg a 140x10³ RPM, se decantó la mayor parte del medio y el pellet fue resuspendido con el medio restante, para ser plaqueado en cajas con medio LB sólido + Ampicilina [100mg/mL] y se dejó incubar a 37°C por 16H.

Tabla 2.- Secuencias de oligonucleótidos diseñados para generar el RNA esponja.

Esp-223
5'GGGGTATTTGACAACTGACACGATGGGGTATTTGACAACTGACAACCGGTGGGGTATTT GACAACTGACATCACGGGGTATTTGACAACTGACAGGTAC -3'
3'ACGTCCCCATAAACTGTTTGACTGTGCTACCCCATAACTGTTTGACTGTTGGCCACCCATA AACTGTTTGACTGTAGTGCCCCATAAACTGTTTGACTGTC-5'
Esp-Abcb1
5'-CTAGAATATTTCCATTTGGACTGTAAGTACTGCCTTGCTAAGGATCCTATAGA-3'
3'TTATAAAAGGGTAAACCTGACATTGACTGACGGAACGATCCTAGGATATCTTGCGC5'

Después de obtener colonias, fueron seleccionadas 3 clonas de las cuales se extrajo DNA plásmido con el sistema comercial Wizard Plus SV miniprep (Promega). El DNA fue cuantificado en un nanodrop (Thermofisher). Para validar que la clonación fue exitosa, previo a la secuenciación se hizo una digestión de los plásmidos con la enzima Agel, para PLVX-Esp-223 y con BamHI para mCHERRY-Esp-223.

6.3.-Secuenciación por Método de Sanger

Para la secuenciación capilar, se utilizó el Kit comercial “BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing” (Applied Biosystem). Para la reacción se ocuparon 400ng del plásmido a evaluar. Las condiciones de la reacción se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del comerciante mediante el siguiente protocolo:

Tabla 3.- Condiciones de reacción, para secuenciación capilar.

Reacción	Concentración	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Plásmido	[400ng]	1	95	1 min
Buffer de secuenciación 5x	2µL	25	95	10 seg
Primer Para secuenciar	[10nM]		50	5 seg
H ₂ O libre de nucleasas	x		60	4 min
Volumen total	20µL	1	60	5min

Para limpiar la reacción de secuenciación, esta se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5mL, en donde se agregaron 5 µL de EDTA 125nM a PH de 8 Y 60 µL de etanol absoluto. La mezcla se incubó por 2 horas a -20°C. A continuación se centrifugo a máxima velocidad por 20 min, inmediatamente el sobrenadante fue removido cuidadosamente. El pellet fue lavado con 250 µL de etanol al 70% y centrifugado a máxima velocidad por 5 min, este

procedimiento se hizo 2 veces. Al final se removió el sobrenadante y la reacción se dejó secar 15 min a temperatura ambiente.

Tabla 4.- Secuencia de primers para secuenciar.

Nombre	Secuencia
PLVX-Esp-223	5'CAATCCAGCGGACCTTCCTTC3'
mCHERRY-Esp-223	5'AGATGCCCGACTGGCACT3'

La electroforesis capilar fue llevada a cabo en un secuenciador automático de un capilar (Applied Biosystems).

6.4.-Transfecciones

Para la transfección de los plásmidos recombinantes, se plaquearon 300×10^3 células en cajas multipozos de 6 (Corning), con 3 ml del respectivo medio para cada línea celular. En el caso de las células AD-293 y MCF7, se transfectaron 24H posterior al paqueo, observando que hubiera al menos un 70% de confluencia de células adheridas. Por otra parte, puesto que las células Jurkat no son adherentes si no en suspensión, fueron transfectadas inmediatamente después de ser plaqueadas. Para las transfecciones se siguieron las recomendaciones del fabricante, usando 4 μg del plásmido (Esp-Cherry y PSI-ABCB1) con 6 μL de TurboFect (Thermo Scientific). 24H posterior a la primer transfección en el caso de AD-293 y MCF7 se realizó una segunda transfección con 2 μg del plásmido PLVX-miR-223 y 4 μL de TurboFect (Thermo Scientific).

Las células fueron visualizadas en un microscopio invertido de epifluorescencia (Zeiss), a 24 y 48H, para evaluar la eficiencia de transfección de ambos plásmidos.

6.5.-Ensayos de luciferasa

Para los ensayos de luciferasa se utilizaron los plásmidos, PSI-ABCB1, PLVX-miR-223 y PLVX-mCHERRY. Los ensayos fueron realizados con el kit comercial "Dual Glo Luciferase Assay" (Promega) Siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para este ensayo se utilizaron cajas de 24 multipozos, en las cuales se plaquearon 1×10^5 células AD-293. Los plásmidos y concentraciones en cada pozo se muestran en la tabla 2.

Tabla 5.- Condiciones de transfección, para ensayos de luciferasa.

Numero de pozo	1	2	3	4	5
Plásmido	PSI-ABCB1	PSI-ABCB1+ miR-223	PSI-ABCB1+ miR-223+ Esp-223	PSI+ABCB1+ miR-223+ PLVX VACIO	PSI-ABCB1+ PLVX-VACIO
Radio 3'UTR: miRNA	1.-500ng	1.-500ng 2.-300ng	1.-500ng 2.-300ng	1.-500ng 2.-300ng	1.-500ng 2.-500ng

			3.-500ng	3.-500ng	
--	--	--	----------	----------	--

En este caso para las transfecciones, se usó 2 μ L de TurboFect (Thermo Scientific). La actividad de luciferasa fue evaluada 48H post-transfección, en el equipo GLIOMAX multi JR (Promega).

6.6.-PCR en tiempo real (qPCR)

Posterior a las transfecciones se cosecharon las células y se extrajo RNA total con el sistema comercial Quick RNA-miniprep (Zimo Research). El RNA se cuantificó con un nanodrop (ThermoFisher) y la integridad fue evaluada a través de un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1%, corriendo a 100 Volts por 50 min. Para generar el cDNA se utilizó el kit comercial "TaqMan MicroRNA reverse transcription system" (Applied Biosystem). Las condiciones de la reacción se muestran en la tabla siguiente. La expresión de RNU48 fue usado como control endógeno.

Tabla 6.- Condiciones de reacción para generar cDNA.

Reacción	Cantidad	Ciclo de retrotranscripción	
RNA total	[300ng]	Temperatura(°C)	Tiempo
Buffer 10X	1.5 μ L	16	30 min
DNTPs 100nM	.20 μ L	42	30 min
Inhibidir de RNAsas 20U/ μ L	.20 μ L	80	5min
MultiScript 50U/ μ L	1 μ L		
H ₂ O Libre de nucleasas	(X)		
Volumen total	15 μ L		

Posteriormente se llevó a cabo la reacción de qPCR usando el kit comercial "TaqMan Universal Master miX II" (Applied Biosystem). La reacción se llevó a cabo con las recomendaciones del fabricante (Tabla), con 3 réplicas de cada experimento. Ambas sondas TaqMan estaban acopladas al fluoroforo FAM, fueron de origen comercial. Para miR-223 (TM: 002295) y RNU48 (TM: 10006) de Applied Biosystems.

Tabla 7.- Condiciones de reacción para qPCR.

Reacción	Cantidad	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Master Mix II	10 μ L	1	50	2 min
cDNA	1.3 μ L	1	95	10 min
Sonda TaqMan	3 μ L	40	95	15 seg
H ₂ O Libre de nucleasas	(X)		60	1 min
Total	25 μ L			

Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador “Agilent-Stratagene Mx 3000P”. Los datos fueron analizados con el método de $\Delta\Delta CT^{57}$.

6.7.-Western Blot

Posterior a las transfecciones, las células fueron cosechadas y posteriormente lavadas con PBS1X. Para la extracción de proteínas totales, las células fueron lisadas con Buffer Ripa 1X (Cell Signaling) adicionando a la mezcla Inhibidor de proteasas. El lisado celular fue incubado en hielo durante 20 min, dando vortexeos cada 5 min. Posteriormente el lisado fue centrifugado a máxima velocidad (14,000 RPM) durante 10 min. Por último el sobrenadante fue recuperado en tubo eppendorf de 1.5mL. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford, midiendo a una longitud de onda de 595nm.

Para cada experimento de Western Blot se utilizaron 40 μ g de proteína total, la cual se mezcló con el Buffer de Carga comercial Lamli (BioRad) en un radio 1:3 respectivamente. Las proteínas se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 10%, el cual se corrió a 30 Volts por 30 min, seguido de un corrimiento a 125 Volts por 60 min.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas por medio de un TransBlot (BioRad) a 25Volts y 2.5 Amperes durante 10 min, a una membrana PVDF. La cual luego fue bloqueada con una solución de leche al 5% PBS/Tween 0.05%, por una hora.

Al final del bloqueo se realizaron 2 lavados de 10 min y uno más de 5 min con PBS/Tween. Inmediatamente después se incubó con el anticuerpo primario, durante toda la noche a 4°C, en constante agitación. Todas las diluciones de los anticuerpos fueron hechas en Leche Svelty sin grasa, al 5% en PBS/Tween, las concentraciones se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 8.-Condiciones de Western Blot.

Anticuerpo Primario	Concentración	Casa comercial	Tamaño KD	Anticuerpo secundario	Concentración	Casa comercial
IGF-1R	1/1000	Abcam	110	Conejo	1/1000	Abcam
Ikk α	1/1000	Abcam	88	Conejo	1/1000	Abcam
Sp1	1/500	Abcam	80	Cabra	1/1000	Abcam
Actina	1/2000	Santa Cruz	42	Ratón	1/2000	Abcam

Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS/TWEEN. Posteriormente fueron incubados con su respectivo anticuerpo secundario, por 45 min a temperatura ambiente, en agitación constante. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS/Tween.

Para revelar las membranas se incubaron por un minuto en Luminol (Santa Cruz) y posteriormente se escanearon en el equipo C-Digit Blot Scanner (Licor).

7.-Resultados y discusión

7.1.-Diseño y construcción de la secuencia de RNA esponja para miR-223.

Como primer objetivo se diseñó la secuencia que contendría los sitios de reconocimiento para miR-223. Esta secuencia se diseñó con 4 secuencias en tándem que eran totalmente complementarias a miR-223 (Figura 8, B). Lo anterior con base a los diferentes trabajos que habían observado buena eficiencia con sitios complementarios^{33,45,47}.

Las secuencias de reconocimiento fueron separadas por 4 nucleótidos, lo cual ha sido sugerido como el ideal entre secuencias de reconocimiento^{36,39,46} y uno más de 6, que se localizaba justo a la mitad. A este diseño de 100 pares de bases, se le denominó “Esp-223” (Figura 8, A)



Figura 8.- Esquema de la Secuencia de “Esp-223”.

A) Se esquematiza la interacción de miR-223 con los sitios de reconocimiento de la secuencia Esp-223. B). Se muestra el diseño final de la secuencia Esp-223, marcado con rosa cada uno de los sitios de reconocimiento para miR-223 y en los extremos las secuencias de los sitios PstI y KpnI.

Posterior al diseño de la secuencia que codificaría nuestro RNA esponja, se optó por clonarla en el vector lentiviral PLVX-shRNA2 (Figura 2, A). Esta clase de vectores lentivirales han sido ampliamente utilizados para la expresión de este tipo de inhibidores, esto gracias a su capacidad de mediar la transferencia de información genética en casi todos los linajes celulares, además de que existe un gran número de trabajos *in vivo* y en modelos animales, donde han sido utilizados vectores lentivirales^{34-36,39,48,58,59} que pueden ser aplicados en una gran diversidad de modelos. Por otra parte, este plásmido lentiviral ha sido usado por

nuestro grupo de trabajo para expresar miRNAs y shRNAs⁶⁰, con gran eficiencia, por lo que ayudaría además a conocer si es capaz de expresar también inhibidores.

Por otra parte se decidió que nuestro RNA esponja, estuviera río abajo de la secuencia que codifica la proteína verde fluorescente, como parte de la región 3'UTR, que nos permitiría visualizar de manera indirecta la expresión de nuestro RNA esponja a través de la expresión de la proteína verde fluorescente; además de hacer más estable a nuestro transcrito^{34,36,39,45,47,48,51}.

Otro factor importante fue la selección de la posición con respecto al elemento de regulación postranscripcional del virus de hepatitis de Woodchuck (WPRE por sus siglas en inglés). Este elemento ha sido reportado como potenciador de la exportación de los transcritos, desde el núcleo hacia el citoplasma, además de ser de gran relevancia en el título viral⁴⁸. La región WPRE, ha causado gran polémica por su función, si beneficia o perjudica la función de los RNAs esponjas. En algunos trabajos se han comparado RNAs esponjas con y sin la región WPRE, observando una disminución de la función del RNA esponja sobre los miRNAs, cuando la región WPRE es eliminada^{32,33,36}. Por otra parte, en un trabajo reciente, se reportó que la presencia de esta región es de gran relevancia, incluso que la posición puede afectar, ya que cuando el elemento WPRE se encuentra río arriba del RNA esponja, existe un mayor efecto de supresión del miRNA⁴⁸.

Por estas razones se buscaron 2 sitios únicos de corte, los cuales estuvieran situados río abajo del gen ZGreen y del elemento WPRE. Los sitios encontrados fueron PstI y KpnI (Figura 9, A), a través de una digestión con cada una de estas enzimas se corroboró la linealización del plásmido sin liberar fragmentos, dando paso a clonar la secuencia de Esp-223 (Figura 9, B).

Una vez que se tuvo el diseño y se verificaron los sitios dentro del plásmido PLVX-shRNA2, se diseñaron oligonucleótidos que contenían la secuencia de Esp-223, a la cual se agregaron extremos que simulaban el corte de las enzimas PstI en el extremo 3' y KpnI en el extremo 5', con lo que permitiría una clonación sitio dirigida (Figura 1, A). Al hibridar ambos oligos, la versión sentido y antisentido, se formó la región de doble cadena (dsDNA) que al clonarse, da origen al RNA esponja Esp-223.

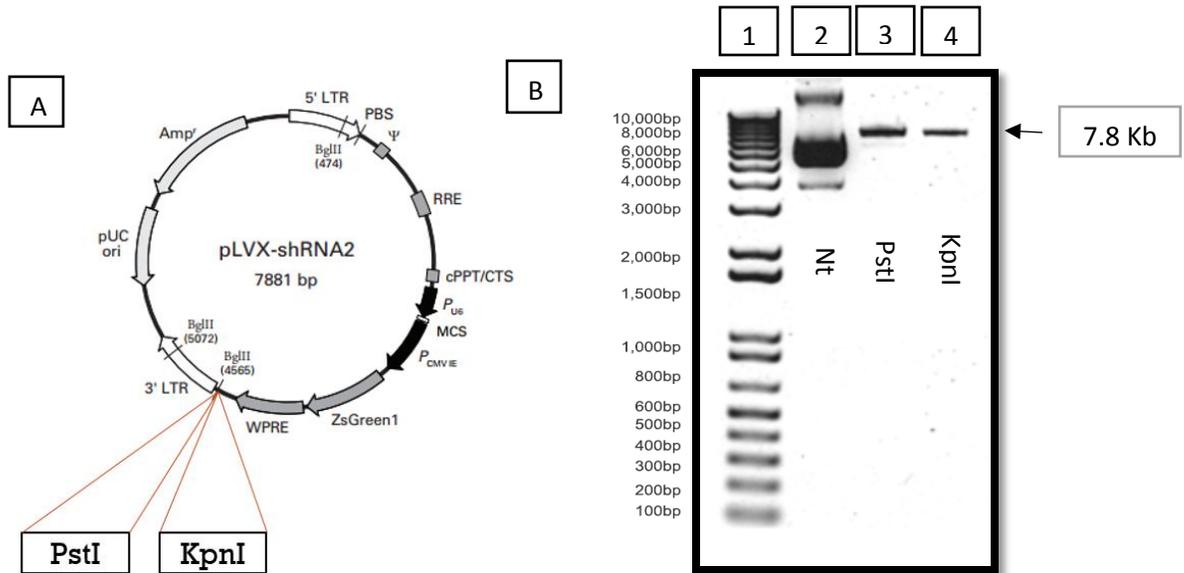


Figura 9. Sitios seleccionados para la clonación de ESP-223, en PLVX-SHRNA2.

A) Mapa del plásmido PLVX-shRNA2 donde se muestra la posición de los sitios PstI y KpnI. B) Corrimiento del plásmido PLVX-shRNA2. Carril 2, control no tratado (Nt), Carril 3 digestión con PstI carril 4 y digerido con KpnI carril 3. Corrimiento en un gel de agarosa al 1% a 100 V por 1 H.

Una vez que fue clonada la secuencia dentro del plásmido PLVX-shRNA2, se verificó que estuviera la secuencia correcta por restricción enzimática, previo a la secuenciación. Tomando las diferentes clonas, se digirieron con la enzima AgeI, donde las clonas positivas debían liberar un fragmento de aproximadamente 1500pb (Figura 10, B).

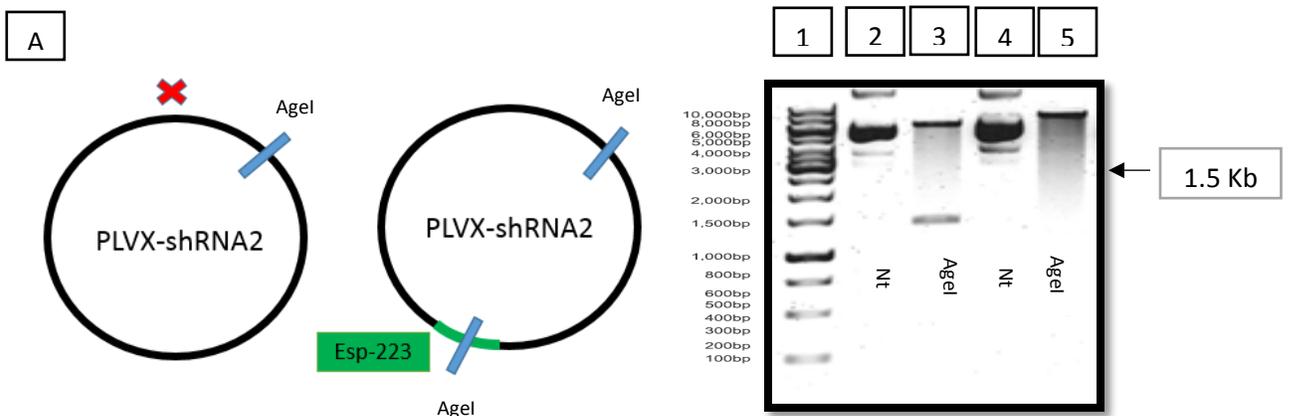


Figura 10.- Validación de la clonación de la secuencia Esp-223

A) Mapa que muestra los sitios de corte de AgeI, además el tamaño de fragmento que debe ser liberado B) Corrimiento de un gel de agarosa al 1% a 100V por 1H. Marcador 1kb, se muestra una banda de 1500 pb, resultado de la digestión con AgeI. 2 PLVX-shRNA2 no

tratado (Nt), 3: clona positiva digerida con Age1, PLVX-shRNA2 no tratado (Nt), 4: PLVX-shRNA2 no tratado (Nt), 5. Clona negativa digerida con Age1.

Las clonas positivas al corte con Age1 se secuenciaron por el método de Sanger, para verificar que la secuencia estuviera completa y con la secuencia previamente descrita, a esta construcción se le denominó como “PLVX-Esp-223” (Figura 11).

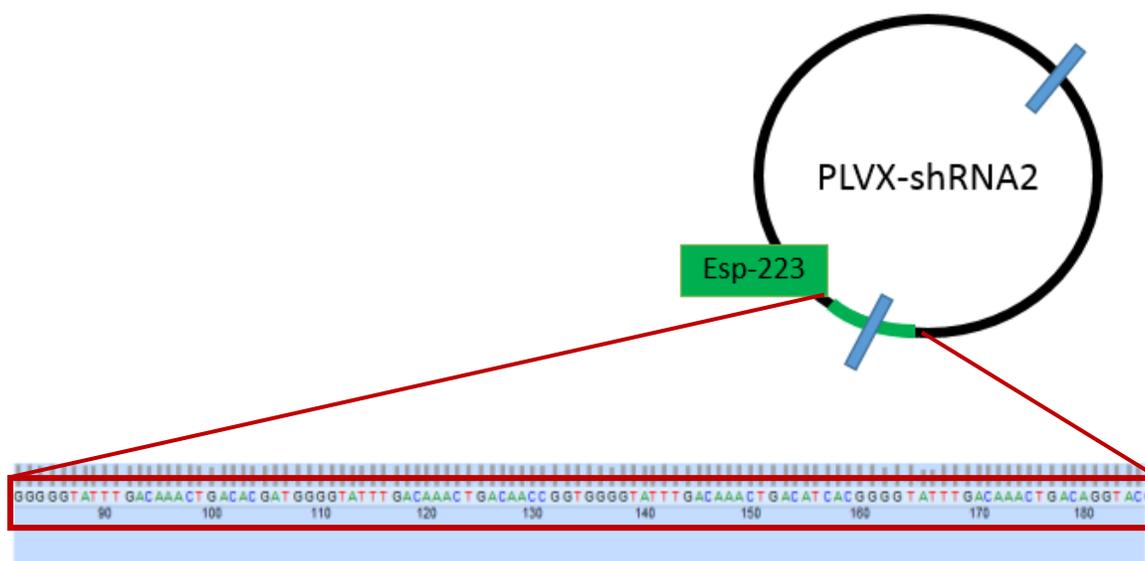


Figura 11.-Electroferograma de la secuencia de Esp-223 clonada en el plásmido PLVX-Esp-223.

Se observa la secuencia mostrada en la tabla 2.

7.2.-Validación del RNA esponja a través de ensayos de luciferasa

Nuestro siguiente paso fue la comprobación de la función de Esp-223. Para esto se recurrió al trabajo previamente descrito por López-Castillejo en el 2013, donde demostró a través de ensayos de luciferasa, que el transcrito de *ABCB1* es blanco directo de miR-223. En el vector utilizado se clonó la región 3'UTR de *ABCB1*¹⁹, río debajo del gen de la luciferasa, en el plásmido PSI-Check al cual se denominó PSI-ABCB1 (Figura 12).

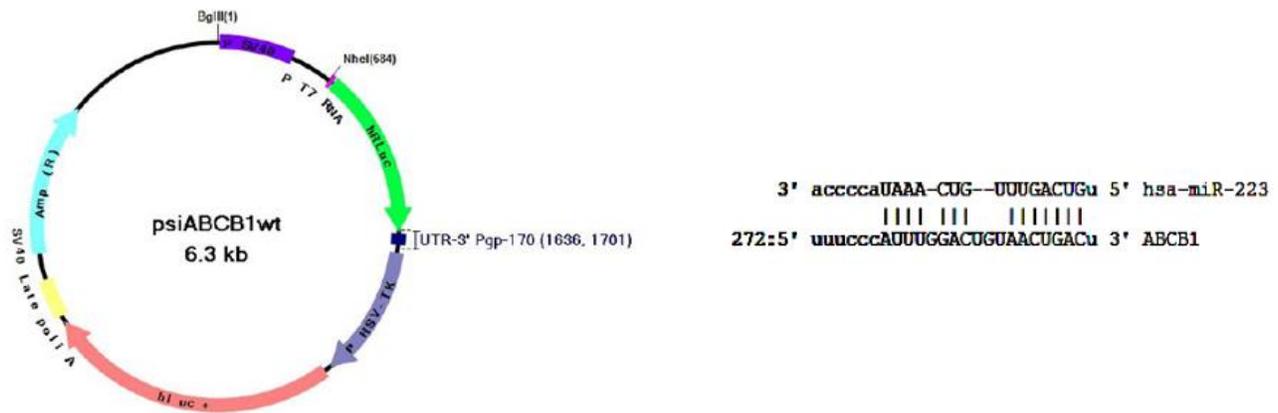


Figura 12.-Mapa del plásmido PSI-CHECKK.

Se muestra la construcción del PSI-ABCB1, con el sitio de reconocimiento del 3'UTR de ABCB1, clonado río abajo del gen reportero de luciferasa.

Utilizando las herramientas previamente descritas, se transfectaron PLVX-Esp-223 en conjunto con PLVX-miR-223 y el plásmido PSI-ABCB1 los cuales se habían generado antes en el trabajo realizado por Lopez-Castillejos en 2013. Los ensayos de luciferasa se llevaron a cabo en células AD-293 las cuales no expresan de forma endógena miR-223⁵⁶, lo que nos permitió tener mayor control sobre el experimento.

Se planteó la hipótesis de que, la actividad de luciferasa que se veía reducida en presencia miR-223, ahora se debería de ver reestablecida por acción de nuestra Esp-223, lo que corroboraría que existe competencia por miR-223.

En los ensayos de luciferasa, se observó una reducción de la actividad de luciferasa en presencia de miR-223, tal como se había reportado previamente¹⁹. Posteriormente la presencia de nuestra Esp-223, provocó un restablecimiento de la actividad de luciferasa como se muestra en la figura 13, lo cual sugería una competencia por miR-223.

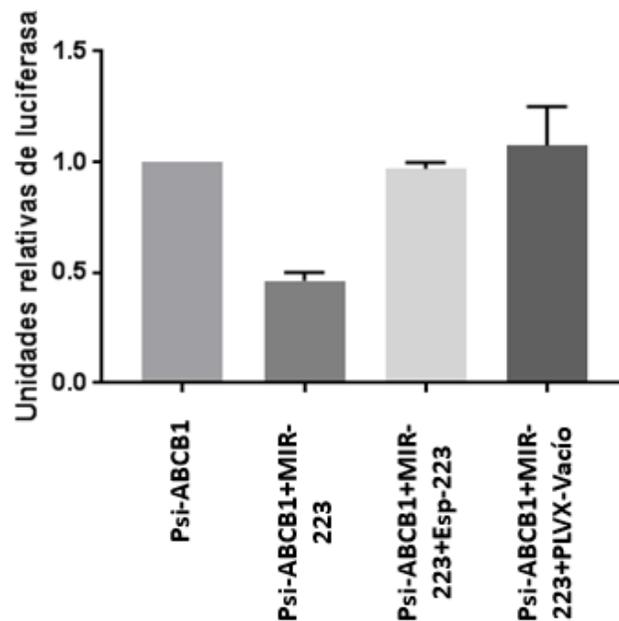


Figura 13.- Restauración de la actividad de luciferasa por PLVX-Esp-223.

Los ensayos de luciferasa fueron hechos 24 horas después de la transfección en células AD-293. Como control se usó el plásmido PSI-ABCB1 junto con el plásmido vacío PLVX-shRNA2.

Aunque los resultados de los ensayos de luciferasa parecían corroborar la función de nuestra esponja, las repeticiones eran pobremente reproducibles, con resultados muy inconsistentes entre ellos. Por ejemplo, en algunos casos miR-223, contrario a reducir la actividad de luciferasa, la incrementaba, lo cual no era lo que se esperaba. Posteriormente, se propuso que esto podría haber sido ocasionado debido a las co-transfecciones, ya que se ha reportado que algunos elementos reguladores contenidos en los plásmidos, como promotores o enhancers, pueden interactuar en *trans* por complementariedad de bases, entre los diferentes plásmidos, ocasionando una expresión inadecuada⁶¹. Lo que sugerimos que, podría estar ocurriendo con PLVX-shRNA2 y PSI-CHECK, generando inconsistencias en la expresión del gen de la luciferasa y por ende en las lecturas obtenidas.

Debido a lo anterior, se realizó una curva de concentración de miR-223 con una concentración fija de ABCB1, (500ng) y por otro lado, una curva de concentración ascendente de ABCB1 con una concentración fija de 350ng de miR-223, que nos permitiera obtener datos sobre lo que sucedía (Figura 14).

Como se puede apreciar en la figura 14, los resultados mostraron que cuando la concentración de miR-223 aumentaba, la actividad de luciferasa también lo hacía (Figura 14, A) lo cual era contrario a lo esperado. Por otra parte cuando se aumentaba la concentración de ABCB1, observamos un incremento conforme al aumento de la concentración de ABCB1, sin embargo este aumento, se veía disminuido drásticamente cuando se llegaba a la concentración de 1000ng. (Figura 14, B)

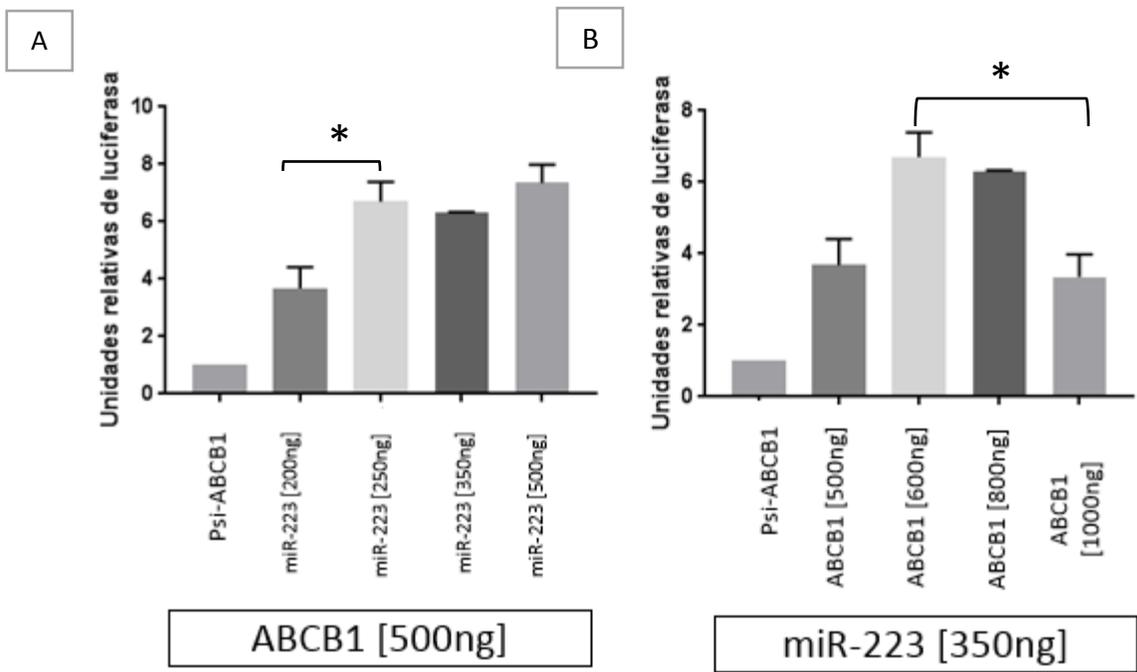


Figura 14.-Efecto de concentraciones crecientes de miR-223 y PSI-ABCB1 sobre la actividad de luciferasa.

A) La concentración de ABCB1 para todas las muestras fue de 500ng B) mientras que para la curva de ABCB1, la concentración de miR-223 fue en todas las muestras de 350ng. Todas las mediciones se hicieron 24 horas después de la transfección. (n=3) *p<0.05

Posterior a estos resultados, se sugirió que el incremento de la actividad de luciferasa que se había asociado con la competencia de Esp-223, podría haber sido solo un falso positivo debido a la co-transfección que se realizó para los ensayos. Esto es porque, al igual que miR-223, nuestra Esp-223 fue clonada en el vector PLVX-shRNA2, previamente mencionado, por lo que existía la posibilidad de que alguna secuencia del plásmido PLVX-shRNA2, interactuara con el plásmido PSI-ABCB1.

Con esto se propuso que nuestra Esp-223, podría tener un efecto similar al observado en la curva de concentración de miR-223. Por esta razón se estableció, que evaluar la función de la esponja por ensayos de luciferasa no era una estrategia adecuada.

7.3.-Evaluación del nivel de expresión de miR-223 en presencia de Esp-223.

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de luciferasa, propusimos una serie de condiciones para poder evaluar nuestra Esp-223 de la mejor manera.

Primeramente se decidió aumentar la concentración del plásmido PLVX-esp-223 hasta 1µg, concentración en la que observamos que miR-223 no disminuía la actividad de luciferasa (Figura 14, B).

Por otra parte, se consideró al plásmido PSI-ABCB1 como un inhibidor en sí de miR-223, debido al sitio de reconocimiento a miR-223 en su 3'UTR. Este tipo de estrategia de tomar como modelo o usar regiones 3'UTR para el diseño de RNAs esponjas ha sido ampliamente utilizada con gran éxito^{34,46,59}. De hecho esta estrategia ha sido destacada en algunos trabajos como una de las grandes ventajas del diseño y construcción de este tipo de herramientas^{35,36,40}. Con esto como antecedente se decidió evaluar a PSI-ABCB1 como inhibidor de miR-223.

Basándonos en las condiciones de los ensayos de luciferasa, se realizó un experimento de qPCR para validar nuestra Esp-223. Este experimento fue llevado a cabo en células AD-293, las cuales no expresan de forma endógena miR-223⁵⁶, por lo que se co-transfectó con el plásmido PLVX-Esp-223 en conjunto con PLVX-miR-223 (Figura 7).

Se observó que en la co-transfección PLVX-Esp-223 con PLVX-miR-223, no hubo una disminución significativa de miR-223 con respecto al control que expresaba solo miR-223. Por otra parte, en la muestra que contenía el plásmido de Psi-ABCB1, se observó una marcada disminución de miR-223, correlacionado con lo que se había observado en los ensayos de luciferasa (Figura 7).

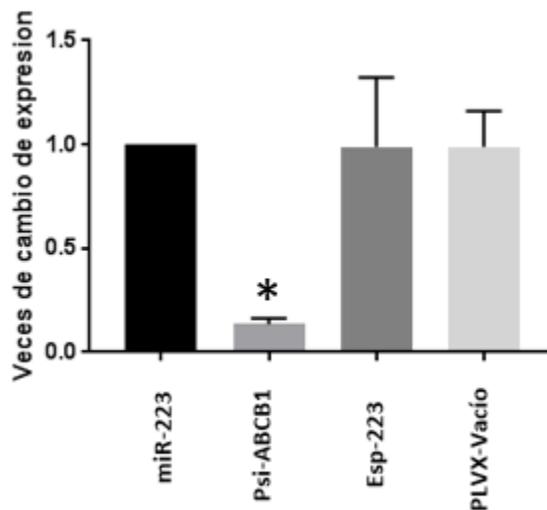


Figura 15.- Efecto de Esp-223 sobre la expresión de miR-223.

PCR tiempo real de miR-223, 48H postransfección. La expresión de miR-223 fue normalizada con RNU 48. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba de ANOVA. *p<0.05

Con este resultado concluimos que nuestra Esp-223 con 4 sitios completamente complementarios a miR-223 carecía de la capacidad para inhibirlo, contrario a los resultados observados con Psi-ABCB1, donde se obtuvo una disminución significativa de 5 veces la expresión de miR-223, el cual es un sitio con una interacción imperfecta.

Es importante analizar qué causas llevaron a que nuestra Esp-223 contrario a Psi-ABCB1, no lograra una inhibición significativa. Una razón pudo haber sido el uso de los sitios totalmente complementarios en Esp-223, lo que llevaría al reconocimiento perfecto entre el miRNA y el RNA esponja, causando una degradación catalítica por Argonauata 2^{2,20,25}, que luego permitiría liberar al miRNA^{4,24,25,62}. Esta hipótesis podría ser demostrada a través de la medición del transcrito de Esp-223 por PCR. Donde se observaría una disminución de los niveles de Esp-223, sugiriendo que realmente es blanco de miR-223 pero es degradada por acción catalítica de Ago2.

Por otra parte, el sitio parcialmente complementario de ABCB1, pudo beneficiar el efecto de esponja, ya que este tipo de interacciones han sido reportadas con mayor eficiencia comparadas con aquellas que son totalmente complementarias^{34,35,39,40,46}, debido a que estas resultan en un secuestro del RNA mensajero en conjunto con el miRNA^{21,24,39}, permitiendo un decremento de los niveles de miR-223. Este tipo de fenómenos ha sido previamente descrito mediante la inmuno-precipitación de Argonauta 2, se comparó una esponja totalmente complementarias y otra parcialmente complementarias, en donde se midió la cantidad de RNA esponja unida a Ago2, donde se observó que existía una mayor cantidad de esponja parcialmente complementaria unida a Ago2, que esponja que era totalmente complementaria³⁹.

Al comparar con distintos trabajos, se puede pensar que la configuración perjudicó el funcionamiento de nuestra Esp-223, ya que además de tener sitios totalmente complementarios, eran idénticos entre ellos, por lo que pudieron existir eventos de recombinación^{39,43,51}, que provocarían un cambio en la configuración de nuestra Esp-223 nulificando la interacción con miR-223. Esto también podría ser determinado por PCR, donde observaríamos que el nivel de Esp-223 no cambia en presencia de miR-223, lo cual sugeriría una interacción ineficiente o prácticamente nula con Esp-223.

Adicionalmente se ha sugerido que la estructura secundaria es un factor importante a tomar en consideración en este tipo de herramientas. En 2009 Haraguchi y colaboradores reportaron un trabajo en donde fueron comparados distintos Decoys, los cuales poseían distintas estructuras secundarias, observando que en algunos casos estas estructuras

afectaban de forma negativa, la interacción con el miRNA, lo cual también se han observado en RNAs esponjas de gran longitud^{36,40,46,48}. Estos puntos cobran relevancia en PSI-ABCB1, ya que al ser una secuencia más corta y al tener solo un sitio de reconocimiento de miR-223, existía menos posibilidad de eventos de recombinación o formación de estructuras secundarias. No obstante se requiere de más estudios, para corroborar que los sucesos anteriores, estén ocurriendo en los modelos celulares utilizados.

7.4.-Construcción de un vector de expresión para inhibir a miR-223, basado en el diseño del 3'UTR de ABCB1.

Tras los resultados anteriores, se concluyó que el plásmido PSI-ABCB1 funcionaba como un inhibidor de miR-223, que logró una inhibición significativa comparada con nuestro primer diseño PLVX-Esp-223, por lo que se usó como referencia para construir una nueva versión de este, en un plásmido distinto al de luciferasa. Para esto se diseñaron un par de oligonucleótidos los cuales tenían un sitio de reconocimiento de la región 3'UTR del gen ABCB1 para miR-223 (Figura 16, B), mismo que fue usado en el trabajo reportado por López-Castillejo en el 2013.

Para esta segunda construcción, se tomó el plásmido lentiviral PLVX-shRNA2, el cual fue modificado anteriormente por nuestro grupo de trabajo, a través del cambio del gen codificante de la proteína Zgreen por el gen de mCHERRY. Este plásmido fue denominado por nuestro grupo como PLVX-mCHERRY (Figura 16, A). La elección de este plásmido nos daba la oportunidad de poder generar partículas lentivirales en caso de que fuera necesario y además visualizar los diferentes fluoróforos en las co-transfecciones del inhibidor y miR-223 en la línea AD-293 o en cualquier modelo celular. Se encontraron en el plásmido PLVX-mCHERRY los sitios XbaI y MluI, los cuales fueron seleccionados para clonar la secuencia que codificaría el RNA esponja. (Figura 16, B).

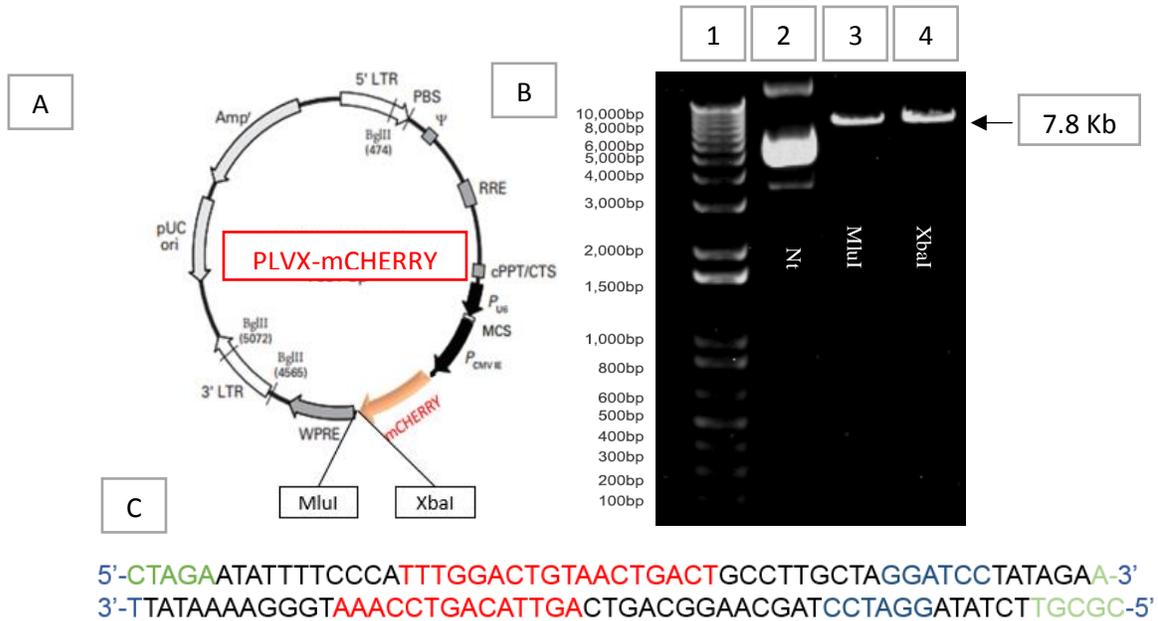


Figura16.- Mapa del plásmido PLVX-mCHERRY.

A) Mapa del plásmido PLVX-mCHERRY con los sitios MluI y XbaI **B)** Corrimiento del plásmido PLVX-Mcherry, en un gel de agarosa al 1% a 100V por 1 HORA. En el carril 1 se muestra el marcador de 1Kb, 2 PLVX-mCherry sin digerir, 3 digestión con MluI y digestión con XbaI. **C)** Diseño del dsDNA donde se indica en rojo el sitio de reconocimiento de miR-223.

Una vez que se obtuvieron los oligos y se hibridaron, se procedió a clonarla en el plásmido PLVX-mCHERRY. Posteriormente se comprobó que la secuencia estuviera insertada en el plásmido a través de una digestión con la enzima BamHI, la cual debía liberar un fragmento de aproximadamente 1800 pares de bases, en aquellas clonas que fueran positivas, como se muestra en la figura 9. Esta construcción fue denominada mCHERRY-Esp-223.

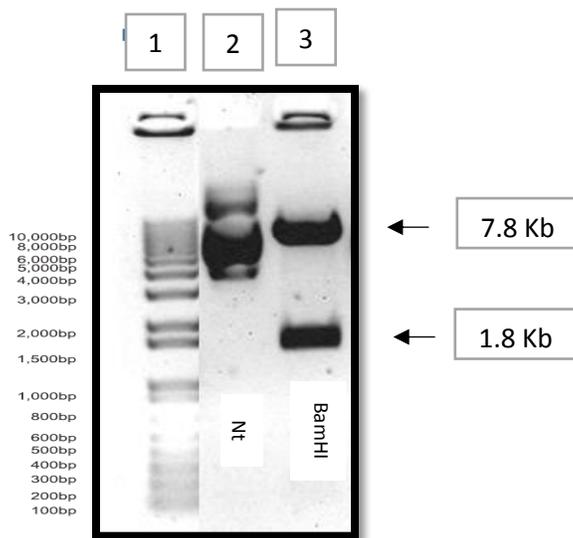


Figura 17.- Validación de la clonación de mCherry-Esp-223.

Corrimiento de un gel de agarosa al 1% a 100V por 1H. Donde se observa la liberación de una banda de 1800pb.. Carril 1 marcador de 1Kb, 2 Plásmido PLVX-shRNA2, 3 Digestión con BamH1.

Posteriormente se evaluó la función de esta nueva construcción. En este caso se pudo visualizar la eficiencia de transfección de ambos plásmidos, lo cual era imposible con nuestra construcción anterior. Observando las células a epifluorescencia a 24 y 48 horas pos-transfección, mCHERRY-Esp-223 (rojo) y miR-223 (verde) (Figura 18).

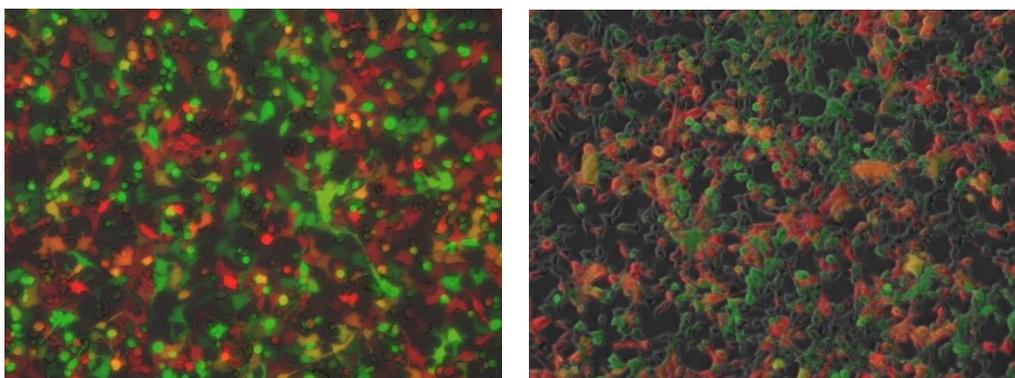


Figura 18.- Eficiencia de transfección de los plásmidos Mcherry-esp-223 y miR223 en células AD-293.

En fluorescencia en rojo se observa mCherry-Esp-223 y en verde PLVX-miR-223. La fluorescencia fue observada 48 H después de la transfección.

Luego de observar la eficiencia, se evaluó la expresión de miR-223 en presencia de Mcherry-esp-223 mediante qPCR, con lo cual se obtuvo una reducción de 5 veces la expresión de miR-223, comparada con el control en células AD-293 (Figura 19), con lo que se concluye, que esta configuración de Esponja, puede actuar como inhibidor de miR-223.

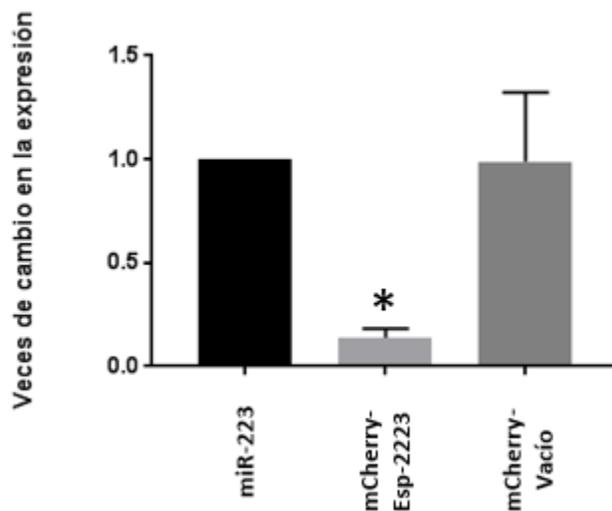


Figura 19.- Efecto de mCherry-Esp-223 sobre la expresión de miR-223 en AD-293.

PCR tiempo real de miR-223, 48H postransfección. La expresión de miR-223 fue normalizada con RNU 48. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba de ANOVA. (n=3)*p<0.05

7.5.-Efecto de mcherry-Esp-223 sobre miR-223 en células Jurkat.

Para evaluar la funcionalidad de la esponja en un contexto celular de expresión endógena, se buscó una línea celular que fuera de fácil transfección y que expresara miR-223.

Una de las líneas celulares que se encontraron en la literatura fue MCF7, de origen de cáncer de mama. En esta línea celular, ha sido reportado que posterior al tratamiento con celastrol, un agente quimioterapéutico, existe un incremento de la expresión de miR-223 y que al inhibirlo, genera una reducción de la viabilidad de las células, sugiriendo que miR-223 puede ser un blanco terapéutico en el tratamiento de este padecimiento⁵⁵. A pesar de haber probado en diferentes ocasiones, incluso diversos primers, no pudimos detectar miR-223 en esta línea celular. Por estas razones se eliminó la posibilidad de poder usar MCF7 como modelo para nuestro trabajo, al menos para evaluar la expresión de miR-223.

Siguiendo la búsqueda de un modelo adecuado para los objetivos de nuestro trabajo, se encontró la línea celular Jurkat, que deriva de leucemia linfoblástica aguda de

células T, en la cual ha sido reportada la expresión de miR-223 como regulador del gen STAT1⁵².

Para validar la expresión de miR-223 en células Jurkat, se realizó un qPCR comparándolo con células AD-293 transfectadas con miR-223, donde se observó que si existía expresión de miR-223 en Jurkat, aunque un poco más baja comparada con las células AD-293, transfectadas con miR-223 (Figura 20, A). Posteriormente, estas células se transfectaron con mCHERRY-Esp-223, para evaluar la eficiencia de transfección con 4µg de plásmido, con la que se obtuvo una eficiencia de aproximadamente de 50% (Figura 20, B). Con los resultados obtenidos se concluyó que la línea celular Jurkat, sería el modelo de trabajo ideal para los siguientes experimentos.

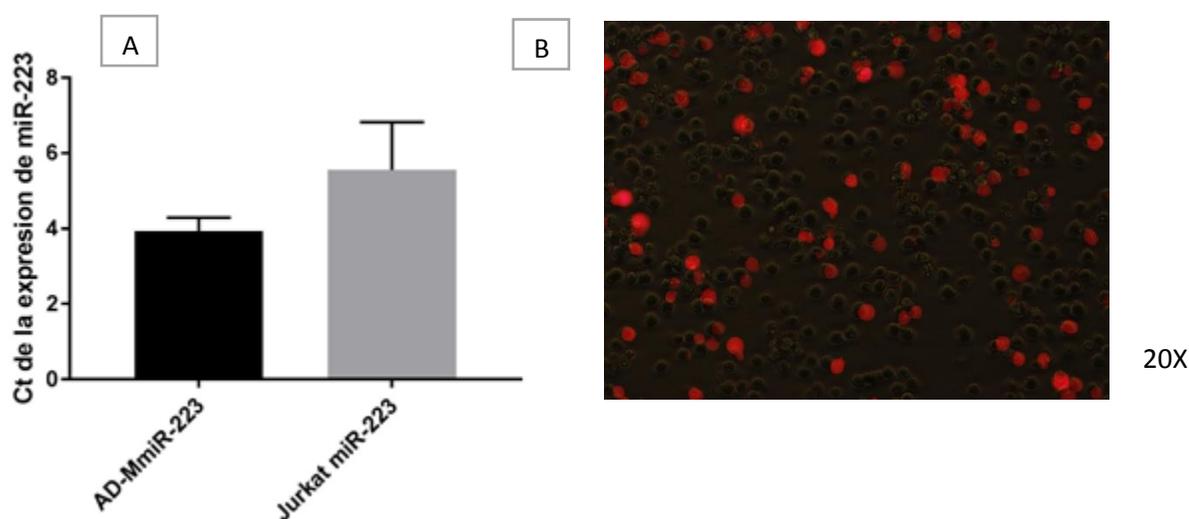


Figura 20.- Evaluación de la expresión de miR-223 en células JURKAT.

A) Expresión de miR-223 representada en Ct en células Jurkat. La expresión de miR-223 fue normalizada con RNU 48 B) Células Jurkat vistas a epifluorescencia a 48 post transfección con mCHERRY-Esp-223.

En orden a validar el efecto de inhibición de miR-223 por mCherry-Esp-223, se transfectó en conjunto con Psi-Abcb1 en las células Jurkat, observando un decremento significativo de 6 y 5 veces la expresión de miR-223 respectivamente (Figura 21). Con estos resultados obtenidos a lo largo de este trabajo podemos concluir que PSI-ABCB1 y mCherry-Esp-223, en su configuración de esponja con un único sitio parcialmente complementario, pueden inhibir a miR-223, expresado de forma exógena en el caso de AD-293, así como, en Jurkat, que expresan endógenamente miR-223.

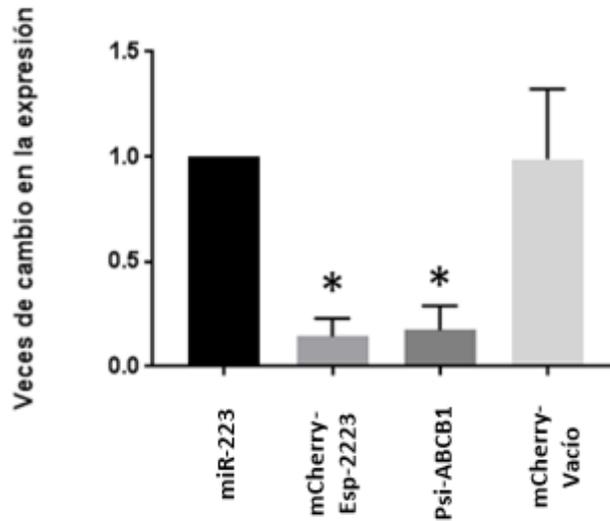


Figura 21.- Efecto de PSI-ABCB1 y mCherry-Esp-223 sobre la expresión de miR-223 en Jurkat.

Número de veces de cambio en la expresión de miR-223. La expresión de miR-223 fue normalizada con RNU 48. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba de ANOVA. (n=3)*p<0.05

Con estos hallazgos podemos sugerir que usar sitios de reconocimiento de regiones 3'UTR, puede resultar en una forma sencilla de generar este tipo de herramientas, tal como se ha descrito en otros trabajos.

7.6.-Efecto de Esp-223 sobre blancos reportados de miR-223

Como objetivo final del trabajo, se planteó que al reducir los niveles de miR-223, podríamos entonces aumentar la expresión de los mensajeros blancos y por ende su nivel de proteína. Por esta razón, mediante ensayos de Western Blot se verificó la expresión de blancos reportados para miR-223, entre los cuales se encontraban IGF-1R, IKK α , FOXO1 y SP1⁵⁴.

El primer paso fue corroborar en los modelos celulares utilizados (AD-293, MCF7 y Jurkat), el efecto de miR-223 sobre estos blancos. Para esto se transfectaron las líneas celulares con 2 μ g de miR-223 y posteriormente se realizaron ensayos de Western Blot.

Observamos en la línea celular MCF7 una disminución considerable de IGF-1R e IKK α en presencia de miR-223, mientras que en AD-293 esta disminución fue mucho menor

aunque perceptible (Figura 22). SP1, disminuyó solo en las células Jurkat, no así en AD-293 y MCF7. A pesar de que estos blancos han sido reportados como blancos de miR-223, con al menos un sitio de reconocimiento para miR-223^{49,50,54}, esto varía en cada modelo celular. Lo anterior pudiera deberse a varios factores, entre los que se puede mencionar: las isoformas del transcrito, donde puede cambiar la longitud de la región 3'UTR, debido a procesos de splicing alternativo^{63,64} o sitios alternativos de poliadenilación en el transcrito^{65,66}.

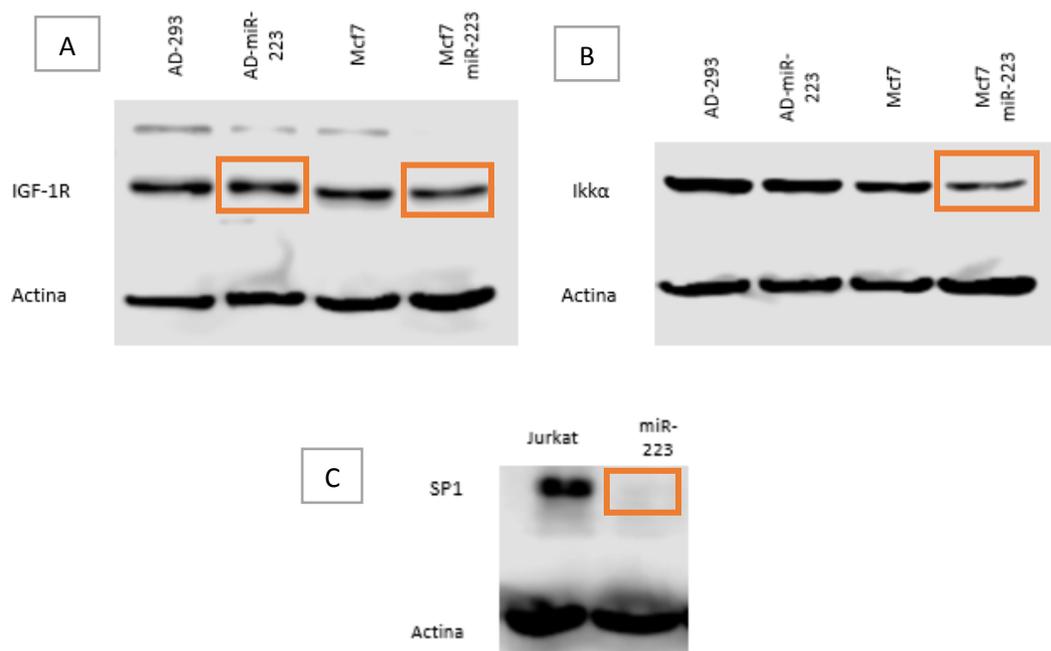


Figura 22.- Efecto de miR-223 en la expresión de IGF-1R, IKKα y SP1

A) Detección de IGF-1R (100KD) B) e IKKα (80KD) en extractos de proteína total de AD-293, MCF7 y C) SP1 en Jurkat .Se resalta con un recuadro rojo la disminución de estos blancos en presencia de miR-223.

Con los resultados anteriores decidimos utilizar IGF-1R, IKKα y Sp1, como blancos a ser evaluados para completar nuestro último objetivo, cada uno en la respectiva línea celular, esperando que en presencia de ambos inhibidores aumente su expresión.

Los experimentos fueron hechos bajo las mismas condiciones que se usaron para los PCR en tiempo real, en donde las líneas celulares AD-293 y MCF7 fueron co-transfectadas, primero con mCHERRRY, PSI-ABCB1 y 24 horas después miR-223. Debido a que las células Jurkat expresan de forma endógena miR-223, solo se transfectaron ambos inhibidores y se cosecharon proteínas 48 H post transfección (Figura 23).

Observamos que en presencia de PSI ABCB1 Y mCherry-Esp-223, se logró el restablecimiento de la expresión de Ikk α en células AD-293, el cual ha sido reportado como blanco importante de miR-223^{49,50} y que su regulación es de gran importancia durante la diferenciación de macrófagos⁶⁷ (Figura 23,A). Sin embargo, no se logró el restablecimiento de IGF-1R en células AD-293 (Figura 23, B), ni SP1 en la línea celular Jurkat (Figura 23, C), en donde se remarca en cuadros negros que permanecieron al mismo nivel de expresión mostrado con el tratamiento de miR-223, el cual se marcó con un recuadro rojo. Esto pese a ver observado una disminución con miR-223. Este tipo de fenómeno, se ha observado, en células Hek-293, en donde se logró el restablecimiento de los blancos de miR-155, c-Jun, Smad4, pero no así Cyr61³⁹.

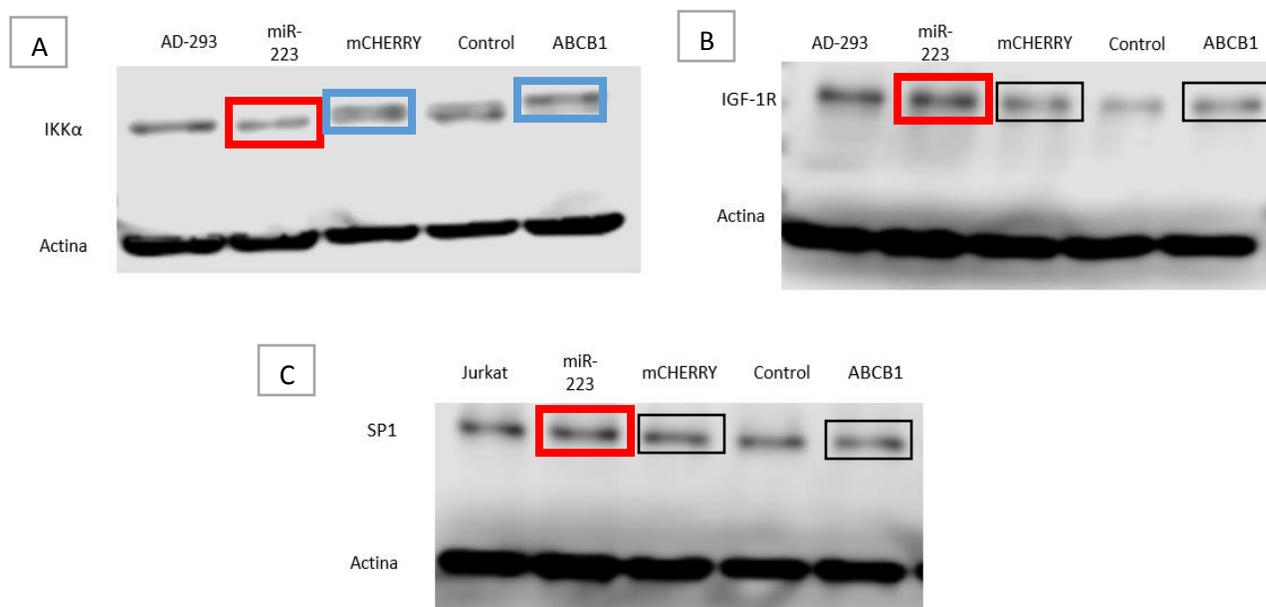


Figura 23.- Efecto de mCHERRY-Esp-223 y PSI-ABCB1 en la expresión de IGF-1R e IKK α .

A) Detección de IGF-1R (100KD) B) e IKK α (80KD) en extractos de proteína total de AD-293 y Jurkat, 48 H posterior a las co-transfecciones mCHERRY- Esp-223, PSI-ABCB1 y miR-223.

Se ha sugerido que el restablecimiento exitoso de blancos de miRNAs, depende de varios factores, siendo uno de estos la afinidad del miRNA, sobre el sitio reconocimiento^{37,40}. Incluso se ha reportado formas de regular la inhibición de miRNAs sobre algunos mensajeros a través de la edición de bases en la región 3'UTR, por la familias

de enzimas adenosina desaminase que actúan sobre RNA (ADAR)⁶⁸. Este tipo de casos se puede ejemplificar con BCL2, un blanco de miR-21, el cual se logró reestablecer con un RNA esponja con sitios de reconocimiento totalmente perfectos, pero no así, con un RNA esponja con sitios parcialmente complementarios³⁹. Por supuesto, en nuestro trabajo faltarían experimentos para corroborar esta hipótesis.

Por otra parte, se ha propuesto que a pesar de que exista una disminución del miRNA, esta no sea suficiente como para afectar la expresión de los blancos, lo cual es recurrente en células con baja expresión del miRNA a evaluar^{39,69}. Adicionalmente, se ha propuesto que una parte importante del funcionamiento no solo de RNAs esponjas, sino también de competidores endógenos, es la concentración, la cual para poder ser exitosa debe ser por lo menos igual con respecto al miRNA. Aunado a esto también se ha propuesto que su expresión debe ser igual o mayor con respecto al RNA mensajero con el que compite, ya que el mRNA se volvería en si un competidor endógeno por el miRNA restante^{36-38,40,59}.

En este trabajo se logró el diseño y construcción de un RNA esponja para miR-223, además se mostró que existen diversas características que pueden llevar al poco éxito en la inhibición del miRNA, como fue el caso de nuestro primer diseño PLVX-Esp-223 con 4 sitios de complementariedad perfecta, cuyo diseño puede ser tomado en cuenta para trabajos futuros. Existen aún muchas interrogantes en el funcionamiento de este tipo de herramientas; sin embargo, se ha demostrado que pueden ser de gran utilidad para el estudio de miRNAs en la célula, dando grandes ventajas sobre otro tipo de sistemas y que no deben ser descartados como herramientas, que podrían ser usadas en un futuro como terapias para el tratamiento de algunas enfermedades, como leucemia, cáncer endometrial, cáncer de mama, septicemia⁴⁹.

8.-Conclusiones

- **PLVX-Esp-223, con 4 sitios de reconocimiento totalmente complementarios para miR-223, no logró disminuir la expresión miR-223.**
- **mCcherry-Esp-223, con un 1 sitio de reconocimiento parcialmente complementario, logró inhibir significativamente la expresión de miR-223, de forma exógena en células AD-293 y de forma endógena en células Jurkat.**
- **IGF-1R e IKK α , son blancos de miR-223 en células AD-293 y MCF7. Por otra parte SP1 es blanco de miR-223 en células Jurkat, lo cual no había sido reportado hasta el momento.**
- **mCherry-Esp-223 solo logró restablecer la expresión de IKK α , en células AD-293.**
- **El plásmido PLVX-shRNA2 puede ser utilizado para expresar miRNAs y RNAs esponja.**

9.-Perspectivas

En el presente trabajo se logró desarrollar un RNA esponja con la capacidad de inhibir la expresión miR-223, no obstante es impórtate resaltar las diferentes incógnitas y detalles que surgieron a raíz de los resultados obtenidos de este trabajo. Dentro de las perspectivas, parece importante evaluar implementar diferentes estrategias que permitan evaluar la función de nuestro RNA esponja, esto con el fin de lograr explicar con mayor certeza los diferentes fenómenos que ocurrieron. Por una parte, se propone la evaluación por qPCR del transcrito de ambas esponjas en presencia de miR-223, en el caso de PLVX-Esp-223, corroborar la hipótesis de que se degrada totalmente y en caso de mCherry-Esp-223, donde su nivel de transcrito debería permanecer al menos semejante al no tratado.

Por otra parte, evaluar más blancos de miR-223, no solo por Western Blot, sino también por qPCR, para medir el nivel de transcrito y asegurar de este modo que no sufren efecto alguno por parte del RNA esponja. También nos parece importante evaluar a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones nuestro RNA esponja, para observar si existen cambios relevantes en su función con estas variaciones, incluso comparar su eficiencia con inhibidores previamente reportados o comerciales. Finalmente sería interesante agregar más de un sitio con complementariedad parcial al RNA esponja mCherry-Esp-223 con el fin de averiguar si existe un incremento en la eficiencia o se ve perjudicada.

10.-Literatura citada

1. Mattick JS, Makunin I V. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet.* 2006;15 Spec No(1):17-29. doi:10.1093/hmg/ddl046.
2. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522-531. doi:10.1038/nrg1415.
3. Hansen TB, Veniç½ MT, Jensen TI, Schaefer A, Damgaard CK, Kjems J. Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun.* 2016;7(May):1-10. doi:10.1038/ncomms11538.
4. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):597-610. doi:10.1038/nrg2843.
5. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell.* 1993;75(5):843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
6. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(8):475-488. doi:10.1038/nrm3611.
7. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2010;1803(11):1231-1243. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.013.
8. Jia W, Chen W, Kang J. The Functions of MicroRNAs and Long Non-coding RNAs in Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2013;11(5):275-283. doi:10.1016/j.gpb.2013.09.004.
9. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science (80-).* 2004;303(5654):95-98. doi:10.1126/science.1090599.
10. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415-419. doi:10.1038/nature01957.
11. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(8):509-524. doi:10.1038/nrm3838.
12. Solorzano Domínguez. Regulación transcripcional de mir-223, a través de la activación de tlr-4/nf-kb. Tesis de Maestría. UNAM. 2015.
13. Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: MicroRNA biogenesis via splicing. *Biochimie.* 2011;93(11):1897-1904. doi:10.1016/j.biochi.2011.06.017.
14. Ender C, Krek A, Friedländer MR, et al. A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Mol Cell.* 2008;32(4):519-528. doi:10.1016/j.molcel.2008.10.017.
15. Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs

- by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(10):4626-4640. doi:10.1093/nar/gks026.
16. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes (Basel)*. 2004;504(5):504-511. doi:10.1101/gad.1184404.species.
 17. Place RF, Li L-C, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(5):1608-1613. doi:10.1073/pnas.0707594105.
 18. Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PLoS One.* 2013;8(11):4-8. doi:10.1371/journal.pone.0079467.
 19. Lopez Castillejos. Regulación postranscripcional del gen *mdr1/ pgp-170* a través de *mir-223*. Tesis de licenciatura. UNAM. 2013
 20. Liu J, Carmell MA, Rivas F V, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 2004;305(5689):1437-1441. doi:10.1126/science.1102513.
 21. Iwakawa H oki, Tomari Y. Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol Cell.* 2013;52(4):591-601. doi:10.1016/j.molcel.2013.10.033.
 22. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
 23. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* 2005;7(7):719-723. doi:10.1038/ncb1274.
 24. Jakymiw A, Pauley KM, Li S, et al. The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *J Cell Sci J Cell Sci.* 2007;120(120):1702-1317. doi:10.1242/jcs.03452.
 25. Pfaff J, Meister G. Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(4):855-860. doi:10.1042/BST20130047.
 26. Parker R, Sheth U. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Mol Cell.* 2007;25(5):635-646. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.011.
 27. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):9-22. doi:10.1038/nrm2080.
 28. MacFarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010;11(7):537-561. doi:10.2174/138920210793175895.
 29. Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S. Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence.* 2012;3(1):1. doi:10.1186/1758-907X-3-1.

30. Elmén J, Lindow M, Schütz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*. 2008;452(7189):896-899. doi:10.1038/nature06783.
31. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature*. 2005;438(7068):685-689. doi:10.1038/nature04303.
32. Hollensen AK, Bak RO, Haslund D, Mikkelsen JG. Suppression of microRNAs by dual-targeting and clustered Tough Decoy inhibitors. *RNA Biol*. 2013;10(3):406-414. doi:10.4161/rna.23543.
33. Bak RO, Hollensen AK, Mikkelsen JG. Managing MicroRNAs with Vector-Encoded Decoy-Type Inhibitors. *Mol Ther*. 2013;21(8):1478-1485. doi:10.1038/mt.2013.113.
34. Bak RO, Hollensen AK, Primo MN, Sorensen CD, Mikkelsen JG. Potent microRNA suppression by RNA Pol II-transcribed “Tough Decoy” inhibitors. *Rna*. 2013;19(2):280-293. doi:10.1261/rna.034850.112.
35. Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: Progress and possibilities. *Rna*. 2010;16(11):2043-2050. doi:10.1261/rna.2414110.
36. Tay FC, Lim JK, Zhu H, Hin LC, Wang S. Using artificial microRNA sponges to achieve microRNA loss-of-function in cancer cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;81:117-127. doi:10.1016/j.addr.2014.05.010.
37. Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nat Publ Gr*. 2016;17(5):272-283. doi:10.1038/nrg.2016.20.
38. Xu F, Zhang J. ScienceDirect Long non-coding RNA HOTAIR functions as miRNA sponge to promote the epithelial to mesenchymal transition in esophageal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2017;90:888-896. doi:10.1016/j.biopha.2017.03.103.
39. Jung J, Yeom C, Choi Y-S, et al. Simultaneous inhibition of multiple oncogenic miRNAs by a multi-potent microRNA sponge. *Oncotarget*. 2015;6(24):20370-20387. doi:10.18632/oncotarget.4827.
40. Bak RO, Mikkelsen JG. miRNA sponges: Soaking up miRNAs for regulation of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;5(3):317-333. doi:10.1002/wrna.1213.
41. Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, et al. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet*. 2010;42(5):454-458. doi:10.1038/ng.556.
42. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. ARTICLES A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*. 2010;465(7301):1033-1038. doi:10.1038/nature09144.
43. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. NIH Public Access. 2013;4(9). doi:10.1038/nmeth1079.MicroRNA.
44. Barbato C, Ruberti F, Pieri M, et al. MicroRNA-92 modulates K(+) Cl(-) co-transporter KCC2 expression in cerebellar granule neurons. *J Neurochem*. 2010;113(3):591-600.

doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06560.x.

45. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2007;13(5):613-618. doi:10.1038/nm1582.
46. Haraguchi T, Ozaki Y, Iba H. Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(6). doi:10.1093/nar/gkp040.
47. Papapetrou EP, Korkola JE, Sadelain M. A genetic strategy for single and combinatorial analysis of miRNA function in mammalian hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(2):287-296. doi:10.1002/stem.257.
48. Hollensen AK, Thomsen R, Bak RO, Petersen CC, Eva R. Improved microRNA suppression by WPRE-linked Tough Decoy microRNA sponges. 2017.
49. Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LAJ, Masters SL. MiR-223: Infection, inflammation and cancer. *J Intern Med*. 2013;274(3):215-226. doi:10.1111/joim.12099.
50. Huang K, Dong X, Sui C, et al. MiR-223 suppresses endometrial carcinoma cells proliferation by targeting IGF-1R. *Am J Transl Res*. 2014;6(6):841-849.
51. Wu LH, Cai QQ, Dong YW, et al. Decoy oligonucleotide rescues IGF1R expression from MicroRNA-223 suppression. *PLoS One*. 2013;8(12):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0082167.
52. Cells ATL, Moles R, Bellon M, Nicot C. STAT1 : A Novel Target of miR-150 and miR-223 Is Involved in the Proliferation of HTLV-I – Transformed. *NEO*. 2015;17(5):449-462. doi:10.1016/j.neo.2015.04.005.
53. Zhou W, Pal AS, Hsu AY-H, et al. MicroRNA-223 Suppresses the Canonical NF-κB Pathway in Basal Keratinocytes to Dampen Neutrophilic Inflammation. *Cell Rep*. 2018;22(7):1810-1823. doi:10.1016/j.celrep.2018.01.058.
54. Jia CY, Li HH, Zhu XC, et al. MiR-223 suppresses cell proliferation by targeting IGF-1R. *PLoS One*. 2011;6(11):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0027008.
55. Cao L, Zhang X, Cao F, et al. Inhibiting inducible miR-223 further reduces viable cells in human cancer cell lines MCF-7 and PC3 treated by celastrol. 2015:1-11. doi:10.1186/s12885-015-1909-2.
56. López Castillejos. Restauración de la quimio-sensibilidad en células de cáncer con fenotipo mdr, mediada por mir-223. Tesis de maestría. UNAM. 2015
57. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73.
58. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: Competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007;4(9):721-726. doi:10.1038/nmeth1079.

59. Ebert MS, Sharp PA. Emerging roles for natural microRNA sponges. *Curr Biol*. 2010;20(19):R858-R861. doi:10.1016/j.cub.2010.08.052.
60. Requenez-Contreras JL, López-Castillejos ES, Hernández-Flores R, et al. MiR-138 indirectly regulates the MDR1 promoter by NF- κ B/p65 silencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;484(3):648-655. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.168.
61. Farr A, Roman A. A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. 1991;20(4):920.
62. Li S, Lian SL, Moser JJ, et al. Identification of GW182 and its novel isoform TNGW1 as translational repressors in Ago2-mediated silencing. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 24):4134-4144. doi:10.1242/jcs.036905.
63. Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008;456(7221):470-476. doi:10.1038/nature07509.
64. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*. 2010;39(6):925-938. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.011.
65. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science (80-)*. 2008;320(5883):1643-1647. doi:10.1126/science.1155390.
66. Elkon R, Ugalde AP, Agami R. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet*. 2013;14(7):496-506. doi:10.1038/nrg3482.
67. Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim YS, Liu ZG. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF- κ B pathway by regulating expression of the kinase IKK α during macrophage differentiation. *Nat Immunol*. 2010;11(9):799-805. doi:10.1038/ni.1918.
68. Wahlstedt H, Öhman M. Site-selective versus promiscuous A-to-I editing. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011;2(6):761-771. doi:10.1002/wrna.89.
69. Chumakov SP, Kravchenko JE, Prassolov VS, Frolova EI, Chumakov PM. Efficient downregulation of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector. *Plasmid*. 2010;63(3):143-149. doi:10.1016/j.plasmid.2009.12.003.