



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MIR-548X-3P COMO REGULADOR DE LA
EXPRESIÓN DE LOS GENES *MAFB* Y *NFATc1* ASOCIADOS AL METABOLISMO ÓSEO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ARIADNA IVETE VALENCIA SOLIS



CDMX, JUNIO 2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ**

VOCAL: **Profesor: ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ**

SECRETARIO: **Profesor: ERIC GUSTAVO RAMÍREZ SALAZAR**

1er. SUPLENTE: **Profesor: JAVIER AXOSCO MARÍN**

2° SUPLENTE: **Profesora: LIZBETH ESMERALDA GARCÍA VELÁZQUEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO GENÓMICA DEL METABOLISMO ÓSEO,

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Eric Gustavo Ramírez Salazar

SUSTENTANTE:

Ariadna Ivete Valencia Solis

ÍNDICE

Resumen.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. microRNAs	1
1.1.1. Biogénesis	1
1.1.2. Nomenclatura.....	3
1.1.3. Mecanismos de regulación de los miRNAs.....	4
1.2. Fisiología del hueso.....	5
1.2.1. Osteoblastos.....	5
1.2.2. Osteocitos.....	6
1.2.3. Osteoclastos.....	6
1.2.4. Remodelado óseo.....	7
1.3. Diferenciación de osteoclastos.....	8
1.3.1. Papel de los factores de transcripción <i>NFATc1</i> y <i>MAFB</i> en el Metabolismo óseo.....	10
1.4. Osteoporosis	11
1.5. Los miRNAs en el metabolismo óseo	12
1.5.1. hsa-miR-548.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo general.....	15
3.2. Objetivos particulares.....	15
4. HIPÓTESIS.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1. Construcción de vectores reporteros	16
5.1.1. Amplificación de regiones 3'-UTR de <i>MAFB</i> y <i>NFATc1</i>	16
5.1.2. Purificación de los productos de PCR.....	18
5.1.3. Digestión con enzimas de restricción y purificación de la digestión.....	18
5.1.4. Ligación.....	19
5.1.5. Transformación bacteriana con los plásmidos generados.....	20

5.1.6.	Purificación de plásmidos.....	20
5.1.7.	Análisis por PCR de colonias candidatas.....	21
5.1.8.	Preparación del plásmido pcDNA-miR-548x-3p.....	22
5.1.9.	Midipreps.....	22
5.1.10.	Cultivo celular.....	23
5.1.11.	Transfección de las células U2OS y Saos-2	24
5.1.12.	Ensayo luciferasa.....	25
5.2.	Expresión de genes.....	26
5.2.1.	Extracción de RNA.....	26
5.2.2.	RT-PCR para analizar la expresión de miR-548x-3p.....	26
5.2.3.	RT-PCR para analizar los genes blanco.....	27
5.2.4.	Extracción de proteínas totales.....	28
5.2.5.	Cuantificación de proteínas de extractos celulares.....	29
5.2.6.	Western Blot.....	30
6.	RESULTADOS	32
6.1.	Genes reporteros.....	32
6.2.	Expresión de genes blanco	45
7.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
8.	CONCLUSIONES	53
9.	REFERENCIAS	54

RESUMEN

Los microRNAs son RNA pequeños de doble hebra de ~22 nucleótidos capaces de regular la expresión genética al unirse por complementariedad a su secuencia blanco ubicada generalmente dentro de la región 3' no traducida de su RNA mensajero blanco. Alteraciones en la expresión de los microRNAs han sido asociadas a una gran variedad de patologías, entre ellas la osteoporosis. La osteoporosis puede ser causada por cualquier alteración en el remodelado óseo, un proceso que se lleva a cabo principalmente por los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos.

Previamente, nuestro grupo de trabajo identificó la sobreexpresión diferencial de tres microRNAs en mujeres con osteoporosis. Uno de ellos fue el miR-548x-3p, el cual mediante análisis bioinformático se predijo que puede regular la expresión de *NFATc1* y *MAFB*, dos genes que juegan un papel importante en el proceso de diferenciación de osteoclastos. Por lo tanto, el objetivo de éste trabajo fue evaluar funcionalmente el papel del miR-548x-3p en la regulación de los genes *NFATc1* y *MAFB*. La capacidad de unión del miR-548x-3p a las regiones 3' no traducidas, se evaluó mediante ensayos del gen reportero de luciferasa. Para esto, se realizaron las clonaciones de las correspondientes regiones 3' no traducidas de ambos genes en el plásmido pmiR-Target, y la clonación del miR-548x-3p en el plásmido pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR. Posteriormente, se realizaron cotransfecciones de los plásmidos mencionados en las líneas celulares U2OS y Saos-2. Los resultados mostraron una disminución de la actividad de luciferasa en presencia del miR-548x-3p, indicando que este fue capaz de unirse a las regiones 3' no traducidas de los genes *NFATc1* y *MAFB*.

En el mismo sentido, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de miR-548x-3p sobre los niveles de expresión de *NFATc1* y *MAFB* a nivel de mRNA mediante RT-PCR y proteína mediante Western Blot. Los resultados mostraron que la sobreexpresión del miR-548x-3p disminuye significativamente los niveles de los mRNA de *NFATc1* y *MAFB*. Así mismo, se observó una disminución de la proteína MAFB cuando se sobre expresa el microRNA.

En conclusión, nuestros resultados señalan que el miR-548x-3p es capaz de regular la expresión de los genes *NFATc1* y *MAFB*, y por lo tanto, tiene un papel importante durante la diferenciación de los osteoclastos en el metabolismo óseo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. microRNAs

Uno de los hallazgos más importantes a finales de siglo XX fue el descubrimiento de pequeñas cadenas de ácido ribonucleico (*RNA*, por sus siglas en inglés) no codificantes de entre 20-30 nucleótidos; capaces de regular el genoma a diferentes niveles en animales y plantas. Los microRNAs (miRNAs) forman parte de este grupo de *RNA* pequeños no codificantes, el primer miRNA identificado fue llamado lin-4 y fue descubierto por Ambros y colaboradores en 1993 en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*¹.

Los miRNAs son pequeños *RNA* endógenos de cadena sencilla de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional a través del emparejamiento de bases con su secuencia complementaria localizada en su *RNA* mensajero (mRNA) blanco².

1.1.1. Biogénesis

Los miRNAs son transcritos en el núcleo por la *RNA* polimerasa II, a este transcrito se le conoce como miRNA primario o pri-miRNA, el cual consta de una cadena de varias kilobases de longitud y puede formar múltiples estructuras de tallo-asa³.

Al menos la mitad de los miRNAs que se conocen hasta ahora, se encuentran cercanos entre sí, por lo tanto, es posible que su transcripción sea policistrónica, ya que se pueden transcribir múltiples pri-miRNA simultáneamente. En algunos casos, esta múltiple coexpresión de miRNAs puede mediar la expresión de una vía de señalización completa^{4,5}.

En la vía canónica del procesamiento, la estructura de tallo-asa es cortada del resto del pri-miRNA por la enzima Drosha. Ésta junto a su cofactor, la proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome DiGeorge (*DGCR8*, del inglés *DiGeorge syndrome critical region gene 8 protein*) y las helicasas *DDX5* y *DDX17* (del inglés *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 5/17*), forman parte de un complejo conocido como microprocesador. En este complejo la acción catalítica de Drosha genera una estructura intermedia de aproximadamente 60-70 nucleótidos llamada precursor de miRNA o pre-miRNA^{4,5,6,7}. Las

helicinas *DDX5* y *DDX17* funcionan como factores promotores que se requieren específicamente para el procesamiento eficiente del pri-miRNA⁸.

Para seguir su proceso de maduración, los pre-miRNA son exportados del núcleo al citoplasma mediante la exportina-5, una proteína intramembranal incrustada en la membrana nuclear, que tiene la capacidad de unirse específicamente a una doble cadena de RNA (dsRNA). Se ha propuesto un modelo en el que se postula que la exportina-5 reconoce el extremo 3' de la estructura tallo-asa del pre-miRNA y junto a RanGTP como cofactor salen del núcleo hacia al citoplasma, donde el GTP se hidroliza liberando al pre-miRNA⁴.

Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por otra proteína denominada Dicer, la cual escinde la estructura de tallo-asa con sus dominios catalíticos IIIa y IIIb para producir un dúplex miRNA-miRNA de ~22 nucleótidos con terminaciones 3' y 5'^{5,6,9}.

La proteína Dicer, la proteína de unión a RNA en respuesta a la transactivación (*TRBP*, del inglés *Trans-Activation Responsive RNA-Binding Protein*), una proteína que contiene una repetición de glicina-triptófano (*GW182*) y Argonauta 2 (*AGO2*) forman el complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RISC*, del inglés *RNA-induced silencing complex*). La hebra guía, transportada por el complejo *RISC*, dirige el reconocimiento del mRNA blanco para desempeñar su función como regulador de la expresión génica¹⁰.

Es importante mencionar que un miRNA puede regular más de un mRNA y que cada mRNA puede estar regulado por múltiples miRNAs, confiriendo de este modo, una amplia red de regulación de la expresión de genes mediada por los miRNAs^{10,11,12}.

Los miRNAs pueden regular la expresión de los mRNAs blanco gracias al emparejamiento perfecto o casi perfecto de una secuencia conocida como semilla¹¹. La secuencia semilla, es una secuencia de aproximadamente 6 a 8 nucleótidos ubicada de manera proximal al extremo 5' del mRNA, se trata de secuencias altamente conservadas entre especies e incluso un ligero cambio en su secuencia puede alterar su función¹³.

De manera general, la mayoría de los miRNAs en animales muestran una complementariedad parcial a la secuencia semilla, en comparación con las plantas donde la complementariedad con su mRNA blanco es perfecta. Lo anterior tiene como consecuencia el hecho de que la degradación del mRNA blanco no pueda llevarse a cabo

directamente por el complejo *RISC*, específicamente por *AGO2*. Hay 3 principales modelos de mecanismos por los cuales un miRNA puede silenciar la expresión de sus genes blanco; escisión exonucleolítica, la represión traduccional y corte de colas de poli A^{5,12,13}.

Es posible que se pueda confundir un miRNA con algún otro RNA no codificante de tamaño similar, por ejemplo, con los siRNA (RNA pequeño de interferencia). Sin embargo, hay tres características que pueden diferenciar a un miRNA, estos dan un único producto maduro, se conservan evolutivamente y su biogénesis, (convencional), es muy característica¹⁴.

La Figura 1, ilustra el proceso de biogénesis convencional para un miRNA y los mecanismos por los cuales un miRNA puede regular la expresión de un mRNA.

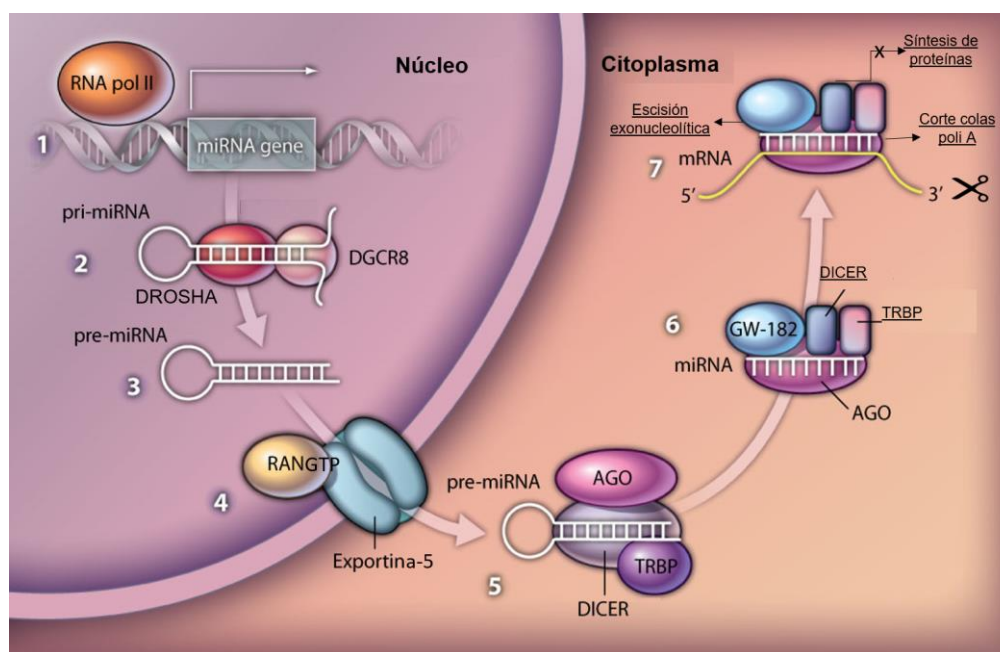


Figura 1. Biosíntesis y función general de un miRNA. De manera ilustrada se describe de manera general la biogénesis de un miRNA, comenzando con su transcripción por la RNA polimerasa II la escisión del pri-miRNA por Drosha, la exportación del pre-miRNA al citoplasma mediante la exportina-5, la formación del dúplex miRNA-miRNA por Dicer y la selección de la hebra guía por RISC formando un miRNA maduro capaz de llevar a cabo su función. Modificado de *Bahubeshi, A. et al. 2011, Science Translational Medicine*¹⁵.

1.1.2. Nomenclatura

El modo de nombrar un miRNA usa la especie en cursiva [por ejemplo, *hsa* (Homo sapiens)] seguido del prefijo “miR” y un número de identificación único, el cual se va asignando secuencialmente seguido del sufijo “3p” o “5p” dependiendo de la cadena de tallo-asa que da origen al miRNA maduro. Puede presentarse el caso en que se agregue

una letra entre el número y la denominación de la cadena guía, por ejemplo, miR-172a-5p; donde la letra “a” denota la existencia de secuencias estrechamente relacionadas expresadas a partir de diferentes precursores o *loci* genómicos y representa a diferentes miembros de una familia. Para nombrar al gen que codifica a un miRNA se usa el prefijo “MIR” en cursiva, un guion, y el número correspondiente^{16,17}.

1.1.3. Mecanismos de regulación de los miRNAs

La expresión de un miRNA puede regularse tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Figura 2). A nivel transcripcional la expresión de un miRNA puede verse afectada tanto por los cambios en la expresión de un gen huésped, por la acción de activadores o represores de la transcripción, así como por sus cambios epigenéticos. A nivel postranscripcional la expresión de un miRNA puede verse afectado por cambios en el procesamiento del miRNA como por su desestabilización. Estos niveles de regulación son importantes, pues de ellos depende la expresión tejido-específica de los miRNAs¹⁸.

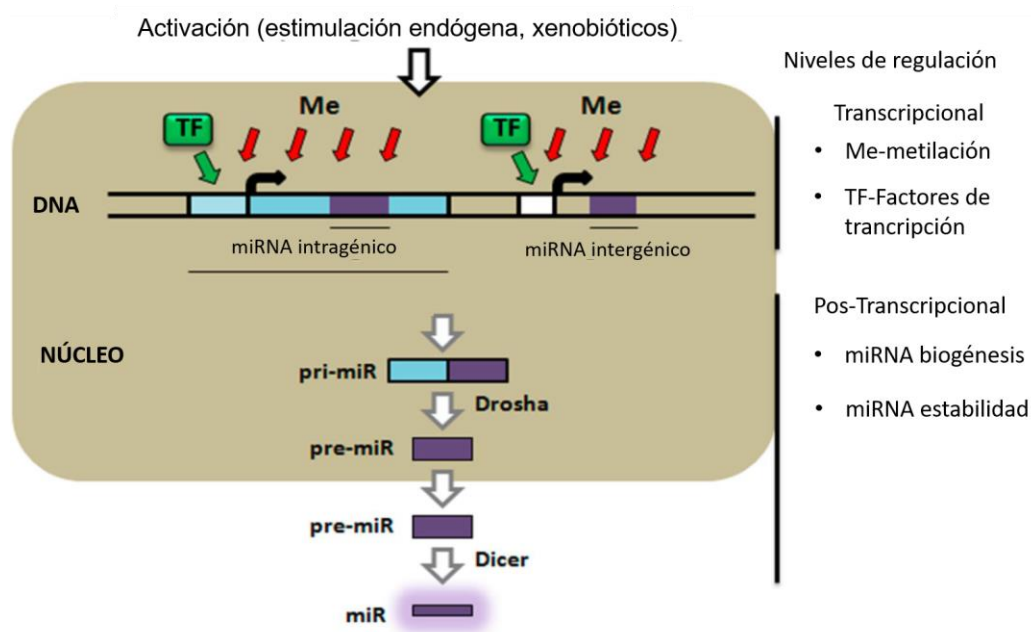


Figura 2. Niveles de regulación de un miRNA. La imagen indica los niveles en los que un miRNA puede ser regulado durante su biogénesis, desde su transcripción hasta que se vuelve un miRNA maduro. Modificado de Gulyaeva, L. et al. 2016, *Journal of Translational Medicine*¹⁸.

1.2. Fisiología del hueso

El hueso es un tejido que forma parte del esqueleto, este tejido tiene diversas funciones entre las más importantes están proteger a los órganos vitales, proveer rigidez al cuerpo y proporcionarle movimiento. El hueso está conformado por células y una matriz extracelular. La matriz extracelular consta de una parte orgánica compuesta de entre 85-90% por colágeno, principalmente colágeno tipo I, y el resto por proteínas no colágenas, como la osteocalcina, osteonectina y la fosfatasa alcalina; mientras que su parte inorgánica está formada principalmente por hidroxapatita ($[3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2](\text{OH})_2$) y fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), lo que le provee al hueso la rigidez, fuerza y elasticidad^{19,20}.

El modelado óseo es un proceso que sufre el hueso mediante el cual los huesos cambian de forma general en respuesta a influencias fisiológicas o mecánicas. A su vez, el remodelado óseo es un proceso que se lleva a cabo durante toda la vida, por el cual el hueso se renueva constantemente para mantener la fuerza ósea y la homeostasis mineral¹⁹.

La finalidad del remodelado óseo es remover el hueso viejo o dañado y reemplazarlo por tejido nuevo. Este proceso se lleva a cabo normalmente de manera azarosa, sin embargo, se tiene especial preferencia por lugares donde se ha presentado un daño en el tejido óseo. El remodelado óseo presenta un máximo de actividad en la edad madura y comienza a disminuir con el envejecimiento. De manera particular, en mujeres que han llegado a la etapa de menopausia, el proceso de remodelado óseo sufre alteraciones como consecuencia a los cambios en los niveles de estrógenos¹⁹.

Las células especializadas involucradas en el proceso del remodelado óseo son los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. Sus principales funciones se enfocan en la reabsorción del hueso viejo, su reemplazo por una matriz ósea recién sintetizada y la subsiguiente mineralización formando hueso nuevo^{19,20}.

1.2.1. Osteoblastos

Los osteoblastos son células que derivan de células madres mesenquimales (*MSC*, del inglés *mesenchymal stem cells*) multipotenciales localizadas principalmente en la médula ósea. La multipotencialidad se refiere a la capacidad de una célula para dar origen a distintos tipos celulares en un mismo tejido, entre ellos los osteoblastos²¹. Los osteoblastos

están ubicados en la superficie externa del tejido óseo y su función principal es la formación de hueso mediante la secreción de “osteoides” que no es más que matriz orgánica no mineralizada²².

Los marcadores de osteoblastos son principalmente el colágeno tipo I que expresan durante su proliferación y la fosfatasa alcalina que expresan durante la producción y maduración de la matriz ósea²³.

1.2.2. Osteocitos

Los osteocitos son osteoblastos totalmente diferenciados que se localizan dentro del hueso mineralizado. Estos son capaces de soportar la estructura ósea y el metabolismo; expresan proteínas que favorecen la adhesión intercelular y regulan el intercambio de minerales en el fluido óseo¹⁹.

Los osteocitos se mantienen comunicados entre sí y con el hueso tanto metabólicamente como eléctricamente a través de proteínas celulares llamadas conexinas, las cuales mantienen esa comunicación necesaria para la maduración, actividad y supervivencia. Los osteocitos pueden vivir durante décadas en el hueso humano que no es dañado¹⁹.

1.2.3. Osteoclastos

Los osteoclastos tienen un progenitor hematológico mieloide multipotencial que da lugar a precursores del linaje monocito-dendrítico-macrófago. De acuerdo al órgano blanco al que llegan estas células, definen sus características y funciones. Cuando estas células se dirigen hacia el tejido óseo, reciben los estímulos necesarios para su diferenciación a osteoclastos²⁴.

Los osteoclastos son células grandes multinucleadas capaces de unirse a la superficie del hueso para digerir la matriz calcificada disolviendo sus minerales, así como el colágeno dejando poros en la superficie del hueso. Estas células están en pocas cantidades en el hueso pues comprenden solo 1-2% de las células óseas²⁴.

Para su diferenciación, las células de origen mieloide requieren del estímulo del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (*RANKL*, del inglés *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (*M-CSF*, del inglés *macrophage colony-stimulating factor*), dos citocinas que producen principalmente las

células estromales de la médula ósea (células no sanguíneas de la medula ósea) y los osteoblastos. La molécula *RANKL* es fundamental para la diferenciación de osteoclastos. Mientras que el factor *M-CSF* es necesario para la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células precursoras de osteoclastos¹⁹.

1.2.4. Remodelado óseo

El remodelado óseo es un proceso complejo que tiene como resultado la renovación del hueso viejo o dañado, por ello, es un proceso necesario para mantener la resistencia del hueso, anualmente se renueva un aproximado del 10% del esqueleto²⁵.

Este proceso se lleva a cabo principalmente por los osteoclastos y los osteoblastos, operando de manera coordinada en tiempo y espacio, además de hacerlo con una eficiencia similar, ya que la cantidad de hueso desechada por los osteoclastos debe ser similar a la formada por los osteoblastos para mantener un balance²⁵.

Aun no se conoce con exactitud como se desencadena el proceso del remodelado óseo, sin embargo, se piensa que los osteocitos tienen un papel importante marcando el lugar en donde este proceso debe llevarse a cabo. Una hipótesis plantea la idea de que la apoptosis de los osteocitos es la responsable de desencadenar este proceso basándose en el hallazgo de osteocitos apoptóticos en las proximidades de microfracturas²⁵.

El inicio del remodelado óseo implica el reclutamiento y activación de los precursores circulantes mononucleares de osteoclastos, el desprendimiento de las células de revestimiento de la superficie ósea y la fusión de múltiples células mononucleares para formar los osteoclastos multinucleados^{19,25}.

Los osteoclastos se unen a la matriz ósea polarizándose, formando una estructura llamada ribete en cepillo, mediante sus receptores de integrina localizados en su membrana²⁴. Esta interacción es importante pues de ella depende la reabsorción ósea ya que una vez que interaccionan los osteoclastos con la matriz ósea secretan iones de hidrógeno y proteasas como la catepsina, que permiten la degradación de los minerales y componentes proteicos de la matriz ósea¹⁹.

La superficie de adsorción se prepara entonces para la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos, los cuales regeneran la matriz ósea, la cual después se

mineraliza diferenciando los osteoblastos en osteoide restableciendo así el hueso dañado (Figura 3)^{19,25}.

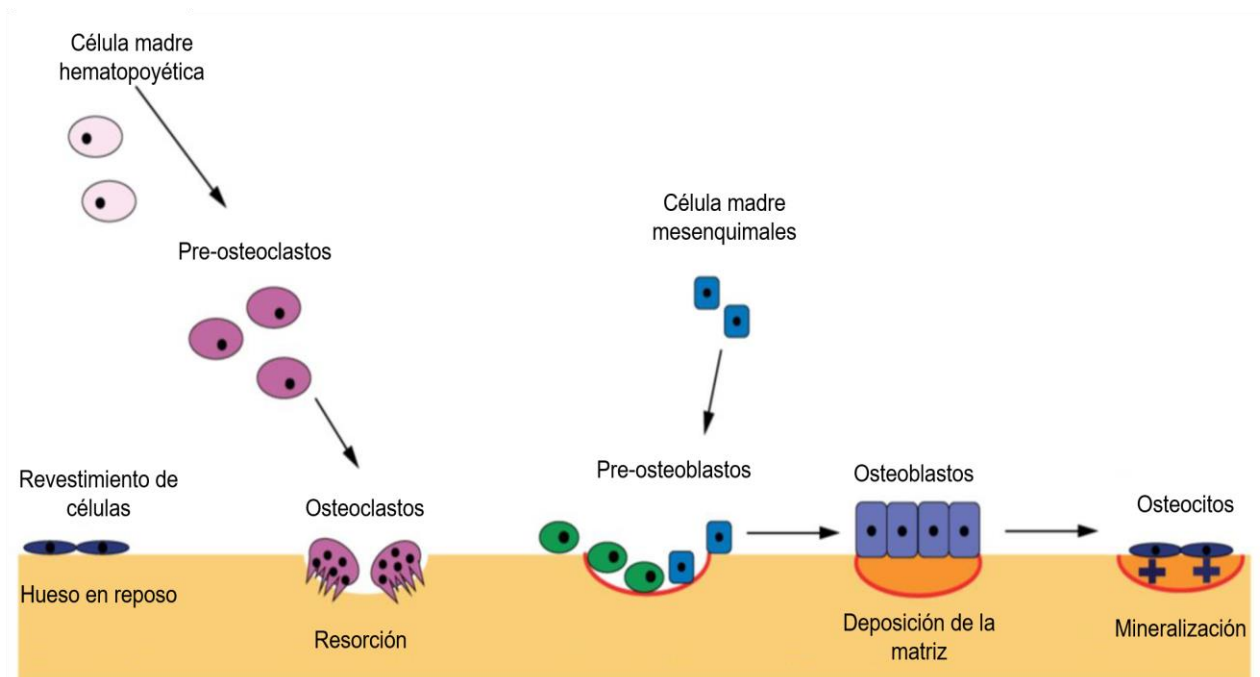


Figura 3. Remodelado óseo. El remodelado óseo es un proceso que comienza con la reabsorción del hueso por osteoclastos, seguido de la formación de hueso por los osteoblastos los cuales se diferencian a osteocitos quienes finalmente le dan soporte al hueso. Modificado de Ge, D. et al. 2017, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*²⁶.

1.3. Diferenciación de osteoclastos

La diferenciación de osteoclastos es un proceso conocido como osteoclastogénesis, este proceso es desencadenado principalmente por los osteoblastos quienes secretan factores que estimulan las fases iniciales del proceso como *RANKL*. Esta molécula pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (*TNF*) y se une al receptor activador para el factor nuclear κ B (*RANK*, del inglés *receptor activator of nuclear factor kappa-B*) presente en la membrana de los precursores osteoclásticos induciendo las señales que promueven la diferenciación a osteoclastos²⁵.

El receptor *RANK* carece de actividad enzimática propia en su dominio intracelular, así que tras su unión con *RANKL* la parte citoplasmática de *RANK* interacciona con el factor asociado con el receptor del factor de necrosis tumoral 6 (*TRAF6*, del inglés *tumor necrosis factor receptor-associated factors 6*). Esta unión induce la trimerización de *TRAF6*,

estimulando la activación de varias vías en la diferenciación de osteoclastos, entre ellas las vías de la cinasa c-jun NH₂-terminal (*JNK*, del inglés *c-Jun NH₂-terminal kinase*) y la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*NF-κB*, del inglés *nuclear factor immunoglobulin kappa chain enhancer B cell transcription*)^{25,27}.

La vía *NF-κB* implica su traslocación del citoplasma al núcleo liberándolo de los complejos que forman las cinasas de los inhibidores de IκB (*IKK*) que lo retienen inactivo en el citoplasma, mientras que la vía *JNK* promueve la formación y activación del complejo AP-1 formado por c-Fos y c-Jun. Ambas vías inducen la expresión del factor nuclear de células T activadas 1 (*NFATc1*). El factor nuclear *NFATc1* es una proteína citoplásmica que debe ser trasladada al núcleo para su activación, para este proceso se necesita altos niveles de calcio que lo desfosforilen promoviendo su traslocación al núcleo en donde su activación es importante debido a que induce la expresión de genes implicados en la osteoclastogénesis (Figura 4)^{25,28}.

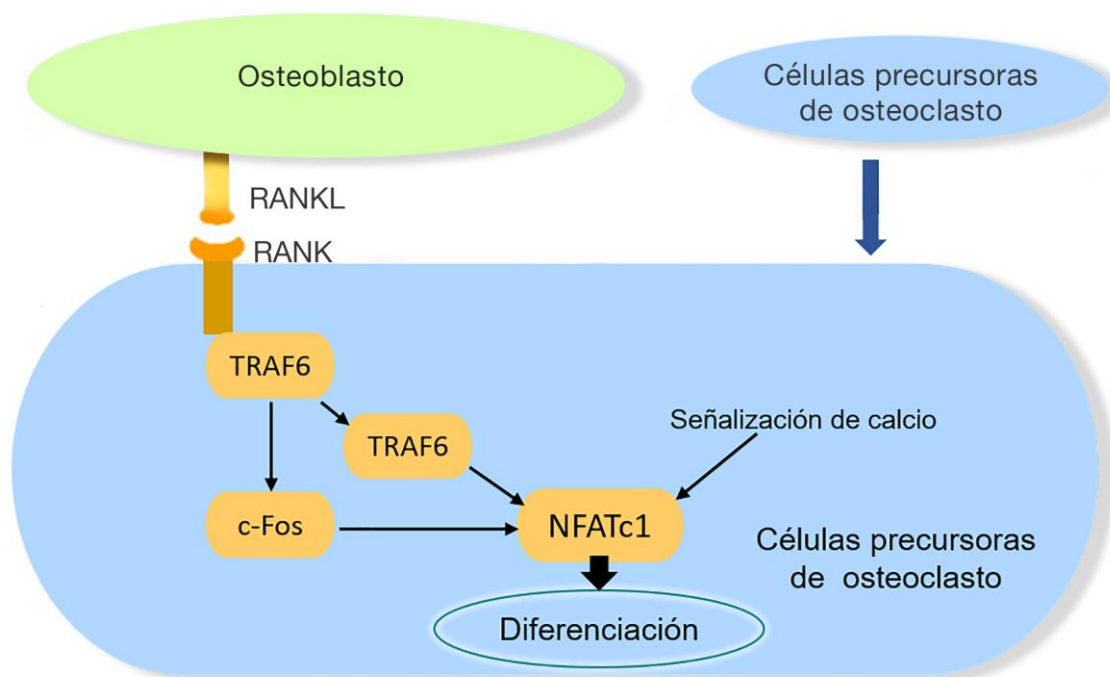


Figura 4. Diferenciación de osteoclastos por las vías *JNK* y *NF-κB*. Este proceso es inducido por los osteoblastos a partir de la expresión de *RANKL* induciendo la expresión de las vías *JNK* y *NF-κB* que llevan a la expresión de *NFATc1* un factor importante para el proceso de diferenciación. Modificado de Asagiri, M. et al.2007, *Bone*²⁷.

1.3.1. Papel de los factores de transcripción *NFATc1* y *MAFB* en el metabolismo óseo

La familia de los factores nucleares de células T activadas (*NFATc*) fueron identificados primeramente en las células T, esta familia está formada por cinco miembros (*NFATc1-NFATc5*). El factor nuclear de células T activadas 1 (*NFATc1*) es ampliamente expresado por diferentes tipos de células, entre ellas los osteoclastos.

El gen que codifica para el factor nuclear *NFATc1* es fundamental para la diferenciación de osteoclastos; sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares por los cuales promueve de manera positiva la diferenciación de los osteoclastos. Además, juega un papel importante para regular la migración y adhesión de los osteoclastos a la superficie del hueso a través de la expresión de genes como la integrina. Regula también la acidificación y la degradación de la matriz ósea a través de la regulación positiva de la expresión de la proteína catepsina²⁹.

Por su parte, el oncogén homólogo de fibrosarcoma musculoponeurótico v-maf B (*MAFB*, del inglés *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*) es miembro de la familia de factores transcripción *MAF*. El factor *MAFB* se expresa solo en monocitos y macrófagos y desempeña un papel importante en la regulación del linaje de la hematopoyesis³⁰.

De acuerdo a un estudio realizado por *Kabsun Kim* publicado en 2007 en la revista *American Society of Hematology* se demostró que *MAFB* regula negativamente la diferenciación de osteoclastos inducida por *RANKL* al interferir con los dominios de unión al ácido desoxirribonucleico (DNA) de los factores de transcripción asociados a la osteoclastogénesis, entre ellos *c-Fos*, inhibiendo la transactivación de *NFATc1*. Se ha propuesto un modelo en el que *MAFB* interactúa con *c-Fos* impidiendo que se una a la región promotora de *NFATc1* atenuando su expresión (Figura 5). Sin embargo, durante la osteoclastogénesis la estimulación por *RANKL* reduce la expresión de *MAFB* permitiendo que *c-Fos* promuevan la expresión de *NFATc1* y por tanto la diferenciación de osteoclastos³¹.

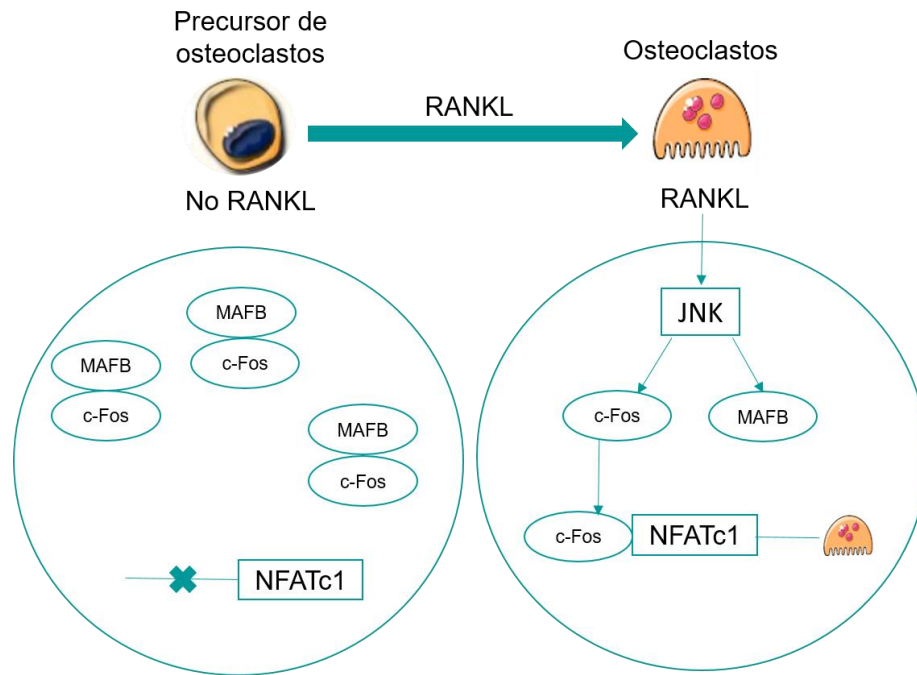


Figura 5. Relación *NFATc1* y *MAFB* en la diferenciación de osteoclastos. La figura describe como la unión de *MAFB* a *c-Fos* cuando *RANKL* no se encuentra, impide la expresión de *NFATc1* y como consecuencia la diferenciación de osteoclastos. Modificado de Kim, K. et al. 2006, *The American Society of Hematology*³¹.

1.4. Osteoporosis

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió a la osteoporosis (OP) como “una enfermedad sistémica, caracterizada por una disminución de la masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo que incrementa la fragilidad del mismo, con el consecuente aumento del riesgo de fractura”³².

La osteoporosis en México es un problema de salud pública, su consecuencia más común es la fractura del hueso sobre todo en personas mayores de 50 años. Las fracturas más comunes son las fracturas vertebrales las cuales de acuerdo a las estadísticas en México su prevalencia es de 19.2% en mujeres y 9.7% en hombres. Otra de las fracturas comunes es la fractura de cadera, el riesgo de sufrir esta fractura es de 1 en cada 12 mujeres y 1 en cada 20 hombres en México después de los 50 años. Sin embargo, es limitada la información acerca de la incidencia de otras fracturas que no requieren hospitalización, como la fractura de muñeca^{33,34}.

Con el aumento de la esperanza de vida también aumenta el número de personas de la tercera edad, por lo que se estima que se incremente el número de fracturas para el año 2050³³.

Además de los gastos económicos que conlleva la enfermedad, está también presente el daño emocional a la persona, dependiendo de la fractura que se origine es la gravedad del daño. Por ejemplo, la fractura vertebral es de las más comunes y de las que mayor impacto tiene en la calidad de vida de los pacientes, disminuyendo su capacidad física, por lo que éstos pacientes se hacen dependientes de otras personas lo que les llega a afectar en su estabilidad emocional desarrollando ansiedad, pánico, problemas para dormir, depresión, mal humor, pérdida de apetito entre otras afecciones³⁴. En cuanto a los gastos económicos en México durante el año 2006 se gastaron 97 millones de dólares simplemente en la atención de fracturas de cadera³³.

Existen dos tipos de osteoporosis, la osteoporosis primaria clasificada en dos tipos, el tipo I llamada también posmenopáusica y la osteoporosis senil o tipo II; y la osteoporosis secundaria que se da como consecuencia de otras enfermedades. La absorciometría con rayos X (DEXA) es la herramienta más utilizada para el diagnóstico de esta enfermedad, utilizando además marcadores séricos para evaluar el recambio óseo, fosfatasa alcalina ósea (FAO), osteocalcina (OC) y propéptido N-terminal del protocolo tipo I (PINP)²⁰.

1.5. Los miRNAs en el metabolismo óseo

Existe evidencia que demuestra que los miRNAs regulan varios eventos del desarrollo y homeostasis celular. Uno de los eventos en los que se ha demostrado que están relacionados es el metabolismo óseo y lo hacen mediante la regulación de la proliferación y diferenciación de osteoblastos y osteoclastos, células especializadas del remodelado óseo. A la fecha, es mayor el número de miRNAs que se conocen que regulan a los osteoblastos, es por esto que los miRNAs pueden jugar un papel importante en la osteoporosis y sobre todo porque pueden ser empleados como blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades metabólicas óseas, como la osteoporosis ²⁰. Adicionalmente, los miRNAs también pueden ser usados como biomarcadores en enfermedades, tales como las asociadas con el metabolismo óseo^{35,36}.

Existen diversos estudios que comprueban la manera en como los miRNAs influyen en el metabolismo óseo. Por ejemplo, Inose. H y colaboradores validaron *in vitro* e *in vivo* la disminución de la proteína de unión GAP α -1 (*Cx43*, del inglés *Gap junction alpha-1 protein*) por acción del miR-206, este efecto altera la diferenciación de las células mesenquimales hacia osteoblastos y por ende el metabolismo óseo³⁷. Otro ejemplo es el caso de miRNA-146a, el cual inhibe la osteoclastogénesis induciendo la disminución de la expresión de genes como *TRAF6*, *NFATc1*, entre otros³⁸.

1.5.1. *hsa*-miR-548

Nuestro grupo de trabajo, ha demostrado que existe una sobreexpresión de algunos miRNAs en monocitos de sangre periférica de mujeres con osteoporosis³⁹. Entre ellos, hemos prestado principal interés en el miR-548x-3p. Este miRNA es miembro de la familia miR-548, los genes *MIR-548* son específicos de primates y tienen muchos parálogos potenciales en el genoma humano, al día de hoy se han estimado más de 3,500 posibles genes blanco para los miembros de ésta familia de microRNAs⁴⁰.

Se ha relacionado a los miembros de la familia *hsa*-miR-548 como participantes importantes en la regulación de múltiples procesos biológicos, ya que éstos se encuentran sub o sobreexpresados en ciertas patologías, como lo son parto prematuro (miR-548a, miR-548ai, miR-548aa, miR-548ak, miR-548n⁴¹), osteosarcoma (miR-548c-3p⁴²), remodelado de matriz de tendones (miR-548j-5p⁴³), promoviendo la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (miR-548d-5p⁴⁴) y la inflamación en respuesta a procesos virales (miR-548g-3p⁴⁵) (miR-548b-5p, miR-548c-5p, miR-548i, miR-548j y miR-548n⁴⁶). También se han encontrado expresados en el sistema nervioso central (miR-548b-5p, miR-548c-5p), en células del sistema inmune (miR-548b-5p, miR-548c-5p, miR-548i, miR-548j, miR-548n) y en células madre embrionarias (miR-548e, miR-548f, miR-548g-3p, miR-548g-5p, miR-548i, miR-548k, miR-548l, miR-548m, miR-548n, miR-548o-3p, miR-548o-5p, miR-548p)⁴⁷.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los miRNAs son RNA pequeños no codificantes capaces de regular la expresión de genes al unirse por complementariedad a su gen blanco, los cuales están asociados con múltiples procesos biológicos como en el metabolismo óseo donde se ha demostrado una variedad de miRNAs capaces de regular este proceso al modular la expresión de genes relevantes en la diferenciación de las células principales que llevan a cabo el proceso, los osteoclastos y osteoblastos⁴⁸.

Previo a este trabajo, nuestro grupo de investigación identificó la sobreexpresión de los miRNAs; miR-8084, miR-548x-3p y miR-1270 en monocitos de sangre periférica de mujeres postmenopáusicas con osteoporosis. Particularmente, hemos prestado atención en el estudio del papel de miR-548x-3p en la diferenciación de los osteoclastos ya que mediante un análisis bioinformático usando las bases de datos microRNA.org, miRDB, miRWalk v2.0, PITA v5.0 y TargetScan Human v7.0 se predijo que los mRNA *NFATc1* y *MAFB* son blancos potenciales para ser regulados por el miR-548x-3p³⁹.

A pesar de que las herramientas computacionales fueron de utilidad para predecir los posibles genes blanco del miR-548x-3p, estos genes candidatos deben validarse experimentalmente para corroborar experimentalmente las predicciones.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar funcionalmente el papel del miR-548x-3p en la regulación de los genes *MAFB* y *NFATc1*.

3.2 Objetivos particulares

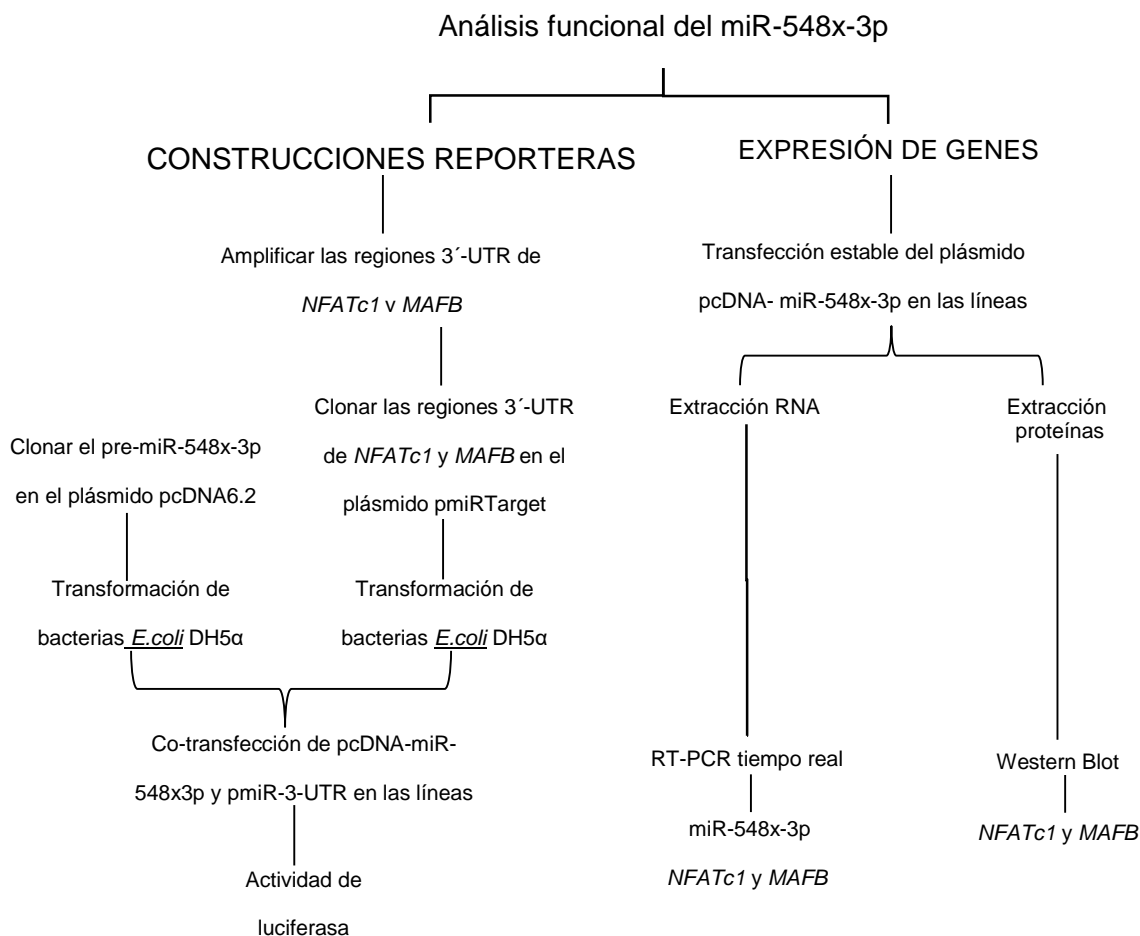
- Amplificar y clonar las regiones 3' no traducidas (3'-UTR) del mRNA de los genes blanco *NFATc1* y *MAFB* en el vector plasmídico pmiR-Target.
- Evaluar la unión de miR-548x-3p a las regiones 3'-UTR de los mRNA de *MAFB* y *NFATc1*, mediante la actividad del reportero de luciferasa.
- Sobreexpresar de manera estable el miR-548x-3p en las líneas celulares Saos-2 y U2OS para analizar el efecto de la sobreexpresión del miR-548x-3p sobre la expresión de los mRNA así como de las proteínas de los genes *NFATc1* y *MAFB* mediante RT-qPCR y Western-Blot, respectivamente.

4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión de miR-548x-3p disminuirá los niveles de expresión de los mRNA y proteínas de los genes *NFATc1* y *MAFB*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en dos etapas, las cuales se muestran en el siguiente diagrama y se describen a continuación:



5.1. Construcción de vectores reporteros

5.1.1. Amplificación de regiones 3'-UTR de *MAFB* y *NFATc1*

Para la amplificación de las regiones 3'-UTR de los genes de interés se usó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una reacción enzimática que sirve para amplificar millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es fielmente copiada.

Se realizaron 5 reacciones de 50 µL cada una, tanto para el fragmento de 3'-UTR de *MAFB* como de *NFATc1*, usando el kit para PCR de *Applied Biosystems* (Cat. No 4311820). Se emplearon los siguientes reactivos y concentraciones: amortiguador para PCR 1X, MgCl₂

1.5 mM, dNTPs 200 μ M, oligonucleótidos sentido y antisentido 200 nM (Tabla 1), DNA polimerasa *AmpliTaq Gold* 1U y 1 μ L de DNA genómico humano de un voluntario sano [67.3 ng/ μ L], sustituyendo este último en el control negativo por agua milliQ estéril.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para clonar las regiones de la 3'-UTR del mRNA de *NFATc1* y *MAFB*.

	Gen
Fw 5'-TACGATGCGATCGCACCATCAGGGCATCATAGAA-3'	<i>NFATc1</i>
Rv 5'-TACATGACGCGTGTCTGGCTCTGTTATTATTTA-3'	
Fw 5'-TACGATGCGATCGCTTGGCAAGTAATTTTGCAAC-3'	<i>MAFB</i>
Rv 5'-TACATGACGCGTATCATAAGCAGGGTTTGAAA-3'	

Para cada reacción se utilizó el perfil térmico descrito en la Tabla 2. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *Gene Amp PCR System 9700* de *Applied Biosystems*:

Tabla 2. Condiciones de amplificación de PCR punto final.

Número de ciclos	Tiempo (min:s)	Temperatura (°C)
1	10:00	94
30	0:45	94
	1:00	55
	1:00	72
1	10:00	72
1	∞	4

Posteriormente, el producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa al 1% cargando 5 μ L de la reacción mezclados con 1 μ L de amortiguador de carga (*Loading dye* 6X) y 3 μ L de *Gel Red Nucleic Acid Stain* 3X (*BIOTIUM*); tanto para las reacciones como para los controles negativos. En cada gel se cargaron 5 μ L del marcador de peso molecular *GeneRuler Ladder* 1 Kb plus (*Fermentas*), los geles se corrieron en una cámara *Power Pac HC* (*BioRad*) usando amortiguador TAE 1X (Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) durante 40 minutos a 80 V, manteniendo el voltaje constante.

5.1.2. Purificación de los productos de PCR

El producto de cada reacción de PCR se purificó con el kit de purificación para PCR (*QIAGEN*, Cat. No. 28106) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Brevemente; cada reacción se mezcló con cinco volúmenes de la solución PB por un minuto con ayuda de un vortex; la mezcla se colocó en una columna de purificación y se centrifugó a 13,000 rpm por 60 segundos en una centrifuga *Sorvall Legend Micro21R*. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y la columna se lavó con 750 μ L de la solución PE, centrifugando por 1 minuto. Para eluir el producto de PCR la columna se colocó en un microtubo de 1.6 mL y se agregaron 30 μ L de agua milliQ, previamente estéril y filtrada, se dejó reposar la columna a temperatura ambiente por 2 minutos y se volvió a centrifugar recuperando el sobrenadante. El DNA eluido se analizó cargando 1 μ L en un gel de agarosa al 1%, tal y como se describió anteriormente en el punto 5.1.1.

5.1.3. Digestión con enzimas de restricción y purificación de la digestión

Se realizaron reacciones de digestión enzimática usando 30 μ L de producto de PCR purificado de cada uno de los fragmentos de las regiones 3'-UTR de los genes *NFATc1* y *MAFB*, 5 μ L del amortiguador 2.1 10X (*New England Biolabs*, Cat. No. B72025), 10 U (1 μ L) de la enzima MluI (*New England Biolabs*, Cat. R0198L), 10 U (1 μ L) de la enzima AsiSI (*New England Biolabs*, Cat. No. R0630L) y 14 μ L de agua. Las reacciones se incubaron a 37°C por 20 horas en un termobloque *Thermo Stat Plus MP Eppendorf*.

Al mismo tiempo, se realizó la digestión del plásmido pmiR-Target-IRF8 (pmiR-IRF8) (*Origene*, Cat. No. PS100062) para cortar y linealizar la estructura del plásmido usando la estructura del pmiR en la clonación de las regiones 3'-UTR de los genes de interés sustituyendo el gen *IRF8* por cada una de las 3'-UTR. Se usaron las mismas concentraciones del amortiguador 2.1 y enzimas descritos anteriormente, agregando a la reacción 1 μ g de plásmido para una reacción de 50 μ L.

Las reacciones de digestión enzimática se analizaron en un gel de agarosa al 1% cargando 5 μ L de cada reacción junto a las correspondientes muestras sin digerir, así como 5 μ L de marcador de peso molecular *Gene Ruler Ladder 1 Kb plus*, corriendo el gel de agarosa como se describió anteriormente.

Se purificaron las digestiones de las regiones 3'-UTR mediante la técnica descrita en el punto 5.1.2. Por otro lado, el plásmido pmiR-IRF8 digerido se purificó utilizando el kit de extracción de gel (QIAGEN, cat. No.28706) corriendo en un gel de agarosa al 1% toda la reacción de digestión del plásmido con amortiguador *Loading dye* 1X y Gel Red al 1X por 40 minutos a 80 V en la cámara *Power Pac HC* de Bio Rad. Posteriormente, se cortó la banda de alrededor de los 7,000 pb y se colocó en un microtubo de 1.6 mL, se pesó y se le agregaron 200 µL de la solución QC por cada 100 mg de agarosa al tubo, se incubó a 55°C por 10 minutos mezclando al menos 2 veces por inversión, la mezcla se agregó a una columna de 750 µL y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto en una centrífuga *Sorvall Legend Micro21R* desechando el filtrado. Se lavó la columna con 750 µL de la solución QG centrifugando y desechando de nuevo el filtrado, se centrifugó la columna vacía por 2 minutos y posteriormente se colocó en un microtubo de 1.6 mL estéril y etiquetado. Por último, se agregaron 20 µL de agua a la columna y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente se centrifugó la columna recuperando el sobrenadante, el resultado de la purificación se resolvió en un gel de agarosa al 1%.

5.1.4. Ligación

Para la ligación entre los fragmentos de la 3'-UTR y el plásmido pmiR-Target se usó una relación proporcional (1:3) y la siguiente ecuación:

$$\frac{ng(\text{plásmido}) * Kb \text{ inserto}}{Kb \text{ plásmido}} * \left(\frac{3}{1}\right) = ng \text{ de inserto que se necesitan}$$

Esta reacción permite ligar covalentemente los enlaces entre los extremos del pmiR y las 3'-UTR previamente digeridas para formar los plásmidos pmiR-NFATc1 y pmiR-MAFB, estos plásmidos se construyeron colocando 50 ng del plásmido pmiR-Target digerido, 10 ng del fragmento de la 3'-UTR correspondiente, amortiguador de ligación 1X (*Thermo Fisher Scientific*, Cat. No.#B69), 5U de DNA ligasa T4 (*Thermo Fisher Scientific*, Cat.No.EL0011) y 9 µL de agua, dejando la reacción a 16°C durante toda la noche.

5.1.5. Transformación bacteriana con los plásmidos generados

Transformación bacteriana es la técnica que se utilizó para transferir los plásmidos construidos pmiR-NFATc1 y pmiR-MAFB, a las bacterias y así lograr generar múltiples copias de estos plásmidos en bacterias *E.coli*.

Primero se hizo una transformación por electroporación utilizando bacterias electrocompetentes *E.coli* BL21. A una alícuota de 50 μ L de estas bacterias se le colocaron 5 μ L de ligación del plásmido construido incubando en hielo por 20 minutos dando un pulso eléctrico por 5 ms a 1,800 V, de inmediato se colocaron 500 μ L de medio SOC (bacto triptona 1%, extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM y MgSO₄ 20 mM, pH. 7.4) previamente temperado a 37°C. Las bacterias se incubaron a 37°C por 1 hora en agitación moderada, posteriormente, se centrifugaron a 1,500 rpm por 1 minuto desechando el sobrenadante, la pastilla de bacterias se resuspendió en el medio sobrante y se sembró en placas de agar LB (bacto triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM y agar 1.5%, pH. 7.4) con kanamicina 50 μ g/mL (*Sigma Aldrich* Cat. No. 60615-5G) incubando por 16 h a 37°C. Las colonias obtenidas se aislaron y crecieron en caldo LB (bacto triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, pH. 7.4) con kanamicina 50 μ g/mL, incubando a 37°C durante 16 horas en agitación, posteriormente se purificó el plásmido como se menciona en el punto 5.1.6.

Debido a que no se contaba con suficiente material para continuar haciendo transformación por electroporación, se continuó transformando por choque térmico. Para esto, se emplearon 2 μ L del plásmido purificado, en una alícuota de 50 μ L de bacterias quimiocompetentes *E.coli* de la cepa DH5 α incubando en hielo 40 minutos, dando el choque térmico a 42°C por 45 segundos en baño maría, regresando las bacterias a hielo por 5 minutos para después colocarles 500 μ L de medio SOC, incubando 1 hora a 37°C y agitación a 180 rpm para sembrar en placas de agar LB con kanamicina 50 μ g/mL.

5.1.6. Purificación de plásmidos

Una vez que se logró la transformación, se picaron las colonias aisladas y se sembraron en 4 mL de medio LB con kanamicina 50 μ g/mL, se incubaron a 37°C por toda la noche.

Para poder analizar las clonas obtenidas y comprobar que realmente tenían el plásmido este se extrajo de las bacterias como se describe a continuación. Se transfirió 1 mL de los

cultivos a microtubos de 1.6 mL y se centrifugaron a 13,000 rpm 1 minuto decantando el sobrenadante sin despegar la pastilla de bacterias, se repitió el proceso hasta terminar el cultivo. Se resuspendió la pastilla de bacterias en 150 µL de solución P1 (Tris base 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, RNasa A 100 µg/mL), se mezcló por inversión 6 veces con 150 µL de solución P2 (NaOH 0.2 N, dodecilsulfato de sodio 1%) incubando a temperatura ambiente por 5 minutos, se les agregó 150 µL de solución P3 (Acetato de potasio 3 M, pH 5.5) mezclando por inversión 6 veces incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C recuperando el sobrenadante en un tubo limpio agregándole 1.5 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclando por inversión, se dejaron incubando por 20 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante 25 minutos a 4°C desechando el sobrenadante cuidando de no tirar las pastillas. Las pastillas de DNA se lavaron con 750 µL de etanol al 70% frío mezclando por inversión y se volvió a centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante dejando el tubo boca abajo sobre papel absorbente por 5 minutos. Posteriormente, se colocaron los tubos boca arriba incubando por 15 minutos a temperatura ambiente o hasta que los tubos estuvieran completamente secos, por último, se resuspendieron las pastillas de DNA en 50 µL de agua milliQ estéril a temperatura ambiente. Los plásmidos se analizaron en un gel de agarosa como se describió anteriormente en el punto 5.1.1.

5.1.7. Análisis por PCR de colonias candidatas

Se usó la técnica de PCR punto final con los oligonucleótidos específicamente diseñados para los fragmentos de la 3'-UTR para evaluar si las bacterias tenían el plásmido con estos fragmentos. Se realizó una reacción de PCR para cada clona de plásmido obtenida para cada construcción siguiendo el protocolo descrito en el punto 5.1.1., a diferencia de que se usó como templado 1 µL del plásmido correspondiente y la temperatura de alineamiento fue de 60°C. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

Las clonas positivas en el análisis por PCR, se seleccionaron para enviarlas a secuenciar por el método de Sanger en la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

5.1.8. Preparación del plásmido pcDNA-miR-548x-3p

Este plásmido se preparó utilizando el kit BLOCK-It Pol II *miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP* (Invitrogen, Cat. No. K4936-00). Se partió de una reacción de 20 μL que contenía 5 μL de oligonucleótido *TOP* y 5 μL de oligonucleótido *BOTTOM*, correspondientes a la secuencia del pre-miRNA-548x-3p, a una concentración de 200 μM , 2 μL de amortiguador de alineamiento 10X y 8 μL de agua, dejando los oligonucleótidos a una concentración de 50 μM , la cual se incubó a 95°C 4 minutos. Se dejó reposar a temperatura ambiente 30 minutos; a partir de esa reacción se hizo otra dilución de oligonucleótidos a 500 nM en 100 μL utilizando agua para finalmente hacer otra dilución de oligonucleótidos a 10 nM, para la cual se usó 1 μL de la dilución anterior, 5 μL de amortiguador de alineamiento de oligonucleótidos 10X aforando con agua a un volumen de 50 μL . Posteriormente se hizo un gel de agarosa al 4% para observar la hibridación de los oligonucleótidos, tomando como control negativo cada uno de los oligonucleótidos *TOP* y *BOTTOM* a una concentración de 1 μM partiendo de la concentración inicial de 200 μM , amortiguador de carga 1X y *Gel Red* al 1X.

Posteriormente, se hizo una ligación como se describió en el punto 5.1.4., a diferencia de que usó 1 μL del plásmido pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR (5 ng/ μL) linearizado y 4 μL de la reacción de oligonucleótidos de doble cadena 10 nM, dejando esta reacción a 16°C por toda una noche.

Al día siguiente se transformaron bacterias quimiocompetentes dando el choque térmico a 42°C durante 45 segundos, sembrando en placas de agar LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*Sigma Aldrich* Cat. No. A9518-5G Lot. 124M4759V), posteriormente se extrajo el plásmido como se describió en el punto 5.1.6. y se hizo un gel de agarosa como se describió anteriormente.

5.1.9. Midipreps

Para esto se usó el kit de *QIAGEN* (Cat. No. 12143), se dejaron cultivos de 250 mL de las clonas seleccionadas con los plásmidos pmiR-NFATc1, pmiR-MAFB y pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-548x-3p (pcDNA-miR-548x-3p) durante toda una noche en agitación a 37°C.

Se transfirieron los cultivos a tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 6,000 rpm por 15 minutos a 4°C, repitiendo este procedimiento hasta agotar el cultivo total, se resuspendió la pastilla formada en 4 mL de amortiguador P1, se mezcló con 4 mL de amortiguador P2 por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado este tiempo se agregaron 4 mL de amortiguador P3 mezclando nuevamente e incubando en hielo por 15 minutos, después se centrifugaron los tubos a 8,500 rpm durante 45 minutos a 4°C. Se equilibró una columna de purificación con 4 mL de la solución QBT dejando que todo este saliera de la columna por gravedad, entonces se colocó el sobrenadante de la centrifugación y se dejó que fluyera por gravedad a través de la columna. Posteriormente, las columnas se lavaron dos veces con 10 mL de la solución QC, después se eluyó el DNA con 5 mL de la solución QF en un tubo cónico de 15 mL. El DNA se precipitó agregando 3.5 mL de isopropanol frío y se dejó a -20°C toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó el contenido de los tubos cónicos de 15 mL dividiéndolo en microtubos de 1.6 mL a 13,000 rpm 4°C por 30 minutos, se les retiró el sobrenadante y se lavaron las pastillas de DNA con 750 µL de etanol al 75%, se volvió a centrifugar a 13,000 rpm 10 minutos a 4°C retirando de nuevo el sobrenadante. El DNA se dejó secar durante 5 minutos dejando el tubo boca abajo en papel absorbente y boca arriba hasta que se secase por completo, por último, se resuspendió el DNA de cada tubo en 50 µL de agua para finalmente juntarlos en un solo tubo. El DNA se cuantificó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.1.10. Cultivo celular

Se usaron las líneas celulares Saos-2 y U2OS derivadas de osteosarcoma, en condiciones estériles usando una campana de flujo laminar. Se descongelaron las líneas celulares y se sembraron en cajas de cultivo (*Nest Biotechnonology*, Cat.No. 704001), las células se mantuvieron con medio *McCoy's* (*Sigma*, Cat. No. M4892-10L) suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (*Biowest*, Cat. No. 5165H-500). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%.

Para propagar las células se retiró el medio *McCoy's* de las cajas con una pipeta Pasteur y vacío, se lavaron las cajas de cultivo con 5 mL de solución salina balanceada de *Dulbecco* (*Gibco*, No.Ref.21300-025) colocado suavemente por las paredes de las cajas, se retiró el medio y se agregó 1 mL de Tripsina-EDTA al 0.5% (*Gibco*, No. Ref.15400-054).

Se dejaron incubando las cajas 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂ para después despegar las células con ayuda de una micropipeta, se juntaron las suspensiones celulares en tubos cónicos agregando 200 µL de FBS, centrifugando los tubos a 1,200 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante con ayuda de vacío y se resuspendió el botón en medio *McCoy's* para colocarlas en cajas Petri, todo en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

Para respaldar las líneas celulares se fueron congelando viales, para esto el botón después de centrifugar se resuspendió en 900 µL de FBS y dimetilsulfóxido al 10% (*AppliChem*, Cat. No. A3672), y se almacenaron en nitrógeno líquido.

5.1.11. Transfección de las células U2OS y Saos-2

Esta técnica permitió la introducción de los plásmidos construidos pmiR-NFATc1 en las células U2OS y Saos-2. El día previo a la transfección se sembraron por triplicado para cada plásmido a usar, 500,000 células en un formato de 12 pozos. Para esto, placas con las células en crecimiento fueron tratadas con tripsina-EDTA al 1X 0.5% para despegar las células de la superficie, se centrifugaron a 1,200 rpm durante 10 minutos. La pastilla de células se resuspendió en 5 mL de PBS 1X, a partir de esta suspensión se hizo una dilución 1:10 con PBS 1X, finalmente se hizo otra dilución 1:2 con azul tripano (*Sigma*, T8154), 10 µL de esta última dilución se colocaron en una cámara de Neubauer, en donde se contaron los 4 cuadrantes y se hizo un promedio el cual se coloca en la siguiente fórmula para conocer el número de células por mililitro:

$$\frac{\#células}{mL} = \text{promedio cuadrantes} * \text{factor de dilución} * 10000$$

El día de la transfección se prepararon dos tubos, ambos con 300 µL de medio *Opti-MEM* (*Gibco*, No. Ref 31985-070, Lot:1929947) por cada pozo a transfectar, se hizo una transfección por triplicado; al tubo A se le agregaron 2 µg del plásmido construido pmiR-NFATc1 por cada pozo a transfectar y el tubo B con 6 µL de lipofectamina (*Invitrogen*, Lot. 1793394) por cada pozo a transfectar, se mezclaron los tubos y se dejaron incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se colocó el contenido del tubo A en el tubo B, se mezclaron e incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Poco antes de finalizar este tiempo se retiró el medio de cultivo de la placa de 12 pozos y se lavaron los pozos con 5 mL de PBS 1X, agregando a cada pozo 300 µL de medio *McCoy's* sin antibiótico ni FBS, una vez pasados los 30 minutos se colocó la mezcla de los tubos en los

pozos previamente preparados con las líneas celulares Saos-2 y U2OS por goteo, se dejaron incubando las placas a 37°C, durante 24 horas. El medio se retiró a las 24 horas y se sustituyó por medio *McCoy's* con antibiótico y FBS.

Aparte, se prepararon dos cajas de cultivo de 100 mm de diámetro una de cada línea celular, con 6,000,000 de células, para transfectar tal y como se describió únicamente con el pcDNA-miR-548x-3p, estas células se propagaron para hacer estable al pcDNA-miR-548x-3p, se seleccionaron las células con el plásmido agregando 10 µL de blasticidina 10 mg/mL.

5.1.12. Ensayo luciferasa

Esta técnica fue de utilidad para observar los cambios en la expresión de un gen de acuerdo a la expresión del gen reportero luciferasa, estos cambios se pueden observar debido a que la reacción de oxidación que cataliza la luciferasa emite luminiscencia.

Los extractos celulares se cosecharon 72 horas después de la transfección usando el kit *Dual-Light System* de *Applied Biosystems* (Cat. No. T1004). Brevemente, se lavaron dos veces cada uno de los pozos con PBS, se les agregó 80 µL de solución de lisis *Tropix* (Cat. No. T2074, Lote 1505098) y se rasparon con un gendarme para despegar las células de los pozos, se colectaron los extractos de cada pozo en un microtubo de 1.6 mL, se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm por 5 minutos, finalmente se colectaron los sobrenadantes en otro microtubo de 1.6 mL y se congelaron a -80 °C.

Para la lectura de luciferasa se utilizó el reactivo A (Cat. No. T2176 Lote: 2934C456), B (Cat. No. T2238 Lote: 0194C346) y el *Tropix Accelerator II* (Cat. No. T2074 Lote: 1505098), se tomaron 10 µL de los extractos de luciferasa y se colocaron en un microtubo de 1.6 mL se les agregó 25 µL del reactivo A se dejó reposar 10 minutos, pasando el tiempo se les colocó 100 µL del reactivo B y de inmediato se comenzó leer en el luminómetro, esta primera lectura corresponde a la de la luciferasa de luciérnaga. Se dejan los tubos reposando 30 minutos para después colocar 100 µL del *Tropix Accelerator II*, se vuelven a leer los tubos en el luminómetro y se desechan los tubos, esta segunda lectura corresponda a la de la β-galactosidasa.

5.2. Expresión de genes

5.2.1. Extracción de RNA

Para esto se usó el reactivo de TRizol, una solución de fenol e isotiocianato de guanidina en donde se solubiliza el material biológico y desnaturaliza la proteína formando dos fases, dejando al RNA en la fase acuosa, a partir de la cual se extrae y purifica.

Se retiró el medio *McCoy*'s de las placas de cultivo, tanto de las líneas celulares U2OS y Saos-2 como de las líneas celulares con el miR-548x-3p ya estable y seleccionadas, las células U2OS-miR-548x-3p y Saos-2-miR-548x-3p. Se lavaron las placas 3 veces con PBS 1X retirando el medio de lavado; se agregaron 750 μ L de reactivo TRizol de *Ambion* (No. Ref 10296028) y con ayuda de un gendarme se despegaron las células. La suspensión se colectó en un microtubo de 1.6 mL incubando 5 minutos a temperatura ambiente, agregando 300 μ L de cloroformo, se mezclaron en vortex por 20 segundos y se volvieron a incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 minutos, colectando la fase acuosa en un microtubo de 1.6 mL agregando 1 volumen de isopropanol frío incubando por 5 minutos a -20°C y se volvieron a centrifugar a 13,000 rpm durante 20 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de RNA con 750 μ L de etanol frío al 75% se volvieron a centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm decantando el sobrenadante dejando el tubo boca abajo sobre papel absorbente por 1 minuto. Se voltearon los tubos y se dejaron incubar hasta dejar secar por completo la pastilla, finalmente la pastilla se resuspendió en 50 μ L de agua milliQ estéril y filtrada. El RNA se resolvió en un gel de agarosa al 0.8% en la cámara *Power Pac HC* de BIORAD previamente tratada con NaOH 0.5 N, los extractos de RNA se almacenaron a -70°C .

5.2.2. RT-PCR para analizar la expresión de miR-548x-3p

Para la retrotranscripción se usó el kit para RT-PCR *TaqManTM MicroRNA* de *Applied Biosystems* (Num. part. 4366596). Se hicieron reacciones de 15 μ L utilizando los reactivos como lo indica el fabricante 0.15 μ L dNTPs, 1 μ L de transcriptasa reversa *MultiScribe*, 1.5 μ L de amortiguador de transcripción reversa, 0.19 μ L de inhibidor de RNasa, 4.16 μ L de agua estéril y filtrada para 7 μ L, complementando las reacciones individualmente con 3 μ L de oligonucleótidos específicos para miR548x-3p y 1 μ g de RNA de las células

transfectadas y sin transfectar de ambas líneas celulares. Se utilizó un termociclador utilizando las siguientes condiciones descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Perfil térmico de la RT para miR-548x-3p.

Ciclos	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	30	16
1	30	42
1	5	85
1	∞	4

Se cuantificó el cDNA resultante de las reacciones en un Nanodrop (*Thermo Scientific Nanodrop 2000*), para hacer diluciones de 100 µL a una concentración de 100 ng/ µL.

Para la PCR se hicieron reacciones de 12.5 µL utilizando el kit *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Cat. No. 4318157) utilizando los reactivos a las siguientes concentraciones *Master Mix* 1X, sondas *TaqMan* para el miR-548x-3p y el U6 como normalizador al 0.5X, agua y por pozo 2 µL de cDNA [200 ng] en un formato de 96 pozos utilizando placas *microAmp Optical Adhesive Film* de *Applied Biosystems* (P/N:4311971) utilizando el equipo de *Applied Biosystem Quant Studio 7 Flex*, siguiendo el siguiente perfil térmico (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil térmico para la PCR miR-548x-3p.

Ciclos	Tiempo (min:s)	Temperatura (°C)
1	2:00	50
1	10:00	95
40	0:15	95
	1:00	60

5.2.3. RT-PCR para analizar los genes blanco

Para la retrotranscripción se usó el kit de *Applied Biosystems* (Cat. No. N8080234). Se hicieron reacciones de 20 µL utilizando los reactivos a las siguientes concentraciones amortiguador RT 1X, dNTPs 0.5 mM, 2U de inhibidor de RNasa, RT *MultiScribe* 1 U/ µL, Oligo d(T) 16´ 2.5 µM, MgCl₂ 1.75 µM, agua previamente filtrada y esterilizada y 2 µL de RNA por muestra, la transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador utilizando las siguientes condiciones (Tabla 5).

Tabla 5. Perfil térmico de la RT para evaluar la expresión de los genes blanco.

Ciclos	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	5	65
1	2	4
1	30	37
1	5	95
	∞	4

Para la PCR se hicieron reacciones de 12.5 μ L utilizando el kit *SYBR Select Master Mix* de *Applied Biosystems* (Cat. No. 4472897) utilizando los reactivos a las siguientes concentraciones Master mix 1X, oligonucleótidos específicos 200 nM, agua y por pozo 2 μ L de cDNA [200 ng] en un formato de 96 pozos utilizando placas *microAmp Optical Adhesive Film* de *Applied Biosystems* (P/N:4311971) utilizando el equipo de *Applied BiosystemS Quant Studio 7 Flex*, siguiendo el siguiente perfil térmico (Tabla 6).

Tabla 6. Perfil térmico para la PCR, genes blanco.

Ciclos	Tiempo (min:s)	Temperatura (°C)
1	2:00	50
1	10:00	95
40	0:15	95
	1:00	60

A la par se realizó una curva de disociación la cual se construyó con el siguiente perfil térmico (Tabla 7).

Tabla 7. Perfil térmico para la curva de disociación de genes blanco.

Tiempo (min:s)	Temperatura (°C)
00:15	95
1:00	60
00:15	95°

5.2.4. Extracción de proteínas totales

Las proteínas se extrajeron con el amortiguador de lisis RIPA formado por detergentes iónicos y no iónicos que rompen la membrana celular por la interacción de los detergentes con los lípidos de la membrana solubilizando así las proteínas.

En hielo, se lavaron con 5 mL de PBS 1X cada una de las cajas con las líneas celulares Saos-2 y U2OS se desechó el medio y se agregaron 1,000 μ L de amortiguador de lisis

RIPA 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, Triton X-100 0.1%, deoxicolato de sodio 0.5%, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1%, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro sódico 1 mM, Inhibidores de proteasas) de *Millipore* (Cat. 20-188, Lot. No. 2811997) a la primer caja, preparado previamente con inhibidor de proteasas, se raspó la caja para despegar las células con un gendarme (No.710001) y se trasladó la suspensión sucesivamente a 5 cajas totales, se recolectó la suspensión total en un microtubo rompiendo las membranas celulares mecánicamente con una jeringa de 1 mL. El lisado celular se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm a 4°C, recuperando el sobrenadante en alícuotas de 50 µL almacenadas a -70°C.

5.2.5. Cuantificación de proteínas de extractos celulares

Los extractos de las proteínas de las células U2OS-miR-548x-3p y Saos-2--miR-548x-3p se diluyeron 1:30 y 1:500 respectivamente en agua.

Se utilizó Albúmina de Suero de Bovino (BSA, de *Sigma-Aldrich* A9647, CAS No. 9048-46-8) como patrón primario para construir una curva patrón con las concentraciones de la Tabla 8 partiendo de una concentración inicial de 2 mg/mL utilizando como diluyente el *RIPA* diluido 1:60.

Tabla 8. Concentraciones de BSA para la curva patrón

BSA (µg/mL)
0
2.5
5
10
15
20
25

Se leyó por triplicado cada punto de la curva, así como cada muestra, para esto, se usó una placa de 96 pozos colocando 150 µL de cada concentración seguida de 150 µL del reactivo de *Bradford* de *Thermo Scientific* (Cat. No. 23200) y después de 5 minutos se leyó la placa a una longitud de onda de 595 nm en un equipo Epoch de *BioTek*.

Para ver la integridad de las proteínas se hizo un gel de poliacrilamida al 10%, cargando 20, 30 y 50 µg de cada extracto con amortiguador de carga 1X (SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.004%, Tris-HCl 0.125 M pH. 8.0). Previo a la carga de las muestras, se dejaron las mezclas 5 minutos a 99°C en el termobloque y se centrifugaron 10 segundos en una microfuga, se dejó correr el gel en una cámara de *Bio-Rad* (modelo 10025025 Rev A 12-0625 0312) por 30 minutos a 60 V el gel concentrador y a 90 V por 1:30 horas el gel separador con amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%). El gel se tiñó en azul de Coomassie de *Bio-Rad* (Cat. No. 161-0786) por una 1 hora y se enjuagó con agua destilada hasta remover el exceso de colorante

5.2.6. Western Blot

Mediante esta técnica se puede detectar una proteína específica al hacer uso de anticuerpos específicos contra ella, previamente se debe hacer una electroforesis que separe a las proteínas las cuales son transferidas a una membrana inmovilizándolas.

Se cargaron 50 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 10% se hizo el mismo procedimiento que en el punto 5.2.5. A diferencia de que en este gel se cargaron también 3 µL de marcador *Precision Plus Protein Dual Color Standards* de *Bio-Rad* (Cat. No. 1610394). El gel se transfirió a una membrana de PVDF de *GE Healthcare* (Pack No. RPN303F) usando amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 Mm, metanol 20%) durante 1:30 horas a 90 V.

El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie como se mencionó en el punto 5.2.5. y la membrana con Rojo de Ponceau de *Sigma-Aldrich* (No. P3504-10G) por 10 segundos, se lavó la membrana con agua destilada y se dejó bloqueando en una solución de TBS-T 0.15 M pH 7.4 (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%) con 5% de leche descremada en polvo "*light*" durante toda la noche en agitación en un agitador de mesa orbital 2D de *Benchmark* a 4°C. Al día siguiente en el caso de *MAFB* se colocó el anticuerpo primario 1:20,000 de Abcam (Cat. No. ab65953) en una solución de TBS-Tween 0.15 M con 1% de leche a 37°C durante 2 horas, se dieron 4 lavados de 15 minutos con TBS-Tween 0.15 M. Posteriormente se le colocó el anticuerpo primario en una solución de TBS-Tween 0.15 M con 1% de leche a una dilución de 1:15,000, se hicieron 4 lavados de 15 minutos con TBS-Tween 0.15 M y finalmente se reveló con *ECL Plus Western Blotting Detection System* de *GE Healthcare* (Pack W4668630 Lot. No. 4645641).

Para el caso de *NFATc1* se probaron las mismas condiciones y concentraciones de anticuerpo primario y secundario 1/15,000, 1/10,000 y 1/20,000, sin obtener resultado alguno, por lo que es necesario seguir buscando sus condiciones ideales.

6. RESULTADOS

6.1. Genes reporteros

Para clonar la 3'-UTR de los genes *NFATc1* y *MAFB* se amplificó mediante PCR un fragmento de 498 pb para *NFATc1* y 523 pb para *MAFB* de sus respectivas 3'-UTR, las cuales contienen las respectivas secuencias semilla a las que posiblemente se une el miR-548x-3p, (g t t t t). La Figura 6 muestra una representación gráfica del mRNA del gen *NFATc1*; la región 3'-UTR de este gen es una secuencia de 1,795 pb de longitud, dentro de la cual se encuentra el posible sitio de unión para el miR-548x-3p.

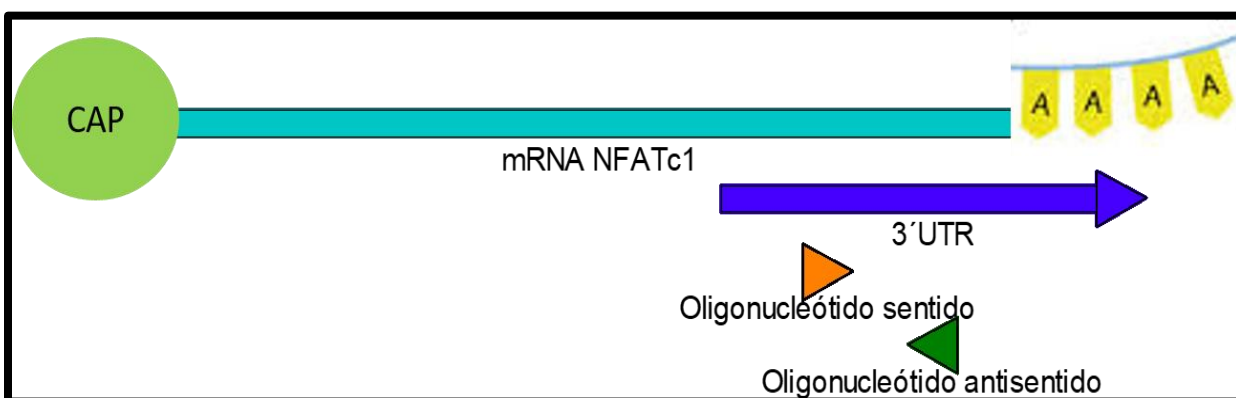


Figura 6. Representación gráfica del mRNA del gen *NFATc1*, en la cual se señala su 3'UTR así como el fragmento de esta región que se amplifica con los oligonucleótidos específicamente diseñados.

En la Figura 7 se muestra la secuencia del fragmento de la 3'-UTR del mRNA del gen *NFATc1* que se amplifica con los oligonucleótidos específicos diseñados, en la cual se señala en naranja y verde la secuencia de los oligonucleótidos sentido y antisentido, respectivamente, en mayúsculas podemos ver la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción, mientras que en rojo se señala la secuencia semilla a la que posiblemente se une el miR-548x-3p (g t t t t).

TACGATGCGATCGCccatcagggcatcatagaa tgagcattgaatttgctactgtaggagtatttta
 ggagcagaaaactgcaaacacatttcattgtgaggtttaccctctgtatgaatgaagagaacgctggaaggctg
 cgagaggactctagatgagtctccaacatttgaacgtttctgggctgtcacgtacactcctgctgccttacac
 agtgcattttagaatcttccagtctgtcatctcagctcttttgaacatgcttccctgtctgcgcggttgaaccgtag
 gcttgttcatagtcgcatgctcgcacatctt **gttttt** atctggcttcgaacatagcacaagtaactgaatagcacat
 caataggttactgacaaaaacacaaaaacctttacaggaataaccttcatttcacatgtgtgtacatatctagg
 catctatttatgt **taataataacagagccgacTACGATGCGATCGC**

Figura 7. Secuencia del fragmento de la 3'-UTR que se amplifica utilizando los oligonucleótidos específicamente diseñados para el gen *NFATc1* (498 pb), señalando con rojo la posible secuencia de unión para el miR-548x-3p, g t t t t.

Del mismo modo, en la Figura 8 es una representación del mRNA del gen *MAFB*, la región 3'-UTR consta de 2,032 pb y los oligonucleótidos que se utilizan para la PCR de este gen amplifican 523 pb dentro de las cuales se encuentran tres posibles sitios de unión del miRNA. Adicionalmente, la figura 9 muestra la secuencia del fragmento de la 3'-UTR que se amplifica con los oligonucleótidos específicos diseñados, en naranja se señala la secuencia complementaria al oligonucleótido sentido mientras que en verde se señala la secuencia complementaria al oligonucleótido antisentido, las letras en mayúscula son las secuencias de unión de las enzimas de restricción, mientras que en rojo se señala la posible secuencia específica de unión del miR-548x-3p (g t t t t).

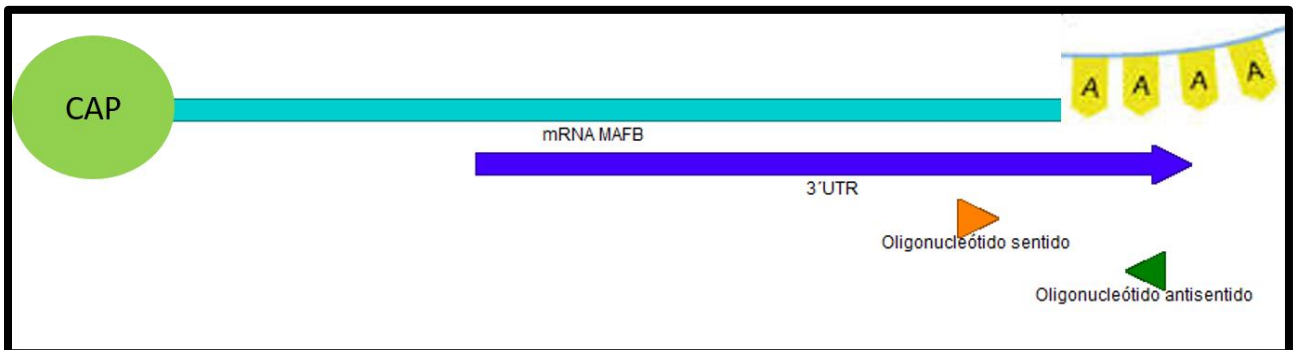


Figura 8. mRNA del gen *MAFB*, en el cual se señala el fragmento de la 3'-UTR que se amplifica con los oligonucleótidos específicamente diseñados.

```

TACGATGCGATCGCttggcaagtaattttgcaac tcaagtgcgttcttagaccaatgcattgcggtt
ctttccctgctttgagatagtaggaagagttcttggtggtgtccccccctcaattcttcagttgtatagtagtata
gggaagatatgggtgtttttttttattattacttttttttctgcaggtcagtaaaaggatttaagttgcactgacaaa
aataccaaaataaaagtgtatttttaagttcccatttgaaattgctggcgctgctggccggatgcatttttgagttgt
attagttgataaattaacagtaataacaagattgtatgaaccgcatggtgcttgcagttttaaattgtggatattt
gtcctgcatcagaaacgagctttgttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
gttttttttcatgtaaaataagggatcaatttcaaccctgcttatgatTACATGACGCGT.

```

Figura 9. Secuencia del fragmento de la 3'-UTR que se amplifica con los oligonucleótidos utilizados en la PCR del gen *MAFB* (523 pb), señalando en rojo los tres posibles sitios de unión específicos para el miR-548x-3p, g t t t t t.

La Figura 10 muestra un gel de agarosa al 1% resultado del análisis de la reacción de PCR en punto final de los fragmentos de la 3'-UTR, de los genes *NFATc1* y *MAFB*, que se amplificaron a partir de una muestra de DNA genómico. En la figura podemos observar una banda de 523 pb y otra banda de 498 pb las cuales corresponden a los productos de amplificación de los fragmentos de la 3'-UTR de *MAFB* y *NFATc1*, respectivamente.

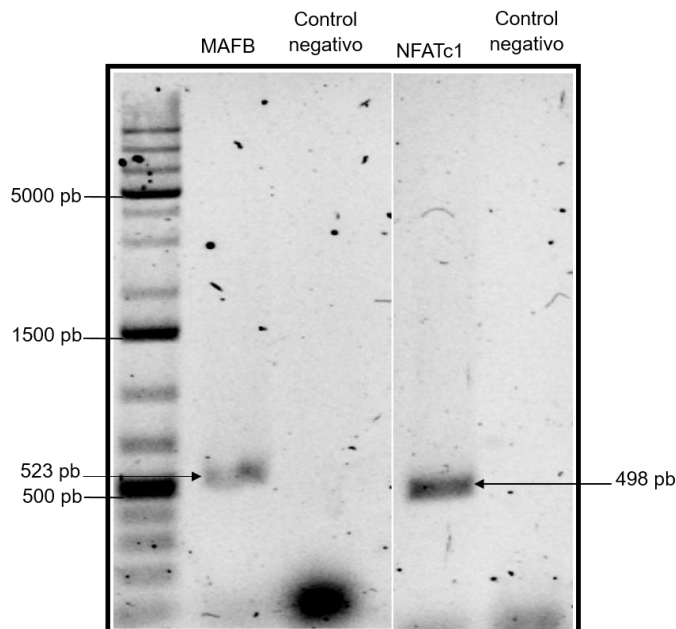


Figura 10. Gel de agarosa de la PCR de los fragmentos de la 3'-UTR de los genes *MAFB* (523 pb) y *NFATc1* (498 pb) utilizando como templado DNA genómico.

En la Figura 11 podemos observar una representación de la estructura del plásmido pmiR-IRF8. Este plásmido se utilizó para clonar las regiones 3'-UTR, el plásmido consta de 9,164 pb, en la imagen se muestran las características más destacables de este plásmido, los

genes *NEO/KAN*, *luciferasa* de luciérnaga y el gen *RFP* (del inglés *Red Fluorescent Protein*).

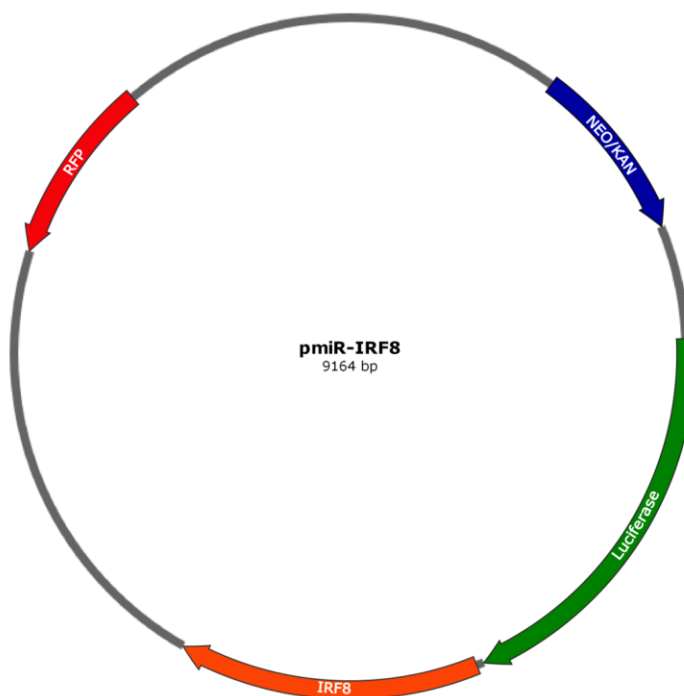


Figura 11. Representación de la estructura del plásmido pmiR-IRF8. En esta imagen solo se observan las principales características de este plásmido; los genes RFP, NEO/KAN y luciferasa.

Para la clonación fue necesario sustituir la 3'-UTR del mRNA de *IRF8* del plásmido pmiR-IRF8 por las regiones 3'-UTR de los genes *NFATc1* y *MAFB* para poder insertar estos plásmidos contruidos en las bacterias *E.coli* DH5 α . Para esto se hizo una digestión enzimática tanto del plásmido pmiR-IRF8 como de los fragmentos previamente amplificados por PCR. La Figura 12 es una representación de la digestión del plásmido pmiR-IRF8 en la cual se señala con un círculo las regiones del plásmido que cortan las enzimas MluI y AsiSI. Los resultados experimentales de la digestión enzimática del plásmido pmiR-IRF8 así como de los productos de PCR de los genes *MAFB* y *NFATc1* se muestran en un gel de agarosa en la Figura 13, en la digestión del pmiR-IRF8 se pueden identificar dos bandas, una de 7,841 pb y otra de 1,323 pb. La banda de mayor peso molecular es más intensa que la de menos peso molecular, debido a que la primera corresponde al 86% del plásmido, mientras que la segunda banda corresponde a la 3'-UTR de IRF8 que solo representa un 14% del plásmido. En la reacción de digestión se usaron las enzimas de restricción MluI y AsiSI simultáneamente en el amortiguador 2.1 a 37°C durante una noche.

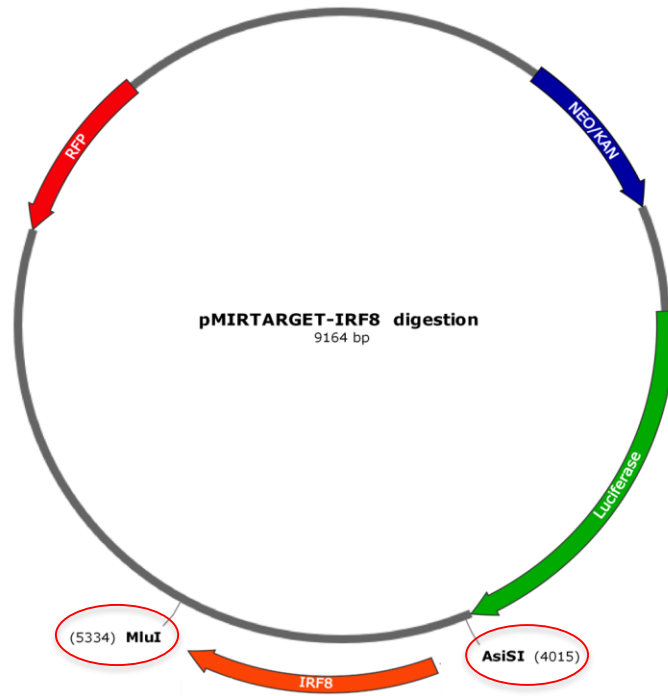


Figura 12. Representación gráfica de la digestión del plásmido pmiR-IRF8, en la cual se señalan los sitios de corte por las enzimas MluI y AsiSI.

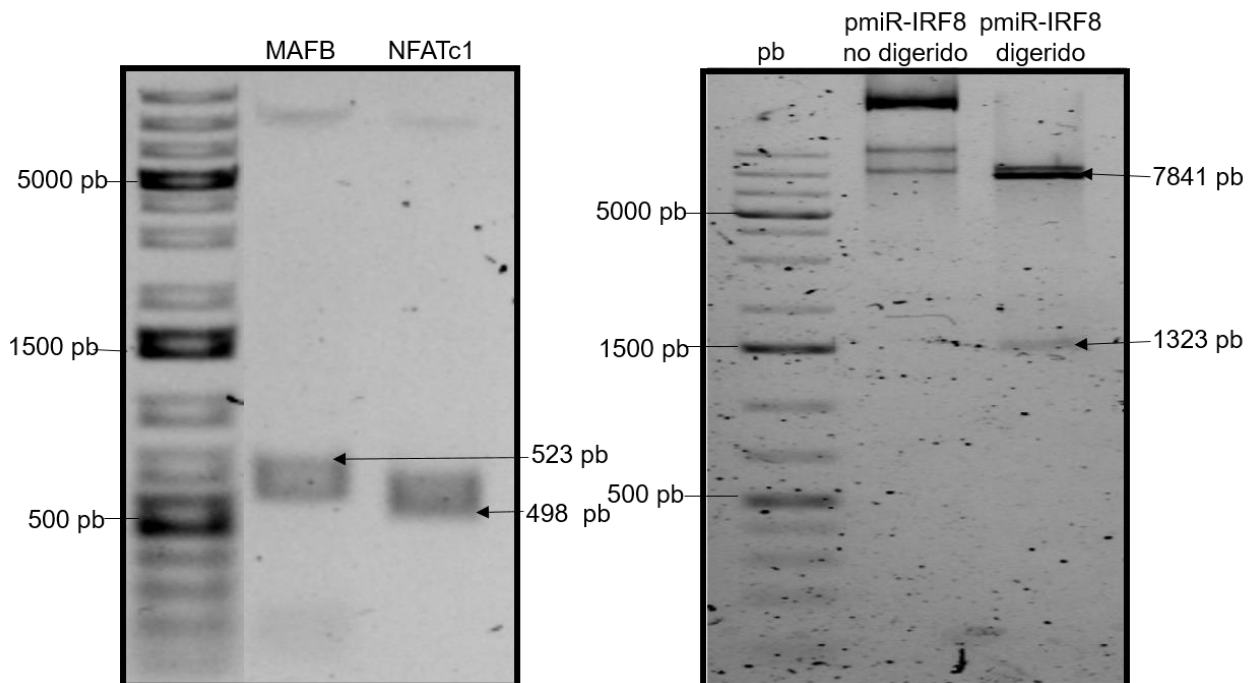


Figura 13. Geles de agarosa al 1% de la digestión enzimática con las enzimas MluI y AsiSI del lado izquierdo de los productos de PCR de los genes *MAFB* y *NFATc1*, del lado derecho del plásmido pmiR-IRF8.

Para poder formar los plásmidos pmiR-NFATc1 y pmiR-MAFB en seguida de la digestión se pusieron en contacto el pmiR con cada uno de los productos de PCR de los fragmentos de las 3'-UTR de los genes *NFATc1* y *MAFB* en una reacción de ligación empleando la DNA T4 ligasa a 4°C para construir los plásmidos pmiR-NFATc1 y pmiR-MAFB ligados por enlaces covalentes, simbolizados en las Figuras 14 y 15 respectivamente.

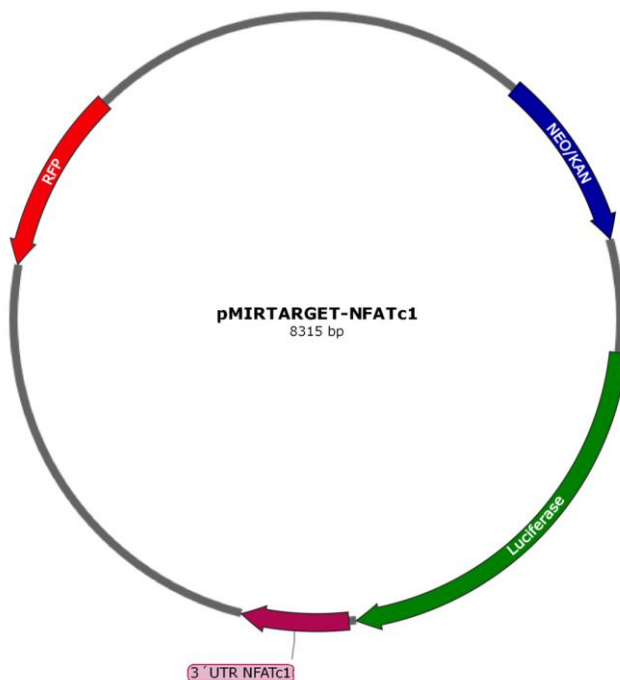


Figura 14. Representación del plásmido construido pmiR-NFATc1.

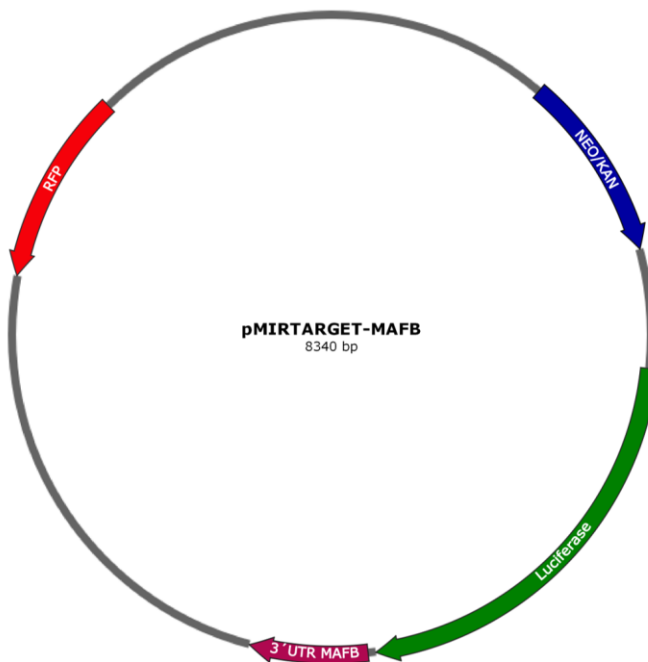


Figura 15. Representación del plásmido construido pmiR-MAFB.

Estos plásmidos construidos se utilizaron para transformar bacterias y clonar los plásmidos de interés. Para el plásmido pmiR-NFATc1 primero se hizo una transformación por electroporación en bacterias electrocompetentes *E.coli* BL21 obteniendo como resultado el crecimiento de una colonia la cual se sembró en medio líquido con kanamicina y posteriormente se extrajo el plásmido con el cual se volvió a transformar facilitando su introducción por choque térmico en bacterias quimiocompetentes *E.coli* DH5α, obteniendo como resultado el crecimiento de 4 colonias aisladas.

Para la construcción pmiR-MAFB se hizo una transformación por choque térmico en bacterias competentes *E.coli* DH5α obteniendo como resultados pequeñas colonias aisladas de las cuales se seleccionaron 8 colonias.

Una vez que se logró la transformación de ambos plásmidos, se seleccionaron las clonas y fueron sembradas en medio líquido LB con kanamicina. Posteriormente se extrajeron los plásmidos mediante lisis alcalina, y se hizo una PCR utilizando como templado el plásmido extraído para comprobar que las clonas tenían los plásmidos construidos y también seleccionar aquellas que serían comprobadas por secuenciación por el método de Sanger.

La Figura 16 muestra un gel de agarosa donde se analizaron los productos de la PCR que se hizo utilizando como templates los plásmidos obtenidos de las colonias candidato del plásmido pmiR-NFATc1. Se observa que las bandas están cerca de los 1,000 pb, debido a que para esta reacción se utilizaron un par de oligonucleótidos los cuales amplifican el fragmento de la 3'-UTR y un fragmento de la estructura del plásmido pmiR. A partir de este resultado se seleccionó la clona 1, como se señala, como candidata para secuenciar por el método de Sanger, ya que su banda es de mayor intensidad lo que nos habla de un mayor número de copias durante la PCR y fue la que mejor crecimiento tuvo en la siembra. El resultado de la secuenciación del producto de PCR purificado de la clona seleccionada se observa en la Figura 17, en donde se señala el posible sitio de unión del miR-548x-3p (g t t t t t). El resultado de la secuenciación, nos indica que la clonación se llevó a cabo adecuadamente. Aunque el electroferograma no se aprecia bien podemos inferir que la letra Y se trata de Timina (T) debido a que el pico mayoritario corresponde al color rojo referente a timina, por todo lo anterior se puede inferir que el plásmido tiene el fragmento de la 3'-UTR del gen *NFATc1*.

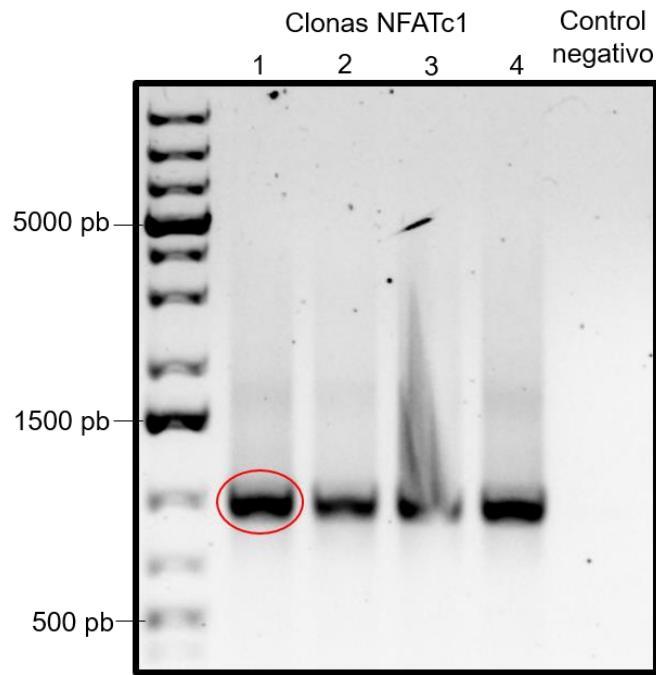


Figura 16. Gel de agarosa de la PCR usando como templado el plásmido pmiR-NFATc1 extraído de las bacterias *E.coli* DH5 α , a partir del cual como se señala se selecciona la clona 1 para secuenciar por Sanger.

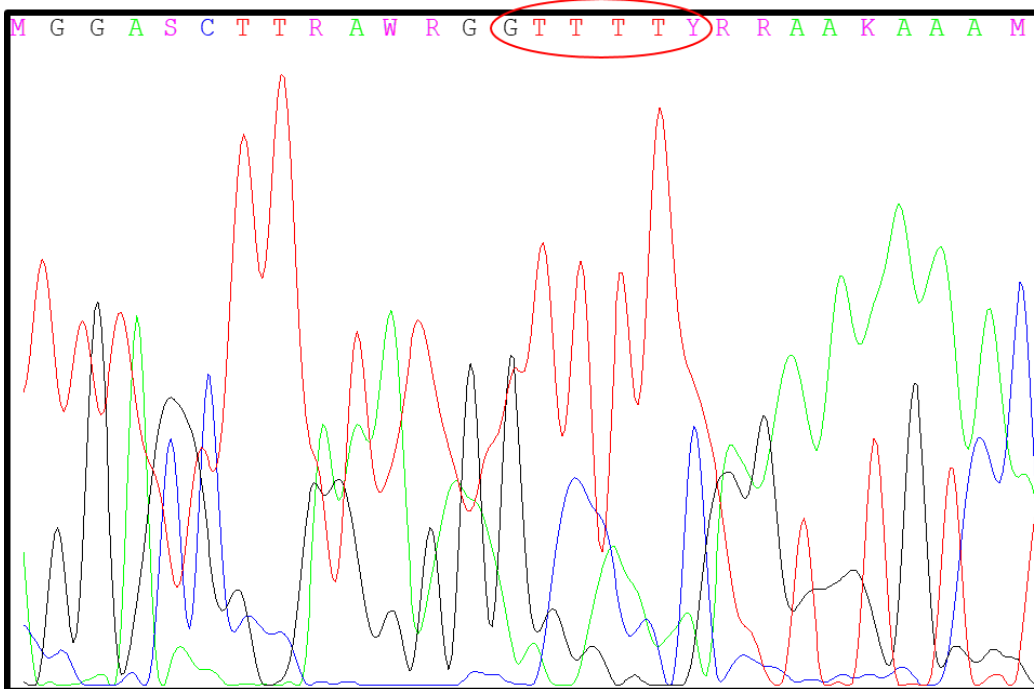


Figura 17. Electroferograma de la secuenciación de la PCR del plásmido pmiR-NFATc1. En esta figura se observa solo un fragmento de electroferograma de la secuenciación de la PCR de la clona 1 del plásmido pmiR-NFATc1 en el que se puede identificar la secuencia (señalada en un óvalo) del posible sitio de unión del miR-548x-3p, g t t t t.

La Figura 18 muestra el resultado de la PCR usando como templado el plásmido pmiR-MAFB extraído de las diferentes clonas obtenidas, esta PCR se realizó con los oligonucleótidos cuya secuencia se muestra en la Figura 9 y amplifican 523 pb, como se señala se seleccionó la clona 6, debido a la intensidad de la banda y a que respecto al resto de la clonas era la que mejor crecimiento tenía, cabe mencionar que ninguna de estas clonas tuvo una abundante densidad óptica en su cultivo. En la Figura 19 se muestra la secuenciación del producto de PCR purificado de dicha clona señalando uno de los 3 sitios de unión del miR-548x-3p al fragmento de la región 3'-UTR del gen *MAFB*, por lo que el plásmido corresponde al construido pmiR-MAFB.

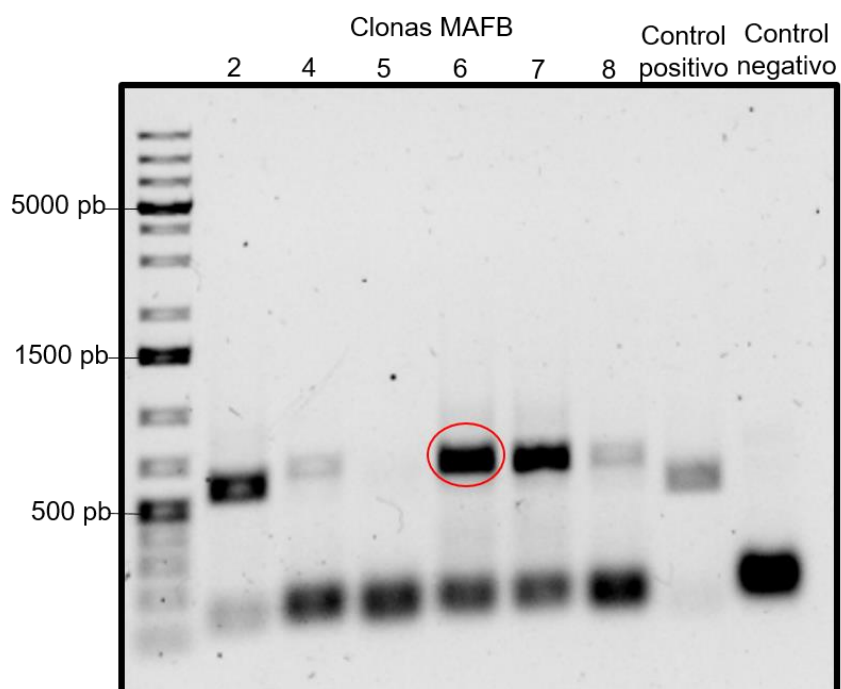


Figura 18. Gel de agarosa de la PCR usando como templado el plásmido pmiR-MAFB extraído de las bacterias *E.coli* DH5 α en la que se señala la clona seleccionada para secuenciar por la técnica de Sanger este producto de PCR.

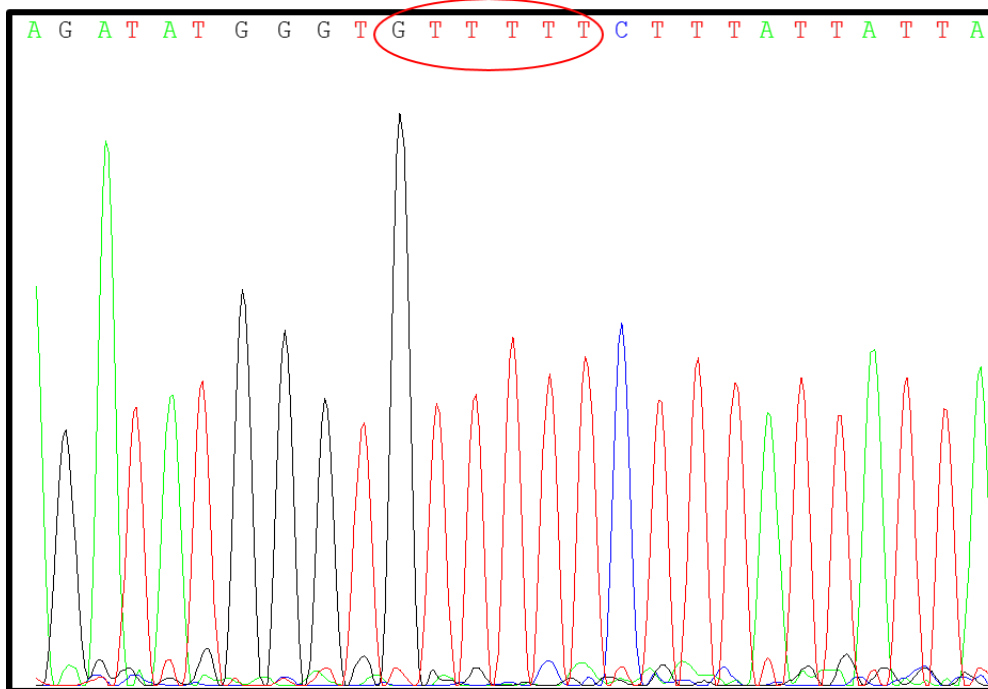


Figura 19. Electroferograma de la secuenciación de la PCR del plásmido pmiR-MAFB. Se observa solo un fragmento de electroferograma de la secuenciación de la PCR de la clona 6 del plásmido pmiR-MAFB en el que se observa la secuenciación de uno de los 3 posibles sitios de unión del miR-548x-3p, g t t t t t (señalada con un óvalo).

Para estudiar la unión del miR-548x-3p en los fragmentos de la 3'-UTR se realizaron ensayos de gen reportero mediante una co-transfección con los plásmidos construidos con los fragmentos de la 3'-UTR y el pcDNA6.2-miR-548x-3p.

La Figura 20 es una imagen de la estructura del plásmido pcDNA6.2 el cual se utilizó para clonar al miR-548x-3p, en el cual se destacan los genes *EmGFP* (del inglés *Emerald green fluorescent protein*) y *Blasticidina*. Este plásmido se preparó partiendo de oligonucleótidos *TOP* y *BOTTOM* y el amortiguador de alineamiento de oligonucleótidos 10X a diferentes temperaturas. La hibridación de los oligonucleótidos se observó en un gel de agarosa al 4%, tomando como control negativo cada uno de los oligonucleótidos *TOP* y *BOTTOM* sin hibridación como se observa en la Figura 21.

Posterior a la hibridación se hizo una ligación con el plásmido pcDNA6.2 utilizando la DNA T4 ligasa formando el plásmido pcDNA6.2-miR-548x-3p con el cual se transformó por choque térmico las bacterias *E.coli* DH5 α , las clonas transformadas se seleccionaron

usando ampicilina; posteriormente se extrajo el plásmido por lisis alcalina y se observaron en un gel de agarosa para comprobar la presencia del plásmido.

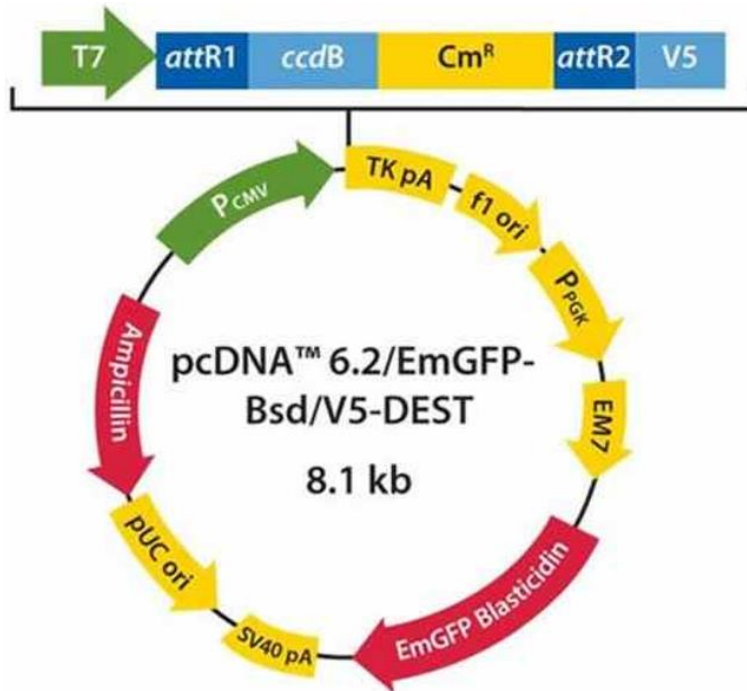


Figura 20. Estructura del plásmido pcDNA6.2 utilizado para clonar el miR-548x-3p.

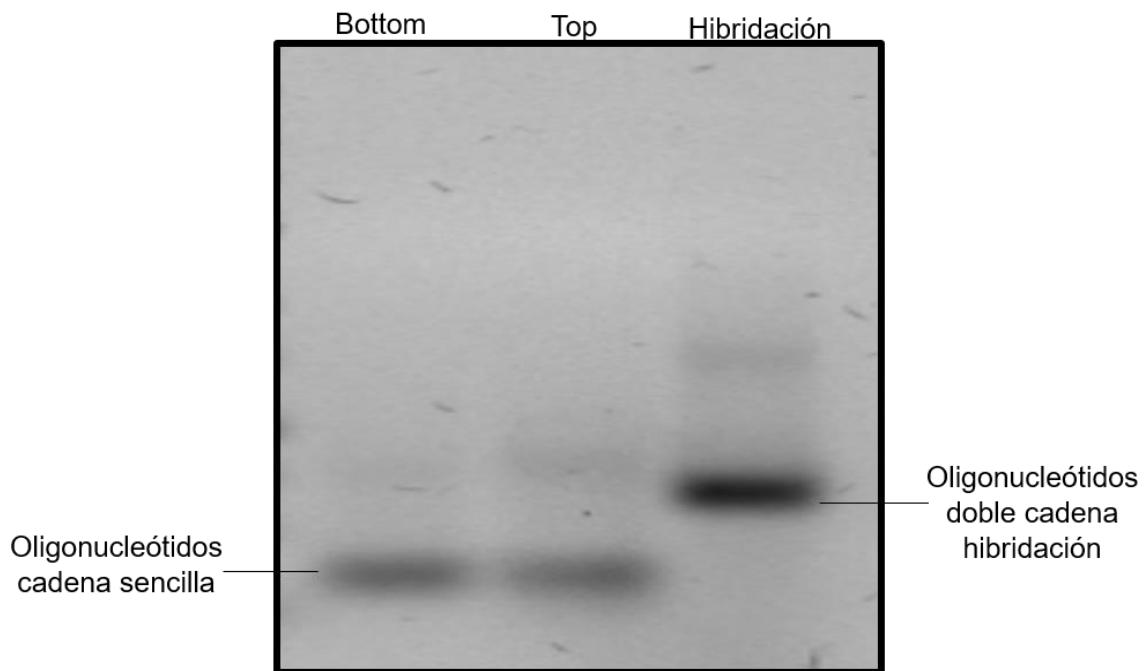


Figura 21. Hibridación de los oligonucleótidos utilizados para formar el miR-548x-3p. En esta figura podemos observar la unión por complementariedad de las cadenas para formar el fragmento del miR-548x-3p que será usado para formar el pcDNA6.2- miR-548x-3p.

Una vez que se obtuvieron los plásmidos, pcDNA6.2-miR-548x-3p y pmiR-NFATc1, se hicieron cultivos de 100 mL. Los plásmidos se extrajeron por lisis alcalina purificando por columna los plásmidos utilizando el kit Midi de QIAGEN, el cual contiene una columna de intercambio aniónico por el cual se hace pasar el plásmido mejorando el grado de pureza del DNA plasmídico. Las clonas de pmiR-MAFB tenían poco crecimiento en el medio aun a menores concentraciones de kanamicina por lo que no fue posible realizar Midiprep de este plásmido, y por lo tanto llevar a cabo el ensayo de luciferasa.

La Figura 22 es una imagen de la cotransfección con los plásmidos pcDNA6.2-miR-548x-3p y pmiR-NFATc1 en las líneas celulares U2OS y Saos-2 por el método de lipofectamina 2000 en una proporción 1:3, utilizando como control las células transfectadas únicamente con el plásmido pmiR-NFATc1. El plásmido pcDNA6.2-miR-548x-3p como se puede ver en la estructura expresa el gen GFP y el plásmido pmiR-NFATc1 el gen RFP, las imágenes fueron tomadas 24 horas después de la transfección bajo el mismo campo de observación. Para realizar los ensayos de luciferasa, 72 horas después de la cotransfección se hizo una extracción de las proteínas de los cultivos celulares utilizando la solución de lisis Tropic del kit Dual-Light System de Applied Biosystems. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de luciferasa, en el cual se analiza la actividad de esta enzima, expresada por el plásmido pmiR-NFATc1.

La Figura 23 nos muestra los niveles de actividad de luciferasa. En ella podemos observar que la expresión de luciferasa disminuye en presencia del plásmido pcDNA6.2-miR-548x-3p en ambas líneas celulares, U2OS y Saos-2, lo que nos indica que el miRNA es capaz de unirse a la región 3'-UTR de *NFATc1* y de ese modo regular la expresión de la luciferasa.

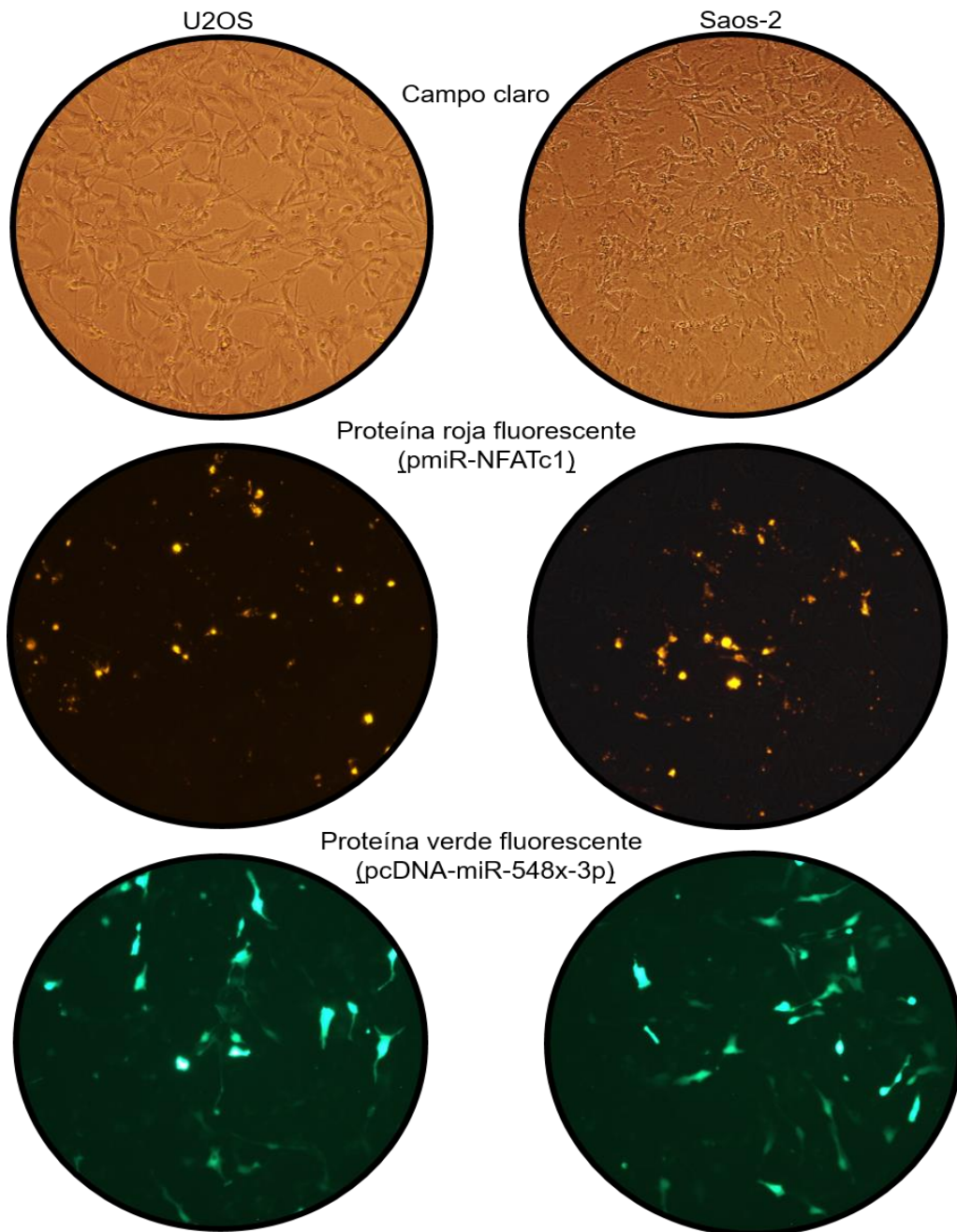


Figura 22. Co-transfección en las líneas celulares U2OS y Saos-2 con los plásmidos pcDNA6.2-miR-548x-3p y el plásmido construido pmiR-NFATc1. En la imagen se observa el mismo campo en ambas líneas celulares en la parte superior el campo claro, en la parte media se observan las células con un filtro que permite observar la expresión de la proteína roja fluorescente (RFP) expresada por el plásmido pmiR-NFATc1 y en la parte inferior las células usando un filtro que permite observar la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) que es expresada por el plásmido pcDNA6.2-miR-548x.

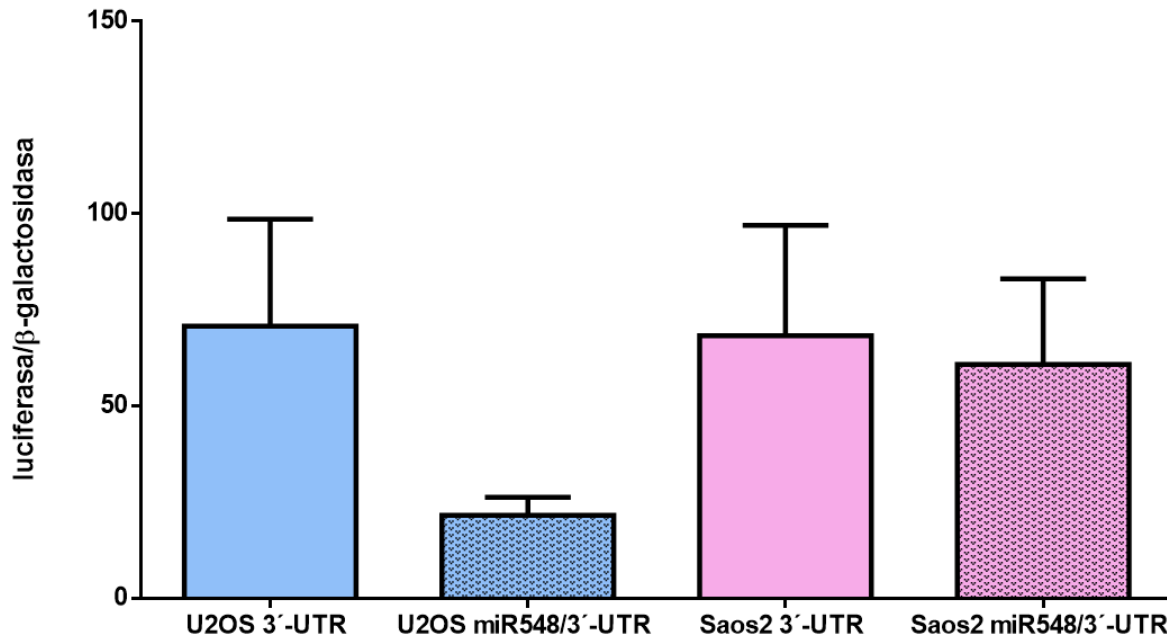


Figura 23. Actividad de luciferasa, el porcentaje de la actividad de luciferasa disminuye en ambas líneas celulares en presencia del miR-548x-3p, sin embargo, la disminución de la actividad de la luciferasa es estadísticamente significativa solo en la línea celular U2OS, ** p=0.0043 vs control.

6.2. Expresión de genes blanco

Se transfectaron las líneas celulares U2OS y Saos-2 con el plásmido pcDNA6.2-miR-548x-3p, las células se propagaron y seleccionaron por su resistencia al antibiótico blasticidina (conferida por el plásmido). La sobreexpresión de miR-548x-3p en ambas líneas celulares se hizo evidente mediante la visualización del gen reportero *GFP* (Figura 24).

Una vez que se sobreexpresó establemente el miR-548x-3p en ambas líneas celulares se extrajo RNA usando TRIzol para evaluar la sobreexpresión del miR-548x-3p mediante una RT-PCR usando sondas TaqMan tomando como referencia las células sin transfectar. En la Figura 25 se puede observar que la sobreexpresión del miR-548x-3p es significativo en las líneas celulares U2OS y Saos-2.

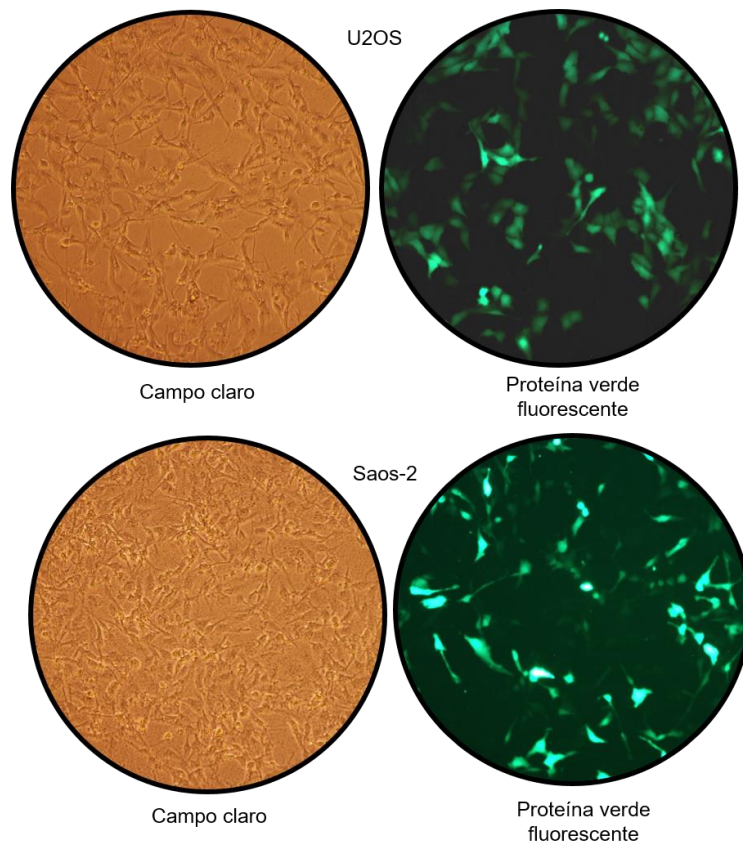


Figura 24. Líneas celulares U2OS y Saos-2 en campo claro y expresando el gen GFP del plásmido pcDNA6.2-miR-548x-3p.

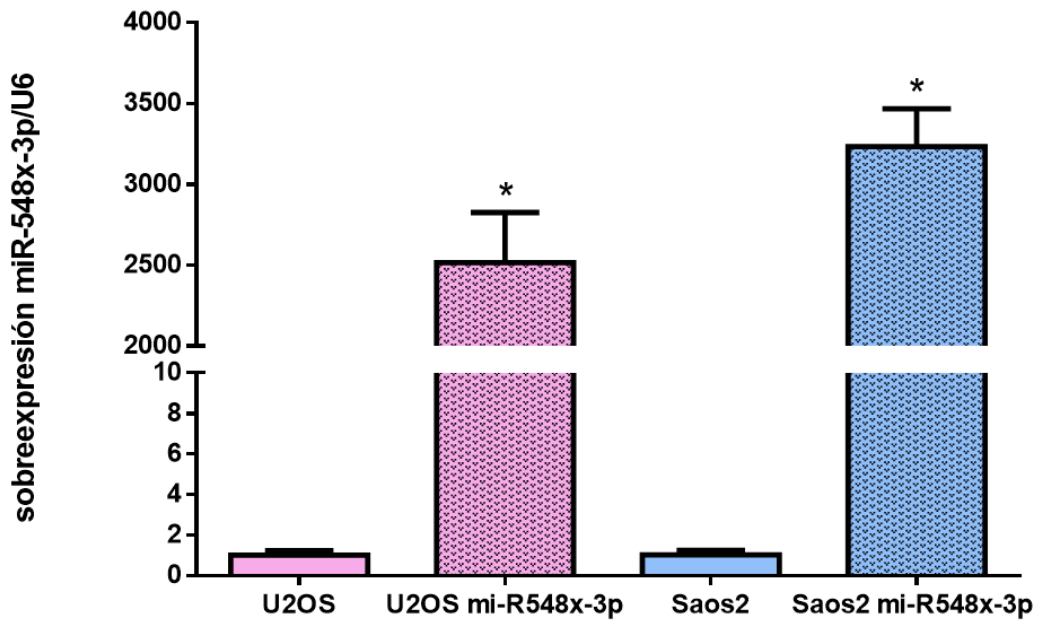


Figura 25. Sobreexpresión del miR-548x-3p en las líneas celulares U2OS y Saos-2. Ambas líneas transfectadas expresan 2,000 veces más el miR-548x-3p, estas diferencias son estadísticamente significativas para ambas líneas celulares (* $p=0.0236$ vs respectivos controles).

Para evaluar el efecto que tiene la sobreexpresión del miR-548x-3p sobre la expresión de los genes *NFATc1* y *MAFB* a nivel RNA se hizo una RT-PCR utilizando SYBR-Green con el RNA que se extrajo. En las Figuras 26 y 27 se observan los resultados de la expresión del gen *NFATc1* y *MAFB*, respectivamente, mostrando una disminución significativa en la expresión de los dos genes en ambas líneas celulares cuando el miR458x-3p está sobreexpresado.

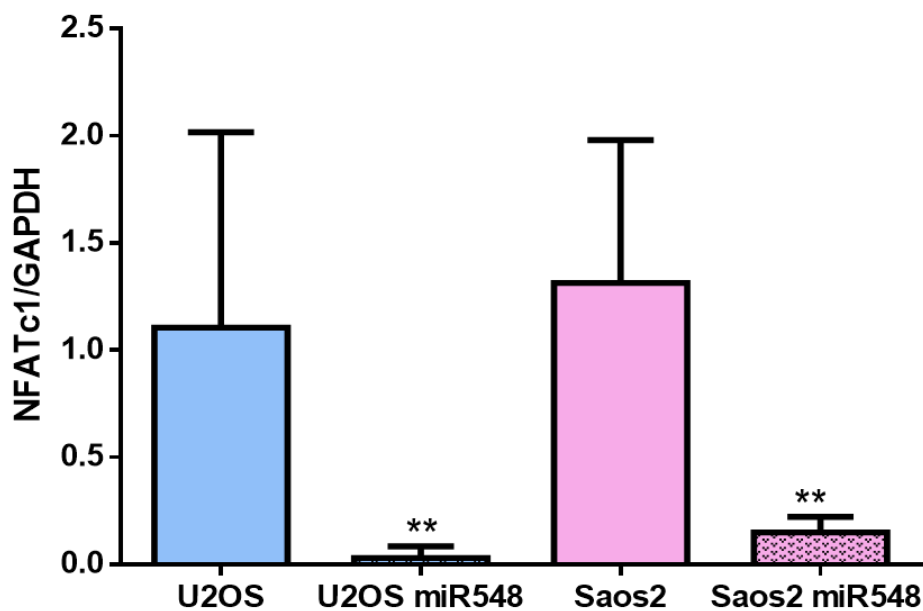


Figura 26. Resultados de la RT-PCR para el gen blanco *NFATc1*, disminución significativa del gen en presencia del miR-548x-3p en las líneas celulares U2OS (**p=0.0043) y Saos-2 (**p=0.0022).

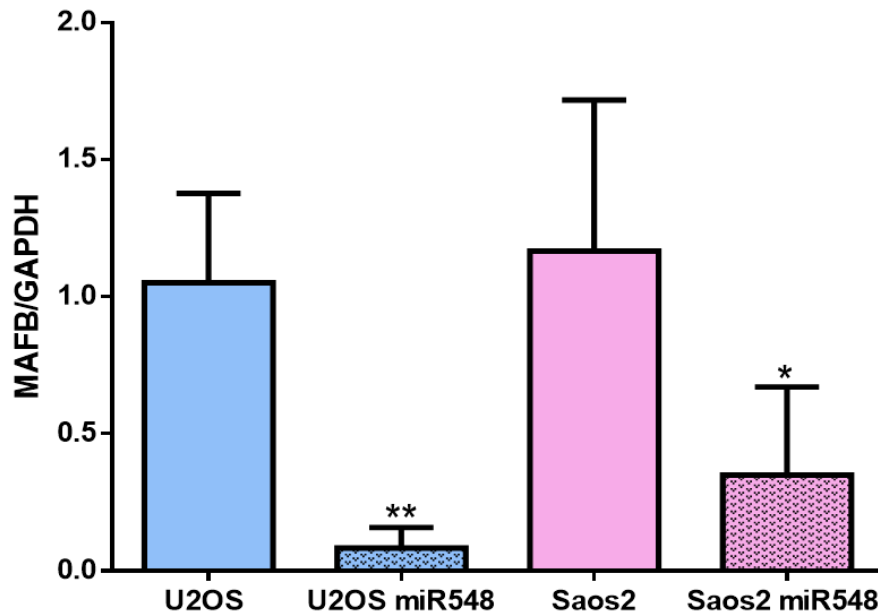


Figura 27. Resultados de la RT-PCR para el gen blanco *MAFB*, disminución significativa del gen en presencia del miR-548x-3p en las líneas celulares U2OS (**p=0.0022) y Saos-2 (*p=0.0238).

Para observar el efecto de la sobreexpresión del miR-548x-3p a nivel proteína, se extrajeron proteínas totales de lisados celulares de las células U2OS y Saos-2 sobreexpresando el miR-548x-3p para evaluar este efecto mediante Western-Blot usando anticuerpos específicos para las proteínas de los genes *NFATc1* y *MAFB*, tomando como control lisados celulares sin transfectar.

En la Figura 28 podemos observar como en ambas líneas celulares disminuye la expresión de la proteína del gen *MAFB* cuando las células sobreexpresan el miR-548x-3p, por otro lado, a pesar de que se hicieron diferentes intentos no se lograron encontrar las condiciones óptimas para *NFATc1* (datos no mostrados), sin embargo, se esperaría que la expresión de las proteínas disminuyera en presencia del miR-548x-3p.

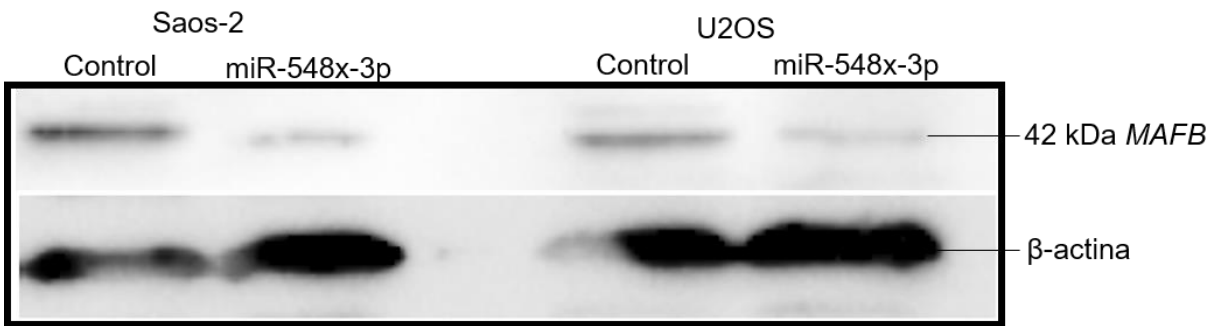


Figura 28. Western Blot de MAFB. Se detectó una banda específica de aproximadamente 42 kDa. Se observa la disminución de la expresión de *MAFB* cuando se sobreexpresa miR-548x-3p.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos mediante estos ensayos *in vitro* ponen en evidencia el papel que tiene el miR-548x-3p como regulador de los genes *NFATc1* y *MAFB* asociados al metabolismo óseo. Por un lado, se manifestaron los cambios en la expresión de un gen reportero como luciferasa en presencia del miR-548x-3p, por el otro lado se evaluaron los cambios en la expresión de los niveles de mRNA de los genes *NFATc1* y *MAFB* mediante RT-PCR y finalmente se visualizó el efecto del miR-548x-3p a nivel proteína mediante Western-Blot.

Las regiones 3'-UTR son regiones no traducidas dentro del mRNA maduro localizadas inmediatamente después del codón de paro y antes de la cola de poli-A. Estas regiones son objeto de una variedad de mecanismos reguladores, entre ellos la acción de los miRNAs. Los miRNAs reconocen a sus blancos a través del emparejamiento de bases de tan solo seis nucleótidos consecutivos, generalmente entre el extremo 5' de un miRNA maduro y la 3'-UTR de su mRNA blanco. Para este trabajo, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de las regiones 3'-UTR de los mRNAs *NFATc1* y *MAFB*. En los fragmentos amplificados podemos encontrar la secuencia, g t t t t t, considerada como la secuencia semilla para que el miR-548x-3p pueda unirse y ejercer su función reguladora.

Mediante ensayos de actividad de la luciferasa, pudimos observar que cuando la expresión de esta enzima se encuentra bajo control regulador de la región 3'-UTR y se presenta una sobreexpresión de miR-548x-3p, la actividad de la luciferasa se ve disminuida en las líneas celulares U2OS y Saos-2 como lo muestra la Figura 23. Por lo tanto, estos resultados nos indican que el miR-548x-3p es capaz de regular la expresión del gen *NFATc1* a través de su unión a la secuencia g t t t t t localizada región 3'-UTR del mRNA del gen *NFATc1*.

Nuestros hallazgos muestran que en la línea celular U2OS esta disminución es estadísticamente significativa, pero no así en la línea celular Saos2. Esta diferencia entre ambas líneas celulares se puede deber a la diferencia en el grado de diferenciación entre estas líneas celulares. La línea celular Saos-2 deriva de un osteosarcoma primario con un grado de diferenciación más tardío que la línea celular UO2S. Sin embargo, más experimentos son necesarios para abordar esta hipótesis.

Dado lo anterior, la unión del miR-548x-3p a las 3'-UTR de *NFATc1* puede representar un posible mecanismo por el cual este miRNA participe en el desarrollo de la osteoporosis. Esto, con base en que *NFATc1* juega un papel importante en la diferenciación de osteoclastos, como ha sido reportado por otros grupos previamente^{49,50}. Del mismo modo, ya ha sido reportado que *MAFB* es un importante regulador de la osteoclastogénesis ya que la inhibición de *MAFB* mediada por miR-148a produce un incremento en la masa ósea asociado a una disminución de la resorción en animales⁵¹.

De acuerdo a los antecedentes directos, el miR-548x-3p fue encontrado sobreexpresado en monocitos de mujeres postmenopáusicas, con objeto de acercarnos a dichas condiciones fisiológicas se sobreexpresó el miR-548x-3p en las líneas celulares U2OS y Saos-2 mediante la transfección del plásmido pcDNA6.2-miR-548x-3p y se evaluó su efecto sobre la expresión de sus genes blanco.

Se logró la sobreexpresión estable del miR-548x-3p en las líneas celulares Saos2 y U2OS, mediante transfección y posteriormente se comprobó por un análisis de expresión usando RT-PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan (Figura 24 y 25). En ambos casos esta sobreexpresión es significativa por lo que podemos inferir que nuestras condiciones eran idóneas para evaluar el efecto de la sobreexpresión del miRNA en la expresión de sus genes blanco *NFATc1* y *MAFB*. Los resultados que se muestran aquí, demuestran que la sobreexpresión del miRNA disminuye los niveles de expresión de ambos genes en ambas líneas celulares (Figura 26 y 27). Por lo tanto, podemos inferir que la presencia del miR-548x-3p modula negativamente la expresión de los mRNAs.

La expresión de una proteína depende de un proceso que se inicia con la transcripción de un mRNA y finaliza en la traducción de dicha secuencia a proteína. En este trabajo, también se evaluó el efecto de la expresión de miR-548x-3p sobre los niveles de las proteínas codificadas por los genes *NFATc1* y *MAFB*. De acuerdo a los resultados la sobreexpresión de miR-548x-3p tiene un efecto negativo en el nivel de expresión de la proteína *MAFB*. Durante el desarrollo de este trabajo, no contamos con todas las condiciones técnicas necesarias para hacer evidente el efecto de miR-548x-3p sobre los niveles de expresión de la proteína de *NFATc1*; sin embargo, resultados preliminares nos permiten pensar que esta proteína sigue la misma tendencia de disminuir en presencia del miR-548x-3p.

Estos resultados sugieren que al igual que la expresión a nivel RNA las proteínas de los genes *NFATc1* y *MAFB* se encontraran disminuidos cuando el miR-548x-3p se encuentra sobreexpresado. Recordemos que hay 3 modelos de mecanismos por los cuales un miR-548x-3p puede regular la expresión de un gen y encontrando disminuida la expresión de los genes tanto a nivel mRNA como proteína, nos sugiere de que el miR-548x-3p modula la expresión de estos genes mediante el modelo de desestabilización del mRNA para su consecuente degradación¹².

De acuerdo con nuestros antecedentes los dos genes en estudio tienen una relación en la que *MAFB* regula negativamente a *NFATc1*. En los estudios *in vivo* citados se ha observado que los ratones que carecen de *NFATc1* desarrollan osteopetrosis, un padecimiento inverso a la osteoporosis en el que los huesos aumentan su densidad⁵¹. Sin embargo, nuestro grupo de trabajo mostró que la expresión de estos genes se encuentra disminuida en pacientes con osteoporosis (baja densidad mineral ósea). El contraste entre estos resultados, nos demuestran que la osteoclastogénesis es un proceso complejo, que merece ser estudiado a fondo para conocer los mecanismos moleculares que lo gobiernan de manera global. Una teoría es que diferentes vías de señalización sean activadas dependiendo de las señales y condiciones del microambiente celular⁵². Por lo tanto, el estudio de los mecanismos moleculares que regulan el equilibrio del metabolismo óseo es de vital importancia para conocer mayor detalle de sus alteraciones y las consecuencias de estas.

En conjunto, los resultados expuestos en este trabajo, sustentan la posibilidad de que el miR-458x-3p desempeñe un papel importante como regulador del metabolismo óseo y que su sobreexpresión puede tener como consecuencia la disminución en los niveles de *NFATc1* y *MAFB*, afectando la diferenciación y actividad de osteoclastos y relacionándose al desarrollo de enfermedades como la osteoporosis.

Estos resultados abren las posibilidades de proponer a este mi-548x-3p como un posible blanco terapéutico o como biomarcador, y sobre todo aporta información relevante que contribuye al conocimiento de los procesos a nivel molecular que se llevan a cabo durante el desarrollo de la osteoporosis.

8. CONCLUSIONES

Se lograron amplificar y clonar los fragmentos de las regiones 3'-UTR de los genes blanco *NFATc1* y *MAFB* en el plásmido pmiR-Target para evaluar la actividad del gen reportero de luciferasa. Se sobreexpresó el miR-548x-3p en las líneas celulares U2OS y Saos-2 y se evaluó la expresión de genes *NFATc1* y *MAFB* a nivel RNA y proteína.

El miRNA, miR-548x-3p, tiene la capacidad de unirse a las regiones 3'-UTR de los genes *NFATc1* y *MAFB*, regulando así la expresión de un gen reportero. La sobreexpresión del miR-548x-3p regula negativamente la expresión de los genes *NFATc1* y *MAFB in vitro* a nivel de mRNA y proteína. Sin embargo, hace falta replicar los experimentos para confirmar el resultado de la regulación a nivel proteína.

En conjunto, estos resultados señalan que el miR-458x-3p juega un papel fundamental en el metabolismo óseo alterando la expresión de genes claves en el proceso de osteoclastogénesis.

9. REFERENCIAS

1. Lee, R. ;, Feinbaum, R. & Ambros, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell Press* **75**, 843–854 (1993).
2. Gayosso, L., Salinas, C., Zárraga, G., Ramírez, E. & Ortiz, B. MicroRNAs como herramienta potencial para el diagnóstico del mesotelioma pleural maligno. *Neumol Cir Torax* **72**, 175–181 (2013).
3. Ka-Fai, V., Chun-Ming, P., CB Tan, K. & Cheung, C. MicroRNA and Human Bone Health. *JBMR Plus* **3**, 2–13 (2019).
4. Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T. & Young, Y. MicroRNAs : Synthesis , mechanism , function , and recent clinical trials. *Biochim. Biophys. Acta- Mol. Cell Res.* **1803**, 1231–1243 (2010).
5. Ameres, S. L. & Zamore, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 475–488 (2013).
6. Treiber, T., Treiber, N. & Meister, G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb. Haemost.* 605–610 (2012).
7. Kwon, C. *et al.* Structure of Human DROSHA Article Structure of Human DROSHA. *Cell* **164**, 81–90 (2016).
8. Shen, J. & Hung, M. Signaling-Mediated Regulation of MicroRNA Processing. *Cancer Res.* **75**, 783–791 (2015).
9. Macrae, I. *et al.* Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science (80-)*. **311**, 195–198 (2006).
10. Gregory, R., Chendrimada, T., Cooch, N. & Shiekhattar, R. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* **123**, 631–640 (2005).
11. Cai, Y., Yu, X., Hu, S. & Yu, J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinforma.* **7**, 147–154 (2009).
12. Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-

- mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 421–433 (2015).
13. Pillai, R., Bhattacharyya, S. & Filipowicz, W. Repression of protein synthesis by miRNAs : how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* **17**, 118–126 (2007).
 14. Ambros, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**, 277–279 (2003).
 15. Bahubeshi, A., Tischkowitz, M. & Foulkes, W. miRNA Processing and Human Cancer: DICER1 Cuts the Mustard. *Sci. Transl. Med.* **3**, 111–116 (2011).
 16. Desvignes, T. *et al.* microRNA nomenclature: A view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways and sequence variants. *Trends Genet.* **31**, 613–626 (2015).
 17. Budak, H., Bulut, R., Kantar, M. & Alptekin, B. MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. *Briefings Func. Genomics* **15**, 65–71 (2016).
 18. Gulyaeva, L. & Kushlinskiy, N. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J. Transl. Med.* **14**, 1–10 (2016).
 19. Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**, 131–139 (2008).
 20. Ajai, S., Sabir, A., Mahdi, A. & Rajeshwar, S. Evaluation of Role of microRNA in Osteoporosis. *J. Pharm. Biomed. Sci.* **33**, 1439–1448 (2013).
 21. Flores, E., Montesinos, J. & Mayani, H. Células troncales mesenquimales : historia , biología y aplicación clínica. *Rev. Investig. Clin.* **58**, 498–511 (2006).
 22. Rho, J., Takami, M. & Choi, Y. Osteoimmunology:interactions of the Immune and Skeletal Systems. *Mol. Cells* **17**, 1–9 (2004).
 23. Heino, T. & Hentunen, T. Differentiation of Osteoblasts and Osteocytes from Mesenchymal Stem Cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **3**, 131–145 (2008).
 24. Arboleya, L. & Castañeda, S. Osteoclastos : mucho más que células remodeladoras del hueso. *Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.* **6**, 109–121 (2014).
 25. Riancho, J. & Delgado, J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatol. Clin.* **7**, S1–S4 (2011).

26. Ge, D., Wang, W., Chen, H., Yang, L. & Cao, X. Functions of microRNAs in osteoporosis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 4784–4789 (2017).
27. Asagiri, M. & Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* **40**, 251–264 (2007).
28. Humphrey, M. & Nakamura, M. A Comprehensive Review of Immunoreceptor Regulation of Osteoclasts. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **51**, 48–58 (2016).
29. Zhao, Q., Wang, X., Liu, Y., He, A. & Jia, R. NFATc1:Functions in osteoclasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 576–579 (2010).
30. Guo, K. *et al.* MiRNA - 199a - 5p positively regulated RANKL - induced osteoclast differentiation by target MafB protein. *J. Cell. Biochem.* 1–8 (2018).
31. Kim, K. *et al.* MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Am. Soc. Hematol.* **109**, 3253–3260 (2006).
32. Giner, V. & Sanf elix, J. *Gu a pr ctica de actuaci n en Atenci n Primaria.* (2004).
33. Clark, P., Tamayo, J., Cisneros, F., Carlos, F. & Vald es, M. Epidemiology of osteoporosis in Mexico . Present and future directions. *Rev. Investig. Cl nica* **65**, 183–191 (2013).
34. Ram rez, E. *et al.* Impact of osteoporosis-associated vertebral fractures on health-related quality of life in the Mexican population. *Rev. Investig. Cl nica* **66**, 225–233 (2014).
35. Giner, M. *et al.*  Qu  son los microARNs? Posibles biomarcadores y dianas terap uticas en la enfermedad osteopor tica. *Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.* **8**, 40–44 (2016).
36. Li, H. *et al.* A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 3666–3677 (2009).
37. Inose, H. *et al.* A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20794–20799 (2009).
38. Nakasa, T., Shibuya, H., Nagata, Y., Niimoto, T. & Ochi, M. The inhibitory effect of

- microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **63**, 1582–1590 (2011).
39. Jiménez, R. *et al.* Identification of microRNAs in human circulating monocytes of postmenopausal osteoporotic Mexican - Mestizo women : A pilot study. *Exp. Ther. Med.* **14**, 5464–5472 (2017).
 40. Piriyaopongsa, J. & Jordan, K. A Family of Human MicroRNA Genes from Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements. *PLoS One* **2**, e203 (2007).
 41. Gray, C., McCowan, L., Patel, R., Taylor, R. & Vickers, M. Maternal plasma miRNAs as biomarkers during mid-pregnancy to predict later spontaneous preterm birth: a pilot study. *Sci. Rep.* **7**, 815 (2017).
 42. Seeliger, C., Balmayor, E. & Van Griensven, M. miRNAs Related to Skeletal Diseases. *Stem Cells Dev.* **25**, 1261–1281 (2016).
 43. Peffers, M. *et al.* Decoding the Regulatory Landscape of Ageing in Musculoskeletal Engineered Tissues Using Genome-Wide DNA Methylation and RNASeq. *PLoS One* **11**, e0160517 (2016).
 44. Zhang, W. *et al.* Synergistic Effects of BMP9 and miR-548d-5p on Promoting Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–9 (2015).
 45. Arboleda, J. & Urcuqui-Inchima, S. Vitamin D-Regulated MicroRNAs: Are They Protective Factors against Dengue Virus Infection? *Adv. Virol.* **2016**, 1–14 (2016).
 46. Li, Y. *et al.* MicroRNA-548 down-regulates host antiviral response via direct targeting of IFN- λ 1. *Protein Cell* **4**, 130–141 (2013).
 47. Chakraborty T, Bancel S, Hoge S, Roy A, Antonin De F, A. N. *EBropean Patent No.EP2922554A1.* (2014).
 48. Tang, P., Xiong, Q., Ge, W. & Zhang, L. The role of MicroRNAs in Osteoclasts and Osteoporosis. *RNA Biol.* **11:11**, 1355–1363 (2014).
 49. Asagiri, M. *et al.* Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J. Exp. Med.* **202**, 1261–1269 (2005).

50. Song, I. *et al.* Regulatory mechanism of NFATc1 in RANKL-induced osteoclast activation. *FEBS Lett.* **583**, 2435–2440 (2009).
51. Cheng, P. *et al.* miR-148a Regulates Osteoclastogenesis by Targeting V-maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog B. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 1180–1190 (2013).
52. Mikán, J. & Oliveros, D. Osteoclastogénesis y Enfermedades Óseas. *Rev. Med* **15**, 261–270 (2007).