



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS VARIANTES DEL RECEPTOR DE
MOTILIDAD MEDIADO POR ÁCIDO HIALURÓNICO (*HMMR*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

JOSSELEN CARINA RAMÍREZ CHIQUITO



MÉXICO, CDMX, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESORA: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

VOCAL: PROFESOR: ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ

SECRETARIO: PROFESOR: SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ

1ER. SUPLENTE: PROFESORA: LIZBETH ESMERALDA GARCÍA VELÁZQUEZ

2º SUPLENTE: PROFESORA: MARÍA DEL CONSUELO PLATA RAMOS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.

TORRE DE INVESTIGACIÓN JOAQUÍN CRAVIOTO.

LABORATORIO DE ONCOLOGÍA EXPERIMENTAL.

DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ
ASESOR DEL TEMA

DRA. VANESSA VILLEGAS RUÍZ
SUPERVISOR TÉCNICO

JOSSELEN CARINA RAMÍREZ CHIQUITO
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Primeramente, quiero agradecer a mi *alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de superarme académica y personalmente, y al mismo tiempo, por darme las herramientas necesarias para contribuir al desarrollo de nuestra sociedad.

A mis asesores de tesis el Dr. Sergio Juárez Méndez y la Dra. Vanessa Villegas Ruíz por la oportunidad que me dieron para colaborar junto a ellos, el apoyo, la confianza, los consejos y conocimientos aportados para el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño y el Dr. Alberto Ortega Vázquez por la revisión de este trabajo, los comentarios, observaciones y las aportaciones realizadas para la mejora del mismo.

Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorgada (SALUD-16-01-272633-01-49) durante la realización de este proyecto, y por el financiamiento de la investigación (272633, “Identificación de variantes de RNA mensajero como marcadores de pronóstico temprano en pacientes con leucemia”).

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Corte y empalme de RNA mensajero: <i>splicing</i> , y su clasificación	8
1.1.1 Mecanismo de <i>splicing</i> : Spliceosoma	10
1.1.2 <i>Splicing</i> alternativo en cáncer	13
1.2 Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (<i>HMMR</i>).....	15
1.2.1 Variantes de RNAm de <i>HMMR</i>	17
1.3 <i>HMMR</i> en cáncer.....	18
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
5. MÉTODOS	22
5.1 Determinación del modelo experimental.....	22
5.1.1 Extracción de RNA	22
5.1.2 Síntesis de cDNA	23
5.1.3 PCR en punto final	23
5.1.4 Cuantificación relativa	24
5.1.5 Western Blot.....	25
5.1.5.1 Extracción y cuantificación de proteína.....	25
5.1.5.2 Electroforesis SDS PAGE	26
5.1.5.3 Transferencia semi-húmeda	26
5.1.5.4 Transferencia húmeda.....	27
5.1.5.5 Expresión proteica de <i>HMMR</i>	27
5.2 Expansión de las secuencias <i>HMMRV1</i> y <i>HMMRV3</i>	28
5.2.1 Desarrollo de bacterias competentes.....	28
5.2.2 Transformación bacteriana	28
5.3 Comprobación de las secuencias: <i>HMMRV1</i> y <i>HMMRV3</i>	31
5.3.1 Extracción de DNA plasmídico	30
5.3.1 Restricción enzimática.....	30
5.3.1 Secuenciación automatizada (Sanger)	31
5.4 Cultivo celular	32
5.4.1 Curva de crecimiento celular	32
5.4.2 Estandarización de concentración de antibiótico	33
5.4.2.1 Ensayo MTT	33

5.5 Transfección estable	33
5.6 Transfección transitoria	34
5.7 Ensayos de funcionalidad celular	35
5.7.1 Ensayo de migración celular.....	35
5.7.2 Ensayo de viabilidad celular	35
5.8 Análisis estadístico	35
6. RESULTADOS.....	36
6.1 Determinación del modelo experimental.....	37
6.2 Expansión y comprobación de las secuencias de <i>HMMR</i> : <i>HMMRV1</i> y <i>HMMRV3</i> ...38	
6.3 Ensayo de transfección estable en MDA-MB-231y HEK-293.....	41
6.4 El mejor modelo experimental es HEK-293 con transfección transitoria	49
6.5 La sobre-expresión de <i>HMMRV3</i> aumenta la viabilidad celular	53
6.6 La sobre-expresión de <i>HMMRV1</i> y <i>HMMRV3</i> promueven la migración celular.....	54
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
8. CONCLUSIONES	58
9. PERSPECTIVAS.....	59
10. BIBLIOGRAFÍA	60
11. ANEXOS	64
I. Validación de la eficiencia para la evaluación de expresión del gen <i>HMMR</i> y <i>HMMRV1</i> por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$	64
II. Cuantificación de proteínas: Método de Lowry	66
III. Ensayo de transformación bacteriana.....	67
IV. Cuantificación de DNA plasmídico	68
V. Estandarización de condiciones para el ensayo de transfección estable.....	69
VI. Ensayo de la herida para evaluar migración celular	70
VII. Preparación de soluciones amortiguadoras de pH utilizadas en Western Blot	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes del genoma humano.....	2
Figura 2. Clasificación del <i>splicing</i>	2
Figura 3. Mecanismo catalítico del <i>splicing</i>	2
Figura 4. Regulación del <i>splicing</i> alternativo.....	2
Figura 5. <i>Splicing</i> aberrante y las “marcas” del cáncer.....	2
Figura 6. <i>Splicing</i> alternativo en cáncer.....	2
Figura 7. Funciones del receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico(<i>RHAMM/HMMR</i>).....	2
Figura 8. Variantes de RNAm generados por <i>splicing</i> alternativo de <i>HMMR</i>	2
Figura 9. Expresión de <i>HMMR</i> (RNA y proteína) en condiciones fisiológicas normales.....	2
Figura 10. Niveles de expresión de <i>HMMR</i> en condiciones normales y en cáncer.....	2
Figura 11. Constructos de las variantes: <i>HMMRV1</i> y <i>HMMRV3</i>	2
Figura 12. Sitios de restricción enzimática.....	2
Figura 13. Localización de los iniciadores usados para la secuenciación Sanger.....	2
Figura 14. Expresión de <i>HMMR</i> en líneas celulares.....	2
Figura 15. Cultivo de línea celular: MDA-MB-231.....	2
Figura 16. Ensayos de restricción enzimática.....	2
Figura 17. Secuenciación Sanger de las <i>HMMRV1</i> y <i>HMMRV3</i> en el vector de expresión.....	2
Figura 18. Fotomicrografías de células MDA-MB-231 transfectadas.....	2
Figura 19. Expresión de las variantes de <i>HMMR</i> en células MDA-MB-231 transfectadas.....	2
Figura 20. Expresión de <i>HMMRV1</i> en células MDA-MB-231 transfectadas.....	2
Figura 21. Productos de PCR de las variantes <i>HMMRV1</i> , <i>HMMRV2</i> , <i>HMMRV3</i> y <i>HMMRV4</i>	2
Figura 22. Expresión de GFP en células MDA-MB-231.....	2
Figura 23. Cultivo de la línea celular HEK-293.....	2
Figura 24. Ensayo de transfección estable con las variantes de <i>HMMR</i> en células HEK-293.....	2
Figura 25. Transfección transitoria de las variantes de <i>HMMR</i> en células HEK-293.....	2
Figura 26. Expresión de <i>HMMRV1</i> y <i>HMMRV3</i> en células HEK-293 transfectadas.....	2
Figura 27. Expresión de GFP en células HEK-293 transfectadas.....	2
Figura 28. Ensayo de viabilidad celular.....	2
Figura 29. Ensayo de migración celular.....	2

ABREVIATURAS

BPS	Secuencia de ramificación
CGAP	Proyecto del genoma del cáncer
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESE	Potenciador exónico de <i>splicing</i>
ESS	Silenciador exónico de <i>splicing</i>
HA	Ácido hialurónico
HMMR	Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico
hnRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
HRP	Peroxidasa de rábano
ISE	Potenciador intrónico de <i>splicing</i>
ISS	Silenciador intrónico de <i>splicing</i>
LINEs	<i>Long Interspersed Elements</i>
LTRs	<i>Long Terminal Repeats</i>
MEC	Matriz extracelular
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa, cuantitativa
SA	<i>Splicing</i> alternativo
SAGE	Análisis en serie de la expresión génica
SINEs	<i>Short Interspersed Sequences</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Corte y empalme de pre-RNA mensajero: *splicing*, y su clasificación.

De acuerdo con la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) el número de genes validados (*RefSeq*) hasta el año 2019 es de 19,116 genes, lo que equivale casi al 1% del genoma (figura 1). Sin embargo, la cantidad de transcritos reportados en esta misma base, supera en gran medida la cifra anterior (49,632 transcritos)(Piovesan *et al.*, 2019). Uno de los mecanismos que contribuyen al entendimiento de tal evento, es el proceso de corte y empalme del pre-RNA mensajero, denominado *splicing* alternativo.

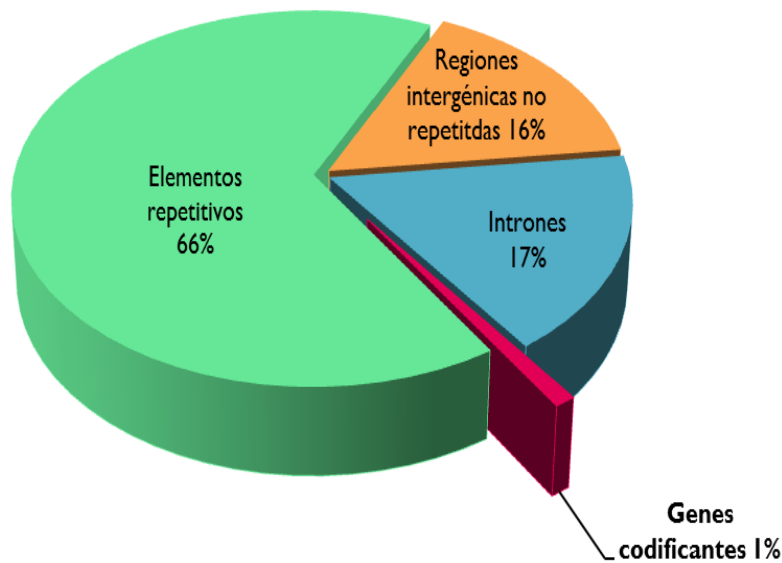


Figura 1. Componentes del genoma humano. Aproximadamente el 1 % del genoma corresponde a genes, las regiones intrónicas representan el 17% y los elementos repetitivos (LINEs, SINEs, secuencias simples repetidas, transposones, LTR, repetidos en tandem, etc.) representan entre el 66 y 69% (Zeller and Gasser, 2017) (de Koning *et al.*, 2011).

El *splicing* es un proceso biológico conservado, en el cual las regiones intrónicas del pre-RNA mensajero son escindidas y las regiones exónicas son ligadas, generando un RNA mensajero maduro. Existen dos tipos de *splicing*: el alternativo y el constitutivo. El *splicing* alternativo se caracteriza por la inclusión/exclusión selectiva de exones e intrones, a diferencia del *splicing* constitutivo donde la escisión de los intrones y la unión de los exones es consecutiva (Figura 2).

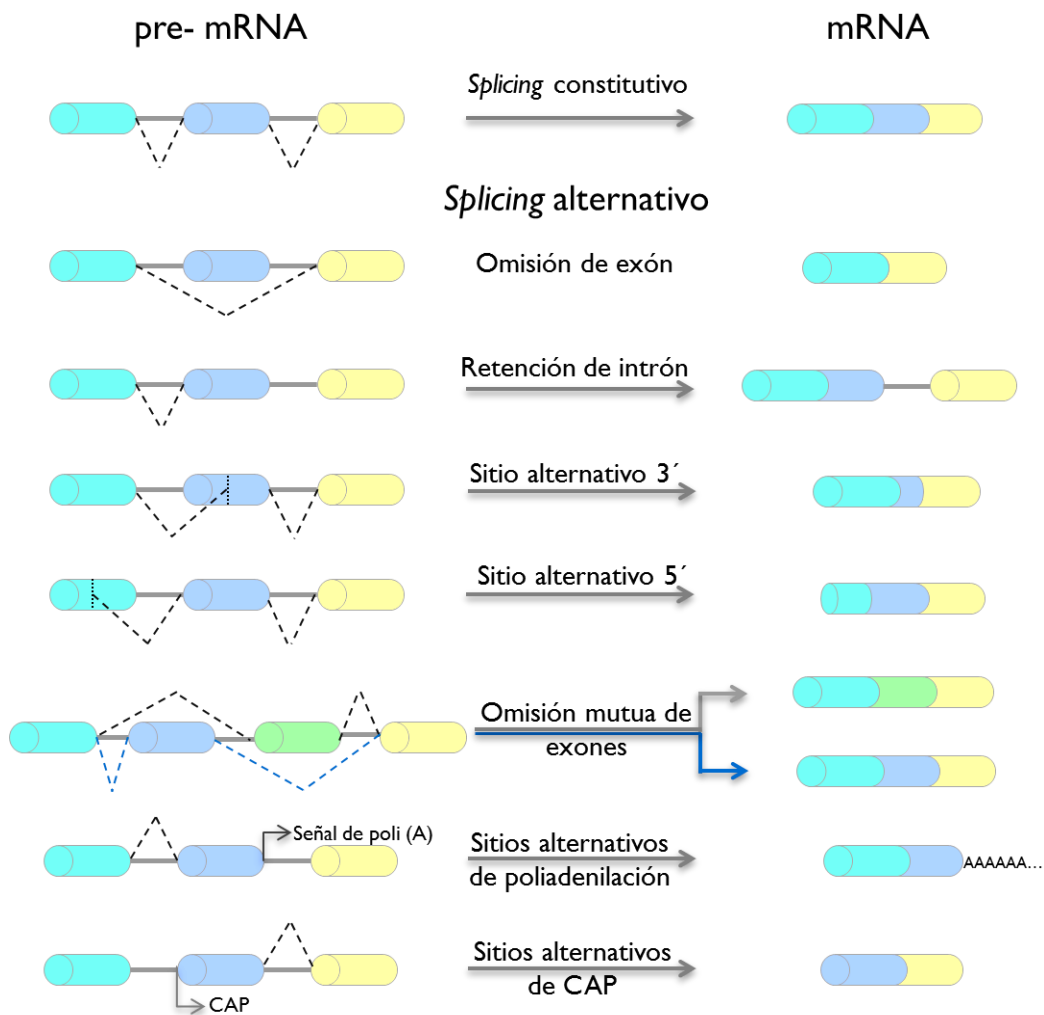


Figura 2. Clasificación del *splicing*. Existen dos tipos de *splicing*: constitutivo y alternativo, este último se divide de acuerdo con el tipo de arreglo que ocurre en el pre-mRNA en: omisión de exón (es), retención de intrón (es), sitios alternativos de *splicing* en extremos 3' o 5', omisión excluyente de exones, y sitios alternativos de poliadenilación y capuchón CAP. Modificado de (Chen and Weiss, 2015).

El *splicing* alternativo además de ser necesario para la maduración del RNA mensajero, es regulador de la expresión a nivel post-transcripcional, ya que se ha demostrado su capacidad para diversificar el transcriptoma, dependiendo del tipo y la condición celular. Se ha estimado que el 86% de los genes codificantes para proteína son procesados por este mecanismo (Wang *et al.*, 2008), y que en promedio existen siete transcritos distintos por cada gen codificante (Sveen *et al.*, 2016).

1.1.1 Mecanismo de *splicing*: *Spliceosoma*

El mecanismo de corte y empalme de pre-RNA_m sucede inmediatamente después de la transcripción y es catalizado por un complejo conformado por cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNAs) (U1, U2, U3, U4 y U6) y numerosos cofactores proteínicos, denominado *spliceosoma* (Will and Lührmann, 2011).

El procesamiento por *splicing* (Figura 3) inicia con el reconocimiento por las snRNAs U1 y U2 de secuencias específicas en los extremos 5' (GU) y 3' (AG) del pre-RNA_m (sitios de *splicing*: 5'ss y 3'ss) respectivamente. El ensamblaje es catalizado por el dominio carboxilo terminal de la polimerasa II, después se unen otros cofactores y el complejo resultante es llamado pre-*spliceosoma* (Matera and Wang, 2014).

Posteriormente, se une el trímero conformado por las snRNAs U4/U6 y U5, U5; se une al 5'ss y U6 a U2 formando un complejo pre-catalítico, las snRNAs U1 y U4 son desplazadas y mediante rearrreglos estructurales, el complejo adquiere la capacidad catalítica (*spliceosoma*) (Matera and Wang, 2014).

La primera reacción que lleva a cabo el *spliceosoma* es la trans-esterificación de tipo SN2, donde el extremo terminal 5' del intrón se liga a la adenina de la secuencia de ramificación (BPS) localizado río arriba de 3'ss, formando un asa intrónica. Después, la snRNA U5 cataliza la segunda reacción de trans-esterificación que escinde el 5'ss para separar al exón del asa intrónica, uniendo covalentemente los exones (Matera and Wang, 2014).

En seguida U5 se une a U6/U2 para formar un heterotrímero que permanece unido momentáneamente al asa intrónica y al RNAm, formando el complejo post-espliceosoma. Finalmente, el RNAm maduro es liberado y las snRNAs U2, U5 y U6 se separan del asa intrónica, para su reutilización en otros eventos de *splicing* (Matera and Wang, 2014).

La regulación del *splicing* (Figura 4) es mediada por la interacción entre secuencias en *cis* (en el pre-RNAm), como los potenciadores exónicos (ESEs) e intrónicos (ISE), los silenciadores exónicos (ESSs) e intrónicos (ISSs), factores en *trans*: proteínas SR (fosfoproteínas nucleares ricas en serinas argininas) y ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs). La colaboración entre estos elementos permite la promoción o inhibición del ensamblaje del spliceosoma (Wang *et al.*, 2015), comúnmente las SR reconocen sitios ESEs mientras que las hnRNPs reconocen secuencias ESSs (Matera and Wang, 2014).

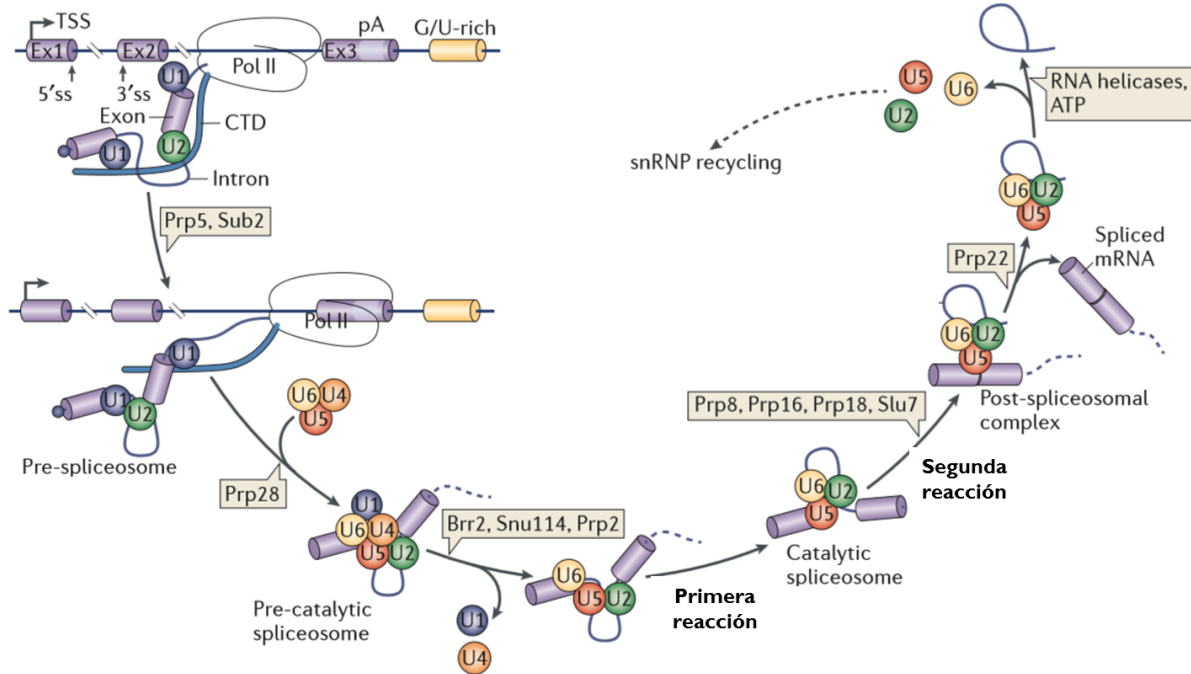


Figura 3. Mecanismo catalítico del *splicing*. Las snRNAs U1 y U2 se unen a los sitios de *splicing* 5' y 3' del pre-RNA: pre-spliceosoma, catalizada por Prp5 y Sub2. Después mediante la proteína Prp28 las snRNAs U5 y U4/U6 son reclutadas: spliceosoma pre-catalítico, el rearrreglo estructural catalizado por Brr2, Snu114 y Prp2 desplaza a U1 y U4, confiriendo la capacidad catalítica del spliceosoma. El complejo catalítico lleva a cabo la primera reacción, generando el asa intrónica, posteriormente, la U5 cataliza la segunda reacción que corta el 5'ss para separar al exón del asa intrónica, ligando covalentemente los exones. La unión de U2 U4 y U6 al asa, forman el complejo post-spliceosoma. Finalmente, las snRNAs son liberadas por RNA helicasa ATP dependiente, para su reciclado y el producto final es el RNAm maduro (Matera and Wang, 2014).

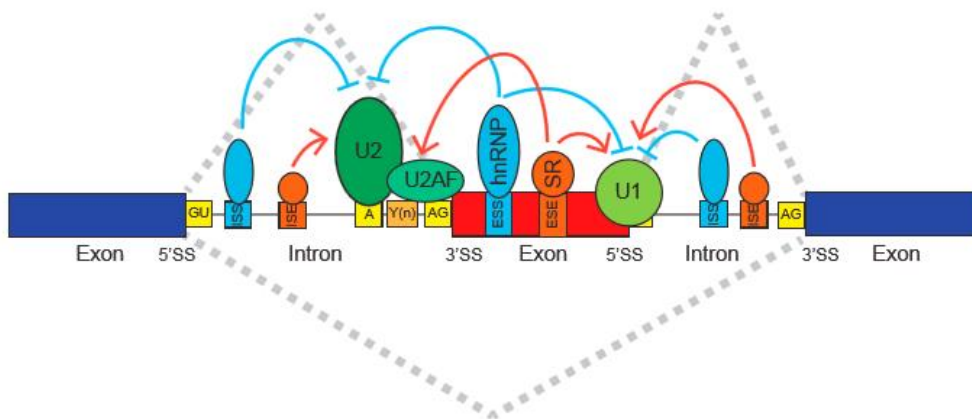


Figura 4. Regulación del *splicing* alternativo. La regulación de este proceso ocurre a través de interacciones proteína-RNA, entre factores en trans (proteínas U2AF, SR y hnRNP) que se unen a elementos en cis (sitios de *splicing* 5'ss y 3'ss) región de polipirimidinas (Y(n)) y secuencias ESEs, ISEs, ISSs, ESSs. Las flechas en rojo indican la promoción del *splicing*, mientras que las azules señalan su inhibición y las líneas punteadas representan los regiones posibles de escisión (Park et al., 2018).

1.1.3 *Splicing* alternativo en cáncer

El *splicing* alternativo constituye un proceso esencial para la expresión génica, también se ha identificado en diferentes procesos patológicos, como el cáncer, donde ha sido vinculado con las “firmas del cáncer” (Figura 5) (Oltean and Bates, 2014). Asimismo, se han dilucidado mecanismos aberrantes durante el *splicing* alternativo que se relacionan con distintas neoplasias (Sveen *et al.*, 2016).



Figura 5. *Splicing* aberrante y las “marcas” del cáncer. El empalme alternativo de genes (recuadro) se ha relacionado con las características del cáncer (círculos).

Algunos de los genes cuyas variantes están asociadas a las “marcas” del cáncer (Figura 6) son: el receptor al factor de crecimiento epidermal (*EGFR*), el transcrito carente del exón 4, produce una proteína constitutivamente activa, promoviendo la proliferación (Oltean and Bates, 2014). Otro ejemplo es el gen *BCLX*, transcrito generado a partir de un sitio alternativo de *splicing* en el extremos 5', produce una isoforma de menor longitud (*BCL-xS*), que tiene un efecto pro-apoptótico en comparación con la proteína de mayor longitud (*BCL-xL*) con función anti-apoptótica (Cloutier *et al.*, 2008).

En relación con la invasión celular, la variante de RNAm del gen *Ron* codifica para un receptor tirosina cinasa; el transcrito carente del exón 11 (ΔRon) promueve la motilidad celular, y se ha visto sobre-expresado en diferentes tipos de cáncer (Ghigna *et al.*, 2005).

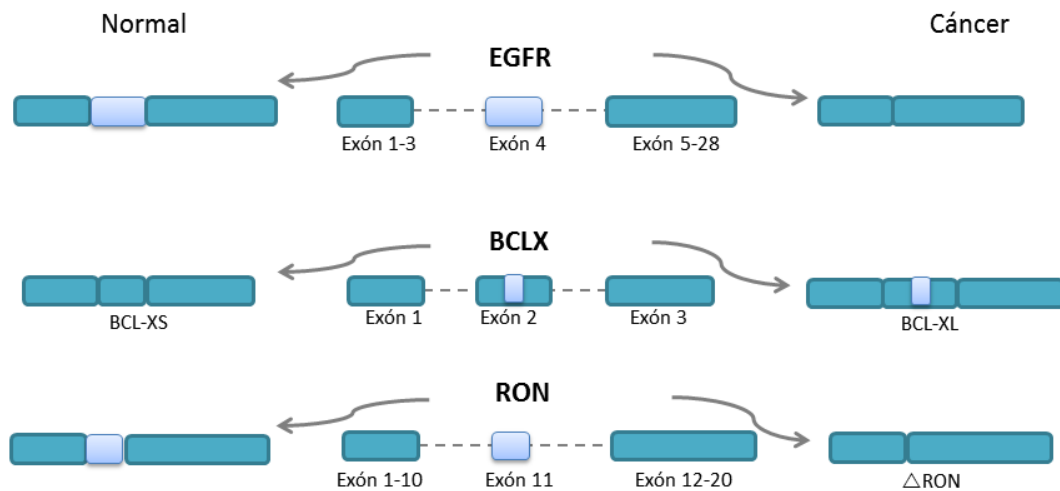


Figura 6. Splicing alternativo en cáncer. Transcritos alternativos de genes asociados con las características del cáncer. La isoforma de *EGFR* donde se omite el exón 4 incrementa la proliferación celular, la variante *BCL-xL* generada por un sitio alternativo de *splicing* en el extremo 5', se considera un factor anti-apoptótico, el transcrito alternativo de *RON* que carece del exón 11 se relaciona con la invasión celular. Los rectángulos de color azul fuerte representan los exones que no se modifican, mientras que los de color azul claro a aquellos exones en donde se lleva a cabo el *splicing* alternativo.

1.2 Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico: *HMMR*

El gen *HMMR* denominado también *CD168* o *RHAMM* se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma cinco en la región q34 y tiene una longitud de 31,743 nucleótidos. El transcrito canónico de este gen está conformado por 18 exones y codifica para el receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (HMMR) de 725 aminoácidos, cuyo peso es de 84.1 kDa (NCBI, 2019).

HMMR fue identificado por primera vez en el sobrenadante de cultivo de fibroblastos de pollo, en forma soluble como un componente de la matriz extracelular (MEC) asociado con ácido hialurónico (HA) (Turley, 1982). Como su nombre lo indica, esta proteína, se encuentra relacionada con la motilidad celular, además de participar en la regulación del ciclo celular en la fase M, mediante la formación del huso mitótico por la activación de genes mitogénicos (Misra *et al.*, 2015).

A nivel de proteína, HMMR se localiza tanto en la superficie de la membrana, citoplasma y núcleo (Okamoto *et al.*, 1999); carece de un dominio transmembranal, (Turley, Noble and Bourguignon, 2002) así como de un péptido señal (Klewes, Turley and Prehm, 2015) y cuenta con un dominio de unión a HA, denominado Bx7B en el carboxilo terminal (Toole, 2001).

HMMR tiene diversas funciones (Figura 7), a nivel extracelular interactúa con receptores tirosina cinasa, con el receptor de HA (CD44) (Tolg *et al.*, 2006), TGF β (Park *et al.*, 2012), PDGFR (Zhang *et al.*, 1998), bFGFR (Savani *et al.*, 2001) y con HA; estas interacciones modulan la motilidad celular, a través de la vía ERK1/2/MAPK, aún en ausencia de HMMR intracelular.

Intracelularmente HMMR tiene capacidad de unión a filamentos de actina, microtúbulos en citoesqueleto (Yang *et al.*, 1994)(Assmann *et al.*, 1999) e interactúa con las cinasas ERK y SCR. Además, se ha reportado que HMMR al unirse a otras proteínas es capaz de regular la dinámica de los microtúbulos y del centrosoma, al activar las cascadas de señalización ERK1/2/MAPK, desencadenando la migración celular debido a la polarización del citoesqueleto.

En el núcleo, HMMR también se une a ERK1/2/MAPK, regulando la transcripción de genes relacionados con la motilidad celular y la degradación de MEC, como PAI-1 y MMP-9 (Tolg *et al.*, 2014a). Además, en su forma citoplásmica o nuclear, HMMR puede asociarse con elementos aurora cinasa A del citoesqueleto (AURKA) modificando la organización mitótica y la progresión del ciclo celular (Jiang *et al.*, 2010).

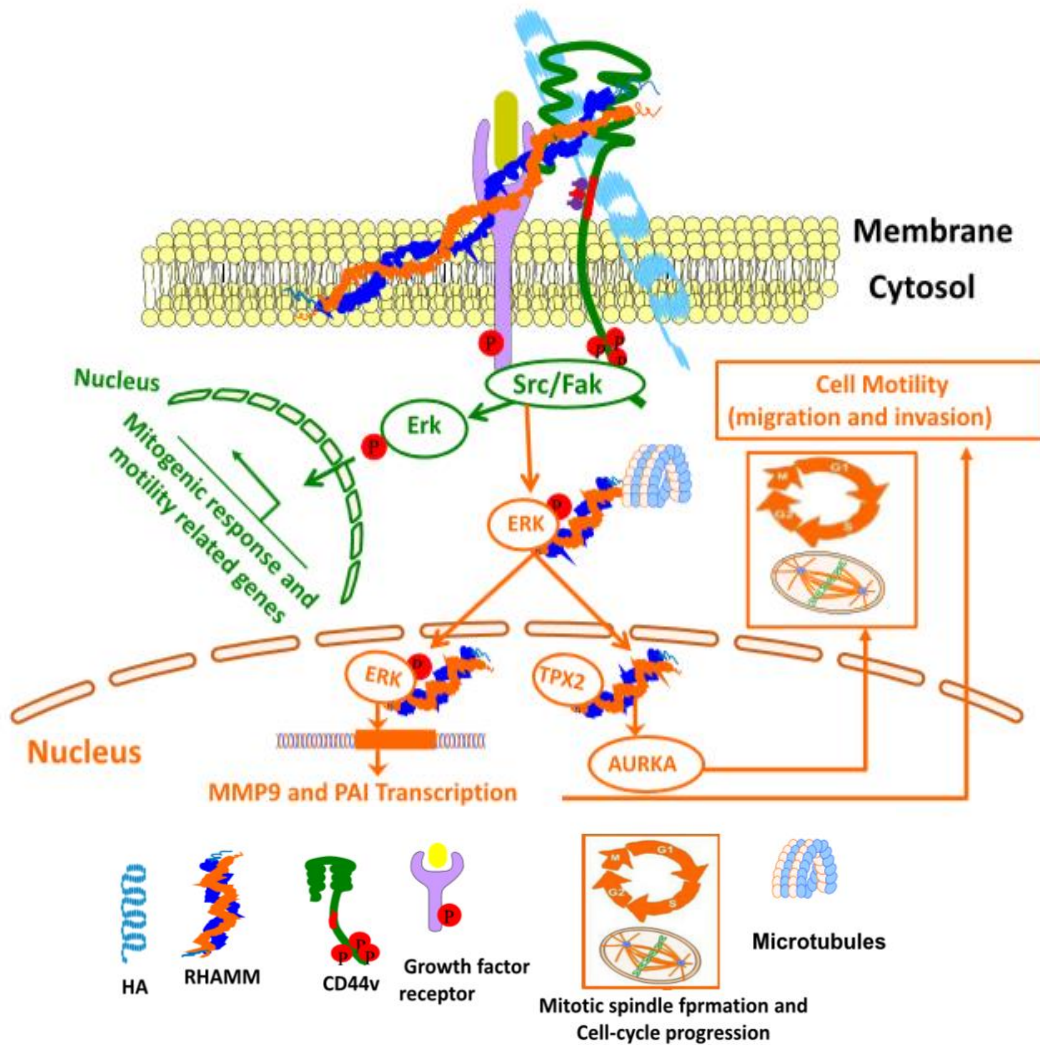


Figura 7. Funciones del receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (RHAMM/HMMR).

La vía verde señala las funciones de HMMR cuando se encuentra a nivel extracelular: HMMR se une a CD44, HA y receptores de factores de crecimiento (GFR), este complejo es activador de la vía ERK1/2/MAPK, en consecuencia, incrementa la motilidad celular mediante la activación de la transcripción de genes relacionados con la motilidad y la respuesta mitogénica. La vía naranja indica las funciones de HMMR cuando existe intracelularmente: la activación de MEK/Erk1/2 permite que HMMR ingrese al núcleo, donde es capaz de activar la transcripción de genes involucrados en la motilidad y la degradación de la matriz extracelular como PAI-1 y MMP-9; además al unirse con las proteínas TPX2 y AURKA regula la dinámica de los microtúbulos y la progresión del ciclo celular (Modificado de (Misra *et al.*, 2015).

1.2.1 Variantes de RNAm de *HMMR*

Se ha reportado en humanos, que *HMMR* tiene cuatro transcritos distintos codificantes para proteínas independientes (Figura 8). La variante canónica de *HMMR* corresponde a la variante 1 (*HMMRV1*), conformada por 18 exones cuya longitud es de 3,144pb, este transcrito codifica la isoforma de 725 aminoácidos.

La variante 2 de *HMMR* (*HMMRV2*), tiene un sitio alternativo de *splicing* en el extremo 5' que genera una pérdida de tres nucleótidos, por lo que su longitud es de 3,141pb organizadas en 18 exones y 17 intrones, dando lugar a una proteína de 724 aminoácidos.

El tercer transcrito de este gen es la variante 3 (*HMMRV3*), caracterizada por la omisión del exón 4 y con una longitud de 3,096 pb, codificando para una proteína de 709 aminoácidos. Finalmente, la variante 4 (*HMMRV4*) se diferencia por carecer de los exones 2, 3 y 4, tiene una longitud de 2,917pb, y la proteína para la que codifica es de 638 aminoácidos (NCBI, 2018).

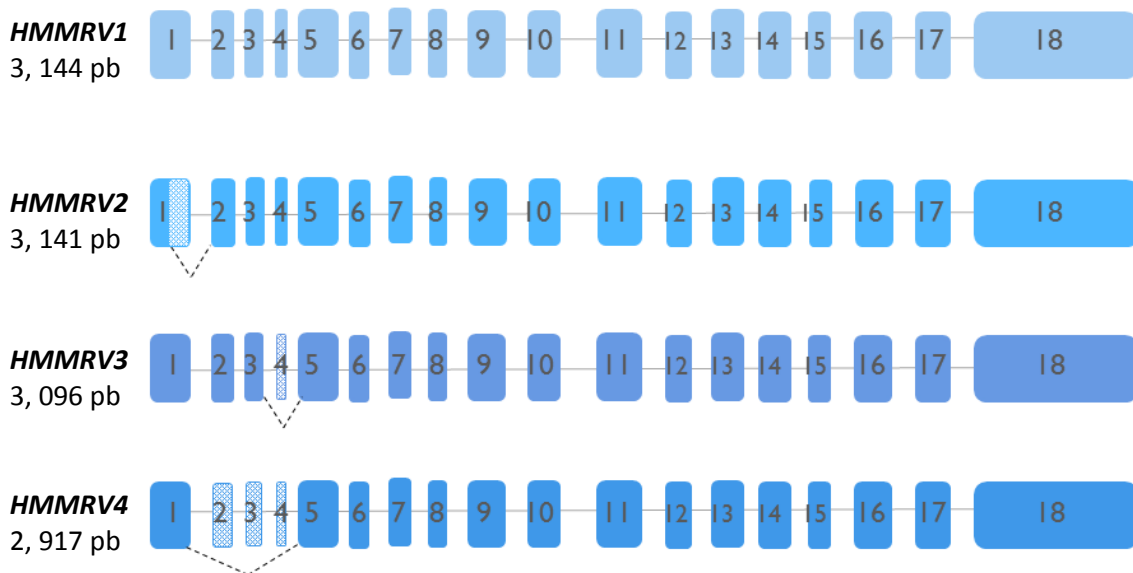


Figura 8. Variantes de RNAm generados por *splicing* alternativo de *HMMR*. Los esquemas hacen referencia a la longitud de cada una de las secuencias (*HMMRV1*: NM_001142556.2, *HMMRV2*: NM_012484.2, *HMMRV3*: NM_012485.2, *HMMRV4*: NM_001142557.1), los recuadros sólidos indican los exones mientras que los sombreados indican las regiones escindidas, las líneas punteadas señalan los sitios de *splicing*.

Aunque se conocen las secuencias de aminoácidos de cada variante de *HMMR*, aún no se ha descrito la localización ni función de éstas y tampoco se han reportado sus estructuras tridimensionales.

1.2.2 *HMMR* en cáncer

En condiciones fisiológicas normales la expresión de *HMMR* es baja, con excepción de la expresión en testículos (Figura 9). Sin embargo, en algunos procesos patológicos la expresión de *HMMR* se incrementa (Tolg *et al.*, 2014b) como en cáncer de próstata (Gust *et al.*, 2015), mama (Veiseh *et al.*, 2014), vejiga (Niedworok *et al.*, 2013) y glioblastoma (Tilghman *et al.*, 2014), entre otros.

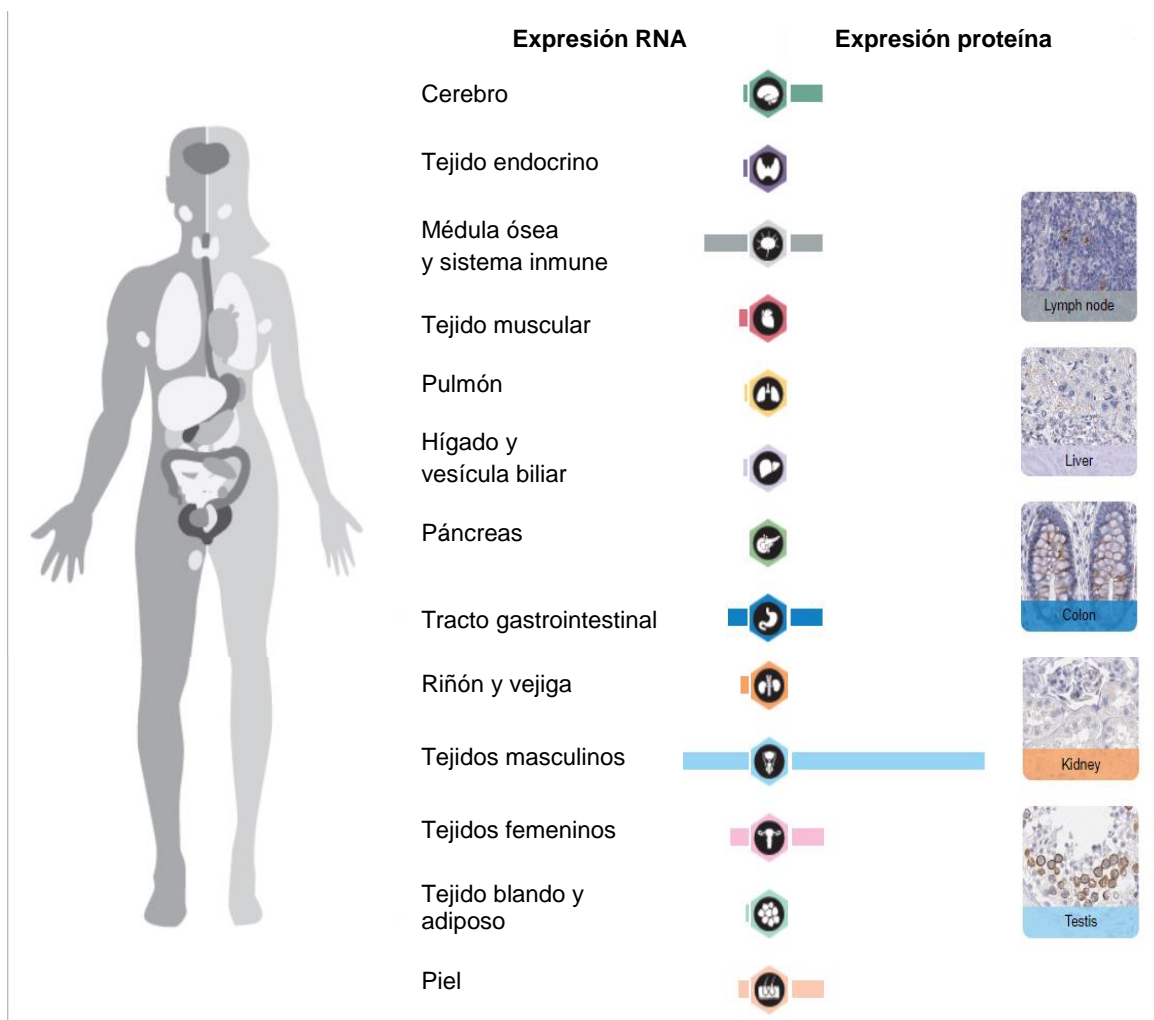
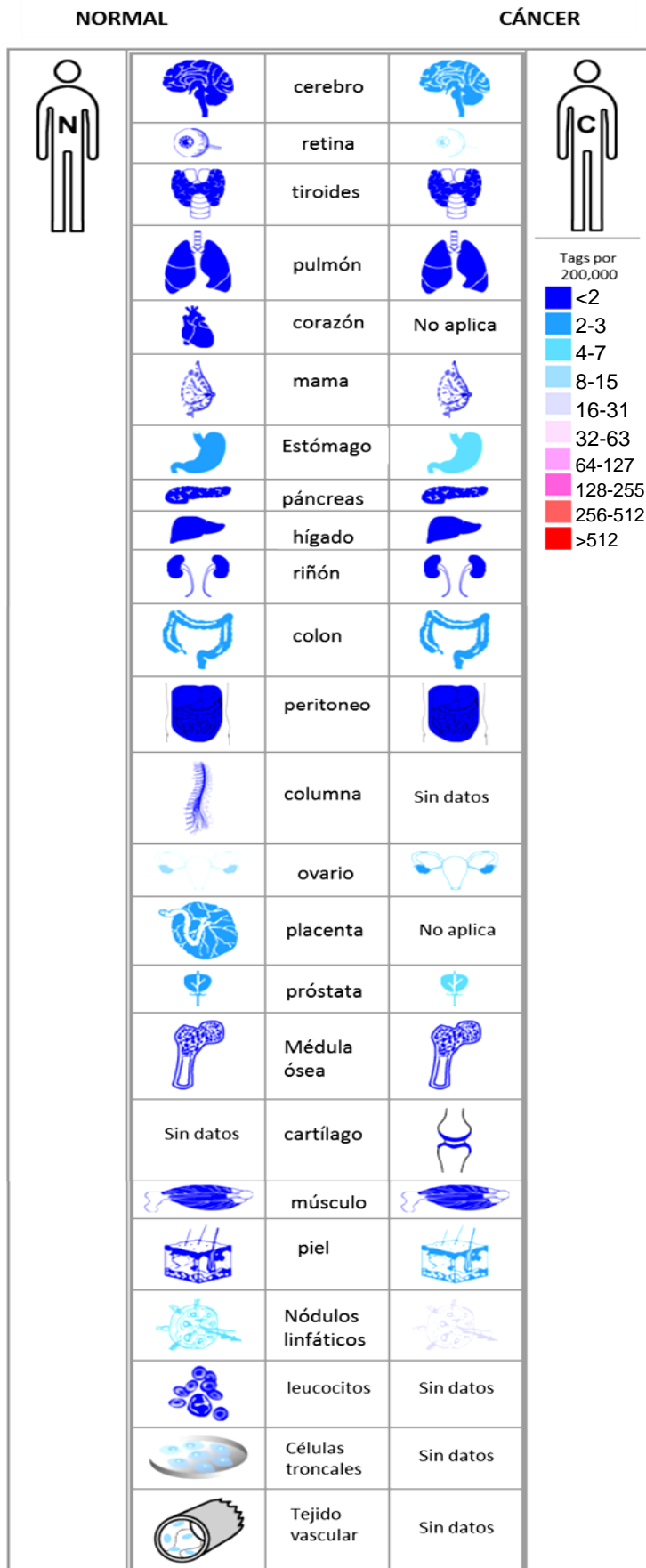


Figura 9. Expresión de *HMMR* (RNA y proteína) en condiciones fisiológicas normales. Las barras indican los niveles de expresión basados en; TPM (transcritos por millón) para RNA, resultado de RNA-seq y para proteína se puntúa un score obtenido a partir de ensayos de inmunohistoquímica. Cada barra representa la puntuación de expresión más alta encontrada en un grupo particular de tejidos (modificado de *The Human Protein Atlas*, 2019).



De acuerdo con el Análisis en Serie de Expresión Génica (SAGE) disponible en el *Cancer Genome Anatomy Project* (CGAP) (Figura 10) *HMMR* se expresa más en cáncer de retina, próstata y piel, con aproximadamente 8-15 copias por cada 200,000. En contraste los tipos de cáncer con menor expresión de *HMMR* son el de tiroides, hígado, riñón entre otros, con menos de 2 copias por cada 200,000.

Además, la sobre-expresión de *HMMR* se ha correlacionado con la progresión de cáncer de ovario (Buttermore *et al.*, 2017) y de vejiga (Niedworok *et al.*, 2013), invasión en cáncer gástrico (Ishigami *et al.*, 2011), así como con metástasis en carcinoma pulmonar de células no pequeñas (Dunrui Wang *et al.*, 2016).

Figura 10. Niveles de expresión de *HMMR* en condiciones normales y en cáncer. SAGE de *HMMR* en diferentes tejidos (modificado de CGAP, 2019).

Aún hay bastante por dilucidar respecto a las variantes el gen *HMMR*, entre los reportes existentes se ha visto que; en adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas, la expresión de *HMMRV3* es alta en comparación con las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV4* (Dunrui Wang *et al.*, 2016). De forma similar se reportó que en muestras de pacientes con mieloma múltiple, la relación de expresión a nivel de RNAm de *RHAMM V3/RHAMM* canónica correlaciona inversamente con la supervivencia (Maxwell *et al.*, 2004). Otro ejemplo es en líneas celulares de cáncer de mama, donde se encontró que la baja expresión de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV2* estaba correlacionada con la radioresistencia (Schutze *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

El *splicing* alternativo es un proceso fundamental para la regulación de la expresión génica, además, contribuye a la diversificación del transcriptoma y proteoma, por lo que, su participación en el desarrollo y diferenciación celular es elemental. Sin embargo, diversos eventos de *splicing* alternativo y su desregulación se han relacionado con procesos patológicos, entre ellos el cáncer.

El cáncer comprende una enfermedad compleja, puesto que representa una red de funciones celulares alteradas; en la actualidad se han reportado numerosas variantes generadas por *splicing* alternativo que promueven el desarrollo y la progresión de la enfermedad, algunas variantes generadas por *splicing* alternativo han permitido el diseño de estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Pese a los numerosos hallazgos alrededor de este evento y su implicación en cáncer, lo que se conoce es mínimo frente a lo que aún falta por dilucidar. Uno de los genes que se sabe es procesado por *splicing* alternativo y que además se ha relacionado con el cáncer es el gen del receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (*HMMR*).

HMMR participa en la motilidad y proliferación celular, se ha reportado la sobre-expresión en diversos tipos de cáncer; y su correlación positiva con la proliferación, migración y metástasis. Este gen tiene cuatro transcritos generados por *splicing* alternativo (*HMMRV1*, *HMMRV2*, *HMMRV3* y *HMMRV4*) que codifican para proteínas independientes. Se ha descrito que las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3* de RNAm son las de mayor expresión en muestras de cáncer. Sin embargo, aún se desconoce que isoforma(s) atribuyen al proceso neoplásico. Por lo tanto, esta investigación es de relevancia para estudiar la función de las variantes de *HMMR*.

3. HIPÓTESIS

La sobre expresión de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3* en un modelo *in vitro* promoverá el incremento de la capacidad replicativa e invasiva de las células.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la función celular de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3*.

Objetivos particulares

Sobre-expresar las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3* en un modelo celular.

Determinar el efecto de la sobre-expresión de *HMMRV1* y *HMMRV3*, en la viabilidad y la migración celular.

5. MÉTODOS

5.1 Determinación del modelo experimental de transfección.

Para determinar el modelo experimental de sobre-expresión de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3*, se analizó la expresión de *HMMR* en 22 líneas celulares disponibles en el laboratorio.

5.1.1 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de las líneas celulares, se empleó el *Kit RNeasy* (*Qiagen*, Valencia, CA, USA), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. De forma breve, se lavaron las células con PBS1X, se adicionaron 500µL de buffer de lisis RLT y se disgregaron las células en el *TissueLyser system* (*Qiagen*, Valencia, CA, USA) durante 2 min a 25 Hz. Se adicionó etanol 70% 1:1 al lisado y se transfirió a la columna, se neutralizó con Buffer RW1, se realizaron dos lavados con buffer RPE y se eluyó el RNA con 35µL de H₂O libre de RNAsa. La concentración de las muestras se midió mediante espectrofotometría en el equipo *NanoDrop One UV-Vis* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA).

5.1.2 Síntesis de cDNA

Previo a la síntesis de cDNA se realizó un tratamiento con DNAsa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) empleando 5000ng de RNA total, H₂O DEPC, 1μL de Buffer 10X y 1U de enzima, en un volumen final de 10μL. La reacción se incubó a 37°C por 30 minutos, se añadió 1μL de EDTA 50mM y se incubó a 65°C durante 10 minutos. Para la síntesis de cDNA se empleó el *kit Revert Aid Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) se realizó un mix que contenía H₂O DEPC, 4μL de buffer 5X, dNTPs Mix 0.5mM, *random hexamers* 100pmol, 10U de *RiboLock RNase Inhibitor* y 200U de *RevertAid Reverse Transcriptase*. La reacción se incubó a 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos y 70°C durante 10 minutos. La concentración final de cDNA obtenido fue de 250ng/μL.

5.1.3 PCR en punto final

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizaron 7.5μL del mix *KAPA 2G Fast HotStar Ready Mix* (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA), 10mM de primer *forward*, 10mM de primer *reverse* y 25ng de cDNA, llevando a un volumen final de 15μL con H₂O DEPC. Las condiciones de incubación fueron un ciclo de pre-desnaturalización a 95°C por 3 minutos, seguido de 38 ciclos de amplificación: 95°C por 15 segundos, temperatura de alineamiento (T_m) de cada par de iniciadores (Tabla 1) por 15 segundos y 72°C durante 15 segundos. Finalmente, un ciclo de extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos obtenidos se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, a 90 Volts durante 35 minutos.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para PCR en punto final.

Gen	Secuencia	T _m (°C)	Tamaño del producto (pb)
RPL4	<i>Forward</i> 5'- CGAATGAGAGCTGGCAAAGGCAAA-3'	60	243
	<i>Reverse</i> 5'- ACGCCAACCTGCCGTACAATTCATC-3'		
RPS18	<i>Forward</i> 5'- AATCCACGCCAGTACAAGATCCCA-3'	60	240
	<i>Reverse</i> 5'- TTTCTTCTTGGACACACCCACGGT-3'		

HMMR	<i>Forward</i> 5'-GCGTTAACAGCCAGTGAGATAG-3'	57	98
	<i>Reverse</i> 5'-TGCTGAACATCCTCTGCA-3'		
HMMR V1	<i>Forward</i> 5'-AATGACCCTTCTGGTTGTGC-3'	57	206
	<i>Reverse</i> 5'-TTTTGAGATTCCTTCTTTGATTCCG-3'		
HMMR V2	<i>Forward</i> 5'-CCAGGTGCTTATGATGTTAAACT-3'	57	173
	<i>Reverse</i> 5'-TGAGATTCCTTTGATTCCGAAGAC-3'		
HMMR V3	<i>Forward</i> 5'-CGGAATCAAAGATTCGTGTTCT-3'	57	300
	<i>Reverse</i> 5'-TAGCCATCATACCCCTCATCT-3'		
HMMR V4	<i>Forward</i> 5'-GACCCTTCTGATTCGTGTTCT-3'	57	105
	<i>Reverse</i> 5'-GCAGCATTTAGCCTTGCTTC-3'		

5.1.4 Cuantificación relativa

Para el análisis de la expresión por PCR en tiempo real se utilizó el *kit Kapa Sybr Fast qPCR Master Mix (2x)* (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA). Se preparó un master mix adicionando H₂O DEPC, reactivo *Kapa Sybr Fast* que contiene MgCl₂ 2.5mM, primer *forward* 10µm y primer *reverse* 10µm y se emplearon 10ng de cDNA.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *Step One Real-Time PCR System* (Applied Biosystem Inc, California, USA) en las siguientes condiciones: 95°C por 10 min, 40 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos seguido de 30 segundos a la T_m de cada par de iniciadores (Tabla 2) y un ciclo a 95°C durante 15 segundos. Finalmente se creó una curva de disociación en un intervalo de temperatura de 55°C a 95°C cuantificando cada +0.3°C.

Para la validación del método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$, se realizaron curvas estándar empleando cDNA de la línea celular SUP-B15, el gen de referencia evaluado

fue *RPS18*. Para cada curva se utilizaron 5 concentraciones estándar, iniciando con 100ng/μL aplicando el factor de dilución 1:5. Las condiciones de ciclaje fueron las anteriormente descritas.

Tabla 2. Secuencias de iniciadores utilizados para PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño del producto (pb)
<i>RPS18</i>	<i>Forward</i> 5'-CAG CCA GGT CCT AGC CAA TG -3'	60	82
	<i>Reverse</i> 5'-CCA TCT ATG GGC CCG AAT CT -3'		
<i>HMMR</i>	<i>Forward</i> 5'-GCGTTAACAGCCAGTGAGATAG-3'	58	98
	<i>Reverse</i> 5'-TGCTGAACATCCTCTGCA-3'		
<i>HMMR V1</i>	<i>Forward</i> 5'- AATGACCCTTCTGGTTGTGC-3'	57	206
	<i>Reverse</i> 5'-TTTTGAGATTCCTTCTTTGATTCCG-3'		

5.1.5 Western Blot

Para evaluar la expresión proteica de HMMR y la expresión de la etiqueta (proteína verde fluorescente, GFP) en diversas condiciones celulares se hizo Western Blot. Brevemente, las muestras proteicas se separaron por electroforesis, se transfirieron a membranas PDVF y se expusieron a los anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés, después el complejo antígeno-anticuerpo se expuso a un segundo anticuerpo conjugado con una enzima (peroxidasa de rábano, HRP) con afinidad por el anticuerpo primario. Finalmente, para evidenciar el complejo formado se añadió el sustrato de la enzima y se reveló la quimioluminiscencia.

5.1.5.1 Extracción y cuantificación de proteína

La extracción de proteínas totales a partir de muestras de líneas celulares, se realizó empleando buffer de lisis compuesto por: Buffer RIPA (*Sigma Aldrich*, MS USA), cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete 25X (*Sigma Aldrich*, MS USA) y PMSF 50mM.

Las células previamente cuantificadas se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se decantó y se resuspendió el botón con buffer de lisis en una proporción de 100µL por cada millón de células. Después se incubó a 4°C durante 60 minutos, con agitación vigorosa cada 5 minutos por 30 segundos. Se centrifugó a 12 000 rpm a 4°C durante 20 minutos, finalmente se conservó el sobrenadante a -70°C.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Lowry, para ello se empleó el *Kit DC Protein Assay (BioRad, CA USA)*. Se realizó una curva estándar de BSA (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ug/uL) las muestras se diluyeron en proporciones 1:5 y 1:10. Para cada cuantificación se utilizó un volumen de 10µL de muestra o estándar, 25µL de reactivo A' (reactivo A 1mL/20µL reactivo S) y 200µL de reactivo B, después se homogeneizó durante un minuto y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente, se midió la absorbancia a 750nm en el espectrofotómetro *SpectraMax plus 384 (Molecular Devices, CA USA)*.

5.1.5.2 Electroforesis SDS PAGE

Se prepararon geles de acrilamida al 10%, de 1.5mm. La cantidad de proteína empleada para cada evaluación fue de 40µg. Para la preparación de las muestras se adicionó 1/5 del volumen del buffer de carga con β-mercaptoetanol 5%. Posteriormente, la desnaturalización se llevó a cabo colocando las muestras en un baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Para la electroforesis se empleó buffer de corrimiento Tris/Glicina /SDS pH 8.3 (preparación Anexo VII), las condiciones de corrimiento fueron a 130V/2horas/4°C.

Para evaluar la integridad de las proteínas después de la electroforesis se tiñeron los geles con azul de Coomassie.

5.1.5.3 Transferencia semi-húmeda

Para la transferencia se emplearon membranas de PDVF, se activaron con metanol durante 1 minuto. Posteriormente, se incubaron los geles, membranas y papel filtro durante 15 minutos a temperatura ambiente en buffer Bjerrum Schafer-Nielsen pH 9.2 (preparación Anexo VII). Las condiciones de transferencia fueron 0.31A/40min, después

de la transferencia la membrana se tiñó con rojo de Ponceau y el gel con azul de Coomassie, con la finalidad de visualizar las proteínas transferidas.

5.1.5.4 Transferencia húmeda

En la transferencia húmeda se utilizaron membranas de PDVF activadas con metanol durante 1 minuto y buffer de transferencia Towbin pH 8.3 (preparación Anexo VII). Las condiciones de transferencia fueron 400mA / 1:08 horas/ 4°C. Para visualizar las proteínas transferidas la membrana se tiñó con rojo de Ponceau y el gel con azul de Coomassie.

5.1.5.5 Expresión proteica de HMMR

Después de la transferencia las membranas se bloquearon, incubando en una solución de leche descremada (Svelty, *total move*, deslactosada) al 5% en TBS-Tween 0.5%, durante 30 minutos (1hora en el caso de GFP). Posteriormente, las membranas se incubaron una noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en la solución antes descrita; las concentraciones de anticuerpo primario empleadas son las siguientes: anti-HMMR 1:1000 (Abcam CAM, UK. No. Catalogo Ab185728), anti- β actina 1:1000 (*Santa Cruz Biotechnology* TX, USA. No. Catalogo Sc-47778), anti-GFP 1:3000 (*Origene Rockville*, MD, EUA No. catalogo TA150041)

Al finalizar la incubación se realizó una serie de tres lavados con TBS 1X-Tween 0.5% por 5 minutos cada uno (5 repeticiones en el caso de GFP). En seguida la membrana se incubó con anticuerpo secundario diluido en solución de leche descremada al 5% en TBS-Tween 0.5%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las concentraciones de los anticuerpos secundarios son las siguientes: anti-rabbit IgG-HRP 1:2000 (*Santa Cruz Biotechnology* TX, USA. No. Catálogo Sc-2004), anti-mouse Ig-G 1:50,000 (*Jackson Immunoresearch*, PA, USA. No. Catalogo 615-035-214).

Transcurrido el periodo de incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados con TBS 1X-Tween 0.5% por 5 minutos cada uno. Finalmente, las reacciones antígeno-anticuerpo inmobilizadas en las membranas de PDVF, se evidenciaron por

quimioluminiscencia añadiendo el sustrato de la enzima (luminol) conjugada al anticuerpo secundario (peroxidasa de rábano, HRP).

5.2 Expansión de las secuencias de *HMMRV1* y *HMMRV3*.

5.2.1 Desarrollo de bacterias competentes

Se realizó un pre-cultivo de 10 μ L de bacterias *Escherichia coli* TOP 10 en 25mL de medio líquido LB a 37°C a 300 rpm, durante 16 horas. Como control negativo se empleó medio LB sin bacterias. Posteriormente, se inocularon 200 μ L del pre-cultivo en tubos con 30mL de medio líquido LB a 37°C, a 300 rpm, durante 3.5 horas. Se detuvo el crecimiento bacteriano hasta obtener una densidad óptica de entre 0.375 y 0.5, a 595nm.

Este cultivo se incubó a 4°C, 15 minutos y se centrifugó a 4°C, 10,000rpm por 10 minutos. Después se decantó el medio y se resuspendió el botón celular en 4mL de una solución de: $C_2H_3KO_2$ 30mM, RbCl 100mM, $CaCl_2$ 10mM, $MgCl_2$ 50mM y $C_3H_8O_3$ 15%. Se incubó en hielo por 15 minutos, después se centrifugó a 4°C, 10,000rpm por 10 minutos y se decantó. Finalmente, se resuspendió el botón celular con 2mL de una solución de: $C_7H_{15}NO_4S$ 10mM, $CaCl_2$ 75mM, RbCl 10mM y $C_3H_8O_3$ 15%. Se hicieron alícuotas de 50 μ L de bacterias competentes y se almacenaron a -70°C.

5.2.2 Transformación bacteriana

Para la transformación se emplearon 3 vectores distintos, adquiridos comercialmente: vector vacío pCMV6-AC-GFP (Figura 11A) (*Origene*, Rockville, MD, EUA), vector HMMR variante 1 RG227613 (Figura 11B) (*Origene*, Rockville, MD, EUA), y vector HMMR variante 3 RG213373 (Figura 11C) (*Origene*, Rockville, MD, EUA); todos con el marcador de resistencia a ampicilina.

Se añadieron 300ng de DNA de cada vector a 50 μ L de bacterias competentes *Escherichia coli* TOP 10. La mezcla anterior se incubó en hielo por 5 min, después a 42°C por 45seg y finalmente a 4°C por 5 min. Se inoculó toda la mezcla en 1mL de medio LB y se incubó por a 37°C, 275 rpm durante 1.5 horas. Del cultivo anterior se inocularon placas de agar LB y agar LB con ampicilina y se incubaron a 37°C, una

noche (Anexo II). Las bacterias que crecieron en medio con antibiótico, correspondieron a las células que adquirieron el vector de interés. Posteriormente, se seleccionó una colonia de bacterias transformadas y se inoculó en 8.5mL de caldo LB con ampicilina e incubó a 37°C por 16 horas para su posterior extracción de DNA.

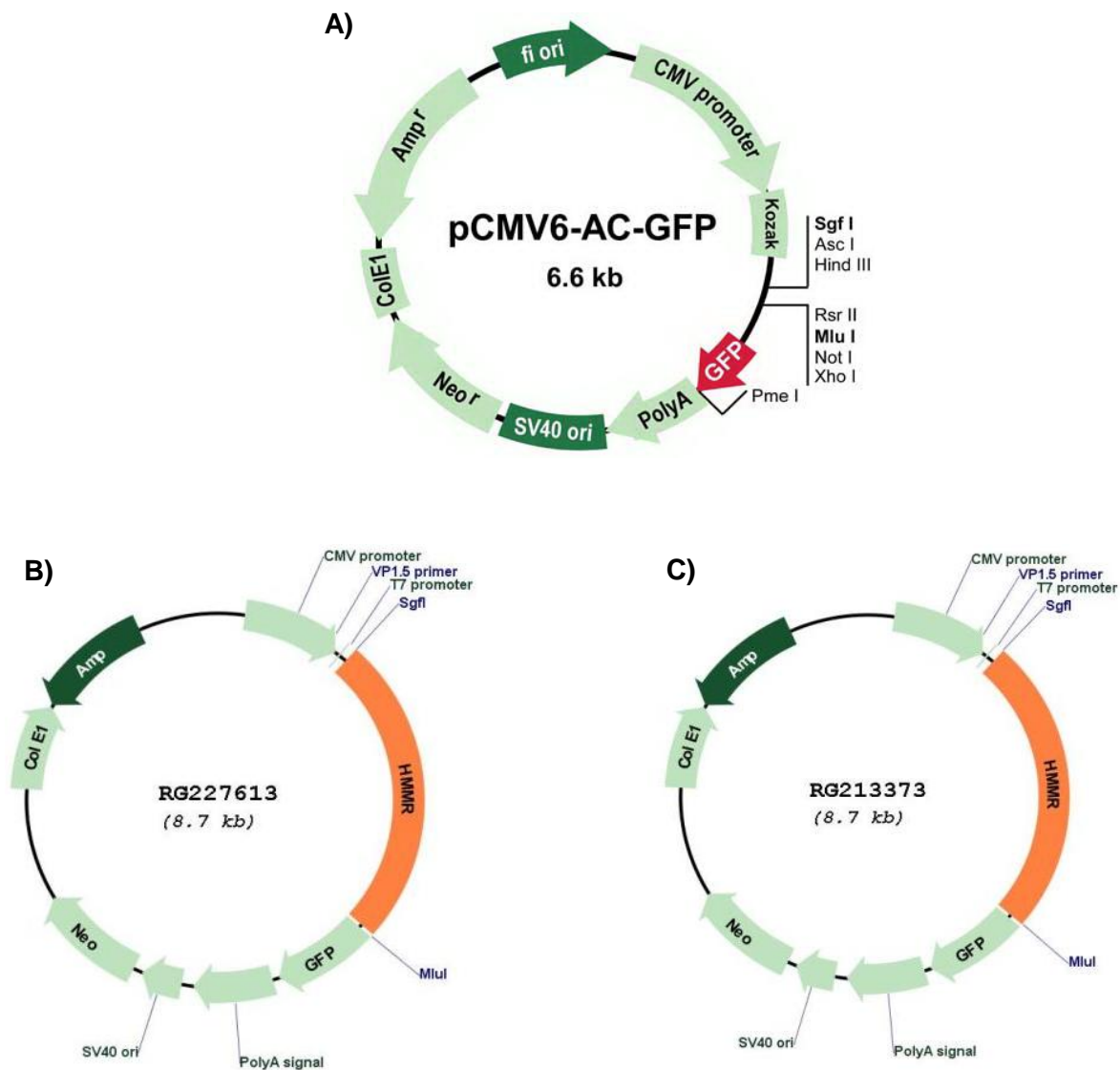


Figura 11. Constructos de las variantes: *HMMRV1* y *HMMRV3*. A) Vector vacío empleado para la construcción de las variantes 1 y 3 de *HMMR*, éste contiene dos marcadores de selección: resistencia a ampicilina (bacterias) y resistencia a neomicina (células de mamíferos) y una etiqueta de expresión (GFP). B) Constructo de la variante 1 de *HMMR*. C) Constructo de la variante 3 de *HMMR*.

5.3 Comprobación de las secuencias: *HMMRV1* y *HMMRV3*

5.3.1 Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción de DNA plasmídico se empleó el Kit *Plasmid Plus Midi Kit* (Qiagen®, Valencia, CA, USA), siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. De forma breve, el cultivo de bacterias transformadas se crecieron en 30mL medio LB con ampicilina, se centrifugaron y se sometieron a lisis celular con el buffer P1 y buffer P2. El lisado fue transferido al filtro *QIAfilter*, se neutralizó con Buffer BB y buffer S3. El filtrado se transfirió a la columna de extracción, se lavó dos veces con buffer ETR y eluyó el DNA con 150µL de buffer EB. Finalmente, el DNA fue cuantificado por espectrofotometría en el equipo *NanoDrop One UV-Vis* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.3.2 Restricción enzimática

Con el DNA plasmídico de cada variante de *HMMR* se realizaron reacciones de restricción enzimática, utilizando las enzimas correspondientes (Figura 12). Para ello, se empleó 1µg de DNA plasmídico, 1U de enzima *Mlu I* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y 1U de *Sfg I* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), buffer: 10x *FastDigest Buffer* y Anza™ 10x Buffer respectivamente y agua como medio de reacción. Se incubó a 37°C durante 16h, la inactivación enzimática se realizó a 80°C por 20 minutos. Los productos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, a 85 Volts durante 50 minutos. Se evaluó el tamaño de los fragmentos con el esperado.

Cloning sites used for ORF Shuttling:

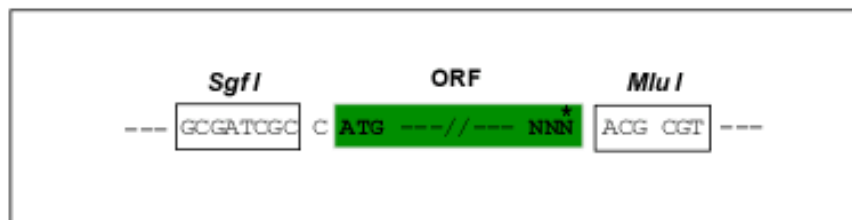


Figura 12. Sitios de restricción enzimática. El esquema muestra un fragmento de la secuencia del vector empleado para la transformación y clonación bacteriana, el sitio de restricción para las enzimas *SfgI* y *MluI* se enmarcan, el recuadro verde indica la zona donde se ubican las secuencias de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3*, respectivamente.

5.3.3 Secuenciación automatizada (Sanger)

Para comprobar la identidad de los insertos contenidos en el vector de expresión se realizó secuenciación automatizada. Para ello, se utilizó cada iniciador para delimitar la posición de cada inserto dentro del vector de expresión de forma independiente (Figura 13), la reacción de amplificación y marcaje se llevó a cabo empleando el *Kit BigDye® Terminator V3.1* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se usaron 100ng de DNA plasmídico, iniciador 50nM, 0.5µL del mix *Terminator Ready Reaction*, buffer *BigDye* y agua DEPC; las condiciones de reacción fueron: 25 ciclos constituidos por una etapa de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una etapa de alineamiento a 50°C por 15 segundos y una etapa de extensión a 60°C por 4 minutos.

Una vez amplificado y marcado el producto de interés fue secuenciado por la unidad de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, en el Instituto de Biología de la UNAM, en el equipo 3730xl *DNA Analyzer* (Applied Biosystems Inc, California, USA). Para el análisis de los resultados se usó el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (V7.0.5), y para el alineamiento de secuencias, *Clustal Omega* (EMBL-EBI).

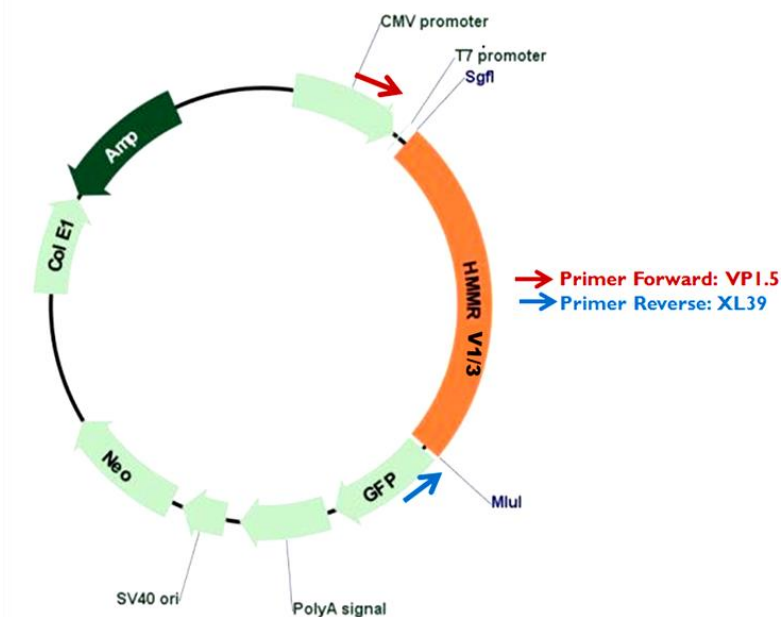


Figura 13. Localización de los iniciadores usados para la secuenciación Sanger. Se muestra la ubicación de los iniciadores *forward* (flecha roja) y *reverse* (flecha azul) en el vector de clonación, ambos delimitan las regiones que incluyen los insertos de interés (*HMMR V1* y *HMMR V3*).

Primer	Secuencia
Forward: VP1.5	5'-GGACTTTCCAAAATGTCG-3'
Reverse: XL39	5'-ATTAGGACAAGGCTGGTGGG-3'

5.4 Cultivo celular

Las líneas celulares MDA-MB-231 y HEK-293 (ATCC, VA USA) se crecieron en medio DMEM (Gibco, MA, US) suplementado con suero fetal bovino (Gibco, MA, US) al 10% y penicilina (100U/mL) estreptomycin (10µg/mL) al 1%, a 37°C/ 5% CO₂/ 85% humedad relativa. La línea celular SUP-B15 (ATCC, VA USA) se creció en medio IMEM (Gibco, MA, US), suplementado con suero fetal bovino al 20% y penicilina estreptomycin al 1%, en las mismas condiciones de incubación que las líneas celulares anteriores.

Para el descongelamiento de las células el procedimiento que se siguió fue el siguiente: 20 minutos previo al descongelamiento del criovial con células almacenado en tanque con nitrógeno líquido, se colocaron 5mL de medio de cultivo suplementado en una caja de 25cm² y se incubó a 37°C/5% CO₂, después se descongeló el vial en un baño de agua a 37°C, inmediatamente las células se colocaron en la caja y se incubaron a 37°C/5% CO₂ por 24h, finalmente se sustituyó el medio de cultivo.

5.4.1 Curva de crecimiento celular

Con la finalidad de conocer la tasa de proliferación de la línea celular MDA-MB-231 se construyeron curvas de crecimiento. A partir de un cultivo con 80% de confluencia, las células se lavaron con PBS 1X y después se desprendieron utilizando tripsina 0.25% /EDTA (Gibco, MA, US) e incubando 5min a 37°C/5% CO₂, posteriormente se inactivó la enzima adicionando medio suplementado SFB 10% en proporción 1:3. Las células se centrifugaron a 900rpm/3min, en seguida se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1mL de medio de cultivo.

Las células se contaron en cámara de Neubauer utilizando una dilución 1:20 con colorante vital azul tripano. Para finalizar, en placas de cultivo de 24 y 96 pozos se

colocó el número de células previamente definido y se adicionó medio de cultivo suplementado SFB 10% hasta un volumen final de 1mL y 200µL respectivamente. Se incubó a 37°C/5% CO₂ y se evaluó la confluencia a las 24h, 48h y 72h.

5.4.2 Estandarización de concentración de antibiótico.

La determinación de la concentración óptima de antibiótico para la selección de las células transfectadas se realizó con una curva de viabilidad después de aplicar el tratamiento con un análogo de neomicina denominado G418 (Sigma Aldrich, MS USA). Inicialmente en una placa de 96 pozos se sembraron 17,000 células MDA-MB-231 por pozo en un volumen de 200µL de medio DMEM suplementado al 10% de SFB, se incubaron a 37°C/5% CO₂ durante 24h. Posteriormente, se evaluó la confluencia, se retiró el medio y se adicionaron 200µL/pozo de G418 (0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mg/mL) en medio de cultivo DMEM 10% SFB, la placa se incubó a 37°C/5% CO₂ por 24 horas y se evaluó la viabilidad mediante el ensayo de MTT.

5.4.3 Ensayo de MTT

Para el ensayo de MTT se retiró el medio de cultivo de las células y se lavaron con 100µL/pozo de PBS 1X, después se adicionaron 20µL/pozo de reactivo MTT (5mg/mL), la placa se incubó durante 4h a 37°C/5% CO₂, protegida de la luz. Posterior al periodo de incubación se retiró el reactivo MTT y se realizó un lavado con 200µL/pozo de PBS 1X para disolver el metabolito, se adicionaron 100µL/pozo de DMSO y se homogeneizó a 400rpm/5min. Después de incubar 10 minutos a 37°C/5% CO₂, se midió la absorbancia a 570nm en el equipo *SpectraMax plus 384* (Molecular Devices, CA USA).

5.4 Transfección estable

Previo al ensayo de transfección, se estandarizaron condiciones tales como: cantidad de células y concentración óptima de antibiótico de selección, para ello se realizaron curvas de proliferación y viabilidad celular, respectivamente, descritas previamente.

Una vez definidas estas condiciones, el ensayo de transfección se llevó a cabo en una placa de 24 pozos; se sembraron 150,000 células/pozo 24 horas previas al ensayo y se incubaron a 37°C/5% CO₂. Transcurrido este tiempo se evaluó que la confluencia fuera

entre 80 y 90%. Para llevar a cabo el ensayo se empleó el reactivo *Lipofectamine 3000 Reagent* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA).

Acorde con las indicaciones del kit, se prepararon dos diluciones: lipofectamina y DNA plasmídico (esterilizado por filtración) en medio Opti-MEM, en proporciones 3:50 y 1:50, respectivamente. Las diluciones se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, después se mezclaron y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente, se sustituyó el medio de cultivo de la placa con medio Opti-MEM y las células se incubaron a 37°C/5% CO₂ durante 20 minutos.

Al término de la incubación se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 950µL/pozo de Opti-MEM, seguido de 50µL de la mezcla complejos DNA-lípidos a cada pozo, se homogeneizó y se incubó por 12-16 horas a 37°C/5% CO₂. Posteriormente, se retiró la mezcla de transfección y se reestablecieron las células con medio DMEM suplementado y con el antibiótico de selección G418 en una concentración de 2mg/mL, finalmente se observó la morfología y se evaluó la confluencia.

Transcurridos dos y 16 días de selección con antibiótico, se tomaron fotografías por microscopía confocal (*Olympus IX81, TYO, JP*) para estimar la eficiencia de transfección.

5.5 Transfección transitoria

Se sembraron 750,000 células HEK-293/pozo en placa de seis pozos, 24 horas previas al ensayo, transcurrido este tiempo se evaluó que la confluencia fuera entre 80 y 90%. El protocolo de transfección fue el mismo que el antes mencionado, con la diferencia del tiempo de transfección de 18 horas y la cantidad de DNA plasmídico 6ng/pozo.

Transcurrido el periodo de incubación con los complejos DNA-liposomas, las células fueron reestablecidas por 24 horas con DMEM suplementado al 10% con SFB, finalmente se despegaron de la placa con tripsina 0.25% /EDTA (Gibco, MA, US) y se utilizaron para la extracción de proteínas y de RNA, como se describió previamente. Este ensayo se hizo por triplicado y se obtuvieron muestras de RNAm y proteínas.

5.7 Ensayos de funcionalidad celular

Para evaluar la función de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3* mediante la sobre-expresión con vectores, se evaluó la viabilidad celular con el ensayo de MTT y la migración utilizando el ensayo de la herida.

5.7.1 Ensayo de viabilidad celular

Para el ensayo, se sembraron 35,000 células HEK-293/pozo en placa de 96 pozos, 24 horas previas a la transfección transitoria. Las cantidades de DNA plasmídico, lipofectamina y reactivo P3000 fueron proporcionales a las empleadas en placa de seis pozos. Después del restablecimiento con DMEM-10%SFB por 24 horas, se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo MTT, descrito previamente.

5.7.2 Ensayo de migración celular

La migración celular se evaluó mediante el ensayo de la herida, para ello se realizó la transfección transitoria con los vectores de interés en una placa de seis pozos, transcurrido el periodo de transfección, la mezcla DNA-liposomas se retiró de la placa y se reemplazó con medio DMEM suplementado 10%SFB, enseguida se trazó una línea recta sobre la monocapa celular con una punta de 200 μ L. La herida fue fotografiada en microscopio invertido de campo claro a 20X, en los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas.

5.7.3 Análisis estadístico

Para el análisis de resultados del ensayo de la herida, el ancho de cada una de las heridas fue delimitado con líneas trazadas, y posteriormente medido. Este experimento se realizó por triplicado, en cada replica se adquirieron 3 imágenes, con esto, en cada condición experimental permitió la obtención de 9 mediciones por grupo.

En el caso del ensayo de viabilidad celular se realizaron ocho replicas, el cálculo del porcentaje de viabilidad se hizo con referencia al promedio de absorbancia del grupo vector vacío, definido como 100% de viabilidad.

El análisis estadístico de ambos ensayos se hizo con la prueba *t-student* para comparar las medias de los grupos con sobre-expresión de *HMMRV1* o *HMMRV3* con respecto al grupo vector vacío.

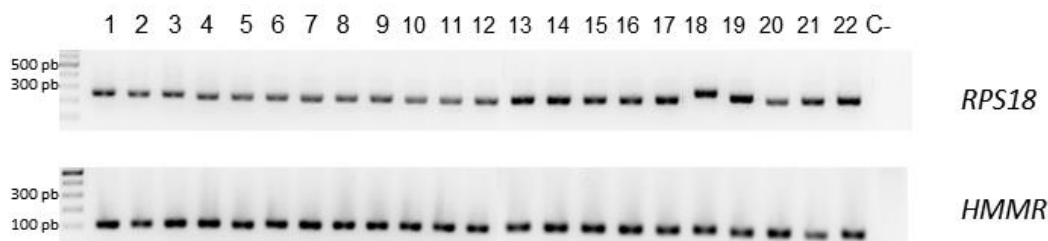
6. RESULTADOS

6.1 Determinación del modelo experimental

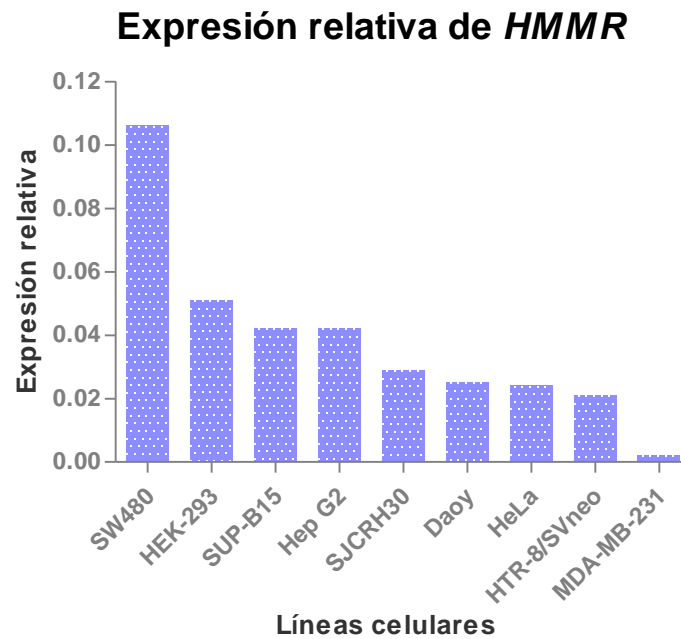
Como parte de la estrategia para la determinación del modelo experimental, se sintetizó cDNA de 22 líneas celulares disponibles en el laboratorio, y se evaluaron a través de la expresión del gen constitutivo *RPS18* (Figura 14A). Estas muestras fueron empleadas para la determinación de la expresión de *HMMR* por medio de RT-PCR (Figura 14A), con la finalidad de identificar la línea celular de menor expresión, y así evidenciar la sobre-expresión de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3*. Sin embargo, se observó que la expresión fue similar en las 22 líneas celulares. Por tal motivo, se realizó el análisis de la expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 14B) de 8 líneas celulares adherentes disponibles para cultivar en el laboratorio; previamente se validó el método de cuantificación $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Anexo I). De acuerdo con el resultado, se definió que el modelo experimental sería la línea celular MDA-MB-231, dado que era la de menor expresión (Figura 14B).

Una vez definido el modelo experimental, se procedió al cultivo de las células MDA-MB-231 (Figura 15), se observó que las características morfológicas fueran congruentes con lo indicado por el proveedor. Posteriormente, se extrajeron las proteínas totales y se cuantificaron por el método de Lowry (Anexo II), a partir de esta muestra se determinó la expresión de HMMR utilizando la técnica de Western blot. Para ello, se empleó como control positivo la línea celular SUP-B15 (Figura 14C). El resultado indica que la expresión de HMMR es menor en la línea celular MDA-MB-231, respecto al control positivo.

A)



B)



C)

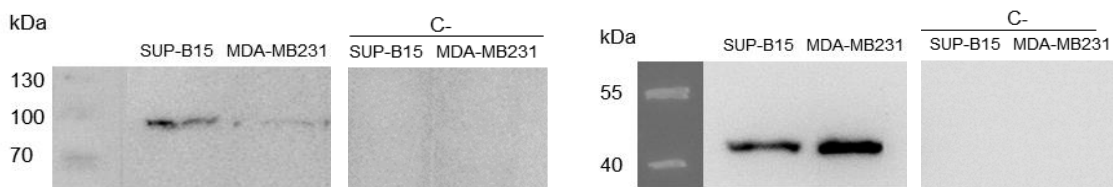


Figura 14. Expresión de *HMMR* en líneas celulares. A) Geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Se observan bandas correspondientes a los amplicones de los genes *RPS18* (240pb) y *HMMR* (98 pb) en 22 líneas celulares. Las muestras corresponden a: 1: K-562, 2: Daoy, 3: SUP-B15, 4: Jurkat, 5: SW480, 6: HeLa, 7: RS4, 8: CCRF, 9: MDA-MB-231, 10: WERI-Rb, 11: HTR-8/SVneo, 12: SK-OV-3, 13: TOV-21G, 14: OVCAR-3, 15: TOV-112D, 16: ES-2, 17: Hep G2, 18: PC-3, 19: SHS754, 20: HEK-293, 21: SJCRRH30, 22: MCF7. **B)** Gráfico que muestra la expresión relativa de *HMMR* en 8 líneas celulares, control positivo: SUP-B15. **C)** Western Blot de *HMMR* (98 kDa) en el modelo de transfección: MDA-MB-231, control positivo: SUP-B15, control de carga: β -actina (43kDa).

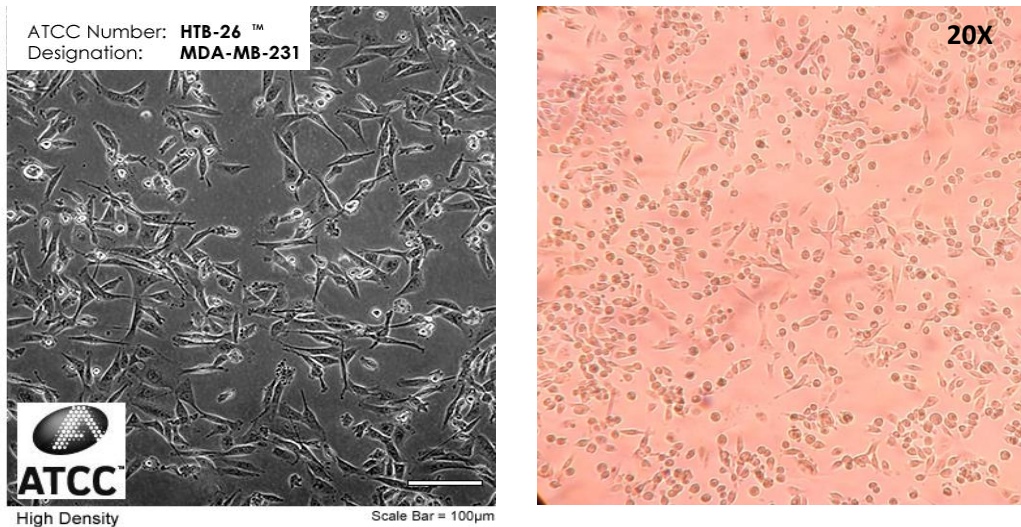


Figura 15. Cultivo de línea celular: MDA-MB-231. Fotografías de células de carcinoma humano de glándulas mamarias; a la izquierda imagen reportada por el proveedor, a la derecha fotografía del cultivo celular tomada en el laboratorio, al 70% de confluencia.

6.2 Expansión y comprobación de las secuencias de *HMMRV1* y *HMMRV3*

Una vez establecido el modelo experimental, se procedió con la expansión y comprobación de las secuencias correspondientes a las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3* insertadas en un vector de expresión, mediante ensayos de restricción enzimática. Para ello, se transformó cada variante de *HMMR* de interés en bacterias competentes, se obtuvo el DNA plasmídico mediante cromatografía de afinidad y se cuantificó mediante espectrofotometría (Anexo IV).

Con el DNA purificado se realizaron ensayos de restricción (Figura 16), usando las enzimas *SfgI* y *MluI* cuya secuencia de corte dentro del vector de expresión permitió la liberación del inserto. Los tamaños de las secuencias de *HMMRV1* y *HMMRV3* que se traducen son 2175pb y 2127pb respectivamente y corresponden con las bandas obtenidas (Figura 16).

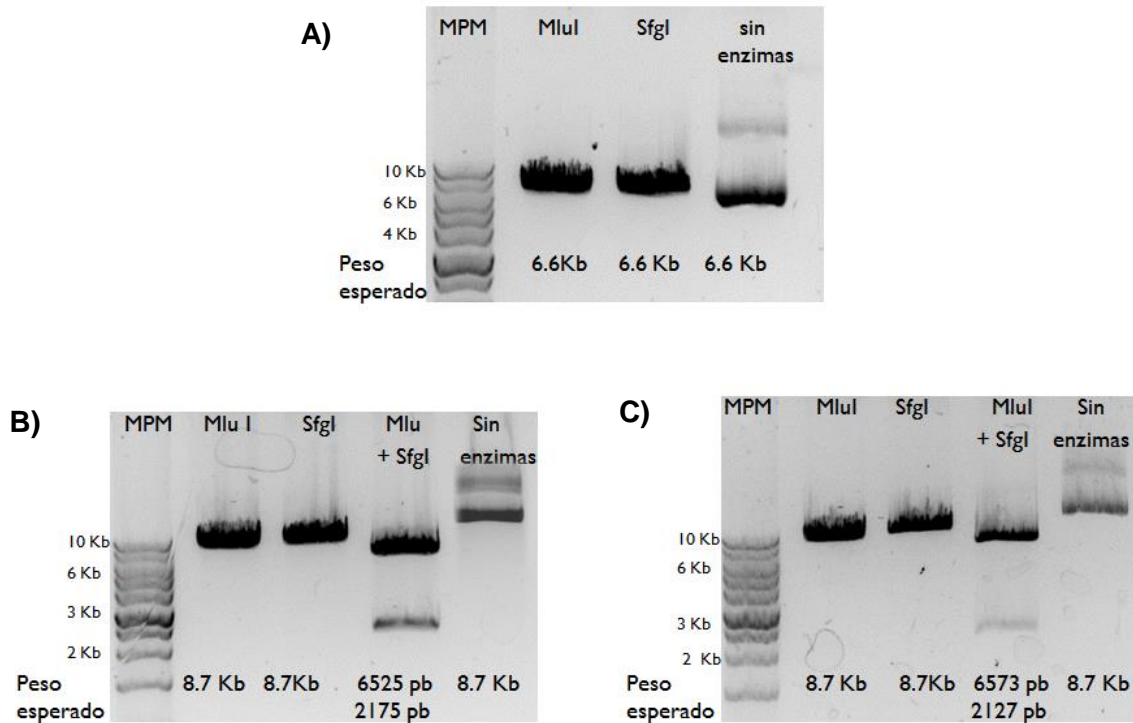
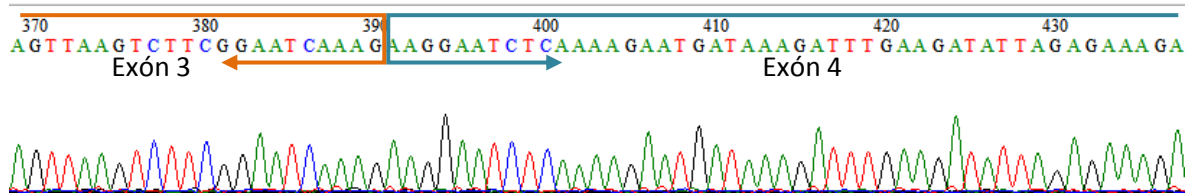


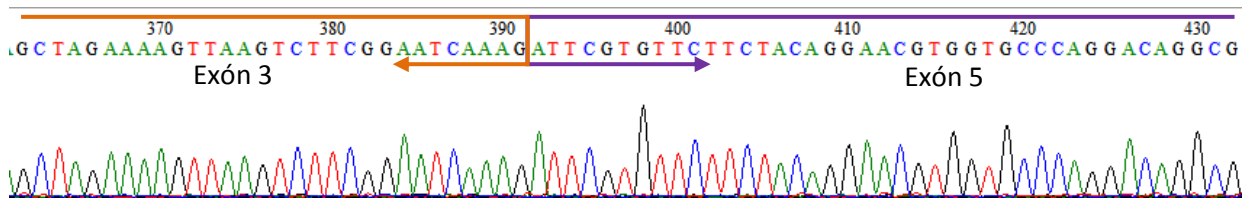
Figura 16. Ensayos de restricción enzimática. Geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio. **A)** Vector vacío: se observan bandas que corresponden al vector linealizado, en el último carril se muestra al control sin restricción. **B)** *HMMRV1*: los carriles 2 y 3 corresponden al vector linealizado, en el cuarto carril se observan las bandas del inserto (2175pb) y del resto del vector (6525pb) y en el último carril se muestra al vector sin restricción. **C)** *HMMRV3*: en los carriles 2 y 3 se observan las bandas que corresponden al vector linealizado, en el cuarto carril al inserto (2127pb) y el resto del vector (6573pb), y en el último carril se observan bandas del vector sin restricción.

De acuerdo con el resultado anterior, se procedió con la comprobación de las secuencias de interés mediante secuenciación Sanger (Figura 17A y 17B), para ello se utilizaron iniciadores que flanqueaban el inserto de interés, dentro del vector de expresión. Los electroferogramas obtenidos se analizaron en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (V7.0.5) y las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias de las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2*, *HMMRV3* y *HMMRV4* reportadas en NCBI (Figura 17C) para comprobar su identidad, usando el software *Clustal Omega* (EMBL-EBI).

A) HMMRV1



B) HMMRV3



C)

HMMRV3	AATCACAAAGATTTAAACAACAAAAAGAATCTAAACAAAATCTTAATGTTGACAAAGATA	360
V3	AATCACAAAGATTTAAACAACAAAAAGAATCTAAACAAAATCTTAATGTTGACAAAGATA	175
V1	AATCACAAAGATTTAAACAACAAAAAGAATCTAAACAAAATCTTAATGTTGACAAAGATA	175
HMMRV1	AATCACAAAGATTTAAACAACAAAAAGAATCTAAACAAAATCTTAATGTTGACAAAGATA	360
HMMRV2	AATCACAAAGATTTAAACAACAAAAAGAATCTAAACAAAATCTTAATGTTGACAAAGATA	360
HMMRV4	-----	228
HMMRV3	CTACCTGCCTGCTTCAGCTAGAAAAGTTAAGTCTTCGGAATCAA-----	405
V3	CTACCTGCCTGCTTCAGCTAGAAAAGTTAAGTCTTCGGAATCAA-----	220
V1	CTACCTGCCTGCTTCAGCTAGAAAAGTTAAGTCTTCGGAATCAA GAA GGAATCTCAA	235
HMMRV1	CTACCTGCCTGCTTCAGCTAGAAAAGTTAAGTCTTCGGAATCAA GAA GGAATCTCAA	420
HMMRV2	CTACCTGCCTGCTTCAGCTAGAAAAGTTAAGTCTTCGGAATCAA---GGAATCTCAA	417
HMMRV4	-----	228
HMMRV3	-----AGATTCGTGTTCTTCTACAGGAACGTG	432
V3	-----AGATTCGTGTTCTTCTACAGGAACGTG	247
V1	AGAATGATAAAGATTTGAAGATATTAGAGAAAGAGATTTGTGTTCTTCTACAGGAACGTG	295
HMMRV1	AGAATGATAAAGATTTGAAGATATTAGAGAAAGAGATTCGTGTTCTTCTACAGGAACGTG	480
HMMRV2	AGAATGATAAAGATTTGAAGATATTAGAGAAAGAGATTCGTGTTCTTCTACAGGAACGTG	477

Figura 17. Secuenciación Sanger de las variantes HMMRV1 y HMMRV3 en el vector de expresión **A)** Electroferograma del vector con el inserto de HMMR variante 1: se muestra la región donde se evidencia la identidad de la secuencia, dado que, esta variante contiene todos los exones, con la flecha naranja se señala la parte final del exón 3 y con la flecha azul la parte inicial del exón 4. **B)** Electroferograma del vector con el inserto de la variante HMMRV3: se muestra la región donde se omite el exón 4, característica específica de este transcrito. La flecha naranja indica el final del exón 3, mientras que, la flecha morada indica el inicio del exón 5. **C)** Alineamiento de las secuencias reportadas en NCBI, con los resultados de la secuenciación, en el ovalo verde se marcan los tres nucleótidos que son específicos de la variante 1 (HMMRV1) y con el rectángulo rojo se indica la región donde se unen el exón 3 y el exón 5, característica de la variante 3 (HMMRV3).

6.3 Ensayo de transfección estable en MDA-MB-231 y HEK-293

Una vez comprobadas las secuencias de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3* dentro del vector de expresión, se procedió con el ensayo de transfección estable. Para ello, de forma previa, se realizó la estandarización de condiciones, tales como la cantidad de células y la concentración de antibiótico de selección que fue un análogo a la neomicina (G418), con el se construyeron curvas para determinar la proliferación y de viabilidad celular (Anexo V).

Posterior al ensayo de transfección, las células fueron visualizadas por microscopía de fluorescencia (Figura 18). Como se observa, con el vector vacío se obtuvo una mayor cantidad de células transfectadas, en comparación con los vectores que contienen las secuencias de *HMMRV1* y *HMMRV3*. Después de seleccionar las células transfectadas durante tres semanas, se extrajo RNA y proteína total, para la comprobación de la sobre-expresión.

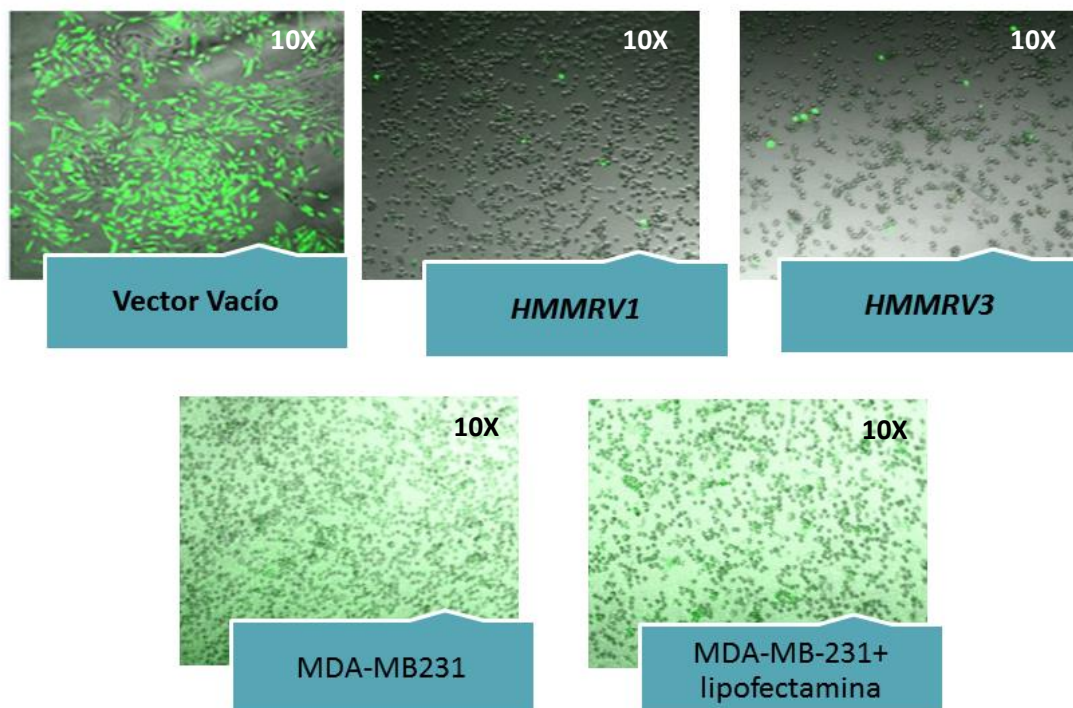


Figura 18. Fotomicrografías de células MDA-MB-231 transfectadas. Se observan células después de la transfección con el vector vacío, el vector de *HMMRV1* y el de *HMMRV3*, se incluyó un control negativo: sin tratamiento, y un control de viabilidad con células y el reactivo para transfección (lipofectamina). Las células de color verde fluorescente son las que contienen al vector ya que expresan la etiqueta de transfección (GFP).

Con el RNA extraído a partir de las células transfectadas se sintetizó cDNA y se evaluó la expresión de los genes constitutivos *RPS18* y *RPL4* (Figura 19A). Después se determinó la expresión de las cuatro variantes mediante PCR en punto final (Figura 19B), de igual forma se determinó en la línea celular MDA-MB-231 sin transfección (Figura 19C). Dado el tamaño del amplicón de *HMMRV1*, se determinó su expresión por PCR en tiempo real (Figura 20A y B).

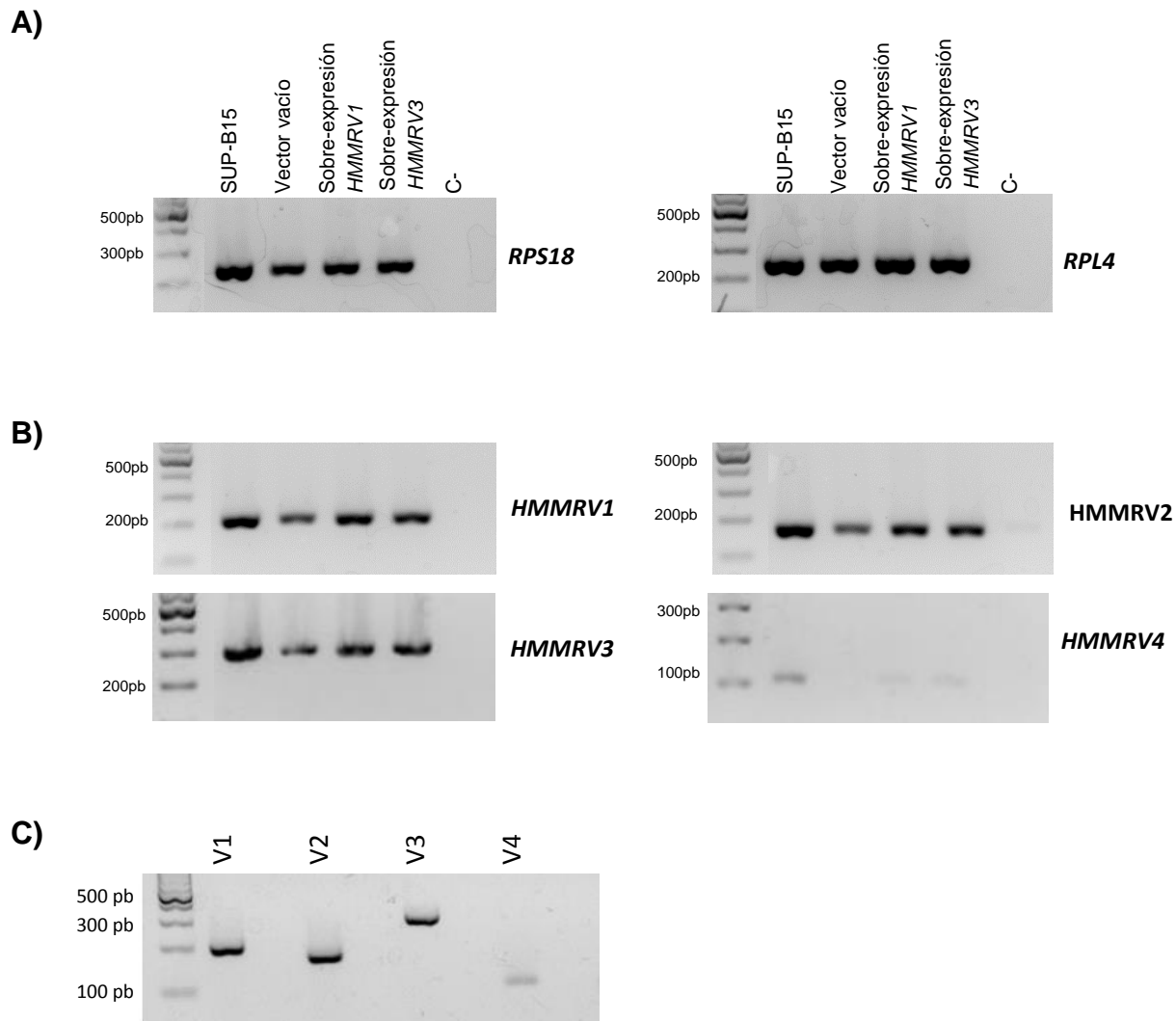
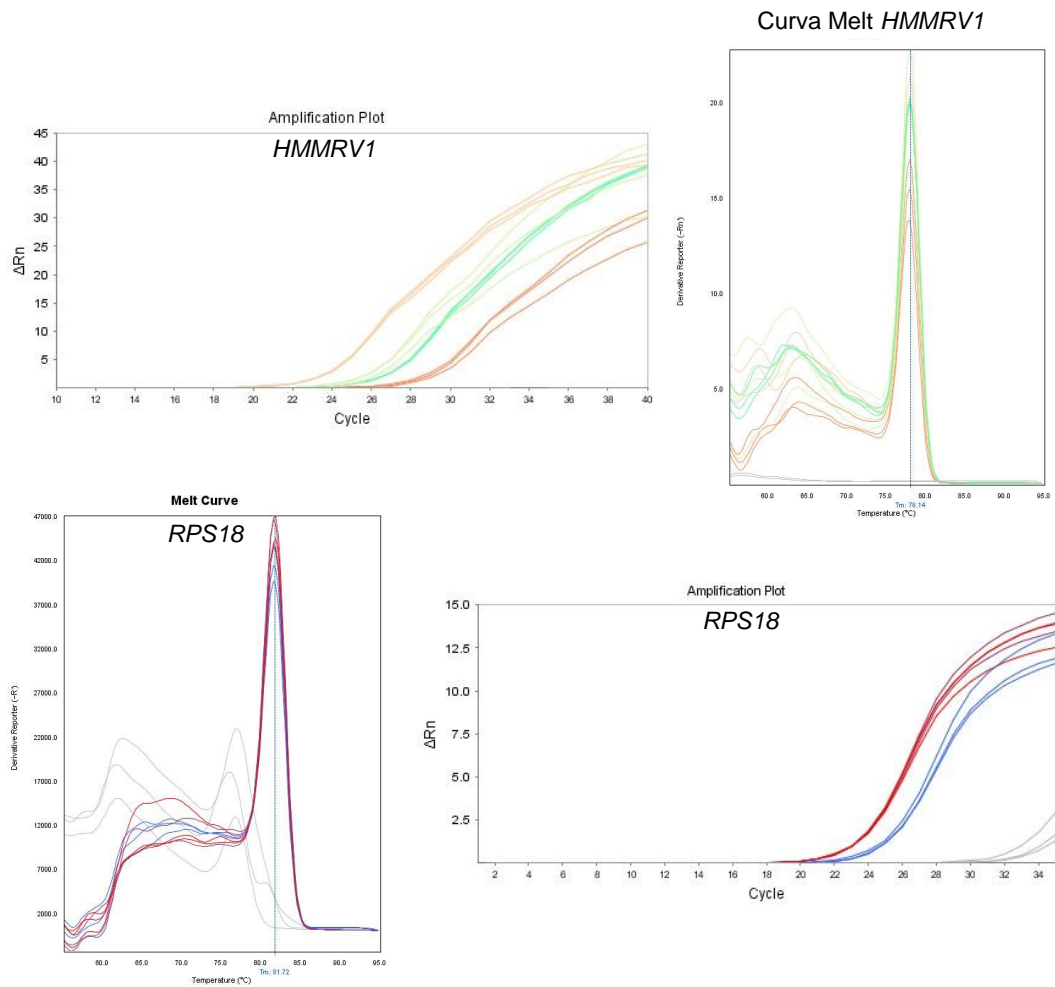


Figura 19. Expresión de las variantes de *HMMR* en células MDA-MB-231 transfectadas. Geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio; donde se evidencia **A)** la expresión de dos genes constitutivos: *RPS18* (240 pb) y *RPL4* (243 pb) **B)** la expresión de las variantes de *HMMRV1* (206 pb), *HMMRV2* (173 pb), *HMMRV3* (300 pb), *HMMRV4* (105 pb) como control positivo se empleó cDNA de la línea celular SUP-B15. Y **C)** la expresión de las cuatro variantes de *HMMR* en las células MDA-MB-231 sin transfección.

A)



B)

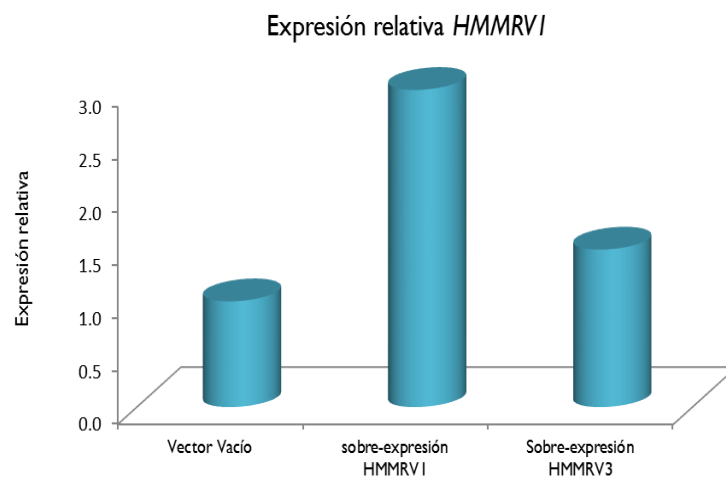
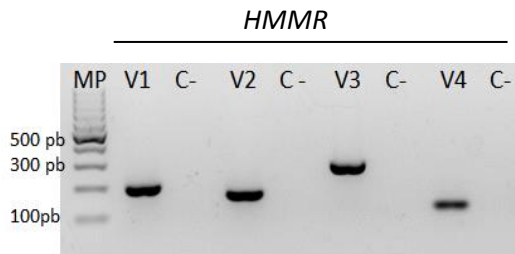


Figura 20. Expresión de *HMMRV1* en células MDA-MB-231 transfectadas. A) Curvas de amplificación y disociación de *HMMRV1* y el gen de referencia *RPS18* en células transfectadas. B) Gráfico de expresión relativa de *HMMRV1*.

Con la finalidad de comprobar que los iniciadores empleados fueran específicos para cada una de las variantes, se secuenciaron los productos de PCR (Figura 21B). Para ello, se utilizó cDNA de la línea celular SUP-B15 (control positivo), se amplificaron las variantes de interés por PCR punto final (Figura 21A), se purificó el producto y se secuenció en la unidad de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, en el Instituto de Biología de la UNAM.

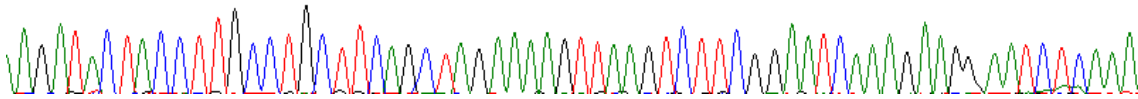
A)



B)

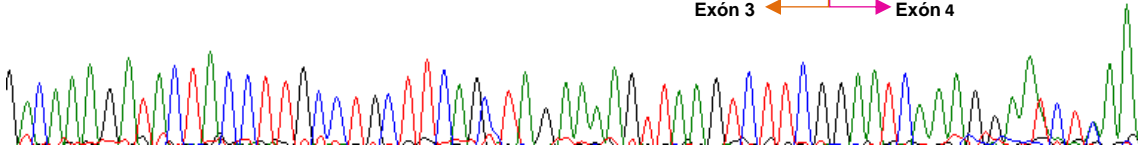
HMMRV1

110 120 130 140 150 160 170
 A G A T A C T A C C T T G C C T G C T T C A G C T A G A A A A G T T A A G T C T T C G G A A T C A A A G A A G G A A T C T C A A A .
 Exón 3 ← → Exón 4



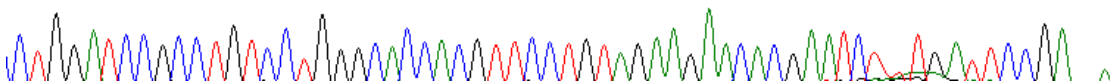
HMMRV2

80 90 100 110 120 130 140
 A C A A A G A T A C T A C C T T G C C T G C T T C A C T A G A A A A G T T A A G T C T T C G G A A T C A A A G G A A T C T A A A .
 Exón 3 ← → Exón 4

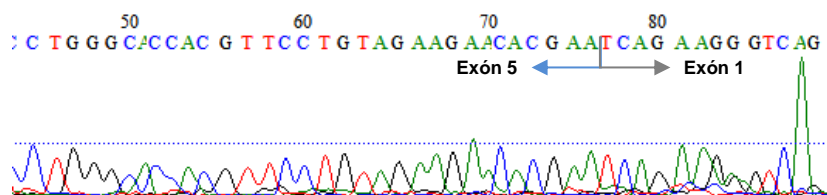


HMMRV3

220 230 240 250 260 270 280
 C T G G A T C C G C C T G T C C T G G G C A C C A C G T T C C T G T A G A A G A A C A C G A A T C T T T G A T T C C G A G A .
 Exón 5 ← → Exón 3



HMMRV4



C)

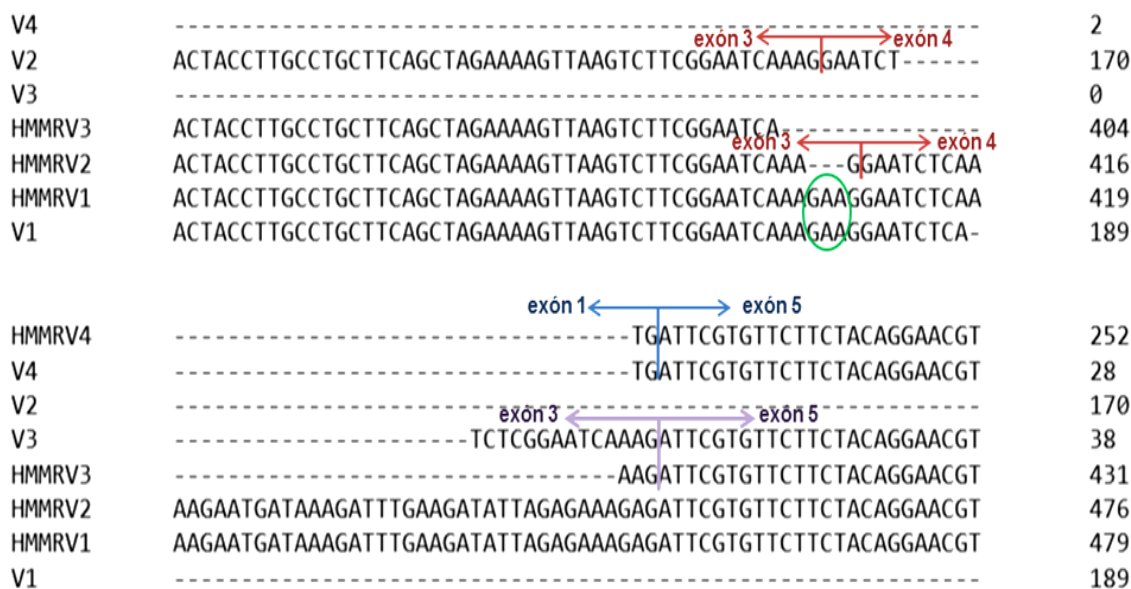


Figura 21. Productos de PCR de las variantes HMMRV1, HMMRV2, HMMRV3 y HMMRV4. Se diseñaron iniciadores que amplificaran las variantes del gen de interés, para comprobar su especificidad. Estos, productos de PCR fueron purificados y se secuenciaron en el equipo 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc, California, USA). **A)** Gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio, donde se muestran las bandas correspondientes a las cuatro variantes de HMMR empleando 10ng de cDNA: SUP-B15 (control positivo), las bandas fueron purificadas. **B)** Electroferogramas obtenidos de la secuenciación para cada variante; para HMMRV1 y HMMRV2 se muestran en dirección 3' a 5' y para HMMRV3 y HMMRV4 en dirección 5' a 3'. Las flechas señalan los patrones de unión de los exones, característicos de cada variante (color naranja exón 3, rosa exón 4, gris exón 1 y azul exón 5). El recuadro morado en HMMRV1 indica los tres nucleótidos que diferencian tal secuencia. **C)** Alineamiento entre las secuencias reportadas en NCBI (HMMRV1, HMMRV2, HMMRV3, HMMRV4), y las obtenidas de la secuenciación (V1, V2, V3, V4), en el software Clustal Omega (EMBL-EBI). El ovalo verde indica los tres nucleótidos que diferencian a HMMRV1, las flechas rojas señalan los exones 3 y 4 de la variante 2, mientras que las flechas moradas muestran la unión entre el exón 3 y 5 de la variante 3, finalmente, las flechas azules indican la unión del exón 1 y exón 5 de la variante 4.

Posteriormente se evaluó la expresión de la etiqueta de transfección (GFP) a nivel de proteína mediante Western Blot (Figura 22). Únicamente se observó expresión en la muestra correspondiente a células con el vector vacío, para evaluar la especificidad del anticuerpo primario se usaron proteínas de células sin transfección, similarmente, para analizar la especificidad del anticuerpo secundario las muestras se expusieron únicamente a este anticuerpo.

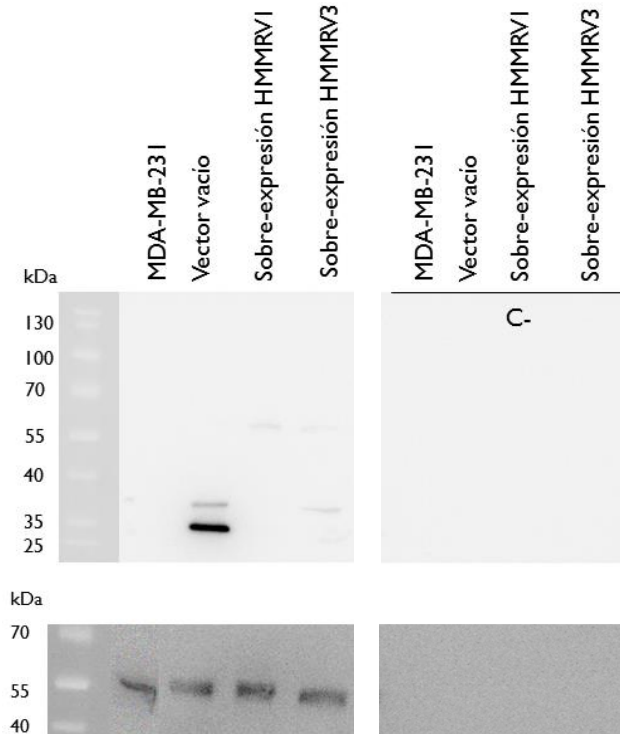


Figura 22. Expresión de GFP en células MDA-MB-231. Por Western Blot se evaluó la expresión de la etiqueta de transfección GFP cuyo peso es de 27kDa, GFP unido a *HMMRV1* equivale a 111 kDa mientras que unido a *HMMRV3* pesa 110KDa. Como control negativo se usaron células MDA-MB-231 sin transfección. Los últimos cuatro carriles corresponden a controles negativos para evaluar la especificidad del anticuerpo secundario. En la parte inferior, se muestra el control de carga α tubulina (55 kDa).

Debido a que no se evidenció a nivel de proteína la sobre-expresión de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3* se decidió incrementar la cantidad de DNA plasmídico utilizado para la transfección. Además, a pesar de realizar la selección con el antibiótico G418, no se logró un aumento en la eficiencia de transfección en las células que contenían la

variante *HMMRV1* y *HMMRV3*, así como el vector vacío; al contrario, se observó una disminución celular.

Por todo lo anterior, se decidió emplear un tipo celular distinto, en este caso, el modelo predilecto para transfección (HEK-293). HEK-293 corresponde a células de riñón embrionario. Las células se cultivaron (Figura 23) y después de corroborar las características morfológicas con las reportadas en ATCC, se procedió a realizar una transfección estable, siguiendo el mismo protocolo que con el modelo inicial MDA-MB-231.

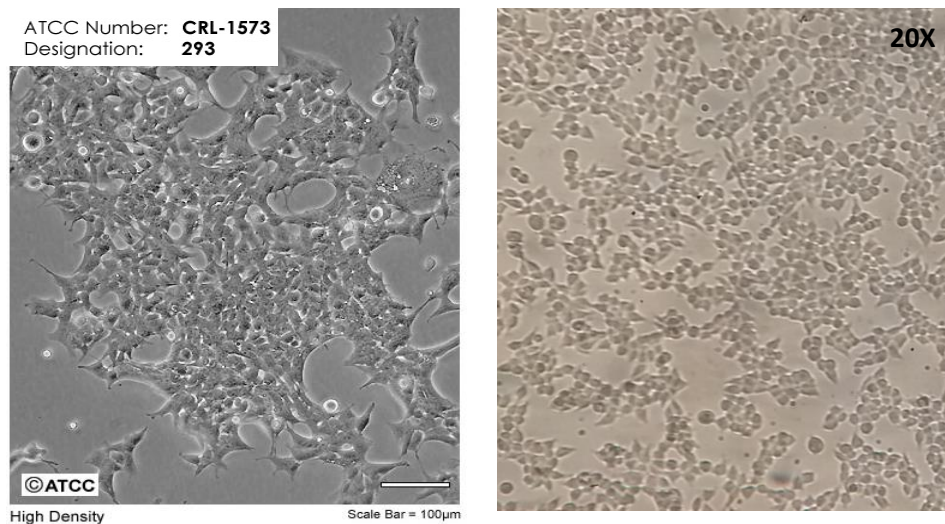
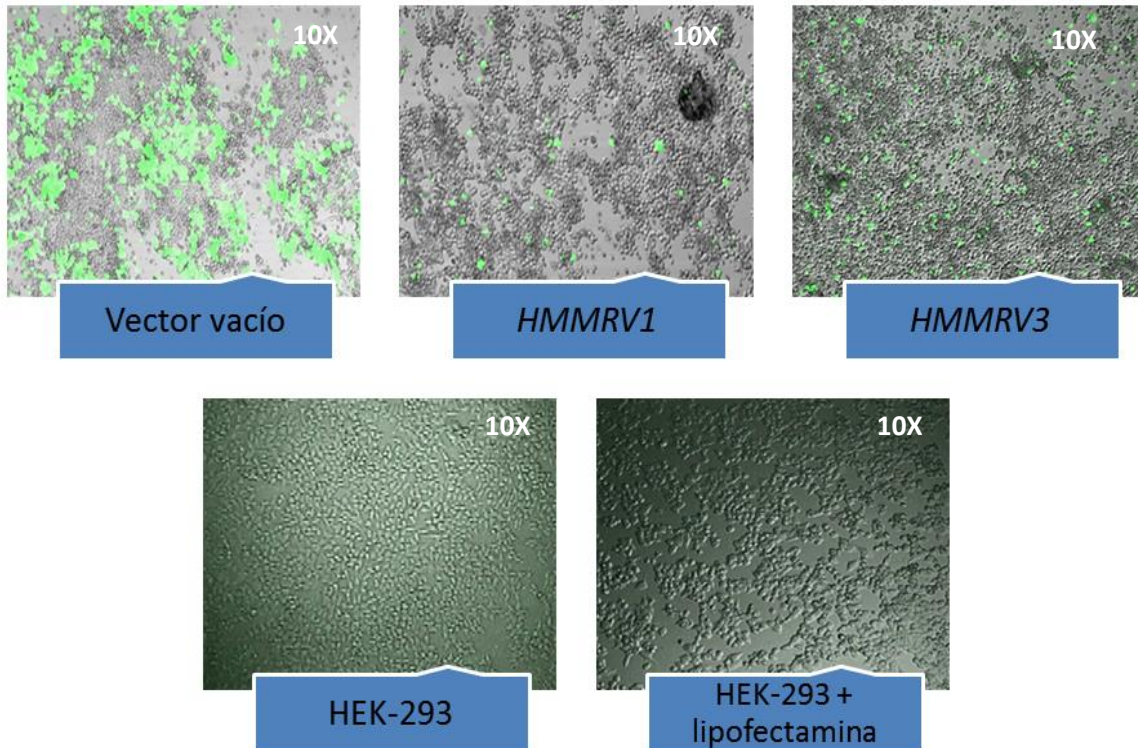


Figura 23. Cultivo de la línea celular HEK-293. Imágenes del crecimiento celular de la línea celular HEK-293 originarias de riñón embrionario. En la imagen de la izquierda se muestra la morfología reportada por ATCC; mientras que, en la imagen derecha se observa el crecimiento celular de HEK-293, con una confluencia del 80%, tomada en el microscopio invertido de campo claro de laboratorio.

Los resultados de la transfección estable en HEK-293 (Figura 24A) indicaron una eficiencia de transfección aproximadamente de 35% con el vector *HMMRV1* y *HMMRV3*, y del 60% con el vector vacío. Sin embargo, al seleccionar las células con el antibiótico G418, después de una semana (Figura 24B) se observó una disminución considerable en el número de células con el vector que contenían las variantes de *HMMR*, a excepción del vector vacío.

A)



B)

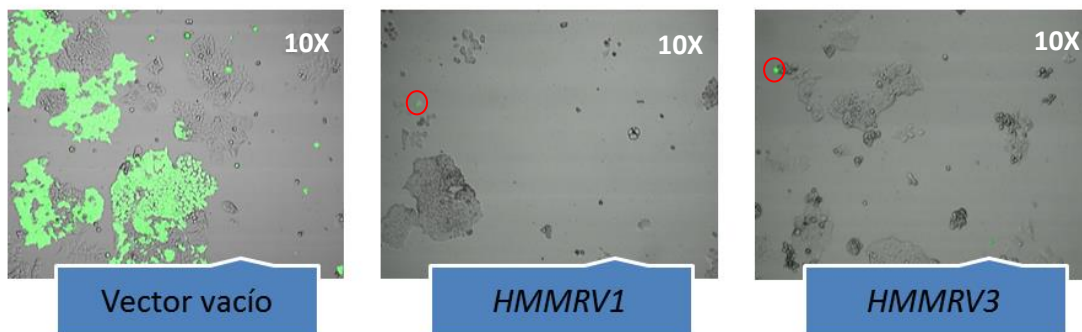


Figura 24. Ensayo de transfección estable con las variantes de *HMMR* en células HEK-293. Se muestran fotografías tomadas en microscopio confocal; **A)** 48 horas después de la transfección con cada uno de los vectores de interés, además de un control de viabilidad sin transfección y uno con el reactivo de transfección, y **B)** después de una semana de selección con el antibiótico G418, se señalan las células transfectadas con un círculo rojo.

6.4 El mejor modelo experimental es HEK-293 con transfección transitoria

De acuerdo con lo anterior, se decidió hacer transfecciones transitorias, incrementando la cantidad DNA plasmídico y el tiempo de incubación con los complejos lipídicos, con estas modificaciones se logró obtener una eficiencia de transfección aproximada de 70% tanto con el vector con *HMMRV1* como con el vector *HMMRV3*, y con el vector vacío de 90% (Figura 25). Con base en estos resultados, se concluyó que el mejor modelo de sobre-expresión era HEK-293, con transfección transitoria.

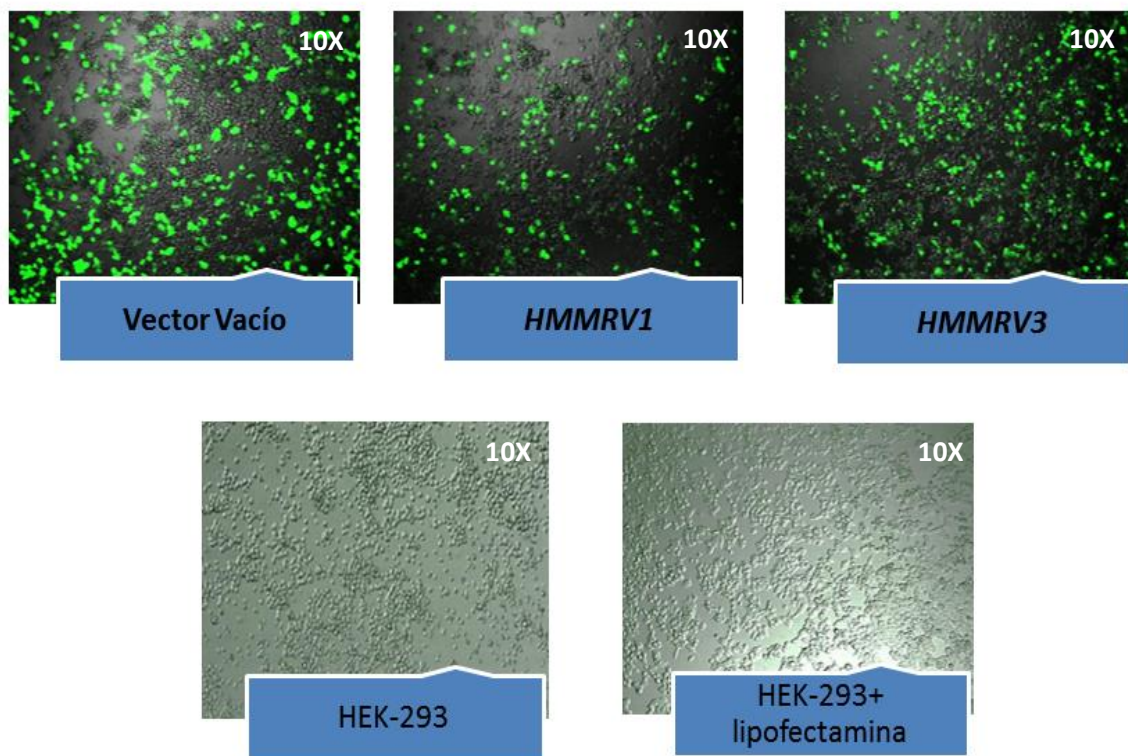
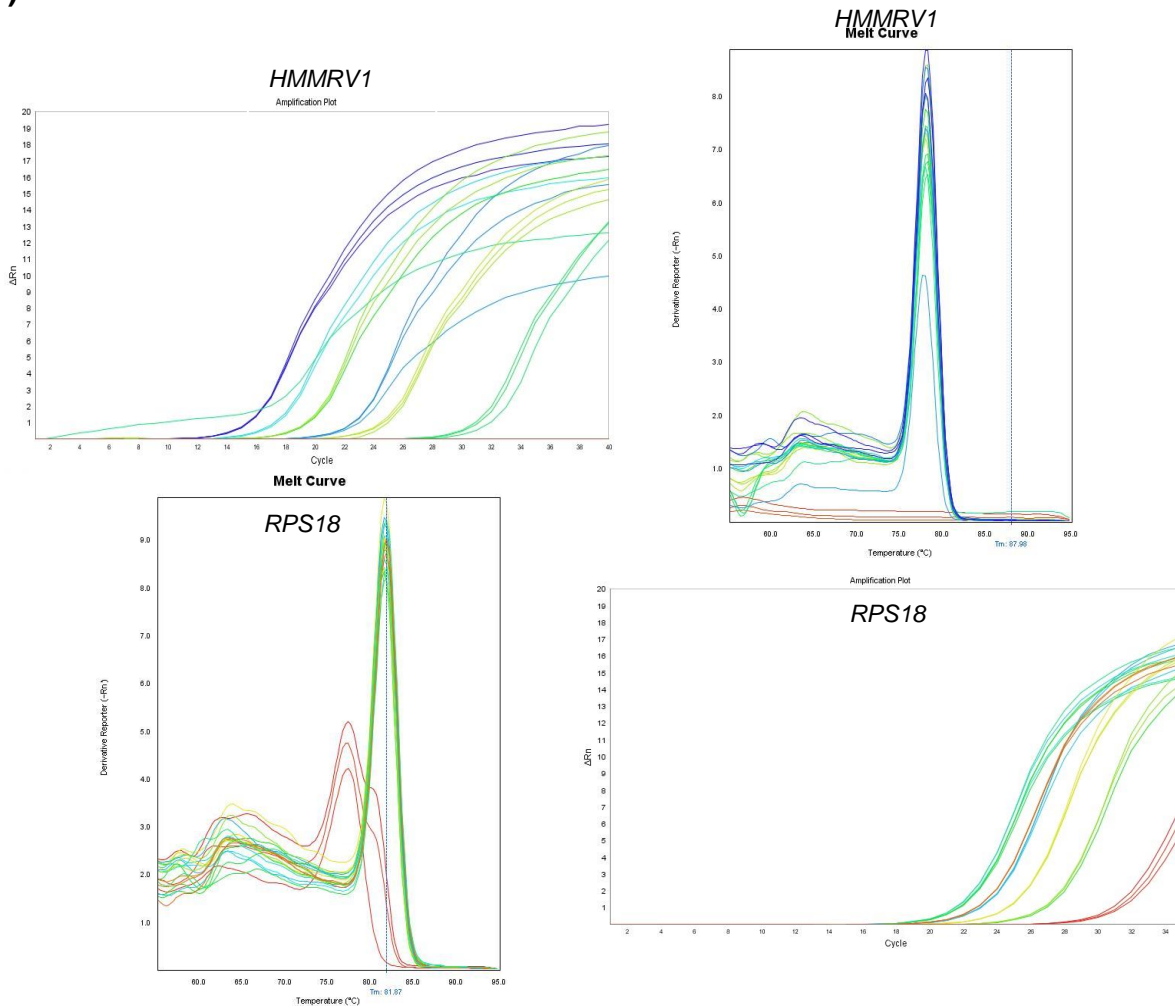


Figura 25. Transfección transitoria de las variantes de *HMMR* en células HEK-293. Fotografías tomadas en microscopio confocal, se muestran células con el vector vacío y con los vectores de *HMMRV1* y *HMMRV3*, además del control negativo de transfección y un control de viabilidad con lipofectamina.

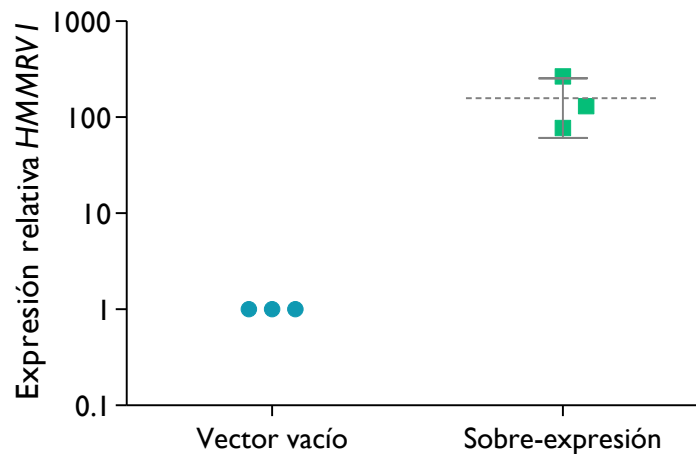
Posteriormente se demostró la sobre-expresión de *HMMRV1* y *HMMRV3* por qRT-PCR y RT-PCR, respectivamente (Figura 26). *HMMRV1* se sobre-expresó 158 veces más (157.9 ± 97.09) con referencia al vector vacío cuyo valor de expresión se normalizó a uno (Figura 26B). Mientras, que el análisis densitométrico (Figura 26D) mostró que

HMMRV3 se sobre-expresó 1.5 veces más que el gen de expresión constitutiva *RPL4*, contrastando con el vector vacío donde no se observó expresión.

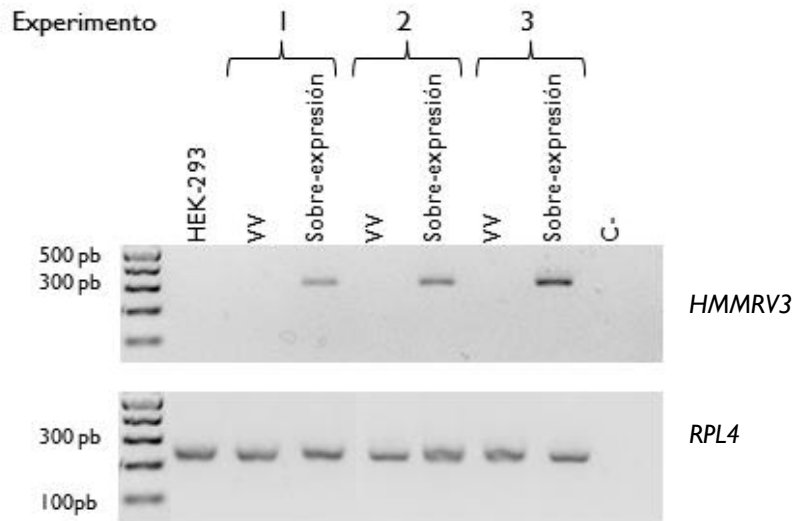
A)



B)



C)



D)

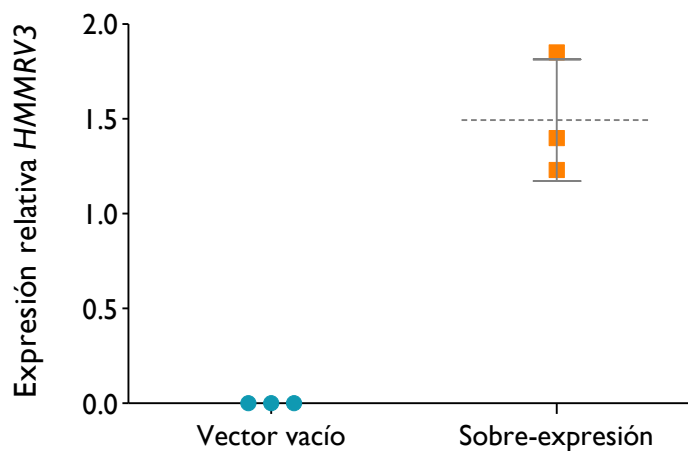
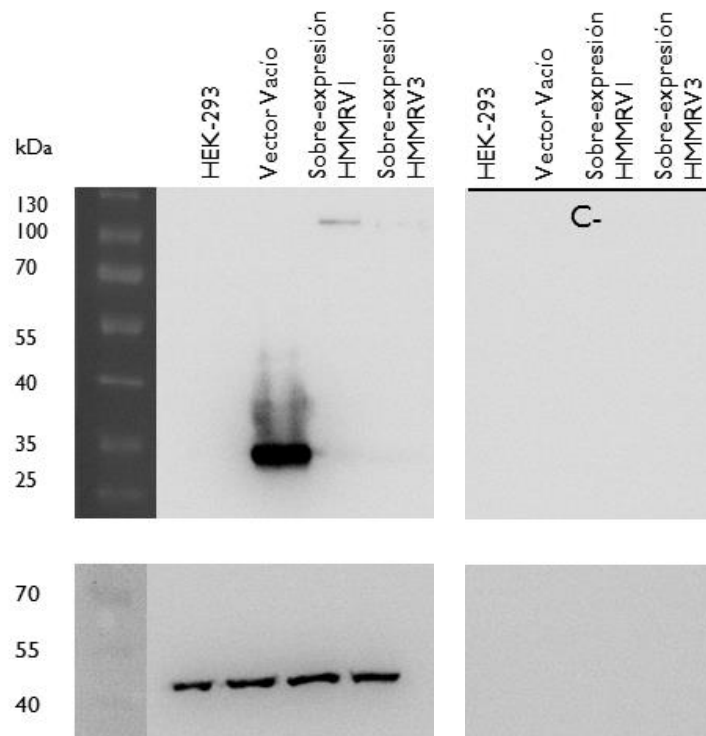


Figura 26. Expresión de *HMMRV1* y *HMMRV3* en células HEK-293 transfectadas. **A)** Curvas de expresión y de disociación de *HMMRV1* y del gen de referencia RPS18, en células HEK-293 transfectadas con vector vacío y con vector de *HMMRV1*. **B)** Gráfico de expresión relativa de *HMMRV1* (vector vacío 1 ± 0 y sobre-expresión de *HMMRV1*: 157.9 ± 97.1) **C)** Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, donde se evidencia la expresión de *HMMRV3* (300 pb) y del gen de referencia *RPL4* (243 pb) en células HEK-293 sin transfectar y transfectadas con el vector vacío y con vector de *HMMRV3* **D)** Gráfico del análisis densitométrico para la expresión relativa de *HMMRV3* (vector vacío= 0, sobre-expresión de *HMMRV3*: 1.49 ± 0.32)

Una vez evidenciada a nivel de RNAm, se comprobó la sobre-expresión de ambas variantes a nivel de proteína usando la técnica de Western blot (Figura 27). Los resultados coinciden con las eficiencias estimadas por microscopia, dado que existe mayor expresión de GFP en la transfección con el vector vacío, en comparación con la transfección de *HMMRV1* y *HMMRV3* (Figura 27A). Del mismo modo, se observa mayor expresión de *HMMRV1* que de *HMMRV3*, lo cual concuerda con los valores de expresión relativa a nivel de RNAm (Figura 26). Sin embargo, es importante mencionar que las eficiencias de transfección no fueron homogéneas entre las réplicas experimentales, tal y como se observa en el gráfico de expresión relativa de *HMMRV1* y *HMMRV3* a nivel proteico (Figura 27B), lo cual, se puede atribuir a la naturaleza azarosa del ensayo.

A)



B)

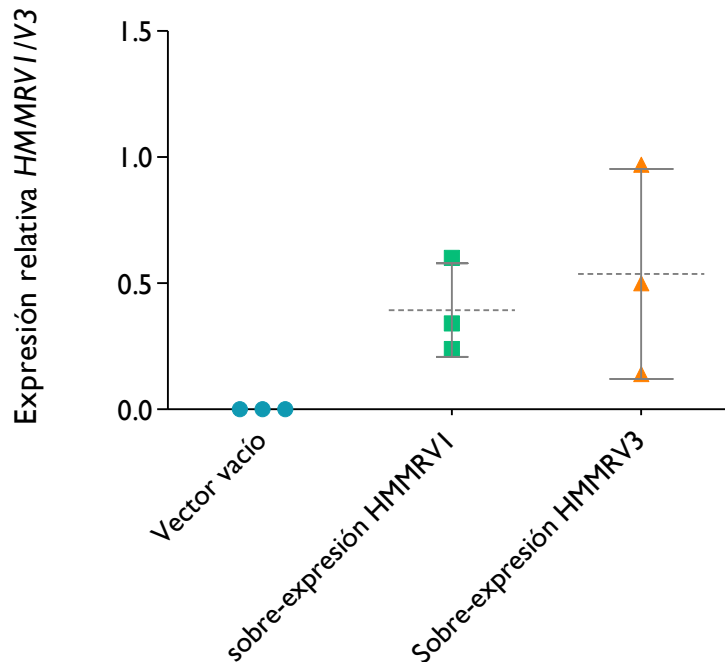


Figura 27. Expresión de GFP en células HEK-293 transfectadas. A) Western blot contra la etiqueta de transfección GFP. El carril 1 corresponde a células sin transfección, el carril 2-4 corresponde a las condiciones experimentales. El tamaño esperado para GFP es de 26 kDa, GFP-*HMMRV1*= 111 kDa y GFP-*HMMRV3*= 110 kDa. Se incluyen controles negativos para probar la especificidad del anticuerpo secundario (carril 6-9). Como control de carga se utilizó β -actina, 43 kDa. **B)** Análisis densitométrico de la expresión relativa de GFP: sobre-expresión *HMMRV1* (0.39 ± 0.19) y sobre-expresión *HMMRV3* (0.54 ± 0.42).

6.5 La sobre-expresión de *HMMRV3* aumenta la viabilidad celular

Después de evidenciar la sobre-expresión de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3*, se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular (Figura 28). Los resultados indican que cuando *HMMRV3* se sobre-expresa se incrementa significativamente ($p=0.0068$) la viabilidad celular, a diferencia de cuando se sobre-expresa *HMMRV1*.

El resultado de este experimento sugiere que la variante *HMMRV3* podría estar relacionada con el aumento de la proliferación celular, pues al incrementar el porcentaje de viabilidad es posible suponer que incrementa el número de células. Sin embargo, para comprobar tal hipótesis, es necesario complementar los resultados utilizando otra técnica, por ejemplo citometría de flujo, o bien, sincronizando las células antes de realizar el ensayo.

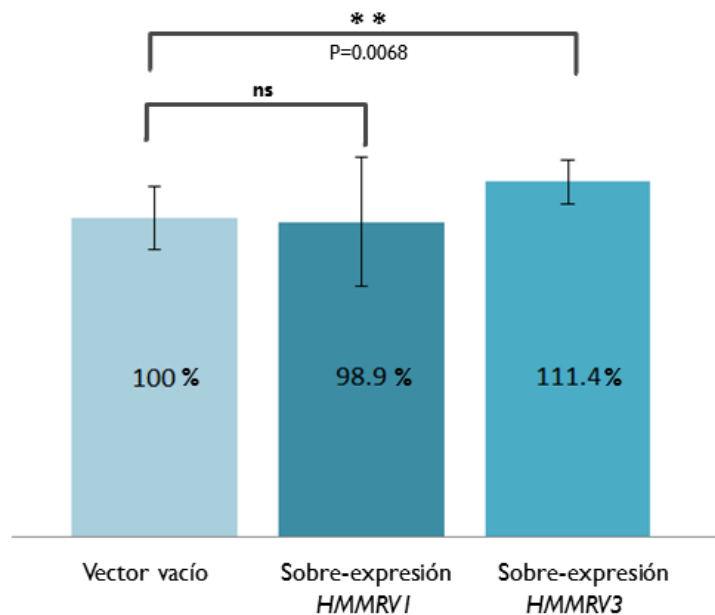


Figura 28. Ensayo de viabilidad celular. Se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT; para cada condición se realizaron ocho replicas, los grupos se compararon con la prueba *t-student* paramétrica (** $p < 0.01$, ns: no estadísticamente significativo).

6.6 La sobre-expresión de *HMMRV1* y *HMMRV3* promueven la migración celular

Otra de las funciones celulares de particular interés fue la migración celular, evaluada mediante el ensayo de la herida (Anexo VI). Para ello, se realizó la medición del ancho de la herida a las 0, 24, 48 y 72 horas y se compararon los grupos con la prueba *t-student* no paramétrica (Figura 29). Los resultados indicaron que en el tiempo cero no existieron diferencias significativas en ninguna condición; en contraste, a las 24 horas en la condición de sobre-expresión de *HMMRV3*, redujo significativamente ($p=0.0067$) el ancho de la herida; mientras que la sobre-expresión de la variante 1 no redujo el tamaño en comparación con el tiempo cero.

A las 48 horas el ancho de la herida, con respecto al vector vacío, fue reducido más cuando *HMMRV1* se sobre-expresa que cuando se sobre-expresa *HMMRV3*, ambos resultados son estadísticamente significativos ($p=0.0013$ y $p=0.0391$). Finalmente, a las

72 horas se observa que el ancho de la herida fue reducido de forma significativa ($p < 0.0001$) en ambos casos de sobre-expresión.

El gráfico evidencia que cuando se sobre-expresa *HMMRV3* la reducción del ancho de la herida es más rápida, en comparación de cuando se sobre-expresa *HMMRV1* y también respecto al vector vacío, cuya disminución de la herida es la más lenta.

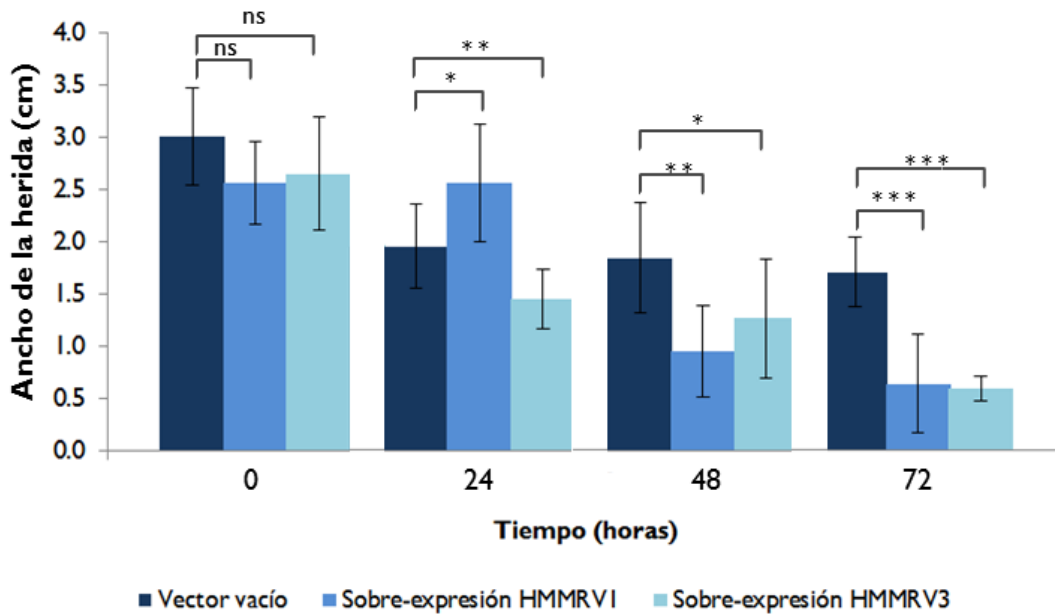


Figura 29. Ensayo de migración celular. Se evaluó el efecto de la sobre-expresión de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3* en la migración celular a través del ensayo de la herida. Los grupos se compararon con la prueba *t-student* no paramétrica (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ns: no estadísticamente significativo).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer representa un problema de salud mundial, siendo la segunda causa de muerte a nivel global y la tercera en México (WHO, 2018). Por tratarse de una enfermedad multifactorial su estudio es complejo, sin embargo, en la actualidad existen numerosos reportes sobre variantes generadas por *splicing* alternativo que se expresan diferencialmente en diversos tipos de cáncer o bien, que se relacionan con alguna de las marcas del cáncer (Sveen *et al.*, 2016)(Oltean and Bates, 2014).

Por ejemplo la isoforma del gen *p53*, un regulador del ciclo celular, denominada $\Delta Np53$ que se caracteriza por la pérdida de los 40 primeros aminoácidos, compite con la proteína canónica, interfiriendo el arresto del ciclo celular (Okumura et al., 2011). Otro ejemplo es el gen *VEGF* que posee varias isoformas, entre ellas está *VEGF-A₁₆₅* altamente angiogénica y sobre-expresada en tumores, en contraparte a *VEGF-A_{165b}* que tiene la función opuesta (Bates et al., 2002).

En este contexto, se sabe que el gen *HMMR* posee cuatro transcritos generados por *splicing* alternativo codificantes para proteínas independientes (NCBI, 2019), también que *HMMR* se sobre-expresa en cáncer de pulmón (D Wang et al., 2016), gástrico (Ishigami et al., 2011), glioblastoma (Tilghman et al., 2014), ovario (Buttermore et al., 2017), entre otros. Además, las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3* son las de mayor expresión en cáncer (Dunrui Wang et al., 2016). Se conoce la localización celular de *HMMR* y se han dilucidado las funciones celulares en las que se involucra, pero sin atribuirles a alguna de las variantes de forma específica (Misra et al., 2015). Por lo que, conocer el papel que desempeña cada una de estas variantes, especialmente *HMMRV1* y *HMMRV3* sería de gran relevancia al conocimiento del cáncer, además, por la actividad celular que desempeña, representaría una oportunidad para identificar posibles blancos terapéuticos y/o pronósticos en diversos tipos cáncer.

En este proyecto se analizaron las funciones de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3*, nuestros resultados indican que ambas variantes (*HMMRV1* y *HMMRV3*) promueven la migración celular, y *HMMRV3* incrementa, además, la viabilidad celular, lo cual podría sugerir que promueve la proliferación celular. Ambas funciones han sido descritas en el mecanismo general de *HMMR* (Misra et al., 2015), en donde independientemente de la localización celular de la proteína, el efecto final es la motilidad, la invasión y la migración. Sin embargo, para poder atribuir una vía de señalización exclusiva de cada una de las variantes de estudio, es necesario conocer su estructura y localización celular, así como, el perfil de expresión cuando se encuentra sobre-expresada cada una de ellas de forma independiente para poder estudiar y dilucidar las cascadas de señalización asociadas a cada variante.

A la fecha, el único reporte del estudio de las isoformas de *HMMR* ha sido en modelos murinos de tumor neuroendocrino pancreático, donde se ha visto que la sobre-expresión de la isoforma b (*HMMRV3*) promueve la metástasis, pero se desconoce el papel de la proteína canónica (*HMMRV1*) (Choi *et al.*, 2019). De forma análoga, en otro reporte se identificó que *HMMRV3* promueve tanto el crecimiento tumoral como la metástasis en nódulos linfáticos pancreáticos e hígado, en modelo murino de tumor de islotes pancreáticos (aun cuando de forma *in vitro* no observaron incrementos en la proliferación ni en la migración) (Du *et al.*, 2011).

Aunado a lo anterior, a nivel de RNAm existe evidencia de que *HMMRV3* promueve un fenotipo agresivo, pues el incremento en la expresión de este transcrito se ha relacionado con el estadio avanzado en leucemia linfocítica crónica B (Giannopoulos *et al.*, 2009), y en adenocarcinoma ductal pancreático, la sobre-expresión de esta misma variante se ha propuesto como factor pronóstico (Choi *et al.*, 2019). Además, se ha visto que la relación de expresión *HMMRV3/HMMRV2* es un factor pronóstico en mieloma múltiple (Maxwell *et al.*, 2004). En conjunto con nuestros resultados hay una fuerte evidencia de que la isoforma b (*HMMRV3*) genera un fenotipo maligno en aquellas células que la sobre-expresen, contrastando con la proteína canónica a quien no se le han atribuido características malignas.

Mientras que la variante *HMMRV1* no se ha relacionado con eventos malignos como: la invasión, metástasis o tumorigénesis. Por el contrario, se ha visto que en líneas celulares de cáncer de mama, una expresión alta de *HMMRV1-V2* (línea celular MCF7) confiere sensibilidad a la radiación, en contraste con bajos niveles de expresión en la línea celular MDA-MB-231, donde se ha observado radioresistencia (Schutze *et al.*, 2016). Nosotros al sobre-expresar *HMMRV1* en un modelo celular observamos el incremento de la migración celular, pero no de la viabilidad celular, a diferencia de sobre-expresión de *HMMRV3*. En conjunto, esto puede sugerir que la proteína canónica (*HMMRV1*) se relaciona con la actividad normal de una célula sana, es decir, en condiciones fisiológicas de salud, mientras que la isoforma b se relaciona probablemente con una actividad celular anormal, o bien en condiciones patológicas, por ejemplo, cáncer.

En un intento por explicar las diferencias encontradas en la funcionalidad celular al sobre-expresar independientemente las variantes *HMMRV1* y *HMMRV3*, es posible proponer que la proteína canónica codificada por la variante *HMMRV1* se localice a nivel extracelular; donde su función al unirse al complejo CD44-HA y otros receptores de factores de crecimiento, activa la cascada de señalización ERK1/2 cuyo efecto es la transcripción de factores motogénicos, esto ha sido evidenciado en fibroblastos donde se restringió la expresión de HMMR a la matriz extracelular (Tolg *et al.*, 2006). Sin embargo, no se ha relacionado específicamente con la variante *HMMRV1*.

Asimismo, se puede sugerir que la isoforma b de *HMMR* (*HMMRV3*) se localice en la región intracelular, en donde se ha descrito que *HMMR* además de activar la vía ERK1/2 antes mencionada, se puede translocar al núcleo y activar la transcripción de genes involucrados con degradación de la matriz celular y la motilidad. Además, tiene capacidad de unión a filamentos de actina y microtúbulos (Yang *et al.*, 1994)(Assmann *et al.*, 1999), y al activar a la proteína TPX2 modula la formación del huso mitótico vía AURKA participando en la progresión del ciclo celular (Jiang *et al.*, 2010).

Esto explicaría nuestros resultados, es decir, que la sobre-expresión de *HMMRV3* incrementó la migración celular y la viabilidad celular (un posible indicador del incremento en la proliferación celular) a diferencia de *HMMRV1* que sólo incrementó significativamente la migración celular. Sin embargo, debido a las limitaciones de este proyecto, estas hipótesis deben ser probadas realizando otros experimentos.

8. CONCLUSIONES

Se sobre-expresaron de forma independiente las variantes del gen *HMMR*: *HMMRV1* y *HMMRV3* en un modelo *in vitro*, al analizar los efectos de la transfección mediante ensayos de funcionalidad celular, se observó que ambas variantes promueven de forma significativa la migración celular, y que además la variante *HMMRV3* aumenta la viabilidad celular, lo que a su vez podría sugerir que promueve la proliferación celular.

9. PERSPECTIVAS

1. Determinar la localización celular de la proteína canónica y la isoforma b de *HMMR* mediante inmunofluorescencia.
2. Comprobar los resultados de expresión de *HMMRV3* en células HEK-293 mediante qPCR-RT o PCR digital.
3. Complementar los resultados de viabilidad celular con un ensayo de proliferación celular, por ejemplo, mediante citometría de flujo, con la finalidad de comprobar que *HMMRV3* promueve esta función celular.
4. Evaluar el efecto de sobre-expresión de ambas variantes en el ciclo celular utilizando citometría de flujo.
5. Evaluar el efecto de sobre-expresión de *HMMRV1* y *HMMRV3* en la invasión celular, mediante el ensayo de Matrigel
6. Determinar el perfil de expresión cuando se sobre-expresan cada una de las variantes, a través de microarreglos; con la finalidad de identificar los genes con expresión diferencial y poder dilucidar las vías de señalización en que participan las variantes.
7. Evaluar la expresión de *HMMRV3* en muestras de leucemia aguda linfoblástica tipo B y analizar si existe correlación con características clínicas.
8. Evaluar la capacidad tumorigénica y metastásica de *HMMRV1* y *HMMRV3* en un modelo murino, para determinar si contribuyen a un fenotipo maligno.

10. BIBLIOGRAFÍA

Assmann, V. *et al.* (1999) 'The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments', *Journal of Cell Science*.

Bates, D. O. *et al.* (2002) 'VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma', *Cancer Research*.

Buttermore, S. T. *et al.* (2017) 'Increased RHAMM expression relates to ovarian cancer progression', *Journal of Ovarian Research*. doi: 10.1186/s13048-017-0360-1.

Chen, J. and Weiss, W. A. (2015) 'Alternative splicing in cancer: Implications for biology and therapy', *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2013.570.

Choi, S. *et al.* (2019) 'Function and clinical relevance of RHAMM isoforms in pancreatic tumor progression', *Molecular Cancer*. doi: 10.1186/s12943-019-1018-y.

Cloutier, P. *et al.* (2008) 'Antagonistic effects of the SRp30c protein and cryptic 5' splice sites on the alternative splicing of the apoptotic regulator Bcl-x', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M800353200.

Du, Y. C. N. *et al.* (2011) 'Receptor for hyaluronan-mediated motility isoform B promotes liver metastasis in a mouse model of multistep tumorigenesis and a tail vein assay for metastasis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1114022108.

Ghigna, C. *et al.* (2005) 'Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.026.

Giannopoulos, K. *et al.* (2009) 'The candidate immunotherapeutical target, the receptor for hyaluronic acid-mediated motility, is associated with proliferation and shows prognostic value in B-cell chronic lymphocytic leukemia', *Leukemia*. doi: 10.1038/leu.2008.338.

Gust, K. M. *et al.* (2015) 'RHAMM (CD168) Is Overexpressed at the Protein Level and May Constitute an Immunogenic Antigen in Advanced Prostate Cancer Disease', *Neoplasia*. doi: 10.1593/neo.09694.

Ishigami, S. *et al.* (2011) 'Prognostic impact of CD168 expression in gastric cancer', *BMC Cancer*. doi: 10.1186/1471-2407-11-106.

Jiang, J. *et al.* (2010) 'Multifunctional proteins bridge mitosis with motility and cancer with inflammation and arthritis', *TheScientificWorldJournal*. doi: 10.1100/tsw.2010.141.

Klewes, L., Turley, E. A. and Prehm, P. (2015) 'The hyaluronate synthase from a

- eukaryotic cell line', *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/bj2900791.
- de Koning, A. P. J. *et al.* (2011) 'Repetitive elements may comprise over Two-Thirds of the human genome', *PLoS Genetics*. doi: 10.1371/journal.pgen.1002384.
- Matera, A. G. and Wang, Z. (2014) 'A day in the life of the spliceosome', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm3742.
- Maxwell, C. A. *et al.* (2004) 'RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma', *Blood*. doi: 10.1182/blood-2003-11-4079.
- Misra, S. *et al.* (2015) 'Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer', *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2015.00201.
- Niedworok, C. *et al.* (2013) 'The impact of the receptor of hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on human urothelial transitional cell cancer of the bladder.', *PloS one*. doi: 10.1371/journal.pone.0075681.
- Okamoto, I. *et al.* (1999) 'CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration', *Oncogene*. doi: 10.1038/sj.onc.1202447.
- Okumura, N. *et al.* (2011) 'Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.098.
- Oltean, S. and Bates, D. O. (2014) 'Hallmarks of alternative splicing in cancer', *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2013.533.
- Park, D. *et al.* (2012) 'Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ ', *Molecules and Cells*. doi: 10.1007/s10059-012-2294-1.
- Park, E. *et al.* (2018) 'The Expanding Landscape of Alternative Splicing Variation in Human Populations', *American Journal of Human Genetics*. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.11.002.
- Piovesan, A. *et al.* (2019) 'Human protein-coding genes and gene feature statistics in 2019', *BMC Research Notes*. doi: 10.1186/s13104-019-4343-8.
- Savani, R. C. *et al.* (2001) 'Differential Involvement of the Hyaluronan (HA) Receptors CD44 and Receptor for HA-mediated Motility in Endothelial Cell Function and Angiogenesis', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M102273200.

Schutze, A. *et al.* (2016) 'RHAMM splice variants confer radiosensitivity in human breast cancer cell lines', *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.7258.

Slevin, M. *et al.* (2007) 'Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways', *Matrix Biology*. doi: 10.1016/j.matbio.2006.08.261.

Sveen, A. *et al.* (2016) 'Aberrant RNA splicing in cancer; Expression changes and driver mutations of splicing factor genes', *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2015.318.

Tilghman, J. *et al.* (2014) 'HMMR maintains the stemness and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2103.

Tolg, C. *et al.* (2006) 'Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200511027.

Tolg, C. *et al.* (2014a) 'Hyaluronan and RHAMM in Wound Repair and the "cancerization" of Stromal Tissues', *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2014/103923.

Tolg, C. *et al.* (2014b) 'Hyaluronan and RHAMM in Wound Repair and the "Cancerization" of Stromal Tissues', *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2014/103923.

Toole, B. P. (2001) 'Hyaluronan in morphogenesis', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1006/scdb.2000.0244.

Turley, E. A. (1982) 'Purification of a hyaluronate-binding protein fraction that modifies cell social behavior', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/0006-291X(82)92101-5.

Turley, E. A., Noble, P. W. and Bourguignon, L. Y. W. (2002) 'Signaling Properties of Hyaluronan Receptors', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.r100038200.

Veisoh, M. *et al.* (2014) 'Cellular heterogeneity profiling by hyaluronan probes reveals an invasive but slow-growing breast tumor subset', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.1402383111.

Wang, Dunrui *et al.* (2016) 'Expression of the receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM) is associated with poor prognosis and metastasis in non-small cell lung carcinoma', *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.9554.

Wang, D *et al.* (2016) 'Expression of the receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM) is associated with poor prognosis and metastasis in non-small cell lung

carcinoma', *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.9554.

Wang, E. T. *et al.* (2008) 'Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes', *Nature*. doi: 10.1038/nature07509.

Wang, Y. *et al.* (2015) 'Mechanism of alternative splicing and its regulation (Review)', *Biomedical Reports*. doi: 10.3892/br.2014.407.

Will, C. L. and Lührmann, R. (2011) 'Spliceosome structure and function', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a003707.

Yang, B. *et al.* (1994) 'Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein.', *The EMBO Journal*. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06261.x.

Zeller, P. and Gasser, S. M. (2017) 'The Importance of Satellite Sequence Repression for Genome Stability', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. doi: 10.1101/sqb.2017.82.033662.

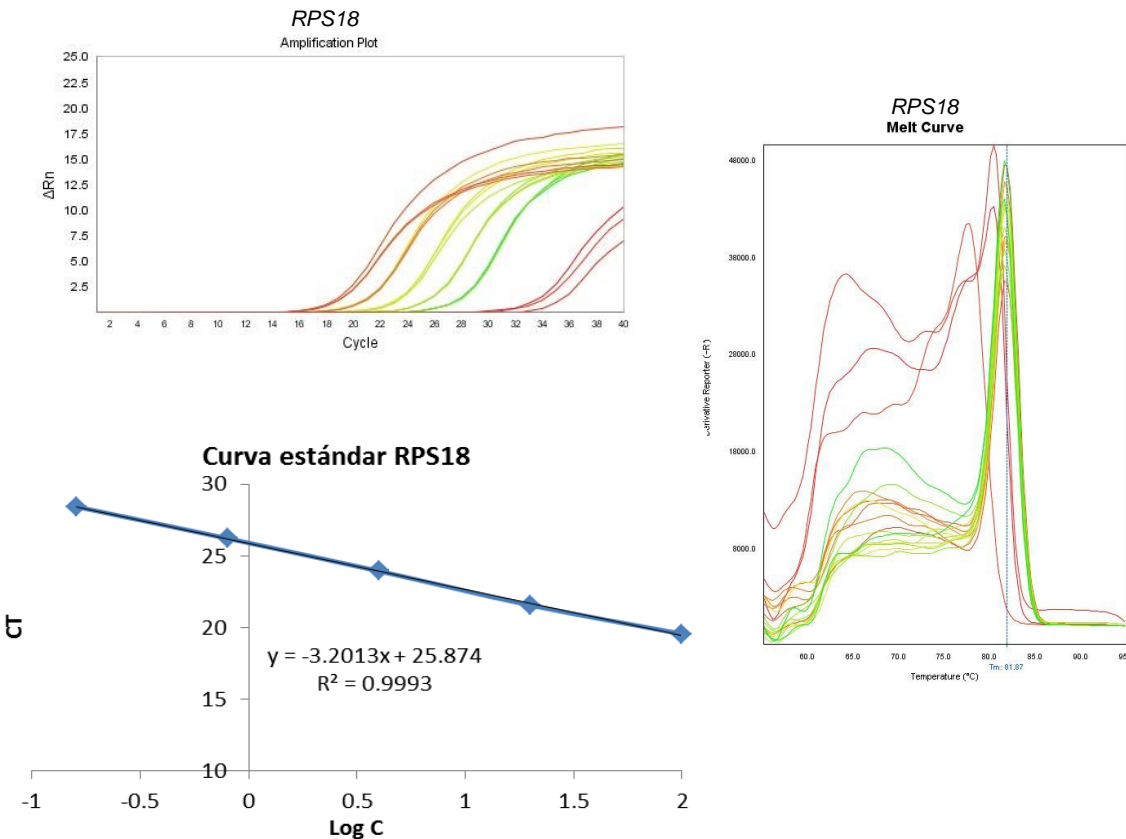
Zhang, S. *et al.* (1998) 'The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.273.18.11342.

ANEXOS

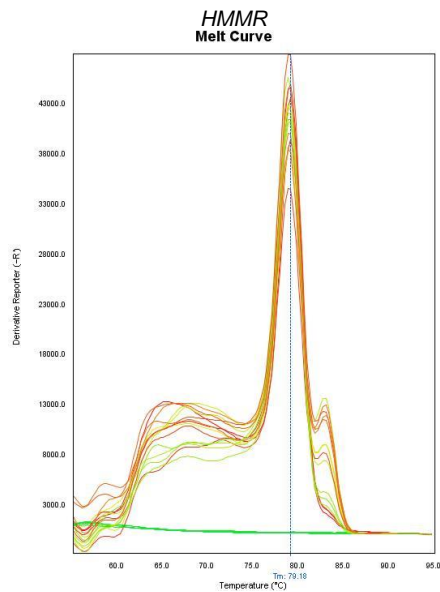
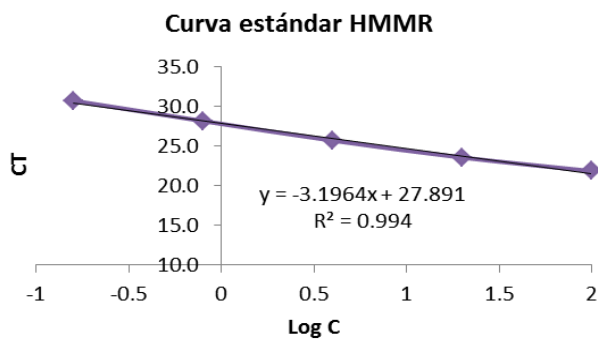
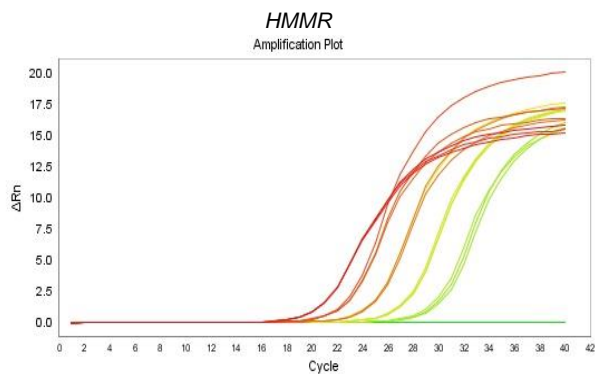
I. Validación de la eficiencia para la evaluación de expresión del gen *HMMR* y *HMMRV1* por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$

A) Curvas de amplificación, disociación y estándar del gen de referencia *RPS18*, **B)** del gen de interés *HMMR* y **C)** de *HMMRV1*. Las ecuaciones de las rectas indican que cumplen con los parámetros de eficiencia ($m = -3.32 \pm 10\%$) y de linealidad ($r^2 \geq 0.9$). **D)** Gráficos ΔCT vs Log concentración: las ecuaciones de la recta indican que se cumple con el parámetro de eficiencia ($m = -0.1$ a 0.1), es decir que, es válido aplicar el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para la evaluación de expresión de *HMMR* y *HMMRV1*, el cual requiere que las eficiencias de amplificación para ambos genes (gen blanco y gen de referencia) sea la misma.

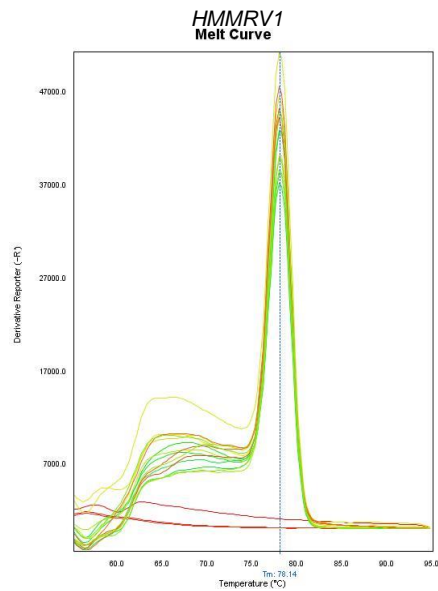
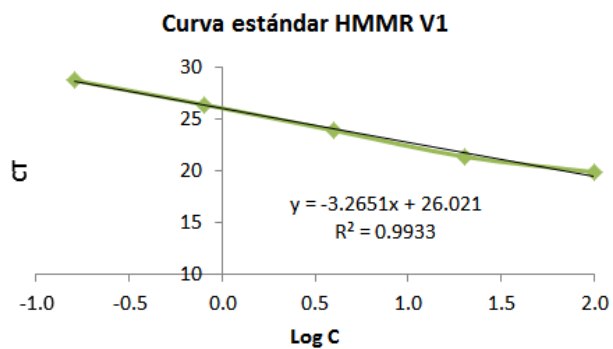
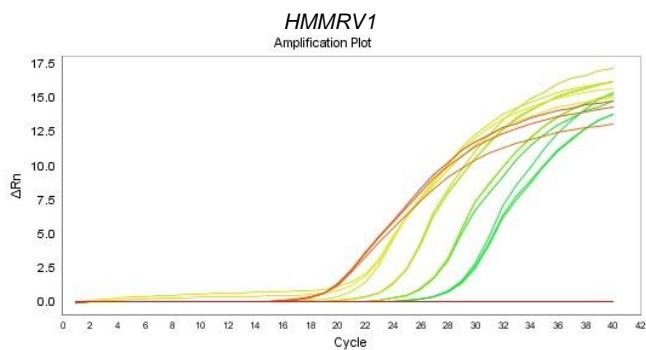
A)



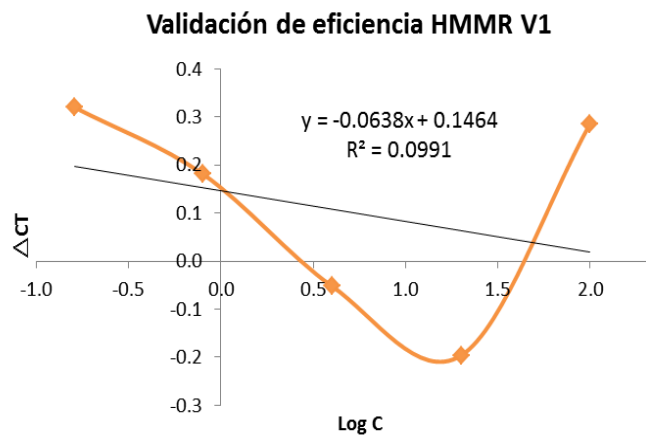
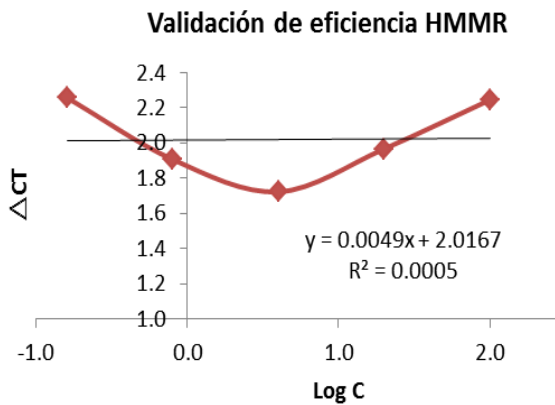
B)



C)

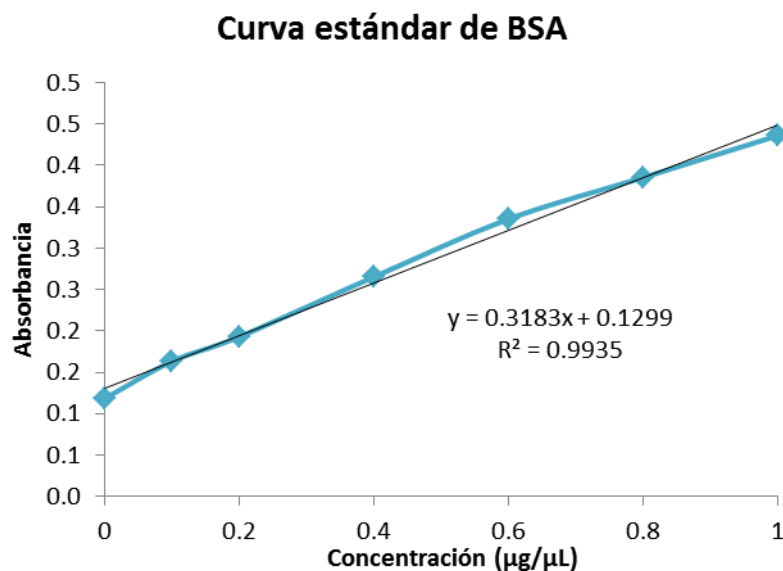


D)



II. Cuantificación de proteínas: Método de Lowry

La cuantificación de proteínas totales extraídas a partir de líneas celulares, se realizó con el método de Lowry; para ello se construyó una curva estándar de albúmina sérica bovina (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) obteniendo un valor de $r^2=0.9935$, mediante la ecuación de la recta se calcularon las concentraciones de las muestras.

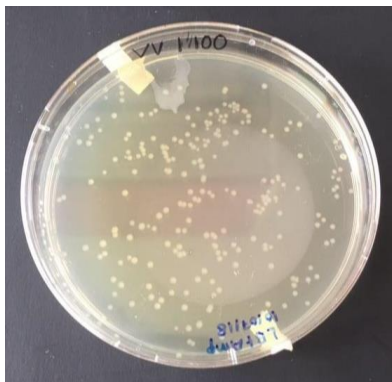


III. Ensayo de transformación bacteriana

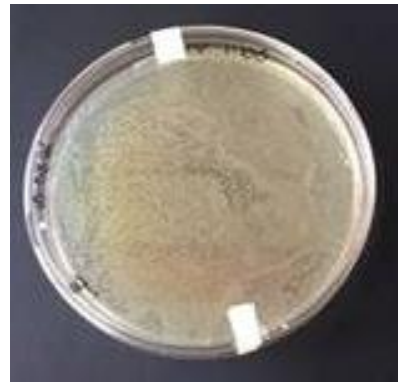
Cada uno de los vectores fueron introducidos en bacterias mediante choque térmico, el cultivo obtenido fue sembrado en agar con y sin el antibiótico de selección, como control de viabilidad se sembraron bacterias sin vector en agar LB, para determinar la funcionalidad del antibiótico se utilizó un control de bacterias sin vector en medio LB con antibiótico, y como control de esterilidad se mantuvo un placa de agar LB abierta durante el procedimiento.

Vector vacío

Agar LB + Ampicilina

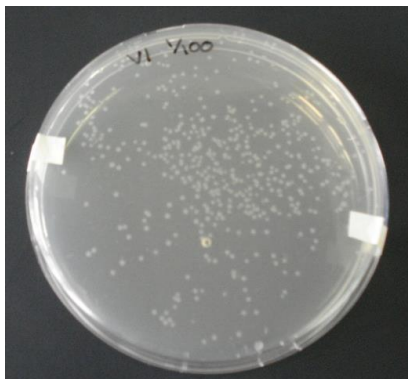


Agar LB

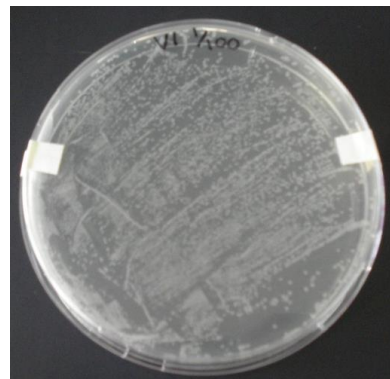


HMMRV1

Agar LB + Ampicilina



Agar LB

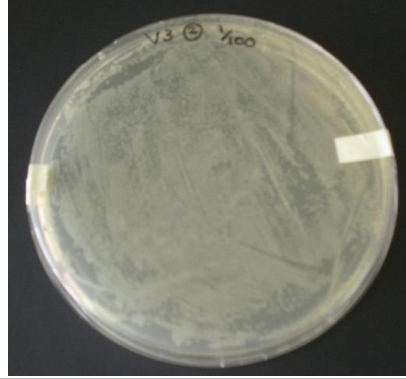


HMMRV3

Agar LB + Ampicilina

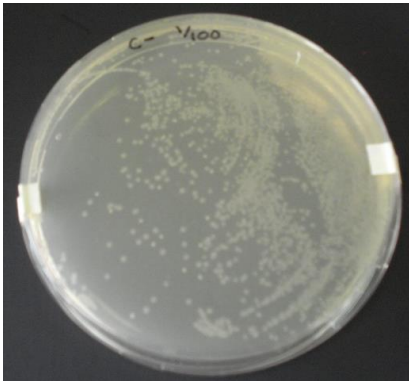


Agar LB

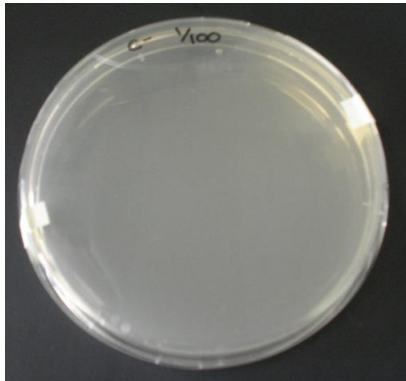


Controles

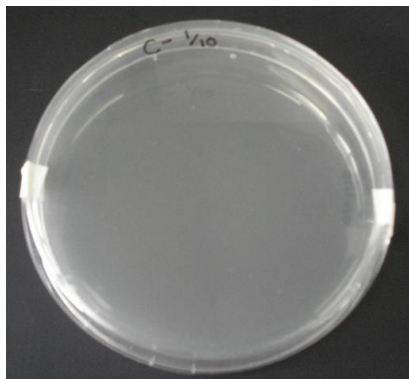
Viabilidad
Agar LB



Antibiótico
Agar LB + Ampicilina



Esterilidad
Agar LB



IV. Cuantificación de DNA plasmídico

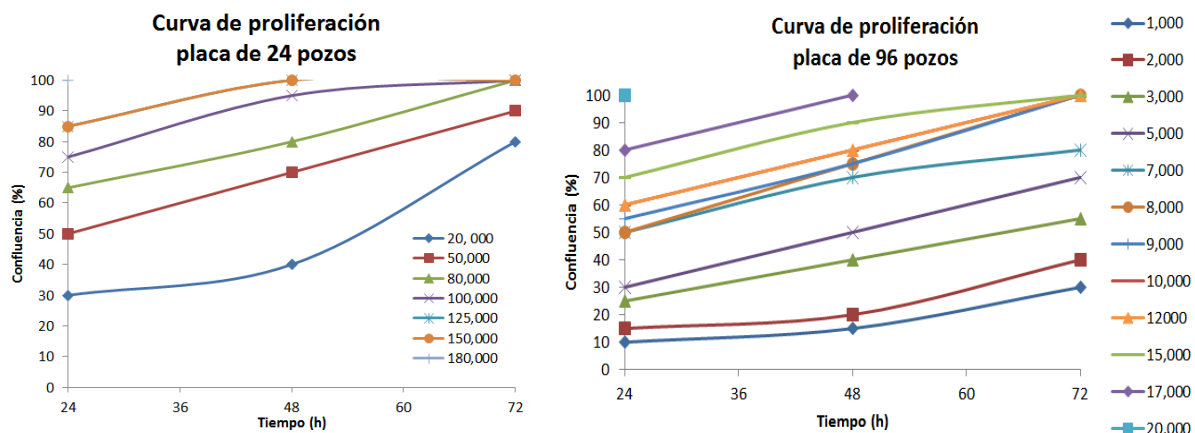
Concentración y resultados de pureza obtenidos por espectrofotometría, de DNA plasmídico correspondientes a cada vector antes y después de la esterilización mediante filtración.

Muestra	Concentración (ng/μL)		Absorbancia 260/280		Absorbancia 260/230	
	No estéril	Estéril	No estéril	Estéril	No estéril	estéril
Vector vacío	1939.3	740	1.95	1.91	2.37	2.25
HMMR V1	1681.2	754.1	1.94	1.92	2.38	2.29
HMMR V3	2272.9	1147.6	1.94	1.93	2.45	2.39

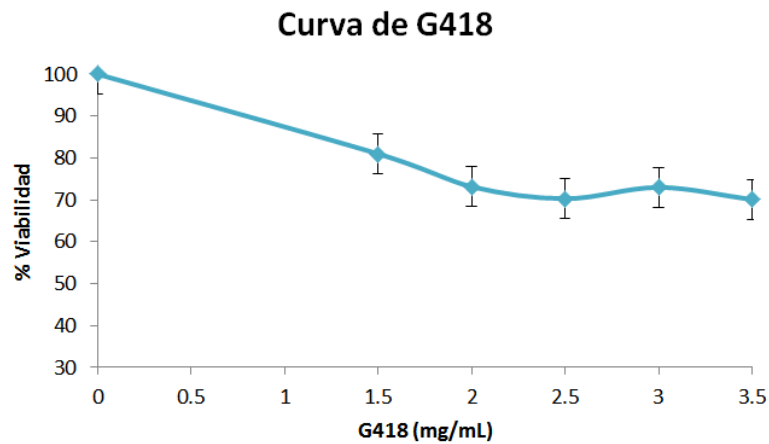
V. Estandarización de condiciones para el ensayo de transfección estable

A) Curva de proliferación MDA-MB-231. Se sembraron cantidades definidas de células en placas de 24 y 96 pozos, y se evaluó cualitativamente la confluencia a las 24, 48 y 72 horas. **B)** Curva de G418. Para determinar la concentración adecuada de antibiótico de selección, se sembraron en placa de 96 pozos 17,000 células/pozo, a las 24h se adicionaron distintas concentraciones de G418 (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mg/mL), finalmente a las 24h se evaluó la viabilidad mediante el ensayo de MTT. La concentración seleccionada fue de 2mg/mL.

A)

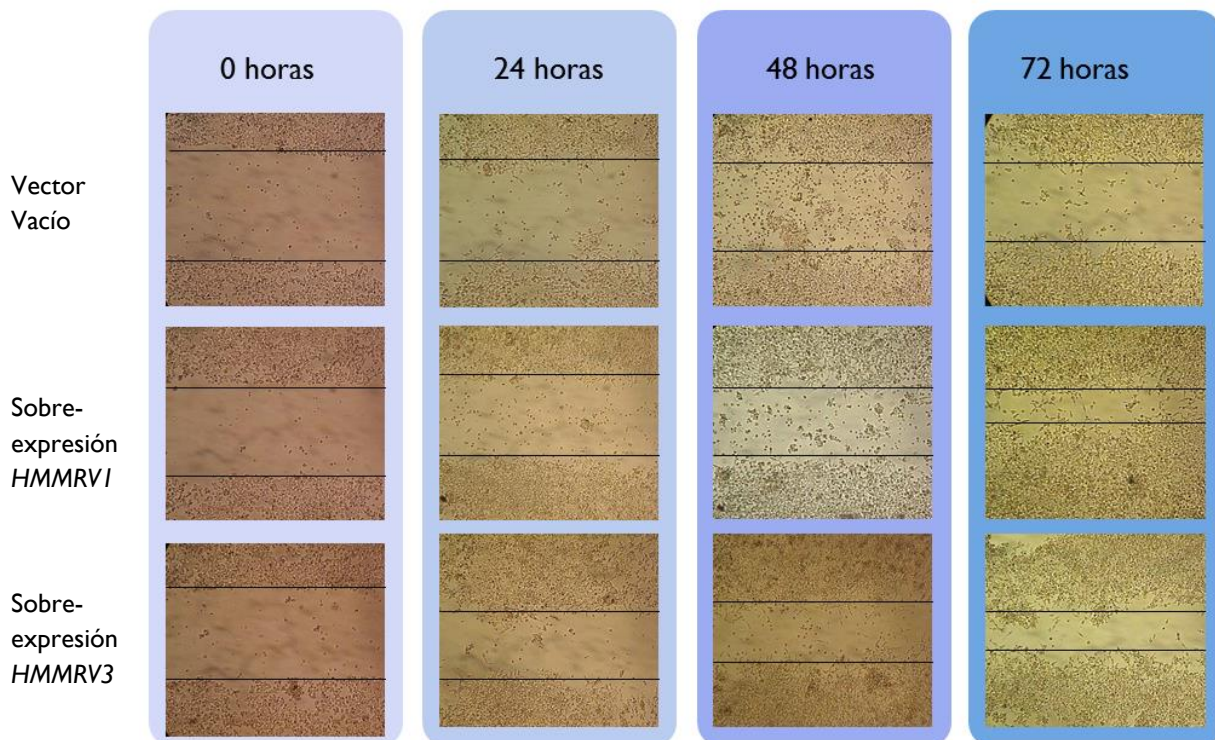


B)



VI. Ensayo de la herida para evaluar migración celular

Se tomaron fotografías de la herida a las 0, 24, 48 y 72 horas, el ensayo se realizó por triplicado, de cada uno se tomaron tres fotografías, por lo que para cada grupo se obtuvieron nueve mediciones. En la figura se muestran fotografías representativas del vector vacío, la sobre-expresión *HMMRV1* y de la sobre-expresión *HMMRV3*.



VII. Preparación de soluciones amortiguadoras de pH utilizadas en Western Blot

A) Buffer de corrimiento Tris/Glicina/SDS pH 8.3

Para preparar 1L de solución stock 10X de buffer de electroforesis, se disolvieron en 500 mL 30.2 g Tris-base (25 mM), 14g glicina (192 mM) y 10g SDS (0.1%). Se ajustó el pH a 8.3 y se aforo con agua a 1L. La solución se etiquetó y se guardó a 4°C. Para la solución de trabajo 1X, se utilizó 100 mL de la solución stock 10X y se aforo a 1L con agua.

B) Buffer Bjerrum Shafer Nielsen pH 9.2 (transferencia semi-húmeda)

Para preparar 1L de buffer Bjerrum Shafer Nielsen 1X se disolvieron en 500 mL de agua desionizada: 5.82g Tris base (48 mM) y 2.93 g glicina (39mM), se añadieron 200 ml de metanol (20% v/v), se ajustó el pH y se llevó a la marca de aforo con agua desionizada.

C) Buffer Towbin pH 8.3 (transferencia húmeda)

Para preparar 1L de buffer Towbin 1X se disolvieron en 500 mL de agua desionizada: 3.03 g Tris base (25 mM) y 14.4g glicina (192 mM), se añadieron 200 ml de metanol (20% v/v), se ajustó el pH y se llevó a la marca de aforo con agua desionizada.

Las soluciones amortiguadoras se almacenaron a 4°C y se reutilizaron hasta tres veces.