



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL FACTOR DE  
TRANSCRIPCIÓN NF-KB EN EL PROMOTOR DE miR-21  
EN CÉLULAS CERVICALES TUMORALES HUMANAS  
HPV+**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**LESLIE NUÑEZ LÓPEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017**



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.



Esta tesis se realizó en la Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP); bajo la Dirección del Dr. Oscar Peralta Zaragoza. La tesis está anidada al proyecto de investigación: “Análisis funcional del factor de transcripción NF-kB en el promotor de miR-21 en células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV+”; el cual tiene un financiamiento por parte del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, Investigación en ciencia básica SEP-CONACYT convocatoria 2011, con clave del proyecto: CB-2011-01-169209. Este proyecto está registrado en el SIID del INSP con clave de proyecto: CISEI-1209.

La estudiante Leslie Nuñez López con número de registro de becario 22510 de CONACYT, recibió la beca para realización de tesis de Licenciatura con cargo al proyecto: “Análisis funcional del factor de transcripción NF-kB en el promotor de miR-21 en células cervicales tumorales humanas HPV+”; con clave de proyecto: CB-2011-01-169209.

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>iii</b>
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades del cáncer.....	1
1.2 Proceso de carcinogénesis.....	1
1.3 Cáncer cervicouterino (CaCU).....	3
1.4 Virus del papiloma humano (HPV).....	3
1.5 Mecanismos de regulación génica en cáncer cervical .....	6
1.6 microRNAs (miRNAs).....	7
1.7 Biogénesis de los microRNAs .....	8
1.8 Perfil de expresión de los microRNAs .....	10
1.9 microRNAs como oncogenes y genes supresores de tumores.....	11
1.10 microRNA-21 .....	13
1.11 NF-kB.....	16
1.12 NF-kB y cáncer.....	19
<b>II JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>III HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>IV OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>22</b>
<b>V OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>22</b>
<b>VI MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
6.1 Cultivos celulares .....	23
6.2 Bacterias competentes .....	23
6.3 Extracción de DNA de cultivos celulares .....	23
6.4 Análisis del promotor del gen de miR-21 <i>in silico</i> .....	24
6.5 Estrategia de clonación y construcción de plásmidos reporteros con los sitios de reconocimiento para los elementos NF-kB del promotor de miR-21 .....	28
6.6 Ensayos de transfección celular y análisis de la actividad de luciferasa .....	31
6.7 Análisis estadístico.....	32
<b>VII RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
7.1 Análisis de los sitios de reconocimiento para NF-kB en el promotor 5´del gen miR-21 .....	34
7.2 Expresión de miR-21 se sugiere es modulada por la unión del factor de transcripción NF-kB a su región promotora en extremo 5´.....	35
<b>VIII DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>IX CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>

<b>X PERSPECTIVAS.....</b>	<b>46</b>
<b>XI REFERENCIAS.....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

## Página

Figura 1. <i>Hallmarks</i> del cáncer .....	2
Figura 2. Organización genómica del HPV .....	5
Figura 3. Biogénesis de los miRNAs .....	10
Figura 4. miRNAs y los <i>hallmarks</i> del CaCU .....	12
Figura 5. Localización genómica de miR-21 .....	14
Figura 6. Regulación transcripcional de miR-21 y sus genes blanco en el cáncer humano .....	16
Figura 7. Vía clásica de activación de NF-kB .....	18
Figura 8. Esquema que muestra los sitios NF-kB en el promotor del gen miR-21 y las regiones que incluyen las diferentes secuencias de reconocimiento NF-kB a amplificar por PCR .....	27
Figura 9. Esquema de pGL2-Basic y de los insertos NF-kB generados por PCR que fueron clonados en este vector reportero .....	29
Figura 10. Amplicones correspondientes a las secuencias de reconocimiento para NF-kB en el promotor del gen miR-21 .....	35
Figura 11. Ensayos de electroforesis en gel de agarosa 1% de construcciones reporteras sometidas a digestión enzimática con MluI. ....	37
Figura 12. Análisis funcional de las secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción NF-kB en el promotor del gen miR-21 .....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. miRNAs involucrados con el CaCU y sus blancos experimentalmente validados.....	13
Tabla 2. Genes regulados por NF-kB involucrados en la carcinogénesis .....	19

## RESUMEN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) representa un grave problema de salud en la población femenina a nivel mundial, principalmente en países en desarrollo. Se reconoce a la infección persistente por uno o más tipos del virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo como principal factor etiológico, que tiene como primordial consecuencia el descontrol de las funciones biológicas del hospedero a nivel molecular y celular; es por ello, que la determinación de los patrones de expresión genética es crucial.

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas que destacan por ser elementos reguladores de la expresión génica y su alteración contribuye al proceso de carcinogénesis. Actualmente, es limitado el conocimiento sobre cómo la expresión génica de los miRNAs es regulada, por lo que el estudio de las regiones promotoras de los genes de miRNAs puede permitir explorar sus mecanismos de regulación. Como caso particular, se ha reportado que miR-21 se encuentra sobreexpresado en diversas patologías, incluyendo el CaCU. Este miRNA modula el fenotipo canceroso de las células mediante la interacción con diversos factores de transcripción, entre los que se incluye al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual participa en el control de la homeostasis celular.

Es por esta razón que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad funcional de los elementos NF- $\kappa$ B en el promotor de miR-21 en células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV. Para ello, se realizó una búsqueda bioinformática sobre la región promotora del gen de miR-21 para ubicar los sitios NF- $\kappa$ B putativos y en la cual se localizaron cinco secuencias de unión de NF- $\kappa$ B. Para demostrar la funcionalidad de estos elementos NF- $\kappa$ B, se obtuvieron por PCR los diferentes fragmentos correspondientes a cada secuencia de reconocimiento para NF- $\kappa$ B y se generaron construcciones de plásmidos reporteros, que posteriormente fueron transfectados en células cervicales tumorales humanas y se evaluó la actividad para cada gen reportero.

Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de las secuencias de reconocimiento para NF- $\kappa$ B son funcionales y tienen un efecto en conjunto en la regulación de la actividad promotora de miR-21. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el gen de miR-21 puede ser regulado a nivel transcripcional por el

factor NF- $\kappa$ B, y este mecanismo puede explicar en parte la sobreexpresión de miR-21 en líneas celulares de cáncer cervical.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Generalidades del cáncer**

El cáncer es un desorden hiperproliferativo de origen multifactorial en el cual la invasión y la angiogénesis, en la mayoría de los casos, conducen a la metástasis tumoral [1]. Este padecimiento es una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial; según informes realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), además es considerado como la tercera causa de muerte a nivel mundial después de desórdenes cardiovasculares y enfermedades infecciosas [2]. En el año 2012 se registraron 8.2 millones de muertes por cáncer, de las cuales el 70% se produjeron en África, Asia, América central y Sudamérica [3].

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es el segundo tipo de cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial [4]. En México, el CaCU representa un gran problema de salud pública, ya que es el segundo tipo de neoplasia más frecuente y la segunda causa de muerte entre la población femenina [5]. La relevancia del CaCU no sólo subyace en ser muy frecuente en las mujeres en diferentes países en desarrollo, sino porque su detección suele ser tardía debido a que el diagnóstico es inadecuado y a que los tratamientos generalmente son inasequibles [6,7]. La infección por el virus del papiloma humano (HPV) tiene una función central en la etiología del CaCU; sin embargo, se requieren de otros factores para su desarrollo. Por esta razón, es importante esclarecer los mecanismos involucrados en la regulación génica de las células tumorales en el desarrollo de este padecimiento.

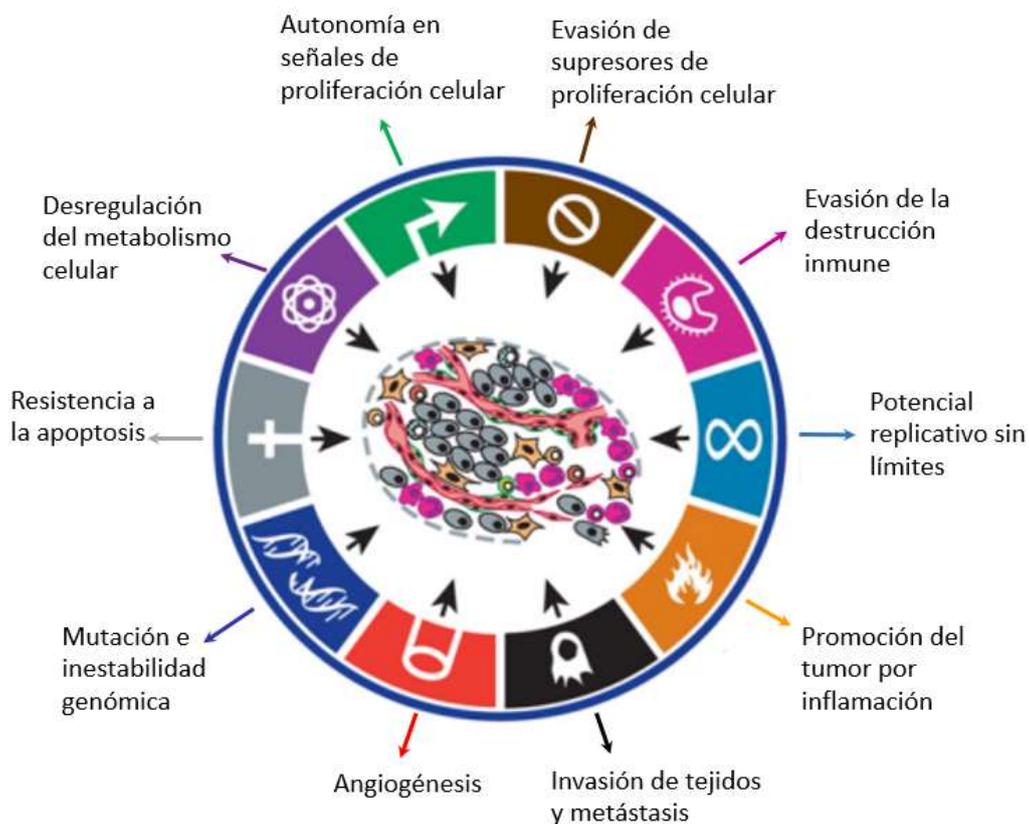
### **1.2 Proceso de carcinogénesis**

Debido a que el cáncer es considerado un padecimiento que tiene origen en múltiples factores, diferentes disciplinas y líneas de investigación se esfuerzan por concretar conceptos que puedan describir de manera lógica la complejidad, los aspectos clínicos y experimentales de la enfermedad.

Principalmente, se han vinculado con la iniciación y desarrollo del cáncer las alteraciones genéticas, las cuales tienen consecuencias relevantes en los

procesos celulares y conllevan a la transformación de células normales en células cancerosas [8,9].

Existe un consenso en el que se contemplan ocho alteraciones fisiológicas comunes de las células humanas normales, que permiten el proceso de transformación a células tumorales: autonomía en señales de proliferación celular, evasión de supresores de proliferación celular, resistencia a la apoptosis, potencial replicativo sin límites, desregulación del metabolismo celular, evasión de la destrucción inmune, angiogénesis, invasión de tejidos y metástasis. Estas características adquiridas son facilitadas por la promoción del tumor por inflamación, las mutaciones y la inestabilidad genómica (Figura 1) [8,9].



**Figura 1.** *Hallmarks* del cáncer. Esquema de las características adquiridas por las células, por medio de distintos mecanismos, durante el proceso de carcinogénesis (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

### **1.3 Cáncer cervicouterino (CaCU)**

El CaCU es un gran problema de salud pública en países en desarrollo, incluyendo a México. Existen muchos factores de riesgo asociados con el desarrollo de este tipo de cáncer que pueden ser inherentes al hospedero (celulares, genéticos, epigenéticos, inmunológicos, dieta) o al ambiente que pueden incidir en el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, el principal factor de riesgo para la evolución del CaCU es la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (HPV-HR, por sus siglas en inglés), el cual tiene una función muy relevante en la iniciación y progresión del cáncer aunque no es un factor determinante en la patogénesis del CaCU [10].

La infección por HPV es comúnmente transmitida por contacto sexual e inicialmente provoca lesiones intraepiteliales escamosas (LIE). La mayoría de estas lesiones desaparecen después de 6 a 12 meses de su brote, probablemente debido a una adecuada respuesta del sistema inmune. Sólo un pequeño porcentaje de estas lesiones persisten y progresan a lesiones intraepiteliales escamosas de alto riesgo (NIC), carcinoma *in situ* y, sin intervención quirúrgica se desarrolla carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma del cérvix [11, 12].

La asociación entre la carga viral y el CaCU varía con el tipo de HPV, el estado físico del virus y las condiciones de la lesión cervical [13].

El examen de detección del CaCU está comúnmente basado en análisis citológicos y colposcopías. El tratamiento de los pacientes usualmente involucra cirugía y quimiorradioterapia, aunque la histerectomía es empleada en etapas tempranas [11].

Dada la importancia del CaCU, es necesario esclarecer las interacciones a nivel molecular entre los tipos de HPV-HR y la célula hospedera para mejorar el diagnóstico y tratamiento de este padecimiento.

### **1.4 Virus del papiloma humano (HPV)**

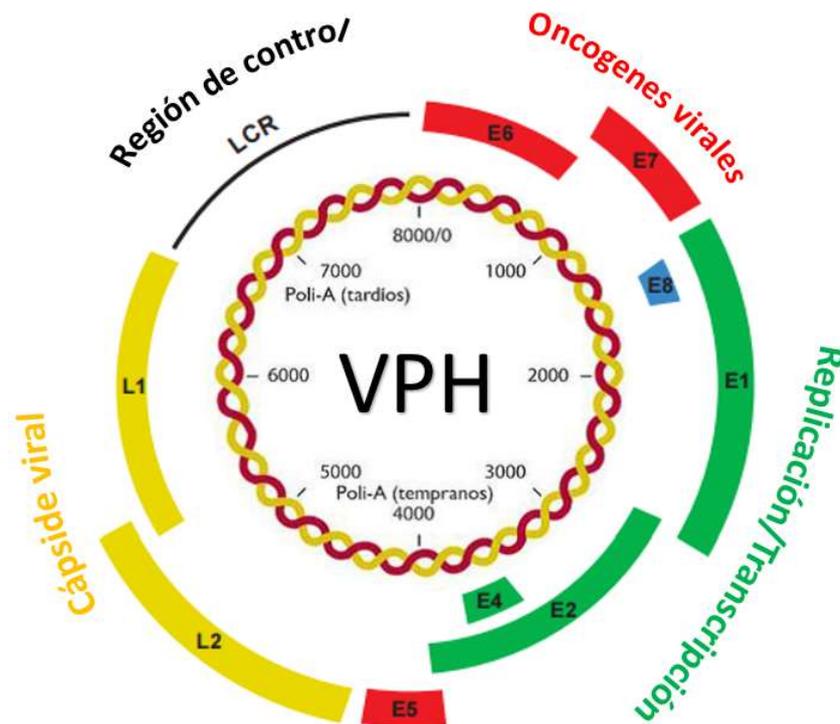
El HPV es un virus pequeño de DNA circular de doble hebra y carente de envoltura lipídica, infecta células basales y se replica en el núcleo de las células escamosas epiteliales [14].

El genoma del HPV consta aproximadamente de 6800 a 8000 pares de bases (pb). El genoma viral está dividido en 8 marcos abiertos de lectura ORF (del

inglés *open reading frame*) que codifican para los genes: E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2; donde la letra E designa una expresión transcripcional temprana y L una expresión transcripcional tardía (Figura 2) [15].

Los oncogenes E5, E6 y E7 modulan el proceso de transformación celular y poseen la capacidad de estimular la actividad de proliferación, los genes E1 y E2 regulan la replicación y la transcripción viral; los genes tardíos L1 y L2, codifican para proteínas de la cápside viral [16]. El oncogen E5 es importante porque previene la apoptosis [11]. El gen E4 se expresa durante todo el ciclo de vida viral, además de que cumple con funciones de regulación del virus, ensamblaje de multímeros y suprime la proliferación celular [11, 17].

El ciclo de vida del HPV difiere de otras familias de virus, la infección requiere de la disponibilidad de células epiteliales de la epidermis o mucosa que todavía sean capaces de proliferar (capa de células basales), es aquí donde la infección por HPV es establecida [17]. En estas células, la expresión génica viral se suprime en gran parte, pero la expresión limitada de los genes virales tempranos (E1-E7) en células infectadas hace que éstas proliferen y se expandan lateralmente. E1 y E2 son genes importantes para la replicación del genoma viral y la terminación del ciclo viral. E1 es importante para el mantenimiento del genoma viral de forma episomal. E2 también está involucrado en la regulación negativa de la actividad transcripcional de los oncogenes virales E6 y E7. Las proteínas E5, E6 y E7 son requeridas para incrementar la proliferación celular basal conduciendo a un incremento en el índice de replicación del genoma viral. La proteína E6 suprime los controles del ciclo celular mediante la inhibición del gen supresor de tumores p53, el cual es un factor de transcripción importante que induce la apoptosis de células infectadas. La proteína viral E7 bloquea el gen supresor de tumores Rb (retinoblastoma) que es otro importante regulador del ciclo celular [10, 18]. Después de entrar a las capas suprabasales, la expresión génica viral tardía es iniciada; el genoma circular del virus es entonces replicado y se sintetizan las proteínas estructurales de la cápside. Es en las capas superiores de la epidermis o de la mucosa, donde las partículas virales completas son ensambladas y liberadas dentro del tracto genital, haciendo posible la infección de otras áreas del epitelio o su transmisión por vía sexual [11].



**Figura 2.** Organización genómica del HPV (Modificado de Prendiville y Davies, 2004).

Los oncogenes E6 y E7 son consistentemente expresados en el tejido canceroso, su inhibición bloquea el fenotipo maligno de las células cervicales cancerosas. Estos genes son capaces de inmortalizar varios tipos de células humanas de manera independiente, pero su eficiencia es mejorada cuando son expresados de manera conjunta; esto parece ser debido a un efecto sinérgico y complementario [11].

La expresión de los genes virales no sólo está regulada por E2, sino también está controlada por factores de transcripción tales como SP-1, AP-1 y NF-κB. La asociación entre estos elementos regula los mecanismos de latencia viral, la replicación vegetativa y la transcripción oncogénica durante la infección con HPV [19,20]. De esta manera, algunas formas en que las células infectadas por HPV se protegen de la progresión de la transformación por el HPV es inhibiendo la función de las oncoproteínas virales y el control transcripcional [11].

El virus del papiloma (PV) ha coevolucionado con sus hospederos animales por millones de años y el ciclo de vida de cada genotipo de HPV está vinculado cercanamente a la diferenciación de su blanco epitelial específico [21].

Actualmente son cerca de 100 genotipos de HPV que han sido identificados, de los cuales se sabe que aproximadamente son 60 los que infectan el epitelio genital [6]. Los tipos de HPV son clasificados según su capacidad para inducir lesiones cervicales; de esta manera, los virus de bajo riesgo están asociados a verrugas genitales y los de alto riesgo tienen el potencial de desarrollar cáncer. Los tipos de HPV de alto riesgo oncogénico son particularmente HPV-16 y HPV1-8, y se encuentran ampliamente distribuidos en todas las poblaciones humanas [10]. En México, se ha reportado que los tipos más frecuentes en las muestras cervicales de pacientes son el HPV-16, 18, 31,45, y 58 [5].

### **1.5 Mecanismos de regulación génica en cáncer cervical**

Como todas las neoplasias malignas, el CaCU es consecuencia de una serie de alteraciones en genes que hacen que las células sean capaces de sobrepasar los controles biológicos y les permite proliferar ilimitadamente, formar tumores e invadir otros tejidos.

Los diferentes procesos celulares y moleculares son finamente regulados por una gran cantidad de elementos; de esta manera, la regulación génica a nivel transcripcional y postranscripcional es fundamental para la estabilidad celular.

En células eucariontes, la regulación transcripcional se realiza en diferentes niveles y a través de una combinación de interacciones entre elementos regulatorios (promotores, potenciadores “*enhancers*”, silenciadores, elementos de control del locus LCRs) y la maquinaria molecular (factores de transcripción, activadores, coactivadores) que modulan la expresión génica [22,23].

Un punto crucial en la determinación de los patrones de expresión génica, está dado por los factores transcripcionales que reconocen secuencias específicas del DNA, principalmente en las regiones promotoras de los genes. La interacción de estos factores con sus secuencias reguladoras, desencadena eventos que tendrán como resultado la activación o la represión de un gen. [24,25]. Seguido de la transcripción, está el punto de control de expresión génica a nivel postranscripcional, en donde intervienen diferentes mecanismos (*splicing* alternativo, poliadenilación alternativa) y elementos regulatorios como son los miRNAs, los cuales destacan por ser pequeñas moléculas involucradas con la oncotransformación de las células.

## 1.6 microRNAs (miRNAs)

El mecanismo de RNA de interferencia (RNAi), se ha identificado con alto potencial en terapia génica. Este se encarga de reprimir o silenciar la expresión de genes específicos y probablemente evolucionó como protección contra virus y elementos genéticos móviles. Estos moduladores de la expresión génica son generalmente transcritos de regiones no codificantes del genoma produciendo microRNAs (miRNAs) [26].

Los miRNAs son pequeñas moléculas endógenas de RNA que no son traducidas en ningún aminoácido, son de cadena sencilla y sus productos maduros son de 20 a 24 nucleótidos (nt) de longitud aproximadamente. Estas moléculas actúan como reguladores de la expresión génica debido a que tienen la capacidad de inhibir específicamente la traducción o inducir la degradación de un RNA mensajero (mRNA) [27,28]. Los miRNAs también tienen la característica de ser diversos en secuencias y patrones de expresión, además de estar evolutivamente conservados [28].

Estas pequeñas moléculas fueron estudiadas por primera vez en *Caenorhabditis elegans*, en donde se descubrió que el gen *lin-4*, que está involucrado con el desarrollo larval, no codificaba para ninguna proteína, pero producía pequeños RNAs [29]. *lin-4* da origen a dos RNAs: uno de 22 nt y otro de aproximadamente 60 nt que potencialmente podría formar una estructura de tallo asa y ser el precursor del RNA más corto. El RNA *lin-4* es ahora reconocido como el primer miRNA identificado de esta clase de pequeños RNAs reguladores [30]. Sin embargo, fue hasta el año 2001, cuando se encontraron decenas de RNAs de tamaños cercanos a 21 nt en el mismo nemátodo (*C. elegans*), en plantas (*A. thaliana*) en moscas (*D. melanogaster*) y en vertebrados (*H. sapiens*) [31].

Una particularidad importante de los miRNAs es que todos sus precursores forman estructuras secundarias de tipo tallo-asa. Estas moléculas se transcriben de regiones intergénicas, ya sea de manera individual o en grupos de varios miRNAs contenidos en un solo transcrito, aunque también se ha visto que hay muchas regiones intrónicas que los contienen individualmente o en grupos [28]. La mayoría de los miRNAs asociados a CaCU se encuentran en regiones intrónicas [32].

Los miRNAs regulan la expresión génica pos-transcripcional al unirse por complementariedad de nucleótidos a los mRNA blanco, generalmente en la

región no traducida 3' UTR (del inglés *untranslated region*), bloqueando la síntesis de proteínas por desestabilización del mRNA y represión traduccional [34]. Sin embargo, un reciente estudio sugiere que los sitios de unión de los miRNAs también se encuentran en la región 5'UTR [35]. Algunos miRNAs se expresan de manera ubicua, mientras que muchos otros lo hacen de forma tejido- específico, o incluso temporal [33].

Aproximadamente el 60% de todos los genes que codifican proteínas son potencialmente regulados por miRNAs, lo que les confiere un papel fundamental en la regulación de numerosos procesos celulares [36]. En la actualidad, un gran número de miRNAs han sido identificados en el genoma de varias especies, incluyendo el humano, y continuamente siguen incrementándose debido a los esfuerzos combinados de la biología molecular y a la predicción bioinformática. Al igual que los factores de transcripción, los genes de miRNAs modulan patrones globales de expresión génica durante la proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis, control del ciclo celular, desarrollo, metabolismo, carcinogénesis, quimioresistencia y radioresistencia [36, 37, 38]. La función de muchos miRNAs ha sido determinada por las consecuencias fenotípicas que ocasiona un miRNA al ser mutado o por un sitio complementario de un miRNA alterado, que en cualquier caso puede producir la interrupción de la regulación de los miRNAs. En otros casos, la función ha sido inferida a partir de efectos o mutaciones de construcciones transgénicas. Sin embargo, para la vasta mayoría de miRNAs, las consecuencias fenotípicas de la interrupción o alteración de la regulación del miRNA no son conocidas debido a la falta de información básica sobre su estructura génica [38].

### **1.7 Biogénesis de los microRNAs**

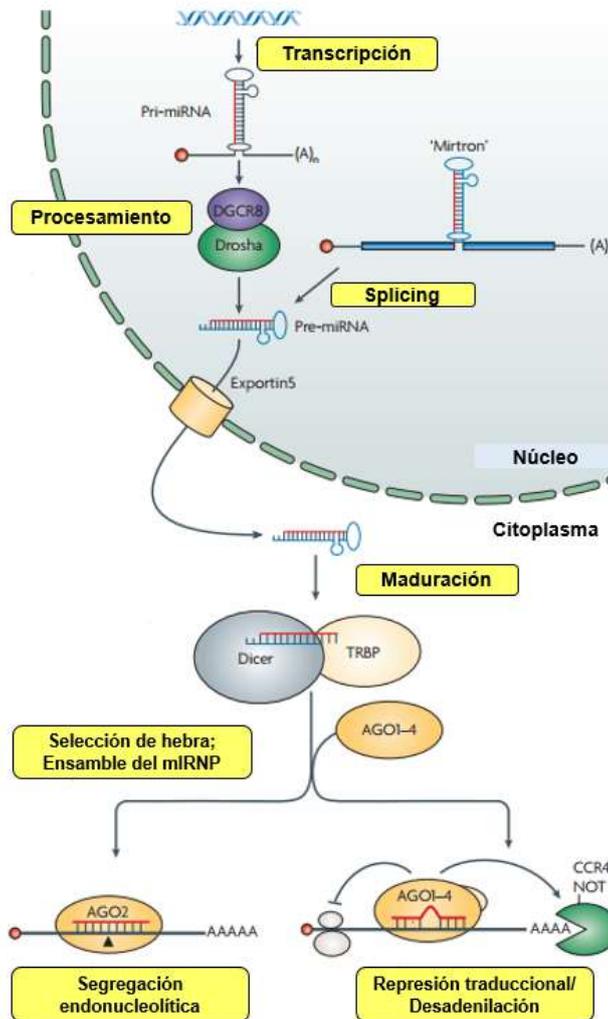
La vía canónica de biosíntesis de los miRNAs incluye varias etapas. Inicialmente, los miRNAs son transcritos de genes endógenos por la RNA polimerasa II para generar moléculas primarias o pri-miRNAs con un casquete (7-metil-guanosina) en el extremo 5' y una cola de poli (A) en el extremo 3'. Estos transcritos primarios se autocomplementan formando estructuras en forma de tallo y asa de aproximadamente entre 80-100 nt de longitud. Posteriormente, estos pri-miRNAs son procesados en el núcleo por el complejo proteico denominado microprocesador para generar un miRNA precursor más pequeño conocido

como pre-miRNA, que consta de aproximadamente entre 60-70 nt de longitud. Este complejo consiste de la enzima Drosha (una RNAsa tipo III) y una proteína con dominios de unión a RNA de doble hebra denominada DGCR8 en humanos y Pasha en *D. melanogaster* y en *C. elegans* [34].

DGCR8 tiene una función importante en el reconocimiento de los sitios de corte de Drosha en el tallo de la estructura del pri-miRNA, dando origen al pre-miRNA. Después de la etapa de procesamiento en el núcleo, el pre-miRNA es trasladado a través de los poros del núcleo al citoplasma mediante la exportina 5 en un proceso dependiente de GTP [31]. Una vez en el citoplasma, sufre otro procesamiento en el que se remueve el asa terminal y se reduce a una cadena doble de RNA de aproximadamente 20 a 24 nt de longitud. La remoción del asa es llevada a cabo por otra RNAsa de tipo III, llamada Dicer.

Es entonces, cuando el RNA pequeño de doble cadena es reclutado al complejo conocido como RISC (por sus siglas en inglés, *RNA induced silencing complex*) que es el efector del silenciamiento de los mRNA. El complejo RISC está constituido por varias proteínas, entre ellas Dicer, TRBP (del inglés *transactivation-response element RNA-binding protein*) y, principalmente por las proteínas Argonauta (Ago).

Los miRNAs son parcialmente complementarios a su mRNA blanco en la región 3'UTR, regulando sus blancos mediante las proteínas Ago. Las proteínas Ago tienen como función degradar una de las dos hebras del RNA pequeño, que es producto de Dicer, para dar como resultado final al miRNA funcional; de igual manera, pueden detener la traducción cuando la homología y la hibridación es parcial o para degradar al mRNA blanco cuando su hibridación con el miRNA es total (Figura 3)[26].



**Figura 3.** Biogénesis de los miRNAs. Los miRNAs son transcritos a partir de regiones amplias de DNA (pri-miRNAs) y tienen estructuras de tipo tallo-asa. Estas moléculas, son procesadas en el núcleo por DROSHA/DGCR8 en un precursor de miRNA (pre-miRNA) Posteriormente, los pre-miRNAs son transportados del núcleo al citoplasma por la exportina 5 y procesados por Dicer, resultando en un miRNA maduro de 20-24 nt. Finalmente, los miRNAs maduros se acoplan al complejo proteico RISC y son capaces de inhibir la traducción o la segregación de los mRNAs (Modificado de Filipowicz *et al*, 2008).

### 1.8 Perfil de expresión de los microRNAs

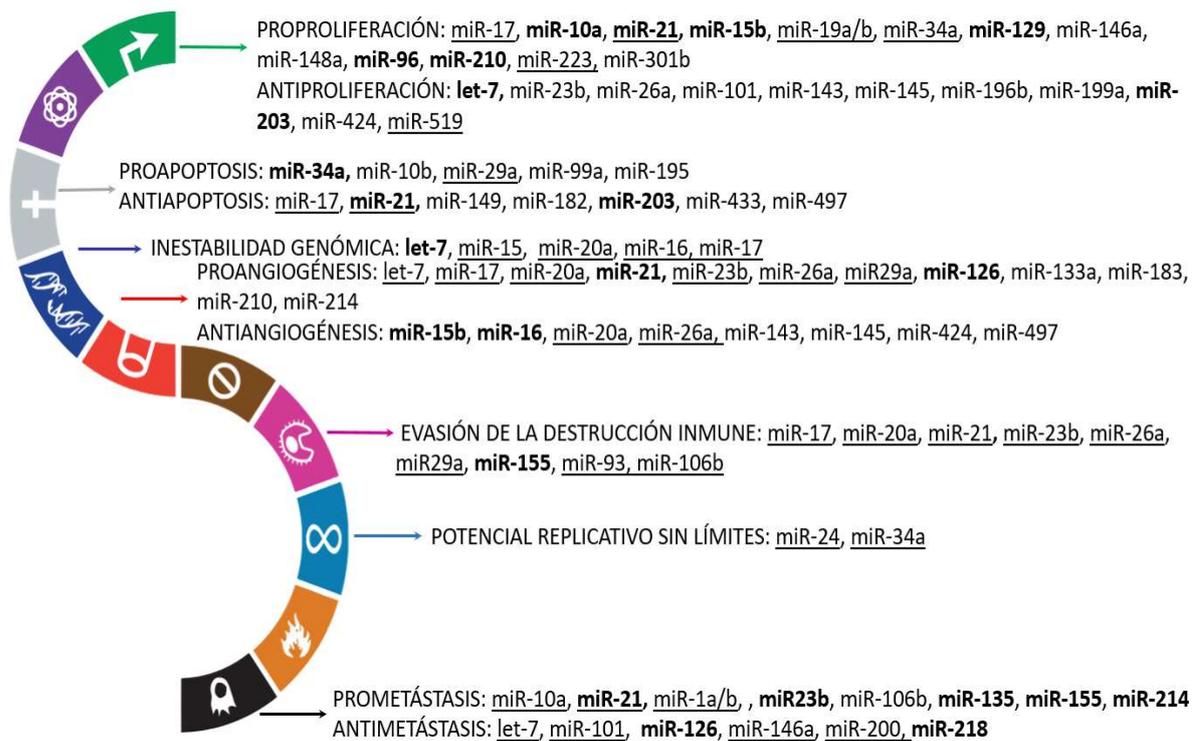
La ubicación cromosómica y la distribución genómica de los miRNAs son aspectos importantes para su expresión desde al menos tres perspectivas: 1) cerca del 80% de los genes que codifican para miRNAs están localizados en

intrones y su expresión está correlacionada con los perfiles de expresión de sus genes hospederos, 2) muchos genes de miRNAs están distribuidos como *clusters* y en ocasiones pueden coexpresarse y 3) más del 50% de los genes que codifican miRNAs están frecuentemente localizados en sitios frágiles (FRA) y regiones genómicas involucradas con cáncer [20,37,39].

En CaCU, el perfil de expresión genético ha demostrado que la infección por un HPV-HR es un factor importante para la expresión anómala de los miRNAs [32,40]. La expresión alterada de los miRNAs no sólo está involucrada con diferentes tipos de cáncer, sino también con enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas e infecciones virales [41].

### **1.9 microRNAs como oncogenes y genes supresores de tumores**

Además de los procesos celulares en los que se ha reportado la participación de los miRNAs, se han encontrado algunas condiciones patológicas relacionadas con su sobreexpresión o ausencia; estos patrones de expresión alterados pueden exhibir funciones oncogénicas (oncomiRs) o conferir funciones supresoras de tumores (antioncomiRs) [31, 36]. Mecanismos como delección, mutación, alteración de la regulación de factores de transcripción pueden ser responsables de esta expresión génica alterada [42]. La identificación de diferentes blancos de los miRNAs (oncogenes o supresores tumorales) ha permitido proponer la idea de que los miRNAs son importantes en la iniciación, progresión y metástasis del cáncer, lo cual ha sido ampliamente demostrado (Figura 4) [36].



**Figura 4.** miRNAs y los *hallmarks* del CaCU. Información obtenida de microRNA.org *Targets and Expression*. Los miRNAs marcados con negritas fueron experimentalmente validados para CaCU, los miRNAs subrayados fueron experimentalmente validados en otros tipos de cáncer (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011; Gómez *et al*, 2013).

En estudios recientes, se puede encontrar que los cromosomas 1, 14, 17, 19 y X contienen significativamente más genes de miRNAs que otros, lo que resulta interesante es que algunos de estos cromosomas se encuentran asociados con diferentes eventos de la carcinogénesis [32]. Por mencionar alguno, el cromosoma 1 se ha encontrado involucrado con la transformación de células al fenotipo cancerígeno en diferentes tipos de cáncer, incluyendo al CaCU [43,44]. De la misma manera, el cromosoma 17 se ha vinculado con el CaCU, debido a que la mayor parte de los miRNAs relacionados con este padecimiento están contenidos en el brazo q de este cromosoma y actúan como oncogenes u oncomiRs [32].

Aproximadamente son 40 miRNAs los que se encuentran desregulados y están involucrados en el desarrollo y progresión del CaCU [10,36]; para estos miRNAs

también se han predicho sus genes blancos, sin embargo, hasta ahora son pocos los que han sido validados experimentalmente (Tabla 1).

**Tabla 1.** miRNAs involucrados con el CaCU y sus blancos experimentalmente validados (Sharma *et al.*, 2014)

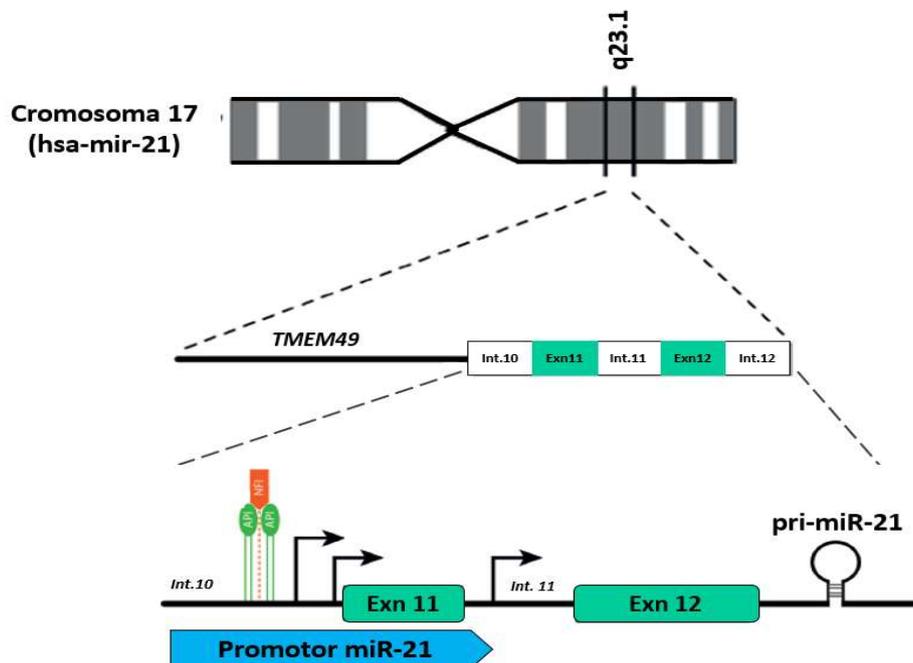
miRNAs	Blancos	miRNAs	Blancos
miR-218	LAMB3	miR-372	CDK2, ciclina A1
miR-143	Bcl-2	miR-133b	MST2, CDC42, RHOA
miR-21	PDCD4, CCL20	miR-20a	TNKS2
miR-214	MEK3, JNK1, plexin-B1, GALNT7, Bcl212	miR-424	Chk1
miR-34 <sup>a</sup>	Notch1, Jagged1, p18INK4c	miR-19a	CUL5
miR-205	SHIP2, CYR61, CTGF	miR-19b	CUL5
miR-100	PLK1	miR-223	FOXO1
miR-29 <sup>a</sup>	YY1, CDK6	miR-17	TP53INP1
miR-23b	Upa	miR-125b	PIK3CD
miR-10 <sup>a</sup>	HOX, CHL1	miR-302-367 cluster	Ciclina D1
miR-196 <sup>a</sup>	HOX	miR-155	SMAD2, CCND1
miR-375	SP1	miR-182	FOXO1
miR-886-5p	Proteína Bax	miR-497	IGF-1R
miR-145	IRS-1		

Entre estos miRNAs destaca miR-21, porque además de estar presente en una amplia variedad de tipos de cáncer, se ha encontrado sobreexpresado en CaCU [36]. Por lo tanto, identificar a los miRNAs, sus genes blancos regulables, su función biológica y mecanismos de regulación génica, resulta relevante para entender su contribución en procesos normales y en condiciones patológicas.

### 1.10 microRNA-21

El *Homo sapiens* miR-21 (hsa-mir-21), también conocido como miR-21, es un miRNA presente en mamíferos y está codificado por el gen *MIR21* (NCBI:406991, Ensembl:ENSG00000062716, MIM:611020; miRBase:MI0000077). Su localización genómica está en el cromosoma humano 17 en la banda q23.1 (55273409-55273480 nt) y en el intrón número 11 del gen *MIR21* (Figura 5).

miR-21 tiene un promotor evolutivamente conservado y se encuentra sobrelapado con el gen codificante de la proteína VMP1 (TMEM49). A pesar de que miR-21 y TMEM49 comparten la misma dirección de transcripción, miR-21 es transcrito independientemente por su propia región promotora y terminado con su propia cola poli (A); formando un transcrito primario de miR-21 (pri-miR21) de aproximadamente 3433 nt. Después de la transcripción, pri-miR21 es procesado y forma un miRNA maduro. Además de la regulación transcripcional, la expresión de mir-21 también es regulada a nivel postranscripcional [36].



**Figura 5.** Localización genómica de miR-21 (Modificado de Kumarswamy *et al*, 2011). En la imagen se observa el gen codificante para pri-miR21 localizado en el cromosoma 17q23.1, que se encuentra sobrelapado con el gen TMEM49.

Con flechas están indicados tres sitios de inicio de la transcripción propuestos para miR-21.

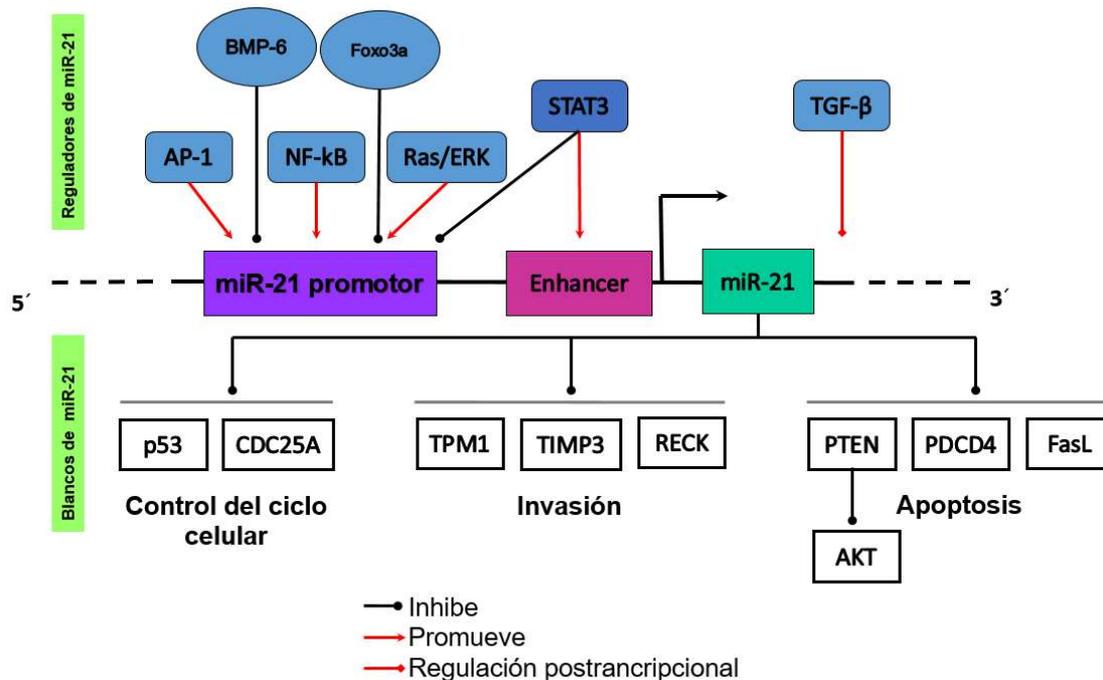
miR-21 fue uno de los primeros miRNAs detectados en el genoma humano e igualmente uno de los primeros para los cuales su estructura fue determinada **[20, 45]**. En años recientes, múltiples estudios se han enfocado en dilucidar las funciones biológicas de miR-21. Este miRNA destaca por estar comúnmente sobreexpresado en diferentes tipos de tumores sólidos y hematológicos, por lo que está establecido como un miRNA oncogénico **[20, 37, 40, 45,46]**. Por mencionar algunos, miR-21 está sobreexpresado en cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer colorectal, leucemia mieloide crónica, cáncer ovárico, cáncer de próstata y cáncer cervical **[47-60]**.

Calin y colaboradores reportaron que miR-21 se encuentra localizado en un sitio frágil conocido como FRA17B, el cual funge como un sitio preferencial para la integración del HPV1-6; de esta manera, la sobreexpresión de miR-21 en líneas celulares transformadas con CaCU comparadas con tejidos normales, indica que el aumento de expresión de miR-21 puede ser el resultado de la integración del HPV al genoma celular.

La sobreexpresión de miR-21 ejerce un silenciamiento a nivel postranscripcional de genes supresores de tumores, muchos de ellos involucrados en el control del ciclo celular, en la regulación de la apoptosis y en el proceso de invasión, lo que favorece el fenotipo tumoral de las células **[20,61]**. Por esta razón, diferentes estudios lo han relacionado como fundamental para la patogénesis tumoral en las diferentes etapas de la carcinogénesis **[37,62]**.

Por otro lado, se sabe que en la región promotora del gen de miR-21 se encuentran secuencias específicas para factores de transcripción que están relacionados con la latencia viral, la replicación vegetativa y la transcripción oncogénica del HPV; uno de estos factores de transcripción son los miembros de la familia de factores de transcripción NF-kB (Figura 6) **[63]**.

Por lo tanto, entender la red de regulación de miR-21 ayudará a incrementar el conocimiento sobre su importante función en el desarrollo del cáncer y resistencia a medicamentos.



**Figura 6.** Regulación transcripcional de miR-21 y sus genes blanco en el cáncer humano. miR-21 regula genes involucrados con el control del ciclo celular, apoptosis e invasión (Modificado de Pan *et al*, 2010).

### 1.11 NF-kB

El factor de transcripción NF-kB es un complejo proteico eucariótico de la familia de las proteínas Rel/NF-kB, expresado de manera inducible y ubicua. Fue identificado por Sen y Baltimore en 1986, mediante la interacción de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina de las células B y una secuencia de 11pb [1]. Los miembros de la familia de NF-kB tienen una conformación de dímeros de proteínas que se unen a una secuencia motivo de 9-10pb conocida como sitio de reconocimiento para NF-kB, ubicada en la región promotora o *enhancer* de genes blanco y regulan la transcripción mediante el reclutamiento de coactivadores y corepresores [64].

Los factores de transcripción Rel/NF-kB comparten un dominio homólogo Rel (RHD) en su extremo N-terminal que es una región conservada de aproximadamente 300 aminoácidos y es responsable de la unión al DNA, dimerización y unión al inhibidor IκB [1,65,66]. Esta familia de proteínas está clasificada en dos grupos: uno requiere

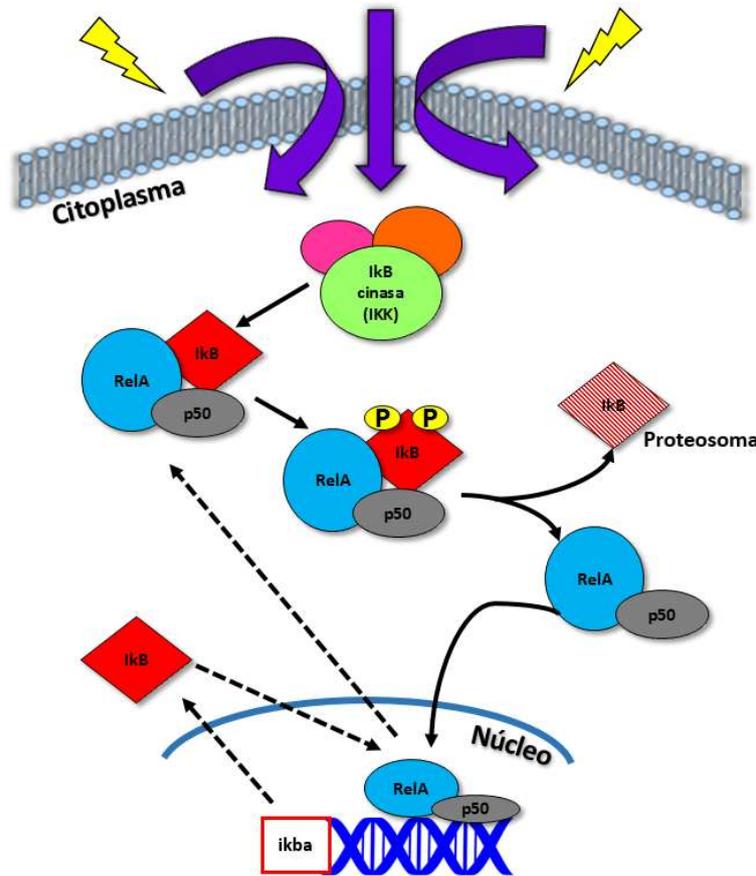
procesamiento proteolítico y el otro no. La primera incluye NF- $\kappa$ B1 (también conocido como p105) y NF- $\kappa$ B2 (p100), los cuales son procesados para producir las proteínas maduras p50 y p52, respectivamente. El segundo grupo incluye RelA (p65), RelB y c-Rel. Todas las proteínas Rel de vertebrados pueden formar homodímeros o heterodímeros, excepto RelB, la cual puede formar únicamente heterodímeros. El término NF- $\kappa$ B generalmente se refiere al heterodímero p50-RelA (p65), el cual es el complejo más abundante de la familia de NF- $\kappa$ B en la mayoría de las células [1,67]. El dominio de activación transcripcional (TAD) necesario para la regulación de la expresión génica está presente sólo en RelA (p65), c-Rel y RelB. En cambio, p50 y p52 carecen de TADs y por ello pueden reprimir la transcripción a menos que estén asociados con un TAD asociado a un miembro de la familia NF- $\kappa$ B u otras proteínas [1,64,65].

En la mayoría de células normales, los dímeros Rel/NF- $\kappa$ B son retenidos en el citoplasma como un complejo inactivo a través de la unión directa a una proteína inhibidora I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ Be, I $\kappa$ Bz, I $\kappa$ BNS y Bcl-3), las cuales tienen diferentes afinidades para los dímeros Rel/NF- $\kappa$ B y son expresadas de manera tejido-específica. Por lo tanto, los NF- $\kappa$ B se translocan al núcleo sólo cuando son activados y entonces son capaces de regular la expresión de genes que controlan respuesta inmune, inflamación, proliferación celular, desarrollo y apoptosis [68].

Estos factores de transcripción son activados en respuesta a diferentes estímulos, que conllevan a la degradación de la proteína I $\kappa$ B y la consecuente translocación del complejo Rel/NF- $\kappa$ B activo en el núcleo; estos estímulos pueden ser de diferente naturaleza como infecciones virales, lipopolisacáridos bacterianos, RNA de cadena doble, radiación UV, ésteres de forbol, la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que promueven la disociación de I $\kappa$ B por medio de su fosforilación, ubiquitinación y degradación [1,65].

I $\kappa$ B es fosforilada en los residuos de serina 32 y 34 por una cinasa I $\kappa$ B (IKK), que generalmente está conformada por las subunidades: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$  (NEMO). IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  son las subunidades catalíticas, mientras que IKK $\gamma$  (NEMO) percibe e integra las señales de activación del complejo. El heterodímero resultante es translocado rápidamente del citoplasma al núcleo, en donde el NF- $\kappa$ B es capaz de unirse al sitio específico del DNA de 10 pares de bases consenso

GGGPuNNPyPyCC (Pu=purina, Py=pirimidina, N= cualquier base), y regular la transcripción de genes específicos (Figura 7) [66,68].



**Figura 7.** Vía clásica de activación de NF-κB. Las flechas continuas indican la vía de activación, flechas punteadas indican la vía de inactivación (Modificado de Gilmore, 2016).

La activación de NF-κB es dependiente del tipo celular y del contexto de la señalización [41]. La vía de activación de NF-κB generalmente suele ser un proceso rápido, que dura aproximadamente de 30-60 minutos [66]. La mayoría de los genes conocidos que son activados por NF-κB están involucrados con las respuestas inmunes e inflamatorias. Algunos de los genes que regulan son los de las citocinas IL-1, IL-6, IL-8, el interferón β (IFN-β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), moléculas de adhesión celular endotelial-1 (ELAM-1), moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), moléculas de adhesión celular

vascular-1 (VCAM-1) (Tabla 2). Asimismo, diferentes oncogenes median sus efectos activando a NF-kB [68, 69].

**Tabla 2.** (Bharti y Aggarwal, 2002)

GENES REGULADOS POR NF-KB INVOLUCRADOS CON LA CARCINOGENESIS
c-Myc
Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)
Moléculas de adhesión celular
Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
Ciclina D1
Metaloproteinasa de matriz-2 (MMP-2)
Metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9)
Ciclooxigenasa-2 (COX2)
Interleucina-1
Interleucina-6
Interleucina-8
Urocinasa activadora del plasminógeno (uPA)
Bcl-2
Bcl-X <sub>L</sub>
Gro 1

Debido a que NF-kB es crítico para la expresión inducible de múltiples genes celulares y virales involucrados con la supervivencia celular, inflamación, diferenciación celular, transformación celular, proliferación celular, invasión, angiogénesis, infección y adhesión de moléculas, este factor de transcripción es relevante en el proceso de carcinogénesis [1,69].

### 1.12 NF-kB y cáncer

Numerosas investigaciones respaldan la importancia de los miRNAs en la iniciación y progresión del cáncer humano, así como en funciones fisiológicas como pueden ser la respuesta inmune, proliferación celular, apoptosis e inflamación; las cuales también se sabe que son reguladas por NF-kB [65,70].

Para diferentes tipos de tumores humanos, incluyendo leucemia, linfoma, mieloma, melanoma, próstata, colon, cérvix, mama, páncreas y líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; se ha encontrado que NF-kB está constitutivamente activo [1,61,65,68].

La mayoría de los cancerígenos y promotores tumorales activan a NF-kB, mientras que los agentes quimiopreventivos los suprimen, sugiriendo que estos factores de transcripción tienen una relación fuerte con el cáncer. Paradójicamente, la mayoría de los agentes que inducen apoptosis (citocinas, agentes quimioterapéuticos y radiación) también pueden activar a NF-kB, indicando que NF-kB es parte de un mecanismo de autodefensa de las células y además puede mediar la desensibilización, quimioresistencia y radioresistencia [68].

En tejidos tumorales se ha visto que la supresión de NF-kB inhibe la proliferación, causa el arresto del ciclo celular y conlleva a la apoptosis; indicando el papel crucial que tiene NF-kB en la proliferación y supervivencia celular .

La invasión tumoral es controlada por numerosos productos genéticos regulados por NF-kB, incluyendo la matriz de metaloproteasa (MMP), activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA), interleucina-8 (IL-8) y otras quimiocinas. La metástasis es mediada a través de la expresión de varias moléculas de adhesión celular, incluyendo ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1, las cuales son a su vez regulados por NF-kB. La inflamación es un evento importante en la tumorigénesis; la mayoría, si no es que todos, de los efectos inflamatorios están mediados a través de la activación NF-kB. Su activación controla la expresión de genes que median la transformación, proliferación, invasión, angiogénesis, metástasis, apoptosis, inmunidad, hematopoyesis, etc [68].

Estudios previos han determinado que potenciales sitios de unión de NF-kB en el promotor de miR-21 son esenciales para la regulación de este miRNA y la de otros factores relacionados con el proceso de carcinogénesis; es por ello que resulta de interés investigar la participación de NF-kB en la regulación génica de miR-21 en líneas celulares de CaCU.

## II. JUSTIFICACIÓN

El CaCU está asociado a múltiples factores inherentes al hospedero y al ambiente; sin embargo, se reconoce a la infección por HPV-HR como el factor etiológico de mayor importancia. A la fecha, se ha encontrado que la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV está involucrada con la inestabilidad genética del hospedero e impacta la expresión de los miRNAs, lo que conlleva al posible desarrollo de carcinoma cervical.

La expresión génica de los miRNAs puede ser activada o reprimida por múltiples factores de transcripción, de esta manera, fungen como reguladores de su expresión.

Son diversos los miRNAs que están involucrados con el desarrollo del carcinoma cervical; sin embargo, miR-21 destaca por ser un potente modulador de células tumorales y por promover el fenotipo canceroso de las células, debido a la activación de diversos factores de transcripción entre los que se incluye al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo cual conlleva a la desregulación de genes blanco celulares que están involucrados con los puntos de control que mantienen la homeostasis celular.

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es un elemento con amplio espectro de funciones celulares y tiene la particularidad de expresarse de manera constitutiva en células con fenotipo canceroso; es por ello, que al igual que en cáncer de mama [71], es probable que la sobreexpresión de miR-21 promueva el desarrollo del CaCU en un proceso dependiente de NF- $\kappa$ B.

A pesar de la importancia biológica de estos elementos, aún es reducido lo que se conoce acerca de los miRNAs y su regulación génica; por lo tanto, en la presente tesis se propone analizar la actividad funcional de elementos potenciales de unión de NF- $\kappa$ B en la región promotora del gen humano de miR-21 en líneas celulares de cáncer cervical transformadas con HPV-HR.

### **III. HIPÓTESIS**

- En el desarrollo del cáncer cervical existe una correlación entre la sobreexpresión del microRNA miR-21 y la del factor de transcripción NF-kB, lo cual puede contribuir a su vez al proceso de carcinogénesis cervical. Por lo tanto, parte de los mecanismos moleculares que participan en la regulación génica de miR-21 pueden ser a nivel transcripcional mediados por la interacción de NF-kB con el promotor de este miRNA.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la actividad funcional del factor de transcripción NF-kB en la región promotora del gen de miR-21 en líneas celulares de cáncer cervical transformadas con HPV-HR.

### **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Identificar *in silico* las secuencias de los sitios de reconocimiento para el factor de transcripción NF-kB en la región promotora 5' del gen de miR-21.
2. Generar construcciones de plásmidos reporteros que contengan deleciones progresivas para los elementos NF-kB del promotor 5' del gen de miR-21.
3. Evaluar la actividad funcional de los elementos NF-kB en líneas celulares de cáncer cervical transformadas con HPV-HR.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cultivos celulares

Se utilizaron dos líneas celulares positivas al HPV: SiHa (HPV-16+) y HeLa (HPV-18+), una línea celular no infectada por HPV: C-33A (HPV-) y una línea no transformada: HaCaT (queratinocitos epidérmicos primarios). Las células fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). La proliferación de las células SiHa, HeLa y C33-A se realizó en el medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y 1x de antibiótico/antimicótico. Por su parte, la línea celular HaCaT fue cultivada con el medio DMEM/F-12 (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con SFB 10% y 1x de antibiótico/antimicótico. Todos los cultivos celulares fueron crecidos en monocapa y se mantuvieron a 37°C con una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5%.

### 6.2 Bacterias competentes

Las bacterias *E. coli*, de la cepa DH5 $\alpha$ , se sembraron en 5mL de medio LB sin antibióticos y se dejaron incubando durante toda la noche a 37°C con agitación constante (300 rpm). En condiciones de esterilidad, se trasladó el precultivo a un matraz con 100mL de medio LB sin antibióticos y se incubó a 37°C con agitación de 300 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600nm. El cultivo se trasladó a tubos de polipropileno de 50mL y se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue eliminado. El sedimento bacteriano fue resuspendido en 10mL de MgCl<sub>2</sub> 0.1M estéril y frío, se incubó 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en 10mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M estéril y frío, se incubó 30 minutos a 4°C. Se centrifugó nuevamente a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió cuidadosamente en 10mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M/glicerol 15%. Las bacterias competentes fueron alicuotadas y almacenadas inmediatamente a -70°C.

### 6.3 Extracción de DNA de cultivos celulares

El aislamiento de DNA genómico a partir de líneas celulares humanas se realizó con Trizol (Life Technologies, Gran Island NY USA). Brevemente, a partir de una

caja de cultivo, con una confluencia celular de 90-100%, se recuperó la mayor cantidad de células en un tubo de 1.5 mL, se centrifugó a 3500 rpm por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Para eliminar la mayor cantidad de medio, se realizó un lavado con 1mL de PBS 1x estéril con pH 7.4. El *pellet* celular se resuspendió con 1mL de Trizol y se dejó incubar a temperatura ambiente - durante 5 minutos- para permitir la disociación completa de los elementos celulares. Enseguida, se agregaron 200µL de CHCl<sub>3</sub> (cloroformo) y la mezcla se agitó suavemente, por inversión, durante 15 segundos. La muestra se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, en una centrífuga refrigerada a 4°C. Después, se removió completamente la fase acuosa que contenía el RNA. Para precipitar el DNA, se agregaron 2.5 volúmenes de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (etanol) al 100% a 4°C, se mezcló suavemente por inversión y se incubó a -20°C al menos durante 1 hora. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos, a 4°C y se removió la totalidad del sobrenadante, con mucho cuidado, para recuperar el DNA. Al *pellet* de DNA se le realizó un lavado con 1mL de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (citrate trisódico; 0.1M/ C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O 10%, pH 8.5) y se incubó durante 30 minutos, a temperatura ambiente procurando mezclar ocasionalmente. Nuevamente, la mezcla se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos, a 4°C y se descartó el sobrenadante. Después, se realizó un lavado con 1.5 mL de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (etanol) al 75% a 4°C, se mezcló suavemente por inversión y se incubó a 4°C por 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos, a 4°C y se eliminó en su totalidad. Finalmente, el DNA se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se resuspendió en 80µL de H<sub>2</sub>O estéril y libre de nucleasas. Para comprobar la integridad del DNA extraído, se realizaron análisis de electroforesis en geles de agarosa (1% ) teñidos con bromuro de etidio (BrEt) y se visualizaron en un transiluminador con luz UV. Cada muestra se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop Lite, NanoDrop® y se almacenó a -20° C.

#### **6.4 Análisis del promotor del gen de miR-21 *in silico***

Se realizó un análisis *in silico* de la región promotora del miRNA humano hsa-mir-21 (NCBI: NR\_029493.1;Ensembl: ENSG00000062716; MIM:611020; miRBase: MI0000077) para ubicar los sitios putativos de unión de NF-kB. Para obtener la secuencia génica de miR-21, el análisis se hizo utilizando la base de datos de Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Posteriormente, se empleó el sitio

web TFSITESCAN IFTI-MIRAGE (<http://www.ifti.org>) para la predicción de los sitios de unión de NF-KB en la región promotora de miR-21. Con la herramienta PrimerQuest, ofrecida por Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com>), se realizó el diseño de los oligonucleótidos usados para amplificar los sitios NF-KB de interés por medio de ensayos de PCR. Cada oligonucleótido fue complementado, en los extremos 5' y 3', con los sitios de restricción para las enzimas *NheI* y *KpnI*. Finalmente, con la herramienta NEBcutter V2.0, proporcionada por New England BioLabs (<https://www.neb.com>), se comprobaron los sitios de restricción para cada oligonucleótido.

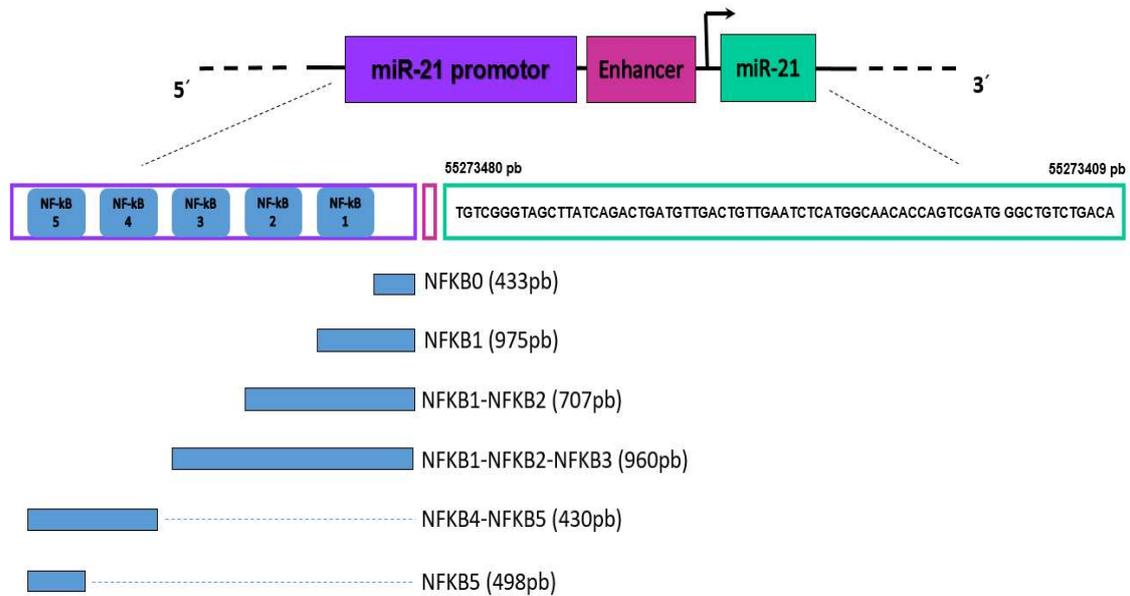
Con el análisis bioinformático de sitios NF-kB en la región promotora 5' de miR-21, se identificaron un total de 5 elementos NF-kB (NFKB-1 del nucleótido -463 al nucleótido -470; NFKB-2 del nucleótido -1041 al nucleótido -1051; NFKB-3 del nucleótido -1269 al nucleótido -1279; NFKB-4 del nucleótido -2711 al nucleótido -2720; y NFKB-5 del nucleótido -2827 al nucleótido -2836; en relación al sitio de inicio de la transcripción de miR-21).

### **PCR**

Se sintetizaron un total de 6 pares de oligonucleótidos. Para amplificar el fragmento sin sitios NF-kB (NFKB-0); es decir, que no contenía ningún elemento potencial de reconocimiento para NF-kB obtenido en la predicción *in silico*, se utilizaron los oligos sentido: 5'-CGT-GGT-ACC-AAA-CAG-GAG-AGG-AGA-AAT-ATC-3' y antisentido: 5'-CTA-GCT-AGC-GAG-ATG-TCA-CGA-TGG-TAG-G-3'. Para amplificar el fragmento NF-kB, con el primer sitio de unión a miR-21 (NFKB-1) se utilizaron los oligos sentido: 5'-CGT-GGT-ACC-GGC-TTG-TCA-CAA-ATG-ATT-G-3' y antisentido: 5'-CTA-GCT-AGC-GAG-ATG-TCA-CGA-TGG-TAG-G-3'. Para amplificar el fragmento con el primer y segundo sitio de unión de NF-kB (NFKB1-NFKB2) a miR-21 se utilizaron los oligos sentido: 5'-CGT-GGT-ACC-GAC-TGG-CCT-TCT-GTT-TGT-TAC-TTT-C-3' y antisentido: 5'-CTA-GCT-AGC-GGG-TAA-TTT-CTC-TCT-CCA-GTA-TCC-TTT-C-3. Para amplificar el fragmento con los primeros tres sitios NF-kB (NFKB1-NFKB2-NFKB3) se utilizaron los oligos sentido: 5'-CGT-GGT-ACC-CCT-TAA-ATT-GGG-AGG-ACT-CCA-AGC-3' y antisentido: 5'-CTA-GCT-AGC-CAT-TAA-CAC-AGA-TAC-GAC-AGA-GTG-TGG-3'. Para amplificar los sitios NF-kB en la cuarta y quinta posición (NFKB4-NFKB5) se utilizaron los oligos sentido: 5'-CGT-GGT-ACC-

CCA-TTT-CAG-GAG-TAC-CTG-GAG-GC-3' y antisentido: 5'-CTA-GCT-AGC-CAA-GTC-ACC-TCA-GTA-AGT-CTA-ATA-C-3'. Para amplificar el sitio con la quinta posición (NFKB-5) se utilizaron los oligos sentido: 5'-CGT-GGT-ACC-CGG-TTT-CTG-ATT-TAC-AGC-TCT-TG-3' y antisentido: 5'-CTA-GCT-AGC-CAC-TGG-CAA-ACC-AAC-TTC-AC3' (Figura 8).

Para amplificar los diferentes fragmentos de DNA que contienen los sitios NF-kB del promotor de miR-21, se utilizó el DNA genómico extraído con Trizol y se obtuvieron los amplicones correspondientes por PCR. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: para amplificar el sitio NFKB-0 fueron 95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto durante 30 ciclos, seguidos por 72°C por 10 minutos; y se obtuvo un fragmento de DNA de 433pb (Figura 10A). Para el sitio NFKB-1 fueron 95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minuto, 70°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto durante 30 ciclos, seguidos por 72°C por 10 minutos; y se obtuvo un fragmento de DNA de 975pb (Figura 10B). Para los sitios NFKB1-NFKB2 fueron 95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minuto, 63.9°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto durante 30 ciclos, seguidos por 72°C por 10 minutos; y se obtuvo un fragmento de DNA de 707pb (Figura 10C). Para los sitios NFKB1-NFKB2-NFKB3 fueron 95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minuto, 68.5°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto durante 30 ciclos, seguidos por 72°C por 10 minutos; y se obtuvo un fragmento de DNA de 960pb (Figura 10D). Para los sitios NFKB4-NFKB5 fueron 95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto durante 30 ciclos, seguidos por 72°C por 10 minutos; y se obtuvo un fragmento de DNA de 430pb (Figura 10E). Para el sitio NFKB-5 fueron 95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto durante 30 ciclos, seguidos por 72°C por 10 minutos; y se obtuvo un fragmento de DNA de 498pb (Figura 10F). Para cada reacción de PCR se utilizaron 2.5µL de buffer Taq polimerasa [5x] MgCl<sub>2</sub> [25mM] 3µL, dNTPs [10mM] 1µL, oligonucleótidos [20pmol] 1µL, DNA [400-800ng] 1µL, DNA Taq polimerasa [0.5 U] 0.2µL, en un volumen total de 25µL. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis, durante 60 minutos en gel de agarosa (1%) y teñido con BrEt para comprobar el tamaño del fragmento y posteriormente fueron purificados (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema que muestra los sitios NF-kB en el promotor del gen miR-21 y las regiones que incluyen las diferentes secuencias de reconocimiento NF-kB a amplificar por PCR.

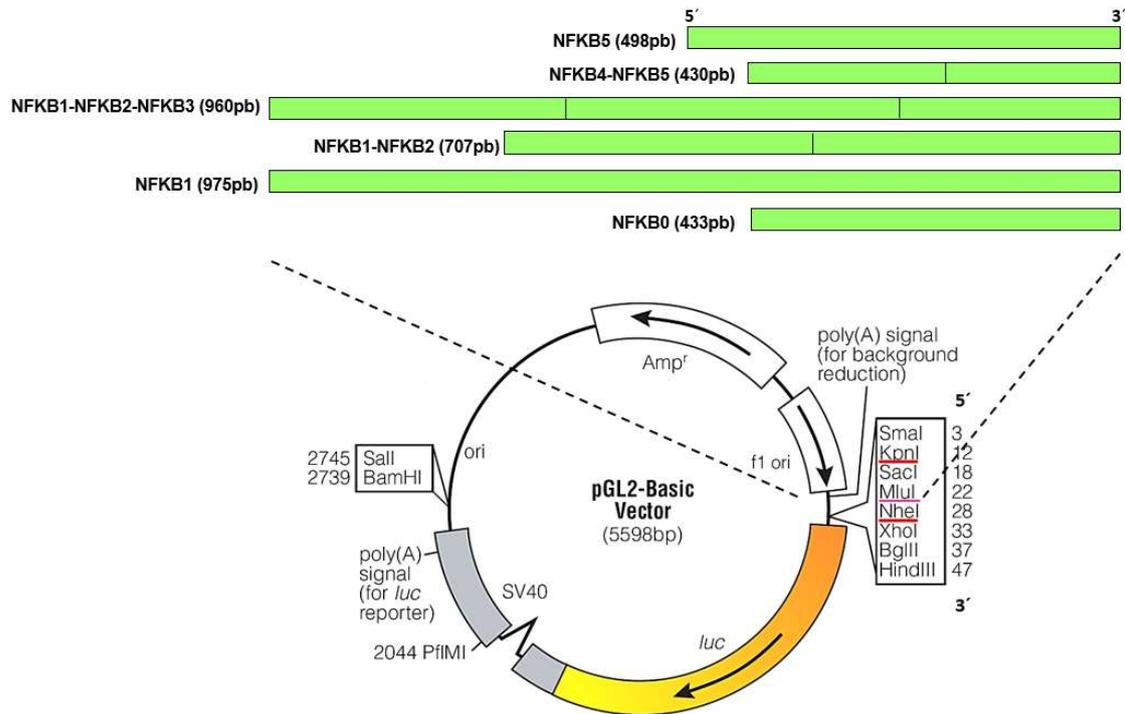
### Purificación de DNA

A partir de los productos de PCR específicos, correspondientes a cada fragmento con los elementos NF-kB incluidos, se realizó la precipitación alcohólica para concentrar el DNA.

A cada muestra se le agregó una décima parte del volumen total de  $C_2H_3NaO_2$  (acetato de sodio 3M, pH 5.2) y 2 volúmenes de  $C_2H_5OH$  (etanol) al 100%, se mezcló suavemente por inversión y se incubó a  $-20^\circ C$  al menos por 1 hora. Después del tiempo de incubación, se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, en una centrifuga refrigerada a  $4^\circ C$ . A continuación se removió el sobrenadante y se realizó un lavado con  $C_2H_5OH$  (etanol) al 70%. Nuevamente se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos y se retiró, cuidadosamente, el etanol y se dejó secar el *pellet* de DNA a temperatura ambiente, en un lugar sin flujo de aire, durante 10 minutos. La muestra se resuspendió en  $80\mu L$  de  $H_2O$  estéril y libre de nucleasas, para después incubarse a  $55^\circ C$  por 15 minutos. Cada muestra se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop Lite, NanoDrop®. Finalmente el DNA se almacenó a  $-20^\circ C$ .

### **6.5 Estrategia de clonación y construcción de plásmidos reporteros con los sitios de reconocimiento para los elementos NF-kB del promotor de miR-21**

Los insertos de DNA, que incluyen los sitios de reconocimiento de NF-kB, obtenidos previamente por PCR, fueron clonados en los sitios de restricción *NheI* y *KpnI* en el plásmido reportero pGL2-Basic. El plásmido pGL2-Basic se utilizó ya que carece de promotor eucariota y de secuencias *enhancer*, además tiene el gen *luc* de la luciferasa como reportero y presenta una región de resistencia a la ampicilina. Se realizó una doble digestión -por separado- a 1µg del vector (pGL2-Basic) y 1µg de DNA correspondiente a cada uno de los insertos de NF-kB, con 2µL de buffer 10x Fast Digest y 1µL de las enzimas de restricción *NheI* (10 U/ µL) y *KpnI* (10 U/ µL) Fast Digest (Thermo Scientific), en un volumen final de 15µL; la muestra se incubó durante 1 hora a 37°C y se inactivó la reacción por incubación a 80°C por 5 minutos. Posteriormente, los insertos de NF-kB y el vector pGL2-Basic (Promega, Madison USA) se ligaron (Figura 9), al realizar una mezcla en una relación de concentración 1:1; 3:1; 5:1 (inserto:vector), respectivamente, con 1µL de enzima T4 DNA ligasa, 2µL de buffer T4 ligasa, en un volumen total de 20µL y dejando incubar 1 hora a 22°C e inactivando la reacción por incubación a 65°C por 10 minutos. Después, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α competentes con las construcciones moleculares por choque térmico. Para cada transformación se mezclaron 40µL de H<sub>2</sub>O, 5µL de reacción de ligación (1:1,3:1,5:1) y 200µL de bacterias competentes; se incubó por 30 minutos a 4°C. Enseguida, se aplicó el choque térmico de 42°C por 90 segundos; inmediatamente se incubó por 5 minutos a 4°C. Para la fase de recuperación, se agregó 1mL de medio LB a cada mezcla de transformación y se incubó por 1 hora a 37°C con agitación de 300 rpm. Finalmente, se centrifugó cada reacción a 3500 rpm durante 5 minutos, se retiraron 950µL del sobrenadante y el resto se usó para resuspender el *pellet* celular y después sembrarlo en placas de LB Agar/Ampicilina (100 µg/mL) que fueron incubadas toda la noche a 37°C.



**Figura 9.** Esquema de pGL2-Basic y de los insertos NF-kB generados por PCR que fueron clonados en este vector reportero. En rojo y rosa se destacan los sitios de restricción utilizados para las construcciones moleculares.

Para comprobar que las construcciones moleculares contenían los insertos NF-kB, se seleccionaron diferentes colonias y se les realizó extracción de plásmido por lisis alcalina para posteriormente identificar a las colonias positivas por un ensayo de restricción enzimática con *MluI*. Cada colonia fue cultivada en un tubo con 5mL de LB/Ampicilina (100 µg/mL) a 37°C con agitación de 300 rpm por 12 horas. El cultivo se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue eliminado completamente. El sedimento bacteriano se resuspendió en 100µL de solución I fría (glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10mM, pH 8) y se dejó incubar por 3 minutos en hielo. Después se agregaron 200µL de solución II fresca y a temperatura ambiente (SDS 1%; NaOH 0.2N), la mezcla se homogenizó cuidadosamente por inversión varias ocasiones. Posteriormente se agregaron 150µL de solución III fría (acetato de potasio/ácido acético glacial 3M, pH 6.0) y se homogenizó por inversión. Enseguida, se centrifugó a máxima

velocidad durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C. La fase superior acuosa se recuperó cuidadosamente en tubos nuevos y se le agregó 0.5 del volumen total de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 (v:v) y se homogenizó por inversión. Nuevamente, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C y la fase superior acuosa fue transferida a tubos nuevos. A continuación se agregaron 2.5 volúmenes de C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O 100% a 4°C para precipitar el DNA plasmídico, por lo que se mezcló por inversión varias veces y se incubó por lo menos 1 hora a -20°C. Para recuperar el DNA plasmídico, se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue eliminado. Se realizó un lavado con 300µL de C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (etanol) al 70% a 4°C y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos; cuidadosamente se removió el sobrenadante en su totalidad. Finalmente, el DNA plasmídico se dejó secar al aire a temperatura ambiente durante 15 minutos y se resuspendió en 100µL de H<sub>2</sub>O estéril y libre de nucleasas. Por último se añadieron 2µL de RNasa (10mg/mL) y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Cada muestra se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop Lite, NanoDrop® y se almacenó a -20°C.

Para cada reacción de digestión enzimática con *MluI* se hizo una mezcla con 2µg de las construcciones de plásmidos (pGL2Basic/NF-kB), 2µL de buffer 10x *Fast Digest*, 2µL de enzima *MluI* (10 U/ µL) *Fast Digest*, en un volumen final de 15µL. La reacción se dejó incubar a 37°C por 1 hora y la enzima se inactivó con 80°C por 5 minutos. El patrón de movilidad electroforética se confirmó con un ensayo de electroforesis en geles de agarosa 1% teñidos con BrEt y visualizado en un transiluminador con luz UV (Figura 10).

### **Purificación de plásmidos reporteros**

Las colonias que presentaron un patrón de bandas que demuestran ser positivas por el ensayo de restricción, fueron seleccionadas para purificar los plásmidos a gran escala por MidiPrep. Los plásmidos fueron aislados con el kit PureYield midiprep (Promega, Madison, WI), debido a que permite aislar grandes cantidades de plásmidos con alta calidad de pureza y libre de endotoxinas. Con el DNA plasmídico purificado, por lisis alcalina se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5α por choque térmico. Para lo cual se utilizaron 40µL de H<sub>2</sub>O, 5µL de plásmido y 200µL de bacterias competentes para cada reacción; la muestra se incubó por 30 minutos a 4°C. Enseguida se aplicó el choque térmico de 42°C por 90 segundos; inmediatamente se incubó 5 minutos a 4°C.

Para la fase de recuperación, se agregó 1mL de medio LB a cada mezcla de transformación y se incubó por 1 hora a 37°C con agitación de 300 rpm. Finalmente, se centrifugó cada reacción a 3500 rpm durante 5 minutos, se retiraron 950µL del sobrenadante y el resto se usó para resuspender el *pellet* celular y después sembrarlo en placas de LB Agar/Ampicilina (100 µg/mL) que fueron incubadas toda la noche a 37°C. Pasado el periodo de incubación, se tomó una estría y se inoculó un tubo con 5mL de LB/Ampicilina (100 µg/mL) para el precultivo, se dejó incubando a 37°C con agitación de 300 rpm durante toda la noche. Después, se inocularon 200mL de LB/Ampicilina (100 µg/mL) con el precultivo y se incubó a 37°C con agitación de 300 rpm por 12 horas. La extracción de plásmidos -con el kit- consistió en sedimentar las células procedentes del cultivo bacteriano y someterlas a una fase de resuspensión celular, lisis celular y neutralización que permitieron las condiciones necesarias para la unión del DNA plasmídico a la membrana de sílica de la columna. Después se lavó la membrana de la columna para eliminar contaminantes. Finalmente el DNA plasmídico se eluyó en 600µL de H<sub>2</sub>O estéril y libre de nucleasas. Cada muestra se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop Lite, NanoDrop® y se almacenó a -20°C.

### **6.6 Ensayos de transfección celular y análisis de la actividad de luciferasa**

Las células SiHa, HeLa, C33-A y HaCaT fueron transfectadas con las construcciones de los plásmidos reporteros pGNFKB-0, pGNFKB-1, pGNFKB1-2, pGNFKB1-3, pGNFKB4-5, pGNFKB-5 que fueron generadas y que contienen los diferentes sitios de reconocimiento para NF-kB en el promotor de miR-21. Los plásmidos se obtuvieron con el kit PureYield midiprep (Promega, Madison, WI) como se describió anteriormente.

La transfección se realizó con el reactivo FuGENE HD (Promega, Madison, WI) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, 24 horas antes de la transfección, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos con una superficie de crecimiento de 2cm<sup>2</sup>, a una densidad de 0.6x10<sup>5</sup> células/pozo en 2mL de medio de cultivo DMEM, con SFB 10% y 1x de antibiótico/antimicótico. La transfección se realizó cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-

85%. En el momento de la transfección, se diluyó 1µg de DNA plasmídico en medio de cultivo DMEM sin SFB, con un volumen final de 50µL, para obtener una concentración de 0.020µg/µL y se homogenizó por pipeteo suave. Para transfectar cada pozo, se agregaron cuidadosamente 1.7µL de FuGENE HD (Promega, Madison, WI) al medio de cultivo con DNA plasmídico y se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Mientras transcurría el tiempo de incubación, se cambió el medio de cultivo de los pozos por 500µL de medio DMEM sin SFB. Posteriormente, se colocaron cuidadosamente los 25µL del complejo (DNA plasmídico+ FuGENE HD) a cada pozo, distribuyéndolo cuidadosamente. Las células transfectadas fueron incubadas con los complejos por 4 horas a 37° C con atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, se retiró el medio de los pozos y se le adicionaron 500µL de medio DMEM suplementado con SFB 10% a cada pozo. Finalmente, se incubaron las placas durante 48 horas.

Después de 48 horas de la transfección con FuGENE HD (Promega, Madison, WI), se removió cuidadosamente el medio de cultivo de cada pozo. Se realizó un lavado con PBS 1x pH 7.4 estéril teniendo mucha precaución de no remover las células. Después se agregaron 100µL de buffer de lisis 1x (Promega, Madison, WI) a cada pozo, se homogenizó suavemente la placa y se incubó de 10-15 minutos en una agitadora a temperatura ambiente. Posteriormente, se despegaron vigorosamente las células de los pozos con ayuda de raspadores de células y se homogenizó varias veces el lisado celular por pipeteo. De cada pozo se tomaron 20µL del lisado celular y se colocaron en una placa de 96 pozos para luminómetro. Finalmente, a cada pozo se le agregaron 50µL del reactivo de luciferasa -Luciferase Assay System (Promega, Madison USA)- para inmediatamente medir la actividad del gen reportero de luciferasa en el equipo Glo-Max 20/20 Luminometry System. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los resultados fueron expresados como actividad relativa de luciferasa (ARL).

## **6.7 Análisis estadístico**

Los datos están expresados como la media y la desviación estándar (DE) estimada a partir de grupos experimentales independientes (células SiHa, HeLa, C33-A y HaCaT), cada uno realizado por triplicado. Para determinar la diferencia

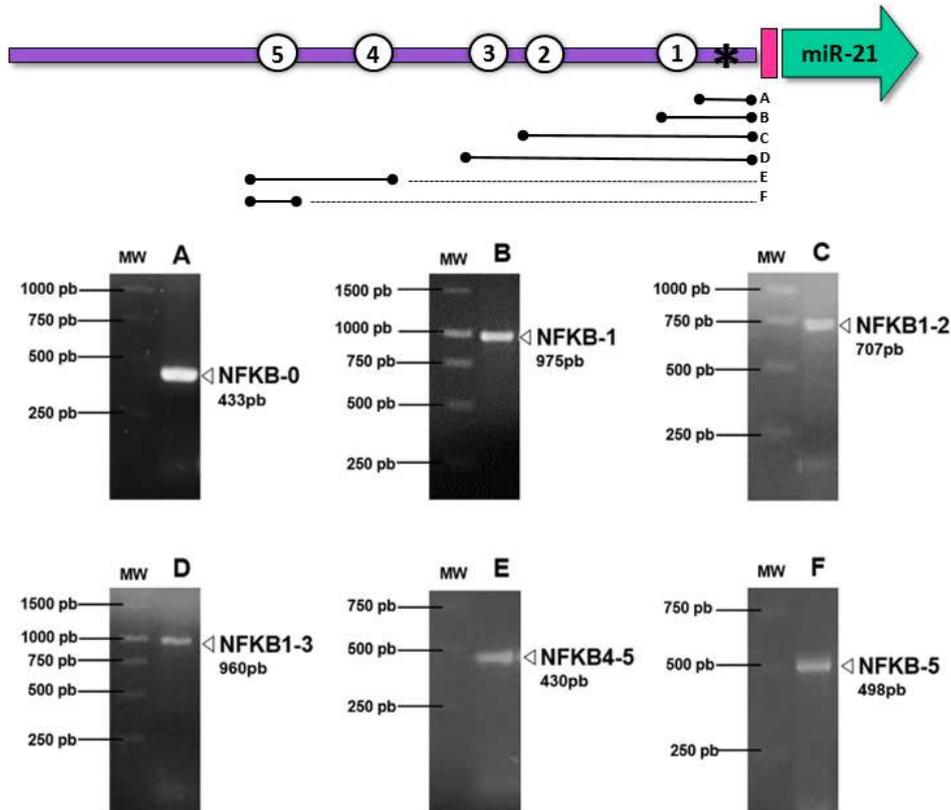
entre las medias de los grupos se utilizó la prueba de t-Student. La significancia estadística fue definida con un valor de  $p < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Análisis de los sitios de reconocimiento para NF-kB en el promotor 5' del gen miR-21

Para identificar los potenciales sitios de unión de NF-kB, en una región de 5kb del promotor 5' del gen de miR-21, se realizó un análisis bioinformático con la herramienta TFSITESCAN, que está respaldada por el Institute for Transcriptional Informatics (IFTI) y es capaz de identificar sitios potenciales de reconocimiento para factores de transcripción en secuencias pertenecientes a regiones promotoras. Los sitios de reconocimiento putativos a la búsqueda son el resultado de la base de datos orientada a objetos de factores de transcripción llamada ooTFD. Los resultados obtenidos a partir de del análisis *in silico*, sugirieron cinco potenciales sitios de reconocimiento para el factor de transcripción NF-kB (Figura 8).

Con el propósito de analizar la funcionalidad de estos elementos de reclutamiento de NF-kB en el promotor de miR-21, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos específicos, a manera de deleciones consecutivas de los elementos NF-kB; sin embargo, el diseño óptimo y propuesto inicialmente sólo se logró para las tres primeras secuencias próximas al sitio de inicio de la transcripción del gen miR-21. De esta manera, por medio de PCR, fueron obtenidos los amplicones correspondientes a los siguientes conjuntos de elementos: NFKB-0; NFKB-1; NFKB1-NFKB2; NFKB1-NFKB2-NFKB3; NFKB4-NFKB5 y NFKB-5 (Figura 10).

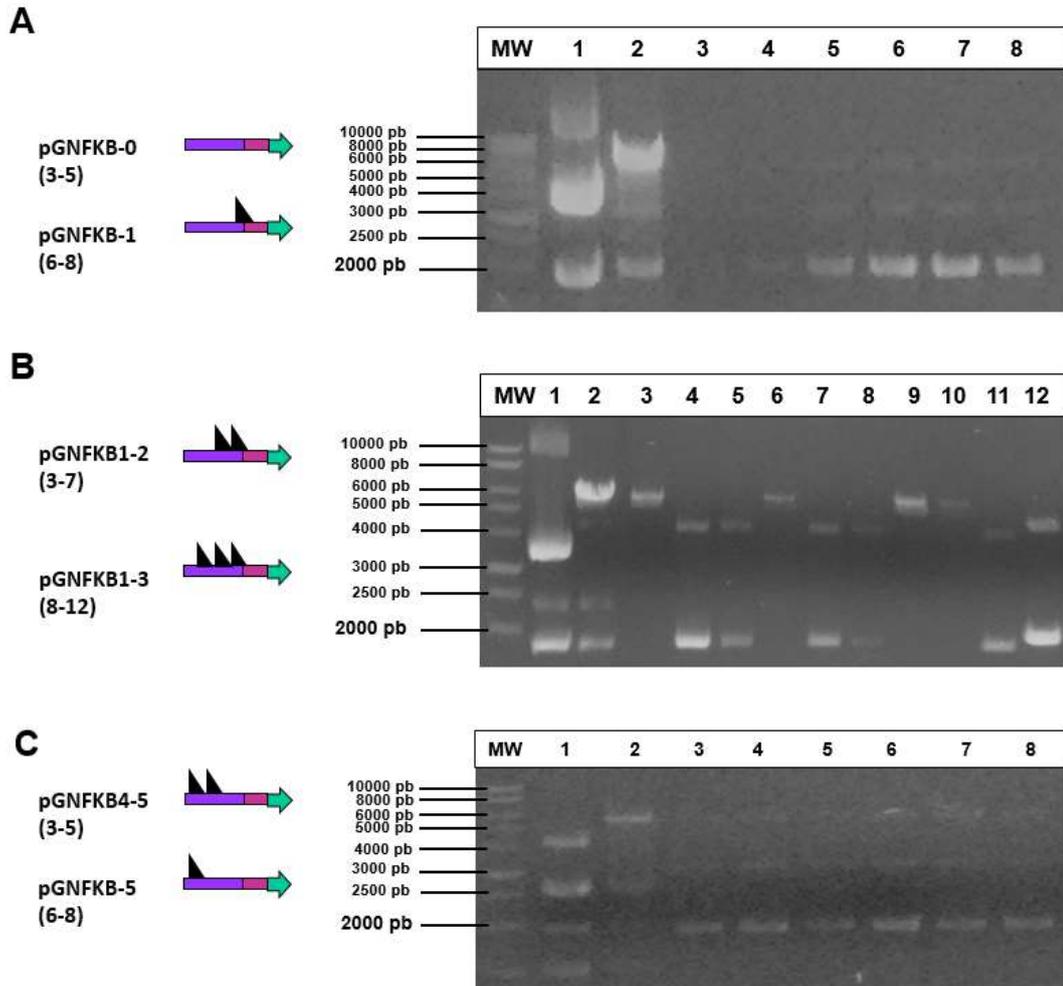


**Figura 10.** Amplicones correspondientes a las secuencias de reconocimiento para NF-kB en el promotor del gen miR-21. En la parte superior se muestran los sitios de reconocimiento de NF-kB obtenidos *in silico*; con flechas delgadas se señalan las regiones a amplificar por PCR. En la parte inferior, se observan los productos de amplificación correspondientes para cada conjunto de elementos NF-kB. El asterisco (\*) indica la localización de la secuencia sin sitios NF-kB (NFKB-0).

## 7.2 La expresión de miR-21 se sugiere es modulada por la unión del factor de transcripción NF-kB a su región promotora en el extremo 5'

Dado que se ha propuesto que los factores de transcripción NF-kB contribuyen al desarrollo del cáncer, mediante un proceso en el que están involucrados otros elementos de regulación génica y sobre todo miRNAs [71], en el presente estudio se realizó un ensayo *in vitro* de la actividad promotora del gen miR-21; relacionado específicamente con secuencias potenciales de reconocimiento para NF-kB, mediante la generación de construcciones de plásmidos reporteros. Para este propósito, se obtuvieron los siguientes amplicones correspondientes

a los sitios NF-kB: NFKB-0 (433nt), NFKB-1 (975nt), NFKB1-NFKB2 (707nt), NFKB1-NFKB2-NFKB3 (960nt), NFKB4-NFKB5 (430nt), NFKB-5 (433nt). Estos insertos fueron clonados en el vector reportero pGL2-Basic y después se identificaron las construcciones de plásmidos reporteros positivas por análisis de restricción enzimática. Las construcciones consideradas como positivas fueron aquellas en donde el sitio único de corte para la enzima *MluI* del vector se encontraba ausente, debido al acoplamiento de los sitios NF-kB. Por lo tanto, las construcciones de plásmidos reporteros seleccionadas, fueron las que mostraron un patrón electroforético similar al vector sin digerir, que se observa como tres bandas que corresponden a la conformación topológica del plásmido. Las construcciones descartadas fueron aquellas que, dada la presencia del sitio único de corte para *MluI*, esta enzima de restricción logró digerir y se observaron como una banda muy cercana a la longitud del plásmido pGL2-Basic (5598pb) correspondiente a moléculas lineales de longitud completa del plásmido (Figura 11). Posteriormente, las construcciones de plásmidos reporteros fueron confirmadas mediante secuenciación.



**Figura 11.** Ensayos de electroforesis en gel de agarosa 1% de construcciones reporteras sometidas a digestión enzimática con *MluI*. En la tres imágenes: el primer carril pertenece a pGL2-Basic sin digerir y el segundo carril a pGL2-Basic digerido con la enzima *MluI*. Los carriles 3-12 pertenecen a colonias independientes de plásmidos reporteros sometidas a restricción enzimática con *MluI*. **A** Corresponde al patrón electroforético para pGNFKB-0 y pGNFKB-1. **B** Corresponde al patrón electroforético para pGNFKB1-2 y pGNFKB1-3. **C** Corresponde al patrón electroforético para pGNFKB4-5 y pGNFKB-5.

### Ensayo de luciferasa

Para evaluar la actividad funcional de las regiones promotoras que contienen las diferentes secuencias de reconocimiento para NF-KB, se realizaron los ensayos

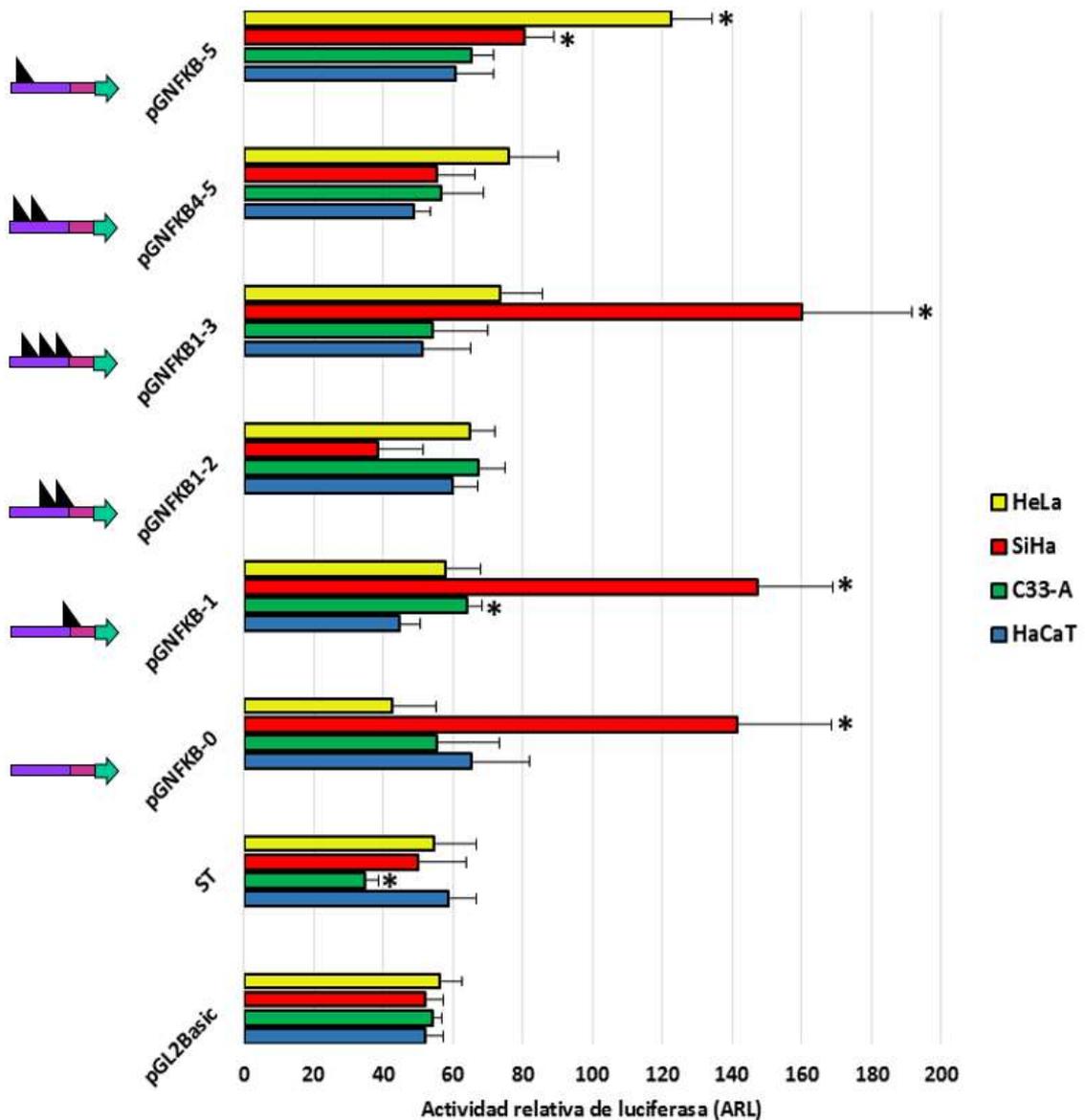
de transfección en diferentes líneas celulares de CaCU; en donde se estimó la actividad relativa del gen reportero de luciferasa (ARL).

Debido a que se han demostrado altos niveles de expresión de miR-21 en líneas celulares de CaCU [73], se transfectaron células SiHa (HPV-16+), HeLa (HPV-18+), C-33A (HPV-, p53 y pRB mutados) y HaCaT (queratinocitos epidérmicos primarios) con las construcciones de plásmidos pGNFKB-0, pGNFKB-1, pGNFKB1-2, pGNFKB1-3, pGNFKB4-5, pGNFKB-5 y el plásmido pGL2-Basic vacío como control negativo y pGL2-Control como control positivo. Posteriormente se evaluó la actividad de la luciferasa usando un luminómetro. Los plásmidos que contienen las secuencias de reconocimiento para NF-kB, indujeron de manera diferencial la actividad del gen reportero de luciferasa, que representa la actividad promotora del gen de miR-21, en cada una de las líneas celulares analizadas (Figura 12).

Para los cultivos celulares sin transfectar, es decir, sin tratamiento (ST), se identificó una actividad de luciferasa similar a la condición de transfección con el plásmido vacío para las células HaCaT, SiHa y HeLa; a excepción de la línea celular C33-A, en donde se observó una disminución de la actividad de la luciferasa de aproximadamente un 30% en comparación con el plásmido vacío. Cuando se empleó el plásmido pGNFKB-0, que no contiene sitios de reconocimiento para NF-kB, se observó un aumento significativo de casi tres veces la actividad de la luciferasa, en comparación con el plásmido vacío en la línea celular SiHa. En la línea celular HaCaT se identificó un aumento de la actividad de luciferasa de cerca del 25%; mientras que para la línea celular HeLa se observó una disminución de  $\pm 25\%$ , y en las células C33-A no se observaron cambios en la actividad del reportero. Cuando se realizó la transfección con el plásmido pGNFKB-1, que contienen un sitio NF-kB, la actividad de luciferasa incrementó significativamente para las líneas celulares C33-A en  $\pm 20\%$  y SiHa en un  $\pm 150\%$ . En la línea celular HaCaT se observó una disminución de actividad de  $\pm 10\%$  y en las células HeLa se conservó una actividad similar a la transfección con el plásmido vacío. Cuando se analizó la transfección con el plásmido pGNFKB1-2, que contiene dos sitios NF-kB, no se identificaron diferencias significativas en todas las líneas celulares. Sin embargo, el nivel de actividad de luciferasa para HaCaT aumentó  $\pm 10\%$ . En las células C33-A se observó un aumento del  $\pm 25\%$  de la actividad de luciferasa, mientras que en las células HeLa

se observó un incremento del  $\pm 10\%$  aproximadamente. En la transfección de células SiHa se observó una disminución de la actividad de la luciferasa de  $\pm 25\%$ . Cuando se analizó la transfección con el plásmido pGNFKB1-3, que contiene tres sitios NF-kB, en las células HaCat y C33-A no se observaron cambios en la actividad de la luciferasa. En las células SiHa se identificó un importante aumento en la actividad del gen reportero de luciferasa de  $\pm 200\%$ . En las células HeLa se percibe una expresión aumentada de  $\pm 25\%$ . Debido a que no se pudo evaluar la actividad de luciferasa para una condición que incluyera los 4 elementos NF-kB contiguos al promotor del gen de miR-21 y para la totalidad de secuencias de reconocimiento NF-kB en dicha región promotora, se valoró la transfección con el plásmido pGNFKB4-5, que contiene los sitios NFKB4-NFKB5, y también la actividad de luciferasa para el plásmido pGNFKB-5 que corresponde al sitio NFKB-5. Cuando se evaluó la actividad de la luciferasa con el plásmido pGNFKB4-5, no se observaron cambios significativos para las líneas celulares HaCaT, C-33A y SiHa. Sin embargo, para la línea celular HeLa hubo un aumento en la actividad de  $\pm 30\%$ . Finalmente, se analizó la transfección con el plásmido pGNFKB-5, en donde se observó un aumento significativo en la actividad de la luciferasa en la línea celular SiHa que corresponde a un  $\pm 50\%$ , mientras que en las células HeLa se identificó un incremento de la actividad promotora de  $\pm 115\%$ .

En conjunto, estos resultados sugieren un incremento en la actividad del gen reportero de luciferasa para las líneas celulares tumorales que está influenciada por la presencia de los elementos NF-kB y, por lo tanto, disminuida por la ausencia de las secuencias de unión para NF-kB. Los resultados también permiten dilucidar que los fragmentos NF-kB más cercanos al sitio de inicio de la transcripción de este miRNA, pueden estar contribuyendo más activamente en la regulación de la transcripción del gen de miR-21; en un proceso que parece depender del tipo celular y del genotipo de HPV presente.



**Figura 12.** Análisis funcional de las secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción NF-kB en el promotor del gen miR-21. Se analizó la funcionalidad de los elementos NF-kB mediante ensayos de actividad de luciferasa, en diferentes líneas celulares de cáncer cervical. Se encontró una expresión diferencial en la actividad relativa de luciferasa (ARL), la cual se sugiere es en respuesta a la presencia de los elementos NF-kB y del contexto celular, con respecto al vector reportero vacío (pGL2-Basic). Los datos representan la media/promedio  $\pm$ S.E. (\* $p < 0.05$ ).

## VIII. DISCUSIÓN

El CaCU es uno de los tipos de cáncer con mayor frecuencia entre la población femenina a nivel mundial y existe una fuerte necesidad por desarrollar métodos diagnósticos y terapéuticos que sean eficaces y accesibles a la población.

El perfil de expresión alterado de los miRNAs ha sido estudiado en múltiples padecimientos y está claro que contribuyen en el desarrollo y progresión del CaCU. Debido a la relevancia biológica de miR-21 y a que interesantemente se encuentra sobrepresado en CaCU y en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical [4,73,74], se ha podido establecer una amplia área de investigación que propone a este oncomiR como un biomarcador con alto potencial para pronosticar y diagnosticar este tipo de cáncer [37].

Al igual que los miRNAs, los factores de transcripción modulan procesos de expresión génica y previamente se ha reportado -para cáncer de mama, colorectal, próstata y de pulmón- que bajo ciertos estímulos extracelulares, la región promotora de miR-21 recluta a NF-kB; este factor de transcripción coopera con otros elementos regulatorios, tales como el transductor de señales y activador de la transcripción-3 (del inglés STAT3), para activar la transcripción de miR-21 [71]. Otros estudios que han trabajado sobre la región promotora de miR-21 han propuesto que son 4 los sitios de reconocimiento para NF-kB; sin embargo, en el presente análisis se propuso analizar 5 sitios potenciales, los cuales fueron nombrados de la siguiente manera: NFKB-0, NFKB-1, NFKB-2, NFKB-3, NFKB-4, NFKB-5 y se sugiere que estos elementos reclutan proteínas Rel/NF-kB al promotor de miR-21 e inducen su expresión de manera diferencial, según el tipo celular y el genotipo de HPV. Las secuencias NFKB-3 y NFKB-5 coinciden con dos sitios anteriormente analizados en líneas celulares de cáncer de mama, próstata y de pulmón [46,71,72]; y de acuerdo a estos estudios han tenido relevancia biológica y contribuyen al proceso de carcinogénesis. De esta manera, NF-kB influye de manera relevante en la expresión de miR-21 al unirse al promotor de este oncogen [71,72,75]. NF-kB es un factor de transcripción constitutivamente activo en varios tipos de cáncer [1,61,65,68], que se transloca al interior del núcleo celular y se une a secuencias consenso específicas que están presentes en regiones promotoras de genes blanco [75]; de esta manera, NF-kB regula la expresión de

genes antiapoptóticos, citocinas proinflamatorias y favorece el fenotipo canceroso. En la mayoría de las células, las proteínas NF-kB se encuentran en su estado latente en el citoplasma y es bajo ciertos estímulos extracelulares que se induce la activación de estos elementos [66]. Como caso particular, se sabe que la infección por HPV induce la actividad de los elementos NF-kB [76,77].

Previamente, se han reportado diferentes sitios potenciales de unión de NF-kB en la región promotora del gen miR-21 en diferentes padecimientos y por lo tanto, en un contexto celular distinto. En el presente trabajo, el análisis de las secuencias consenso de NF-kB presentes en el promotor de miR-21, se obtuvo de la base de datos oTFD. Este análisis *in silico* nos sugirió cinco elementos potenciales de reconocimiento para NF-kB. Para los objetivos de este trabajo, se emplearon las cinco secuencias sugeridas por la herramienta TFSITSCAN, con el propósito de ampliar el análisis de otras secuencias de reconocimiento para NF-KB aún no analizadas y conocer su contribución en la inducción de miR-21 en células de cáncer cervical. Las proteínas Rel/NF-kB se caracterizan por unirse a sitios de aproximadamente 9-10pb de longitud [66], mediante el reconocimiento de la secuencia consenso GGGuNNPyPyCC (Pu=purina, Py=pirimidina, N= cualquier base) [68].

Al analizar la funcionalidad de estas secuencias de reconocimiento, se observaron diferentes grados de inducción de la actividad de la luciferasa dependiente del contexto celular y de la presencia de cada uno de los elementos de NF-kB.

Para conocer la funcionalidad de los elementos NF-kB en células no neoplásicas, se evaluó el nivel de actividad de la luciferasa en la línea HaCaT y no se detectaron alteraciones significativas, ya que es una línea celular derivada de queratinocitos humanos normales y no presenta un perfil de sobreexpresión de miR-21 ni de NF-kB. Al evaluar la actividad de la luciferasa en las líneas celulares establecidas de cáncer cervical (C33-A, SiHa, HeLa), se observó un incremento significativo con la presencia de las secuencias de reconocimiento para NF-kB. Previamente, se ha confirmado que la línea celular C-33A (HPV-), en comparación con las líneas celulares SiHa (HPV-16+), HeLa (HPV-18+) y CaSki (HPV-16+), muestra un nivel de expresión menor de miR-21 [73]. De esta manera, en los resultados se observa que la actividad de la luciferasa se encuentra significativamente disminuida para la condición sin tratamiento (ST).

Sin embargo, el reclutamiento del primer elemento NF-kB (pGNFKB-1) ,próximo al sitio de inicio de la transcripción de miR-21, marca un aumento significativo en la actividad de la luciferasa. Por otro lado, cuando se analizó la actividad promotora del gen de miR-21, mediante la actividad relativa de luciferasa en las células SiHa, se observó un incremento significativo por la acción conjunta de los tres elementos contiguos (pGNFKB1-3), y que de acuerdo con el grupo de Yang *et al* (2015), la región promotora en la que están comprendidos estos tres elementos de reconocimiento para NF-kB también es de relevancia biológica; ya que en cáncer de pulmón contribuyen a la regulación transcripcional de miR-21 y a su vez, modulan la expresión de genes blanco que modifican los procesos celulares. Adicionalmente, el elemento pGNFKB-5 que fue de importancia para el grupo de Yang *et al*, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, también resultó tener relevancia funcional en células cervicales tumorales HPV-HR+. Al evaluar la actividad de luciferasa en la línea celular HeLa, la tendencia ascendente de expresión demuestra también que la acción conjunta de los elementos NF-kB influyen sobre la expresión de miR-21; sin embargo, se observa que el incremento significativo corresponde a la secuencia de reconocimiento más lejana al inicio de la transcripción (pGNFKB-5).

Además, es importante mencionar que al igual que los múltiples factores de transcripción conocidos, el factor NF-kB no funciona de manera aislada, sino que interactúa con una gran variedad de elementos reguladores, formando grandes redes de cooperación; de igual forma, el promotor de miR-21 se relaciona con diferentes factores que inhiben o promueven su expresión. Así, en los experimentos realizados fue posible detectar una actividad aumentada e incluso significativa para la condición que no incluye secuencias de reconocimiento NF-kB (pGNFKB-0) [78].

Para dilucidar de una manera más íntegra el mecanismo molecular de regulación del promotor de miR-21 por NF-kB en cáncer cervical, se requiere de estudios adicionales de tipo EMSA (del inglés *electrophoretic mobility shift assay*) así como de DNA *footprinting* o ensayos tipo ChIP (del inglés *chromatin immunoprecipitation*), que demuestren la interacción DNA-proteína del factor de transcripción NF-kB con las secuencias específicas de reconocimiento en el promotor de miR-21. En este sentido, aunque estos ensayos sean necesarios y complementen los resultados reportados en esta tesis, no están planteados

dentro de los alcances de sus objetivos, sino que están siendo desarrollados por el grupo de trabajo.

En conjunto, los resultados reportados en esta tesis sugieren el hecho de que parte de los mecanismos de regulación de la expresión génica del gen de miR-21 ocurren a nivel transcripcional a través de la interacción con el factor de transcripción NF- $\kappa$ B en las células cervicales tumorales humanas transformadas con el HPV-HR+. Estos hallazgos no excluyen que otras vías moleculares puedan influir también en la regulación transcripcional del promotor de miR-21, lo cual ofrece excelentes oportunidades de estudio para identificar nuevos blancos potencialmente terapéuticos contra el cáncer cervical. La relevancia de los resultados reportados aquí serán mejor apreciados cuando se realicen este tipo de análisis en muestras de pacientes con cáncer cervical.

## **IX. CONCLUSIONES**

- Se identificaron cinco secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción NF-kB en la región promotora 5' del gen humano miR-21.
- Se sugiere que el factor transcripcional NF-kB induce la actividad promotora del gen de miR-21, mediante el reclutamiento de las proteínas Rel/NF-kB a sus diferentes sitios de reconocimiento en la región promotora de este miRNA.
- Las cinco secuencias de reconocimiento para NF-kB son funcionales para inducir la actividad promotora de miR-21 y el grado de inducción varía de acuerdo a la presencia/ausencia de estos elementos.
- Se sugiere que la regulación del promotor de miR-21, por el factor de transcripción NF-kB, también es dependiente del genotipo de HPV presente.

## X. PERSPECTIVAS

En este estudio, se analizó la región promotora 5' del gen miR-21 y con las herramientas pertinentes se obtuvo un análisis *in silico* que sugirió cinco secuencias potenciales de reconocimiento para las proteínas Rel/NF-kB en la región promotora de dicho oncomiR. El planteamiento de la metodología proponía un modelo que evaluara en su totalidad los cinco sitios sugeridos y se fueran deletando uno a uno. Sin embargo, no pudo ser llevado a cabo de tal manera dado que los amplicones correspondientes a los elementos NFkB1-4 y NFkB1-5, resultaron inespecíficos. Por tal motivo, sería relevante ampliar el análisis mediante el diseño y síntesis eficiente de oligonucleótidos para estos fragmentos y posteriormente someterlos al mismo procedimiento *in vitro* presentado en esta tesis. De tal manera, los resultados presentados en la presente tesis en conjunto complementarían la información sobre la regulación de la expresión de miR-21 influenciada por la presencia de estas secuencias de unión para el factor de transcripción NF-kB. Dado que miR-21 presenta una sobreexpresión en tumores sólidos y hematológicos [20, 37, 40, 45,46], a futuro, podría ampliarse el análisis de la funcionalidad de NF-kB utilizando biopsias de pacientes con carcinoma cervical en sus diferentes etapas de progresión del cáncer.

Dado que estudios recientes han comprobado la interacción directa entre las proteínas Rel/NF-kB y la región promotora de miR-21, sería de interés conocer si este comportamiento sucede con la misma efectividad en líneas celulares de CaCU mediante ensayos de tipo ChIP o EMSA, medir su afinidad para posteriormente comparar los resultados con la funcionalidad de las secuencias de unión a NF-kB.

## **X. REFERENCIAS**

1. Bharti, A. C., & Aggarwal, B. B. (2002). Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochemical pharmacology*, 64(5), 883-888.
2. Mathers, C., Fat, D. M., & Boerma, J. T. (2008). The global burden of disease: 2004 update. World Health Organization.
3. GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Worldwide in 2012. IARC, 2014.
4. Peralta-Zaragoza, O., Deas, J., Meneses-Acosta, A., De la O-Gómez, F., Fernández-Tilapa, G., Gómez-Cerón, C., & Madrid-Marina, V. (2016). Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells. *BMC cancer*, 16(1), 1.
5. Aguilar-Lemarroy, A., Vallejo-Ruiz, V., Cortés-Gutiérrez, E. I., Salgado-Bernabé, M. E., Ramos-González, N. P., Ortega-Cervantes, L., & Piña-Sánchez, P. (2015). Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: Type-specific prevalence and HPV coinfections. *Journal of medical virology*, 87(5), 871-884.
6. Wang, H. Y., Park, S., Lee, D., Kim, S., Kim, G., Park, K. H., & Lee, H. (2015). Prevalence of type-specific oncogenic human papillomavirus infection assessed by HPV E6/E7 mRNA among women with high-grade cervical lesions. *International Journal of Infectious Diseases*, 37, 135-142.
7. De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27.
8. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70
9. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
10. Plasencia, C. P., Dueñas-Gonzalez, A., & Bustos-Martínez, J. (2008). Activación de la vía de Wnt/beta catenina en el proceso de carcinogenesis cervical. *Archivos de Medicina*.
11. Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 342-350.
12. Braicu, O., Pileczki, V., Braicu, C., Achimas-Cadariu, P., Irimie, A., & Berindan-Neagoe, I. (2015). p53 siRNA-a therapeutic tool with significant implication in the modulation of apoptosis and angiogenic pathways. *Clujul Medical*, 88(3), 333.

13. Woodman, C. B., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7(1), 11-22.
14. Wang, H. Y., Park, S., Lee, D., Kim, S., Kim, G., Park, K. H., & Lee, H. (2015). Prevalence of type-specific oncogenic human papillomavirus infection assessed by HPV E6/E7 mRNA among women with high-grade cervical lesions. *International Journal of Infectious Diseases*, 37, 135-142.
15. Prendiville, W., & Davies, P. (2004). HPV HANDBOOK.
16. De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27.
17. Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370(9590), 890-907.
18. Faridi, R., Zahra, A., Khan, K., & Idrees, M. (2011). Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology journal*, 8(1), 1.
19. Nees, M., Geoghegan, J. M., Hyman, T., Frank, S., Miller, L., & Woodworth, C. D. (2001). Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF- $\kappa$ B-responsive genes in cervical keratinocytes. *Journal of virology*, 75(9), 4283-4296.
20. Pan, X., Wang, Z. X., & Wang, R. (2010). MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer biology & therapy*, 10(12), 1224-1232.
21. Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370(9590), 890-907.
22. Coulon, A., Chow, C. C., Singer, R. H., & Larson, D. R. (2013). Eukaryotic transcriptional dynamics: from single molecules to cell populations. *Nature Reviews Genetics*, 14(8), 572-584.
23. Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 7, 29-59.
24. de-Leon, S. B. T., & Davidson, E. H. (2007). Gene regulation: gene control network in development. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36, 191-212.
25. Felsenfeld, G., & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448-453.
26. Martínez, T., Jiménez, A. I., & Pañeda, C. (2015). Short-interference RNAs: becoming medicines. *EXCLI journal*, 14, 714.

27. Yao, T., & Lin, Z. (2012). MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(2), 248-260.
28. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
29. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
30. Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862-864.
31. Flores, F., Martínez, M. Á., Arenas, C., Covarrubias, A., & Reyes, J. L. (2007). ¡Silencio mensajeros! Qué son y cómo actúan los micrnas. *REB. Revista de educación bioquímica*, 26(4), 135-141.
32. Sharma, G., Dua, P., & Agarwal, S. M. (2014). A comprehensive review of dysregulated miRNAs involved in cervical cancer. *Current genomics*, 15(4), 310.
33. Moss, E. G. (2002). MicroRNAs: hidden in the genome. *Current Biology*, 12(4), R138-R140.
34. Lugo-Trampe, Á., & del Carmen Trujillo-Murillo, K. (2009). MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina Universitaria*, 11(44), 187-192.
35. Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., & Tuschl, T. (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 141(1), 129-141.
36. González-Quintana, V., Palma-Berré, L., Campos-Parra, A. D., López Urrutia, E., Peralta-Zaragoza, O., Vazquez-Romo, R., & Pérez-Plasencia, C. (2016). MicroRNAs are involved in cervical cancer development, progression, clinical outcome and improvement treatment response (Review). *Oncology reports*, 35(1), 3-12.
37. Wang, W., Li, J., Zhu, W., Gao, C., Jiang, R., Li, W., & Zhang, B. (2014). MicroRNA-21 and the clinical outcomes of various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer*, 14(1), 1.
38. Fujita, S., & Iba, H. (2008). Putative promoter regions of miRNA genes involved in evolutionarily conserved regulatory systems among vertebrates. *Bioinformatics*, 24(3), 303-308.
39. Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., & Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC genomics*, 8(1), 1.

40. Gómez-Gómez, Y., Organista-Nava, J., & Gariglio, P. (2013). Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: Human papillomavirus implications. *BioMed research international*, 2013.
41. Vandermark, E. R., Deluca, K. A., Gardner, C. R., Marker, D. F., Schreiner, C. N., Strickland, D. A., & Woodworth, C. D. (2012). Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF- $\kappa$ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- $\kappa$ B promotes cell growth and immortalization. *Virology*, 425(1), 53-60.
42. Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 18(3), 215.
43. Caramazza, D., Hussein, K., Siragusa, S., Pardanani, A., Knudson, R. A., Ketterling, R. P., & Tefferi, A. (2010). Chromosome 1 abnormalities in myeloid malignancies: a literature survey and karyotype–phenotype associations. *European journal of haematology*, 84(3), 191-200.
44. Wilting, S. M., Steenbergen, R. D., Tijssen, M., van Wieringen, W. N., Helmerhorst, T. J., van Kemenade, F. J., ... & Ylstra, B. (2009). Chromosomal signatures of a subset of high-grade premalignant cervical lesions closely resemble invasive carcinomas. *Cancer research*, 69(2), 647-655.
45. Kumarswamy, R., Volkmann, I., & Thum, T. (2011). Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA biology*, 8(5), 706-713.
46. Yang, C. H., Yue, J., Fan, M., & Pfeffer, L. M. (2010). Interferon induces miR-21 through a STAT3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on interferon-induced apoptosis. *Cancer Research*, canres-2579.
47. Si, M. L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., & Mo, Y. Y. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 26(19), 2799-2803.
48. Giovannetti, E., Funel, N., Peters, G. J., Del Chiaro, M., Erozenci, L. A., Vasile, E., ... & Danesi, R. (2010). MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer research*, 70(11), 4528-4538.
49. Shi, G. H., Ye, D. W., Yao, X. D., Zhang, S. L., Dai, B., Zhang, H. L., & Ma, C. G. (2010). Involvement of microRNA-21 in mediating chemo-resistance to docetaxel in androgen-independent prostate cancer PC3 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(7), 867-873.
50. Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J. T., & Patel, T. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*, 130(7), 2113-2129.

51. Li, Y., Zhu, X., Gu, J., Dong, D., Yao, J., Lin, C., & Fei, J. (2010). Anti-miR-21 oligonucleotide sensitizes leukemic K562 cells to arsenic trioxide by inducing apoptosis. *Cancer science*, 101(4), 948-954.
52. Li, T., Li, D., Sha, J., Sun, P., & Huang, Y. (2009). MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 383(3), 280-285.
53. Wang, K., & Li, P. F. (2010). Foxo3a regulates apoptosis by negatively targeting miR-21. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 16958-16966.
54. Li, Y., Zhu, X., Gu, J., Hu, H., Dong, D., Yao, J., & Fei, J. (2010). Anti-miR-21 oligonucleotide enhances chemosensitivity of leukemic HL60 cells to arabinosylcytosine by inducing apoptosis. *Hematology*, 15(4), 215-221.
55. Park, J. K., Lee, E. J., Esau, C., & Schmittgen, T. D. (2009). Antisense inhibition of microRNA-21 or-221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, 38(7), e190-e199.
56. Wickramasinghe, N. S., Manavalan, T. T., Dougherty, S. M., Riggs, K. A., Li, Y., & Klinge, C. M. (2009). Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic acids research*, 37(8), 2584-2595.
57. Li, Y., Li, W., Yang, Y., Lu, Y., He, C., Hu, G., & Yu, H. (2009). MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain research*, 1286, 13-18.
58. Kurashige, J., Kamohara, H., Watanabe, M., Tanaka, Y., Kinoshita, K., Saito, S., ... & Baba, H. (2012). Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of surgical oncology*, 106(2), 188-192.
59. Toiyama, Y., Takahashi, M., Hur, K., Nagasaka, T., Tanaka, K., Inoue, Y., & Goel, A. (2013). Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, djt101.
60. Xu, Y. Z., Xi, Q. H., Ge, W. L., & Zhang, X. Q. (2013). Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(2), 1057-1060.
61. Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., & Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF- $\kappa$ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*, 139(4), 693-706.

62. Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K., & Iba, H. (2008). miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *Journal of molecular biology*, 378(3), 492-504.
63. Shukla, S., Shishodia, G., Mahata, S., Hedau, S., Pandey, A., Bhambhani, S., ... & Bharti, A. C. (2010). Aberrant expression and constitutive activation of STAT 3 in cervical carcinogenesis: implications in high-risk human papillomavirus infection. *Molecular cancer*, 9, 282-282.
64. Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell*, 132(3), 344-362.
65. Rayet, B., & Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18(49).
66. Gilmore, T. (2016). NF- $\kappa$ B Transcription Factors [En línea]. Boston University. Bu.edu. Disponible: <http://www.bu.edu/nf-kb/> [2016, Agosto 21]
67. Ma, X., Buscaglia, L. E. B., Barker, J. R., & Li, Y. (2011). MicroRNAs in NF- $\kappa$ B signaling. *Journal of molecular cell biology*, 3(3), 159-166.
68. Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor- $\kappa$ B: the enemy within. *Cancer cell*, 6(3), 203-208.
69. Kopp, E., & Ghosh, S. (1994). Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*, 265(5174), 956-959.
70. Baud, V., & Karin, M. (2009). Is NF- $\kappa$ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature reviews Drug discovery*, 8(1), 33-40.
71. Niu, J., Shi, Y., Tan, G., Yang, C. H., Fan, M., Pfeffer, L. M., & Wu, Z. H. (2012). DNA damage induces NF- $\kappa$ B-dependent microRNA-21 up-regulation and promotes breast cancer cell invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 21783-21795.
72. Yang, Z., Fang, S., Di, Y., Ying, W., Tan, Y., & Gu, W. (2015). Modulation of NF- $\kappa$ B/miR-21/PTEN Pathway Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer to Cisplatin. *PloS one*, 10(3), e0121547.
73. Shishodia, G., Shukla, S., Srivastava, Y., Masaldan, S., Mehta, S., Bhambhani, S., ... & Bharti, A. C. (2015). Alterations in microRNAs miR-21 and let-7a correlate with aberrant STAT3 signaling and downstream effects during cervical carcinogenesis. *Molecular cancer*, 14(1), 1.
74. Bumrungthai, S., Ekalaksananan, T., Evans, M. F., Chopjitt, P., Tangsiriwatthana, T., Patarapadungkit, N., ... & Pientong, C. (2015). Up-regulation of miR-21 is associated with cervicitis and human papillomavirus infection in cervical tissues. *PloS one*, 10(5), e0127109.

- 75.** Madhyastha, R., Madhyastha, H., Pengjam, Y., Nakajima, Y., Omura, S., & Maruyama, M. (2014). NFkappaB activation is essential for miR-21 induction by TGFβ1 in high glucose conditions. *Biochemical and biophysical research communications*, 451(4), 615-621.
- 76.** Yan, M., Peng, J., Jabbar, I. A., Liu, X., Filgueira, L., Frazer, I. H., & Thomas, R. (2005). Activation of dendritic cells by human papillomavirus-like particles through TLR4 and NF-κB-mediated signalling, moderated by TGF-β. *Immunology and cell biology*, 83(1), 83-91.
- 77.** James, M. A., Lee, J. H., & Klingelutz, A. J. (2006). Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-κB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *Journal of virology*, 80(11), 5301-5307.
- 78.** Chen, K., & Rajewsky, N. (2007). The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics*, 8(2), 93-103.