



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**REGULACIÓN DEL RNAm de GPT2 POR miR-124 EN LÍNEAS
CELULARES DERIVADAS DE CANCER COLORRECTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA :

DAVID NÚÑEZ CORONA



DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS PÉREZ PLASENCIA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Una de las reglas básicas del Universo es que nada es perfecto. La perfección no existe simplemente... sin imperfección, ni usted ni yo existiríamos”

-Stephen Hawking

Agradecimientos

Gracias a mis padres por todo el amor, paciencia y la motivación constante que me brindaron para alcanzar mis anhelos, gracias por siempre confiar y creer en mí a pesar de las adversidades, por siempre desear y anhelar lo mejor para mí, gracias mama por esos palos que me daba de pequeño para ir a la escuela, vea que si dieron resultados. Todos mis logros incluyendo este se los debo a ustedes.

Gracias mis hermanos Alejandro, Juana, Silvia y Elizabeth, por ser un ejemplo de lucha, dedicación y superación, por toda la ayuda que me brindaron directa e indirectamente para que estuviera un paso más cerca de alcanzar mis sueños, gracias por estar cerca de mi ofreciéndome lo mejor de su persona, los amo.

Gracias a la Dra. Verónica por todo el apoyo y conocimiento que me brindo cuando siempre lo necesité. Le agradezco no solo por la ayuda brindada, si no por los consejos, regaños, paciencia y momentos en los que convivimos. Quiero agradecer al Dr. Urrutia por despejar todas mis dudas y alimentar la curiosidad.

Quiero agradecer a todos aquellos que estuvieron allí a lo largo de mi formación académica, gracias a mis compañeros y amigos de laboratorio Jossimar, Misael, Rebeca, David, Carlos, Luis y Samuel que con respeto decencia y humor realizaron aportes y críticas para mejorar este trabajo.

Gracias a mis amigos, Toño, Marcos, Héctor Martínez, Edgar, Erendira Ortiz y Eduardo Cano, quienes han estado a lo largo de mi vida compartiendo sus alegrías y tristezas.

Gracias a el Dr. Calos Pérez Plasencia por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, gracias por los retos, la ayuda, las charlas motivacionales, gracias por fomentar trabajo duro para llegar al éxito individual y colectivo.

Resumen

Las células cancerosas se distinguen de la mayoría de las células normales por su metabolismo alterado. Estas células convierten la glucosa en lactato incluso en presencia de oxígeno (efecto Warbug) y usan glutamina para generar intermediarios metabólicos que completan el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Para que la glutamina sea aprovechada por el TCA, debe someterse a un proceso de desaminación mediado por glutaminasas como la glutamato piruvato transaminasa 2 (GPT2), lo que da como resultado α -cetoglutarato (α -KG) un intermediario del TCA; Se ha reportado que la sobreexpresión de GPT2 mejora la glutaminólisis facilitando la migración y la proliferación celular. Por otro lado, miR-124 es una pequeña molécula supresora de tumores no codificante subexpresada en células de cáncer de colon, pero con un papel aún desconocido. A través del análisis bioinformático, se identificó a miR-124 como un potencial regulador GPT2. Se midió la expresión relativa GPT2 y miR-124 en las líneas celulares derivadas de cáncer de colon HCT 116, SW480 y SW620, se encontró que GPT2 estaba sobreexpresado y miR-124 estaba subexpresado. Se observó una disminución en la cantidad de luminiscencia del ensayo de luciferasa, lo que sugiere que existe una interacción de miR-124 con GPT2. Por primera vez hay evidencia de la regulación e interacción de miR-124 con GPT2 y se tiene la intención de dilucidar el papel que tiene esta unión en el metabolismo del cáncer colorrectal.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
INTRODUCCIÓN	4
<i>Cáncer</i>	4
<i>Epidemiología del cáncer a nivel mundial</i>	5
<i>Epidemiología de cáncer colorrectal</i>	6
<i>Epidemiología de Cáncer colorrectal en México</i>	7
<i>Factores de riesgo de cáncer colorrectal</i>	8
<i>Clasificación del cáncer colorrectal</i>	9
<i>Clasificación histológica de cáncer de colon</i>	9
<i>Transición adenoma-carcinoma y CCR hereditario</i>	10
<i>Clasificación molecular del cáncer colorrectal</i>	11
<i>Metabolismo del cáncer</i>	12
<i>miRNAs en metabolismo</i>	16
<i>miR-124</i>	18
Justificación	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MÉTODOS	22
<i>Análisis in silico de la 3' UTR de GPT2 y miR-124</i>	22
<i>Diseño de primers GPT2 y miR-124</i>	22
<i>Extracción de RNA</i>	23
<i>Construcciones para sobreexpresar miR-124 y validar la interacción miR-124/GPT2</i> ...	26
Cultivo celular y transfección	28
<i>Ensayo reportero de luciferasa</i>	28
<i>Métodos estadísticos</i>	28
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	49
LITERATURA CITADA	50

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Listado de primers diseñados en Primer3 y miRNA Primer Desing Tool.</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 2. Secuencias clonadas en pSilencer entre los sitios de restricción para las enzimas BamHI y HindIII.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 3. Secuencias del sitio de unión de miR-124 con GPT2, normal y con tres desajustes en la región semilla.</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 4. Reactivos usados para la doble digestión del vector pSilencer.</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 5. Reactivos para una doble digestión en el vector pMiR-report.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 6. Lista de posibles microRNAs que interactúan con el RNAm de GPT2 validada con siete bases de datos.</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 7. Puntuación Context Score de los sitios de unión de miR-124 a la región 3'UTR de GPT2. La región semilla del miRNA maduro está representada en color azul.</i>	<i>30</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Características distintivas del cáncer. Progresión del cáncer (modificada de Hanahan y Weinberg, 2011).</i>	4
<i>Figura 2. a) Gráfica de barras de incidencia y mortalidad de los diez tipos cáncer más comunes en países desarrollados y en vías de desarrollo de todo el mundo. b) Gráficas circulares representan la proporción del número total de casos y muertes de los principales tipos de cáncer en el mundo.</i>	6
<i>Figura 3. Principales tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres mayores de 20 años en México. Tomado y modificado de INEGI 2015.</i>	7
<i>Figura 4. Clasificación de las características moleculares del cáncer colorrectal. Tomada y modificada de Müller et al., 2016.</i>	12
<i>Figura 5. Sellos del metabolismo del cáncer. Se observan tres niveles de interacción célula-metabolito como consecuencia de la reprogramación metabólica en cáncer, tomada y modificada de Pavlova et al., 2016.</i>	13
<i>Figura 6. Principales rutas metabólicas. Glucólisis, ruta de las pentosas fosfato, síntesis de lípidos β-oxidación, fosforilación oxidativa y glutaminólisis. Tomada y modificada de Pearce y Everts, 2015. Espacio intermembrana ETC, Isocitrato deshidrogenasa, Malato deshidrogenasa MDH, α-cetoglutarato deshidrogenasa αKGDH, Piruvato cinasa PKM1, lactato deshidrogenasa LDHA, especies reactivas de oxígeno ERO.</i>	14
<i>Figura 7. Metabolismo de la Glutamina. El catabolismo de la glutamina se usa para la formación de ATP en el TCA, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y glutatión. Tomada y modificada de Still y Yuneva, 2017. Glutamato deshidrogenasa GLUD, gltamamato oxalacetato transaminasa 2 GOT2, glutaminasa GLS, glutamato amonio ligasa GLUL, α-cetoglutarato α-KC, especeis reactivas de oxígeno ROS.</i>	15
<i>Figura 8. Biogénesis de miRNAs. Proceso de transcripción, maduración y mecanismo de acción de los miRNAs, tomada de (Peng y Croce, 2016). Metiltransferasa MTTL3.</i>	17
<i>Figura 9. Transcripción de la familia de miR-124. La familia de miR-124 se procesa a partir de tres secuencias separadas, dos en cromosoma 8 y una el cromosoma 20.</i>	19
<i>Figura 10. miR-124 regula la expresión de genes en múltiples niveles.</i>	20
<i>Figura 11. Condiciones de PCR para sintetizar cDNA de líneas celulares de cáncer colorrectal.</i> ...	24
<i>Figura 12. Condiciones de PCR para estandarizar la temperatura de alineamiento de los primers GPT2 y GAPDH.</i>	24
<i>Figura 13. Condiciones de qPCR para medir la expresión relativa de GPT2 y GAPDH.</i>	25
<i>Figura 14. Condiciones RT para sintetizar cDNA de miR-124 y U6.</i>	25
<i>Figura 15. Condiciones de qPCR para la detección de miR-124 y U6 en líneas celulares de cáncer colorrectal.</i>	26

<i>Figura 16. Esquema de la 3'UTR de GPT2 y la posición de cada una de posibles interacciones con miRNAs conservados.</i>	29
<i>Figura 17. Modelado de la estructura secundaria del RNAm de GPT2. A la derecha se muestra una ampliación de la región circundante al sitio de interacción de miR-124 con GPT2, en color azul indica la región semilla del microRNA.</i>	31
<i>Figura 18. Estructura secundaria de la región 3'UTR de GPT2 y el sitio de interacción de miR-124 con su blanco, en azul se muestra la región semilla del microRNA.</i>	32
<i>Figura 19. Geles de Integridad para RNA obtenido de líneas celulares de CCR. Bandas ribosomales 28s Y 18s.</i>	33
<i>Figura 20. Expresión relativa de GPT2 en líneas celulares de CCR medida por qRT-PCR. Los datos de expresión de GPT2 fueron normalizados con GAPDH.</i>	34
<i>Figura 21. Expresión relativa de miR-124 en líneas celulares de CCR medida por qRT-PCR. Los datos fueron normalizados con snRNA U6.</i>	35
<i>Figura 22. a) Construcción del vector pSilencer-premiR-124. b) Análisis de restricción de la construcción pSilencer-PremiR-124 con la enzima HindIII de la colonia uno a cinco.</i>	36
<i>Figura 23. Electroferograma y alineamiento de la colonia 3 con la secuencia de premiR-124.</i>	37
<i>Figura 24. Expresión relativa miR-124 en células SW620 transfretadas con pSilencer premiR-124 a diferentes concentraciones.</i>	38
<i>Figura 25. Expresión relativa GPT2 en células SW620 transfretadas con pSilencer premiR-24 a diferentes concentraciones.</i>	39
<i>Figura 26. a) Construcción del vector pMIR-REPORT mir-124/GPT2. b) Análisis de restricción con la enzima HindIII de la colonia uno y dos.</i>	40
<i>Figura 27. Electroferograma y alineamiento de la construcción pMIR-REPORT miR-124/GPT2.</i>	41
<i>Figura 28. a) Construcción del vector pMIR-REPORT mir-124/GPT2mut. b) Análisis de restricción con la enzima HindIII de la colonia uno a seis</i>	42
<i>Figura 29. Mutaciones de las colonias dos y cinco de la construcción pMIR-REPORT miR-124/GPT2 mut.</i>	43
<i>Figura 30. Ensayo de luciferasa del sitio de interacción de miR-124/GPT2 normal y con un desajuste de tres nucleótidos en la región semilla.</i>	44
<i>Figura 31. Modelo para validar todos los miRNAs que regulan a GPT2 en CCR.</i>	49

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja, heterogénea y altamente dinámica en la cual múltiples componentes de células normales cambian progresivamente a un estado neoplásico adquiriendo una serie de características distintivas que las convierte en células malignas. En el 2000, Hanahan y Weinberg, propusieron un marco lógico integral para el estudio funcional del cáncer, describiendo seis Hallmarks o características distintivas que adquiere una célula durante el desarrollo tumoral: mantenimiento de la señal proliferativa, eludir supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, invasión y metástasis. Los avances significativos en la comprensión de las características del cáncer llevaron a estos mismos autores a identificar cuatro características nuevas: evasión del sistema inmune, inflamación, desregulación metabólica e inestabilidad genómica y mutacional (Figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2011).

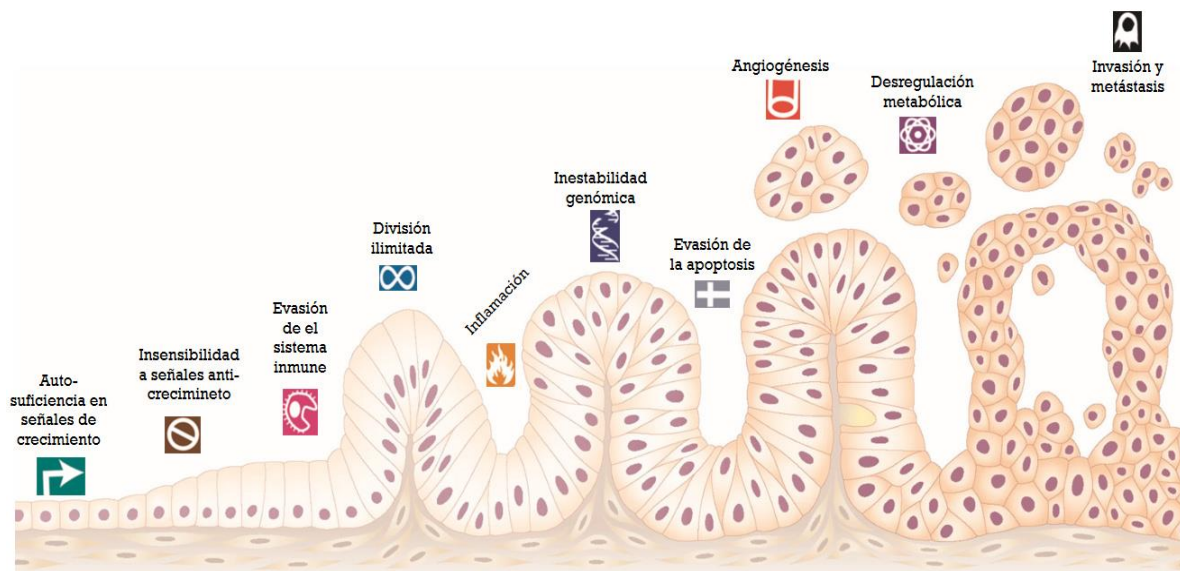


Figura 1. Características distintivas del cáncer. Progresión del cáncer (modificada de Hanahan y Weinberg, 2011).

Epidemiología del cáncer a nivel mundial

En la actualidad las enfermedades no transmisibles (ENT) son responsables de la mayoría de las muertes en todo el mundo y se estima que el cáncer se posicionara como la principal causa de muerte por estas enfermedades en el siglo XXI. Esto nos conduce a una investigación realizada por la Organización Mundial de Salud (OMS) en el 2015 en donde reportan que el cáncer fue la primera y segunda causa de muerte antes de los 70 años en 91 de 172 países (“WHO | Global Health Observatory (GHO) data,” 2018).

El cáncer constituye un enorme problema social y económico en países desarrollados y en vías de desarrollo; para muchos tipos de cáncer la tasa de incidencia es dos o tres veces mayor en países desarrollados en comparación con economías emergentes, sin embargo, la diferencia en mortalidad entre estas dos regiones es mucho más pequeña debido a una mayor fatalidad en los casos de cáncer de los países menos desarrollados. Los tipos de cáncer con una mayor incidencia y mortalidad en estas regiones son: mama en primer lugar, seguido de pulmón, próstata, colorrectal y estómago (Bray et al., 2018) (Figura 2a).

Estudios liderados por científicos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estimaron que en 2018 se presentaron 18.4 millones nuevos casos y 9.6 millones de muertes por cáncer en todo el mundo. De los diez principales tipos de cáncer en ambos sexos, el cáncer de pulmón es el más diagnosticado (11.6%) seguido por el cáncer de mama en mujeres (11.4%), colorrectal (10.2%), próstata (7.1%) y estómago (8.2%). Por otro lado, los principales tipos de cáncer que causan un mayor número muertes son: pulmón (18.4%), colorrectal (9.2%), estómago (8.2%) e hígado (8.2%) (Bray et al., 2018) (Figura 2b).

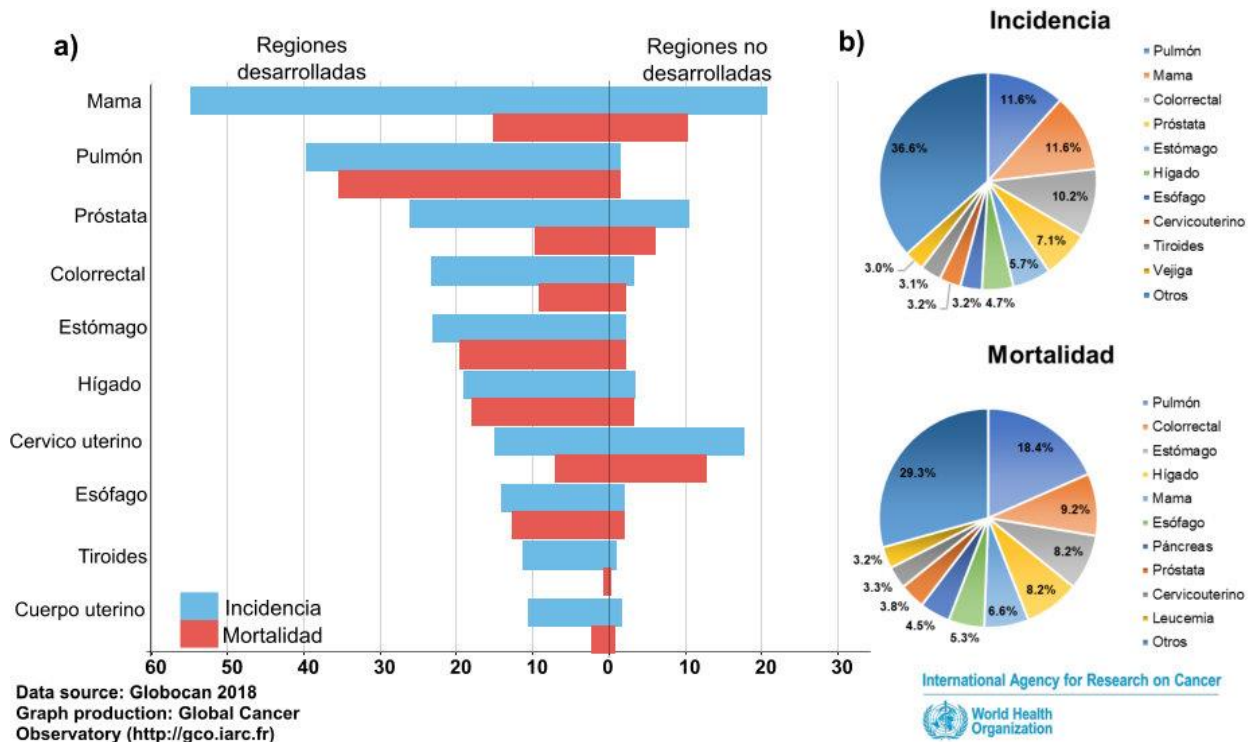


Figura 2. a) Gráfica de barras de incidencia y mortalidad de los diez tipos cáncer más comunes en países desarrollados y en vías de desarrollo de todo el mundo. b) Gráficas circulares representan la proporción del número total de casos y muertes de los principales tipos de cáncer en el mundo.

Epidemiología de cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar en incidencia en el todo el mundo (Figura 2b). Se estima que en 2018 se diagnosticaron más de 1.8 millones de nuevos casos de cáncer colorrectal, lo que representa el 10% en hombres con 746,000 y en mujeres un 9.2% lo que equivale a 614,000 del total de casos. El cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte por cáncer (Figura 2b) y se calcula que es responsable de casi 881,000 muertes en ambos sexos lo que equivale al 8.5% del total (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2015). El pronóstico que se tiene de esta enfermedad es alarmante, pues se prevé que en los próximos 15 años aumente el número de casos en un 60% que equivale a 2.2 millones de nuevos casos y 1.1 millones de defunciones por este tipo de cáncer a nivel mundial (Arnold et al., 2017).

Epidemiología de Cáncer colorrectal en México

Desde finales del siglo XX el cáncer ha representado un problema de salud pública, siendo una de las diez principales causas de muerte por enfermedad en México (Kuri-Morales, 2011). En la actualidad en cáncer es la tercera causa de mortalidad en el país, con el 12.9% de todos los casos. De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el año 2015 fallecieron un total de 655,688 personas por enfermedad y las tres principales causas fueron: complicaciones de diabetes mellitus (98,521), complicaciones de enfermedades isquémicas del corazón (88,144) y cáncer (85,201) (“Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI,” 2015). Los principales tipos de cáncer fueron mama, útero, hígado, estómago, pulmón, y colorrectal en mujeres, mientras que en la población masculina: cáncer de próstata, pulmón, estómago, hígado y colorrectal fueron los más frecuentes (Aldaco-Sarvide et al., 2018) (Figura 3).

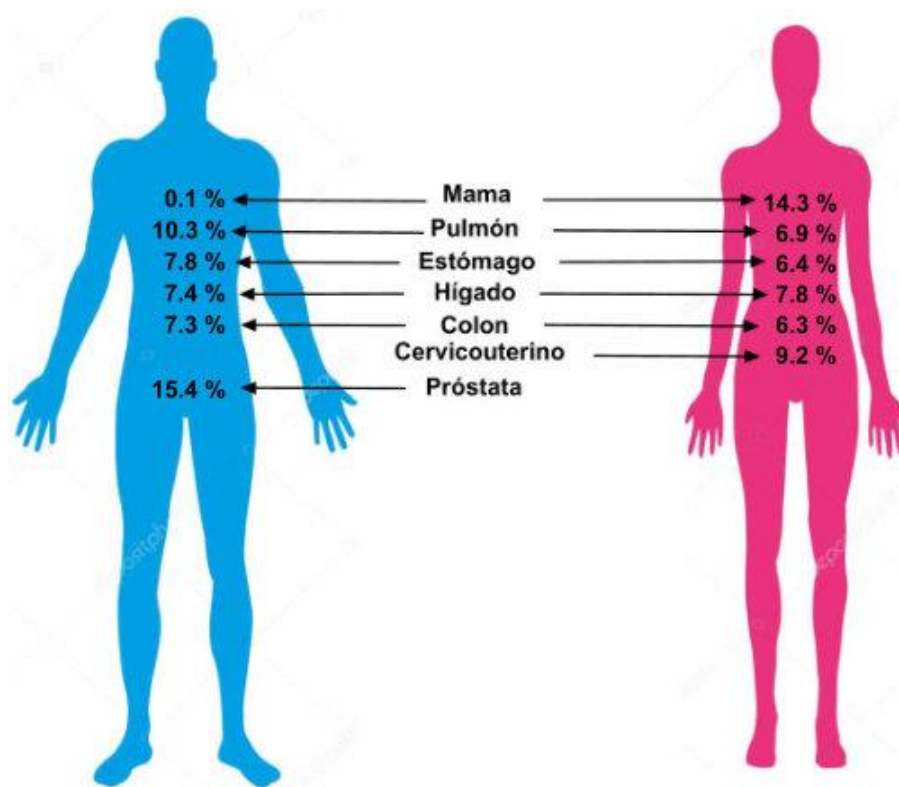


Figura 3. Principales tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres mayores de 20 años en México. Tomado y modificado de INEGI 2015.

En México, se carece de información sobre la tasa de incidencia del CCR ya que no existen registros poblacionales frecuentes que permitan el cálculo de este, sin embargo, se tiene el número de casos nuevos notificados por los patólogos y médicos oncólogos incorporados al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM). Debido a la alta letalidad que presenta esta neoplasia maligna, la mortalidad constituye un indicador de gran utilidad para el diseño y desarrollo de programas preventivos y de control de dicha patología (Sánchez et al., 2008).

La tasa mortalidad de cáncer colorrectal en México mantiene un incremento sostenido a lo largo de los últimos 15 años, pasando de 2,600 muertes en el año 2000 a 5,856 en el año 2015, lo cual indica que se está presentado una etapa de incremento discreto en la tasa de mortalidad y, quizás, una pequeña fase de meseta causada por la edad de la población, para luego entrar en un periodo de crecimiento acelerado en el número muertes por este tipo de enfermedad. Los estados donde se suscitan más muertes por este tipo de cáncer son: Chiapas (8.9%), Chihuahua (7.1%), Ciudad de México (7.1%), Sonora (6.6%) y Baja California (6.4%) (Aldaco-Sarvide et al., 2018)

Factores de riesgo de cáncer colorrectal

Se sabe que el riesgo de padecer cáncer colorrectal aumenta con la edad; más del 90% de los casos se diagnostican en personas mayores de 50 años. El riesgo también aumenta debido a mutaciones genéticas, que se asocian, por un lado, al desarrollo de múltiples tipos de pólipos como: poliposis hamartomatosa (STK11 en el síndrome de Puetz-Jeghers, SMAD4 y BMPR1A en poliposis juvenil, PTEN en el síndrome de Cowden), poliposis adenomatosa (gen APC y MYH en herencia recesiva). Por otro lado, el síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC), es causado por variantes en los genes de reparación MSH2, MLH1, MSH6 y PMS2 que ocasiona un mal apareamiento con DNA ("mismatch repair genes", MMR) lo que conlleva a la acumulación de mutaciones (Lynch, 2017).

Existen varios factores asociados al riesgo de padecer cáncer colorrectal que pueden prevenirse, entre ellos se encuentran: obesidad, inactividad física, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol, una dieta alta en carnes rojas o procesadas así como la poca ingesta de frutas y verduras (Torre et al., 2015). En la actualidad existen diversos estudios en donde se advierte que hombres y mujeres con sobrepeso tienen más probabilidades de desarrollar y morir de cáncer colorrectal que aquellas personas con un peso saludable (Bardou, Barkun, y Martel, 2013). Algunos estudios sugieren que el uso regular de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos como la aspirina u hormonas como el estrógeno y la progestina pueden reducir el riesgo de padecer cáncer colorrectal; sin embargo, estos medicamentos actualmente no se recomiendan para la prevención del cáncer colorrectal porque pueden tener efectos adversos para la salud (*American Cancer Society*, 2018). Por último, también se ha documentado que la colitis crónica y su duración se asocia a un mayor riesgo de contraer esta enfermedad (Jess et al., 2012).

Clasificación del cáncer colorrectal

Clasificación histológica de cáncer de colon

De acuerdo a la OMS, el cáncer de colorrectal puede clasificarse histológicamente en: a) adenocarcinoma, que es el más frecuente y se caracteriza por la invasión mucosa muscular hacia la submucosa y se clasifica de acuerdo al grado de diferenciación en tumores, moderados o poco diferenciados; b) adenocarcinoma mucinoso que se compone > 50% de mucina, c) carcinoma de células en anillo que posee una vacuola de mucina que llena el citoplasma y desplaza al núcleo; d) carcinoma de células pequeñas, es muy inusual ya que tiene características de carcinoma escamoso y adenocarcinoma; e) carcinoma medular, el cual es raro y se caracteriza por láminas malignas, núcleo vesicular y nucléolos prominentes; f) carcinoma indiferenciado, que carece de evidencia morfológica de diferenciación y g) carcinoma neuroendocrino (Hamilton y Aaltonen, 2000) .

De 1929 a 1935 se usó una clasificación propuesta por Dukes para el cáncer colorrectal la cual tiene en cuenta dos características histopatológicas: la profundidad de la penetración en la pared y la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales; hay que mencionar que esta clasificación sentó las bases para los sistemas posteriores. En la actualidad la clasificación más usada es la del American Joint Committee on Cancer (AJCC) llamada también TNM la cual comprende tres categorías como: La extensión (tamaño) del tumor en la pared del colon y recto (T), la afectación de los ganglios (nódulos) linfáticos adyacentes (N) y la propagación (metástasis) a sitios distantes (M) (Amin et al., 2017).

Transición adenoma-carcinoma y CCR hereditario

Alrededor del 70-80% de los CCR son esporádicos, es decir, no presentan antecedentes familiares ni predisposición genética por lo cual se desarrollan lentamente durante varios años en una transición adenoma-carcinoma la cual es promovida por la activación de KRAS y la inactivación de TP53 por mutaciones, se caracteriza por la inestabilidad cromosómica (CIN, *chromosomal instability*) con cambios importantes en el número y la estructura de los cromosomas como son: deleciones, inserciones, translocaciones y otros reordenamientos cromosómicos (Müller et al., 2016).

Las formas hereditarias representan del 20-30% son de todos los CCR y se caracterizan por la inactivación de genes supresores de tumores y/o mecanismos de reparación. Las formas más comunes de cáncer hereditario son la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP) o síndrome de Lynch (Brenner et al., 2014; Müller et al., 2016).

La PAF es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones en el gen APC, esto promueve que los portadores desarrollen múltiples pólipos adenomatosos generalmente más de 100 distribuidos a lo largo de todo el colon recto, se caracteriza por el desarrollo pólipos a una edad temprana (desde la pubertad en adelante). También existen manifestaciones fuera del colon causadas

por este síndrome como: adenomas gástricos, adenomas duodenales, adenomas suprarrenales, tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) e hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina (Rossi et al., 2017).

El síndrome de Lynch es el cáncer hereditario más frecuente y al igual que el PAF se hereda de forma autosómica dominante, se origina principalmente por mutaciones en los genes que participan en la reparación del DNA (mismatch repair genes) y los portadores de estas mutaciones poseen un riesgo elevado de desarrollar CCR, cáncer de endometrio, ovario, estomago e intestino delgado, este síndrome se caracteriza por presentar menos de diez pólipos y desarrollarse antes de los 45 años, histológicamente tiende a formar adenomas vellosos con alto grado de displasia (Rossi et al., 2017).

Clasificación molecular del cáncer colorrectal

La integración de una extensa gama de datos moleculares ha generado dos sistemas de clasificación de los tipos de cáncer colorrectal. La primera clasificación tumoral es de The Cancer Genome Atlas (TCGA), corresponde a tumores con una alta tasa mutacional que puede subdividirse en: CCR ultra mutados (3%) con mutaciones en el dominio de corrección de la DNA polimerasa épsilon (POLE), CCR hipermutados (13%) con inestabilidad en microsatélites y CCR con una baja tasa de mutación (84%) pero con una alta frecuencia de alteraciones en el número de copias somáticas de DNA (SCNA) (Figura 4a) (Cancer Genome Atlas Network, 2012). La segunda clasificación, llamada también: consenso de subtipos moleculares (CMS) describe cuatro grupos: CMS1 (activación del sistema inmune por MSI, 14%), CMS2 (canónica, 37%), CMS3 (metabólica, 14%), CMS4 (mesenquimal, 23%) y un grupo residual no clasificado (con características mixtas, 13%) (Guinney et al., 2015) (Figura 4b).

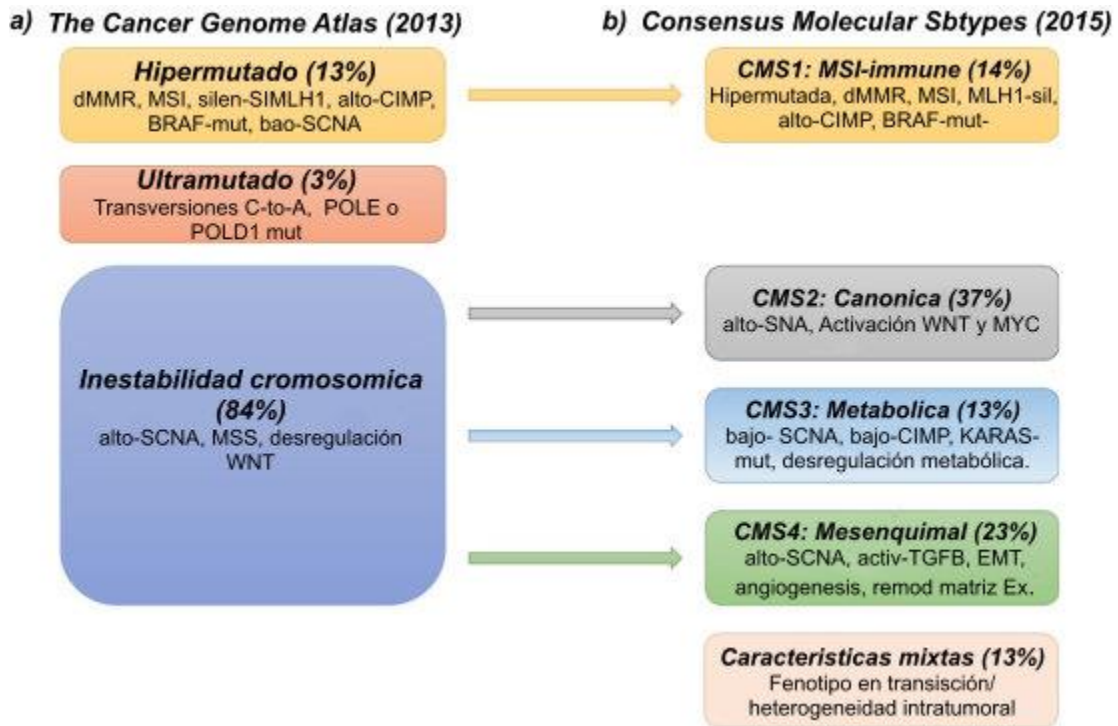


Figura 4. Clasificación de las características moleculares del cáncer colorrectal. Tomada y modificada de Müller et al., 2016.

Metabolismo del cáncer

Las células normales diferenciadas emplean la fosforilación oxidativa para generar energía y biomasa necesarias para los procesos celulares; sin embargo, a diferencia de los tejidos normales, la mayoría de las células cancerígenas presentan un fenotipo glucolítico que les proporciona amplias ventajas como: una mayor biosíntesis de macromoléculas, anti-apoptosis y participar en la señalización paracrina y autocrina basada en metabolitos locales (Hsu y Sabatini, 2008).

Dada la amplitud que existe en las características de la reprogramación metabólica que inducen la tumorigenesis, impulsada principalmente por mutaciones oncogénicas que permiten a la célula acceder a fuentes convencionales y no convencionales de nutrientes para la creación de biomasa y mantener la

proliferación, Pavlova y Thompson en 2016 organizaron los cambios metabólicos asociados al cáncer conocidos hasta el momento, en seis sellos distintivos: 1) Captación desregulada de glucosa y aminoácidos, 2) modos oportunistas para adquirir nutrientes (macropinocitosis, entosis y fagocitosis), 3) uso de intermediarios del ciclo glucolisis/ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para biosíntesis y producción de NADPH, 4) mayor demanda de Nitrógeno, 5) alteración en la regulación de genes impulsada por metabolitos, 6) interacciones metabólicas con el microambiente (Figura 5).

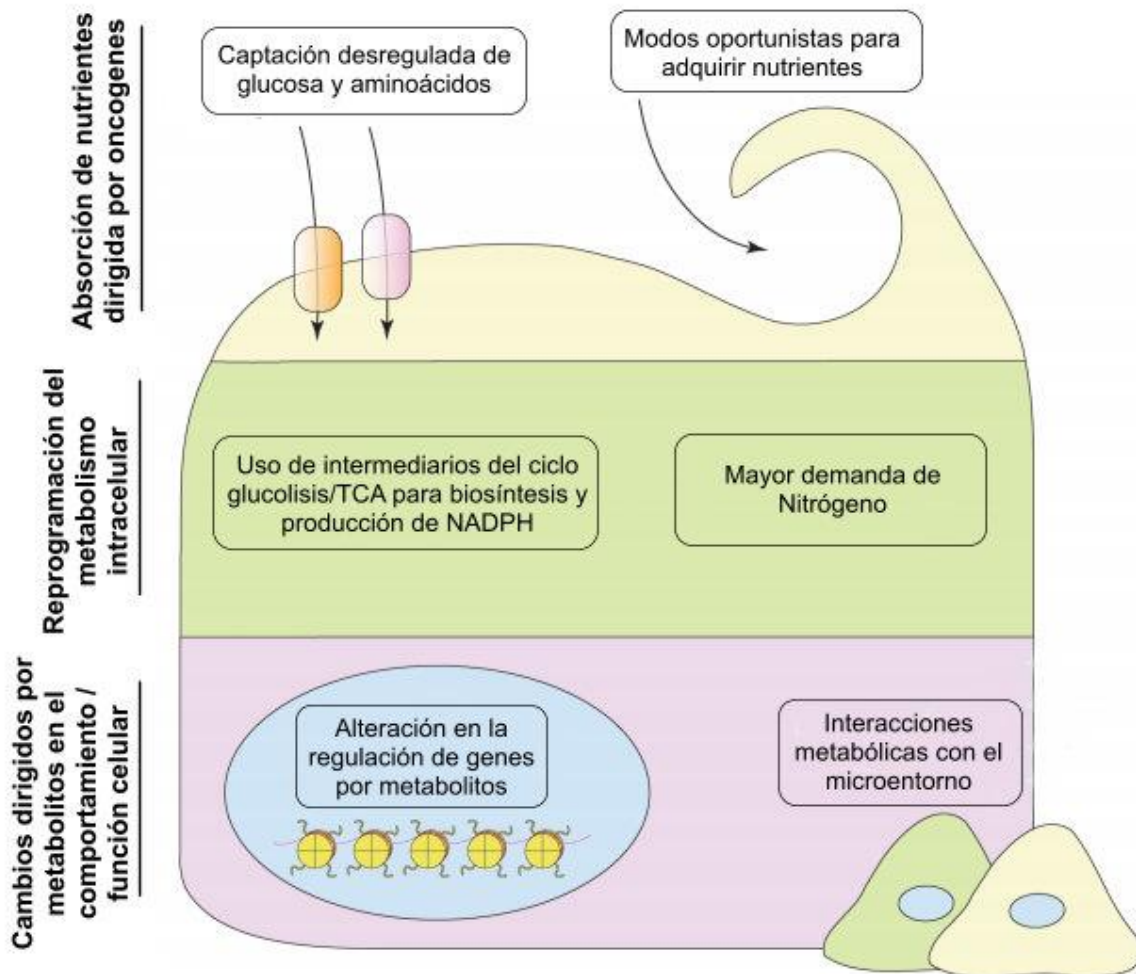


Figura 5. Sellos del metabolismo del cáncer. Se observan tres niveles de interacción célula-metabolito como consecuencia de la reprogramación metabólica en cáncer, tomada y modificada de Pavlova et al., 2016.

En las células la toma de nutrientes y metabolismo están regulados por sistemas de control que previenen la proliferación anormal. Sin embargo, las células tumorales sobrepasan estas restricciones metabólicas cuando adquieren mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores. Estas mutaciones se acumulan a lo largo de la vida del individuo provocando alteraciones en vías de señalización que regulan el crecimiento y proliferación celular (DeBerardinis et al., 2008; Hsu y Sabatini, 2008). Muchas de estas alteraciones genéticas sobreexpresan enzimas que participan en el metabolismo (Sreedhar y Zhao, 2018). Dichas enzimas están involucradas en la glucólisis (Christofk et al., 2008; Fantin et al., 2006; Telang et al., 2006), biosíntesis de ácidos grasos (Bauer et al., 2005), ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y glutaminólisis (Gao et al., 2009; Wise et al., 2008) (Figura 6).

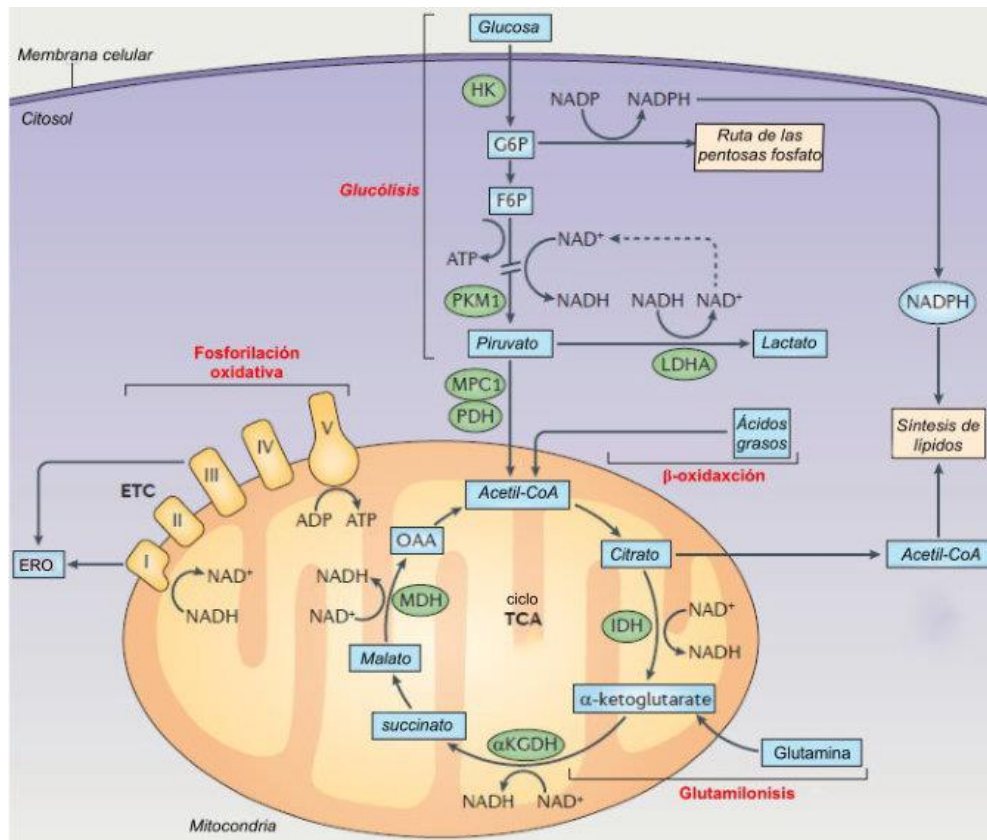


Figura 6. Principales rutas metabólicas. Glucólisis, ruta de las pentosas fosfato, síntesis de lípidos β-oxidación, fosforilación oxidativa y glutaminólisis. Tomada y modificada de Pearce y Everts, 2015. Espacio intermembrana ETC, Isocitrato deshidrogenasa, Malato deshidrogenasa MDH, α-cetoglutarato deshidrogenasa αKGDH, Piruvato cinasa PKM1, lactato deshidrogenasa LDHA, especies reactivas de oxígeno ERO.

Glutaminólisis y el papel de la Glutamato Piruvato Transaminasa tipo 2 (GPT2)

Aunque la glutamina es un aminoácido no esencial, es un complemento necesario para las células cancerosas, ya que los productos metabólicos derivados de ella son utilizados para producir ATP, amoniaco, glutatión, alanina, aspartato, serina, glicina y la principal fuente de α -KG, un intermediario del TCA y sustrato para dioxigenasas que modifican proteínas y DNA. Estas dioxigenasas incluyen prolil hidroxilasas, desmetilasas de histona e hidroxilasas 5-metilcitosina (Hensley, Wasti, y DeBerardinis, 2013).

El catabolismo de la glutamina comienza con reacciones de desaminación que son catalizadas por glutaminasas (GLS) y como producto al glutamato, posteriormente el glutamato se convierte en α -KG e ingresa al TCA. Existen tres grupos de enzimas que pueden convertir el glutamato en α -KG: la glutamato piruvato transaminasas (GPTs); oxalacetato glutamato transaminasas (GOTs); y glutamato deshidrogenasas (GLUDs) (Hensley et al., 2013) (Figura 7).

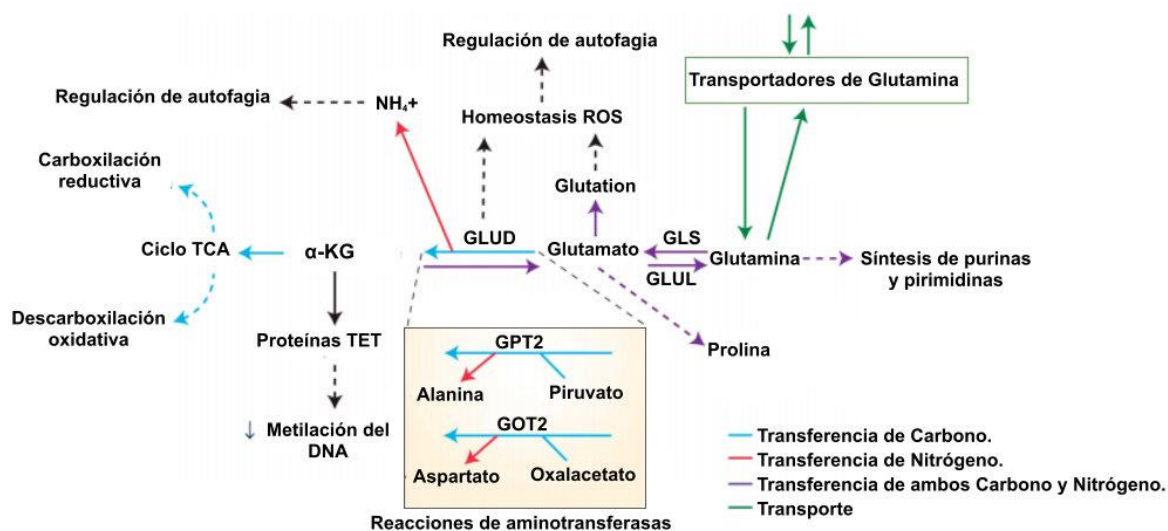


Figura 7. Metabolismo de la Glutamina. El catabolismo de la glutamina se usa para la formación de ATP en el TCA, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y glutatión. Tomada y modificada de Still y Yuneva, 2017. Glutamato deshidrogenasa GLUD, glutamato oxalacetato transaminasa 2 GOT2, glutaminasa GLS, glutamato amonio ligasa GLUL, α -cetoglutarato α -KG, especies reactivas de oxígeno ROS.

Muchos oncogenes y genes supresores de tumores afectan el metabolismo de la glutamina. Por ejemplo, la sobreexpresión del oncogén *c-Myc* afecta los niveles de glutamina en las células tumorales al inducir la transcripción de las GLS y el transportador de glutamina SLC1A5 (ASCT2) (Gao et al., 2009). Recientemente se ha demostrado que mutaciones en PIK3CA (p110 α) que reprograman el metabolismo de la glutamina sobreexpresando a GPT2 a través del eje de señalización PDK1-RSK2-ATF4 en células de cáncer colorrectal (CCR), haciéndolas más dependientes a la glutamina (Hao et al., 2016).

La anaplerosis del TCA dirigida por la glutamina requiere la transferencia del nitrógeno del glutamato a una molécula aceptor para formar α -KG. Se sabe que la GPT2 transfiere el nitrógeno del glutamato al piruvato (un producto final glucolítico) como un medio para impulsar la formación alanina y de α -KG, facilitando así la entrada de carbono procedente de la glutamina en el TCA (Smith et al., 2016).

miRNAs en metabolismo

Los miRNAs maduros son moléculas pequeñas de RNA endógeno de 20-24 nucleótidos de longitud con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3', no codifican para proteínas y actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica (Bartel, 2009).

Los miRNAs están localizados dentro de intrones que codifican para proteínas, así como en regiones intergénicas o exónicas y secuencias repetitivas del DNA (Rodríguez et al., 2004; Smalheiser y Torvik, 2005). La biogénesis de los miRNAs inicia con la transcripción en regiones codificantes y no codificantes del genoma, lo que genera miRNAs primarios (pri-miRNAs). Los pri-miRNAs son cortados por la enzima Drosha (una RNasa tipo III) y la proteína cofactor DGCR8, creando una molécula precursora en forma de asa y tallo de 60~70 nucleótidos llamada pre-miRNA. Los pre-miRNAs son transportados al citoplasma por el factor nuclear exportina-5 dependiente de Ran-GTP (Okada et al., 2009). Una vez en el citoplasma la RNasa tipo III Dicer, los corta para producir miRNAs maduros de 20-24

nucleótidos de longitud. Los miRNAs maduros se incorporan al complejo ribonucleoproteico conocido como (RISC), conformado por la proteína Argonata 2, TRBP y Dicer (Bartel, 2009) (Figura 8).

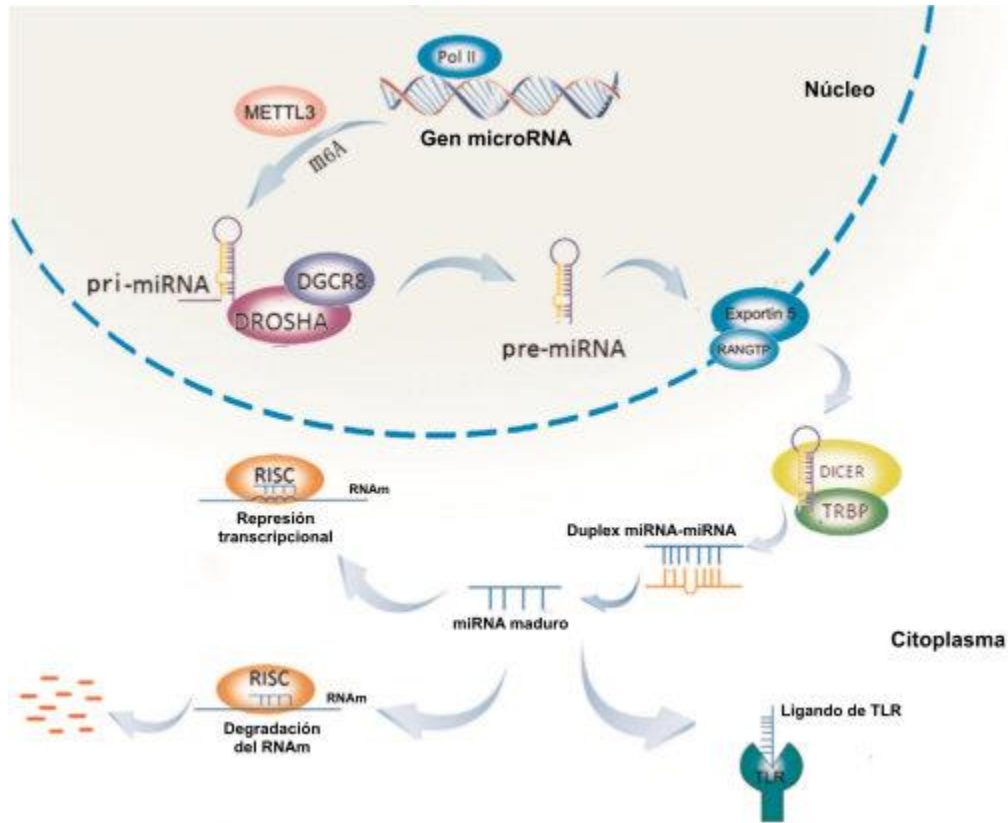


Figura 8. Biogénesis de miRNAs. Proceso de transcripción, maduración y mecanismo de acción de los miRNAs, tomada de (Peng y Croce, 2016). Metiltransferasa MTTL3.

Los miRNAs están involucrados en la proliferación celular, señalización, crecimiento muerte celular (Bartel, 2004; Krützfeldt y Stoffel, 2006), diferenciación celular, apoptosis (Redova et al., 2011) y metabolismo celular (Gao et al., 2009). Se descubrió que tienen un papel clave como reguladores postranscripcionales de la expresión génica y su desregulación, puede causar la expresión anormal de genes que están asociados a enfermedades humanas como el cáncer. Ejemplo de esto es miR-138, este miRNA, que regula el metabolismo en células de cáncer de mama

reduciendo la expresión de genes que participan en el TCA y el consumo de oxígeno, así como un incremento en la producción de lactato a través de la vía transcripcional PGC-1 β /ERR γ . Diversos estudios han demostrado que los miRNAs controlan aspectos del metabolismo energético como: la producción y señalización de la insulina, el transporte y el metabolismo de la glucosa, la homeostasis del colesterol, lípidos y biogénesis de aminoácidos (Chen et al., 2012; Rottiers y Näär, 2012). Los miRNAs regulan estos procesos celulares directamente; dirigiéndose a las moléculas clave de las rutas metabólicas (transportadores, enzimas y cinasas) o indirectamente mediante la modulación de la expresión de importantes factores de transcripción (Hatziapostolou et al., 2013).

miR-124

Este microRNA está altamente conservado y enriquecido en el cerebro, está involucrado en procesos como la gastrulación y el desarrollo neuronal. Además, desempeña un papel clave como supresor tumoral, sin embargo, se ha visto que esta actividad se reduce significativamente en varios tejidos cancerosos (Ryul Lee et al., 2010; F. Zheng et al., 2012).

La secuencia madura de miR-124 se procesa a partir de tres regiones separadas, que se encuentran en los cromosomas 8p23.1 (miR-124-1), 8q12.3 (miR-124-2) y 20q13.33 (miR-124-3) (Figura 9), todas contienen islas CpG en su región promotora (Wilting et al., 2010). Se ha reportado que la hipermetilación de miR-124 en varios tipos de cáncer como: colon, mama, pulmón, leucemia y linfoma parece jugar un papel importante en el desarrollo de tumores (Lujambio et al., 2007). Además, se ha descrito que miR-124 participa en varios procesos malignos como: la proliferación tumoral, la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la angiogénesis (W. Zhang et al., 2015).

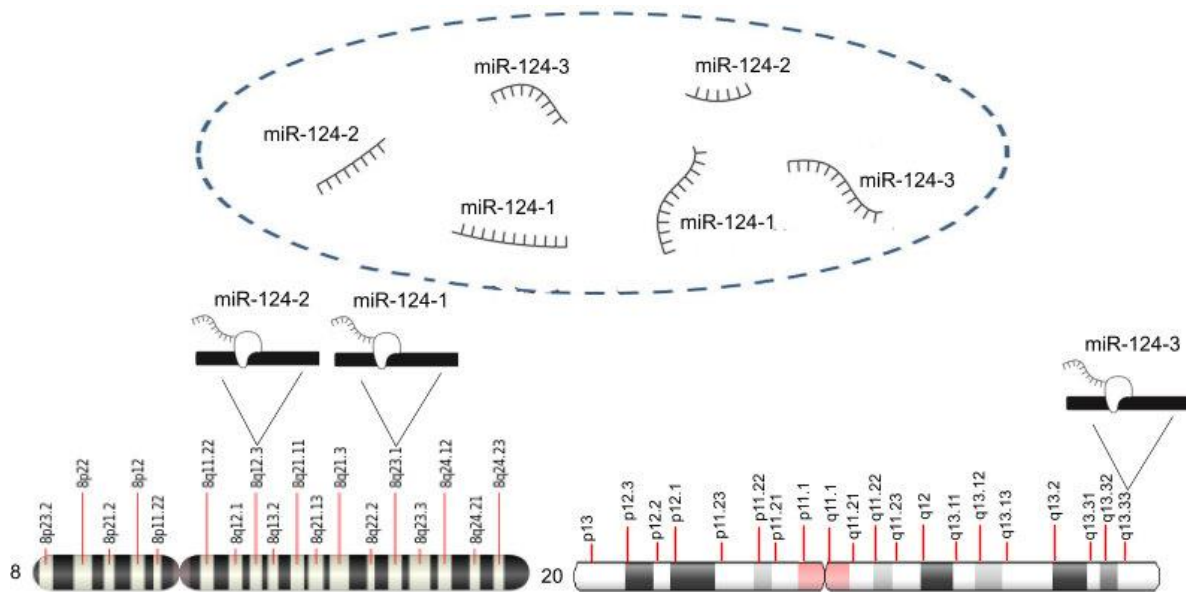


Figura 9. Transcripción de la familia de miR-124. La familia de miR-124 se procesa a partir de tres secuencias separadas, dos en cromosoma 8 y una el cromosoma 20.

miR-124 es ejemplo de un RNA que controla la expresión de genes a múltiples niveles (Figura 10), puede regular cientos y posiblemente miles de genes diana distintos (Chi et al., 2009; Makeyev y Maniatis, 2008). Algunos ejemplos importantes incluyen genes que codifican la subunidad SCP1 un componente del complejo represor transcripcional REST, factores de transcripción como Sox9 y proteínas de unión a elementos de respuesta de cAMP, el ligando de Notch Jagged1, la subunidad BAF53a un componente de remodelación de cromatina (Yoo et al., 2009). Existe evidencia que indica que miR-124 se une al RNAm de Ptbp1, un regulador global del splicing (proteína de unión a RNA), otros estudios demuestran que miR-124 regula múltiples vías moleculares que son críticas para una adecuada progresión en la diferenciación neuronal (Makeyev et al., 2007), además, reprime la expresión de un factor epigenético crítico llamado lisina metiltransferasa EZH2 que es responsable de la trimetilación de la lisina 27 en la histona tres H3K27 (Neo et al., 2014).

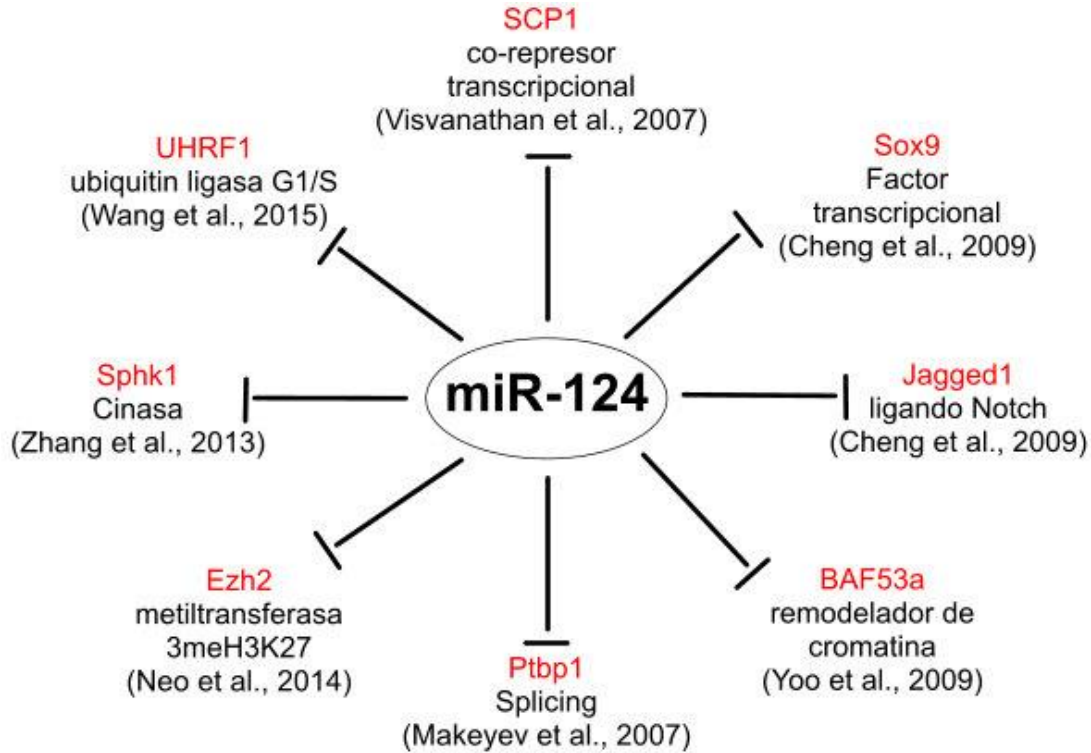


Figura 10. miR-124 regula la expresión de genes en múltiples niveles.

Justificación

Se conoce el papel crítico de GPT2 en el metabolismo de la glutamina para formar intermediarios metabólicos en el TCA, además, participa en el crecimiento y proliferación tumoral de células de CCR, también se ha reportado en células tumorales mama, cáncer de páncreas y ovario (Coloff et al., 2016; Itkonen et al., 2016).

Por otro lado, hay evidencia que afirma que la regulación a la baja de miR-124 está involucrada en el desarrollo de varias neoplasias humanas como: cáncer de pulmón, próstata, ovario y colorrectal (Xi et al., 2015; Y. Zhang, Li, Han, y Zhang, 2015) y, su restauración o sobreexpresión indica que este microRNA puede actuar como un supresor de tumores en cáncer de mama, cervical, carcinoma nasofaríngeo, vejiga, y carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2016).

Estas observaciones revelan que la sobreexpresión de GPT2 y la disminución de miR-124 de alguna manera son importantes para el crecimiento y proliferación del CCR. Sin embargo, la interacción y posible regulación de miR-124 sobre GPT2 aún se desconoce, por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que GPT2 sea blanco miR-124 y más adelante pueda usarse como un potencial blanco en la terapia contra el CCR.

HIPÓTESIS

miR-124 regula negativamente la expresión de GPT2 en células de cáncer colorrectal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la regulación e interacción de miR-124 con el mensajero de *GPT2* en células de cáncer colorrectal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la expresión de *GPT2* en líneas celulares de cáncer colorrectal
- Analizar la expresión miR-124 en líneas celulares de cáncer colorrectal
- Determinar el efecto de miR-124 en los niveles de expresión de GPT2
- Determinar la interacción de miR-124/ GPT2

MÉTODOS

Análisis in silico de la 3' UTR de GPT2 y miR-124

Para predecir las interacciones de los microRNAs que se unen a la región 3'UTR se empleó la plataforma de código abierto StarBase (Li et al., 2014) que es alimentada por siete bases de datos PicTar, RNA 22, PITA, miRmap, microT miRanda y TargetScan, posteriormente, para ver el sitio de interacción de miR-124 con la región 3'UTR de GPT2 se usó el programa bioinformático Targetscan. Para obtener estructura secundaria que forma el mensajero de GPT2 se utilizó el servidor web Mfold (Zuker, 2003).

Diseño de primers GPT2 y miR-124

Las secuencia de nucleótidos de GPT2 se adquirió de la base de datos RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84706>) y la secuencia de miR-124 fue obtenida de miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006). Para el diseño de primers de GPT2 se usó el software Primer3 (v.0.4.0) siguiendo las recomendaciones de Chuang, Cheng, y Yang,(2013): longitud 17-28 b, contenido de G y C 40-60%, TM 55-65°C, menos de 3 Cs o Gs en la región 3' y evitar que los primers formen secuencias autocomplementarias. Se diseñaron primers para detectar microRNAs usando una herramienta llamada *miRNA Design Tool*, siguiendo las recomendaciones de Busk, 2014; Varkonyi-Gasic et al., 2007. Posteriormente se utilizó la base de datos BLAST (un algoritmo de alineamiento) para examinar los objetivos potenciales de los primers y descartar una posible situación de amplificaciones inespecíficas, todos los primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT). Las secuencias finales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Listado de primers diseñados en Primer3 y miRNA Primer Desing Tool.

Nombre	Secuencias 5'--3'	Tm	CG%	Bases
GPT2 F	TACATGGGCGAGTGTGGTTA	59.69	50	20
GPT2 R	TTCCGTCAGCTTTGCTTTTT	60.00	40	20
GAPDH F	TCACGCCACAGTTTCCCGGAG	62.00	61	21
GAPDH R	CCTCAAGATCATCAGCAATGCCT	57.04	47.8	23
3'UTR F	AGGATGACTATCCTCCCTCC	56.99	55	20
3'UTR R	TGATCTGCATCTGTTCCCTCC	57.00	50	20
MiR-124	CGCAGTAAGGCACGCGGTGAA	63.00	62	21
RT- 124	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACGGCATT	80.00	56	50
U6	GCTCTCGCTTCGGCAGCACAT	64.00	62	21
RT- U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACAAAATATGG	80.00	51	53
Universal	GTGCAGGGTCCGAGGT	56.00	69	16

Extracción de RNA

Se extrajo RNA total de líneas celulares de cáncer colorrectal HCT 116, SW480, SW620 y la línea no tumoral CRL-1790 mediante el método de TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, se cuantificó mediante un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek). Para comprobar la integridad del RNA se usó un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

RT-PCR y PCR punto final

Se sintetizó cDNA a partir de 2 µg de RNA total con el kit High-Capacity Reverse Transcription de la casa comercial Applied Biosystems siguiendo las instrucciones del fabricante y con las condiciones mostradas en la figura 11.

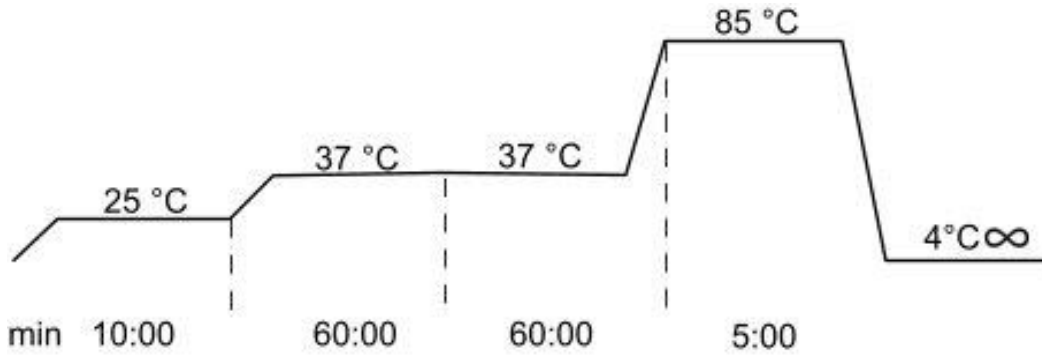


Figura 11. Condiciones de PCR para sintetizar cDNA de líneas celulares de cáncer colorrectal.

Se estandarizaron las condiciones de amplificación de los primers de GPT2 y GAPDH por medio de PCR punto final utilizando el kit GoTaq DNA Polymerase (Promega), la amplificación se llevó a cabo en un termociclador Axygen (Maxygen Gradient Termal Cyler) siguiendo las condiciones que se presentan en la figura 12.

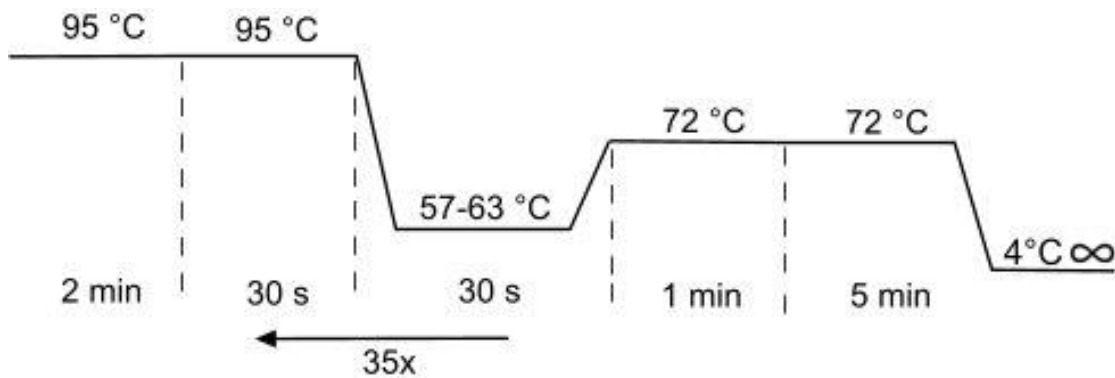


Figura 12. Condiciones de PCR para estandarizar la temperatura de alineamiento de los primers GPT2 y GAPDH.

Para conocer el nivel de expresión de GPT2 y GAPDH se usó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR), en donde se utilizaron primers (10 μ M), cDNA (100 μ g/ μ L) y SYBR Green Takara Bio (1x), las condiciones de amplificación se muestran en la figura 13. Para normalizar los datos se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Applied Biosystem).

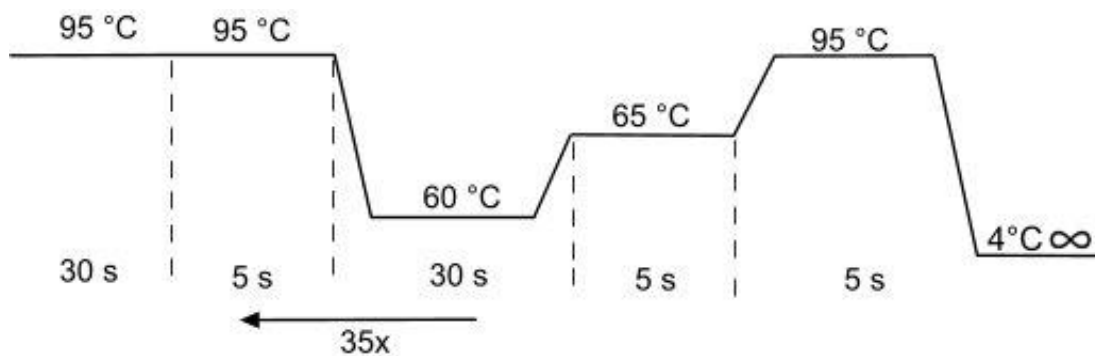


Figura 13. Condiciones de qPCR para medir la expresión relativa de GPT2 y GAPDH.

Se sintetizó el cDNA de miR-124 usando el kit High-Capacity Reverse Transcription de la casa comercial Applied Biosystems utilizando Buffer RT(1x), dNTPs (100 mM), RNA (2 µg), Enzima MultiScribe (1U), se sustituyeron los Random Primers por primers Stem-loops RT específicos para miR-124 y U6 (10 µM). Los primers Stem-loops RT tienen la característica de unirse a la región 3' del miRNA para que inicie transcripción inversa (Wu et al., 2007). Las condiciones de amplificación se muestran en la figura 14.

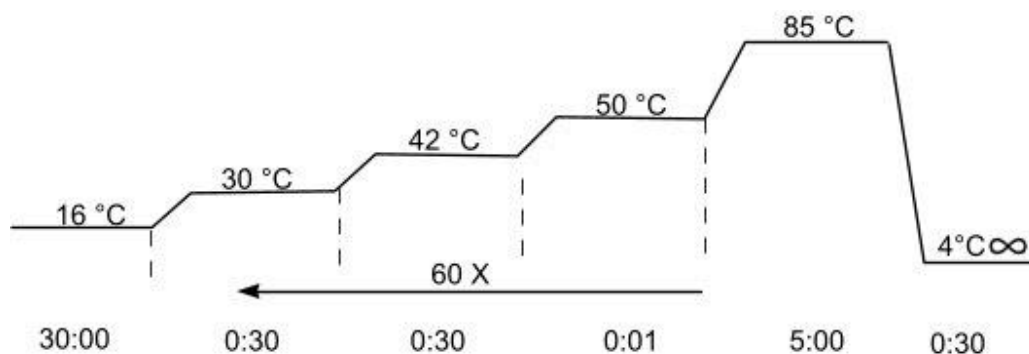


Figura 14. Condiciones RT para sintetizar cDNA de miR-124 y U6.

Del cDNA obtenido se utilizaron 200 ng/µL para hacer una qPCR empleando el kit Master Mix Takara Bio SYBR (1x) y primers Forward (10 µM) específicos para de miR-124 y U6 además de un reverso universal (10 µM), siguiendo las recomendaciones de Wu et al., 2007, y unas pequeñas modificaciones a los tiempos de desnaturalización y alineamiento para optimizar la reacción, los datos fueron normalizados con la expresión U6 y todo se hizo por triplicado en un termociclador Bio-RAD modelo CFX96 con las condiciones mostradas en la figura 15.

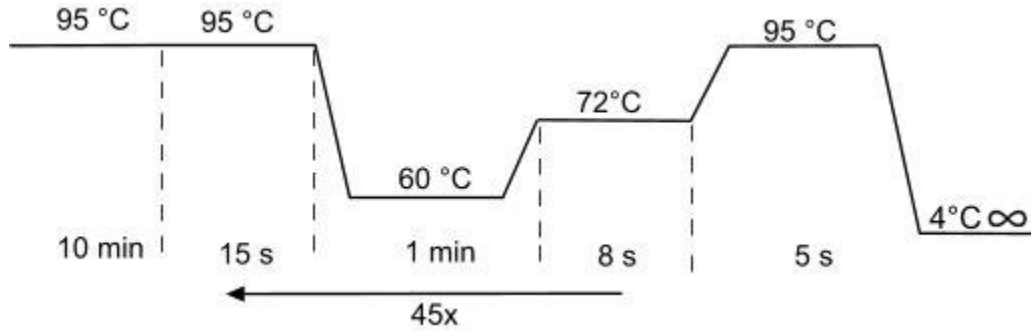


Figura 15. Condiciones de qPCR para la detección de miR-124 y U6 en líneas celulares de cáncer colorrectal.

Construcciones para sobreexpresar miR-124 y validar la interacción miR-124/GPT2

Todas las construcciones se llevaron a cabo siguiendo las metodologías recomendadas por Ausubel et al., 2003. Las secuencias de PremiR-124 fueron sintetizadas por IDT con los sitios de restricción marcados en rojo en la tabla 3 para las enzimas Bam H1 y HindIII (Thermo Fisher Scientific) como se muestra en la tabla 3, estas secuencias fueron ligadas en el vector pSilencer 2.1- U6- Neo de la casa comercial Thermo Fisher Scientific utilizando pSilencer (50 ng), inserto (100 ng), Buffer T4 (10x), ligasa T4 (1 U) y agua Milli-Q necesaria para 20 μ L.

Tabla 2. Secuencias clonadas en pSilencer entre los sitios de restricción para las enzimas BamHI y HindIII.

Nombre	Secuencia
PremiR-124 F	GAT CCA GGC CTC TCT CTC CGT GTT CAC AGC GGA CCT TGA TTT AAA TGT CCA TAC AAT TAA GGC ACG CGG TGA ATG CCA AGA ATG GGG CTG A
PremiR-124 R	AGC TTC AGC CCC ATT CTT GGC ATT CAC CGC GTG CCT TAA TTG TAT GGA CAT TTA AAT CAA GGT CCG CTG TGA ACA CGG AGA GAG AGG CCT G

Las secuencias de los sitios de interacción miR-124/GPT2 y miR-124/GPT2 mutado (con desajuste de tres nucleótidos en la región semilla) entre sitios de restricción para las enzimas SpeI y HindII (Tabla 3 en rojo) se ligaron en el vector pMIR-REPORT (Ambion) usando los reactivos antes mencionados.

Todas las construcciones fueron transformadas en bacterias de *Escherichia coli* XL10-Gold ultra competentes, las colonias resultantes fueron seleccionadas por su marcador de resistencia a la Ampicilina (A9393 Sigma 200 mg/μL) en agar-LB. Las colonias seleccionadas se pusieron a crecer en 3 mL de medio LB-líquido durante 24 horas. Se extrajo el DNA de los plásmidos mediante lisis alcalina y se analizaron mediante ensayo de restricción con sus respectivas enzimas (Tabla 6 y 7). Para secuenciar se extrajo el DNA de los plásmidos con el kit Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) y se secuenció en un equipo ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems).

Tabla 3. Secuencias del sitio de unión de miR-124 con GPT2, normal y con tres desajustes en la región semilla.

Nombre	Secuencia
miR-24/ GPT2 F	CTAGTGACGTCTTTCTTTGTCCTTGA
miR-24/ GPT2 R	AGCTTCAAGGCACAAAGAAAGACGTCA
miR-24/ GPT2 mut F	CTAGTGACGTCTTTCTTTGCATCTTGA
miR-24/ GPT2 mut R	AGCTTCCCTTAACAAAGAAAGACGTCA

Tabla 4. Reactivos usados para la doble digestión del vector pSilencer.

Dig p-Silencer	Volumen
H2O	11 μL
Buffer Bam H1	2 μL
Vector 2 μg	4 μL
Bam H1	1 μL
Hind III	2 μL
Volumen final	20 μL

Tabla 5. Reactivos para una doble digestión en el vector pMiR-report.

Dig p-MiR-report	Volumen
H2O	13μL
Buffer tango H1	2 μL
Vector 2 μg	2 μL
Spel	1 μL
Hind III	2 μL
Volumen final	20 μL

Cultivo celular y transfección

Para los ensayos de transfección se usaron células SW620 de ATCC, que son derivadas de colon de un sitio metastásico de ganglio linfático y, fueron cultivadas en medio D-MEM/F-12 suplementado con 10% de SFB, bajo las condiciones de CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C. Estas células se sembraron en placas de seis pozos utilizando 500,000 células por pozo y después de 24 horas se transfectaron con el reactivo de Lipofectamine 3,000 reagent (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Ensayo reportero de luciferasa

Para el ensayo de luciferasa se usó el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Después de la transfección de 24 horas se lisaron las células con 500 µL buffer de lisis pasiva (1x) por pozo durante 15 minutos, se recuperó el lisado, se centrifugó durante 30 segundos a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante, posteriormente, para detectar la actividad de quimioluminiscencia se usaron microplacas de 96 pozos de fondo transparente y paredes negras (Promega) cargadas con 20 µL de muestra por pozo. Se usó el equipo Luminómetro GloMax® 20/20 para dispensar 50 µL de LARII y Stop and Glo (con sustrato) y medir la actividad de la luciferasa de luciérnaga y Renilla.

Métodos estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA de un solo factor y por el método de comparaciones múltiples Tukey, los datos fueron graficados con ayuda del software Prism 7 GraphPad.

RESULTADOS

Análisis in silico

Se obtuvieron todas las posibles interacciones de los miRNAs que se unen al RNAm de GTP2 y como se puede observar en la tabla 6, de todos candidatos miR-124 es el que aparece en cinco de siete bases de datos disponibles por los que lo convierte en un fuerte candidato para regular a GTP2.

Tabla 6. Lista de posibles microRNAs que interactúan con el RNAm de GTP2 validada con siete bases de datos.

Nombre	Gen	PITA	RNA22	miRmap	microT	miRanda	PicTar	TargetScan	# Cáncer
hsa-miR-30a-5p	GPT2	1	0	1	1	0	0	1	10
hsa-miR-204-5p	GPT2	1	0	1	0	1	0	1	5
hsa-miR-211-5p	GPT2	1	0	1	0	1	0	1	6
hsa-miR-124-3p	GPT2	1	0	1	1	1	0	1	4
hsa-miR-130a-3p	GPT2	1	0	1	0	1	0	1	7
hsa-miR-136-5p	GPT2	1	0	1	1	1	0	0	5
hsa-miR-301a-3p	GPT2	1	0	1	0	1	0	1	4
hsa-miR-506-3p	GPT2	1	0	1	1	1	0	0	5

De la base de datos TargetScan se extrajo la información de todos los miRNAs que interactúan con la región 3'UTR de GTP2, se detectó que miR-124-3p tiene dos posibles sitios de unión, uno en la posición 151-157 y otro en la posición 1,958-1,964, miR-204-5p / 211-5p en el lugar 1,555-1,562, miR-4295 / 454-3p / 3666 / 301b-3p / 301a-3p / 130a-3p / 130b-3p en el sitio 1,601-1,607, y la familia de miR-30-5p (a-e) en el sitio 1,900-1,907 (Figura16).

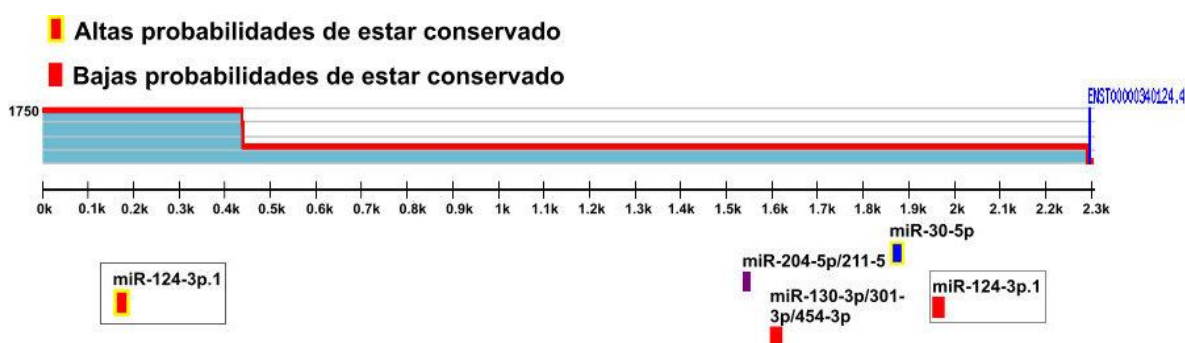


Figura 16. Esquema de la 3'UTR de GTP2 y la posición de cada una de posibles interacciones con miRNAs conservados.

El plegamiento de las cadenas de nucleótidos influye en su función biológica y, da lugar a diversas estructuras secundarias, por ejemplo, tallo-bucle (stem-loop), bucle interno, horquillas (hairpin loop), abultamientos (bulge), bucles ramificados (multibranch loops). Para aproximarse lo más posible al plegamiento biológico que puede tener un RNAm, se utilizó el servidor M-fold para modelar la estructura secundaria del transcrito completo (5'UTR, CDS y 3'UTR) de GPT2 para identificar el contexto estructural de la región a la que se une miR-124. Como se puede observar en la figura 17, el sitio de interacción se encuentra del nucleótido 1,840-1,860 en una región que comprende en su mayoría una doble cadena con excepción de un pequeño stem-loop en el extremo 3' y dos nucleótidos libres en la región semilla.

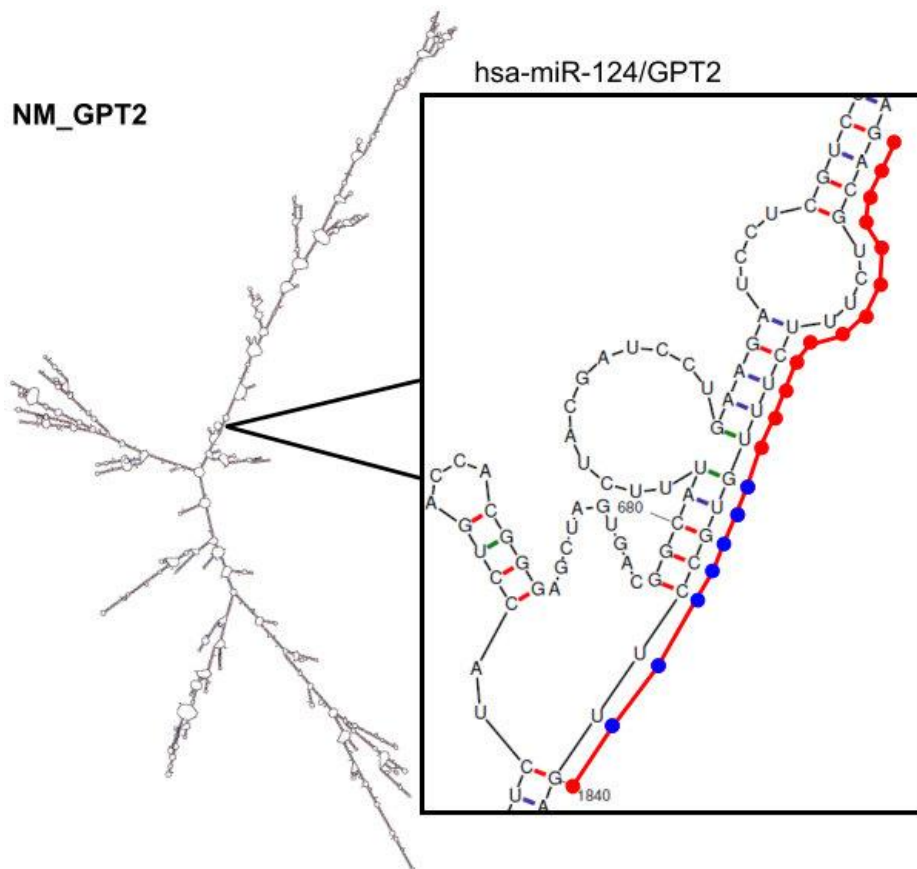


Figura 17. Modelado de la estructura secundaria del RNAm de GPT2. A la derecha se muestra una ampliación de la región circundante al sitio de interacción de miR-124 con GPT2, en color azul indica la región semilla del microRNA.

En lo que respecta a la estructura secundaria de la región 3'UTR de GPT2, esta zona tiene una longitud de 2,300 nucleótidos (Figura 18). El sitio de interacción de miR-124, se encuentra entre los nucleótidos 141-158 (en color rojo y azul). Además, la región semilla del microRNA (en color azul) se localiza entre dos stem-loop monocatenarios con una pequeña región de doble cadena que abarca del nucleótido 151-157, de igual manera el sitio de interacción del extremo 3' se localiza entre una región de doble cadena y parte de un loop.

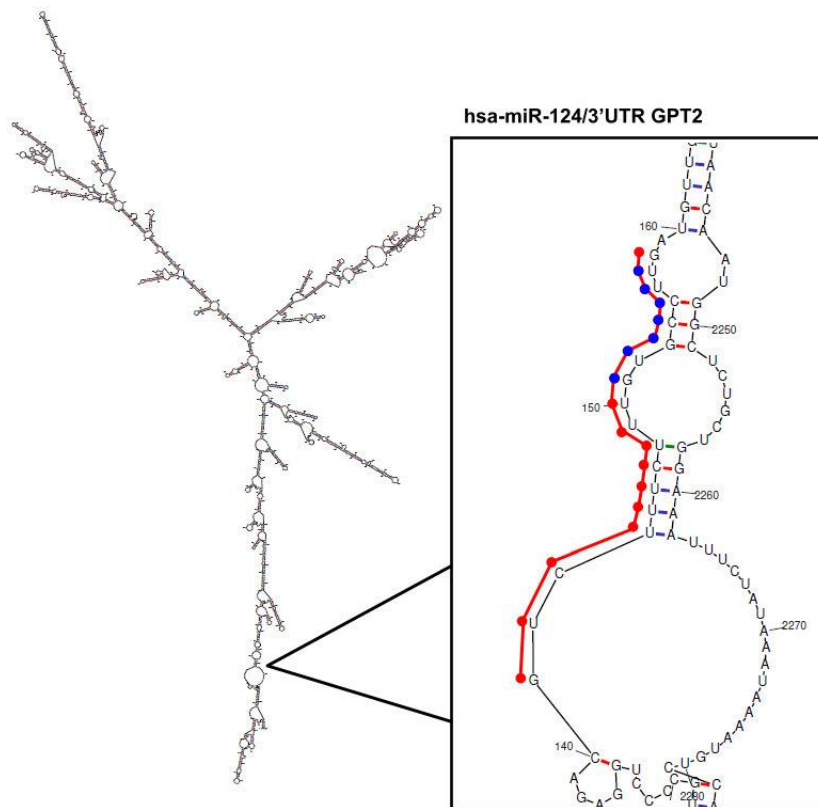


Figura 18. Estructura secundaria de la región 3'UTR de GPT2 y el sitio de interacción de miR-124 con su blanco, en azul se muestra la región semilla del microRNA.

Estos plegamientos nos indican que, de la estructura secundaria y la formación de doble cadena, loops y sitio de interacción cambian con respecto a la longitud del RNAm, se observa que se favorece la interacción del miRNA utilizando solo la 3'UTR, pero no hay que perder de vista que este análisis de plegamiento no toma en cuenta las interacciones tridimensionales con el transcrito mismo ni con proteínas que pueden modificar el pliegue en un sistema biológico.

Se realizó la extracción de RNA de las líneas celulares de CCR, se cuantificó y se hizo electroforesis en gel de agarosa al 2% para corroborar su integridad y comprobar que estuviera libre de DNA. Como se puede observar en la figura 19, todas las muestras tuvieron buena integridad y están libres de contaminación por DNA.

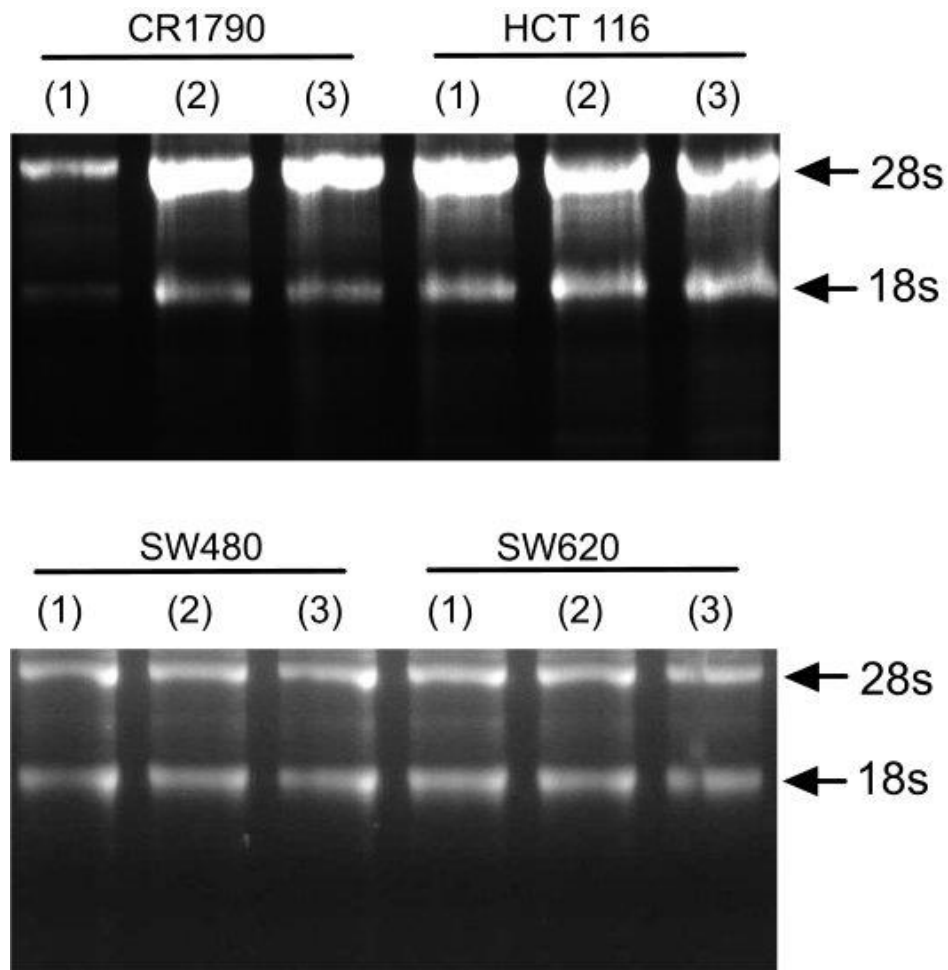


Figura 19. Geles de Integridad para RNA obtenido de líneas celulares de CCR. Bandas ribosomales 28s Y 18s.

La expresión relativa de GPT2 en tres líneas celulares de cáncer colorrectal fue diferencial. Se observa que la expresión de GPT2 se relaciona al estadio de CCR del que se deriva cada línea celular, esto es más evidente en la línea celular SW620 ya que muestra una expresión mayor en GPT2 en comparación con las otras tres líneas celulares y en más del doble con respecto al grupo control (Figura 17).

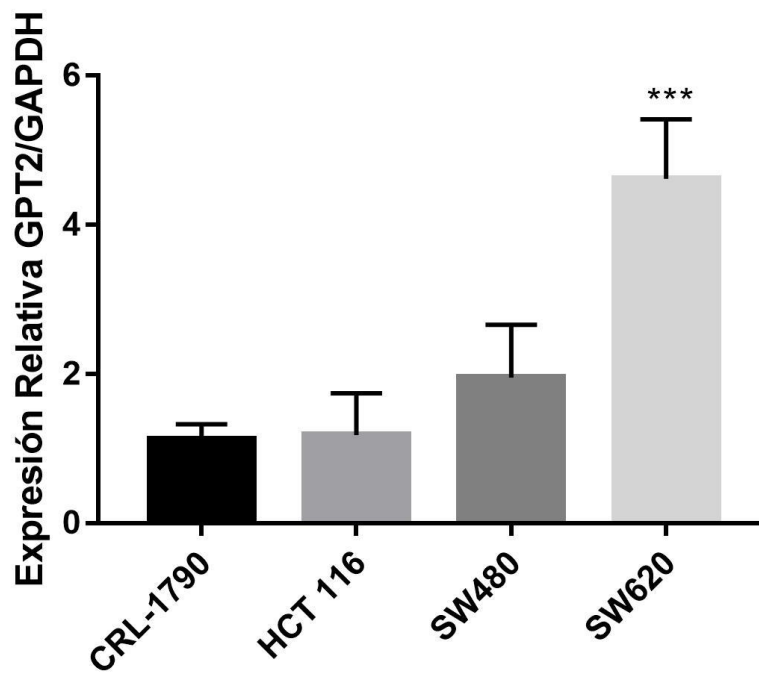


Figura 20. Expresión relativa de GPT2 en líneas celulares de CCR medida por qRT-PCR. Los datos de expresión de GPT2 fueron normalizados con GAPDH.

En el grupo control que corresponde a la línea celular no tumoral CRL-1790 existe una mayor expresión relativa de miR-124 comparado con etapas tempranas de CCR (HCT116 y SW480) en donde disminuye aproximadamente la mitad la detección de este miRNA, y se pierde casi por completo en el estadio más avanzado (SW620). Estos resultados indican que la cantidad de miR-124 detectado se relaciona con en estadio tumoral y se va perdiendo conforme avanza el proceso carcinogénico (Figura 21).

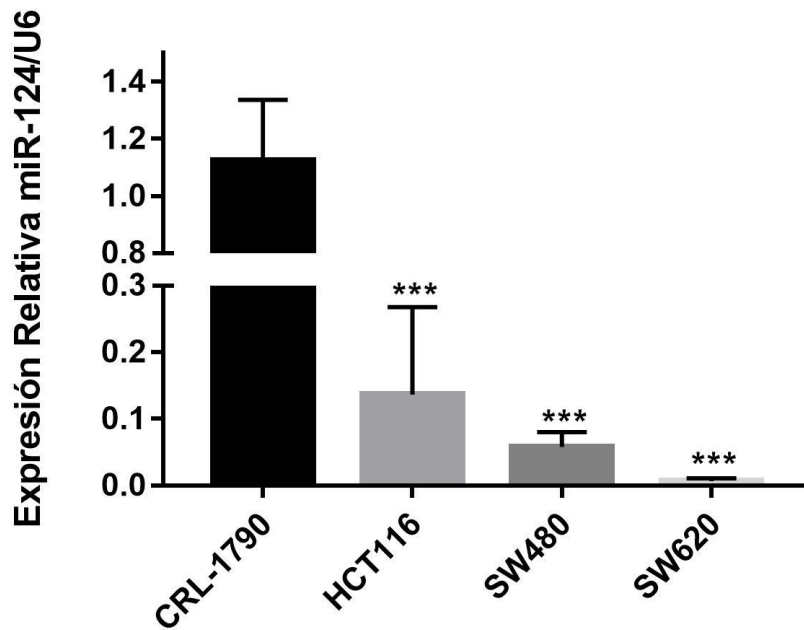


Figura 21. Expresión relativa de miR-124 en líneas celulares de CCR medida por qRT-PCR. Los datos fueron normalizados con snRNA U6.

Para restaurar la expresión de miR-124 se clonó la secuencia de premiR-124 para generar el plásmido pSilencer-premiR-124, dicha construcción se transformó y se obtuvieron cinco colonias, las cuales fueron analizadas por digestión con la enzima HindIII (Figura 22a), se observó que todas las colonias presentan una banda de aproximadamente 4612 pb que es comparable con la del grupo control que no tiene inserto, por lo cual se puede afirmar que cada una de las colonias contienen el plásmido de interés (Figura 22b).

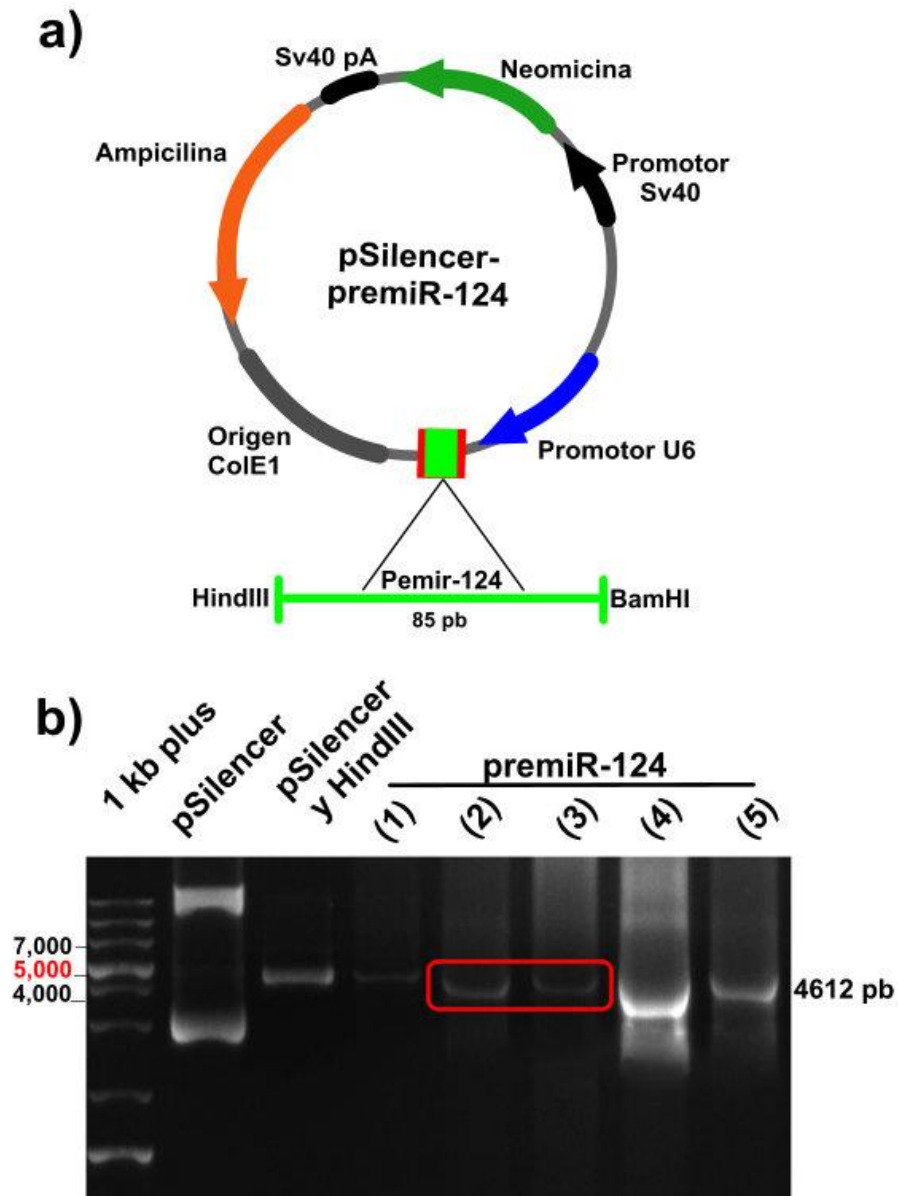


Figura 22. a) Construcción del vector pSilencer-premiR-124. b) Análisis de restricción de la construcción pSilencer-PremiR-124 con la enzima HindIII de la colonia uno a cinco.

Para corroborar que al menos una de las colonias tuviera el inserto se eligieron las colonias 2 y 3 para analizarlas mediante secuenciación tipo Sanger. Con los resultados obtenidos se hizo un alineamiento de la secuencia obtenida con la secuencia teórica del premiR-124, como se puede observar en la figura 23 el alineamiento de las dos secuencias es idéntico por lo que se puede afirmar que la colonia número tres contuvo el inserto de interés.

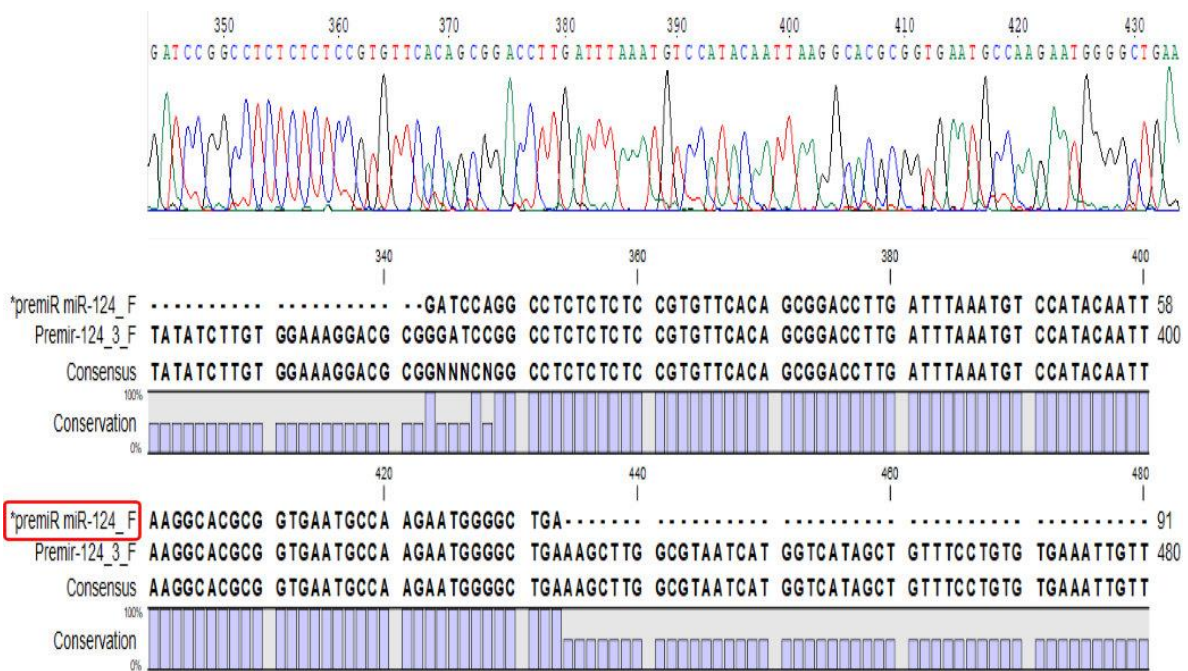


Figura 23. Electroferograma y alineamiento de la colonia 3 con la secuencia de premiR-124.

Con el fin de investigar los efectos biológicos de miR-124 en CCR, este miRNA fue sobreexpresado de forma transitoria mediante la construcción pSilencer-premiR-124 y transfectado en concentraciones crecientes en células SW620 por presentar el nivel más bajo de este miRNA (Figura 21). Como se puede ver en la figura 24 las transfecciones de premiR-124 restablecen la expresión de miR-124 alcanzando el punto más alto con la transfección de 5 μg por lo que se puede afirmar que la construcción puede restablecer la expresión de miR-124 transitoriamente.

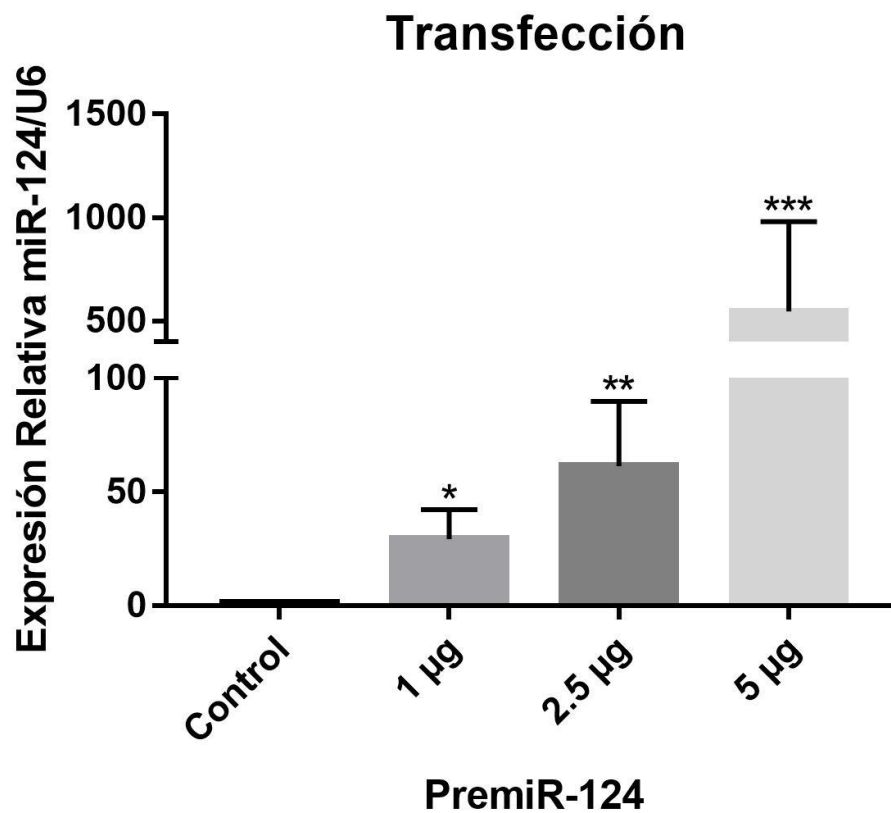


Figura 24. Expresión relativa miR-124 en células SW620 transfetadas con pSilencer premiR-124 a diferentes concentraciones.

Para corroborar si la transfección de la construcción pSilencer premiR-124 produce cambios en la abundancia del RNAm de GPT2, se midió la cantidad de éste mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR). La figura 25 muestra la cuantificación relativa de los niveles de RNAm de GPT2 obtenidos de línea celular SW620 después de 24 horas de ser transfectada con la construcción pSilencer-PremiR-124 a diferentes concentraciones. Como se puede observar en las concentraciones 1 y 2.5 μg no hay diferencias significativas en la abundancia del RNAm de GPT2 en comparación con el grupo control, pero cuando se aumentó la concentración de la construcción a 5 μg , la detección del RNAm de GTP2 disminuyó aproximadamente la mitad.

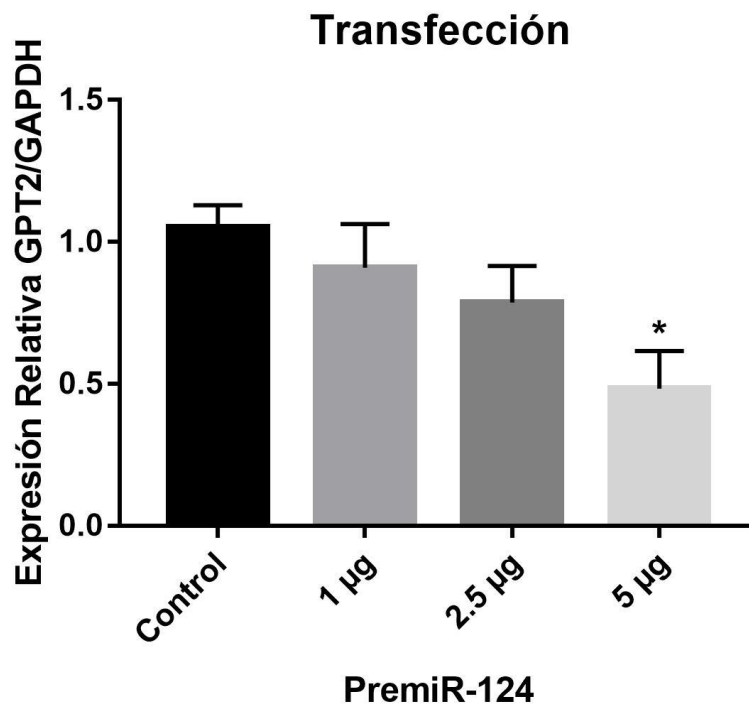


Figura 25. Expresión relativa GPT2 en células SW620 transfectadas con pSilencer premiR-24 a diferentes concentraciones.

Para corroborar la interacción y una posible regulación de GPT2 por miR-124, se clonó el sitio de interacción miR-124/GPT2 flanqueado por los sitios SpeI y HindIII en el vector pMIR-REPORT para generar la construcción pMIR-REPORT-miR-124/GPT2 (Figura 26a). Esta construcción se usó para transformar bacterias competentes dando como resultados dos colonias que posteriormente fueron analizadas por restricción con la enzima HindIII dando como resultado dos bandas de aproximadamente 6,497 pb (Figura 26b).

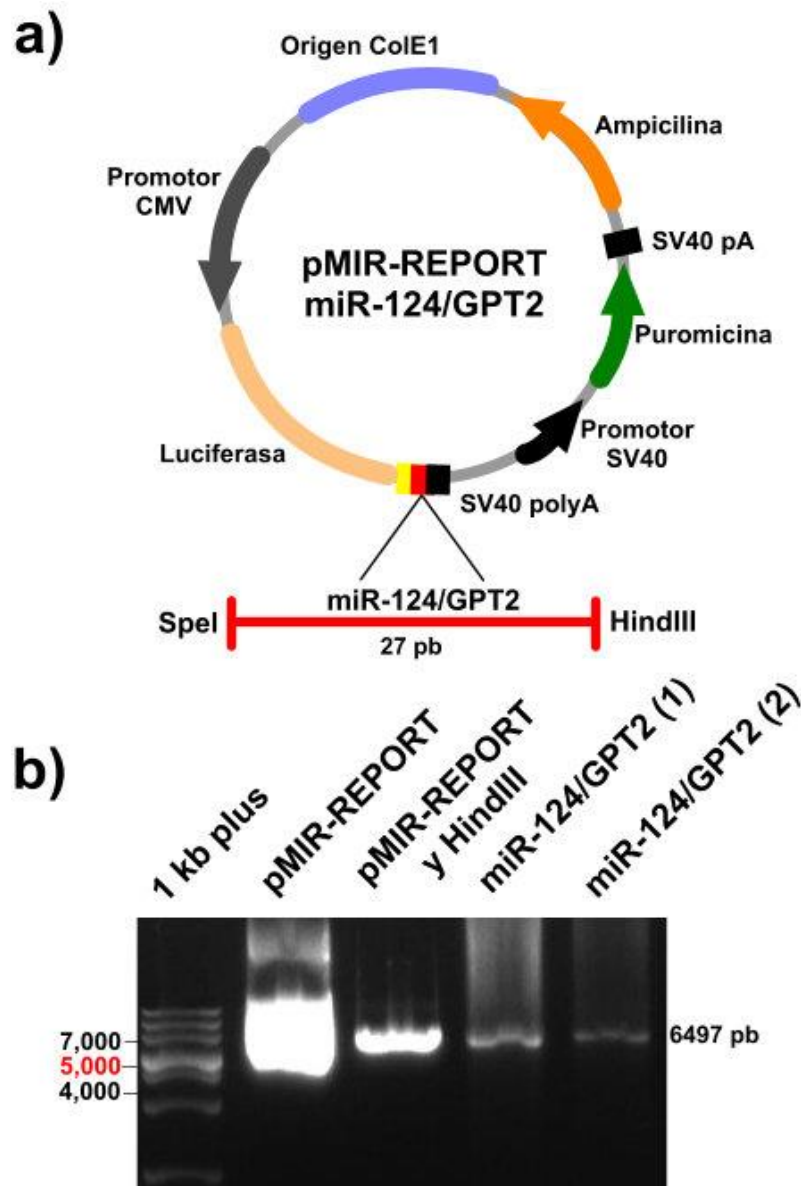


Figura 26. a) Construcción del vector pMIR-REPORT mir-124/GPT2. b) Análisis de restricción con la enzima HindIII de la colonia uno y dos.

La clonación se verificó mediante secuenciación tipo Sanger y se alineó con la secuencia teórica del sitio de interacción miR-124/GPT2 y, como se puede observar en la figura 27, las secuencias alineadas coinciden a la perfección por lo que se puede deducir que la secuencia de interés fue clonada con éxito en el vector.

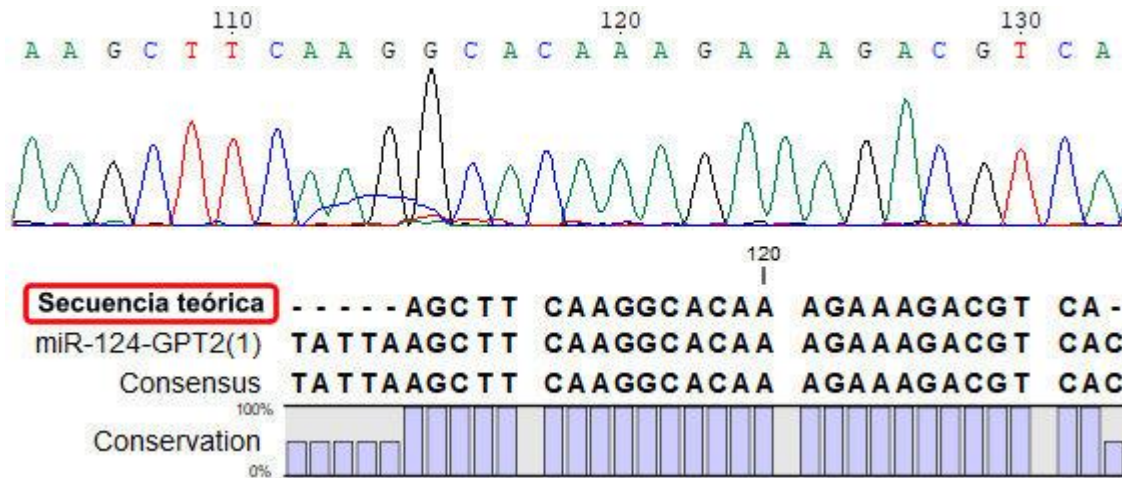


Figura 27. Electroferograma y alineamiento de la construcción pMIR-REPORT miR-124/GPT2.

Como control para validar el sitio de interacción de miR-124/GPT2 se hizo la construcción pMIR-REPORT mir-124/GPT2 mut (con tres desajustes en la region semilla), este inserto se flanqueó por las sitios de restriccion SpeI y HindIII (Figura 28a). Esta construcción se usó para transformar bacterias competentes, dando como resultados seis colonias que posteriormente fueron analizadas por restriccion con la enzima HindIII lo que resulto en tres bandas de aproximadamente 6,497pb correspondientes a las colonias 2, 4 y 5 (Figura 28b).

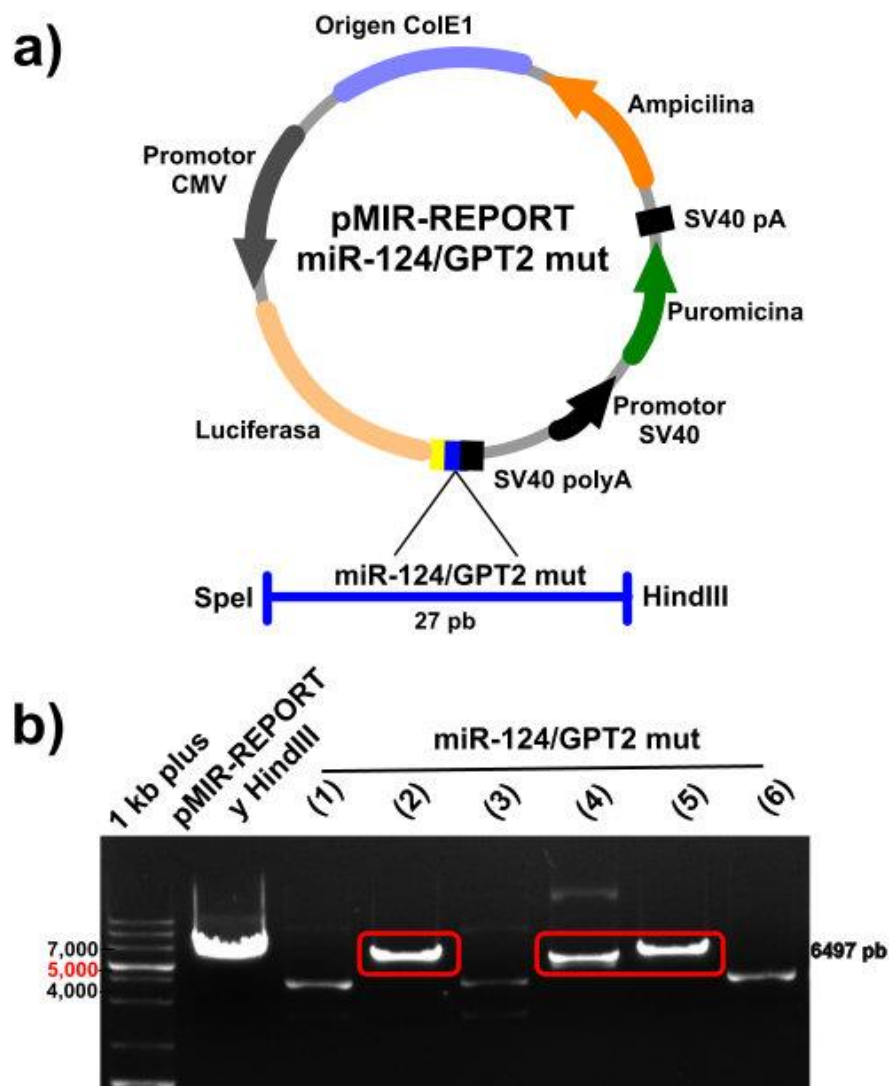


Figura 28. a) Construcción del vector pMIR-REPORT mir-124/GPT2mut. b) Análisis de restriccion con la enzima HindIII de la colonia uno a seis

La clonación del inserto se verificó mediante secuenciación tipo Sanger y se alineó con la secuencia teórica del sitio de interacción miR-124/GPT2 mut y como se puede observar en la figura 29 las colonias dos y cinco presentan desajustes de tres nucleótidos en la región semilla que puede eliminar la complementariedad con el miRNA maduro miR-124.

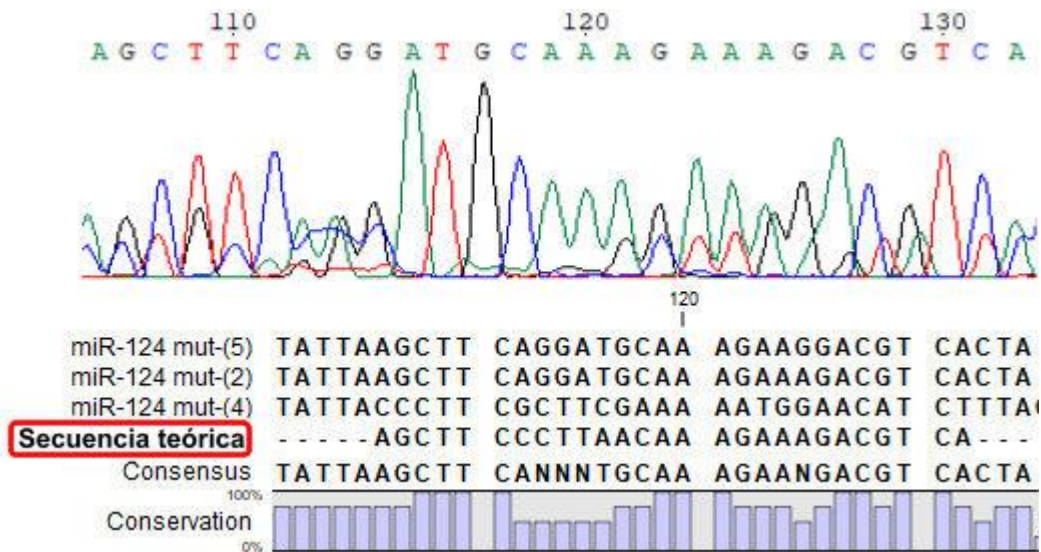


Figura 29. Mutaciones de las colonias dos y cinco de la construcción pMIR-REPORT miR-124/GPT2 mut.

Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de luciferasa con las construcciones que contenían el sitio de interacción de miR-124/GPT2 normal y mutado. Como se puede observar en la figura 30, con el sitio de interacción normal se observa una disminución en la detección de luminiscencia, por otro lado, con el sitio de interacción mutado, no se observa una inhibición de la actividad de luciferasa y esta permanece constante, estos datos sugieren que existe una interacción de miR-124 con GPT2 ya que su interacción ocasiona una disminución en la cantidad luminiscencia.

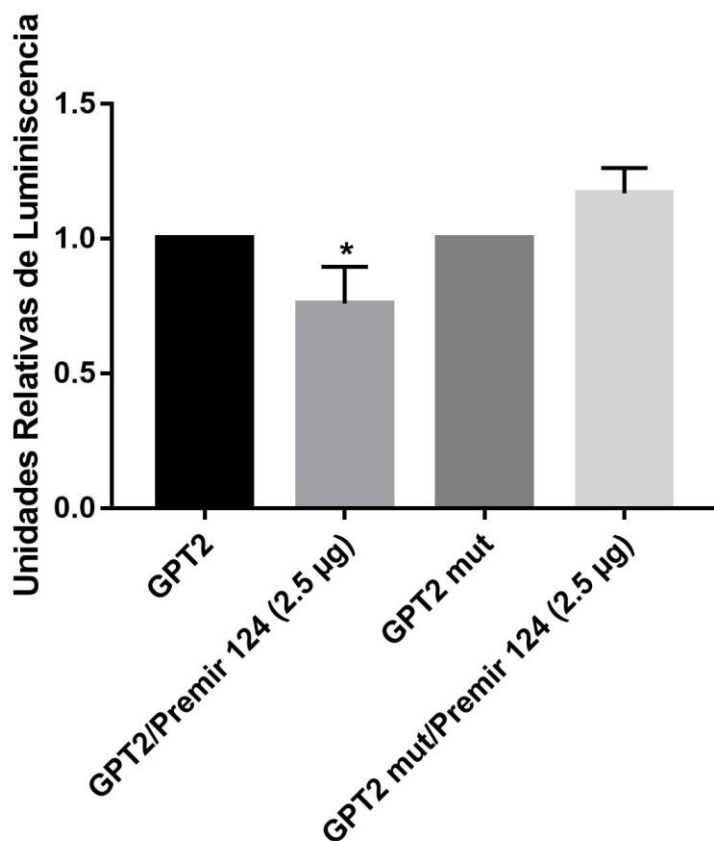


Figura 30. Ensayo de luciferasa del sitio de interacción de miR-124/GPT2 normal y con un desajuste de tres nucleótidos en la región semilla.

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la regulación e interacción de miR-124 con el RNAm de GPT2 en células de cáncer colorrectal. Se encontró que miR-124 puede regular la expresión de GPT2 uniéndose a la región 3'UTR de este.

Estos resultados concuerdan con diversos estudios en donde un miRNA puede regular pasos esenciales en metabolismo del cáncer, por ejemplo: Puisségur y colaboradores en 2011 encontraron que la sobreexpresión de miR-210 inhibe la actividad de la Succinato Deshidrogenasa Subunidad D (SDHD), induciendo la aparición de un fenotipo mitocondrial aberrante, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y un aumento en la glucólisis. Por otro lado, Chen y colaboradores en 2014 reportaron que miR-26a puede inhibir la expresión de la Piruvato Deshidrogenasa Componente del Complejo X (PDHX) uniéndose directamente a la 3'UTR de este RNAm, ocasionando, una disminución de la transformación del Piruvato en Acetil-CoA, regulando así, el metabolismo de la glucosa e indirectamente el TCA.

En lo que respecta al análisis *in silico*, se detectó que la 3'UTR de GPT2 posee dos sitios de unión para miR-124. La mayoría de las bases de datos como PicTar, PITA, TargetScan, miRanda, DIANA-microT, utilizan cuatro criterios para analizar el sitio de interacción de un miRNA con su blanco; el primero comprende la región semilla, la cual es una zona conservada que permite clasificar a los miRNAs dentro de familias y especies, y se localiza entre los nucleótidos 2-8 del 5' y tiene una complementariedad perfecta al RNAm. Es por eso que herramientas como PicTar y PITA incluyen a la región semilla como un elemento clave para la predecir la de un miRNA a su blanco (Kertesz et al., 2007; Krek et al., 2005). El segundo es la energía libre, este principio termodinámico evalúa que tan fuerte es la unión entre un miRNA y su RNAm objetivo, y mientras más negativa sea energía libre (Kcal/mol), aumenta la probabilidad de que la interacción ocurra realmente, este parámetro es utilizado por PITA (Mathews et al., 1999). El tercero comprende un alineamiento de RNA en los nucleótidos 13-16 del extremo 3' del miRNA, este parámetro lo incluyen TargetScan y miRanda (Betel et al., 2010; Grimson et al., 2007b). El cuarto

considera el estado de conservación entre diferentes especies, usa datos de distancia filogenética y evolutiva entre organismos y proporcionar evidencia de que un miRNA es funcional porque está siendo seleccionado naturalmente de forma positiva (Friedman et al., 2009), este parámetro lo incluyen algoritmos como TargetScan, miRanda, DIANA-microT, PicTar y PITA. Hay que señalar que, aunque estos análisis de predicción tienen una estimación de error del 20- 40% en cuanto al pronóstico de la unión de un miRNA a su objetivo, siguen siendo requeridos por la comunidad científica como punto de partida para una posterior validación experimental de la interacción miRNA-RNAm.

En lo que respecta al análisis de plegamiento del RNAm, en ellos se muestra que miR-124 tiene altas probabilidades de unirse a su objetivo, ya que su región semilla está situada en entre varios loops y pequeñas regiones de doble cadena que podrían favorecer su unión en ambos modelos (RNAm completo y 3'UTR). Estos análisis son utilizados para predecir la estructura secundaria de un RNAm (Zuker, 2003); un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Zheng y colaboradores en el 2017, en donde modelaron la estructura secundaria de los transcritos de MYB33 y MYB65, e informaron que dichos plegamientos presentaban múltiples sitios con stem-loop, por lo cual decidieron investigar más a fondo y descubrieron que muchos de los nucleótidos que conformaban los stem-loops estaban altamente conservados en los genes estudiados, además, sugieren que la conservación y formación de sitios con stem-loops puede favorecer la unión de miR159 a MYB33 y MYB65. De la misma forma no debemos perder de vista que la predicción de la estructura secundaria de un transcrito elaborada a partir de herramientas como M-fold u otros programas, ignoran las interacciones tridimensionales entre el mismo transcrito e interacciones RNA-proteína, las cuales podrían estabilizar o desestabilizar el pliegue de un RNA (Hassan et al., 2013).

Asimismo, en líneas celulares derivadas de CCR, se detectó una reducción diferencial, de miR-124, más evidente en la línea en la línea celular SW620, esto puede deberse a diversas causas como: metilación, largos no codificantes que funcionan como esponjas o por inserciones y deleciones en las regiones donde se

encuentra este miRNA, por mencionar los más comunes. Hasta el momento, la única causa conocida para explicar por qué miR-124 está disminuido en cáncer es la reportada por Agirre et al., 2009; Ando et al., 2009; Furuta et al., 2010 y Ueda et al., 2014, ellos mencionan que la transcripción de este miRNA es controlada por la metilación del DNA en sus regiones promotoras y que estas zonas se van metilando durante la carcinogénesis en Cáncer Asociado a Colitis (CAC), cáncer de hígado, gástrico, leucemia y colon. Además, ellos estiman que el nivel de metilación puede usarse como un marcador para estimar el riesgo asociado a cáncer. Por ejemplo: Saito y colaboradores en 2006 observaron que miR-127 se expresaba en las células normales, pero no en las células con cáncer, así que trataron líneas celulares de cáncer con drogas desmetilantes y después del tratamiento detectaron a miR-127, por lo que sugieren que este miRNA está sujeto a silenciamiento epigenético por hipermetilación de su promotor.

Por otro lado, se reafirmó que GPT2 está sobreexpresado en todas las líneas derivadas de CCR, estos datos fueron más evidentes con el estadio tumoral, siendo más notorio en la línea celular SW620. Estos datos concuerdan con el trabajo realizado Hao y colaboradores en 2016 en donde probaron que GPT2 estaba sobreexpresado en líneas derivadas de CCR debido a mutaciones en PIK3CA que reprograman el metabolismo de la glutamina al aumentar la expresión de GPT2 y, por lo tanto, convirtiendo más glutamato en α -KG para reponer macromoléculas e intermediarios metabólicos del TCA, para sostener el crecimiento tumoral acelerado.

La disminución en la cantidad de luminiscencia, que se observó en los ensayos de luciferasa posiblemente fue causada por la interacción de miR-124 con su blanco, esto es completamente nuevo ya que no existen reportes de que miR-124 regule el RNAm de GPT2. Por otro lado, se observó un ligero aumento en la actividad de luminiscencia en el grupo control que presenta los tres desajustes en la región semilla, esto puede deberse a la capacidad de un miRNA de unirse competitivamente a los elementos ricos en AU de la 3'UTR, esto previene la degradación del RNAm mediada por las RBPs (RNA Binding Proteins) dando como

resultado un aumento en los niveles de RNAm y proteína, esto es fue corroborado por Ma y colaboradores en 2010, ellos reportaron que miR-466l podía regular la expresión del RNAm y proteína de IL-10, ya que, este miRNA podía unirse competitivamente a la región 3' de IL-10 rica en AU, impidiendo la unión de la RBP Tristetraprolina (regula la degradación del RNAm), dando como resultado la extensión de la vida media del RNAm y una elevada expresión de IL-10. Por lo que es probable que los tres desajustes realizados en el sitio de interacción ocasionen que miR-124 no interactúe con su blanco, pero no se puede descartar la posibilidad que esta modificación haya favorecido la interacción de otro miRNA con la región en estudio. Por otro lado existe la posibilidad de que una RBP posea afinidad con el sitio con tres desajustes, ocasionando una estabilización del RNAm y una regulación positiva en la traducción (Szostak y Gebauer, 2013).

Es necesario un mayor entendimiento de los miRNAs y los mecanismos que regulan a GPT2 en condiciones biológicas, por lo cual, se propone un modelo de captura por afinidad llamado miR-CATCH el cual se puede ver en la figura 31, y, fue creado y estandarizado por Vencken y colaboradores en 2015, este método permitirá validar todos los miRNAs que regulan a esta aminotransferasa.

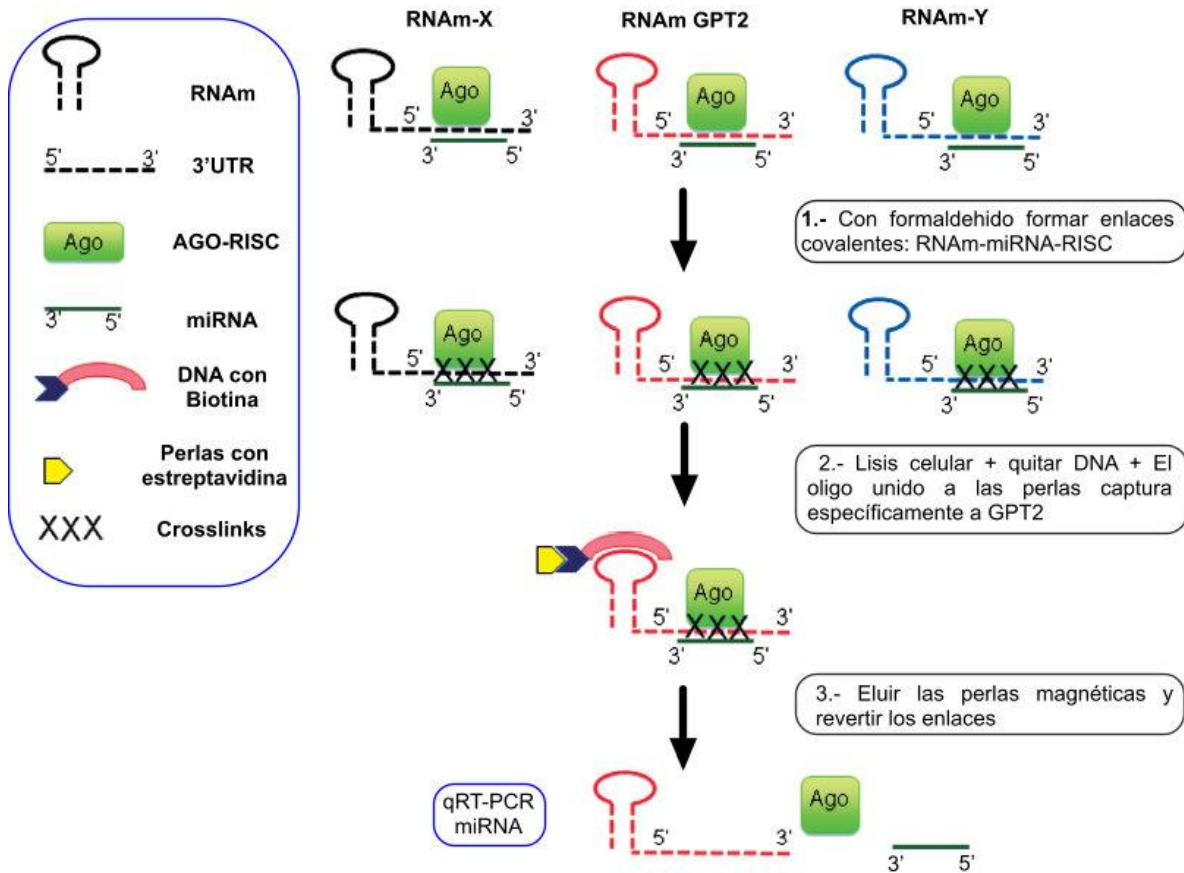


Figura 31. Modelo para validar todos los miRNAs que regulan a GPT2 en CCR.

CONCLUSIONES

Se verificó que GPT2 estaba sobreexpresado en líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal y que miR-124 estaba subexpresado, además, se demostró que miR-124 puede regular el RNAm de GPT2 y por primera vez se comprobó la interacción de miR-124 con la 3'UTR de GPT2.

LITERATURA CITADA

- Agirre, X., Vilas-Zornoza, A., Jimenez-Velasco, A., Martin-Subero, J. I., Cordeu, L., Garate, L., Prosper, F. (2009). Epigenetic Silencing of the Tumor Suppressor MicroRNA Hsa-miR-124a Regulates CDK6 Expression and Confers a Poor Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Research*, 69(10), 4443–4453. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4025>
- Aldaco-Sarvide, F., Pérez-Pérez, P., Cervantes-Sánchez, G., Torrecillas-Torres, L., Erazo-Valle-Solís, A. A., Cabrera-Galeana, P., Cárdenas-Cárdenas, E. (2018). Mortalidad por Cáncer en México: actualización 2015. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 17(1). <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M18000105>
- American Cancer Society. (2018). *Cancer Facts y Figures*. Atlanta.
- Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>
- Ando, T., Yoshida, T., Enomoto, S., Asada, K., Tatematsu, M., Ichinose, M., Ushijima, T. (2009). DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: Its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *International Journal of Cancer*, 124(10), 2367–2374. <https://doi.org/10.1002/ijc.24219>
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., y Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683–691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. a, Blackshaw, S. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. *Molecular Biology* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>
- Bardou, M., Barkun, A. N., y Martel, M. (2013). Obesity and colorectal cancer. *Gut*, 62(6), 933–947. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304701>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bauer, D. E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C., y Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*, 24(41), 6314–6322. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208773>
- Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., y Leslie, C. (2010). Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biology*, 11(8), R90. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-8-r90>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., y Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brenner, H., Kloor, M., y Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet*, 383(9927), 1490–1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9)
- Busk, P. K. (2014). A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics*, 15, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-29>

- Cancer Genome Atlas Network, T. C. G. A. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330–337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>
- Chen, B., Li, H., Zeng, X., Yang, P., Liu, X., Zhao, X., y Liang, S. (2012). Chen, B., Li, H., Zeng, X., Yang, P., Liu, X., Zhao, X., y Liang, S. (2012). Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *Journal of Translational Medicine*, 10, 228. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-228> Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *Journal of Translational Medicine*, 10, 228. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-228>
- Chen, B., Liu, Y., Jin, X., Lu, W., Liu, J., Xia, Z., Liang, S. (2014). MicroRNA-26a regulates glucose metabolism by direct targeting PDHX in colorectal cancer cells. *BMC Cancer*, 14, 443. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-443>
- Chi, S. W., Zang, J. B., Mele, A., y Darnell, R. B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, 460(7254), 479–486. <https://doi.org/10.1038/nature08170>
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., Cantley, L. C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184), 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature06734>
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., y Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Coloff, J. L., Murphy, J. P., Braun, C. R., Harris, I. S., Shelton, L. M., Kami, K., Brugge, J. S. (2016). Differential Glutamate Metabolism in Proliferating and Quiescent Mammary Epithelial Cells. *Cell Metabolism*, 23(5), 867–880. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.016>
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., y Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*, 7(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>
- Fantin, V. R., St-Pierre, J., y Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9(6), 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.023>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., y Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Furuta, M., Kozaki, K., Tanaka, S., Arai, S., Imoto, I., y Inazawa, J. (2010). miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 31(5), 766–776. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp250>
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Dang, C. V. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, 458(7239), 762–765. <https://doi.org/10.1038/nature07823>
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., y Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(90001), D140–D144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj112>
- Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., y Bartel, D. P. (2007a). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*,

27(1), 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>

- Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., y Bartel, D. P. (2007b). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*, 27(1), 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11), 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
- Hamilton, S. R., y Aaltonen, L. A. (2000). *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Retrieved from [https://www.patologi.com/who mage.pdf](https://www.patologi.com/who%20mage.pdf)
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, Douglas, y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hao, Y., Samuels, Y., Li, Q., Krokowski, D., Guan, B.-J., Wang, C., Wang, Z. (2016). Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer. *Nature Communications*, 7, 11971. <https://doi.org/10.1038/ncomms11971>
- Hassan, T., Smith, S. G. J., Gaughan, K., Oglesby, I. K., O'Neill, S., McElvaney, N. G., y Greene, C. M. (2013). Isolation and identification of cell-specific microRNAs targeting a messenger RNA using a biotinylated anti-sense oligonucleotide capture affinity technique. *Nucleic Acids Research*, 41(6), e71. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1466>
- Hatzia Apostolou, M., Polytarchou, C., y Iliopoulos, D. (2013). miRNAs link metabolic reprogramming to oncogenesis. *Trends in Endocrinology y Metabolism*, 24(7), 361–373. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.03.002>
- Hensley, C. T., Wasti, A. T., y DeBerardinis, R. J. (2013). Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3678–3684. <https://doi.org/10.1172/JCI69600>
- Hsu, P. P., y Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703–707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2015). Retrieved February 6, 2019, from <https://www.inegi.org.mx/>
- Itkonen, H. M., Gorad, S. S., Duveau, D. Y., Martin, S. E. S., Barkovskaya, A., Bathen, T. F., Mills, I. G. (2016). Inhibition of O-GlcNAc transferase activity reprograms prostate cancer cell metabolism. *Oncotarget*, 7(11), 12464–12476. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7039>
- Jess, T., Rungoe, C., y Peyrin-Biroulet, L. (2012). Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(6), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.01.010>
- Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., y Segal, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature Genetics*, 39(10), 1278–1284. <https://doi.org/10.1038/ng2135>
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37(5), 495–500. <https://doi.org/10.1038/ng1536>
- Krützfeldt, J., y Stoffel, M. (2006). MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metabolism*, 4(1), 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.009>

- Kuri-Morales, P. (2011). *La transición en salud y su impacto en la demanda de servicios*. México, D.F. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2011/gm116b.pdf>
- Li, J.-H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L.-H., y Yang, J.-H. (2014). starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D92–D97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1248>
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M. F., Cerrato, C., Setién, F., Esteller, M. (2007). Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Research*, 67(4), 1424–1429. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4218>
- Lynch, P. M. (2017). Historia del cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC). *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(4), 512–523. <https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2017.07.006>
- Ma, F., Liu, X., Li, D., Wang, P., Li, N., Lu, L., y Cao, X. (2010). MicroRNA-466l upregulates IL-10 expression in TLR-triggered macrophages by antagonizing RNA-binding protein tristetraprolin-mediated IL-10 mRNA degradation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(11), 6053–6059. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902308>
- Makeyev, E. V, y Maniatis, T. (2008). Multilevel regulation of gene expression by microRNAs. *Science (New York, N. Y.)*, 319(5871), 1789–1790. <https://doi.org/10.1126/science.1152326>
- Makeyev, E. V, Zhang, J., Carrasco, M. A., y Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, 27(3), 435–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.015>
- Müller, M. F., Ibrahim, A. E. K., y Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 469(2), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>
- Neo, W. H., Yap, K., Lee, S. H., Looi, L. S., Khandelia, P., Neo, S. X., Su, I. H. (2014). MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning Ezh2 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20788–20801. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525493>
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science (New York, N. Y.)*, 326(5957), 1275–1279. <https://doi.org/10.1126/science.1178705>
- Pavlova, N. N., y Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Peng, Y., y Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1(1), 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Puisségur, M.-P., Mazure, N. M., Bertero, T., Pradelli, L., Grosso, S., Robbe-Sermesant, K., Mari, B. (2011). miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death and Differentiation*, 18(3), 465–478. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.119>
- Redova, M., Svoboda, M., y Slaby, O. (2011). MicroRNAs and their target gene networks in renal cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405(2), 153–156. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2011.01.019>
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., y Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14(10A), 1902–1910. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>
- Rossi, B. M., Vaccaro, C., y Kronberg, U. (2017). Síndromes hereditarios que predisponen al desarrollo del cáncer colorrectal. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(4), 617–626. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2017.07.003>

- Rottiers, V., y Näär, A. M. (2012). MicroRNAs in Metabolism and Metabolic Disorders. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(4), 239–250. <https://doi.org/10.1038/nrm3313>
- Ryul Lee, M., Soo Kim, J., y Kim, K.-S. (2010). miR-124a Is Important for Migratory Cell Fate Transition During Gastrulation of Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, 28(9), 1550–1559. <https://doi.org/10.1002/stem.490>
- Sánchez, E. E. J. D. G. C., y Royal, D. L. R. O. (2008). Gaceta mexicana de oncología (GAMO) Editores asociados. Retrieved from <https://www.mendeley.com/catalogue/gaceta-mexicana-oncologia-gamo-editores-asociados/>
- Smalheiser, N. R., y Torvik, V. I. (2005). Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. *Trends in Genetics : TIG*, 21(6), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.04.008>
- Smith, B., Schafer, X. L., Ambeskovic, A., Spencer, C. M., Land, H., y Munger, J. (2016). Addiction to Coupling of the Warburg Effect with Glutamine Catabolism in Cancer Cells. *Cell Reports*, 17(3), 821–836. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.045>
- Sreedhar, A., y Zhao, Y. (2018). Dysregulated metabolic enzymes and metabolic reprogramming in cancer cells. *Biomedical Reports*, 8(1), 3–10. <https://doi.org/10.3892/br.2017.1022>
- Still, E. R., y Yuneva, M. O. (2017). Hopefully devoted to Q: targeting glutamine addiction in cancer. *British Journal of Cancer*, 116(11), 1375–1381. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.113>
- Szostak, E., y Gebauer, F. (2013). Translational control by 3'-UTR-binding proteins. *Briefings in Functional Genomics*, 12(1), 58–65. <https://doi.org/10.1093/bfpg/els056>
- Telang, S., Yalcin, A., Clem, A. L., Bucala, R., Lane, A. N., Eaton, J. W., y Chesney, J. (2006). Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene*, 25(55), 7225–7234. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209709>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., y Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Ueda, Y., Ando, T., Nanjo, S., Ushijima, T., y Sugiyama, T. (2014). DNA Methylation of MicroRNA-124a Is a Potential Risk Marker of Colitis-Associated Cancer in Patients with Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 59(10), 2444–2451. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3193-4>
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., y Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3, 12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- Vencken, S., Hassan, T., McElvaney, N. G., Smith, S. G. J., y Greene, C. M. (2015). miR-CATCH: MicroRNA Capture Affinity Technology (pp. 365–373). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1538-5_23
- Wang, X., Liu, y., Liu, X., Yang, J., Teng, G., Zhang, I., y zhou, c. (2016). miR-124 inhibits cell proliferation, migration and invasion by directly targeting SOX9 in lung adenocarcinoma. *Oncology Reports*, 35(5), 3115–3121. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4648>
- Who | Global Health Observatory (GHO) data. (2018). WHO. Retrieved from <https://www.who.int/gho/en/>
- Wilting, S. M., van Boerdonk, R. A. A., Henken, F. E., Meijer, C. J. L. M., Diosdado, B., Meijer, G. A., Steenbergen, R. D. M. (2010). Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. *Molecular Cancer*, 9, 167. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-167>
- Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H. K., Thompson, C.

- B. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18782–18787. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810199105>
- Wu, R., Wood, M., Thrush, A., Walton, E. F., y Varkonyi-Gasic, E. (2007). Real-Time PCR Quantification of Plant miRNAs Using Universal ProbeLibrary Technology. *Biochemica*, (2), 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.004>
- Xi, Z.-W., Xin, S.-Y., Zhou, L.-Q., Yuan, H.-X., Wang, Q., y Chen, K.-X. (2015). Downregulation of rho-associated protein kinase 1 by miR-124 in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 21(18), 5454–5464. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i18.5454>
- Yoo, A. S., Staahl, B. T., Chen, L., y Crabtree, G. R. (2009). MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature*, 460(7255), 642–646. <https://doi.org/10.1038/nature08139>
- Zhang, W., Mao, Y.-Q., Wang, H., Yin, W.-J., Zhu, S.-X., y Wang, W.-C. (2015). MiR-124 suppresses cell motility and adhesion by targeting talin 1 in prostate cancer cells. *Cancer Cell International*, 15, 49. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0189-x>
- Zhang, Y., Li, H., Han, J., y Zhang, Y. (2015). Down-regulation of microRNA-124 is correlated with tumor metastasis and poor prognosis in patients with lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(2), 1967–1972. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25973090>
- Zheng, F., Liao, Y.-J., Cai, M.-Y., Liu, Y.-H., Liu, T.-H., Chen, S.-P., Xie, D. (2012). The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2. *Gut*, 61(2), 278–289. <https://doi.org/10.1136/GUT.2011.239145>
- Zheng, Z., Reichel, M., Deveson, I., Wong, G., Li, J., y Millar, A. A. (2017). Target RNA Secondary Structure Is a Major Determinant of miR159 Efficacy. *Plant Physiology*, 174(3), 1764–1778. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01898>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824337>