



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
*"Francisco García Salinas"*

Unidad Académica de Ciencias Químicas  
Maestría en Ciencia y Tecnología Química

TESIS

**Evaluación de los IncRNAs: WRAP53, LOC285194, SIRT1-AS y su  
relación con el sistema p53:miR-34 en líneas celulares de  
carcinoma de cérvix.**

Para Obtener el Grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología Química

Presenta:

**Ricardo Castillo Velázquez**

Director:

Dr. Jesús Adrián López

Agosto, 2019

## **Agradecimientos**

Se agradece el apoyo brindado por el Laboratorio de microRNAs de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas así mismo se agradece también a la Maestría en Ciencia y Tecnología Química (MCTQ) de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el recurso financiero otorgado a través de la beca de maestría con registro No. 475985.

## **Agradecimientos Personales**

- A mi madre Yolanda Velázquez Piña por haber creído y confiado en mí siempre en cada etapa de mi vida y darme su cariño y apoyo incondicional.
- A mi padre Orlando Castillo Delgado.
- A mi hermano Iván Castillo Velázquez.
- A mis abuelos Amalia Piña Alejo y Guadalupe Velázquez Prado.
- A mi novia Alejandra Bonilla Segovia (mi mor) por su amistad, paciencia y amor durante la realización de este trabajo.
- A mis amigos Kuri (Humpty Dumpty), Abdel (Abdul), Felipe (Pollo), Luis (Thor) y Gustavo (Milhouse) por ser buenos amigos.
- A mis compañeros de investigación y laboratorio Sergio (Master), Ixa y Angy esperando que sigan por el camino de la ciencia y con pasión por su trabajo.
- Agradezco al comité tutorial conformado por personas de gran capacidad, a mi director de tesis Dr. en C. Jesús Adrián López por guiarme en la elaboración de mi trabajo de tesis, así como por sus buenos consejos durante la realización de este trabajo.

## 1.- Índice

1.1 Lista de Tablas	6
1.2 Lista de figuras	7
1.3 Lista de Abreviaturas	8
2. Resumen	10
2.1 Abstract	11
3. Introducción	12
4. Antecedentes	13
4.1 Cáncer	13
4.2 Cáncer en México	15
4.3 VPH	16
4.4 RNAs no codificantes	19
4.5 MicroRNAs	20
4.6 Familia <i>miR-34</i>	21
4.7 <i>lncRNAs</i>	22
4.8 <i>Wrap53</i>	23
4.9 <i>LOC285194</i>	25
4.10 <i>SIRT1 AS</i>	25
5. Justificación	26
6.1 Hipótesis	27
7. Objetivo general	27
7.1 Objetivos particulares	27
8. Materiales y Métodos	28
8.1 Cultivo celular	28
8.2 Diseño de primers	28
8.3 Extracción de RNA por el método de Trizol	28
8.4 RT-PCR	29
8.5 Extracción de proteínas de líneas celulares	29
8.6 Western blot	29
8.9 Análisis bioinformático	30
9. Resultados	31
9.1 Diseño de Primers	31

9.2 Wrap53	31
9.3 SIRT1 AS	31
9.4 LOC285194	31
9.5 Análisis por bioinformática (predicción de interacción lncRNA-microRNAs)	32
9.5.1 Wrap53	32
9.5.2 LOC285194	35
9.5.3 SIRT1-AS	37
9.6 Extracción de RNA	37
9.7 RT-PCR	38
9.9 Extracción de proteínas y Western blot	40
10. Discusión	42
11. Conclusión	43
12. Perspectivas	44
13. Referencias	45
14. Anexos	50
14.1 Anexo A)	56
14.2 Homo sapiens colon cancer associated transcript 1 (CCAT1), long non-coding RNA	57
14.3 Homo sapiens promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA (PANDAR), long non-coding RNA	59
14.4 Homo sapiens long non coding transcriptional activator of miR34a (LNCTAM34A), long non-coding RNA.	60
14.5 Anexo B)	50

## 1.1 Lista de Tablas

Tabla 1. Interacciones de WRAP53 con la familia miR-34 a nivel de la región semilla del miRNA con la secuencia de WRAP53.....	32
Tabla 2. Interacciones de WRAP53 con la familia miR-34 a nivel de la región brazo (no semilla) del miRNA con la secuencia de WRAP53. .....	34
Tabla 3. Interacciones de LOC289451 con la familia miR-34 a nivel de la región semilla del miRNA con la secuencia de LOC285194. .....	35
Tabla 4. Interacciones de LOC285194 con la familia miR-34 a nivel de la región brazo (no semilla) del miRNA con la secuencia de LOC285194. .....	36

## 1.2 Lista de figuras

Figura 1. Características adquiridas por las células cancerígenas..	14
Figura 2. Defunciones por cáncer en México.	15
Figura 3. Genoma del VPH	17
Figura 4. Función de las oncoproteínas E6 y E7..	18
Figura 5. Mecanismo de acción de la oncoproteína E6..	19
Figura 6. Vía de activación de la familia miR-34 mediante p53. .	21
Figura 7. Tipos de lncRNAs según su posible origen.	22
Figura 8. Mecanismo de Wrap53 sobre el RNAm de p53	24
Figura 9. Altos niveles de Wrap53 en tejido y líneas celulares.	24
Figura 10. Diseño de primers para Wrap53.	31
Figura 11. Diseño de primers para Sirt1 AS.	31
Figura 12. Diseño de primers para LOC285194.	32
Figura 13. Gráfico de relacion lncRNA Wrap53 vs familia miR-34 (región semilla).	33
Figura 14. Gráfico de relacion lncRNA Wrap53 vs familia miR-34 (región del brazo).	35
Figura 15. Gráfico de relacion lncRNA LOC285194 vs familia miR-34 (región semilla).	35
Figura 16. Gráfico de relacion lncRNA LOC285194 vs familia miR-34 (región del brazo).	37
Figura 17. Análisis de la familia miR-34 y el lncRNA Sirt1-AS.	37
Figura 18. Extracción representativa de RNA total mediante trizol.	38
Figura 19. RT-PCR Sirt1-AS/LOC285194/Wrap53.	39
Figura 20. RT-PCR para Wrap53..	40
Figura 21. Western Blot p53/Actina.	41
Figura 22. Diseño experimental.	51
Figura 23. Diseño experimental de una esponja molecular.	51
Figura 24. Crecimiento de E. Coli. se observa.	52
Figura 25. Cajas de E. Coli.	53
Figura 26. Restricción enzimática.	54
Figura 27. Ensayo de resistencia a antibiótico..	55
Figura 28. Extracciones de RNA de tejido de cuello uterino.	56

### 1.3 Lista de Abreviaturas

**3 Bp:** Presencia de un emparejamiento de bases contiguas de Watson Crick para el miRNA.

**CaCu:** Cáncer cervicouterino

**dG\_hybrid =  $\Delta G_{\text{hybrid}}$**  Una medida de estabilidad para el híbrido miRNA: target como se calcula por RNAhybrid.

**dG\_nucl =  $\Delta G_{\text{nucl}}$**  Una medida del potencial de nucleación para la hibridación de miRNA: diana.

**dG\_total =  $\Delta G_{\text{total}}$**  Una medida del cambio de energía total de la hibridación.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**ID del sitio:** Sitios pronosticados, numerados sucesivamente a lo largo de la secuencia de destino.

**IMSS:** Instituto Mexicano del Seguro Social

**INEGI:** Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática

**ISSSTE:** Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado

**miRNA:** microRNAs.

**MPM:** Marcador de peso molecular

**mRNA:** RNA mensajero

**NIC:** Neoplasia intraepitelial cervical

**Offseed Consv:** Puntuación de conservación por el programa para nucleótidos dentro del sitio objetivo, pero fuera de la región complementaria de semillas.

**pB:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa



**Posición del sitio:** Posición inicial y final de la región objetivo (sitio) predicha que estará vinculada al miRNA.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**RT-PCR:** Transcripción reversa acoplada a la Reacción en cadena de la polimerasa.

**Seed Access:** Una medida de accesibilidad estructural calculada por el promedio de probabilidades monocatenarias de los nucleótidos en la región objetivo complementarios a la semilla de miRNA.

**Seed Consv:** Puntaje de conservación por el programa para la sub-región objetivo complementaria a la semilla del miRNA.

**Seed Start:** Región objetivo complementarias a la semilla del miRNA.

**Seed Type:** Tipo de interacción del miRNA 6mer, sitios semillas offset 6mer, 7mer-A1, 7mer-m8 y 8mer.

**Site Access:** Una medida de accesibilidad estructural calculada por el promedio de probabilidades monocatenarias de los nucleótidos en el sitio de unión predicho.

**Site Consv:** Puntaje de conservación por el programa para el sitio de enlace.

**Site End:** Posiciones finales de la región de destino (sitio) que se predice que estará unida al miRNA.

**Site Start:** Inicio de la región objetivo (sitio).

**Target Leng:** Longitud del objetivo.

**UTR:** Región no codificante del mRNA.

**VPH:** Virus del papiloma humano.

## 2. Resumen

El cáncer cervical es la tercera causa de muerte para la población femenil mexicana. La infección por virus del papiloma humano de alto riesgo (cepas VPH 16 y 18) está altamente asociado con la aparición del cáncer de cuello uterino. Entre las consecuencias causadas por el VPH se encuentran la desregulación de las proteínas E2F (involucrada en el control del ciclo celular) y p53 la cual actúa como factor transcripcional de la familia miR-34 la cual pertenece a un grupo de RNAs no codificantes (miRNAs) importantes para el control del ciclo celular y la regulación de diversos tipos de RNAs codificantes y no codificantes. Sin embargo, los miRNAs no son el único tipo de RNAs no codificantes (ncRNAs) que se encuentran desregulados en procesos cancerígenos ya que se sabe que los RNAs no codificantes largos (lncRNAs) están relacionados con procesos celulares como proliferación celular, muerte celular, replicación celular, etc., y también se ven desregulados en procesos cancerígenos. En este estudio se trabajó con los lncRNAs Wrap53, LOC285194 y Sirt1-AS buscando su presencia en líneas celulares de carcinoma de cérvix VPH positivas y negativas, y su potencial regulación que podría tener la familia miR-34 mediante análisis bioinformáticos. Se analizó la expresión de la proteína p53 dentro de las líneas celulares de cérvix ya que forma parte del sistema p53-miR-34. Se detectaron los lncRNAs en muestras con DNA indicando que los primers funcionan adecuadamente, sin embargo, en muestras de RNAs no se obtuvo amplicon de LOC285194 y Sirt1-AS, mientras que de Wrap53 no fue concluyente su análisis, ya que en algunos experimentos su expresión era positivo y en otros negativo. La expresión de la proteína p53 no mostró cambios significativos entre las líneas celulares analizadas.

## **2.1 Abstract**

Cervical cancer is the third cause of death in the Mexican female population. Infection with high-risk human papilloma virus (i.e. HPV strains 16 and 18) is highly associated with the onset of cervical cancer. Among the consequences caused by HPV are the deregulation of E2F proteins (involved in the control of the cell cycle) and p53. The latter acts as a transcriptional factor of the miR-34 family which belongs to a group of non-coding RNAs (microRNAs) important for the control of the cell cycle and the regulation of various types of coding and non-coding RNAs. However, microRNAs are not the only type of non-coding RNAs (lncRNAs) that are deregulated in carcinogenic processes since lncRNAs are known to be involved in cellular processes such as cell proliferation, cell death, cell replication, etc., and are also deregulated in carcinogenic processes. In this study we worked with the lncRNAs Wrap53, LOC285194 and Sirt1-AS looking for their presence in HPV positive and negative cervical carcinoma cell lines. We also performed a bioinformatics analysis on the regulatory capacity that the miR-34 family could have on these lncRNAs. Finally, we performed the identification of the p53 protein within the cervical cell lines.

### **3. Introducción**

El cáncer es una patología que afecta a células de diversos tipos de tejidos (Rohlfis et al., 2000). Las células tumorales adquieren diversas características que resultan en ventaja respecto a las células sanas, dichas ventajas afectan principalmente la regulación de procesos relacionados al ciclo celular, metástasis, proliferación celular, etc. Debido a la expresión alterada de diferentes biomoléculas (Hanahan & Weinberg, 2011). Estas moléculas son principalmente proteínas, genes codificantes y no codificantes las cuales toman importancia ya que son uno de los principales blancos para las diferentes terapias anticancerígenas o también usadas como marcadores moleculares en el diagnóstico. Algunas de las ventajas que adquieren las células cancerosas son gracias a la integración de genomas virales en la célula huésped y/o a eventos de ruptura, translocación y recombinación cromosómica (Weinberg, 2013) que modifican la expresión génica y por ende los diferentes procesos celulares. Siendo el virus del papiloma humano (VPH) un ejemplo de este fenómeno, ya que se le ha reportado como el principal agente etiológico del cáncer cervical (Zur Hausen, 1996). La expresión de diversas oncoproteínas presentes en el VPH conducen a cambios moleculares y celulares llevando a la transformación celular; iniciando el desarrollo de neoplasias intraepiteliales que posteriormente culminan en eventos cancerígenos. Dentro de los cambios más importantes causados por el VPH, se encuentra la desregulación de numerosos genes debido a la integración del genoma viral (Bosch, et al, 2002), así como la regulación por RNAs no codificantes (ncRNA), que pueden ser tanto microRNAs (miRNAs) como RNAs largos no codificantes (lncRNA), ambos han sido reportados como sistemas de regulación en la expresión genética susceptibles a alterar sus niveles de expresión en procesos tumorigénicos en ocasiones favoreciendo los procesos cancerígenos o brindando algún tipo de resistencia contra estos (Prensner & Chinnaiyan, 2011).

## 4. Antecedentes

### 4.1 Cáncer

La organización mundial de la salud (OMS) ubica al cáncer como una de las principales causas de muerte a nivel mundial junto con las enfermedades vasculares, siendo responsable de 8.2 millones de defunciones y 14 millones de nuevos casos en el año 2017 teniendo como pronóstico que esta cifra aumente a 22 millones de casos en las siguientes dos décadas. Las zonas de Asia, África, América central y América del sur presentan mayor incidencia con el 60% de los nuevos casos y el 70% de las defunciones (OMS, 2017).

La mayoría de los tumores en humanos se generan en regiones epiteliales. Los epitelios son un conjunto de células que se alinean recubriendo los diversos tejidos del cuerpo y por debajo de ellos se encuentra la lámina basal que separa las células epiteliales del resto del tejido (Schafer & Brugge, 2007).

En la actualidad se sabe que existen seis características biológicas adquiridas por las células cancerígenas durante su progresión Figura 1 (Hanahan & Weinberg, 2011), las cuales se definen como:

1. **Autosecreción de señales de crecimiento.** Las células cancerosas adquieren la habilidad de proliferar sobre sus contrapartes sanas debido a la secreción de factores de proliferación como TGF- $\beta$ .
2. **Pérdida de sensibilidad a señales inhibitoras de crecimiento:** Las células cancerosas no responden a la actividad de genes supresores de tumores.
3. **Evasión de la muerte celular programada (apoptosis):** Las células suprimen genes y vías de señalización que desembocan en apoptosis.
4. **Potencial de replicación ilimitada:** Las células activan genes específicos que les permitan replicarse indefinidamente.
5. **Angiogénesis:** Las células adquieren la capacidad de generar sus propios vasos sanguíneos.

6. **Invasión y Metástasis:** Las células cancerígenas ganan la habilidad de invadir tejidos tanto cercanos como distantes (Hanahan & Weinberg, 2011).

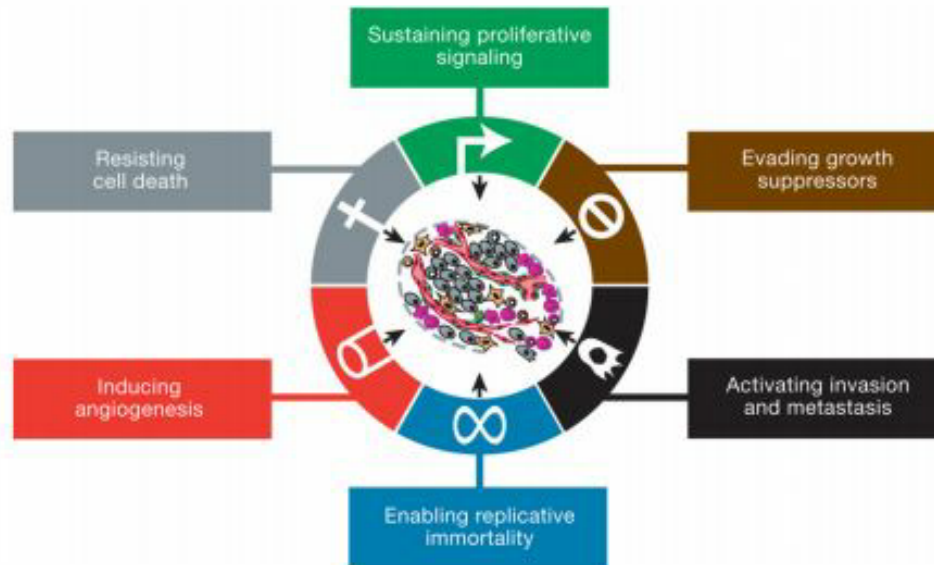


Figura 1. Características adquiridas por las células cancerígenas. En la figura se observan las 6 características clave que adquiere una célula normal al momento de presentarse un proceso oncogénico (Tomada y modificada de Weiberg and Hanhan, 2011).

Estas seis características marcan el principio de su entendimiento, ya que aún se le considera una enfermedad genética compleja que involucra la desregulación de oncogenes y genes supresores de tumores (Prensner & Chinnaiyan, 2011, George A Calin & Croce, 2006).

La gran mayoría de los tipos de cáncer se pueden clasificar en dos categorías: la primera corresponde a los carcinomas (células escamosas) provenientes de células que forman láminas y los adenocarcinomas que constan de epitelios de células especializadas en secretar sustancias a los ductos o cavidades del cuerpo humano (Weinberg, 2013). Se ha observado que en muchos de los procesos celulares relacionados al desarrollo del cáncer intervienen los microRNAs y lncRNAs y con ello todos los procesos que estos regulen cooperan en el avance hacia la carcinogénesis o bien interfieren con dichos procesos (Hauptman & Glavač, 2013).

## 4.2 Cáncer en México

En México se ha mostrado la existencia de una relación entre la edad de una mujer y el cáncer cérvico uterino, ya que las infecciones por VPH que llegan a desencadenar procesos de carcinogénesis, empiezan a edades tempranas y se desarrollan lentamente si no son diagnosticadas y atendidas a tiempo (INEGI, 2013). Lo anterior ha permitido al cáncer ser la tercera causa de muerte en cuanto a población general se refiere; sin embargo, el cáncer del cuello uterino se ubica en el segundo lugar con 4,560 decesos en la población femenina al año, con una incidencia de 13,960 casos al año Figura 2 (OMS, 2017). Este fenómeno se encuentra estrechamente relacionado con la falta de prevención y la insuficiencia de métodos de diagnóstico altamente efectivos.

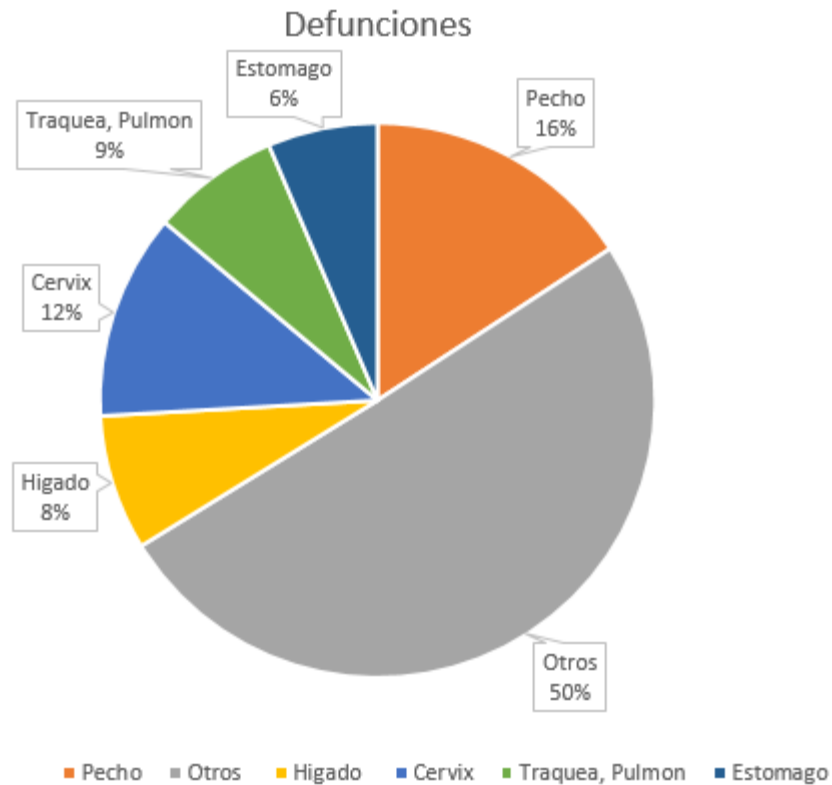


Figura 2. Defunciones por cáncer en México. En esta figura se muestran los principales tipos de carcinomas relacionados con defunciones en mujeres para México (Tomado de OMS, 2017).

La infección por VPH es localizada normalmente en membranas mucosas y se le asocia con lesiones benignas tales como verrugas. No obstante, algunas cepas virales son altamente riesgosas al existir pacientes incapaces de librarse de ellas de manera natural, siendo esta situación un factor que se relaciona con algunos tipos de carcinomas presentes en la región ano-genital (Daud et al., 2011).

### **4.3 VPH**

Los VPHs son virus pequeños con un genoma de alrededor de 8000 pb de DNA de doble cadena circular, que infectan tejidos epiteliales y está asociado con el 99.0% de los casos de cáncer cérvico uterino Figura 3. Algunos tipos de VPH causan verrugas, mientras otros pueden aumentar el riesgo de cáncer de cérvix (zur Hausen, 1991). Esto permite poder clasificar las cepas del virus en alto y bajo riesgo, siendo los VPH tipo 6 y 11 considerados genotipos de bajo riesgo que generan verrugas mientras los VPH 16 y 18 se consideran los genotipos de alto riesgo pues se les ha encontrado en la mayor parte de los casos de cáncer cérvico uterino. Durante su ciclo viral, el VPH se expresa de manera episomal pero, en ocasiones, el genoma del virus se puede integrar al genoma del huésped, lo que provoca un incremento en la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, aumentando el riesgo de la transición de genotipos celulares sanos a genotipos cancerígenos (E. M. Burd, 2003; Zur Hausen et al, 1983).



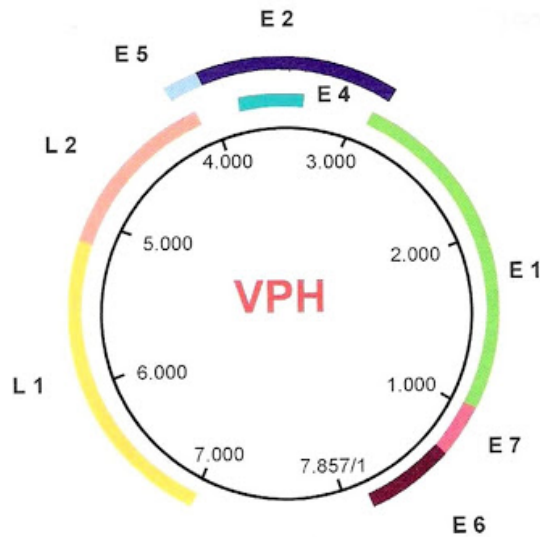


Figura 3. Genoma del VPH. El genoma del VPH se organiza principalmente en dos tipos de genes: Early (Tempranos) y Late (Tardíos), los primeros mantienen una relación con los procesos infecciosos del virus mientras los segundos se encargan de generar proteínas de la capsula viral. (Tomada de Murti, 1998).

E6 y E7 son oncoproteínas de las que se sabe su función, E6 se une a la proteína supresora de tumores p53 a través de la interacción con la ligasa asociada a E6 (E6AP) causando la ubiquitinación y degradación de p53, Figura 4b. Esto significa que la pérdida de p53 no permitiría generar un proceso de arresto del ciclo celular y/o la subsecuente apoptosis cuando la célula así lo requiera. Por otra parte, la proteína viral E7 actúa liberando al factor E2F de su proteína supresora pRb, lo que permite la expresión de ciclina D1 y E iniciando procesos de ciclo celular, Figura 4a (Miyashita et al., 2009, Sathish, Wang, & Yuan, 2014).

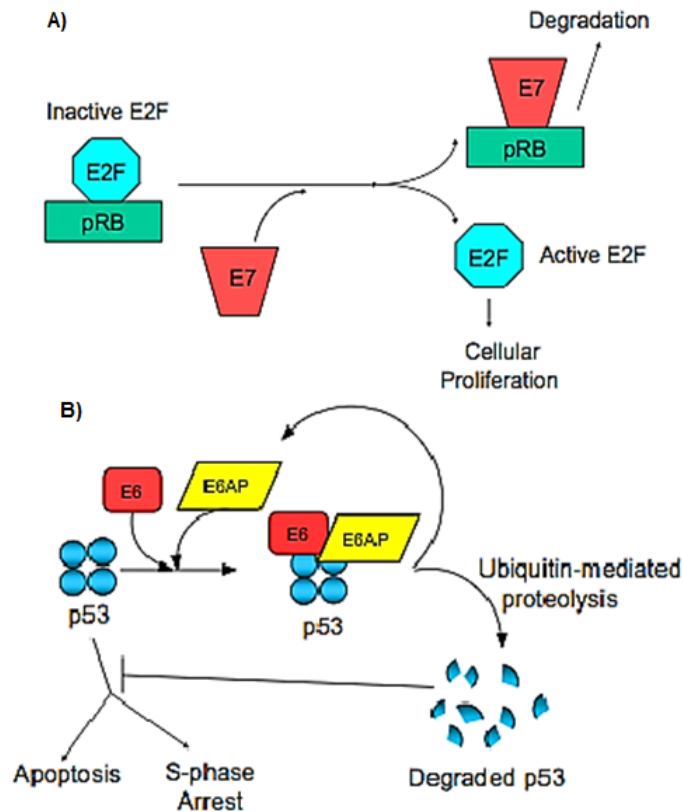


Figura 4. Función de las oncoproteínas E6 y E7. A) Modelo de como la proteína pRB regula al factor E2F el cual al estar unido a pRB permanece inactivo y no permite la proliferación celular, sin embargo, la oncoproteína E7 tiene como función secuestrar a pRB permitiendo la proliferación celular. B) El modelo muestra la degradación de la proteína supresora de tumores p53 mediante la acción del complejo E6. Se cree que la degradación sucede mediante un secuestro y posterior ubiquitinación de p53 a su vez esto evita el arresto del ciclo celular (Tomado de K Münger, 1992).

La historia natural del cáncer cérvico uterino muestra a una enfermedad con progreso continuo y gradual partiendo de la neoplasia intraepitelial cervical 1 (NIC1), que avanza hacia grados más severos de lesiones, tal como: NIC2, NIC3 y, finalmente, a un carcinoma. NIC1, generalmente indica infección activa por VPH mientras que NIC2 y NIC3, representan un posible proceso cancerígeno en progreso. La mayoría de las displasias tienden a desaparecer como parte del proceso viral, donde la progresión de una lesión de bajo a alto riesgo, aumenta conforme no exista un tratamiento preventivo (Eileen M Burd, 2003). Algunos aspectos del proceso tumorigénico desencadenado por VPH pueden estar ligados a un tipo de regulación genética que depende de RNAs no codificantes, en

específico. La regulación mediante microRNAs, por ejemplo, muestra que se encuentran desreguladas en diferentes procesos patológicos, incluido el cáncer (Calin A et al., 2004). Tal es el caso del miRNA supresor de tumores miRNA-34a, el cual se ha observado que en procesos inducidos por VPH como los carcinomas de cuello uterino su factor transcripcional p53 es suprimido por la oncoproteína viral E6 y esto a su vez genera una baja o nula expresión del miRNA Figura 5 (Wang et al., 2009).

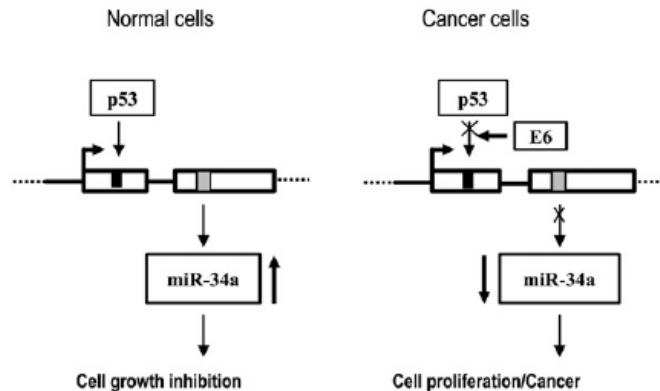


Figura 5. Mecanismo de acción de la oncoproteína E6. El modelo muestra como el miR-34a forma parte en el desarrollo del cáncer. En células normales se expresan la proteína p53 que activa la expresión del miR-34a el cual actúa como un mecanismo de control de la proliferación y crecimiento celular a través de sus mRNA blancos. La expresión viral E6 causa la desestabilización de p53 celular y la reducción de miR-34a (Tomada de Wang et al., 2009).

#### 4.4 RNAs no codificantes

De cierta manera, todos los procesos de formación de tumores pueden deberse no solo a la activación y/o desactivación de ciertos tipos de genes codificantes, si no también a los genes no codificantes. Estos pueden regular RNAs mensajeros de diversas maneras e incluso regularse entre ellos mismos sin importar a que clase pertenezcan (Jalali Saakshi, et al., 2013). Entre los de mayor interés se encuentran los miRNAs y los lncRNAs, en ambos casos se tiene un papel activo en diversas patologías (Prensner, J. R., & Chinnaiyan, A. M. 2011, Lugo Trampe, 2009). A continuación, se describirán brevemente sus características.

## 4.5 MicroRNAs

Un microRNA es una secuencia de aproximadamente 22 nt de longitud en su forma madura que se caracteriza por ser complementaria a la región 3' no traducible (3'UTR) del mRNA o mRNAs blancos. Esto es reflejado en su capacidad de acción ya que a los microRNAs se les involucra en diferentes tipos de procesos celulares, como, por ejemplo: el desarrollo y función del sistema inmune, la diferenciación celular, el control de la proliferación celular, el metabolismo, etc. (Baltimore et al., 2008, Hildebrand et al., 2011, Lee et al., 1993, Trampe A, 2009).

En cuanto a su biogénesis, esta comienza en el núcleo, donde la RNA polimerasa II y/o RNA polimerasa III se encargan de generar transcritos primarios de microRNAs (pri-miRNAs) que serán procesados por las enzimas DROSHA y DGCR8 para generar un pre-miRNA de 60 a 100 nt, el cual tiene una estructura secundaria de tipo tallo-asa. El pre-miRNA es exportado del núcleo el receptor de membrana nuclear Exportina 5 dependiente de la proteína Ran-GTP. Una vez fuera del núcleo, otro complejo proteico denominado Dicer produce los microRNAs maduros de 21 a 25 nt (Bartel, 2004), que formarán parte esencial del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC); su complementariedad de bases con el mRNA blanco permite el silenciamiento de los RNA mensajeros generando la represión de la expresión proteica. Cabe señalar que si la hibridación entre el miRNA y su mRNA blanco es total inducirá un corte sobre el mRNA mientras que si la hibridación es parcial generará represión traduccional (Libri et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, los microRNAs están involucrados en diversos procesos celulares y esto no excluye patologías como el cáncer, donde los genes no codificantes pueden sufrir alteraciones tales como amplificaciones, delaciones y/o mutaciones ya que muchos microRNAs se ubican cerca de regiones frágiles en el DNA (Calin and Croce, 2006), Esto genera que en el cáncer exista la disminución o el aumento en los niveles de los microRNAs, por lo que se pueden clasificar en oncomiRs y antioncomiRs, dependiendo incluso de su función, es decir, del tipo de mRNA que tienen como blanco (He et al, 2019).

## 4.6 Familia miR-34

Existen diversos microRNAs, pero para este trabajo la familia miR-34 es de interés debido a que se conoce que su expresión depende de la respuesta de daño hacia el DNA y son dependientes directos de la proteína p53, Figura 6 (Hermeking, 2007). Esta familia se encuentra conformada por 3 elementos: miR-34-a, b, c, que al igual a p53, la expresión se encuentra suprimida en diversos tipos de carcinomas (He et al, 2007).

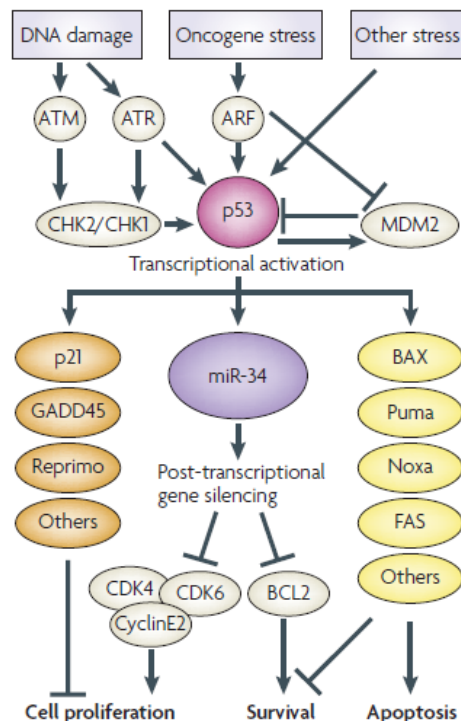


Figura 6. Vía de activación de la familia miR-34 mediante p53. miR-34 es un blanco transcripcional directo de p53, que regula los genes necesarios para la proliferación y la supervivencia. Junto con otros blancos p53, como p21 y BAX, los miRNAs de la familia miR-34 detienen el crecimiento celular y promueven la muerte celular (Tomado de He et al, 2007).

## 4.7 lncRNAs

Por otra parte, los RNA no codificantes largos conforman una familia de RNAs que en los últimos años han llamado la atención de la comunidad científica al estar implicados en diversos procesos celulares. Hace algunos años se decía que gran

parte del material genético era basura (DNA junk), esto debido a que se desconocía la función y no se le podía asignar una actividad, uso o aplicación a gran parte del DNA que contienen las células aparte del codificar proteínas (material genético codificante). Sin embargo, gracias a los avances de la tecnología en materia de biología molecular y genética, hoy en día se sabe que mucho del DNA que se creía basura en realidad se transcribe en forma de RNA teniendo algún tipo de función reguladora de la expresión genética (Hauptman & Glavač, 2013).

Los lncRNAs pertenecen a un grupo de RNAs que no codifican para proteínas, aunque pueden presentar marcos de lectura abierta no funcionales, se sabe que su tamaño es superior a los 200 nt, son transcritos por la RNA polimerasa II y pueden presentar una cola poli-adenilada (PolA) y una caperuza (CAP) en sus extremos 3' y 5', respectivamente; esto los asemeja mucho al mRNA, aunque son mucho más pequeños en tamaño (Quinn & Chang, 2016).

Aunque mucha de la información respecto a su función y/o biogénesis aún están bajo estudios, los lncRNAs se pueden clasificar de diversas formas, una de las más usadas tiene que ver con respecto a su posible origen, Figura 7 (Kung, et al, 2013).

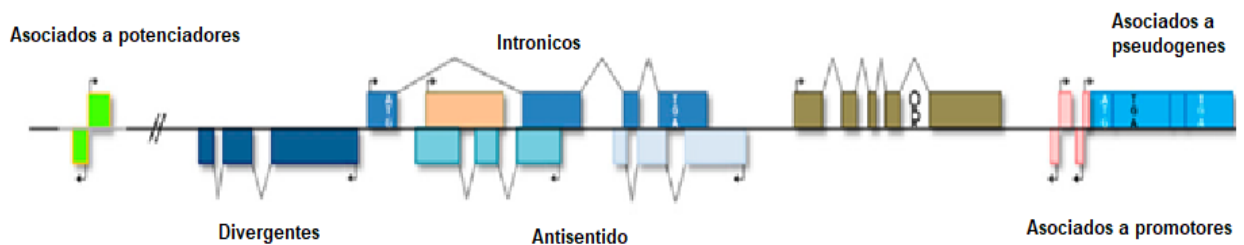


Figura 7. Tipos de lncRNAs según su posible origen. Los lncRNAs pueden ser unidades de transcripción independientes, o pueden transcribirse a partir de potenciadores (eRNA), promotores (TSSa-RNAs) o intrones de otros genes, producto de pseudogenes o antisentidos de otros genes. Los lncRNAs también pueden albergar uno o más RNA pequeños dentro de sus unidades de transcripción (Tomado de Kung et al, 2013).

Entre las diversas funciones asociadas a los lncRNAs se menciona su papel en procesos como la impronta genómica, inactivación cromosomal, regulación epigenética y reguladores de microRNAs y mRNA, etc. (Quinn & Chang, 2016).

Estas capacidades reguladoras, son las que en los últimos años han llevado a la comunidad científica a investigar a fondo el papel de los lncRNAs y es, gracias a esto, que se les ha relacionado con procesos patológicos como el cáncer, tal como lo son los casos de Wrap53, LOC285194 y SIRT1 AS (Farnebo, 2010, Liu, 2013, Wang, 2016).

#### **4.8 Wrap53**

Wrap53 es un lncRNA que se sobrelapa con el gen de p53, se sabe además que Wrap53 se expresa como tres isoformas,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , donde sólo la forma  $\alpha$  contiene el exón número 1 que puede regular a p53 (Mahmoudi et al, 2009). Esto posiblemente se lleva a cabo mediante la interacción con la región 5'UTR protegiendo al mRNA de la degradación mediante un modelo en el cual el RNA muestra complementariedad de secuencia perfecta en el primer exón de p53, lo que sugiere alguna regulación de tipo lncRNA anti-sentido y a nivel postranscripcional, Figura 8 (Farnebo, 2010).

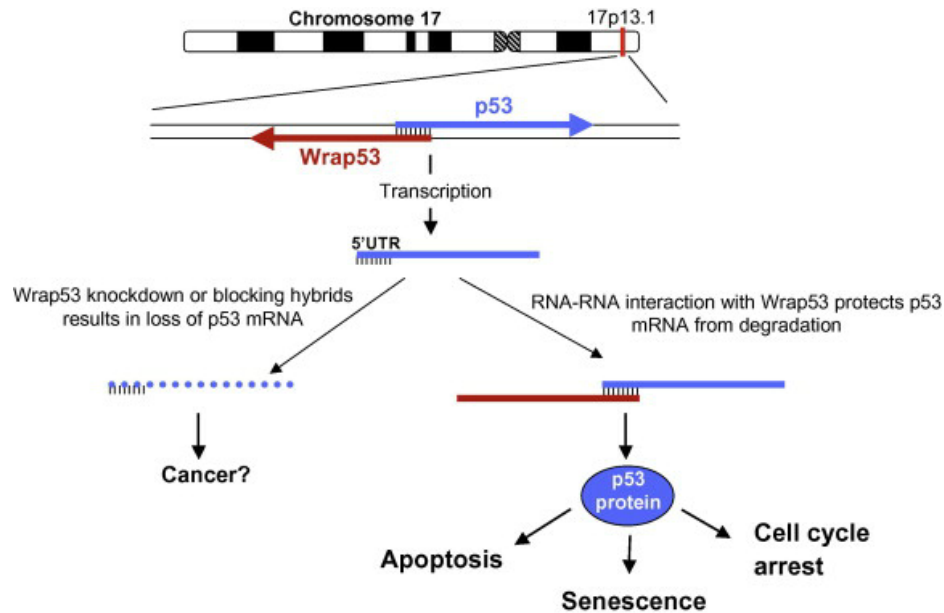


Figura 8. Mecanismo de Wrap53 sobre el mRNA de p53. Modelo para la regulación mediada por Wrap53 de p53. Wrap53 y p53 se coexpresan en las células y la interacción entre estos dos transcritos a través de sus regiones complementarias protegen el RNA mensajero de p53 de la degradación (Tomado de Farnebo, 2010).

Sin embargo, aunque se sugiere que este lncRNA “protege” a la proteína p53, es considerado como un lncRNA pro-cancerígeno debido a que se ha sobre-expresado en algunas líneas celulares y carcinomas de colon Figura 9 (Zhu, 2018).

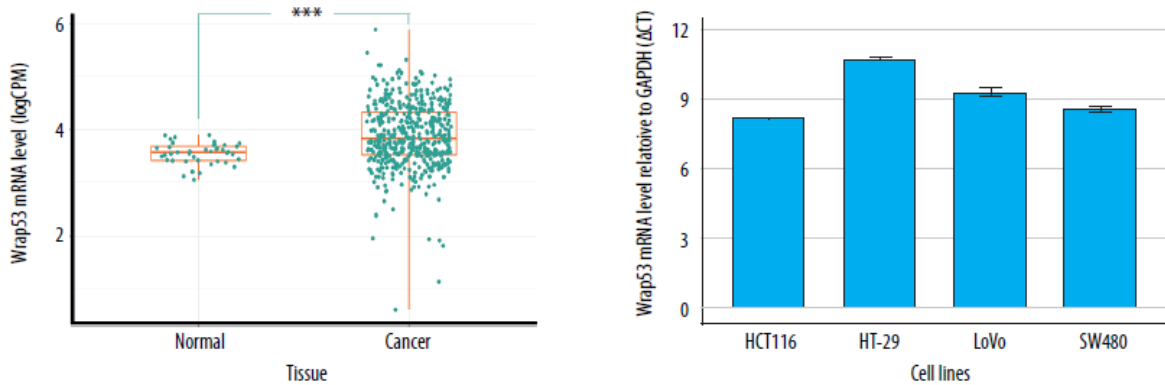


Figura 9. Altos niveles de Wrap53 en tejido y líneas celulares. El análisis muestra una mayor expresión de Wrap53 en tejidos de cáncer colorrectal que en tejidos normales, además las líneas celulares de cáncer colorrectal indican que Wrap53 estaba altamente expresado en 4 líneas celulares (Tomado de Zhu, 2018).



#### **4.9 LOC285194**

El lncRNA LOC285194 también conocido como LSAMP antisentido RNA 3 o TUSC7, posee alrededor de 2105 nt de longitud y se ubicada en el chr3q13.31. Este lncRNA ha mostrado un posible efecto en pacientes con osteosarcoma, favoreciendo el incremento de la proliferación celular al encontrarse disminuido, por lo que fue sugerido como posible inductor de p53 (Liu, 2013, Qi, 2013). A su vez, se muestra su participación en la regulación negativa sobre el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Pasic, 2010) y asociación con una pobre prognosis en diversos tipos de cáncer: adenocarcinoma pancreático ductal, carcinoma escamoso de esófago, osteosarcoma, carcinoma colon rectal; en donde se ha encontrado disminuido, probablemente debido al lncRNA de tipo anti-oncogénico (Tong, 2014, Qi, 2013).

#### **4.10 SIRT1 AS**

Sirt1 es una proteína desacetilasa de clase III dependiente de NAD. Sirt1 regula la proliferación de mioblastos y la diferenciación, además de alojar a un AS lncRNA transcrito de Sirt1, el cual se localiza en la región 3, 'región no traducida (3' UTR) y que posiblemente interactúa con el miRNA-34 atenuando su función; por lo que actuaría como un posible onco-lncRNA. No obstante, miR-34 es un elemento que se encuentra en la cascada de señalización de p53 e inhibe la actividad de la proteína SIRT1 (Keller, 2011, Wang, 2016).

## 5. Justificación

Los RNAs no codificantes (ncRNA) juegan un papel importante en diversos procesos celulares incluido el cáncer, a través de la regulación de oncogenes o genes supresores de tumores. Los lncRNAs pueden regular mRNA y/o miRNAs de manera positiva o negativa. Los lncRNAs podrían participar activamente en la adquisición del fenotipo cancerígeno durante las infecciones de VPH en el cuello uterino. Debido a que este agente viral está presente en la mayor parte de los casos de cáncer cérvico-uterino y la expresión de las proteínas virales, así como la integración del genoma viral al genoma huésped modifican la expresión de diversos genes incluyendo los ncRNA. Se ha observado que la expresión de algunos lncRNAs y miRNAs está asociada a cáncer cérvico-uterino por lo que un análisis en líneas celulares de cáncer cervico-uterino puede dar indicios de si la expresión alterada de Wrap53, LOC28 y SIRT1 AS son la causa o la consecuencia del desarrollo del cáncer. LOC28 se sugiere que induce a p53 y Wrap53 estabiliza el mRNA de p53 lo que llevaría a un incremento de la expresión de este factor transcripcional que a su vez generaría la expresión de los miembros de la familia miR-34. Sin descartar que la expresión de los lncRNAs puede intervenir en procesos relacionados con mRNA, miRNAs, proteínas y otras biomoléculas que pueden ocasionar algún efecto de carácter epigenético desregulando de manera importante los procesos celulares. De ahí la importancia de identificar la presencia de algunos de los posibles lncRNAs relacionados a cáncer en líneas celulares, así establecer si existe una relación de estos lncRNAs (Wrap53, LOC28 y SIRT1 AS) con la familia miR-34.

## **6.1 Hipótesis**

Si los lncRNAs Wrap53, LOC28 y SIRT1 AS tienen un papel activo en diversos procesos celulares, entonces es posible que su expresión sea diferencial en líneas celulares inmortales y tumorigénicas de cáncer cérvico-uterino mediante su interacción con miembros de la familia miR-34.

## **7. Objetivo general**

Evaluar la expresión de los lncRNAs Wrap53, LOC285194 y SIRT1 AS en líneas celulares inmortales y tumorigénicas VPH16, VPH18 y su relación con el sistema p53-miR-34.

### **7.1 Objetivos particulares**

- Diseño de los primers para los lncRNAs Wrap53, LOC285194 y SIRT1 AS.
- Evaluar mediante RT-PCR la expresión de los lncRNAs en líneas celulares inmortales (HaCaT), tumorigénicas VPH- (C-33) y VPH+ (SiHa, Caski, HeLa).
- Evaluar mediante western blot la expresión de la proteína p53 en líneas celulares inmortales (HaCaT), tumorigénicas VPH- (C-33) y VPH+ (SiHa, Caski, HeLa).
- Evaluar los lncRNAs mediante alineamientos bioinformáticos para determinar su posible interacción con la familia miR-34.

## **8. Materiales y Métodos**

### **8.1 Cultivo celular**

Las líneas celulares tumorigénicas y la línea celular inmortalizada se crecieron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). El medio se enriqueció con 5% de suero fetal bovino (FBS), denominado medio DMEM completo. Para llevar a cabo la propagación celular se realizó un lavado con PBS (2.7mM KCl, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136mM NaCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4) filtrado y se adicionó tripsina al 0.5% e incubando por 5 min, posteriormente se neutralizó con medio DMEM completo. Se realizaron diluciones 1:10 para los pasajes donde crecieron las líneas celulares.

### **8.2 Diseño de primers**

Se buscaron las secuencias de los lncRNAs en la base de datos Gene Bank, una vez obtenida la secuencia de cada uno de los lncRNAs y con la ayuda del software en línea primer-BLAST, se buscaron las parejas de primers las cuales tienen temperaturas de alineamiento muy cercanas entre sí para maximizar su rendimiento, lo cual se logró teniendo un contenido de GC entre 50% y 60%. Se buscó que los primers no formen horquillas (hairpins) ni ser complementarios.

### **8.3 Extracción de RNA por el método de Trizol**

Se levantaron y colocaron las diferentes células provenientes de cajas de Petri en un tubo de 1.5 ml con 1 ml de Trizol y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, se agregó 0.2 ml de cloroformo y se agitó por 15 segundos y se dejó en reposo por 5 minutos; una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 17000 G por 15 minutos a 4°C; se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml. Se agregó 0.5 ml de isopropanol al 100% y se dejó reposar durante 10 minutos para posteriormente centrifugar a 12000 G por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 7500 G durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el RNA en agua libre de RNAsas.

## **8.4 RT-PCR**

Se realizó la técnica reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) mediante SuprScript III Reverse. Se prepararon los mix para la RT en un tubo de 0.2 ml que contuvo 200 nM de primer reverse, 200 nM de NTPS, 1x de buffer de RT-PCR, 1 U de RNAsin, 200 U de SuprScript III Reverse por muestra. Los mix se prepararon en campana de flujo laminar, los reactivos se mantuvieron en hielo para evitar amplicones inespecíficos. Las condiciones de amplificación fueron 42°C por 60 minutos, seguido de 85°C por 10 minutos y un estado de 4°C por tiempo indefinido para la conservación de las muestras.

Posteriormente se realizó la PCR, usando un primer reverse a 200 nM, 200 nM de primer forward, 4 mM de cloruro de magnesio, 200 nM de dNTPs y 1 U de Taq polimerasa. Los tubos se colocaron en el termociclador por un periodo de 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C. Al final de los ciclos se mantuvieron las muestras a 4°C para su estabilidad. Una vez terminado el proceso se migraron las muestras por un gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño de los productos.

## **8.5 Extracción de proteínas de líneas celulares**

La técnica consistió en obtener la proteína mediante lisis celular, macerando y utilizando una solución buffer (Buffer de lisis RIPA (tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, ácido deoxicólico (DOC) 10 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 0.1%, 0.5 mM de 4-(2-aminoetil) clorhidrato de fluoruro de bencenosulfonilo (AEBSF)).

Obtenidas las extracciones proteínicas, se tomaron alícuotas equivalentes a 40 µg de proteína total, se agregó Leamli (Leamli 5X (250 mM tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerol, 10% beta-mercapto-etanol, 0.25% azul de bromofenol) y se hirvieron por 5 minutos para posteriormente cargarse en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%.

## **8.6 Western blot**

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) por 90 minutos a 80 V en buffer de corrida 1x (25 mM tris-base, 192 mM glicina, 1% SDS), posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (BioRad supported

nitrocellulose membrane 0.45 micrómetros) por 180 minutos a 200 mA constantes utilizando buffer de transferencia 1x (25 mM tris-base, 192 mM glicina y 20% de metanol). Después se bloqueó por 2 horas con solución (PBS-tween 1x, leche 5%). Al término del bloqueo se incubó la membrana con anticuerpo primario por 12 horas. El anticuerpo se preparó en solución de anticuerpos (PBS-tween 20 (Bio-Rad) al 1%, 0.25% de albumina sérica bovina (BSA)) 1:1000 para p53. En seguida se procedió a realizar 3 lavados con 10 ml PBS 1X-Tween 20 al 1% durante 10 minutos a 65 rpm. Después se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-mouse 1:15000 para p53 y actina. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X Tween 20 al 1%, realizándose el análisis de la quimioluminiscencia mediante el kit ECL (Santa Cruz Biotechnology) en el foto-documentador (BioRad).

### **8.9 Análisis bioinformático**

Este análisis consistió en el ordenamiento de secuencias de microRNAs versus un blanco permitió visualizar los resultados generados por plataformas de nueva generación y escaneo predictivo, de tal manera que exista la predicción y generación de diagramas con los sitios de interacción; así como tablas con datos útiles al usuario, la relación se genera a partir de las posibles interacciones entre las secuencias a analizar.

## 9. Resultados

### 9.1 Diseño de Primers

El diseño de primers se realizó en el sistema primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) con la finalidad de comprobar la especificidad con la obtención del peso molecular estimado del producto. Se alineó cada uno de los primers con la secuencia a amplificar, obteniendo los siguientes resultados:

### 9.2 Wrap53

FORWARD: GACCAATAGTGCTGATAACATCTTGCGAA

REVERSE: GAGCCATCATCCCAGGCATACAGAC

**Detailed primer reports**

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACCAATAGTGCTGATAACATCTTGCGAA	Plus	29	855	883	63.84	41.38	4.00	2.00
Reverse primer	GAGCCATCATCCCAGGCATACAGAC	Minus	25	1373	1349	65.00	56.00	5.00	1.00
Product length	519								

Products on intended target  
>NM\_018081.2 Homo sapiens WD repeat containing antisense to TP53 (WRAP53), transcript variant 1, mRNA

Figura 10. Diseño de primers para WRAP53.

### 9.3 SIRT1 AS

FORWARD: AATCCAGTCATTAAACGGTCTACAA

REVERSE: TAGGACCATTACTGCCAGAGGA

**Detailed primer reports**

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AATCCAGTCATTAAACGGTCTACAA	Plus	25	1	25	58.53	36.00	5.00	1.00
Reverse primer	TAGGACCATTACTGCCAGAGGA	Minus	22	266	245	60.02	50.00	5.00	0.00
Product length	266								

Figura 11. Diseño de primers para SIRT1 AS.

### 9.4 LOC285194

LOC285194 Forward: TGTGCCTGTTTGACCTCTGA

LOC-285194 Reverse: AGGAAGGATAAAAGACCGACCA

## Detailed primer reports

Primer pair 1										
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
Forward primer	TGTGCCTGTTTGACCTCTGA	Plus	20	1301	1320	59.16	50.00	3.00		3.00
Reverse primer	AGGAAGGATAAAGACCGACCA	Minus	22	1385	1364	58.82	45.45	2.00		0.00
Product length	85									

Figura 12. Diseño de primers para LOC285194.

## 9.5 Análisis por bioinformática (predicción de interacción lncRNA-microRNAs)

Este análisis se realizó mediante la plataforma <http://sfold.wadsworth.org>, ordenando las secuencias de microRNAs versus los lncRNAs visualizando las interacciones entre ellos.

### 9.5.1 Wrap53

Tabla 1. Interacciones de Wrap53 con la familia miR-34 a nivel de la región semilla del miRNA con la secuencia de Wrap53.

miRNA	Site_Position	LogitProbt
hsa-miR-34a-3p	276-289	0.561
hsa-miR-34a-5p	899-918	0.523
hsa-miR-34b-5p	898-919	0.516
hsa-miR-34a-3p	322-334	0.498
hsa-miR-34c-5p	899-919	0.484
hsa-miR-34b-3p	929-964	0.385



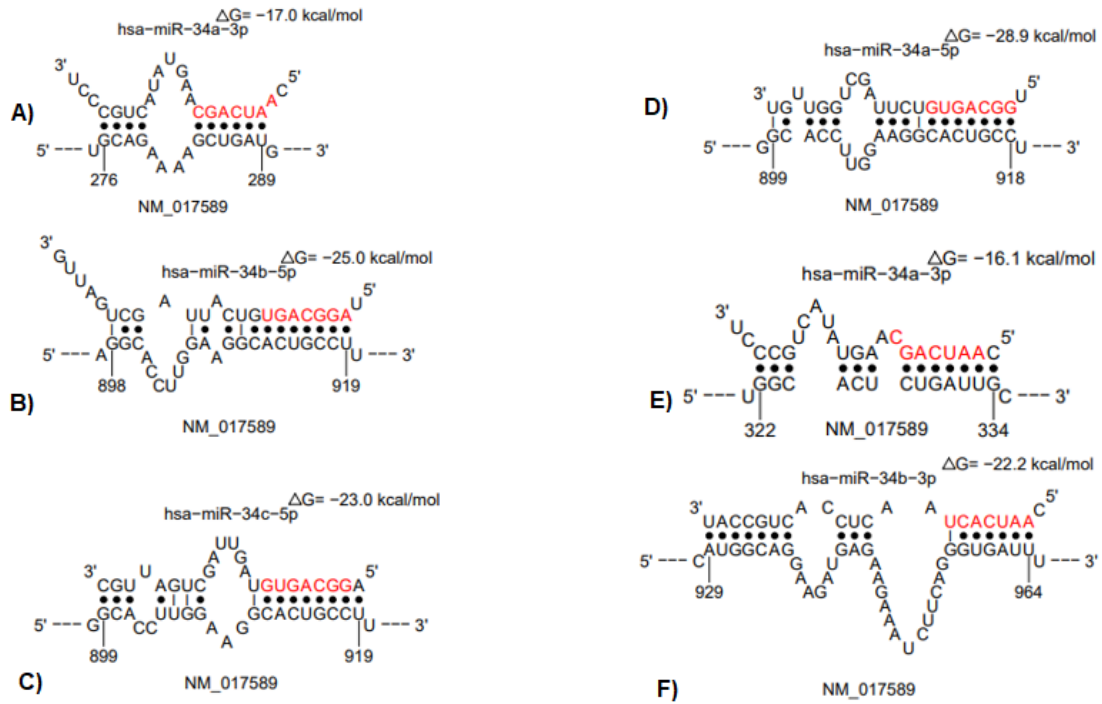


Figura 13. Relación lncRNA Wrap53 vs familia miR-34 (región semilla). Se muestra las posibles interacciones entre la región semilla del miRNA con la región teórica blanco que tendría en el lncRNA.

Tabla 2. Interacciones de Wrap53 con la familia miR-34 a nivel de la región no semilla del miRNA con la secuencia de Wrap53.

miRNA	Site_Position	LogitProb
hsa-miR-34c-3p	407-417	0.842
hsa-miR-34a-5p	823-841	0.825
hsa-miR-34a-5p	257-277	0.817
hsa-miR-34b-3p	540-559	0.805

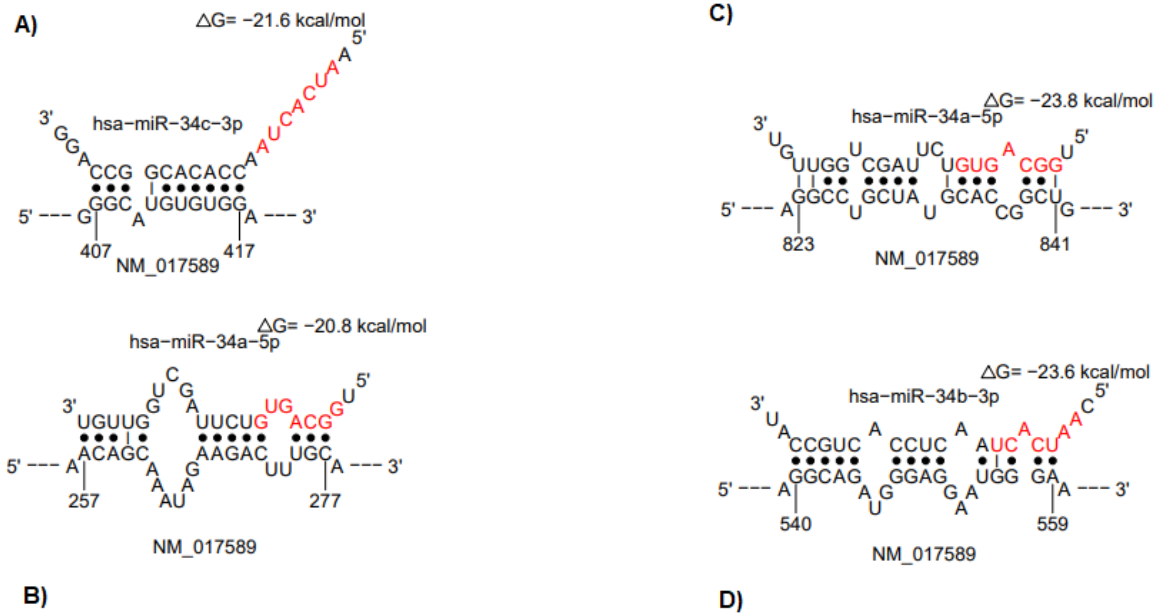


Figura 14. Relación lncRNA Wrap53 vs familia miR-34 (región sin semilla). Se muestra las posibles interacciones entre la región sin semilla del miRNA con la región teórica blanco que tendría en el lncRNA.

### 9.5.2 LOC285194

Tabla 3. Interacciones de LOC289451 con la familia miR-34 a nivel de la región semilla del miRNA con la secuencia de LOC285194.

miRNA	Site_Position	LogitProbability
hsa-miR-34b-5p	1676-1705	0.919
hsa-miR-34c-5p	1676-1704	0.818
hsa-miR-34a-5p	1676-1703	0.779
hsa-miR-34b-3p	683-697	0.576
hsa-miR-34c-3p	681-697	0.548
hsa-miR-34c-3p	589-604	0.531
hsa-miR-34b-3p	555-604	0.45

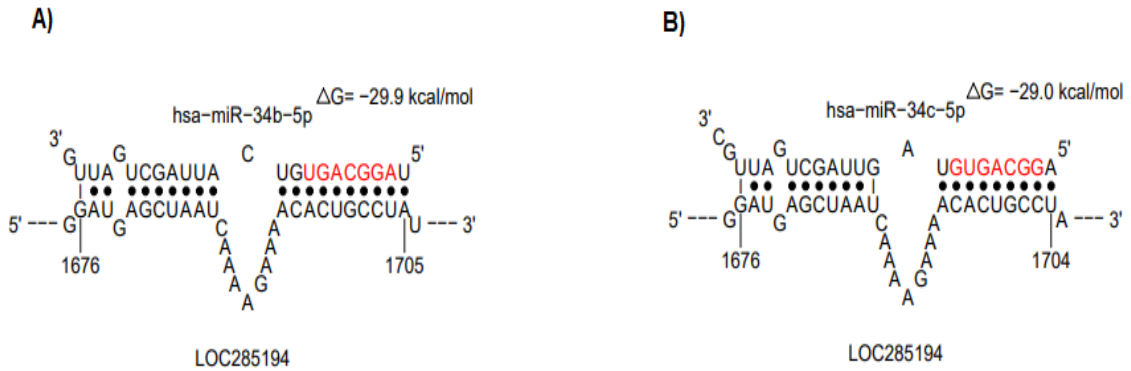


Figura 15. Relación lncRNA LOC285194 vs familia miR-34(región semilla). Se muestra las posibles interacciones entre la región semilla del miRNA con la región teórica blanco que tendría en el lncRNA.

Tabla 4. Interacciones de LOC285194 con la familia miR-34 a nivel de la región brazo (no semilla) del miRNA con la secuencia de LOC285194.

miRNA	Site_Position	LogitProb†
hsa-miR-34a-5p	1711-1734	0.868
hsa-miR-34a-5p	1636-1649	0.866
hsa-miR-34c-5p	2082-2093	0.852
hsa-miR-34a-3p	365-383	0.844
hsa-miR-34b-5p	1537-1561	0.841
hsa-miR-34b-5p	1130-1147	0.834
hsa-miR-34b-5p	1537-1558	0.833
hsa-miR-34a-3p	1540-1562	0.833
hsa-miR-34c-5p	363-384	0.822

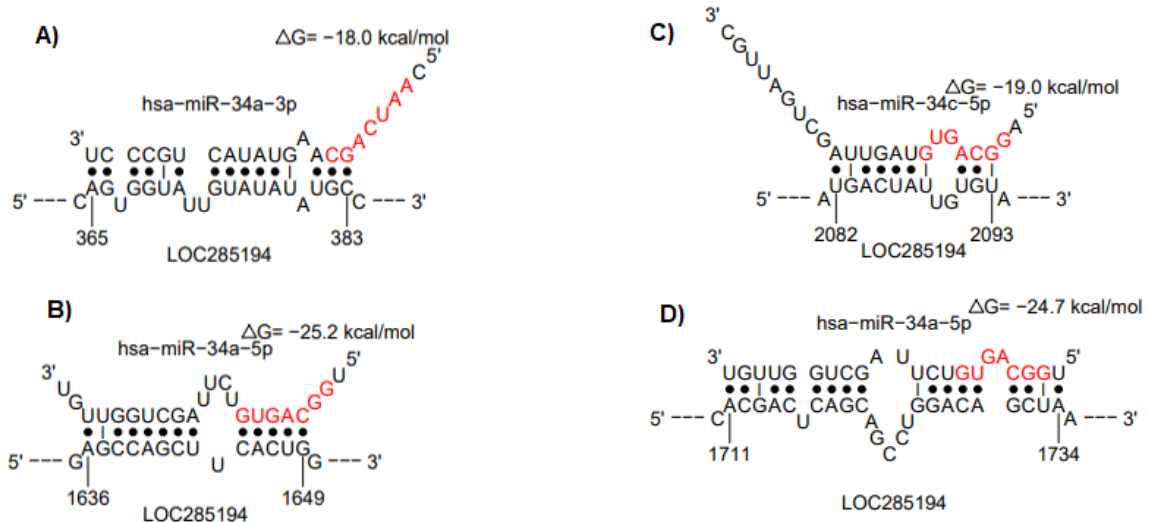


Figura 16. Relación lncRNA LOC285194 vs familia miR-34 (región sin semilla). Se muestra las posibles interacciones entre la no región semilla del miRNA con la región teórica blanco que tendría en el lncRNA.

### 9.5.3 SIRT1-AS

Figura 17. Análisis de la familia miR-34 y el lncRNA SIRT1-AS. Se muestra que no se encontró ninguna relación entre este lncRNA y la familia miR-34 en ningún nivel.

### 9.6 Extracción de RNA

Primero se realizó la extracción de RNA total en las todas las líneas celulares mediante el protocolo de TRIZOL, posteriormente el RNA se resuspendió en agua libre de nucleasas, se cuantificó y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , una vez logradas las extracciones se procedió a realizar las RT-PCR Figura 18.

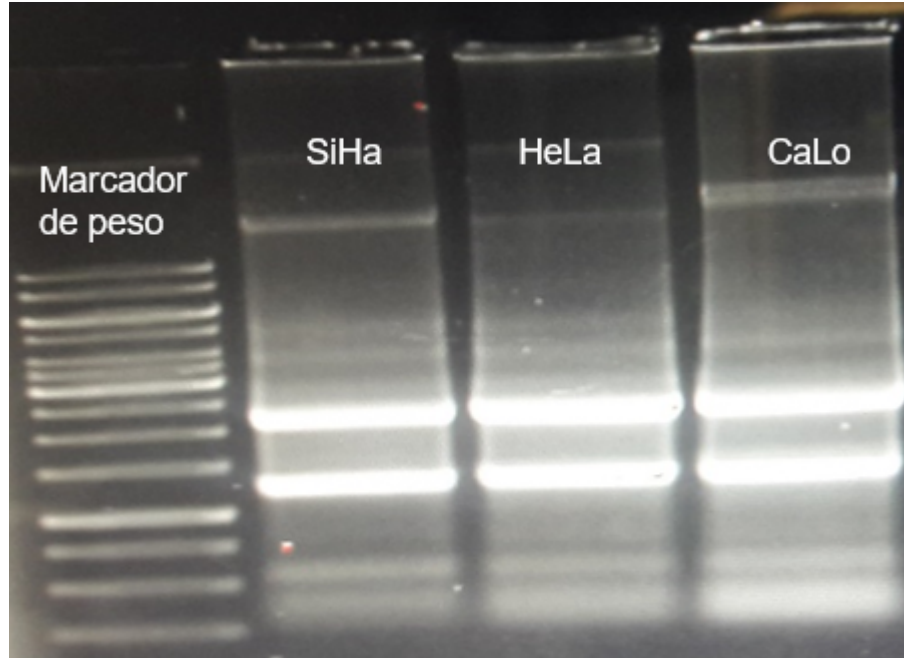


Figura 18. Extracción de RNA total mediante TRIZOL. Se muestra la calidad del RNA total extraído de algunas de las líneas celulares.

### 9.7 RT-PCR

Las RT-PCR se realizaron inicialmente en la línea celular SiHa con el fin de estandarizar el protocolo de amplificación para los 3 RNA largos no codificantes de interés, Figura 19, como parte de estos experimentos se encontró que sólo Wrap53 amplificó, correspondiendo en su peso molecular y mostrando su amplicon en el corrimiento de agarosa. Por otra parte, los lncRNA LOC285194 y SIRT1AS no lograron ser estandarizados correctamente, aún cuando uno de ellos es considerado un onco-lncRNA y teóricamente podría encontrarse en líneas celulares cancerígenas. Algunas de las explicaciones pueden ser el tipo de linaje celular ya que se sabe que este tipo de moléculas aparecen sólo en ciertas etapas o tipos de la célula, así como el número de copias que puedan estar presentes en las células ya que se sabe que la expresión de los lncRNAs en ocasiones es muy reducida llegando incluso a una sola copia por célula, comprometiendo la integridad del mismo en una extracción total de RNA.

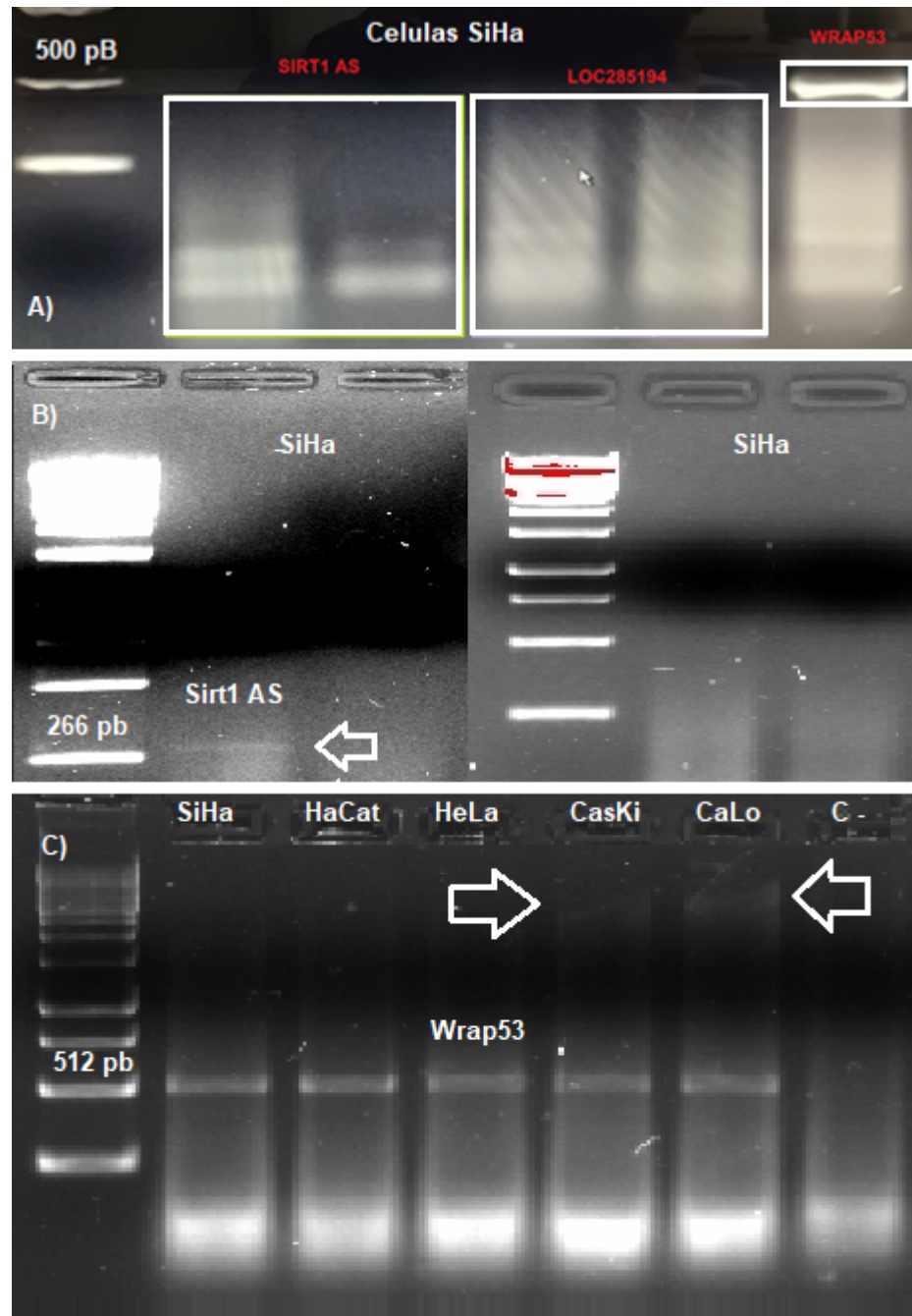


Figura 19. RT-PCR en líneas celulares. A) En la imagen se muestra el primer experimento para determinar la presencia o ausencia de los diferentes RNAs largos no codificantes en la línea celular SiHa, B) RT-PCR en la línea celular SiHa, en esta imagen se observa la evaluación de Sirt1 AS antes y después del tratamiento con DNAasa. C) RT-PCR de las líneas celulares SiHa, HaCat, HeLa, CasKi y CaLo. Se observa una posible contaminación de DNA en el corrimiento de las muestras

La amplificación de Wrap53 se realizó en las líneas celulares SiHa, HaCat, HeLa, CasKi, CaLo y C33A, como se observa en la Figura 20. Para contrastar los

resultados, se utilizó el gen constitutivo actina el cual muestra amplicones similares. Los resultados mostraron que el lncRNA Wrap53 se encontró presente en 5 de las 6 líneas celulares evaluadas, siendo de interés que la línea celular CasKi, la cual es VPH + con integración de genomas virales 16/18, fue la única en la cual la presencia de Wrap53 no se detectó Figura 21.

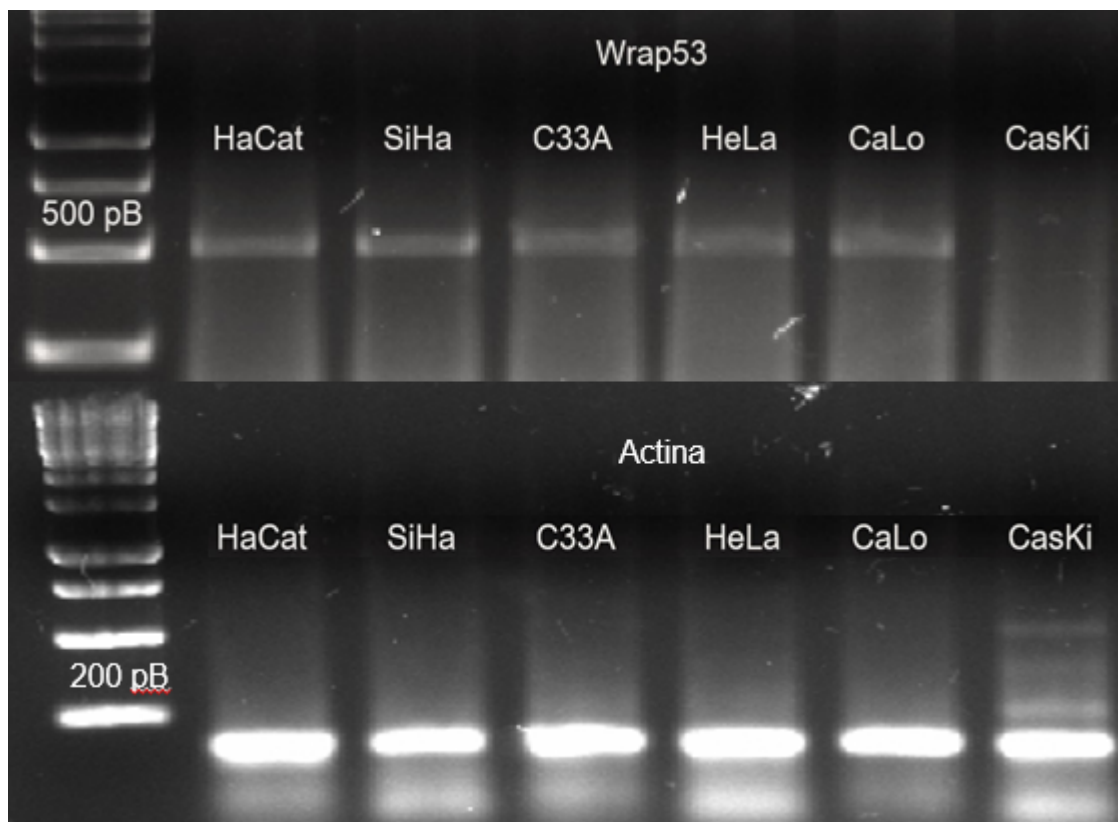


Figura 20. Evaluación de Wrap53 en líneas celulares mediante RT-PCR. En la figura se observa la comparación de las líneas celulares VPH+, VPH – y Hacat (Inmortalizada), observándose una diferencia con respecto a todas las líneas celulares y CasKi la cual posee la característica de tener dentro de su genoma copias del genoma viral VPH 16/18.

### Extracción de proteínas y Western blot

Una vez obtenidas las líneas celulares SiHa, HeLa y CaLo se procedió con los protocolos de RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) para extraer las proteínas totales y el método de Bradford para la cuantificación de las muestras. Adicionalmente se normalizó la cantidad de proteína a utilizar basándose en la

expresión de la proteína constitutiva actina, evaluándose un total de 40 microgramos de proteína total homogénea. Se determinó la presencia de las proteínas p53 y actina mediante la técnica de inmunodetección, cuantificándose cada una de las bandas y comparando el nivel de expresión de p53 en cada una de las líneas celulares. La incubación de los anticuerpos se realizó por separado en cada una de las membranas utilizando una solución de “striping” Figura 21.

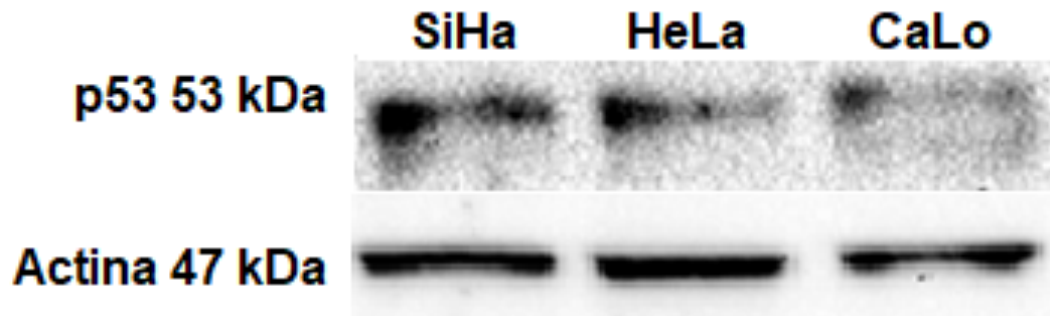


Figura 21. Western Blot p53/Actina. Se analizaron 40 microgramos de proteína total en geles de poliacrilamida al 10% y se realizó la inmunodetección en fase sólida de p53 y actina como proteína constitutiva en líneas celulares (SiHa, HeLa y CaLo).



## Discusión

Durante los últimos años se ha descubierto que los lncRNAs son moléculas que presentan múltiples orígenes y variadas funciones, participando en diversos procesos celulares como migración, diferenciación celular, ciclo celular, etc. Lo que hace de este tipo de RNAs un objeto de estudio con gran potencial para diversos grupos de investigación (Huarte, 2015). En el presente trabajo se evaluó al lncRNA Wrap53 que por su relación con el sistema p53:miR-34 podría ser un potencial marcador molecular para cáncer debido a que este lncRNA potencialmente puede interactuar con la proteína p53. Se sabe que en líneas celulares provenientes de carcinoma de cérvix tanto VPH positivas como negativas es posible detectar a la proteína p53 (Scheffner, 1991). Sin embargo, el sistema p53-miR34 se encuentra desregulado o inactivo. Bajo la propuesta de Mahmoudi y colaboradores en 2010, en el que se menciona que Wrap53 es un lncRNA con complementariedad de secuencia perfecta en el primer exón de p53 y que este podría interactuar con el sitio 5'UTR del RNA mensajero de p53 para protegerlo de la degradación. Sin embargo, también se ha detectado que Wrap53 se encuentra sobre-expresado en carcinomas de células escamosas de esófago (Rao, 2014) y en carcinoma rectal (Zhang, 2014) por lo que su papel en los procesos de carcinogénesis tal vez dependa del tipo celular en que se lleve a cabo el proceso cancerígeno (Zhu, 2018). En el presente trabajo se detectó la presencia de Wrap53 en 5 de 6 líneas celulares evaluadas: SiHa, HeLa, HaCaT, C33A, CaLo y CAski, ésta última sin la obtención de ningún tipo de señal. La ausencia de Wrap53 en CasKi, puede deberse a la presencia del doble genoma viral (VPH 16 y 18), lo que interferiría con mayor agresividad el sistema p53 (Lehoux M, 2009). Las demás líneas celulares solo poseen un solo tipo de genoma viral integrado, a excepción de HaCaT, la cual es inmortalizada no tumorigénica.

Por otra parte, se sabe que los miRNAs son parte de un complejo de silenciamiento inducido por RNAs (RISC) el cual tiene como función regular gran parte de la expresión genética que se lleva a cabo en diversos procesos celulares (Bartel, 2004), tal es el caso de la familia miR-34, catalogado como anti-oncomiRs y cuya

expresión es activada transcripcionalmente por la proteína p53 (Choi, 2011). Los análisis bioinformáticos realizados entre Wrap53 y la familia miR-34 arrojaron que la región semilla de los miembros hsa-miR-34a-3p, hsa-miR-34a-5p y hsa-miR-34b-5p son fuertes candidatos a regular a Wrap53 debido a las predicciones bioinformáticas, aportando mayor evidencia sobre la interacción entre el sistema p53-miR34 y el lncRNA Wrap53, ya que las interacciones de la región semilla de los microRNAs, generalmente conducen a la degradación del RNA mediante el complejo RISC.

## **Conclusión**

Los lncRNAs, Sirt1-AS y LOC285194 no se detectaron en las líneas celulares HaCaT, SiHa, HeLa, CaLo, C33A y CasKi.

El lncRNA Wrap53 se detectó en cinco líneas celulares (HaCaT, SiHa, HeLa, CaLo, C33A) mientras que CasKi su expresión fue nula. Cabe resaltar que la expresión de Wrap53 no es concluyente por lo que se necesitan realizar y aplicar nuevas técnicas como la inmunoprecipitación de RNA.

Los análisis bioinformáticos muestran una posible interacción entre Wrap53 y la región semilla de los miembros de la familia miR-34 lo que sugeriría una posible regulación por parte de esta familia de microRNAs.

## **Perspectivas**

Para elucidar completamente el papel de Wrap53 en el carcinoma de cérvix es de importancia continuar con estudios de precipitación de RNA para Wrap53 lo que permitiría concentrarlo y facilitar su análisis, así como la realización de una construcción molecular que nos permita saber si Wrap53 tiene una interacción real con los miembros de la familia miR-34, sumado a esto es recomendable realizar una prueba de vida media de RNA para evaluar el tiempo de vida de Wrap53 en la célula, así como evaluar a la proteína p53 en líneas transfectadas con Wrap53.

## Referencias

- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *cell*116(2): 281-297.
- Bosch, F., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C., & Shah, K. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology*, 55(4), 244-265.
- Burd, E. M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*, 16(1), 1-17.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 857-866.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., . . . Negrini, M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2999-3004.
- Choi, Y. J., C.-P. Lin, J. J. Ho, X. He, N. Okada, P. Bu, Y. Zhong, S. Y. Kim, M. J. Bennett and C. Chen (2011). "miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming." *Nature cell biology*13(11): 1353-1360.
- Daud, I. I., Scott, M. E., Ma, Y., Shiboski, S., Farhat, S., & Moscicki, A. B. (2011). Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *International journal of cancer*, 128(4), 879-886.
- Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., & Zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(12), 3812-3815.
- Farnebo, M., Bykov, V. J., & Wiman, K. G. (2010). The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(1), 85-89.
- Han, L., Zhang, E. B., Yin, D. D., Kong, R., Xu, T. P., Chen, W. M., ... & De, W. (2015). Low expression of long noncoding RNA PANDAR predicts a poor

- prognosis of non-small cell lung cancer and affects cell apoptosis by regulating Bcl-2. *Cell death & disease*, 6(2), e1665.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hauptman, N., & Glavač, D. (2013). Long non-coding RNA in cancer. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 4655-4669.
- He, C., Luo, B., Jiang, N., Liang, Y., He, Y., Zeng, J., ... & Zheng, X. (2019). OncomiR or antioncomiR: Role of miRNAs in acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 60(2), 284-294.
- He, L., He, X., Lowe, S. W., & Hannon, G. J. (2007). microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), 819.
- Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nature medicine*, 21(11), 1253.
- Jalali, S., Bhartiya, D., Lalwani, M. K., Sivasubbu, S., & Scaria, V. (2013). Systematic transcriptome wide analysis of lncRNA-miRNA interactions. *PLoS one*, 8(2), e53823.
- Kaller, M., Liffers, S. T., Oeljeklaus, S., Kuhlmann, K., Röh, S., Hoffmann, R., ... & Hermeking, H. (2011). Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and micro-array analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp-M111.
- Kung, J. T., Colognori, D., & Lee, J. T. (2013). Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*, 193(3), 651-669.
- Lehoux, M., D'Abramo, C. M., & Archambault, J. (2009). Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public health genomics*, 12(5-6), 268-280.
- Liu, Q., Huang, J., Zhou, N., Zhang, Z., Zhang, A., Lu, Z., ... & Mo, Y. Y. (2013). LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor. *Nucleic acids research*, 41(9), 4976-4987.

- Libri, V., Miesen, P., van Rij, R. P., & Buck, A. H. (2013). Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3525-3544.
- Lugo Trampe, Á., & Trujillo Murillo, K. D. C. (2009). MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina universitaria*, 11(44).
- Mahmoudi, S., Henriksson, S., Corcoran, M., Méndez-Vidal, C., Wiman, K. G., & Farnebo, M. (2009). Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Molecular cell*, 33(4), 462-471.
- Miyashita, M., Agdamag, D. M., Sasagawa, T., Matsushita, K., Salud, L. M., Salud, C. O., . . . Acuna, J. (2009). High-risk HPV types in lesions of the uterine cervix of female commercial sex workers in the Philippines. *Journal of medical virology*, 81(3), 545-551.
- Murti, P. R., Warnakulasuriya, K. A. A. S., Johnson, N. W., Bhonsle, R. B., Gupta, P. C., Daftary, D. K., & Mehta, F. S. (1998). p53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. *Journal of oral pathology & medicine*, 27(5), 191-196.
- Münger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J. M., & Howley, P. M. (1992). Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer surveys*, 12, 197-217.
- Pasic, I., Shlien, A., Durbin, A. D., Stavropoulos, D. J., Baskin, B., Ray, P. N., ... & Malkin, D. (2010). Recurrent focal copy-number changes and loss of heterozygosity implicate two noncoding RNAs and one tumor suppressor gene at chromosome 3q13.31 in osteosarcoma. *Cancer research*, 70(1), 160-171.
- Prensner, J. R., & Chinnaiyan, A. M. (2011). The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer discovery*, 1(5), 391-407.
- Rao, X., Huang, D., Sui, X., Liu, G., Song, X., Xie, J., & Huang, D. (2014). Overexpression of WRAP53 is associated with development and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 9(3), e91670.

- Qi, P., Xu, M. D., Ni, S. J., Huang, D., Wei, P., Tan, C., ... & Du, X. (2013). Low expression of LOC285194 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Journal of translational medicine*, 11(1), 122.
- Quinn, J. J., & Chang, H. Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature Reviews Genetics*, 17(1), 47.
- Rohlf, E. M., Puget, N., Graham, M. L., Weber, B. L., Garber, J. E., Skrzynia, C., . . . Mazoyer, S. (2000). An Alu-mediated 7.1 kb deletion of BRCA1 exons 8 and 9 in breast and ovarian cancer families that results in alternative splicing of exon 10. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 28(3), 300-307.
- Sathish, N., Wang, X., & Yuan, Y. (2014). Human papillomavirus (HPV)-associated oral cancers and treatment strategies. *Journal of dental research*, 93(7\_suppl), 29S-36S.
- Schafer, Z. T., & Brugge, J. S. (2007). IL-6 involvement in epithelial cancers. *The Journal of clinical investigation*, 117(12), 3660.
- Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J. C., & Howley, P. M. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5523.
- Serviss, J. T., Andrews, N., Van den Eynden, J., Richter, F. C., Houtman, M., Vesterlund, M., ... & Tamm, K. P. (2018). An antisense RNA capable of modulating the expression of the tumor suppressor microRNA-34a. *Cell death & disease*, 9(7), 736.
- Tseng, Y. Y., Moriarity, B. S., Gong, W., Akiyama, R., Tiwari, A., Kawakami, H., ... & Essig, J. (2014). PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase. *Nature*, 512(7512), 82.
- Tong, Y. S., Zhou, X. L., Wang, X. W., Wu, Q. Q., Yang, T. X., Lv, J., ... & Cao, X. F. (2014). Association of decreased expression of long non-coding RNA LOC285194 with chemoradiotherapy resistance and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of translational medicine*, 12(1), 233.

- Wang, G. Q., Wang, Y., Xiong, Y., Chen, X. C., Ma, M. L., Cai, R., ... & Pang, W. J. (2016). Sirt1 AS lncRNA interacts with its mRNA to inhibit muscle formation by attenuating function of miR-34a. *Scientific reports*, 6, 21865.
- Wang, X., Wang, H.-K., McCoy, J. P., Banerjee, N. S., Rader, J. S., Broker, T. R., . . . Zheng, Z.-M. (2009). Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *Rna*, 15(4), 637-647.
- Weinberg, R. (2013). *The biology of cancer*: Garland science.
- Zhang, B., Pan, X., & Anderson, T. A. (2006). MicroRNA: a new player in stem cells. *Journal of cellular physiology*, 209(2), 266-269.
- Zhang, E. B., Kong, R., Yin, D. D., You, L. H., Sun, M., Han, L., ... & fei Chen, J. (2014). Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a. *Oncotarget*, 5(8), 2276.
- Zhang, H., Wang, D. W., Adell, G., & Sun, X. F. (2012). WRAP53 is an independent prognostic factor in rectal cancer—a study of Swedish clinical trial of preoperative radiotherapy in rectal cancer patients. *BMC cancer*, 12(1), 294.
- Zhu, Y., Ding, L., Chen, B. F., Song, J. G., & Yao, Y. S. (2018). Oncogenic Activity of Wrap53 in Human Colorectal Cancer In Vitro and in Nude Mouse Xenografts. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 6129.
- zur Hausen, H. (1991). Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, 184(1), 9-13.
- Zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1288(2), F55-F78.



## Anexos

### Anexo A)

Anteriormente a la realización de este trabajo de tesis experimental, se trató de llevar a cabo la generación de esponjas moleculares para la captura de miRNAs los cuales tuvieran como blanco la región 3'UTR de la proteína gamma tubulina el diseño experimental se ilustra en las Figuras 24 y 25, dicho trabajo no pudo llevarse a término y tuvo que ser sustituido como trabajo experimental para la tesis, sin embargo, a continuación, se mostraran algunos de los experimentos realizados hasta la fecha de cambio de objetivos.

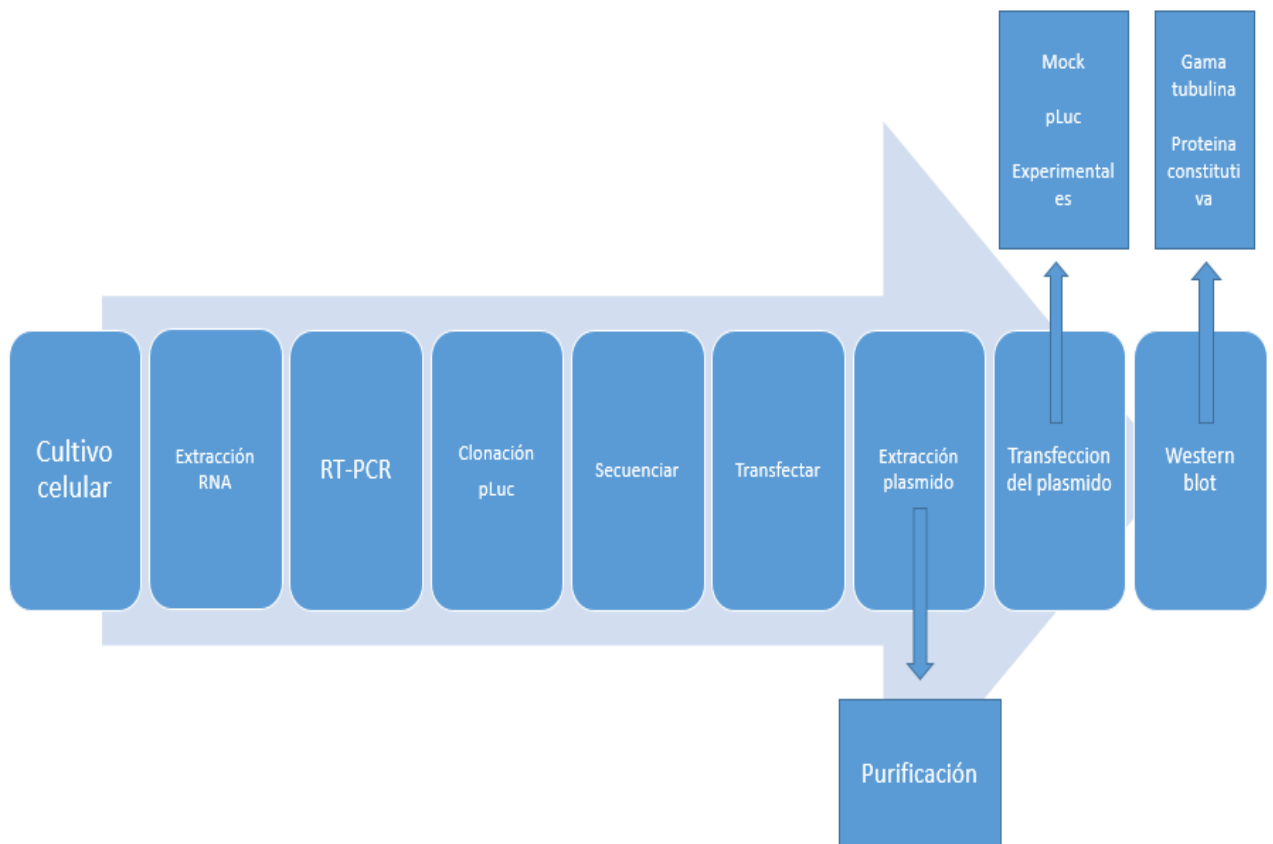


Figura 22. Diseño Experimental. Se observa el diseño experimental inicial del proyecto de tesis experimental.

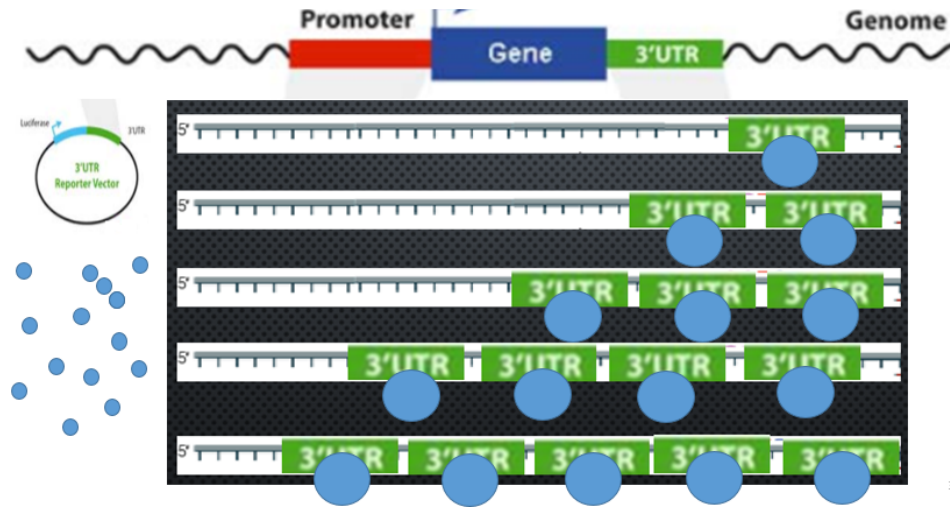


Figura 23. Diseño experimental de una esponja molecular.

En un principio se trabajó con la cepa bacteriana DH5 $\alpha$  (E. Coli) (Figura 26) con la finalidad de poder replicar en ella un plásmido que contuviera las regiones 3'UTR de la proteína gama tubulina para llevar acabo esto las bacterias se volvieron competentes y se transformaron con el plásmido desnudo (sin regiones 3UTR) esto se realizó con el objetivo de evaluar la competencia de las bacterias así como la funcionalidad del plásmido (Figura 27) en este punto se observó que el antibiótico no funcionaba óptimamente y se procedió a preparar nuevo, una vez hecho esto se determinó el correcto funcionamiento de las bacterias y el plásmido por lo que se procedió a realizar varias transformaciones con el fin de obtener y producir una mayor cantidad de plásmido desnudo para someterlo a un corte enzimático y observar que se trataba del plásmido de interés así como el funcionamiento de las enzimas de restricción que se usarían en la inserción de las regiones 3 UTR.

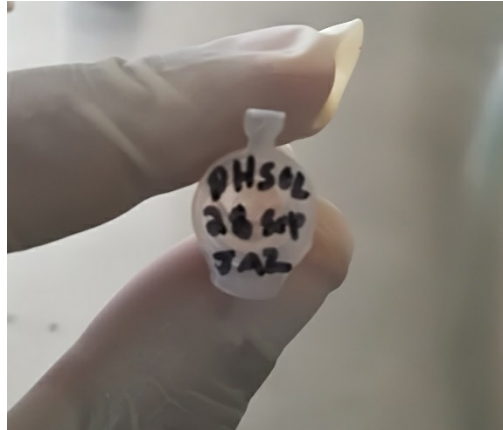


Figura 24. E. Coli. Se observa la cepa bacteriana que se utilizó.

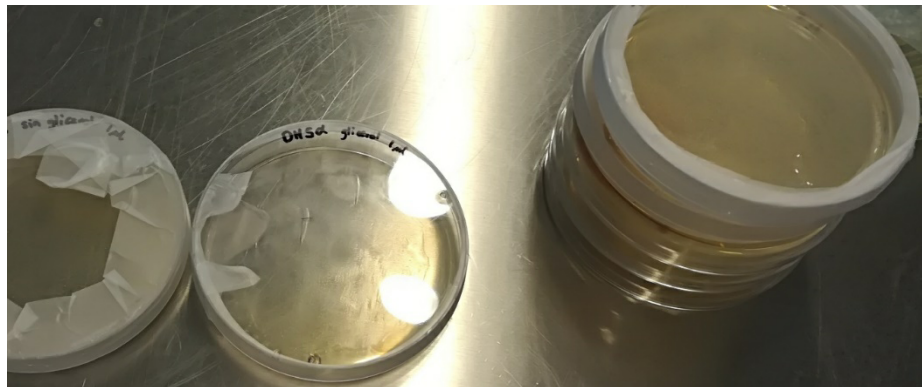


Figura 25. Cajas de E. Coli. Las cajas Petri se sembraron con bacterias transformadas y sin transformar en medio LB AGAR con diferentes concentraciones de antibiótico (ampicilina 100, 200, 400 y 800 mg) con el objetivo de observar su viabilidad y el correcto funcionamiento del plásmido.

Sin embargo, aunque las bacterias se transformaban correctamente y presentaban resistencia al antibiótico, al realizar la extracción del plásmido mediante una lisis alcalina y someter el plásmido a corte por enzimas de restricción, no se logró que el patrón de corte correspondiera al esperado Figura 28, tratando de corregir esto se realizó la transformación de las bacterias con un segundo plásmido donado por la unidad de investigación del instituto mexicano del seguro social (IMSS), obteniendo resultados desfavorables, posiblemente debido a que el nuevo plásmido no funcionaba ya que no confirió resistencia a las bacterias contra el antibiótico ampicilina Figura 29.

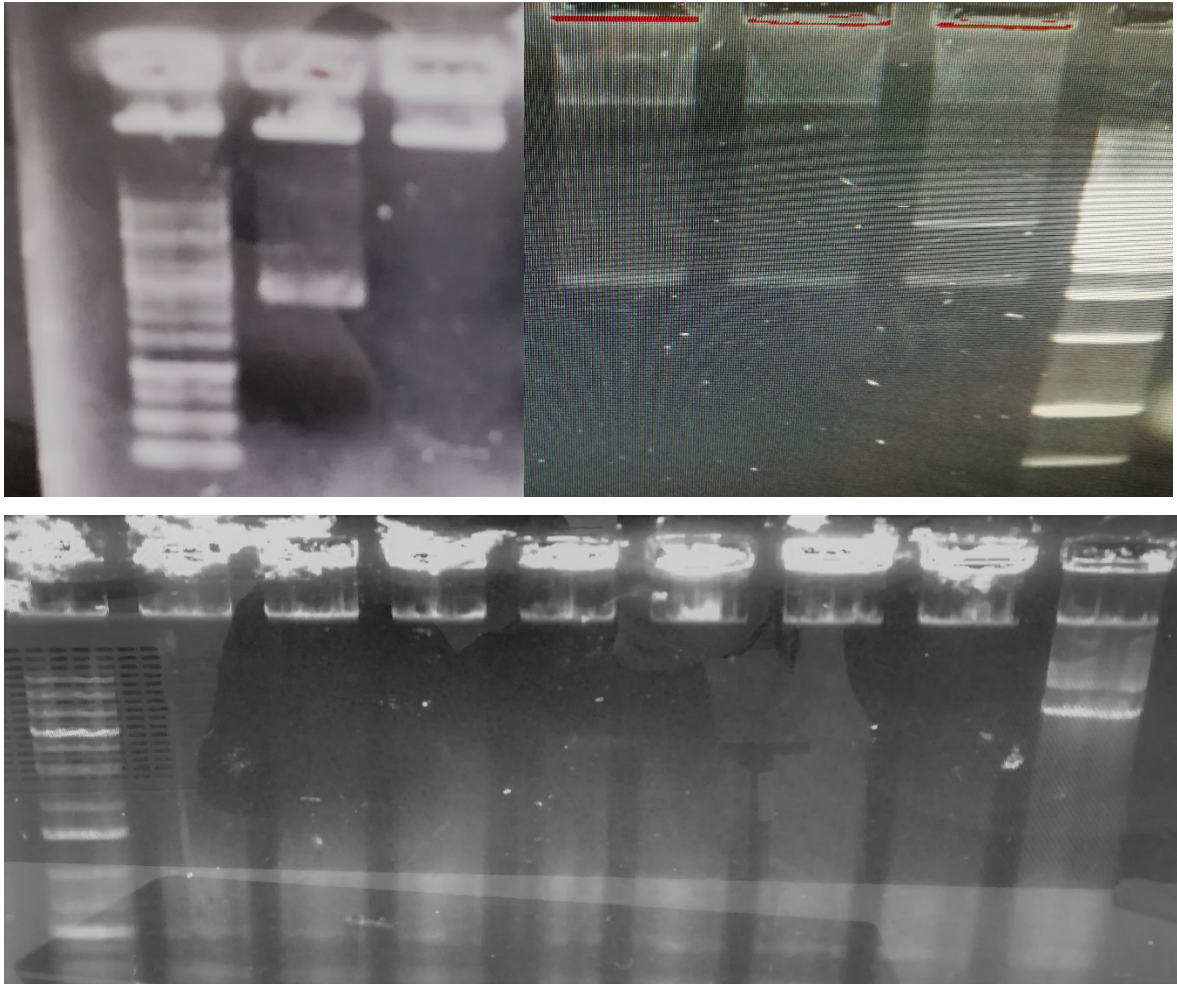


Figura 26. Restricción enzimática. En la imagen se observan algunos de los múltiples esfuerzos realizados para la obtención del correcto patrón de corte en el plásmido de interés.

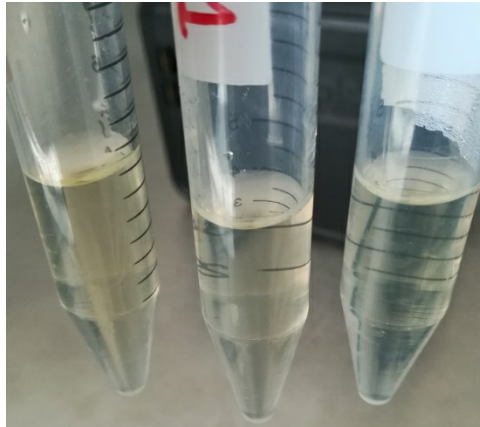


Figura 27. Ensayo de resistencia a antibiótico. En la imagen se observa cultivos bacterianos transformados con un segundo plásmido el cual no confirió de resistencia a las bacterias.

En todas las pruebas y experimentos realizados los controles positivos y negativos resultaron ser funcionales, por lo que el problema no se pudo resolver y se optó por cambiar el proyecto experimental debido al tiempo consumido y por la falta de recurso para adquirir nuevas cepas de bacterias, así como un nuevo plásmido y enzimas de restricción, esta decisión estuvo respaldada en los numerosos intentos por llevarla a cabo a pesar de haber probado la metodología al pie de la letra.

Al realizar el cambio en el proyecto de tesis experimenta se propuso trabajar con RNAs largos no codificantes por lo que se seleccionó a LOC285194, SIRT1 AS y WRAP53 para su análisis en tejido fresco de cuello uterino que presentara lesiones de tipo NIC1, 2, 3 y CaCu, sin embargo, a pesar de iniciar las extracciones RNA de las muestras de tejido Figura 30 no se logró llegar contar con el número de muestra mínima estadística, por lo que el trabajo se continuo con líneas celulares.

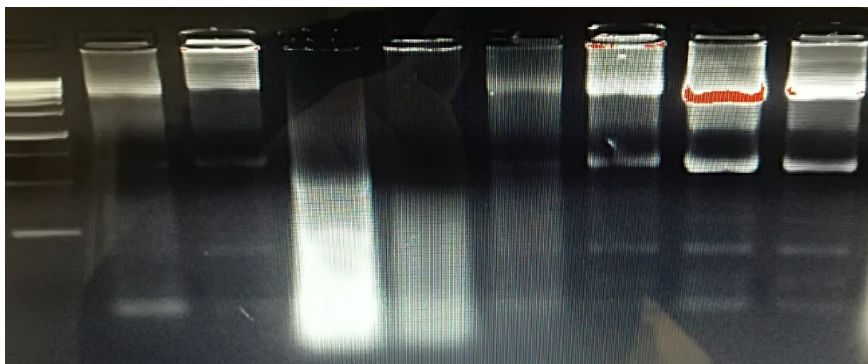


Figura 28. Extracciones de RNA de tejido de cuello uterino.

## Anexo B)

Búsqueda de lncRNAs oncogénicos como candidatos a evaluar en líneas celulares de carcinoma de cuello uterino.

### 1.- Homo sapiens Pvt1 oncogene (PVT1), long non-coding RNA

Este gen representa un RNA no codificante que se ha identificado como un oncogén. El aumento en el número de copias y la sobreexpresión de este gen está asociado con muchos tipos de cáncer, incluidos los de mama, ovario, leucemia mieloide aguda y el linfoma de Hodgkin (Tseng, 2014).

Primers:

PVT1	
	Sequence (5'->3')
Forward primer	CTCCGGGCAGAGCGCGTGTG
Reverse primer	TTTTTTTTTTTTTTTTTAGTAGAAAAAGA
Product length	1957

MicroRNAs asociados:

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue
<a href="#">MIMAT0022285</a>	<a href="#">hsa-miR-5585-5p</a>	877	898	1	22	-	83	1.8
<a href="#">MIMAT0026622</a>	<a href="#">hsa-miR-619-5p</a>	887	908	1	22	+	83	1.8
<a href="#">MIMAT0026622</a>	<a href="#">hsa-miR-619-5p</a>	1022	1043	1	22	+	83	1.8
<a href="#">MIMAT0015023</a>	<a href="#">hsa-miR-3150a-3p</a>	1360	1381	1	22	-	74	9.8

## 2.- Homo sapiens tumor suppressor candidate 7 (TUSC7), long non-coding RNA

Este RNA no codificante se ha identificado como un oncogén. Presentandoun elevado número de copias que son asociadas con procesos cancerígenos de colon y hueso (Qi, 2013).

Primers:

### Primer pair 1

	Sequence (5'→3')
Forward primer	GGGGTACCAAAGTCCACTCTG
Reverse primer	TTTTTCGTGAGTACACAATAGTCAT
Product length	2105

MicroRNAs asociados:

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue
<a href="#">MIMAT0026624</a>	<a href="#">hsa-miR-651-3p</a>	122	142	1	21	+	69	9
<a href="#">MIMAT0027103</a>	<a href="#">hsa-miR-5699-5p</a>	675	694	2	21	-	73	4.6
<a href="#">MIMAT0019232</a>	<a href="#">hsa-miR-4423-5p</a>	538	558	1	21	-	69	9.9

## 3.- Homo sapiens colon cancer associated transcript 1 (CCAT1), long non-coding RNA

Este gen produce un RNA largo no codificante que promueve la formación de tumores y está sobre expresado en cáncer de colon y otros tipos de cáncer. Se sabe que su transcripción puede regular las interacciones cromosómicas a nivel de la oncoproteína Myc. Este RNA también puede funcionar como una esponja molecular para microRNAs.

Primers:



## Primer pair 1

Sequence (5'→3')  
 Forward primer TTTAAATCATACCAATTGAACCGAGCCTT  
 Reverse primer CCAAGACTTAATATACTTATATTTATATTA  
 Product length 2795

### MicroRNAs:

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue
<a href="#">MIMAT0027581</a>	<a href="#">hsa-miR-6839-3p</a>	366	386	1	21	+	78	1.6
<a href="#">MIMAT0027580</a>	<a href="#">hsa-miR-6839-5p</a>	367	386	3	22	-	73	4.2
<a href="#">MIMAT0004924</a>	<a href="#">hsa-miR-876-5p</a>	225	242	1	18	-	72	5.1
<a href="#">MIMAT0027572</a>	<a href="#">hsa-miR-6780b-5p</a>	596	618	1	23	-	70	7.4
<a href="#">MIMAT0030426</a>	<a href="#">hsa-miR-7851-3p</a>	248	268	2	22	+	78	1.6
<a href="#">MIMAT0018951</a>	<a href="#">hsa-miR-4435</a>	546	565	1	20	-	73	4.2
<a href="#">MIMAT0022473</a>	<a href="#">hsa-miR-5684</a>	292	309	2	19	+	72	5.1
<a href="#">MIMAT0027405</a>	<a href="#">hsa-miR-6752-3p</a>	218	235	3	20	-	72	5.1
<a href="#">MIMAT0019765</a>	<a href="#">hsa-miR-4680-3p</a>	522	542	1	21	-	69	9
<a href="#">MIMAT0027571</a>	<a href="#">hsa-miR-6835-3p</a>	463	483	3	23	-	69	9
<a href="#">MIMAT0030415</a>	<a href="#">hsa-miR-1273h-5p</a>	250	270	1	21	+	69	9
<a href="#">MIMAT0030416</a>	<a href="#">hsa-miR-1273h-3p</a>	249	269	1	21	-	69	9
<a href="#">MIMAT0004550</a>	<a href="#">hsa-miR-30c-2-3p</a>	1117	1138	1	22	+	74	6.6
<a href="#">MIMAT0043997</a>	<a href="#">hsa-miR-11181-3p</a>	350	367	1	18	-	72	9.7

4.- Homo sapiens ANRIL ncRNA for antisense noncoding RNA in the INK4 locus transcript



ANRIL es un RNA no codificante largo que consta de 19 exones que se asocian con múltiples enfermedades, como la enfermedad de las arterias coronarias, diabetes y diversos tipos de cáncer, su actividad está relacionada con la represión transcripcional (Zhang, 2014).

Primers:

### Primer pair 1

**Sequence (5'→3')**

**Forward primer** AGCTACATCCGTCACCTGACACGG  
**Reverse primer** TTTTTTTTTTTTTTTGAAACAAGGTTAT  
**Product length** 2177

MicroRNAs:

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue
<a href="#">MIMAT002662</a> <u>2</u>	<a href="#">hsa-miR-619-5p</a>	1021	1042	1	22	+	83	1.1
<a href="#">MIMAT001986</a> <u>8</u>	<a href="#">hsa-miR-4739</a>	237	254	5	22	-	72	8.7
<a href="#">MIMAT004199</a> <u>2</u>	<a href="#">hsa-miR-10523-5p</a>	436	453	7	24	-	72	8.7

5.- Homo sapiens promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA (PANDAR), long non-coding RNA

Este gen produce un RNA no codificante que regula la respuesta al daño del ADN. Este gen es inducido por la proteína p53 y modula la actividad de un factor de transcripción que induce genes pro-apoptóticos. La desregulación de este gen está asociada con la progresión del cáncer (Han, 2015).

Primers:

### Primer pair 1

**Sequence (5'→3')**

**Forward primer** ACGAATTCTTTCAGGAATGCCG  
**Reverse primer** GCAGTGGCTCACGCCTGTAATC  
**Product length** 1506

MicroRNAs:

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue
<a href="#">MIMAT0026622</a>	<a href="#">hsa-miR-619-5p</a>	1480	1501	1	22	+	92	0.24
<a href="#">MIMAT0027446</a>	<a href="#">hsa-miR-6773-5p</a>	814	835	1	22	+	74	7.5
<a href="#">MIMAT0027625</a>	<a href="#">hsa-miR-6862-5p</a>	1192	1213	1	22	-	74	7.5
<a href="#">MIMAT0018108</a>	<a href="#">hsa-miR-3681-5p</a>	288	307	1	20	-	73	9.1

6.- Homo sapiens long non coding transcriptional activator of miR34a (LNCTAM34A), long non-coding RNA.

(Serviss, 2018)

Primers:

**Primer pair 1**

Sequence (5'→3')

Forward primer ACCAGGCCCGGGGCCGCGA

Reverse primer TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACAAGAATTCT

Product length 1003

MicroRNAs:

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue
<a href="#">MIMAT0018090</a>	<a href="#">hsa-miR-3667-3p</a>	684	702	4	22	-	77	2.8
<a href="#">MIMAT0027379</a>	<a href="#">hsa-miR-6739-5p</a>	791	806	4	19	+	71	8.9

g

## Anexos c)

Tablas de alineamientos:

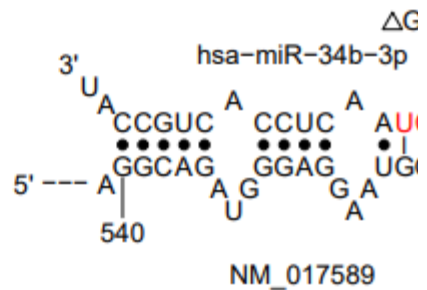
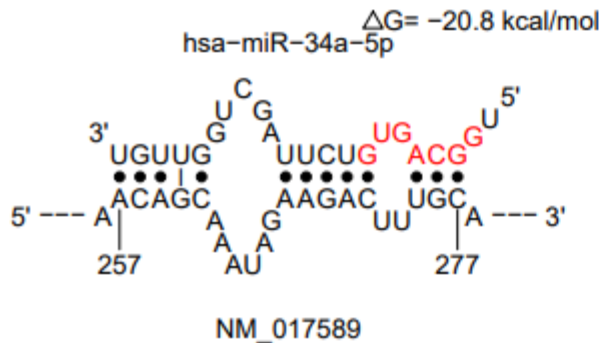
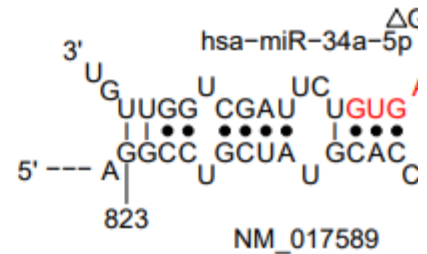
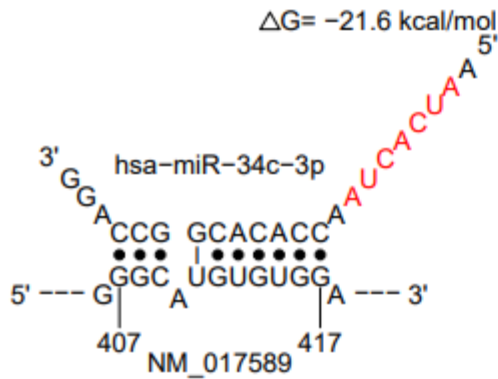
Interacciones Mir34 + Wrap53

Wrap53 + SEED

miRNA	Site_Position	LogitProb	Score	Seed_Position	Seed_Type*	$\Delta G_{\text{hybrid}}$	$\Delta G_{\text{nucd}}^*$	$\Delta G_{\text{total}}^*$	Site_Access*	Seed_Access*	Upstream_Access (30nt)*	Dwstream_Access (30nt)*
hsa-miR-34a-3p	276-289	0.561	0.048	284-289	offset-6mer	-17	-0.065	2.423	0.272	0.152	0.665	0.475
hsa-miR-34a-5p	899-918	0.523	0.09	912-918	7mer-m8	-28.9	-0.668	-8.969	0.338	0.333	0.346	0.367
hsa-miR-34b-5p	898-919	0.516	0.086	913-919	7mer-m8	-25	-0.658	-4.518	0.329	0.365	0.344	0.382
hsa-miR-34a-3p	322-334	0.498	0.048	328-333	6mer	-16.1	-0.067	7.657	0.111	0.044	0.48	0.338
hsa-miR-34c-5p	899-919	0.484	0.07	912-918	7mer-m8	-23	-0.861	-3.024	0.342	0.333	0.346	0.382
hsa-miR-34b-3p	929-964	0.385	0.034	959-964	6mer	-22.2	-1.494	1.85	0.362	0.395	0.36	0.588

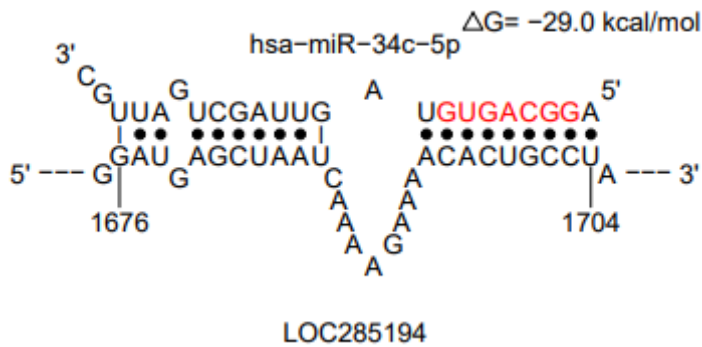
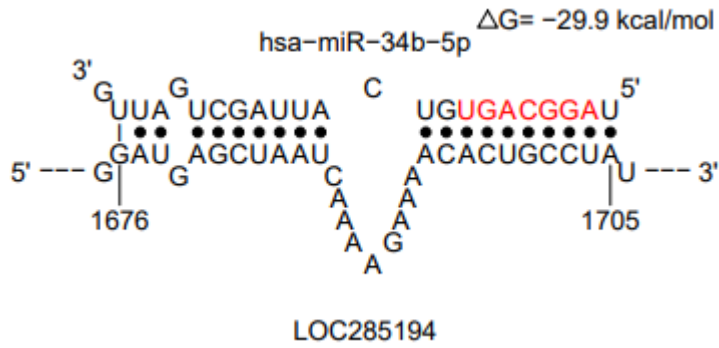


hsa-miR-34c-5p	821-841	0.777	0.07	1	-19.9	-0.59	-6.967	0.352	0.461	0.642	0.6
hsa-miR-34b-3p	540-551	0.776	0.034	0	-21.2	-0.886	-8.673	0.302	0.727	0.306	0.75
hsa-miR-34b-5p	283-303	0.766	0.086	0	-25	-0.183	-9.684	0.209	0.209	0.721	0.7
hsa-miR-34b-3p	540-549	0.764	0.034	0	-18.2	-0.419	-7.191	0.307	0.727	0.32	0.75
hsa-miR-34b-5p	258-277	0.762	0.086	0	-18	-0.737	-10.204	0.492	0.899	0.302	0.8
hsa-miR-34b-5p	283-297	0.761	0.086	0	-21.3	-0.121	-5.631	0.215	0.209	0.6	0.7
hsa-miR-34b-5p	691-715	0.761	0.086	0	-17.9	-0.475	-9.165	0.439	0.616	0.248	0.6
hsa-miR-34b-5p	283-293	0.76	0.086	0	-21.1	-0.121	-7.407	0.278	0.209	0.368	0.7
hsa-miR-34a-5p	146-165	0.759	0.09	0	-19.9	-5.01	-6.387	0.497	0.299	0.366	0.35
hsa-miR-34a-5p	279-293	0.758	0.09	1	-17.2	-0.056	-2.404	0.247	0.429	0.368	0.65
hsa-miR-34a-3p	823-843	0.758	0.048	0	-19	-0.727	-6.488	0.326	0.541	0.684	0.6
hsa-miR-34b-5p	283-299	0.755	0.086	0	-22.1	-0.132	-5.291	0.224	0.209	0.673	0.7
hsa-miR-34b-5p	283-301	0.752	0.086	0	-22.9	-0.152	-6.41	0.211	0.209	0.736	0.7
hsa-miR-34c-5p	685-715	0.751	0.07	0	-18.8	-0.931	-8.809	0.471	0.581	0.248	0.6
hsa-miR-34a-3p	956-969	0.75	0.048	0	-16.3	-1.701	-3.198	0.301	0.412	0.46	0.65
hsa-miR-34a-3p	405-416	0.75	0.048	0	-19.4	-0.708	-3.653	0.289	0.443	0.406	0.7



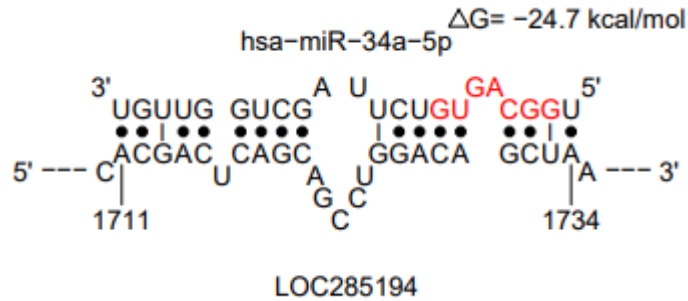
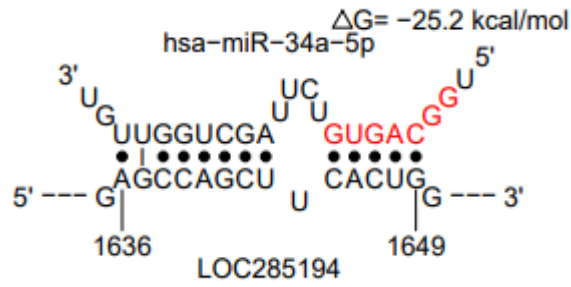
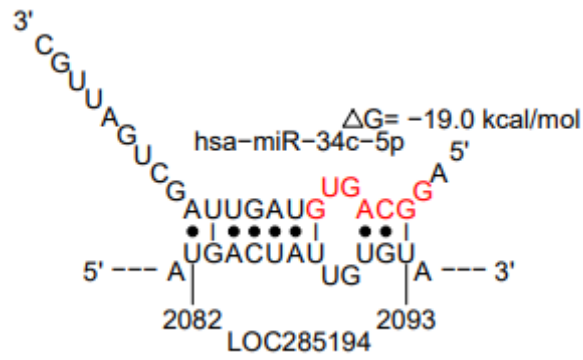
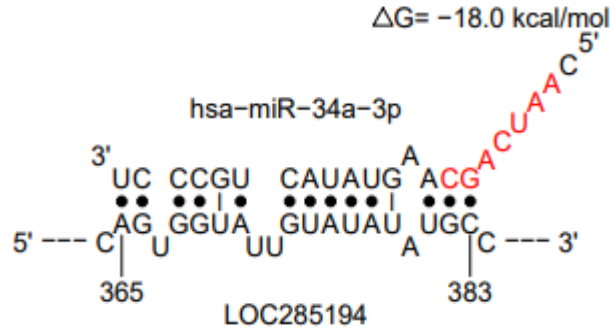
LOC285194 + SEED

miRNA	Site_Position	LogitProbability	Score	Seed_Position	Seed_Type*	3'_bp*	$\Delta G_{\text{hybrid}}$	$\Delta G_{\text{nud}}^*$	$\Delta G_{\text{total}}^*$	Site_Access*	Seed_Access*	Upstream_Access (30nt)*	Dwstream_Access (30nt)*
hsa-miR-34b-5p	1676-1705	0.919	0.148	1698-1704	8mer	1	-29.9	-4.004	-15.428	0.519	0.479	0.504	0.561
hsa-miR-34c-5p	1676-1704	0.818	0.126	1697-1703	7mer-m8	1	-29	-4.06	-14.578	0.507	0.392	0.504	0.557
hsa-miR-34a-5p	1676-1703	0.779	0.212	1697-1703	7mer-m8	1	-26.4	-1.524	-11.663	0.496	0.392	0.504	0.551
hsa-miR-34b-3p	683-697	0.576	0.078	692-697	offset-6mer	0	-19.7	-1.218	-11.671	0.492	0.331	0.492	0.356
hsa-miR-34c-3p	681-697	0.548	0.087	692-697	6mer	0	-22.7	-5.938	-14.67	0.446	0.331	0.493	0.356
hsa-miR-34c-3p	589-604	0.531	0.087	599-604	7mer-A1	0	-16	-1.835	2.021	0.333	0.581	0.762	0.431
hsa-miR-34b-3p	555-604	0.45	0.078	599-604	offset-6mer	0	-16.4	-5.071	2.75	0.609	0.581	0.379	0.431

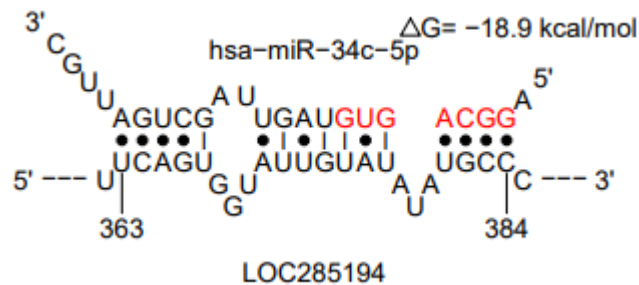
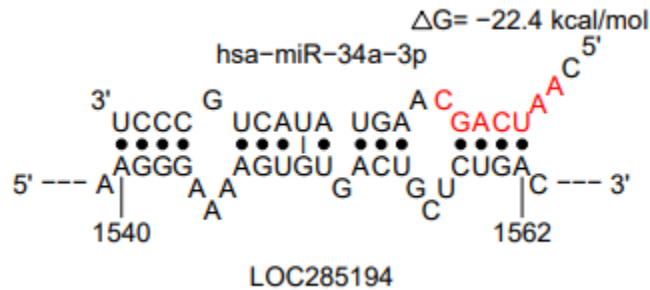
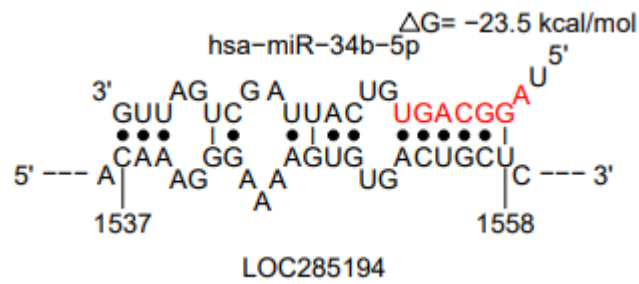
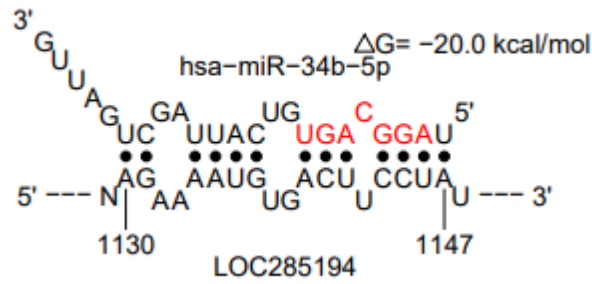
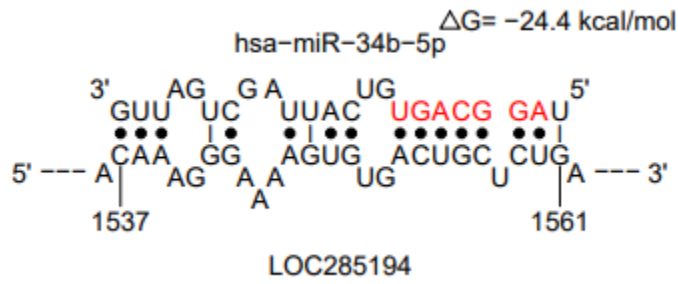


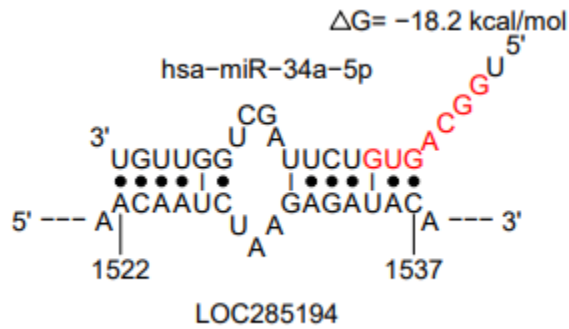
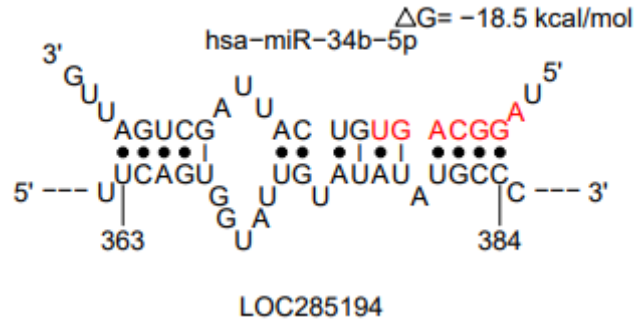
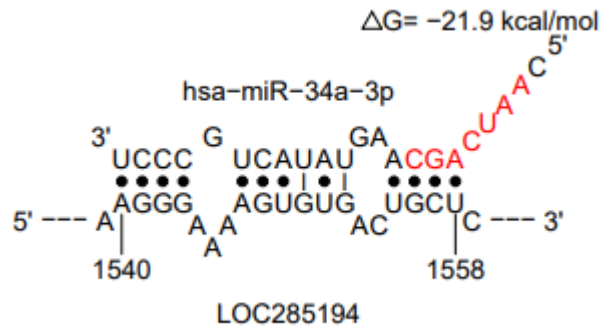
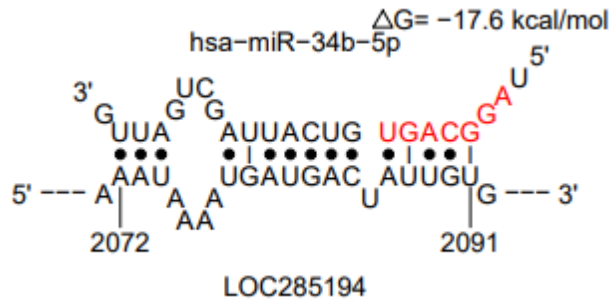
LOC285194 + SEEDLESS

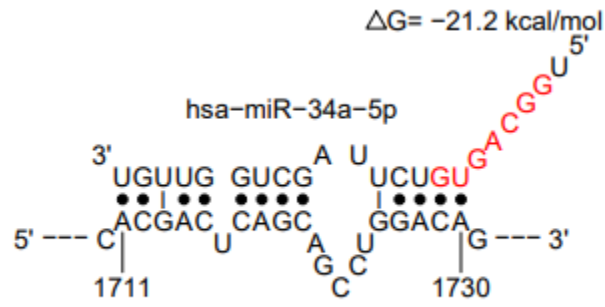
miRNA	Site_Position	LogitProb †	Score	3' *_bp	$\Delta G_{\text{hybrid}}$	$\Delta G_{\text{nucl}}^*$	$\Delta G_{\text{total}}^*$	Site_Access *	Upstream_Access (10nt)*	Dwstream_Access (15nt)*	Upstream_U (20nt)*
hsa-miR-34a-5p	1711-1734	0.868	0.212	1	-24.7	-5.97	-14.871	0.543	0.562	0.626	0.55
hsa-miR-34a-5p	1636-1649	0.866	0.212	1	-25.2	-0.842	-17.3	0.369	0.288	0.483	0.7
hsa-miR-34c-5p	2082-2093	0.852	0.126	0	-19	-0.16	-8.688	0.259	0.814	0.713	0.8
hsa-miR-34a-3p	365-383	0.844	0.068	1	-18	-4.439	-12.367	0.482	0.348	0.434	0.7
hsa-miR-34b-5p	1537-1561	0.841	0.148	0	-24.4	-0.448	-12.856	0.453	0.503	0.642	0.8
hsa-miR-34b-5p	1130-1147	0.834	0.148	0	-20	-6.419	-13.864	0.553	0.403	0.495	0.5
hsa-miR-34b-5p	1537-1558	0.833	0.148	0	-23.5	-0.47	-12.596	0.44	0.503	0.66	0.8
hsa-miR-34a-3p	1540-1562	0.833	0.068	0	-22.4	-2.691	-12.197	0.421	0.521	0.673	0.75
hsa-miR-34c-5p	363-384	0.822	0.126	0	-18.9	-3.988	-13.446	0.505	0.285	0.422	0.75
hsa-miR-34b-5p	2072-2091	0.822	0.148	0	-17.6	-3.052	-11.415	0.561	0.416	0.581	0.6
hsa-miR-34a-3p	1540-1558	0.821	0.068	0	-21.9	-1.009	-12.164	0.396	0.521	0.66	0.75
hsa-miR-34b-5p	363-384	0.82	0.148	0	-18.5	-4.471	-13.046	0.505	0.285	0.422	0.75
hsa-miR-34a-5p	1522-1537	0.815	0.212	0	-18.2	-3.074	-13.723	0.61	0.704	0.434	0.65
hsa-miR-34a-5p	530-535	0.811	0.212	1	-15.3	-5.691	-13.193	0.736	0.147	0.361	0.55
hsa-miR-34a-5p	1711-1730	0.807	0.212	1	-21.2	-3.121	-11.537	0.491	0.562	0.675	0.55
hsa-miR-34c-5p	1108-1129	0.807	0.126	0	-27.4	-0.163	-13.951	0.343	0.117	0.468	0.65
hsa-miR-34a-5p	1536-1558	0.802	0.212	0	-21.1	-2.863	-10.177	0.446	0.491	0.66	0.75



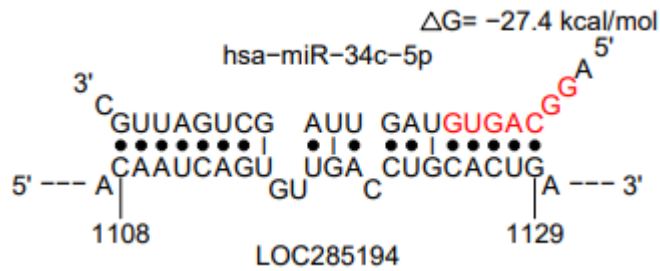








LOC285194



LOC285194



LOC285194