



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

Unidad Académica de Ciencias Químicas
Maestría en Ciencia y Tecnología Química

TESIS

Efecto de los compuestos de arsénico y la familia miR-34 sobre la expresión de MMP2 y MMP9 en líneas derivadas de cáncer cérvico-uterino

Para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología Química

Presenta:

Biol. Ixamail Fraire Soto

Director:

Dr. En C. Jesús Adrián López

Diciembre 2019

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar una etapa más en mi vida, acompañada de las personas que más amo, mi familia.

A las personas que más amo en la vida: A mi madre, **María de las Nieves Soto Espino** y a mi padre, **Humberto Fraire Chavarría** por el gran apoyo que me han dado todos estos años, sus enseñanzas y sus grandes consejos que siempre me impulsan a seguir adelante.

A mis hermanos **Lucero** y **Jaime**; por siempre cuidarme, aconsejarme y motivarme a perseguir mis sueños, son los mejores hermanos del mundo.

A mis pequeños sobrinos **Monse**, **Evangeline**, **Simón** y **Ale**, por mostrarme el verdadero valor de la vida.

Por último y no menos importante a ti cielo **José Luis**, por siempre estar ahí, por tus consejos, tu tiempo y por apoyarme en todo.

¡¡LOS AMO!!

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo de investigación, se realizó en el Laboratorio de microRNAs de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas y se contó con el apoyo académico y administrativo de la Maestría en Ciencia y Tecnología Química (MCTQ) de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, contando con los apoyos financieros otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de maestría con registro No **567906**.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento y admiración a mi asesor, el **Dr. Jesús Adrián López** por sus enseñanzas, consejos, confianza y gran apoyo durante mis estudios de maestría, así como al **Dr. Hiram Hernández López** y **Dra. Yamile López Hernández** por sus consejos y su gran apoyo durante toda la realización del proyecto.

A los profesores-Investigadores que han dejado una huella de enseñanza y admiración en mi formación de la Maestría en Ciencia y Tecnología Química: **Dr. Raúl Adrián Martínez Orozco, Dr. Gerardo Martínez Guajardo, Dra. Irma González Curiel, Dr. Jorge Luis Ayala Luján y Dr. Alberto Cervantes Villagrana.**

A mi familia por siempre apoyarme, mis cuñados: **Janeth e Iván** gracias por el gran regalo, mis pequeños hermosos; **Janeth** gracias por siempre tener las mejores palabras de aliento en todo mi proyecto de maestría, mis primos: **Eduardo, Hugo, Dariela, Lupita, Santiago**, siempre trato de dar lo mejor de mí, para motivarlos a superarse día a día, mis Tías: **Teresa, Leticia, Leisdi**, por siempre tener palabras de apoyo, mis abuelos: **Papá Simón, Abuela Evelia, Abuelo Paz** aunque ya no están con nosotros me quedo con sus grandes valores y consejos, **amá Meche y Tía Ermelinda** mis dos abuelas, por sus consejos y su protección.

A mis Amigos que influyeron en mi persona con grandes consejos, **Itzel, Isabel, Sustaita, Ruthis, Adri, Susy y Kukis.**

A mis compañeras y amigas de la Maestría **Nancy, Rox, Geo** pasamos demasiadas aventuras juntas, hoy terminó esta etapa, y estoy segura que una de las mejores cosas que me ha dejado la Maestría es su amistad, gracias infinitas por sus consejos, sus risas, y por todos los momentos compartidos.

A mis compañeros de generación **Crucita, Luis Ángel, Mario y Etshon** por siempre apoyarnos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de microRNAs **Gus, César y Angie**, por siempre tener las mejores palabras de aliento cuando sentía que no podía más, por

todos esos consejos que influyeron en mi persona para seguir adelante en mi vida personal y profesional, ustedes hicieron la diferencia. De igual manera agradezco a **Ricardo, Sergio, Marisol, Monse, Cinthia y Ulises** compañeros de laboratorio.

Y nuevamente a **Dios** por permitirme terminar una etapa más en mi vida, a mi **familia** gracias por siempre estar ahí para mí, por impulsarme a ser mejor persona, son mi mayor inspiración para seguir adelante. ¡Los Quiero Mucho!

Mamá: Mi agradecimiento es principalmente a ti, eres la persona que más amo en la vida, la única que siempre me ha apoyado en todo, la que está ahí incondicionalmente, nadie más sabe, todo lo que costó terminar este proyecto, las lágrimas y sacrificios que pasé, siempre tenías las mejores palabras de aliento para mí, ¡¡ Te amo por siempre ma !!

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	III
ABREVIATURAS	IV
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Cáncer de cuello Uterino	5
2.2 Características distintivas del cáncer.....	6
2.2.1 Mantenimiento de la señalización proliferativa.....	6
2.2.2 Resistencia a muerte celular	6
2.2.3 Angiogénesis.....	7
2.2.4 Invasión y metástasis	7
2.2.5 Replicación ilimitada e inmortalidad.....	7
2.3 Arsénico	9
2.4 microRNAs	11
2.5 Familia miR-34	13
2.6 Metaloproteinasas	14
2.7 Snail1	16
2.8 Notch1	17
2.9 TUBG	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo General	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
6. METODOLOGÍA.....	22
6.1 Tratamiento de células con arsénico	22
6.2 Transfección.....	22
6.3 Zimografía	23
6.3.1 Sobrenadantes tratados con As_2O_3 , $NaAsO_2$ y Na_2HAsO_4	23
6.3.2 Filtrado de sobrenadantes transfectadas con microRNAs	23
6.3.3 Preparación de muestra y electroforesis.....	23
6.4 Western Blot.....	24
6.4.1 Extracción de Proteínas por Buffer de Lisis RIPA	24

6.5	Análisis Estadístico.....	25
7.	RESULTADOS.....	25
7.1	Evaluación de MMP2 y MMP9 mediante diferentes concentraciones de arsénico..	25
7.2	Evaluación de TUBG en células SiHa tratadas con diferentes concentraciones de NaAsO ₂	37
7.3	Sitios de unión entre la familia miR-34 y sus potenciales blancos MMP2, MMP9, Notch1 y Snail1.....	38
7.4	Evaluación de la expresión de MMP2, Notch1 y Snail1 en células SiHa transfectadas con la familia miR-34.....	40
7.5	Evaluación de la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 en células SiHa Transfectadas con los miembros de la familia miR-34.....	44
8.	DISCUSIÓN	45
9.	CONCLUSIONES.....	49
10.	PERSPECTIVAS.....	49
11.	REFERENCIAS.....	50
12.	ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características y habilidades de las células tumorigénicas.....	8
Figura 2. Biogénesis de los miRNAs.	12
Figura 3. Estructura de las metaloproteinasas.....	16
Figura 4. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células SiHa tratadas con NaAsO ₂	28
Figura 5. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células SiHa tratadas con As ₂ O ₃	29
Figura 6. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células SiHa tratadas con Na ₂ HAsO ₄	30
Figura 7. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células C33-A tratadas con NaAsO ₂	31
Figura 8. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células C33-A tratadas con As ₂ O ₃	32
Figura 9. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células C33-A tratadas con Na ₂ HAsO ₄	33
Figura 10. Evaluación de MMP2 y MMP9 en línea celular HaCaT tratadas con NaAsO ₂	34
Figura 11. Evaluación de MMP2 y MMP9 en línea celular HaCaT tratadas con As ₂ O ₃	35
Figura 12. Evaluación de MMP2 y MMP9 en línea celular HaCaT tratadas con Na ₂ HAsO ₄	36
Figura 13. Evaluación de TUBG en línea celular siHa tratadas con NaAsO ₂	37
Figura 14. Sitios de unión de MMP2 con miR-34a-5p y miR-34c-5p.....	38
Figura 15. Sitios de unión de MMP9 con miR-34a-5p y miR-34c-5p.....	38
Figura 16. Interacción de Snail1 con los miembros de la familia miR-34a-5p (a), miR-34b- 3p (b) y miR-34c-5p (c).	39
Figura 17. Interacción de Notch1 con los miembros de la familia miR-34a-5p (a), miR-34b- 3p(b) y miR-34c-5p (c).	39
Figura 18. Evaluación del efecto de los miembros de la familia miR-34 sobre MMP2.	41
Figura 19. Evaluación del efecto de los miembros de la familia miR-34 sobre Notch1.	42
Figura 20. Evaluación del efecto de los miembros de la familia miR-34 sobre Snail1	43
Figura 21. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células SiHa transfectadas con los miembros de la familia miR-34.....	44

ABREVIATURAS

CC: Cáncer Cervical

VPH: Virus de Papiloma Humano

MMP2: Metaloproteinasa 2

MMP9: Metaloproteinasa 9

TUBG: Gamma-tubulina

mRNA: RNA mensajero

As₂O₃: Trióxido de Arsénico

NaAsO₂: Arsenito de Sodio

Na₂HAsO₄: Arseniato de Sodio

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

E6AP: Proteína ligasa asociada a E6

pRB: Proteína del Retinoblastoma

NIC: Neoplasia Intraepitelial cervical

MEC: Matriz Extracelular

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA

SDS: Dodecil sulfato de sodio

APL: Leucemia promielocítica aguda

RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades que causa más muertes en el mundo, el cáncer cérvico-uterino (CaCu) ocupa el cuarto lugar en nivel de incidencia y mortalidad. El principal agente etiológico del CaCu es el virus del papiloma humano (VPH), primordialmente los virus de alto riesgo VPH-16 y VPH-18. Ciertas proteínas están involucradas en la progresión de esta neoplasia, como lo son Metaloproteinasa 2 (MMP2) y Metaloproteinasa 9 (MMP9) que son endodipasas dependientes de zinc, que son capaces de degradar la matriz extracelular. Las metaloproteinasas tienen un papel importante en varios procesos celulares como la proliferación, migración, adhesión, diferenciación y la angiogénesis, siendo importante en el desarrollo del cáncer cervical, ya que pueden actuar como precursoras de la metástasis. Es por ello que es primordial poder suprimir su expresión con diferentes terapias. Un agente terapéutico que se ha estado utilizando en los últimos tiempos y que ha sido muy efectivo en leucemia promielocítica es el As_2O_3 . Además, se ha demostrado *in vitro* que el As_2O_3 y el $NaAsO_2$ inducen la apoptosis en células de cáncer cervical, a través de la sobre-expresión de p53, afectando diversos procesos moleculares. p53 regula de manera positiva a los miembros de la familia miR-34 por lo tanto el tratamiento con arsénico afectará los blancos de esta familia. Teniendo en cuenta estos antecedentes, este trabajo se evaluó la actividad de MMP2 y MMP9 con diferentes concentraciones de arsénico ($NaAsO_2$, As_2O_3 y $NaHAsO_4$) en líneas de cáncer cervicouterino (SiHa, C33-A) y HaCaT mediante zimografía, así como la evaluación por Western Blot de la proteína gamma tubulina (TUBG), proteína implicada en cáncer cervical. Se encontró una disminución en la actividad de MMP2, así como una disminución en la expresión de la proteína TUBG luego del tratamiento a mayor concentración de arsénico. También fueron evaluadas MMP2, MMP9, Notch1 y Snail1 en líneas celulares SiHa transfectadas con los miembros de la familia miR-34 mediante zimografía y Western Blot. La sobreexpresión de la familia miR-34 disminuyó la actividad enzimática de la MMP2 y MMP9, lo que sugiere que los compuestos de arsénico (As_2O_3 , $NaAsO_2$ y Na_2HAsO_4) pueden regular negativamente la progresión tumorigénica en cáncer cervico-uterino mediante la vía arsénico/p53/miR-34.

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases that cause more deaths in the world, cervical-uterine cancer (CaCu) ranks fourth in the level of incidence and mortality. The main etiologic agent of CaCu is the human papillomavirus (HPV), mainly the high-risk viruses HPV-16 and HPV-18. Certain proteins are involved in the progression of this neoplasm, such as MMP2 and MMP9, which are zinc-dependent endopeptidases, which are capable of degrading the extracellular matrix. Metalloproteinases have an important role in several cellular processes such as proliferation, migration, adhesion, differentiation and angiogenesis, being important in the development of cervical cancer, where can act as precursors of metastasis. That is why it is essential to be able to suppress their expression with different therapies. A therapeutic agent that has been used in recent times and has been very effective in promyelocytic leukemia is As_2O_3 . In addition, it has been detected in vitro that As_2O_3 and $NaAsO_2$ induce apoptosis in cervical cancer cells, through the overexpression of p53, affecting various molecular processes. p53 positively regulates the members of the miR-34 family so arsenic treatment affects the targets of this family. Therefore, in this work the activity of MMP2 and MMP9 with different arsenic compounds ($NaAsO_2$, As_2O_3 and $NaHAsO_4$) in cervical cancer lines (SiHa, C33-A) and HaCaT expression by zymography, was evaluated, as well as TUBG protein by Western. Finding a decrease in MMP2 activity, as well as a decrease in TUBG protein expression at a higher concentration of Arsenic. MMP2, MMP9, Notch1 and Snail1 were also evaluated in SiHa cell lines transfected with members of the miR-34 family by Zymography and Western Blot. Overexpression of the miR-34 family decreased the enzymatic activity of MMP2 and MMP9. These results suggest that arsenic compounds (As_2O_3 , $NaAsO_2$ and Na_2HAsO_4) can negatively regulate tumorigenic progression in cervical-uterine cancer through the arsenic / p53 / miR-34 pathway.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad genética muy compleja que involucra anomalías de genes codificantes y no codificantes. La proliferación normal de las células está regulada por proto-oncogenes que promueven la proliferación celular y que se equilibra por su contraparte, genes supresores de tumor, que inhiben la proliferación celular (Calin and Croce 2006). El cáncer cervical es una de las principales causas de mortalidad asociada al cáncer entre las mujeres en todo el mundo, y representa más de 311,000 muertes anuales (OMS,2018). El VPH es el principal agente etiológico en el desarrollo de esta patología (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, Lorincz et al. 2002). El arsénico ha demostrado eficacia terapéutica en cáncer, principalmente el Trióxido de Arsénico (As_2O_3), ya que tiene una larga historia de aplicación en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda y diversas neoplasias hematológicas (Zhang 2017). Esto ha despertado el interés de este compuesto, como, en cáncer cervicouterino, ya que se ha demostrado que induce a apoptosis en células tumorales, inhibe la proliferación celular y actúa como un agente anti angiogénico (Zheng, Deng et al. 1999). Así mismo se ha reportado que inhibe la proliferación celular regulando negativamente la expresión de HPV-E6, oncoproteína de VPH que desempeña funciones vitales en la replicación viral, inmortalización y transformación de las células huésped (Wen, Li et al. 2012). E6 ejerce sus efectos al integrar, inactivar y degradar el gen supresor tumoral p53, gen que está críticamente involucrado en la regulación del ciclo celular, reparación de DNA y muerte celular programada (Thomas, Pim et al. 1999), por ende, al regular negativamente la oncoproteína E6 restablece los niveles de manera positiva en p53. Se sabe que al activarse la proteína p53 a su vez activa a una familia de microRNAs, la familia miR-34, los microRNAs son moléculas no codificantes que influyen en la regulación de diversos procesos celulares ya que inhiben la traducción de RNAs

mensajeros (mRNA) (Bartel 2004). Los miembros de la familia miR-34: 34a-5p, 34a-3p, 34b-5p, 34b-3p, 34c-5p, 34c-3p, son blancos directos de la proteína p53 y su sobreexpresión reprime varios genes implicados en cáncer cervical, ya que como se sabe el cáncer está estrechamente relacionado con la expresión aberrante de varias proteínas asociadas con la regulación de señalización celular (Chan, Wang et al. 2014), como lo son MMP2, MMP9, Notch1, Snail1 y TUBG que desarrollan un funciones importante en procesos celulares conduciendo a carcinogénesis. MMP2 y MMP9 son endodipasas dependiente de zinc, que son capaces de degradar la matriz extracelular y tienen funciones importante en varios procesos celulares como: la proliferación, migración, adhesión, diferenciación y la angiogénesis, siendo importante en el desarrollo del cáncer ya que puede actuar como precursora de metástasis (Rauvala, Aglund et al. 2006). Notch1 es una proteína transmembranal que funciona como receptor de señales extracelulares y participa en varias rutas de señalización durante el desarrollo, como proliferación, crecimiento celular, migración y diferenciación (Sun, Zhang et al. 2015). Estudios recientes han demostrado que, dependiendo del nivel de expresión y del contexto celular, los receptores de membrana Notch contribuyen en la resistencia de la apoptosis en células tumorales (Sun, Liu et al. 2016). Snail1 es una familia de factores transcripcionales que promueven la represión de la molécula de adhesión E-cadherina para regular la transición epitelio-mesenchimal (EMT). Las evidencias emergentes indican que Snail1 confiere a las células tumorales características de células stem cancerosas y promueve la resistencia a los medicamentos, la recurrencia del tumor y la metástasis (Kaufhold and Bonavida 2014). TUBG es una proteína asociada con varias proteínas de punto de control y desempeña un papel en la regulación de la división celular, lo que sugiere que la malla de esta proteína está involucrada en el desarrollo del cáncer (Morris, Brammall et al. 2000). Además, la amplificación del centrosoma se correlaciona con un alto grado histológico tumoral, metástasis en los ganglios linfáticos, y mal pronóstico (Lingle, Barrett et al. 2002).

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer cervico-uterino

El cáncer cervico-uterino es el cuarto cáncer más común en mujeres en todo el mundo, con una incidencia global estimada de 570,000 casos nuevos y más de 311,000 muertes por año (Bray, Ferlay et al. 2018). Aproximadamente el 85% de las muertes por cáncer cervical en el mundo ocurren en países menos desarrollados. En México el cáncer cervical ocupa el tercer lugar con 4,121 decesos en la población femenina al año y con una incidencia de 7,869 casos al año (OMS, 2018). En Zacatecas esta neoplasia es la segunda causa de muerte en la población femenina (INEGI, 2015), siendo el principal agente etiológico el VPH (Zur Hausen 1996).

Los VPHs son un grupo heterogéneo de virus, formados por DNA de doble hebra que infectan las mucosas y las superficies cutáneas, causando verrugas y tumores epiteliales. Los VPHs se pueden dividir en dos grupos: el de bajo riesgo (como el tipo 6 y 11) que inducen verrugas genitales y papilomas respiratorios y el de alto riesgo (16, 18, 31 y 45) que son conocidos como agentes causantes de tumores y neoplasias cervicales (Burd 2003). La infección persistente por VPH de alto riesgo conduce a estadios de neoplasia intraepitelial cervical (Dráberová, D'Agostino et al.), I, II y III. La tasa de progresión de la enfermedad de NIC III a ICC varía de aproximadamente del 12% al 69% (Holowaty, Miller et al. 1999). El genoma del VPH es circular con dos promotores de los cuales se desglosan dos grupos de proteínas virales: los genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y genes tardíos (L1 y L2). Los VPHs se reportan en más del 90% de todos los casos de cáncer cervical, la mayoría de los cuales son carcinomas de células escamosas directamente infectadas con el VPH 16. Por otro lado, los adenocarcinomas cervicales están estrechamente correlacionados con la infección por el VPH 18 (Adams, Wise-Draper et al. 2014). Durante su ciclo de vida viral, el VPH se expresa como un episoma, sin embargo, en ocasiones el genoma del virus se puede integrar al genoma del hospedero, lo cual provoca un incremento en la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 que aumentan el riesgo de transformación maligna (Dürst,

Gissmann et al. 1983). La oncoproteína E6 se une a la proteína ligasa asociada a E6 (E6AP) causando la ubiquitinación y degradación de p53. La pérdida de p53 previene el arresto del ciclo celular y/o una subsecuente apoptosis (Finzer, Aguilar-Lemarroy et al. 2002). En cambio, la proteína viral E7 actúa liberando al factor E2F de su secuestro por la proteína celular pRb, lo que permite la expresión de ciclina D1 y E (Sathish, Wang et al. 2014).

2.2 Características distintivas del cáncer

En la actualidad se tienen seis características biológicas adquiridas por las células cancerígenas durante su progresión hacia la tumorigénesis (Figura 1). (Hanahan and Weinberg 2011) que en cáncer cervical son propiciada por VPH.

2.2.1 Mantenimiento de la señalización proliferativa

Uno de las características esenciales de las células cancerosas es su capacidad para sostener la proliferación crónica. Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento, progresión y división celular, garantizando así una homeostasis del número de células. Las células cancerígenas rompen la homeóstasis entre las células que forman el tejido y comienzan a proliferar sin control (Hanahan and Weinberg 2011), generan sus propios factores de crecimiento como ligandos y receptores (Bergers and Benjamin 2003). También se ha observado que no responden a las señales inhibitoras por contacto (Cavallaro and Christofori 2004). Los puntos de control del ciclo celular también se ven afectados ya que no responden a los inhibidores del ciclo celular como p21, p14 y p16 entre otros (Duronio and Xiong 2013).

2.2.2 Resistencia a muerte celular

Las células tumorigénicas desarrollan una variedad de estrategias para limitar o evitar la apoptosis. La más común es la pérdida de la función de p53 que induce la expresión de genes pro-apoptóticos como bax, bim y puma. La multiplicidad de los mecanismos de evasión de apoptosis refleja la diversidad de señales inductoras de

apoptosis que las poblaciones de células cancerígenas combaten durante su evolución al estado maligno (Angosto 2003).

2.2.3 Angiogénesis

La neovascularización del tumor es marcada por la formación de capilares precoces, vasos complejos y ramificaciones excesivas. Una vez que la angiogénesis ha sido activada, se exhiben diversos patrones de neovascularización (Hanahan and Weinberg 2011).

2.2.4 Invasión y metástasis

Las células asociadas a cáncer típicamente desarrollan alteraciones en su forma, así como en su interacción con otras células y la matriz extracelular. Un cambio representativo es la pérdida de E-cadherina, una molécula implicada en la adhesión célula a célula (Christofori and Semb 1999). Mediante la formación de uniones adherentes con células epiteliales adyacentes, E-cadherina ayuda a ensamblar láminas de células epiteliales y mantener la quiescencia de las células dentro de estas láminas. El aumento de la expresión de esta se reconoce como un antagonista de la invasión y metástasis (Cavallaro and Christofori 2004).

2.2.5 Replicación ilimitada e inmortalidad

La senescencia y apoptosis son dos obstáculos para la proliferación que se han relacionado como importantes defensas anticancerígenas (Hanahan and Weinberg 2011). La inmortalización de variantes extrañas de células que proceden a formar tumores ha sido atribuida a su capacidad de mantener el DNA telomérico a longitudes suficientes para evadir la senescencia o apoptosis. Por lo tanto, el acortamiento de los telómeros ha llegado a ser observado como un mecanismo de sincronización que determina el potencial replicativo limitado de las células normales y por ende uno que debe ser superado por las células cancerígenas (Artandi and DePinho 2009).

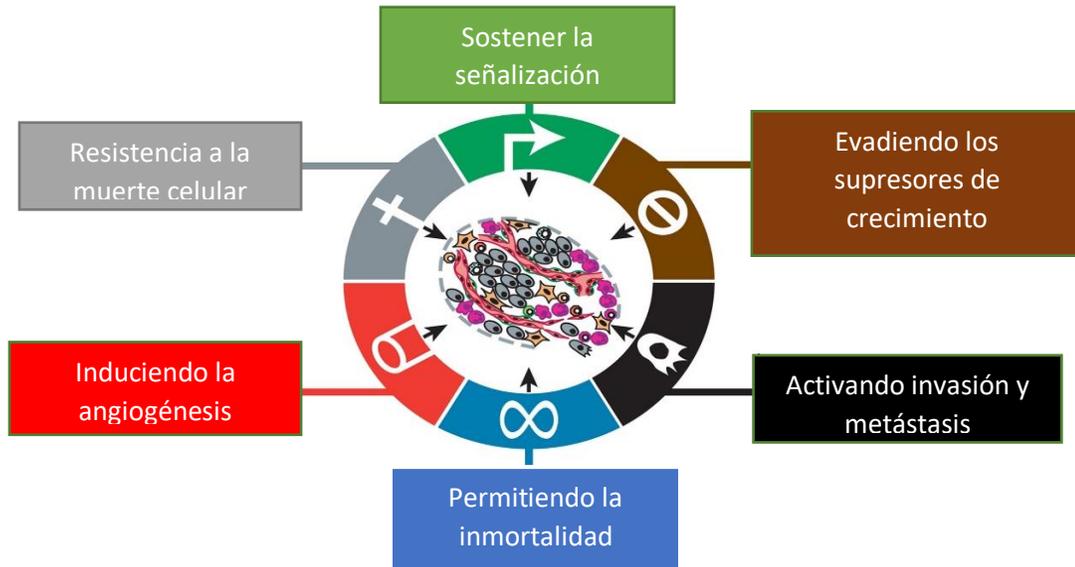


Figura 1. Características y habilidades de las células tumorigénicas. En la figura se muestran las 6 características que debe adquirir una célula normal para transformarse en célula maligna (Hanahan and Weinberg 2011).

El cáncer de cuello uterino proporciona un buen modelo para estudiar el proceso metastásico debido a que ocurre de manera gradual. El espectro completo de la progresión del cáncer de cuello uterino incluye desde el cuello uterino normal, la displasia intraepitelial cervical, el carcinoma in situ, los cánceres metastásicos localmente invasivos y distantes (Syrjänen, Kataja et al. 1992). Cuando las células cancerosas se vuelven más malignas, pueden invadir el sistema linfático y diseminarse a los ganglios linfáticos distantes alrededor de los vasos en la pared pélvica. Entre estos múltiples pasos, la diseminación metastásica de las células cancerosas al área distante, como el ganglio linfático pélvico, es la causa principal del fracaso del tratamiento y la posterior muerte en pacientes con cáncer de cuello uterino (Friedl and Gilmour 2009). Sin embargo, aún no se ha podido encontrar un tratamiento efectivo para pacientes con cáncer cervico-uterino, ya que la recaída postratamiento son comunes y son más difíciles de tratar, por ello, es primordial desarrollar nuevas estrategias quimioterapéuticas, un compuesto que se ha estado

investigando y que ha inducido apoptosis en células de cáncer cervico-uterino es el arsénico.

2.3 Arsénico

El arsénico es un semimetal que se encuentra comúnmente en el suelo, el agua y el aire. El uso medicinal del arsénico y sus derivados se remonta a más de 2400 años en la antigua Grecia y Roma. El arsénico se consideraba un agente terapéutico y un veneno (Bode and Dong 2000). Se sabe desde hace mucho tiempo que los agentes arsénicos actúan como carcinógenos en niveles altos, lo que conduce a cánceres de piel, pulmón, riñón y tracto urinario (Huff, Chan et al. 2000). A la inversa, en niveles bajos, se ha demostrado que tienen actividad anticancerígena. Se ha utilizado para tratar la plaga, la malaria, el cáncer y para promover la sudoración. Los médicos recetaron arsénico para uso externo e interno a lo largo del siglo XVIII. Los arseniuros fueron ingredientes clave en antisépticos, antiespasmódicos, cáusticos, colagogos, hematínicos, sedantes y tónicos (Park, Lee et al. 2005). Aunque el arsénico resultó ser beneficioso en muchas enfermedades. Los estados y los efectos secundarios o repercusiones posteriores de la terapia fueron inconsistentes de paciente a paciente. Las preocupaciones entre los profesionales médicos acerca de las toxicidades asociadas con el uso de arsénico, especialmente el uso a largo plazo, surgió en los últimos años. En la medicina tradicional china, el trióxido de arsénico As_2O_3 se registró en el Compendio de Materia Médica, más tarde, el óxido de arsénico también se usó como la opción de tratamiento crónico de leucemia mieloide en el siglo XIX. Debido a los efectos secundarios tóxicos y la introducción de la radioterapia y la quimioterapia modernas, la medicina occidental abandonó el uso del arsénico como tratamiento para la leucemia mieloide crónica (Kwong and Todd 1997). Sin embargo, recientemente, su efecto terapéutico sobre la leucemia promielocítica aguda ha iniciado un nuevo despertar de interés en el compuesto de arsénico en medicamentos (Zhang, Chen et al. 2001). La actividad de As_2O_3 en otros tipos de cáncer ahora se han investigado exhaustivamente a nivel molecular, celular y clínico (Haga, Fujita et al. 2005). Se ha informado que As_2O_3 induce la apoptosis de células tumorales, para inhibir la

proliferación y ser un agente anti-angiogénico. A través de numerosas vías facilita estas alteraciones celulares profundas, incluida la inducción de la apoptosis, la inhibición de la proliferación, la estimulación de la diferenciación y la inhibición de la angiogénesis. Se ha reportado que As_2O_3 puede inducir apoptosis en células epiteliales cervicales al regular negativamente la expresión de HPV-E6 y regular positivamente p53 (Zheng, Deng et al. 1999). En otros reportes con células de mieloma cultivadas se observa que el trióxido de arsénico induce a apoptosis a través de la activación de la caspasa-9 en clínicamente relevantes (Maher 2000), así como una reducción en la actividad de la telomerasa (Chou, Hawkins et al. 2001).

Los efectos biológicos del arsénico (principalmente las formas trivalentes, arsenito y trióxido de arsénico) pueden estar mediados por reacciones con residuos de cisteína muy espaciados en proteínas celulares críticas (Wen, Li et al. 2012). Diversas líneas de evidencia obtenidas a partir de sistemas modelo muy diferentes apuntan a la capacidad del arsénico para alterar la función de varias enzimas y moléculas de señalización, e influyen notablemente en la expresión génica (Goussetis, Altman et al. 2010). El estado de oxidación del arsénico influye en las vías de señalización que se activan, las vías que se activan pueden variar según los orígenes específicos del tejido o las características de células particulares.

El $NaAsO_2$ otro compuesto de arsénico activa el factor de transcripción AP-1, como consecuencia del aumento de la actividad de sus componentes mitogénicos, c-fos y c-jun. El arsenito puede estimular la actividad de JNK mediante la inhibición de una fosfatasa JNK constitutiva, cuya función en las células no estimuladas es mantener una actividad de JNK basal baja (Wen, Li et al. 2012). Otros estudios muestran investigaciones en cáncer cervicouterino, y han demostrado que el $NaAsO_2$ reprime los oncogenes E6 y E7, restaura la vía supresora de tumores p53 e induce la apoptosis en las células SiHa (Chou and Huang 2002). p53 puede inducir la muerte celular programada mediante dos tipos de genes diferentes: genes codificantes y genes no codificantes como los microRNAs. En este último mecanismo se encuentran los miembros de la familia miR-34.

2.4 microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de 18-22 nucleótidos que actúan como importantes reguladores de la expresión génica en el nivel post-transcripcional. Uno de los mecanismos a través del cual los miRNAs regula la expresión génica implica la interacción de sus secuencias "semilla" principalmente con el extremo 3' y con menos frecuencia en el extremo 5' de los mRNAs (Gulyaeva and Kushlinskiy 2016). Los miRNAs regulan la expresión de genes mediante dos mecanismos: el primero consiste en inhibir la traducción cuando existe una complementariedad parcial con el mRNA blanco, mientras que la segunda consiste en la degradación del mRNA blanco si existe una complementariedad total (Bartel 2004).

La biogénesis de los miRNAs comienza con la transcripción del gen, miRNA primario (pri-miRNA), que tiene una estructura de caperuza 5' y en el 3' una secuencia poliadenilada. La transcripción típicamente está mediada por la RNA polimerasa II. Los pri-miRNAs se escinden mediante el complejo microprocesador, compuesto por la proteína de unión a RNA DGCR8 y la RNasa Drosha de tipo III, en una estructura de tallo-lazo ~85~ nucleótidos llamada miRNA precursor (pre-miRNA). Tras el transporte por el complejo Ran/GTP/Exportina 5 del núcleo al citoplasma, los pre-miRNAs son procesados por la enzima RNasa III, Dicer formando un miRNA dúplex de ~ 20-22 nucleótidos. Después de desenrollar el dúplex, el miRNA maduro se incorpora a un complejo de proteína denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y guía a RISC al mRNA diana (Figura 2) (Peng and Croce 2016).

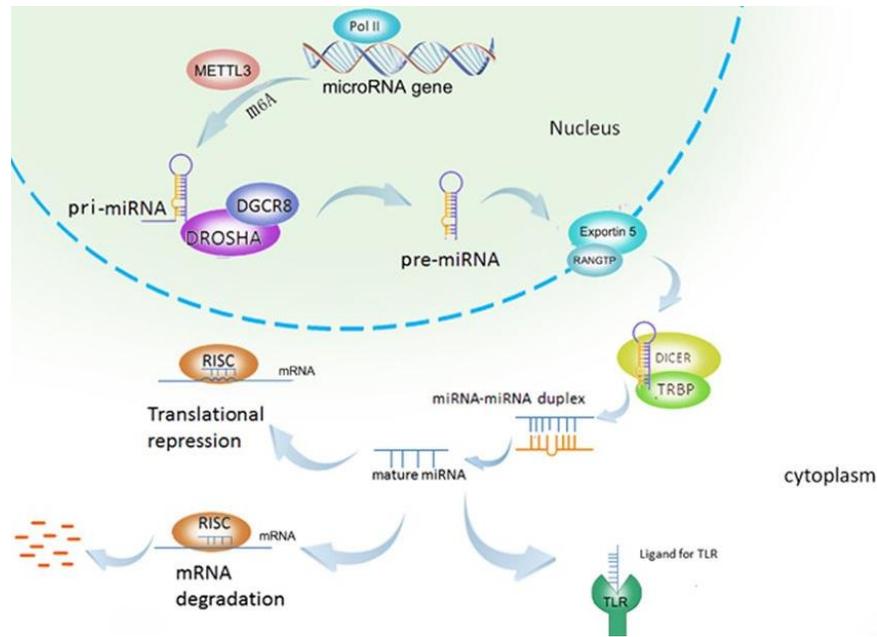


Figura 2. Biogénesis de los miRNAs. Los genes de miRNA generalmente se transcriben por la RNA polimerasa II para producir los grandes transcritos primarios denominados pri-miRNA, que se escinden mediante un complejo microprocesador, compuesto por la proteína de unión al ARN DGCR8 y la RNAasa Drosha de tipo III, en un bucle-bucle de ~ 85 nucleótidos estructura llamada pre-miRNA. Luego del transporte por el complejo Ran / GTP / Exportin 5 desde el núcleo al citoplasma, los pre-miRNA son procesados por otra enzima RNasa III, Dicer a un dúplex de miARN / miARN * de 20-22 nucleótidos. Una vez que el dúplex se desenrolla, el miRNA maduro se incorpora a un complejo de proteínas denominado RISC. Un RISC cargado con miRNA media el silenciamiento del gen a través de la escisión y degradación del mRNA, o la represión de la traducción en función de la complementariedad entre el miRNA y el transcrito del mRNA seleccionado. Además, los miRNAs pueden funcionar como ligandos para unirse directamente con el receptor tipo Toll (TLR), lo que desencadena las vías de señalización. Recientemente se descubrió que la metiltransferasa-like 3 (METTL3) metila los pri-miRNAs, marcándolos para su reconocimiento y procesamiento por DGCR8 para producir un miRNA maduro. (Peng and Croce 2016).

2.5 Familia miR-34

Los miRNAs pertenecientes a la familia miR-34 han sido propuestos como importantes moduladores de la vía p53 y potenciales supresores de tumores en cáncer humano (Concepcion, Han *et al.* 2012). En mamíferos, la familia miR-34 comprende tres miRNAs procesados que están codificados por dos genes diferentes: miR-34a está codificado por su propio transcrito, mientras que miR-34b y miR-34c comparten un transcrito primario común (Hermeking 2010). El miRNA maduro se origina en el brazo 5' o en el brazo 3' del producto precursor y se indica con un sufijo -5p o -3p, respectivamente (Mitra, Lin *et al.* 2015). Curiosamente, los miRNAs de una familia no se expresan por igual, ni tampoco la cadena 5p ni 3p de un pre-miRNA, la hebra del miRNA maduro que realiza el silenciamiento se reconoce como cadena guía y el otro como cadena estrella (*) o cadena pasajera, que habitualmente se degrada y casi nunca se estudia, la maduración del miRNA es un proceso complejo que consta de dos cortes, además de la inestabilidad termodinámica de la secuencia e interacciones proteicas. La cadena guía y estrella tienen cientos de blancos potenciales y cada miembro de la familia tiene una expresión de mRNA maduro particular que determina las funciones diferenciales o complementarias que regulan los procesos celulares. La hebra guía de los miembros de la familia miR-34 tiene cinco nt diferentes, mientras que la cadena pasajera tiene 10 nt, por lo que podría argumentarse un efecto celular diferencial en respuesta a los mRNA blancos regulados por cada miembro (Granados-López, Ruiz-Carrillo *et al.* 2017)

En su región promotora los genes miR-34 a, b y c tienen sitios de unión para p53, que regula positivamente la expresión de miR-34 (Hermeking 2010). La función de los miembros de la familia miR-34 está implicada en proliferación celular, supervivencia, apoptosis, migración, invasión y angiogénesis (Slabáková, Culig *et al.* 2017). Además han sido estudiados por su papel en el desarrollo del cáncer de cuello uterino, donde presentan un papel clave en la inhibición de la transformación celular y la carcinogénesis (Li, Hu *et al.* 2010). Estos miRNAs presentan una disminución en lesiones preneoplásicas al cáncer de cuello uterino invasivo y por tanto podrían estar involucrados en la metástasis y la progresión en pacientes con

cáncer de cuello uterino, lo que sugiere que miR-34a es un supresor tumoral clave y un potencial biomarcador de pronóstico y terapia en el cáncer de cuello uterino (Rokavec, Li et al. 2014). Varios estudios reportados demuestran que los miembros de la familia miR-34 inhibe la expresión de las proteínas MMP2, MMP9, Snail1 y Notch-1 implicadas en la metástasis del cáncer de cuello uterino, uniéndose a su región 3'UTR, evitando la progresión tumoral.

2.6 Metaloproteinasas

La Matriz extracelular (MEC) está formada por una gran cantidad de componentes que se clasifican en dos o tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina). Tales variedades de componentes se encuentran interconectados y requiere una familia de proteasas denominadas MMP de la MEC, cuya misión es degradar las proteínas integrantes de dicha MEC en su medioambiente inmediato y activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión. La interacción de la célula con la MEC desencadena cascadas de señalización que promueven la diferenciación, migración y movilización celular, esenciales para el mantenimiento de la homeostasis (María Cascales Angosto, Álvarez-Gómez et al. 2010).

Las MMPs intervienen en diversos procesos fisiológicos y patológicos del organismo. Regulan, por ejemplo, las vías de señalización que controlan el crecimiento celular, inflamación y angiogénesis. Cumplen funciones moduladoras en el complejo microambiente tumoral interviniendo en las etapas tempranas de la carcinogénesis, en la invasión y la producción de metástasis tumorales. Participan en el procesamiento de moléculas bioactivas como citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Folgueras, Pendas *et al.* 2004). Las MMPs son reguladas por inhibidores endógenos (TIMPs). El adecuado balance entre ambas moléculas es fundamental para mantener la homeostasis (Handsley and Edwards 2005). Debido al papel que desempeñan en diferentes etapas de la biología del cáncer, son un blanco potencial para futuras estrategias en la terapéutica de esta enfermedad (Moore and Crocker 2012).

Las metaloproteasas constituyen una familia de proteasas dependiente del zinc y se les clasifica, de acuerdo a sus diferencias estructurales, en cinco grupos claramente diferenciados (Angosto and Álvarez-Gómez 2010)

1. Colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18) son capaces de escindir el colágeno intersticial I, II y III dando lugar a colágeno desnaturalizado o gelatina.
2. Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) degradan el colágeno desnaturalizado o gelatina. MMP-2 también digiere colágenos I, II y III y se expresa en condiciones normales por las células del estroma de la mayoría de los tejidos
3. Estromalisinas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11) digieren diversos componentes de la MEC.
4. Matrilisinas (MMP-7 y MMP-26) estructuralmente son las más simples debido a que carecen del dominio hemopexina.
5. Metaloproteasas asociadas a membrana denominadas MT-MMP se dividen en dos:
 - Proteínas transmembrana unidas a la membrana por un sitio hidrófobo: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24
 - Proteínas que poseen glicofosfatidilinositol (GPI): MMP-17 y MMP2.

Estructura de las Metaloproteinasas

La estructura de las MMPs comprende varios dominios comunes a la mayoría de ellas:

- Péptido señal o predominio, este es necesario para el desplazamiento intracelular de la enzima hasta la membrana ya que es eliminado después de la secreción de la proteasa.
- Dominio propeptídico. Está formado por una secuencia peptídica con un residuo de cisteína, que interactúa con el sitio catalítico.
- Dominio catalítico carboxiterminal que contiene un átomo de zinc y otros dominios variables.
- Dominio tipo hemopexina, en la posición carboxiloterminale que interviene en la unión a sustrato específicos de las metaloproteasas y con los inhibidores endógenos.

- Dominio transmembrana, en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática (Nagase, Visse *et al.* 2006) .

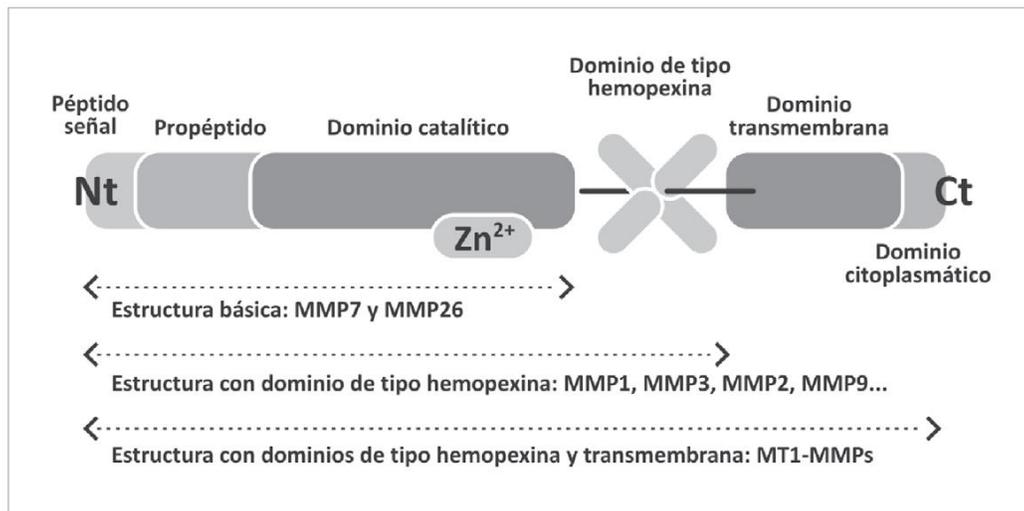


Figura 3. Estructura de las metaloproteinasas. Se muestra los dominios que cada una tiene, siendo el primero, péptido señal, luego el propeptido, el dominio catalítico, y dominio transmembrana (María Cascales Angosto, Álvarez-Gómez *et al.* 2010).

2.7 Snail1

La familia Snail, que incluye Snail (Snail-1), Slug (Snail-2) y Smuc (Snail-3), son un grupo de factores de transcripción que contienen dedos de zinc conservados. Se encontraron en *Drosophila melanogaster* en 1984. Snail1 también tiene homólogos bien documentados en *Xenopus*, *C. elegans*, ratones, polluelos y humanos (Grau, Carteret *et al.* 1984). Snail1 es una proteína con dedos de zinc C₂H₂ compuesta por 264 aminoácidos, con un peso molecular de 29.1 kDa (Nieto 2002). En los seres humanos, Snail1 se expresa en los riñones, tiroides, glándulas suprarrenales, pulmones, placenta, ganglios linfáticos, corazón, cerebro, hígado y los tejidos del músculo esquelético (Moody, Perez *et al.* 2005). Está implicado en la represión transcripcional de E-cadherina que es el sello distintivo de la EMT, también rige los genes relacionados con las funciones independientes de la EMT, como la supervivencia celular, motilidad, anti-apoptosis, inmunosupresión, las propiedades de las células stem y quimio-resistencia (Kudo-Saito, Shirako *et al.* 2009). La EMT inducida por Snail convierte las células epiteliales en células mesenquimatosas con

propiedades migratorias que contribuyen a la formación de muchos tejidos durante el desarrollo embrionario y a la adquisición de propiedades invasivas en tumores epiteliales. La EMT inducida por Snail se debe en parte a la represión directa de la transcripción de E-cadherina durante el desarrollo y la progresión tumoral (Wang, Shi et al. 2013). Snail1 se expresa en cáncer de mama, colorrectal, gástrico, pancreático, melanomas, de próstata y cáncer cervical (Kaufhold and Bonavida 2014). La sobreexpresión generalmente se correlaciona con una mayor migración, invasión y metástasis (De Craene, Van Roy et al. 2005). Con frecuencia, las neoplasias malignas más avanzadas y el mal pronóstico también acompañan a la expresión elevada de dicha proteína. Chen et al. encontró Snail1 expresado en el 94% de las muestras (n = 70), y su expresión elevada correlaciona con el estadio tardío FIGO (Chen, Li et al. 2013).

2.8 Notch1

Thomas Hunt Morgan describió al sistema Notch, por primera vez, en 1917, como responsable de la neurogénesis y la especificación del ectodermo en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Morgan 1917). A mediados de los años ochenta, los grupos de Artavanis-Tsakonas y Young clonaron y expresaron independientemente el gen que consiste en un receptor con un solo dominio transmembranal (Wharton, Johansen et al. 1985). A la fecha, se han identificado varios genes del receptor Notch en diversas especies, incluyendo la humana y en ratón, en las que se conocen cuatro genes que codifican a sus correspondientes proteínas Notch 1 a la 4. Se demostró que Notch-1 se expresa a altas concentraciones en una amplia variedad de tejidos en el epitelio estratificado de la epidermis y en capas suprabasales intermedias de las mucosas de la cavidad oral, esófago, ectocérvix y vagina (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999). La función de la señalización Notch involucra una gran variedad de procesos celulares incluyendo el mantenimiento de células troncales, especificación del destino celular, diferenciación, proliferación y apoptosis, por lo que posee efectos pleiotrópicos en diferentes órganos (Radtke and Raj 2003). Los componentes de la vía Notch están involucrados en diversas enfermedades humanas, siendo la más frecuente el

cáncer. Entre las causas principales se encuentran la presencia de mutaciones, deleciones, translocaciones e inserciones virales en sus genes.

La señalización Notch desempeña un papel importante en la angiogénesis, que es esencial para el crecimiento, progresión y metástasis de un tumor (Wharton, Johansen et al. 1985). Los receptores Notch y los ligandos están implicados en la tumorigénesis y se expresan conjuntamente en las células tumorales y el compartimento estromal, están expresados en células adyacentes que tienen el potencial de regular la especificación, diferenciación, proliferación y supervivencia celular, la señalización Notch con frecuencia está desregulada en varios cánceres (Bridges, Oon et al. 2011). Se han demostrado concentraciones elevadas de estos receptores y sus ligandos en relación con tejidos normales en los siguientes cánceres: cervical, de colon, cabeza y cuello, pulmón, renal, pancreático, mieloides agudo, enfermedad de Hodgkin, linfomas de células grandes y mama (Miele, Miao et al. 2006). El primer estudio realizado sobre Notch en cáncer cervicouterino en humano señala que su expresión está asociada a células escamosas del cérvix en carcinomas in situ e invasivos.

2.9 TUBG

El gen TUBG fue descubierto por primera vez en el hongo *Aspergillus nidulans* como regulador del ensamblaje de microtúbulos, está altamente conservada entre las especies. Se han descrito dos genes de esta proteína y un pseudogen en humanos (Alvarado-Kristensson 2018). TUBG es una proteína expresada de forma ubicua que aparece en abundancia tanto en el citosol como en los compartimentos nucleares de las células en todos los tejidos de los mamíferos (Dráberová, D'Agostino et al. 2015) regula la nucleación de la $\alpha\beta$ -tubulina interfásica, la duplicación centrosomal y la formación de huso, se produce en el citosol, centrosomas y núcleo (Höög, Zarrizi et al. 2011). Existe evidencia sustancial de que los centrosomas y la proteína regulan la transición de G1 a S, progresión mitótica, y citocinesis (Gromley, Jurczyk et al. 2003). En la fase G1, la mayor parte del grupo de TUBG está en el citosol, y parte de este grupo citosólico crea túbulos. Sin embargo, en la transición G1-S, el número de túbulos γ -citosólicos se reduce y hay

una acumulación posterior de la proteína en el compartimento nuclear y el PCM (Alvarado-Kristensson, Rodríguez et al. 2009). TUBG está asociada con varias proteínas de punto de control y desempeña un papel en la regulación de la división celular, lo que sugiere que la malla de esta proteína está involucrada en el desarrollo del cáncer (Morris, Brammall et al. 2000). Además, la amplificación del centrosoma se correlaciona con un alto grado histológico tumoral, metástasis en los ganglios linfáticos y mal pronóstico (Lingle, Barrett et al. 2002). En varios tumores y líneas celulares (meduloblastoma, mielomas, carcinoma de células no pequeñas, cáncer de mama, gliomas y glioblastoma), el patrón de localización y los niveles de (Caracciolo, D'agostino et al. 2010) expresión están alterados. Estas observaciones implican que el aumento de sus niveles puede conducir a una malla de la proteína de mayor complejidad y favorecer así la progresión tumoral (Cho, Whipple et al. 2010)

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico-uterino es uno de los tipos de cáncer más frecuente y la cuarta causa de muerte en el mundo. La propagación de las células cancerosas es la principal causa de muerte ya que invaden diferentes tejidos y órganos. La desregulación o sobreexpresión de varios tipos de proteínas originan dicha proliferación celular ilimitada siendo una de las principales características distintivas del cáncer ya que es fundamental en el crecimiento tumoral y por ende en la invasión y metástasis. Algunas de las principales proteínas que se sobre-expresan en el cáncer cérvico-uterino son MMP2, MMP9, Notch1, Snail1 y TUBG, por ende, es primordial poder suprimir su expresión. La expresión de dichas proteínas es regulada a diferentes niveles y por diversas moléculas como microRNAs ó compuestos de arsénico. En los últimos años han surgido nuevas terapias para combatir el cáncer y se ha utilizado As_2O_3 como terapia en leucemia. Se ha demostrado que $NaAsO_2$ induce la sobre-expresión de p53 afectando diversos procesos celulares y moleculares. p53 regula positivamente a los miembros de la familia miR-34 por lo tanto el tratamiento con arsénico afectará a los blancos de esta familia. Los brazos miR-34c-5p, miR-34a-5p hibridan con el 3'UTR de MMP2 los brazos miR-34 a-5p y miR-34a-3p con MMP9. La regulación a través de arsénico en el sistema p53-miR-34 es importante para ampliar el conocimiento en el mecanismo de acción del arsénico. El arsenito y arseniato de sodio han sido estudiados en cáncer cérvico-uterino induciendo apoptosis en varias líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino. Sin embargo, su efecto en migración e invasión no está dilucido. Por estos motivos, en el presente trabajo se pretende determinar el efecto de los diferentes compuestos de arsénico y de los miembros de la familia miR-34 sobre la en la expresión de las MMP2, MMP9, Notch1, Snail1 y TUBG en células de cáncer cervical.

4. HIPÓTESIS

Si las proteínas MMP2, MMP9 y sus reguladores están involucradas en invasión y migración en cáncer cérvico-uterino, entonces el tratamiento con As_2O_3 , $NaAsO_2$ y Na_2AsHO_4 y la sobreexpresión de los miembros de la familia miR-34 alterará su expresión.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar el efecto de As_2O_3 , $NaAsO_2$ y Na_2HAsO_4 y de los miembros de la familia miR-34 sobre MMP2, MMP9 y sus reguladores en las líneas celulares HaCaT, SiHa y C-33A.

5.2 Objetivos específicos

- 1.- Analizar la actividad de MMP2 y MMP9 en células HaCaT, SiHa y C-33A tratadas con As_2O_2 , $NaAsO_2$ y Na_2HAsO_4 .
- 2.- Evaluar la expresión de las proteínas TUBG en células SiHa tratadas con $NaAsO_2$.
- 3.- Analizar la actividad de la MMP2 y MMP9 en células SiHa transfectadas con los miembros de la familia miR-34.
- 4.- Evaluar la expresión de las proteínas MMP2, Notch1 y Snail1 en células SiHa transfectadas con los miembros de la familia miR-34.

6. METODOLOGÍA

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de microRNAs perteneciente a la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

6.1 Tratamiento de células con arsénico

Se cuantificaron las células SiHa, HaCaT y C-33a mediante cámara de Neubauer y se sembraron 1×10^5 por pozo. Se agregaron 3 ml de DMEM con 5% de FBS en caja multipozos y se adicionó 625nM, 1250nM, 2500nM, 5000nM y 10000nM de NaAsO_2 , AsO_3 y NaHAsO_4 . Como control se usaron células expuestas a agua que se usó como solvente para los compuestos de arsénico. Las células tratadas, se agitaron e incubaron por 72 horas a 37°C y finalmente se colectó el medio. (Realizado por el Q. A. Gustavo Araujo Huitrado).

6.2 Transfección

Se cuantificaron las células SiHa mediante cámara de Neubauer. Después de cuantificar las células se colocaron 2 tubos de 1.5 ml por tratamiento miR-34a-5p, miR-34a-3p, miR-34b-5p, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-34c-3p, C- y mock y se añadieron 100 μl de DMEM basal a cada uno, luego se añadieron a cada uno de los primeros tubos 10 μl de los respectivos miRNAs. A los segundos tubos se les agregaron 1.5 μl de lipofectamina 2000. Después se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente, el contenido de los tubos con lipofectamina 2000 se pasó a los distintos tubos con miRNAs, se resuspendieron y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente dentro de la campana. Posteriormente el contenido de los tubos se depositó por goteo en cajas de 6 pozos, luego fueron colocadas 100,000 células por pozo y se ajustó a un volumen final de 600 μl con DMEM basal. Después se incubaron las cajas durante 7 horas dándoles una agitación cada 30 minutos, al concluir las horas de incubación se agregaron 400 μl de DMEM completo y se volvieron a incubar por 12 horas, luego se añadieron 2ml de DMEM completo y se incubaron nuevamente, por 72 horas. Como controles del experimento se utilizaron células no tratadas, mock que corresponde a células tratadas con Lipofectamina

2000 y C- que es una secuencia dúplex similar a un miRNA, pero sin secuencias blanco conocidas dentro de células humanas (realizada por el M. en C. Sergio Córdova Rivas).

6.3 Zimografía

6.3.1 Sobrenadantes enriquecidos con As_2O_3 , $NaAsO_2$ y Na_2HAsO_4

Se colectó el sobrenadante de las células SiHa, HaCaT y C-33A; Control y de los tratados con 625, 1250, 2500, 5000 y 10000 nM (cada uno en sus respectivos tubos falcon de 15 ml) se guardaron a una temperatura de $-20^{\circ}C$ hasta su uso.

6.3.2 Filtrado de sobrenadantes transfectadas con microRNAs

Se colectó el sobrenadante de las células SiHa tratadas con Lipofectamina 2000 (MOCK), C-, miR-34a-5p, miR-34a-3p, miR-34b-5p, miR-34b-3p, miR-34c-5p y miR-34c-3p y se guardaron a una temperatura de $-20^{\circ}C$ hasta su uso. Los sobrenadantes se colectaron por triplicado y se añadieron a tubos Filtro centrífugo Amicon® Ultra-0,5 (Millipore) de 12 ml para filtrarlos por centrifugación a 5000xg por 45min. Después se recuperó el concentrado con una micropipeta y se introdujo en la parte inferior del dispositivo de filtro y se retiró la muestra usando movimientos de barrido de lado a lado para garantizar la recuperación total del concentrado. El concentrado se pasó a tubos eppendorf de 1ml y se almacenó a $-20^{\circ}C$ hasta su uso.

6.3.3 Preparación de muestra y electroforesis

En tubos eppendorf de 1 ml se colocaron 12 μ l de sobrenadante y se mezclaron con 6 μ l de buffer de corrida (2.5% SDS, 1% sacarosa). El SDS-PAGE y los sobrenadantes se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% que contiene 4 mg/ml de gelatina (Sigma). Después de la electroforesis, los geles se renaturalizaron lavando con Triton X-100 al 2.5% dos veces durante 30 min. Las bandas transparentes del sustrato hidrolizado se desarrollaron mediante incubación en tampón de revelado (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, $CaCl_2$ 10 mM y $ZnCl_2$) a $37^{\circ}C$ durante 48 h y se tiñeron con 0.025% (p/v) de Coomassie blue R250 durante 1 h. La actividad gelatinolítica de las bandas de MMP se cuantificó con el fotodocumentador (programa Quantity One, sistema Gel Doc 2000, Bio-Rad, EE.UU).

6.4 Western Blot

6.4.1 Extracción de Proteínas por Buffer de Lisis RIPA

Las células SiHa, HaCaT y C33-A, fueron tratadas con los compuestos de arsénico, así como la línea celular SiHa con los miembros de la familia miR-34, se agregó el buffer de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl pH 8 50 mM, SDS 0.1%, NP40 1%, AEBSF 0.5 mM, Deoxicolato 10mM, 4 pellets de inhibidor de proteasas) y se dejaron reposar por 5 minutos, se colectaron en un microtubo de 1.5 ml, se centrifugó durante 15 min a 13,500 rpm. Se recuperó el sobrenadante en otro microtubo de 1.5ml y se almacenó la muestra a -20°C.

Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford, posteriormente se tomaron alícuotas con 15 µl y se les agregó leamli 1X (Leamli 5X (250 mM tris-HCl pH 6.8. 10% SDS, 50% glicerol, 10% beta-mercapto-etanol, 0.25% azul de bromofenol). Después se hirvieron por 5 minutos para posteriormente cargarse en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y 8 % y se corrió a 80 V constantes por 90 minutos en buffer de corrida 1X (Buffer de corrida 5X (25 mM tris-base, 192 mM glicina, 1% SDS). Se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) por 120 minutos a 300 mA constantes utilizando buffer de transferencia 1X (Buffer de transferencia 5X (25 mM tris-base, 192 mM glicina). Después se bloqueó por 2 horas con solución (PBS-tween 1X con 5% de leche). Al término del bloqueo se incubó la membrana con anticuerpo primario (1:1000 para Notch1, Snail1, MMP2, TUBG y beta actina) por 12 horas. Después se realizaron tres lavados con 10 ml PBS 1X-Tween 20 al 1% durante 10 minutos a 65 rpm. Posteriormente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario para Notch1 (anti-rabbit), Snail1 (anti-goat), MMP2 (anti-rabbit), TUBG (anti-mouse) y para beta actina (anti-goat) 1:10000. Después se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X Tween 20 al 1%, para posteriormente analizar la quimioluminiscencia mediante el kit ECL (Santa Cruz Biotechnology), en el fotodocumentador (programa Quantity One, sistema Gel Doc 2000, Bio-Rad, EE.UU).

6.5 Análisis Estadístico

Los datos que se obtuvieron se sometieron a prueba Anova de una vía y un post hoc Dunnett. En las gráficas se muestra la desviación estándar y se considera que la diferencia es significativa si el resultado obtenido es \leq a 0.05.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de MMP2 y MMP9 mediante diferentes concentraciones de arsénico.

Para determinar si el NaAsO_2 , As_2O_3 y Na_2HAsO_4 inhibe la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 en líneas celulares SiHa, C33-A y HaCaT se realizó un ensayo de zimografía. En la figura 4 se observa que la actividad enzimática de MMP2 se reduce significativamente desde 2500 nM de NaAsO_2 en línea celular SiHa (Figura 4a y 4b). En la figura 4b se muestran los porcentajes de actividad de MMP2 con las diferentes concentraciones de NaAsO_2 y se puede apreciar una disminución de la actividad de MMP2 a partir de 625nM y continua a 1250nM, respecto al control, sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p=0.08$ y 0.06). Los tratamientos con 2,500nM, 5000 nM y 10000 nM de NaAsO_2 muestran un decremento de 21, 25 y 30%, con respecto al control, obteniendo diferencia estadísticamente significativa ($p=0.002$, 0.02 y 0.02 , respectivamente). En la figura 5 se observó que la actividad enzimática de MMP2 se reduce significativamente desde 625 nM hasta 10000nM de As_2O_3 (Figura 5a y 5b). En la figura 5b se muestran los porcentajes de actividad de MMP2 con las diferentes concentraciones de As_2O_3 y se puede apreciar diferencia estadísticamente significativa en todos los tratamientos ($p=0.01$, 0.01 , 0.005 , 0.006 y 0.005). En la figura 6 se observó que la actividad enzimática de MMP2 se reduce significativamente en 10,000nM de Na_2HAsO_4 (Figura 6a y 6b). En la figura 6b se muestran los porcentajes de actividad de MMP2 con diferentes concentraciones de Na_2HAsO_4 y se puede apreciar una disminución desde 1,250nM, 2,500nM, 5,000nM de la actividad de MMP2 con respecto al control, sin embargo, no muestra una diferencia estadísticamente

significativa ($p=0.1$, 0.08 y 0.059). El tratamiento con 10000nM de NaHAsO_4 muestra un decremento de 48% , con respecto al control, obteniendo diferencia estadísticamente significativa ($p=0.02$). En la figura 7 se observó que la actividad enzimática de MMP2 se reduce significativamente en $5,000\text{nM}$ de NaAsO_2 en las células C33-A (Figura 7a y 7b). En la figura 7b se observan los porcentajes de actividad de MMP2 con diferentes concentraciones de NaAsO_2 y se puede apreciar una disminución desde 625nM , 1250nM , 2500nM y $10,000\text{nM}$ de la actividad de MMP2 con respecto al control, sin embargo, no muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.058$, 0.59 , 0.07 y 0.056). El tratamiento con 5000nM de NaAsO_2 muestra una disminución de la actividad de la MMP2 obteniendo diferencia estadísticamente significativa ($p=0.005$). En la figura 8 se se puede apreciar que la actividad enzimática de MMP2 se reduce significativamente en $5,000\text{nM}$ y $10,000\text{nM}$ de As_2O_3 (Figura 8a y 8b). En la figura 8b se observan los porcentajes de actividad de MMP2 con diferentes concentraciones de As_2O_3 y se puede apreciar una disminución en 625nM , 1250nM , 2500nM de la actividad de MMP2 con respecto al control, sin embargo, no muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.056$, 0.07 y 0.071). El tratamiento con 5000nM y $10,000\text{nM}$ de As_2O_3 muestra una disminución obteniendo diferencia estadísticamente significativa ($p=0.008$ y 0.003). En la figura 9 se muestra una pequeña disminución en la actividad enzimática de MMP2 en 5000nM (Figura 9a y 8b). En la figura 9b se muestran los porcentajes de actividad de MMP2 con diferentes concentraciones de Na_2HAsO_4 y se puede apreciar sólo una pequeña disminución en 2500nM , 5000nM y 10000nM , sin embargo, no muestran diferencia estadísticamente significativa ($p=0.09$, 0.081 , 0.06 y 0.1). En la figura 10 se observó la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 en línea celular HaCaT, encontrando una disminución dependiente en MMP2 desde $1,250\text{nM}$, mientras que en MMP9 no se tiene una disminución constante (Figura 10 a, 10b y 10c). En la figura 10b y 10c se observan los porcentajes de actividad de MMP2 y MMP9 con diferentes concentraciones de NaAsO_2 y se puede apreciar una disminución desde $1,250\text{nM}$, $2,500\text{nM}$, $5,000\text{nM}$ y 10000nM de la actividad de MMP2 con respecto al control, sin embargo, solo en 1250nM se encontraron diferencias estadísticamente

significativas ($p= 0.001$). La actividad de MMP9 se puede observar una pequeña disminución en 625nM, 2500nM, 5000nM y 1000nM, sin embargo, no es constante y en ningún tratamiento se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Se analizó la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 y encontramos que MMP2 disminuye significativamente desde 2500nM (Figura 11a, 11b), mientras que la actividad de MMP9 aumenta en todos los tratamientos (Figura 11a, 11c). En la figura 11b y 11c se observan los porcentajes de actividad de MMP2 y MMP9 con diferentes concentraciones de As_2O_3 y se puede apreciar una disminución desde 2500nM, 5,000nM y 10000nM de la actividad de MMP2 con respecto al control, encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p=0.005$, 0.007 y 0.005), mientras que en la actividad de MMP9 se puede apreciar un aumento en todos los tratamientos 625nM, 1250nM, 2500nM, 5000nM y 1000nM, sin embargo, no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.13$, 0.067, 0.2, 0.23, 0.3 y 0.26). En la figura 12 se muestra la actividad enzimática de MMP2 y MMP9, encontrando que MMP2 disminuye desde 2,500nM en Na_2HAsO_4 (Figura 12a, 12b), mientras que la actividad de MMP9 aumenta constantemente su actividad desde 625nM (Figura 12a, 12c). En la figura 12b y 12c se observan los porcentajes de actividad de MMP2 y MMP9 con diferentes concentraciones de Na_2HAsO_4 , se puede apreciar una pequeña disminución en 1250nM y 2500nM en la actividad de MMP2, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.065$ y 0.058). La actividad de MMP9 muestra un aumento en todos los tratamientos (625nM, 1250nM, 2500nM, 5000nM y 1000nM), no obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

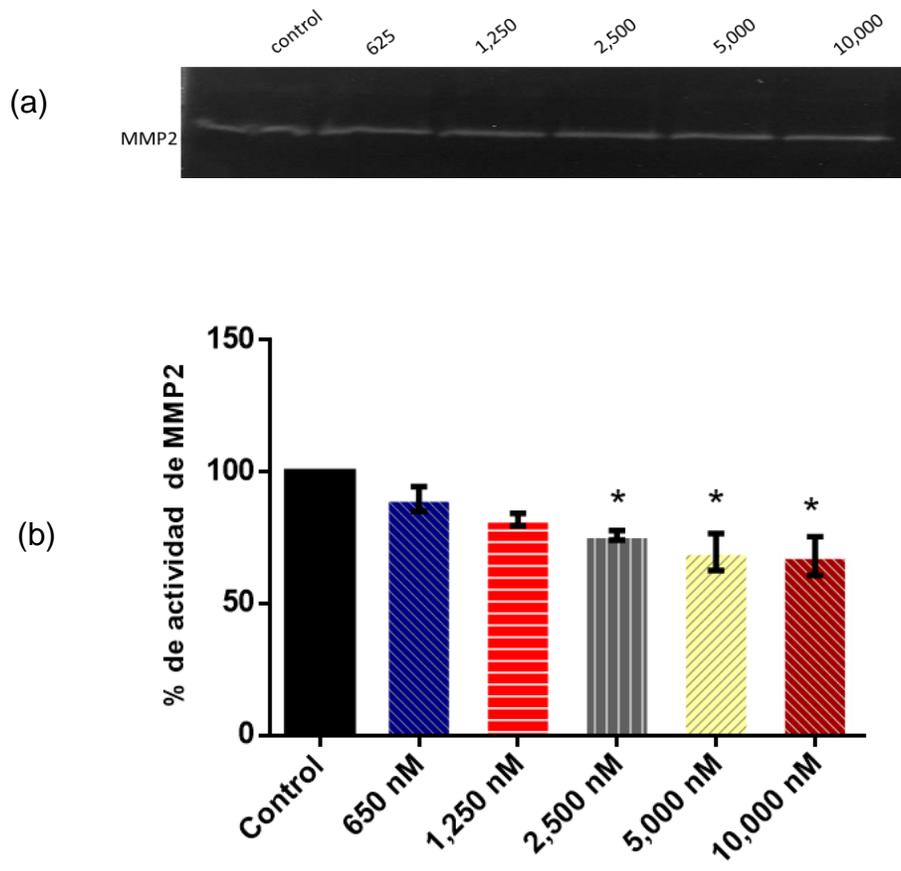


Figura 4. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células SiHa tratadas con NaAsO₂.

(a) La línea celular SiHa se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de NaAsO₂ y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 por zimografía. (b) Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas obtenidas de tres experimentos independientes.

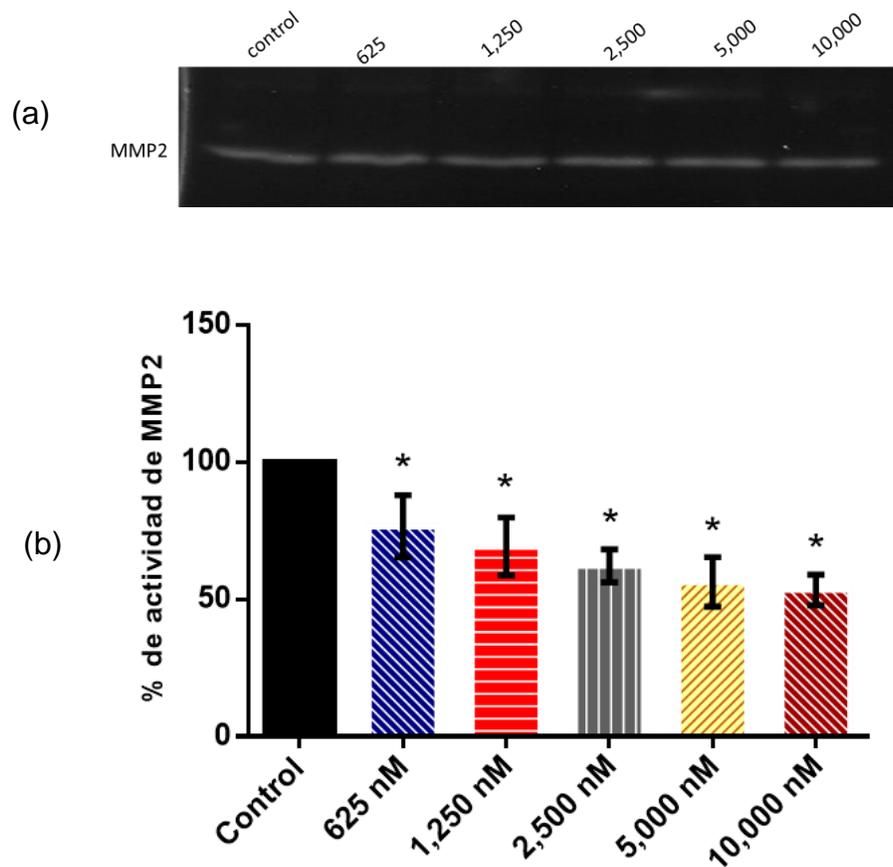


Figura 5. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células SiHa tratadas con As_2O_3 .

(a) La línea celular SiHa se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de As_2O_3 y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 por zimografía. (b) Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas de tres experimentos independientes.

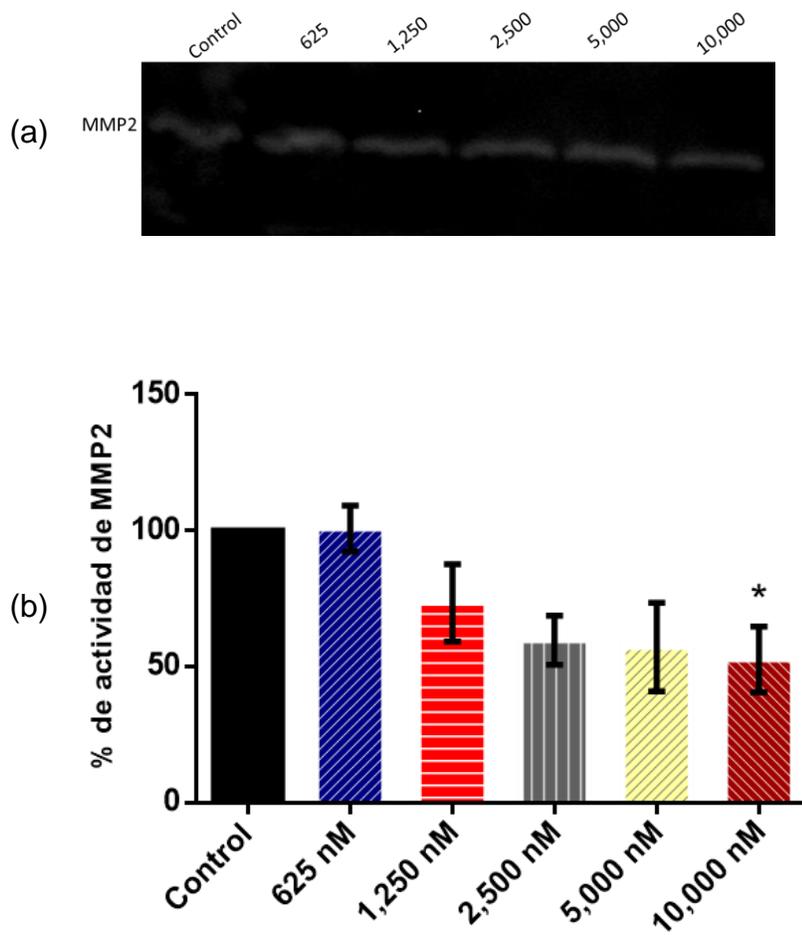


Figura 6. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células SiHa tratadas con Na_2HAsO_4 .

(a) La línea celular SiHa se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de Na_2HAsO_4 y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 por zimografía. (b) Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas de tres experimentos independientes de MMP2.

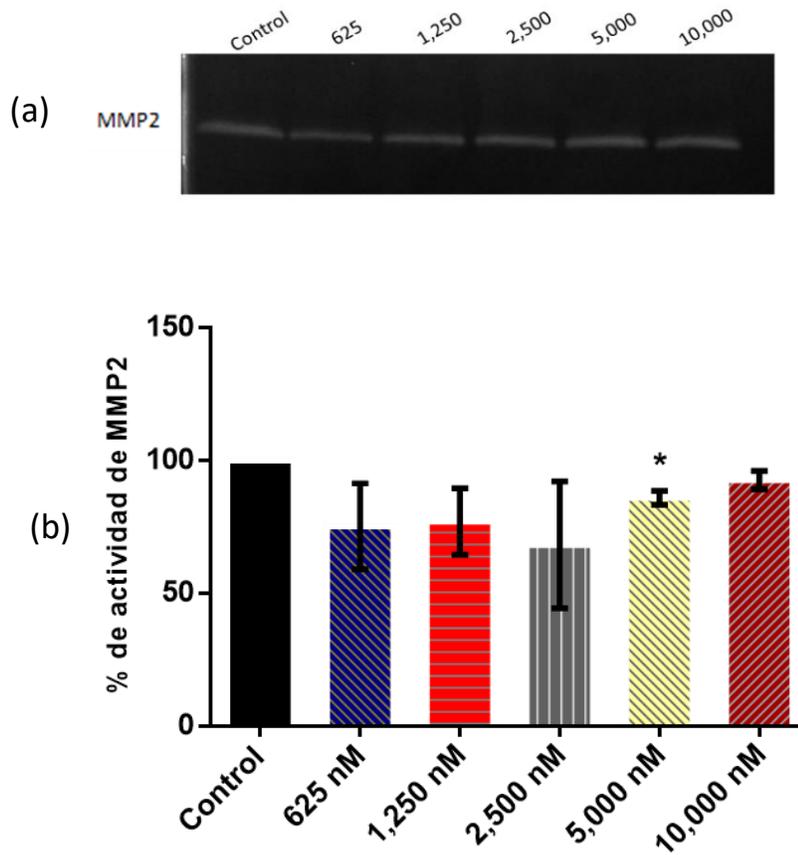


Figura 7. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células C33-A tratadas con NaAsO₂.

(a) La línea celular C33-A se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de NaAsO₂ y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 por zimografía. (b) Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas de tres experimentos independientes.

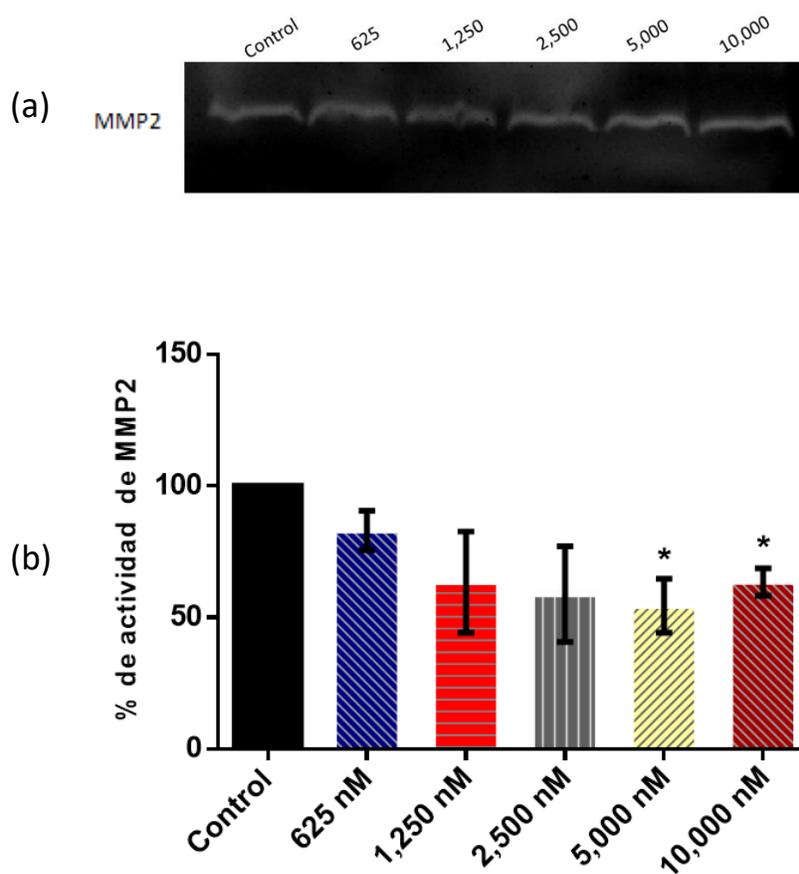


Figura 8. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células C33-A tratadas con As_2O_3

(a) La línea celular C33-A se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de As_2O_3 y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 por zimografía. (b) Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas de tres experimentos independientes de MMP9.

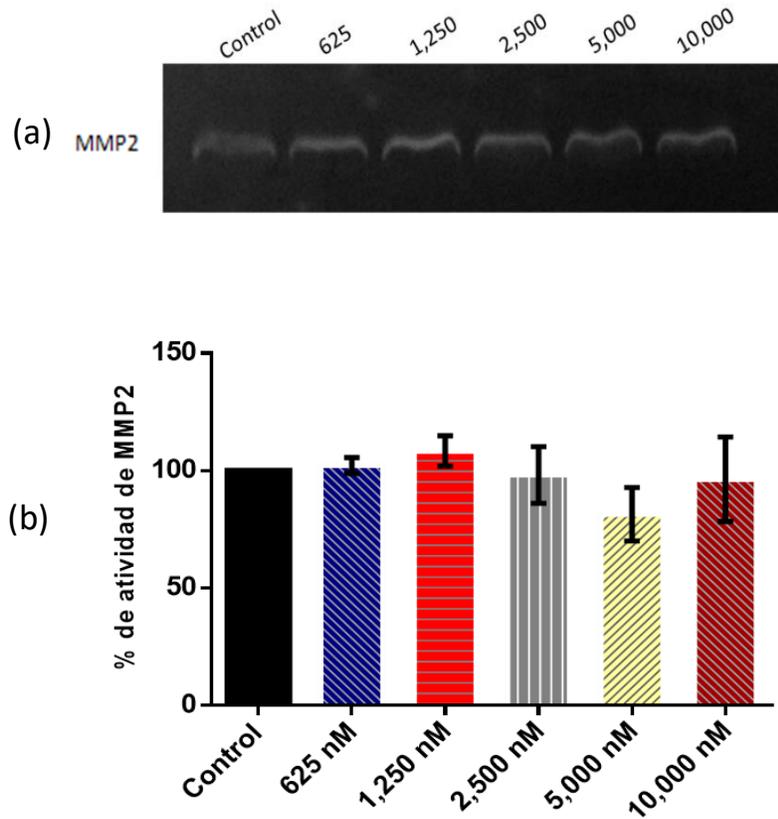


Figura 9. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células C33-A tratadas con Na_2HAsO_4

(a) La línea celular C33-A se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de Na_2HAsO_4 y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 por zimografía. (b) Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas de tres experimentos independientes de MMP9.

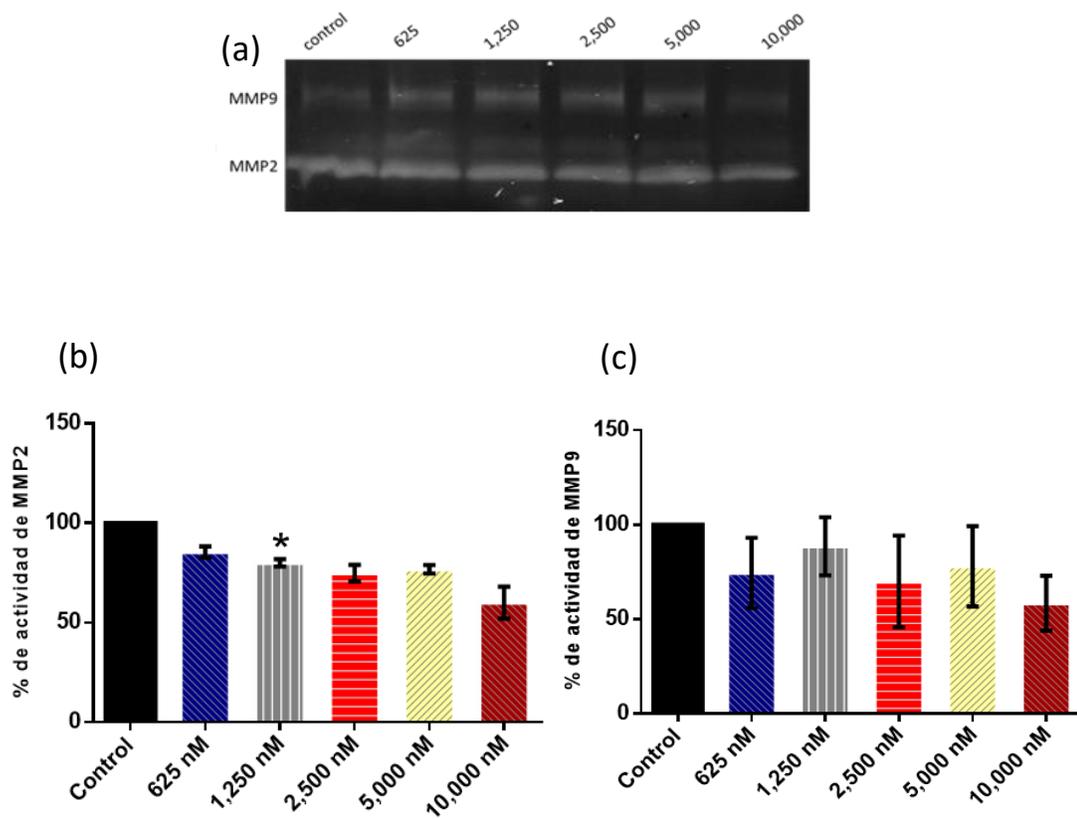


Figura 10. Evaluación de MMP2 y MMP9 en línea celular HaCaT tratada con NaAsO₂.

(a). La línea celular HaCaT se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de NaAsO₂ y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 por zimografía. Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas de tres experimentos independientes en MMP2 (b) y MMP9 (c).

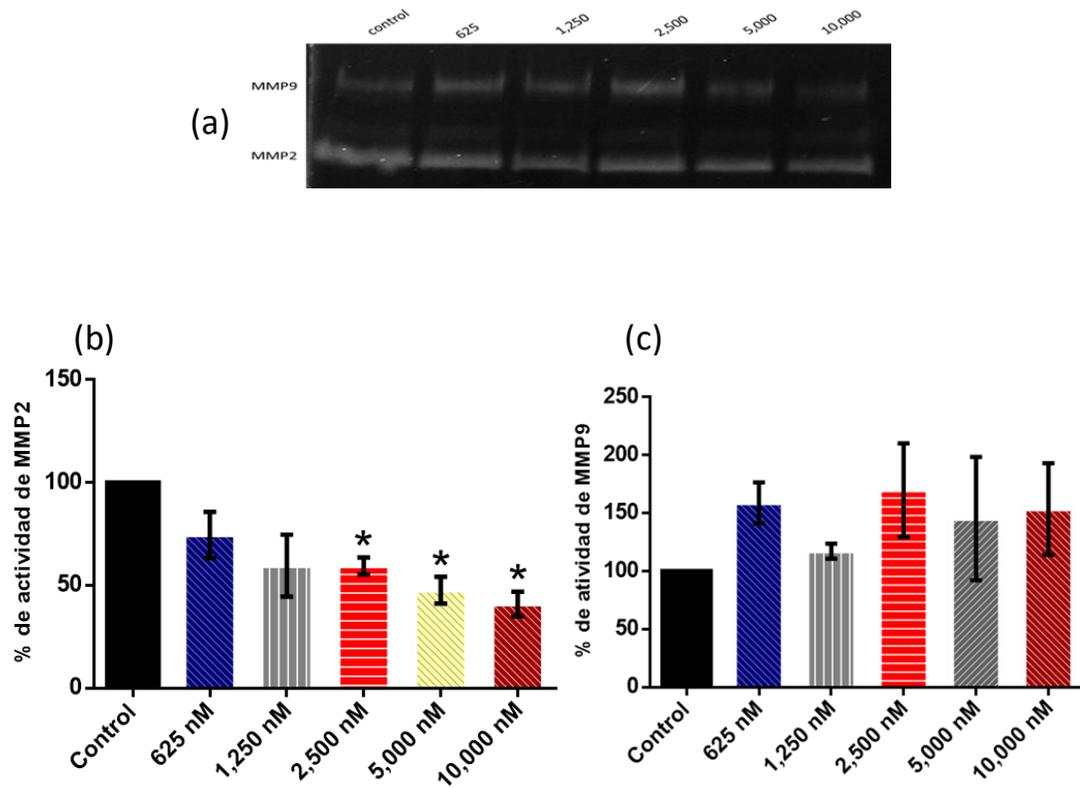


Figura 11. Evaluación de MMP2 y MMP9 en línea celular HaCaT tratadas con As_2O_3 .

(a) La línea celular HaCaT se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de As_2O_3 y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 por zimografía. Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas de tres experimentos en MMP2 (b) y MMP9 (c).

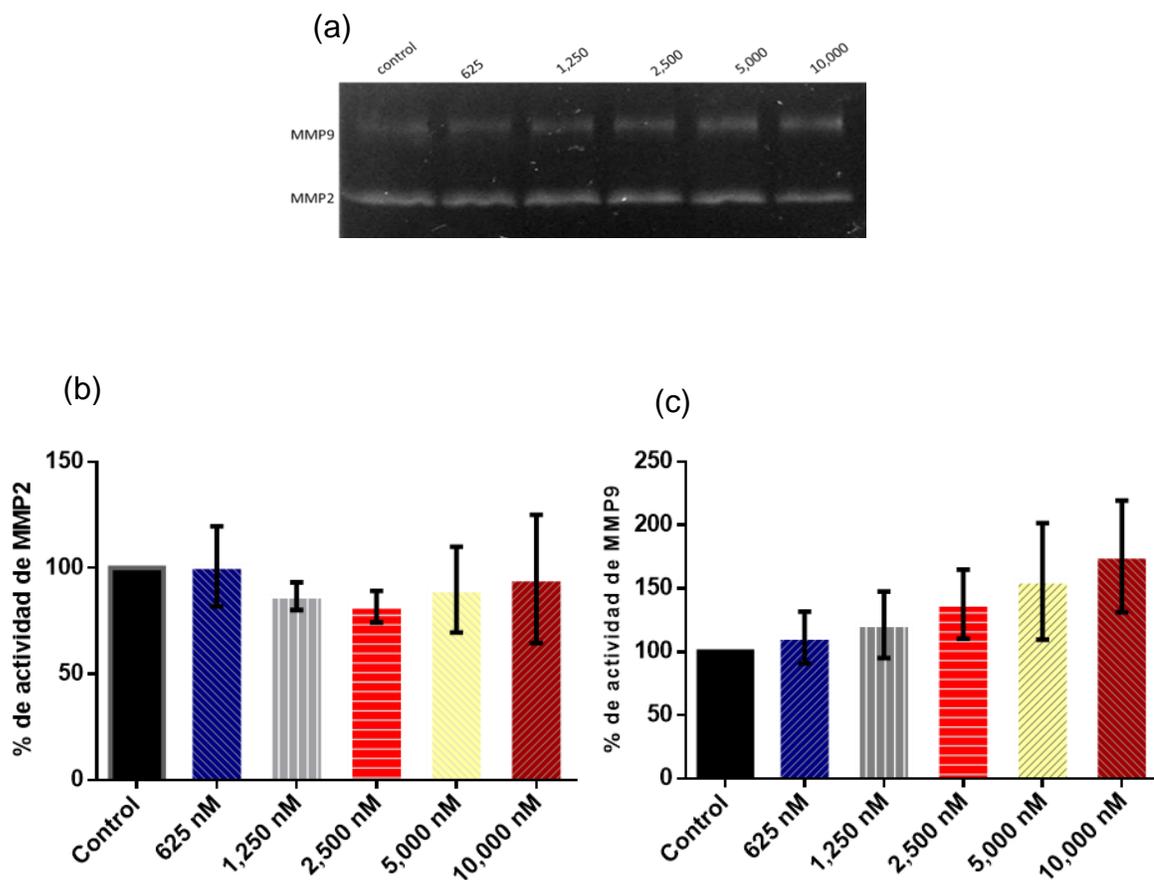


Figura 12. Evaluación de MMP2 y MMP9 en línea celular HaCaT tratadas con Na₂AsO₄. (a) La línea celular HaCaT se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de Na₂AsO₄ y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 por zimografía. Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas de tres experimentos en MMP2 (b) y MMP9 (c).

7.2 Evaluación de TUBG en células SiHa tratadas con diferentes concentraciones de NaAsO₂.

Para determinar si el NaAsO₂ inhibe la expresión de TUBG en línea celular SiHa, se realizó un Western Blot. En el Western Blot se observó que la expresión de TUBG se reduce significativamente desde 5,000nM de NaAsO₂ (Figura 13a y 13b). En la figura 13b se muestran los porcentajes de expresión de TUBG con las diferentes concentraciones de NaAsO₂ y se puede apreciar una disminución en 1,250nM y 2500nM de la expresión de TUBG con respecto al control, sin embargo, no muestran diferencia estadísticamente significativa ($p=0.058$ y 0.06). Los tratamientos con 5000nM y 10000 nM de NaAsO₂ muestran un decremento de (TUBG), con respecto al control, obteniendo diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.0008$ y 0.00005) respectivamente.

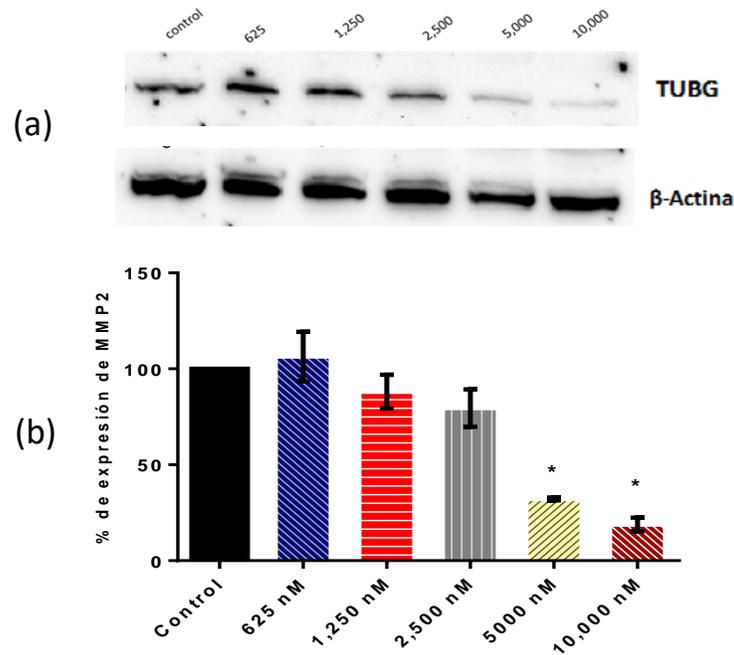


Figura 13. Evaluación de TUBG en línea celular siHa tratadas con NaAsO₂

(a) La línea celular SiHa se trató con 625nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10000 nM de NaAsO₂ y se incubó por 72 horas para posteriormente realizar extracción de proteína y evaluar TUBG por Western Blot, se usó como control constitutivo β -actina. (b) Se realizó un análisis cuantitativo por densitometría de las bandas obtenidas de tres experimentos independientes.

7.3 Sitios de unión entre la familia miR-34 y sus potenciales blancos MMP2, MMP9, Notch1 y Snail1.

Para determinar los sitios de unión de la familia miR-34 sobre la región codificante y las regiones no traducibles 5' y 3' (5'UTR y 3'UTR) de MMP2, MMP9, Notch1 y Snail1 se hizo una búsqueda en la base de datos Targetscan, en la cual se encontró una hibridación en los brazos miR-34c-5p y miR-34a-5p con MMP2 (Figura 14). El brazo 5p del miR-34a hibrida con la región codificante de MMP9, mientras que el brazo 5p del miR-34c hibrida con la región 3'-UTR de MMP9(figura 15). miR-34a-5p (A), miR-34b-3p (B) y miR-34c-5p (C) hibridan con el 3'UTR del factor de transcripción Snail1 (Figura 16). El miR-34 a-5p (A), miR-34b-3p (B) y miR-34c-5p (C) hibrida con la región 3'UTR de Notch1 (Figura 17). Los miembros de la familia miR-34 comparten una similitud del 54% por lo tanto se tiene una probabilidad alta de que el brazo 3p muestre un efecto.



Figura 14. Sitios de unión de MMP2 con miR-34a-5p y miR-34c-5p. Los brazos de la familia miR-34 que hibridan con MMP2 se resaltan mediante una unión esquematizada.



Figura 15. Sitios de unión de MMP9 con miR-34a-5p y miR-34c-5p. Los brazos de la familia miR-34 que hibridan con MMP9 se resaltan mediante una unión esquematizada.

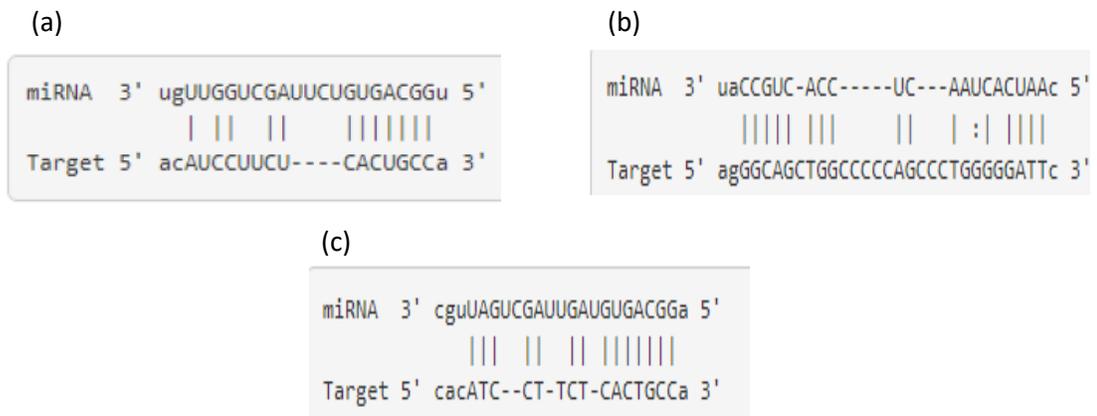


Figura 16. Interacción de Snail1 con los miembros de la familia miR-34a-5p (a), miR-34b-3p (b) y miR-34c-5p (c). Los brazos de la familia miR-34 que hibridan con snail1 se resaltan mediante una unión esquematizada.

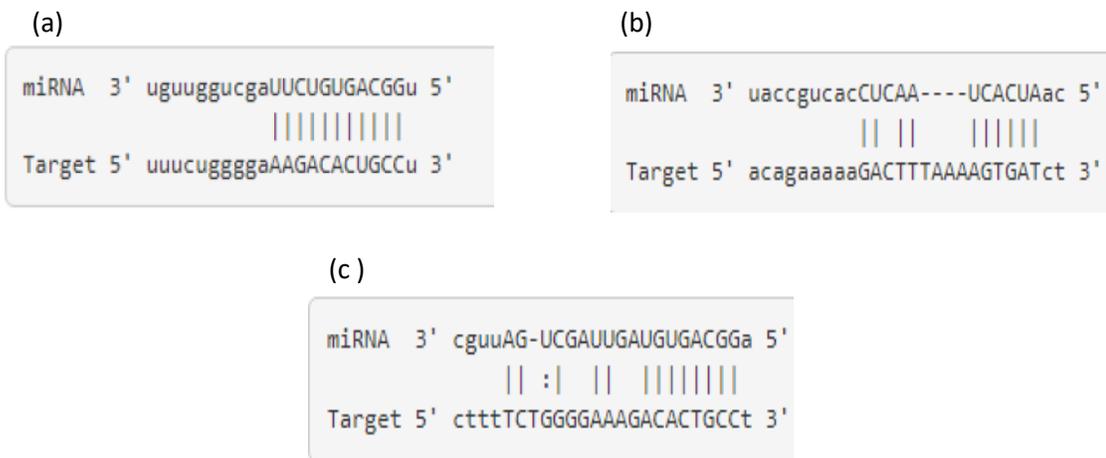


Figura 17. Interacción de Notch1 con los miembros de la familia miR-34a-5p (a), miR-34b-3p(b) y miR-34c-5p (c). Los brazos de la familia miR-34 que hibridan con Notch1 se resaltan mediante una unión esquematizada.

7.4 Evaluación de la expresión de MMP2, Notch1 y Snail1 en células SiHa transfectadas con la familia miR-34

Para determinar si los miembros de la familia miR-34 inhiben la expresión de MMP2, Notch1 y Snail1 en línea celular SiHa, se realizó un Western Blot. En la figura 18 se observó que la expresión de MMP2 se reduce significativamente en el brazo miR-34c-3p, encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p=0.04$), mientras que en los otros brazos miR-34a-5p y miR-34a-3p aumenta la expresión, no obstante, no se encontraron diferencias significativas (figura 18a y 18b). En la figura 19 se observó que la expresión de Noct1 se reduce en el brazo miR-34c-5p y miR-34c-3p, sin embargo, no se pudieron completar los tres experimentos independientes, por lo cual no se realizaron pruebas estadísticas. En la figura 19 se observó que la expresión de snail1 disminuye en el brazo miR-34b-3p, de igual manera no se completaron los tres experimentos independientes de snail1, por lo cual, no se realizó pruebas estadísticas.

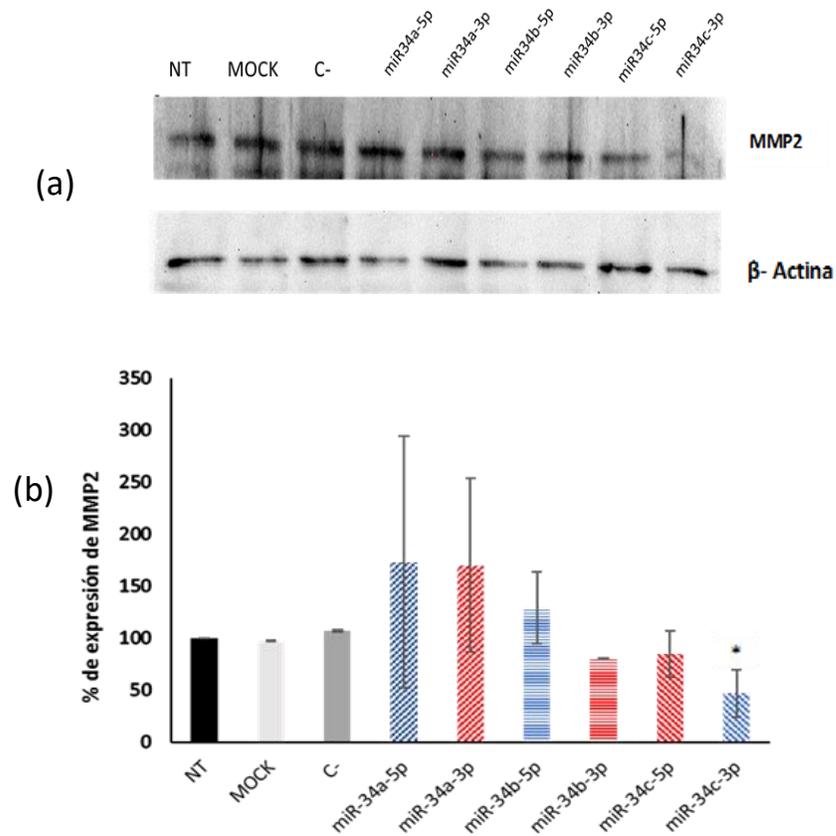


Figura 18. Evaluación del efecto de los miembros de la familia miR-34 sobre MMP2.

(a) Efecto de los miembros de familia miR-34 sobre MMP2. Se transfectaron células SiHa con 5 nM de cada uno de los miembros de la familia miR-34 y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la proteína MMP2 por western blot. Se usó como control de carga β -actina. (b) Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas obtenidas de tres experimentos independientes.

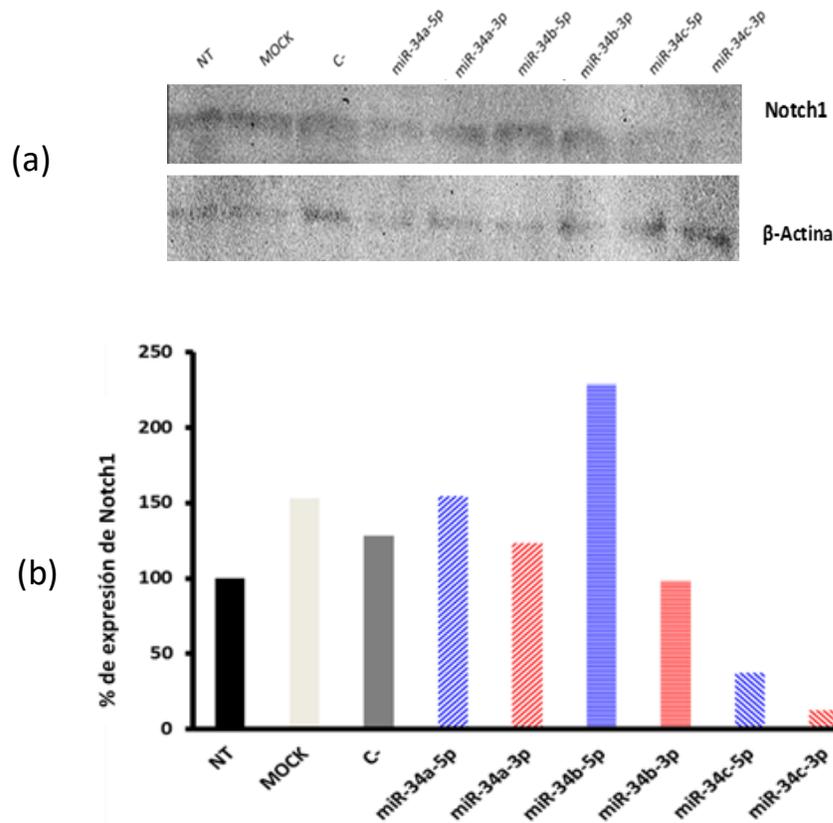


Figura 19. Evaluación del efecto de los miembros de la familia miR-34 sobre Notch1.

(a) Efecto de los miembros de familia miR-34 sobre Notch1. Se transfectaron células SiHa con 5 nM de cada uno de los miembros de la familia miR-34 y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la proteína Notch1 por western blot. Se usó como control de carga β -actina. (b) Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas obtenidas en el experimento mostrado en (a).

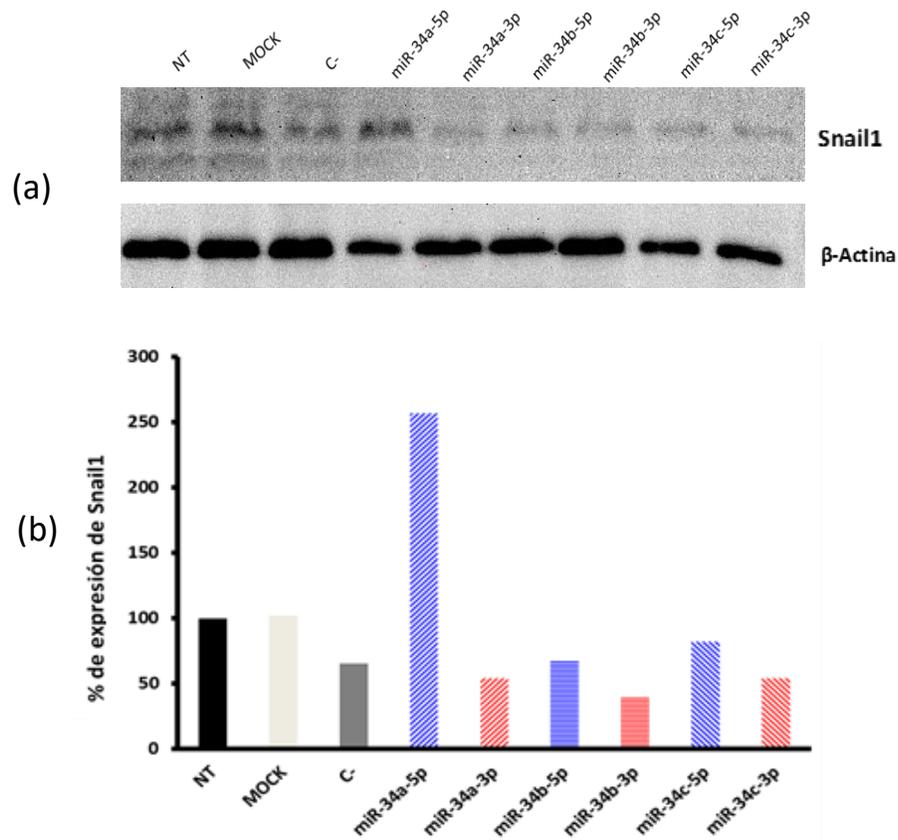


Figura 20. Evaluación del efecto de los miembros de la familia miR-34 sobre Snail1

(a) Efecto de los miembros de familia miR-34 sobre Snail1. Se transfectaron células SiHa con 5 nM de cada uno de los miembros de la familia miR-34 y se incubó por 72 horas para posteriormente analizar la proteína Snail1 por western blot. Se usó como control de carga β -actina. (b) Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas obtenidas en el experimento mostrado en (a).

7.5 Evaluación de la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 en células SiHa transfectadas con los miembros de la familia miR-34.

Para determinar si los miembros de la familia miR-34 inhibían la actividad de MMP2 y MMP9, se realizó un ensayo de zimografía. En el zimograma se observó que la actividad de MMP2 disminuye significativamente en el brazo miR-34 a-3p (figura 21a y 21b), mientras que la actividad de MMP9 disminuye significativamente en miR-34 a-5p, miR-34b-3p, miR-34c-5p y miR-34c-3p (figura 21 a y 21c).

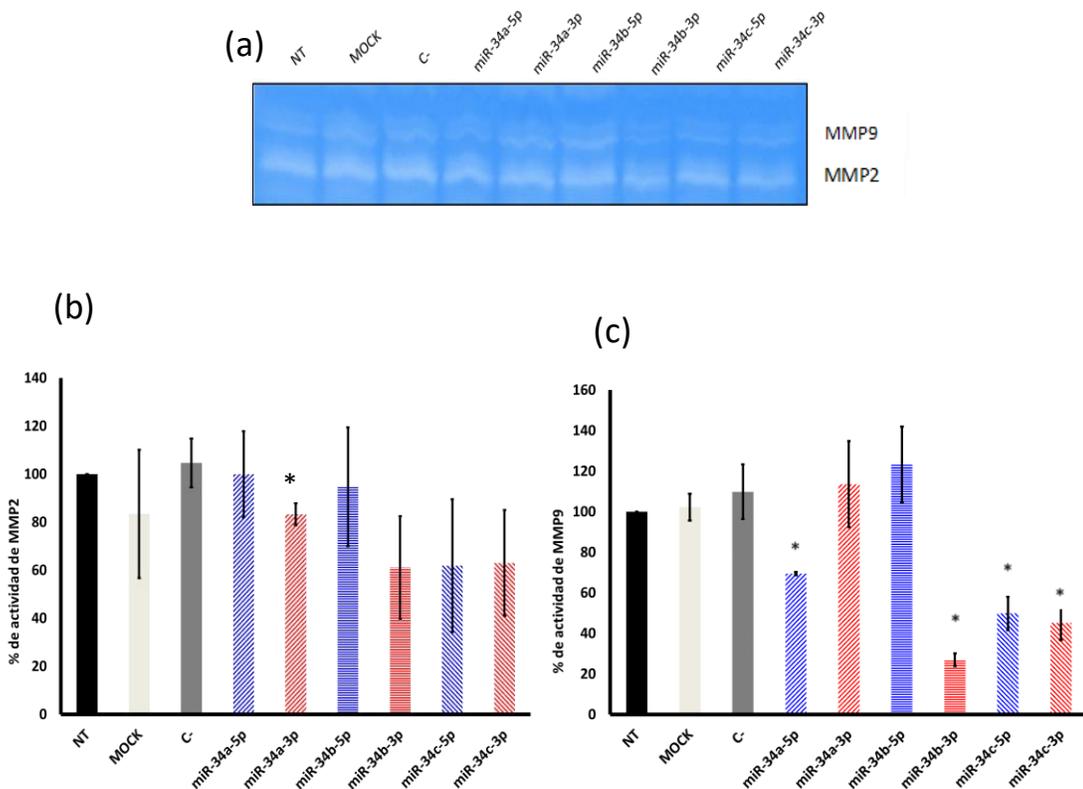


Figura 21. Evaluación de MMP2 y MMP9 en células SiHa transfectadas con los miembros de la familia miR-34. Las células SiHa se transfectaron con la familia miR-34 y se obtuvieron sobrenadantes, a partir de los cuales se evaluó el efecto enzimático de la endodipasa MMP2 y MMP9 mediante zimografía. Se realizó un análisis semicuantitativo por densitometría de las bandas obtenidas en el experimento mostrado en (a).

8. DISCUSIÓN

El As_2O_3 se ha utilizado como reactivo terapéutico en varios tipos de carcinomas (Shen, Chen et al. 1997). En la actualidad, el fármaco está indicado como un medicamento contra el cáncer de amplio espectro mediante la inducción de la apoptosis para una variedad de carcinomas, entre ellos Leucemia promielocítica aguda (APL), otras células leucémicas mieloides, carcinomas de esófago, próstata y ovario (Kang, Yi et al. 2004). Estudios in vitro e in vivo demuestran que el arsénico ejerce un amplio espectro de efectos anticancerosos por inducción de la apoptosis, inhibición de la proliferación celular, antiangiogénesis y posible inmunomodulación (Antman 2001). Estudios recientes señalan que el tratamiento de las células cancerosas cervicales humanas con As_2O_3 induce la disipación del potencial de membrana mitocondrial (m), la translocación de AIF de las mitocondrias al núcleo y la posterior muerte celular (Chun, Park et al. 2002). Sin embargo, dependiendo del estado de oxidación del arsénico influye en las vías de señalización que se activan. La metástasis es uno de los eventos moleculares y celulares que determinan la supervivencia de los pacientes con cáncer. En este sentido se han analizado la actividad de las MMPs en respuesta a diferentes compuestos de arsénico. La actividad de As_2O_3 , NaAsO_2 y Na_2HAsO_4 sobre la migración e invasión celular no está caracterizada en cáncer cérvico-uterino es por ello que en el presente trabajo se evaluó el efecto del As_2O_3 , NaAsO_2 y Na_2HAsO_4 sobre la actividad de MMP2 y MMP9 en las líneas celulares SiHa, C33-A y HaCaT. En el tratamiento con As_2O_3 encontramos una disminución en la actividad de MMP2 en todas las líneas celulares de manera dependiente de la concentración. El trabajo de Dizaji et al. mostró una disminución en la expresión de MMP2 en líneas celulares de cáncer de glioblastoma tratadas con As_2O_3 (Dizaji, Malehmir et al. 2012).

En nuestro trabajo encontramos una disminución desde 625 hasta 10000 nM de As_2O_3 en células SiHa y HaCaT mientras que en C-33A no encontró una diferencia estadísticamente significativa lo que sugiere un efecto dependiente de la línea celular.

La línea celular SiHa responde al tratamiento con NaAsO_2 que se observó una disminución de la actividad de MMP2. Cabe resaltar que en células HaCaT únicamente se encuentra efecto en la concentración 1250 nM de manera significativa, aunque se aprecia una tendencia a disminuir su actividad en respuesta a NaAsO_2 . De manera interesante la actividad de MMP9 únicamente se logró observar en la línea celular inmortal HaCaT, pero no en células tumorales SiHa y C-33A. Por otro lado, en el tratamiento con NaHAsO_4 se obtuvo una disminución de la actividad de MMP2 a 10000 nM en células SiHa mientras que en HaCaT y C-33A no se observó una disminución significativa inclusive en células HaCaT se observa un incremento lo que sugiere que la composición de los compuestos de arsénico determina el efecto molecular. La inhibición de MMP2 en respuesta a As_2O_3 y NaAsO_2 sugiere que la invasión celular se afectaría, no obstante, se necesitan estudios adicionales para corroborarlos. Sin embargo, el análisis sobre TUBG sugiere fuertemente que la migración e invasión celular se afectan en respuesta a As_2O_3 y NaAsO_2 ya que esta proteína está implicada en la progresión tumoral. Se ha observado que en meduloblastoma, mielomas, carcinoma de células no pequeñas, cáncer de mama, gliomas y glioblastoma el patrón de localización y los niveles de expresión de TUBG están alterados (Caracciolo, D'agostino et al. 2010). En el presente trabajo encontramos una disminución de TUBG dependiente de la concentración de NaAsO_2 en células SiHa lo que sugiere que el proceso de migración se ve afectado de manera específica por NaAsO_2 . Los genes regulados por los compuestos de arsénico son muy variados. Dentro de los genes regulados negativamente encontramos a la oncoproteína E6 de VPH16+ que por consiguiente induce incremento de p53 (Zheng, Deng et al. 1999), activando sus genes efectores como p21 y los miembros de la familia miR-34 (Wang et al 2009). Lo que permite sugerir que el efecto de los compuestos de arsénico produce su efecto vía el sistema p53-miR-34.

Se ha demostrado que la expresión ectópica de los miembros de la familia miR-34 induce apoptosis, detención del ciclo celular o senescencia, migración e invasión mediante la inhibición de genes relacionados con estos procesos celulares (Hermeking 2010). Por lo tanto, en el presente trabajo sugerimos que el mecanismo

molecular podría ser $As_2O_3/NaAsO_2/p53/miR-34$ para inhibir proliferación y migración celular en cáncer cérvico-uterino a través de las proteínas MMP2 y MMP9, y los reguladores Snail1 y Notch1. En este trabajo se encontró mediante análisis bioinformáticos que las proteínas MMP2 y MMP9 son blancos directos de la familia miR-34, ya que miR-34a-5p y miR-34c-5p hibridan con la región 3'UTR de MMP2 y MMP9. En nuestro trabajo encontramos que la sobre-expresión de miR-34b-3p y miR-34c-5p disminuye la expresión de la proteína MMP2 mientras que el miR-34a-3p disminuye su actividad enzimática abriendo la posibilidad de una regulación indirecta a través de (TIMPs) que activan a MMP2 (Arpino, Brock et al. 2015). La sobre-expresión de miR-34a-5p, miR-34b-3p, miR-34c-5p y miR-34c-3p disminuyen la actividad enzimática de MMP9. Cabe mencionar que el miR-34b-3p no tiene sitios de unión en el 3'UTR de MMP2 y 9, sin embargo, los miembros de la familia presentan una alta homología y comparten cientos de blancos (Córdova-Rivas et al 2019). Por otro lado, en estudios de cáncer de colon, los niveles de proteína MMP2 y MMP9 disminuyeron en células transfectadas con miR-34a-5p mediante la inhibición de Fra-1. Este factor transcripcional induce directamente la actividad transcripcional a través de la interacción con el promotor de MMP2. Por lo que, la inhibición indirecta de la MMP2 por miR-34a-5p inhibe la migración e invasión celular (Wu, Wu et al. 2011). Es importante resaltar que la inhibición de MMP2 y MMP9 es similar en nuestro trabajo al de Wu et al 2011, no obstante, nosotros no determinamos si la inhibición se debe a un efecto directo sobre la región 3'UTR o sobre la región codificante por lo que se necesitan estudios adicionales para discernir el mecanismo inhibición de las MMPs por los miembros de la familia miR-34 en cáncer cérvico-uterino. En este mismo sentido otro regulador maestro de la expresión transcripcional es Notch1. En nuestro trabajo encontramos mediante análisis bioinformáticos que Notch1 hibrida con los miembros de la familia miR-34a-5p, miR-34b-3p y miR-34c-5p. Cabe resaltar que los datos experimentales no correlacionan con los datos in silico, ya que en la sobre-expresión de miR-34c-5p y miR-34c-3p se observa una disminución de Notch1 con respecto a los controles. En contraste Pang et al encontró que miR-34a-5p inhibe la invasividad a través de la regulación de la vía Notch en células derivadas de cáncer cervical (Pang, Leung et

al. 2010). En cáncer de páncreas el miR-34a-5p, miR-34b-5p y miR-34c-5p inhibieron la expresión de Notch1 (Ji, Hao et al. 2009). Estos estudios claramente muestran una regulación de las hebras 5p de los miembros de la familia miR-34 sobre Notch1, sin embargo, en nuestro trabajo observamos efecto tanto por el brazo 5p y 3p del miR-34c, aunque se necesitan ensayos adicionales para caracterizar dicho efecto. Otro regulador importante de la expresión de MMP2 y 9 es el factor transcripcional Snail1. Se encontró mediante análisis bioinformáticos que los miembros de la familia miR-34a-5p, miR-34b-3p y miR-34c-5p hibridan con la región 3'UTR de Snail1. Con la sobre-expresión de los miembros de la familia miR-34a-3p, miR-34b-3p y miR-34c-3p se observa una disminución de Snail1 lo que correlaciona con los estudios previos que muestran que los brazos 5p de los miembros de la familia miR-34 suprimen la expresión de Snail1 al unirse a su 3'UTR en células de carcinoma de colon, mama y pulmón (Kim, Kim et al. 2011). Sin embargo, aún faltan estudios sobre la expresión de Snail1 en cáncer cervico-uterino y los miembros de la familia miR-34. Los compuestos de arsénico regulan diferentes genes en células derivadas de cérvix probablemente a través del sistema p53-miR-34. Este trabajo permite vislumbrar un paso más en el mecanismo molecular de los As_2O_3 , $NaAsO_2$, Na_2HAsO_4 , y los miembros de la familia miR-34 sobre la regulación de los MMP2 y 9 que son fundamentales en la invasión de células tumorales.

9. CONCLUSIONES

- La actividad enzimática de MMP2 es dependiente de la concentración de As_2O_3 y $NaAsO_2$ en las células SiHa, C-33A y HaCaT.
- La expresión de la proteína TUBG disminuyó en la línea celular SiHa y es dependiente de la concentración de $NaAsO_2$.
- La expresión de MMP2, Notch1 y Snail1 en la línea celular SiHa transfectadas con los miembros de la familia miR-34 son regulados por el miR-34a-3p, miR-34b-3p, miR-34c-5p y miR-34c-3p.
- La actividad enzimática de MMP2 y MMP9 en línea celular SiHa transfectadas con los miembros de la familia miR-34 son reguladas por el miR-34a-5p, miR-34a-3p, miR-34b-3p, miR-34c-5p y miR-34c-3p en la línea celular SiHa.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la Expresión de MMP2, MMP9, Notch1 y Snail1 mediante RT-PCR.
- Evaluar la expresión de MMP9 mediante Western Blot.
- Evaluar la actividad enzimática de MMP2 y MMP9 en más líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino.
- Evaluar p53 y los niveles de expresión de los miembros de la familia en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino tratadas con los diferentes compuestos de arsénico.

11. REFERENCIAS

- Adams, A. K., T. M. Wise-Draper and S. I. Wells (2014). "Human papillomavirus induced transformation in cervical and head and neck cancers." Cancers **6**(3): 1793-1820.
- Alvarado-Kristensson, M. (2018). " γ -Tubulin as a signal-transducing molecule and meshwork with therapeutic potential." Signal transduction and targeted therapy **3**(1): 1-6.
- Alvarado-Kristensson, M., M. J. Rodríguez, V. Silió, J. M. Valpuesta and A. C. Carrera (2009). "SADB phosphorylation of γ -tubulin regulates centrosome duplication." Nature cell biology **11**(9): 1081.
- Angosto, M. C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Angosto, M. C. and J. Á. Álvarez-Gómez (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Antman, K. H. (2001). "Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy." The oncologist **6**(Supplement 2): 1-2.
- Arpino, V., M. Brock and S. E. Gill (2015). "The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis." Matrix Biology **44**: 247-254.
- Artandi, S. E. and R. A. DePinho (2009). "Telomeres and telomerase in cancer." Carcinogenesis **31**(1): 9-18.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-776.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." cell **116**(2): 281-297.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Angiogenesis: tumorigenesis and the angiogenic switch." Nature reviews cancer **3**(6): 401.
- Bode, A. and Z. Dong (2000). "Apoptosis induction by arsenic: mechanisms of action and possible clinical applications for treating therapy-resistant cancers." Drug Resistance Updates **3**(1): 21-29.
- Bosch, F., A. Lorincz, N. Munoz, C. Meijer and K. Shah (2002). "The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer." Journal of clinical pathology **55**(4): 244-265.

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (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.

Bridges, E., C. E. Oon and A. Harris (2011). "Notch regulation of tumor angiogenesis." Future Oncology **7**(4): 569-588.

Burd, E. M. (2003). "Human papillomavirus and cervical cancer." Clinical microbiology reviews **16**(1): 1-17.

Calin, G. A. and C. M. Croce (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." Nature reviews cancer **6**(11): 857-866.

Caracciolo, V., L. D'agostino, E. Dráberová, V. Sládková, C. Crozier-Fitzgerald, D. P. Agamanolis, J. P. de Chadarevian, A. Legido, A. Giordano and P. Dráber (2010). "Differential expression and cellular distribution of γ -tubulin and β III-tubulin in medulloblastomas and human medulloblastoma cell lines." Journal of cellular physiology **223**(2): 519-529.

Cavallaro, U. and G. Christofori (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer." Nature Reviews Cancer **4**(2): 118.

Cavallaro, U. and G. Christofori (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer." Nature reviews. Cancer **4**(2): 118.

Concepcion, C. P., Y.-C. Han, P. Mu, C. Bonetti, E. Yao, A. D'andrea, J. A. Vidigal, W. P. Maughan, P. Ogradowski and A. Ventura (2012). "Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice." PLoS Genet **8**(7): e1002797.

Chan, L., W. Wang, W. Yeung, Y. Deng, P. Yuan and K. Mak (2014). "Hedgehog signaling induces osteosarcoma development through Yap1 and H19 overexpression." Oncogene **33**(40): 4857.

Chen, Z., S. Li, K. Huang, Q. Zhang, J. Wang, X. Li, T. Hu, S. Wang, R. Yang and Y. Jia (2013). "The nuclear protein expression levels of SNAI1 and ZEB1 are involved in the progression and lymph node metastasis of cervical cancer via the epithelial-mesenchymal transition pathway." Human pathology **44**(10): 2097-2105.

Cho, E. H., R. A. Whipple, M. A. Matrone, E. M. Balzer and S. S. Martin (2010). "Delocalization of γ -tubulin due to increased solubility in human breast cancer cell lines." Cancer biology & therapy **9**(1): 66-76.

Chou, R.-H. and H. Huang (2002). "Restoration of p53 tumor suppressor pathway in human cervical carcinoma cells by sodium arsenite." Biochemical and biophysical research communications **293**(1): 298-306.

Chou, W.-C., A. L. Hawkins, J. F. Barrett, C. A. Griffin and C. V. Dang (2001). "Arsenic inhibition of telomerase transcription leads to genetic instability." The Journal of clinical investigation **108**(10): 1541-1547.

Christofori, G. and H. Semb (1999). "The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene." Trends in biochemical sciences **24**(2): 73-76.

Chun, Y.-J., I.-C. Park, M.-J. Park, S.-H. Woo, S.-I. Hong, H. Y. Chung, T.-H. Kim, Y.-S. Lee, C.-H. Rhee and S.-J. Lee (2002). "Enhancement of radiation response in human cervical cancer cells in vitro and in vivo by arsenic trioxide (As₂O₃)." FEBS letters **519**(1-3): 195-200.

De Craene, B., F. Van Roy and G. Berx (2005). "Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors." Cellular signalling **17**(5): 535-547.

Dizaji, M. Z., M. Malehmir, A. Ghavamzadeh, K. Alimoghaddam and S. H. Ghaffari (2012). "Synergistic effects of arsenic trioxide and silibinin on apoptosis and invasion in human glioblastoma U87MG cell line." Neurochemical research **37**(2): 370-380.

Dráberová, E., L. D'Agostino, V. Caracciolo, V. Sládková, T. Sulimenko, V. Sulimenko, M. Sobol, N. F. Maounis, E. Tzelepis and E. Mahera (2015). "Overexpression and nucleolar localization of γ -tubulin small complex proteins GCP2 and GCP3 in glioblastoma." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **74**(7): 723-742.

Duronio, R. J. and Y. Xiong (2013). "Signaling pathways that control cell proliferation." Cold Spring Harbor perspectives in biology **5**(3): a008904.

Dürst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg and H. Zur Hausen (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.

Finzer, P., A. Aguilar-Lemarroy and F. Rösl (2002). "The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis." Cancer letters **188**(1): 15-24.

Folgueras, A. R., A. M. Pendas, L. M. Sanchez and C. Lopez-Otin (2004). "Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies." International Journal of Developmental Biology **48**(5-6): 411-424.

Friedl, P. and D. Gilmour (2009). "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." Nature reviews Molecular cell biology **10**(7): 445.

Goussetis, D. J., J. K. Altman, H. Glaser, J. L. McNeer, M. S. Tallman and L. C. Plataniias (2010). "Autophagy is a critical mechanism for the induction of the

antileukemic effects of arsenic trioxide." Journal of Biological Chemistry **285**(39): 29989-29997.

Granados-López, A. J., J. L. Ruiz-Carrillo, L. S. Servín-González, J. L. Martínez-Rodríguez, C. A. Reyes-Estrada, R. Gutiérrez-Hernández and J. A. López (2017). "Use of mature miRNA strand selection in miRNAs families in cervical cancer development." International journal of molecular sciences **18**(2): 407.

Grau, Y., C. Carteret and P. Simpson (1984). "Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of snail, a gene involved in embryonic patterning in *Drosophila melanogaster*." Genetics **108**(2): 347-360.

Gromley, A., A. Jurczyk, J. Sillibourne, E. Halilovic, M. Mogensen, I. Groisman, M. Blomberg and S. Doxsey (2003). "A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase." The Journal of cell biology **161**(3): 535-545.

Gulyaeva, L. F. and N. E. Kushlinskiy (2016). "Regulatory mechanisms of microRNA expression." Journal of translational medicine **14**(1): 143.

Haga, N., N. Fujita and T. Tsuruo (2005). "Involvement of mitochondrial aggregation in arsenic trioxide (As₂O₃)-induced apoptosis in human glioblastoma cells." Cancer science **96**(11): 825-833.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." cell **144**(5): 646-674.

Handsley, M. M. and D. R. Edwards (2005). "Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis." International journal of cancer **115**(6): 849-860.

Hermeking, H. (2010). "The miR-34 family in cancer and apoptosis." Cell death and differentiation **17**(2): 193.

Holowaty, P., A. B. Miller, T. Rohan and T. To (1999). "Natural history of dysplasia of the uterine cervix." Journal of the National Cancer Institute **91**(3): 252-258.

Höög, G., R. Zarrizi, K. von Stedingk, K. Jonsson and M. Alvarado-Kristensson (2011). "Nuclear localization of γ -tubulin affects E2F transcriptional activity and S-phase progression." The FASEB Journal **25**(11): 3815-3827.

Huff, J., P. Chan and A. Nyska (2000). "Is the human carcinogen arsenic carcinogenic to laboratory animals?" Toxicological Sciences **55**(1): 17-23.

Ji, Q., X. Hao, M. Zhang, W. Tang, M. Yang, L. Li, D. Xiang, J. T. DeSano, G. T. Bommer and D. Fan (2009). "MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells." PloS one **4**(8): e6816.

Kang, Y.-H., M.-J. Yi, M.-J. Kim, M.-T. Park, S. Bae, C.-M. Kang, C.-K. Cho, I.-C. Park, M.-J. Park and C. H. Rhee (2004). "Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria." Cancer research **64**(24): 8960-8967.

Kaufhold, S. and B. Bonavida (2014). "Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **33**(1): 62.

Kim, N. H., H. S. Kim, X.-Y. Li, I. Lee, H.-S. Choi, S. E. Kang, S. Y. Cha, J. K. Ryu, D. Yoon and E. R. Fearon (2011). "A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial–mesenchymal transition." J Cell Biol **195**(3): 417-433.

Kudo-Saito, C., H. Shirako, T. Takeuchi and Y. Kawakami (2009). "Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells." Cancer cell **15**(3): 195-206.

Kwong, Y. and D. Todd (1997). "Delicious poison: arsenic trioxide for the treatment of leukemia." Blood **89**(9): 3487-3487.

Li, B., Y. Hu, F. Ye, Y. Li, W. Lv and X. Xie (2010). "Reduced miR-34a expression in normal cervical tissues and cervical lesions with high-risk human papillomavirus infection." International Journal of Gynecological Cancer **20**(4): 597-604.

Lingle, W. L., S. L. Barrett, V. C. Negron, A. B. D'Assoro, K. Boeneman, W. Liu, C. M. Whitehead, C. Reynolds and J. L. Salisbury (2002). "Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(4): 1978-1983.}}

Maher, P. A. (2000). "Disruption of cell–substrate adhesion activates the protein tyrosine kinase pp60c-src." Experimental cell research **260**(2): 189-198.

María Cascales Angosto, M., J. Á. Álvarez-Gómez and J. Ángel (2010). "Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer." An Real Acad Farm: 59-84.

Miele, L., H. Miao and B. Nickoloff (2006). "NOTCH signaling as a novel cancer therapeutic target." Current cancer drug targets **6**(4): 313-323.

Mitra, R., C.-C. Lin, C. M. Eischen, S. Bandyopadhyay and Z. Zhao (2015). "Concordant dysregulation of miR-5p and miR-3p arms of the same precursor microRNA may be a mechanism in inducing cell proliferation and tumorigenesis: a lung cancer study." RNA **21**(6): 1055-1065.

Moody, S. E., D. Perez, T.-c. Pan, C. J. Sarkisian, C. P. Portocarrero, C. J. Sterner, K. L. Notorfrancesco, R. D. Cardiff and L. A. Chodosh (2005). "The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence." Cancer cell **8**(3): 197-209.

Moore, C. S. and S. J. Crocker (2012). "An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology." The American journal of pathology **180**(1): 12-16.
Morgan, T. H. (1917). "The theory of the gene." The American Naturalist **51**(609): 513-544.

Morris, V. B., J. Brammall, J. Noble and R. Reddel (2000). "p53 localizes to the centrosomes and spindles of mitotic cells in the embryonic chick epiblast, human cell lines, and a human primary culture: an immunofluorescence study." Experimental cell research **256**(1): 122-130.

Nagase, H., R. Visse and G. Murphy (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovascular research **69**(3): 562-573.

Nieto, M. A. (2002). "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors." Nature reviews Molecular cell biology **3**(3): 155.

Pang, R. T., C. O. Leung, T.-M. Ye, W. Liu, P. C. Chiu, K. K. Lam, K.-F. Lee and W. S. Yeung (2010). "MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells." Carcinogenesis **31**(6): 1037-1044.

Park, M. J., J. Y. Lee, H. J. Kwak, C. M. Park, H. C. Lee, S. H. Woo, H. O. Jin, C. J. Han, S. An and S. H. Lee (2005). "Arsenic trioxide (As₂O₃) inhibits invasion of HT1080 human fibrosarcoma cells: Role of nuclear factor- κ B and reactive oxygen species." Journal of cellular biochemistry **95**(5): 955-969.

Peng, Y. and C. M. Croce (2016). "The role of MicroRNAs in human cancer." Signal transduction and targeted therapy **1**: 15004.

Radtko, F. and K. Raj (2003). "The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?" Nature Reviews Cancer **3**(10): 756.

Rauvala, M., K. Aglund, U. Puistola, T. Turpeenniemi-Hujanen, G. Horvath, R. Willén and U. Stendahl (2006). "Matrix metalloproteinases-2 and-9 in cervical cancer: different roles in tumor progression." International Journal of Gynecologic Cancer **16**(3): 1297-1302.

Rokavec, M., H. Li, L. Jiang and H. Hermeking (2014). "The p53/miR-34 axis in development and disease." Journal of molecular cell biology **6**(3): 214-230.

Sathish, N., X. Wang and Y. Yuan (2014). "Human papillomavirus (HPV)-associated oral cancers and treatment strategies." Journal of dental research **93**(7_suppl): 29S-36S.

Shen, Z.-X., G.-Q. Chen, J.-H. Ni, X.-S. Li, S.-M. Xiong, Q.-Y. Qiu, J. Zhu, W. Tang, G.-L. Sun and K.-Q. Yang (1997). "Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients." Blood **89**(9): 3354-3360.

Slabáková, E., Z. Culig, J. Remšík and K. Souček (2017). "Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer." Cell death & disease **8**(10): e3100.

Sun, L., M. Liu, G.-C. Sun, X. Yang, Q. Qian, S. Feng, L. V. Mackey and D. H. Coy (2016). "Notch signaling activation in cervical cancer cells induces cell growth arrest with the involvement of the nuclear receptor NR4A2." Journal of Cancer **7**(11): 1388.
Sun, Y., R. Zhang, S. Zhou and Y. Ji (2015). "Overexpression of Notch1 is associated with the progression of cervical cancer." Oncology letters **9**(6): 2750-2756.

Syrjänen, K., V. Kataja, M. Yliskoski, F. Chang, S. Syrjänen and S. Saarikoski (1992). "Natural history of cervical human papillomavirus lesions does not substantiate the biologic relevance of the Bethesda System." Obstetrics and gynecology **79**(5 (Pt 1)): 675-682.

Thomas, M., D. Pim and L. Banks (1999). "The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV." Oncogene **18**(53): 7690.

Wang, Y., J. Shi, K. Chai, X. Ying and B. P Zhou (2013). "The role of Snail in EMT and tumorigenesis." Current cancer drug targets **13**(9): 963-972.

Wen, X., D. Li, Y. Zhang, S. Liu, L. Ghali and R. K. Iles (2012). "Arsenic trioxide induces cervical cancer apoptosis, but specifically targets human papillomavirus-infected cell populations." Anti-Cancer Drugs **23**(3): 280-287.

Wharton, K. A., K. M. Johansen, T. Xu and S. Artavanis-Tsakonas (1985). "Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats." Cell **43**(3): 567-581.

Wu, J., G. Wu, L. Lv, Y.-F. Ren, X.-J. Zhang, Y.-F. Xue, G. Li, X. Lu, Z. Sun and K.-F. Tang (2011). "MicroRNA-34a inhibits migration and invasion of colon cancer cells via targeting to Fra-1." Carcinogenesis: bgr304.

Zhang, P. (2017). "On arsenic trioxide in the clinical treatment of acute promyelocytic leukemia." Leukemia research reports **7**: 29-32.

Zhang, T.-D., G.-Q. Chen, Z.-G. Wang, Z.-Y. Wang, S.-J. Chen and Z. Chen (2001). "Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL." Oncogene **20**(49): 7146.

Zheng, J., Y. P. Deng, C. Lin, M. Fu, P. G. Xiao and M. Wu (1999). "Arsenic trioxide induces apoptosis of HPV16 DNA-immortalized human cervical epithelial cells and

selectively inhibits viral gene expression." International journal of cancer **82**(2): 286-292.

Zur Hausen, H. (1996). "Papillomavirus infections—a major cause of human cancers." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer **1288**(2): F55-F78.

12. ANEXOS



International Journal of
Molecular Sciences



Article

5p and 3p Strands of miR-34 Family Members Have Differential Effects in Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer Cells

Sergio Córdova-Rivas ¹, Ixamail Fraire-Soto ¹, Andrea Mercado-Casas Torres ¹ ,
Luis Steven Servín-González ², Angelica Judith Granados-López ¹,
Yamilé López-Hernández ^{1,3} , Claudia Araceli Reyes-Estrada ⁴ ,
Rosalinda Gutiérrez-Hernández ⁵, Julio Enrique Castañeda-Delgado ⁶,
Leticia Ramírez-Hernández ⁷, José Antonio Varela-Silva ¹ and Jesús Adrián López ^{1,*} 

¹ Laboratorio de microRNAs y Cáncer, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Av. Preparatoria S/N, Zacatecas 98066, México; cordova092@hotmail.com (S.C.-R.); ixamail13@gmail.com (I.F.-S.); andrea.casas05@gmail.com (A.M.-C.T.); agranadosjudith@gmail.com (A.J.G.-L.); ylopezher@conacyt.mx (Y.L.-H.); antonio_varela@outlook.com (J.A.V.-S.)

² School of Life Sciences, Gibbert Hill Campus, University of Warwick, Coventry CV47AL, UK; L.Servin-Gonzalez@warwick.ac.uk

³ Laboratorio de Metabolómica de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas, CONACyT, Universidad Autónoma de Zacatecas, Av. Preparatoria S/N, Zacatecas 98066, México

⁴ ...



Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.
FUNDADA EN 1957

HIS. CHARRIS EN SOL. SAN ANTONIO TITUL. TPAE
C.P. 44000 MEXICO, D.F.
AVENIDA POSADA TONER. COLONIA UNIVERSITARIA
TEL. Y FAX. 56281914-12
WWW.SMBI.BQ.MX
Cuenta Bancaria: 48030101-000000

MESA DIRECTIVA 2017 - 2019
PRESIDENTE
DRA. IRENE BEATRIZ CASTRÓN MAUERO
VICEPRESIDENTE
DR. DAVID MENÉ ABERO CARRERA
SECRETARÍA TÉCNICA
DR. JORGE LUIS FLOCH WALLÓN
SUBSECRETARÍA TÉCNICA
DRA. MARTA ESCOBAR FERNÁNDEZ ANGÉLICO

SOCIOS FUNDADORES
Dr. Rodolfo Aragón Luciano
Dr. Edmundo Caba Cuatrecasas
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)
Dr. Joseph Creato (†)
Dr. Carlos del Río Estrada (†)
Dr. Silvestre Frenk Picard
Dr. Mario García Hernández (†)
Dr. Jesús Guzmán García (†)
Dr. Jesús Hernández Rodríguez
Dr. José Laporte García (†)
Dr. Guillermo Masera Higuera (†)
Dr. Raúl Chelista Viquez
Dr. Elvira D. Parra Cuatrecasas
Dr. Guillermo Ederlin Acosta

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Ixamail Fraire Soto

Quien asistió y presentó el trabajo:

Evaluation of MMP2, Notch-1 and Snail1 in siHa cells transfected with members of the miR-34 family

Por: Ixamail Fraire Soto, Jesús Adrián López

En la modalidad de cartel durante el
XXXII Congreso Nacional de Bioquímica
4 - 9 de noviembre de 2018 en Ixtapa, Zihuatanejo, Gro.

Atentamente
Por el Comité Organizador

1er Congreso Nacional de Biología Integrativa

La Sociedad Mexicana de Biología Integrativa y la Universidad Autónoma de Zacatecas



No. 0161/2019



Otorga la presente

CONSTANCIA A:

Biol. Ixamail Fraire Soto



Por su participación como **ORGANIZADORA** del 1er Congreso de Biología Integrativa Celebrado en la ciudad de Zacatecas, Zacatecas, México. Los días 22, 23 y 24 de mayo de 2019.

Dr. Jesús Adrián López
Presidente de la SMBI

Dr. Agustín Enciso Muñoz
Director de COZCyT

1er Congreso Nacional
de Biología Integrativa

La Sociedad Mexicana de Biología Integrativa
y la Universidad Autónoma de Zacatecas



No. 0037/2019



Otorga la presente

CONSTANCIA A:

Ixmail Fraire Soto, Jesús Adrián López

Por su participación con el póster científico



**“Evaluación de MMP2, MMP9, NOTCH-1 y SNAIL 1 en células
SiHa transfectadas con los miembros de la familia mir-34”**



Dentro de las actividades del 1er Congreso de Biología Integrativa Celebrado en la
ciudad de Zacatecas, Zacatecas, México. Los días 22, 23 y 24 de mayo de 2019.

Dr. Jesús Adrián López
Presidente de la SMBI

Dr. Agustín Enciso Muñoz
Director de COZCyT



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

CONSEJO ZACATECANO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

OTROGAN EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A: Ixmail Fraire Soto, Jesús Adrián López

Por su participación con el CARTEL titulado:
Evaluación de MMP2, Notch-1 y Snail1 en células siHa transfectadas con los
miembros de la familia miR-34

**VI SIMPOSIO NACIONAL DE CIENCIAS
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

22 y 23 de octubre de 2018
25 horas de valor curricular

Sala Principal del Teatro Fernando Calderón
Zacatecas, Zacatecas

Dr. Frapelsfo Luna Pacheco
Coordinador
Área de Ciencias de la Salud

Dr. en C. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez
Líder
Cuerpo Académico Fisiopatología
Celular y Molecular UAZ-176

Simposio Nacional de
Ciencias Químico Biológicas



ZACATECAS CIENCIA:TECNOLOGÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FOLIO: 4145

OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA

1^{er} Encuentro Nacional
DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS QUÍMICAS

A:
IXAMAIL FRAIRE SOTO Y JESÚS ADRIÁN LÓPEZ

Por su participación en la presentación del trabajo en la modalidad Oral:
"EVALUACIÓN DE MMP-2, NOTCH-1 Y SNAI1 EN CÉLULAS SIHA TRANSECTADAS CON LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA MIR-34"

en las "XI Jornadas y 1er Encuentro Nacional de Investigación en Ciencias Químicas", del 29 al 31 de Agosto del 2018 con un Valor Curricular de 10 horas
Zacatecas, Zac., 29 de Agosto de 2018

Jorge Luis Ayala Luján
Dr. Jorge Luis Ayala Luján
Director UACQ

55
"APLICANDO LAS CIENCIAS QUÍMICAS EN ZACATECAS"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
"Francisco García Salinas"
A través del
ÁREA ACADÉMICA DE CIENCIAS DE LA SALUD
OTORGAN LA PRESENTE **CONSTANCIA**

A: Ixamail Fraire Soto

POR SU ASISTENCIA AL CURSO TALLER
MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIADO
26 al 28 de Octubre de 2017
25 horas de valor curricular

Audiovisual del Edificio 1, Campus UAZ Siglo XXI
Zacatecas, Zacatecas

Joel Monárrez Espino
Dr. Joel Monárrez Espino
Profesor
Institutet Karolinska

Francisco Luna Pacheco
Dr. Francisco Luna Pacheco
Coordinador Área de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma de Zacatecas

Juan Armador Flores de la Torre
M. en C. Juan Armador Flores de la Torre
Secretario Académico Área de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma de Zacatecas

