

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
PÚBLICA

---

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

“EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE miR-21 SOBRE  
EL RESTABLECIMIENTO EN LA EXPRESIÓN DEL  
GEN RECK EN CÉLULAS SiHa VPH16 POSITIVAS”

## TESIS

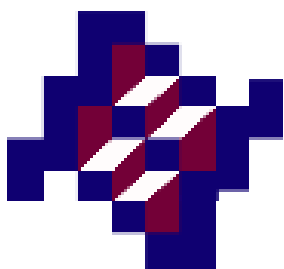
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA DE  
CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS

PRESENTA:

BIÓL. SELMA EUGENIA MEDINA GARCÍA

CUERNAVACA, MORELOS.

DICIEMBRE, 2013.



## COMITÉ DE TESIS

Director de Tesis

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Asesor

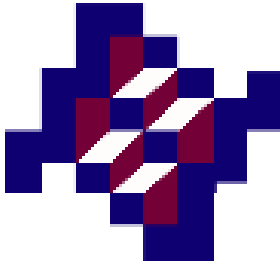
Dra. Verónica Valverde Garduño

Asesor

Dra. Angélica Meneses Acosta

Asesor

Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales



## JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Director: Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Secretario: Víctor Hugo Bermúdez Morales

Sinodal: Dr. Carlos Pérez Plasencia

# AGRADECIMIENTOS

---

A Dios, por darme la fuerza, paciencia y salud para culminar esta etapa en mi vida profesional.

*Estoy en deuda te debo más que todo, más que todo el oro acumulado dentro de cualquier tesoro. Me diste vida cuando no lo merecí, todo lo que soy ahora es gracias a ti.*

Al apoyo que obtuve de mis compañeros de maestría y doctores que me ayudaron a realizar mi proyecto, en la mejor disposición.

A esos extraños que dejaron de serlo para convertirse en mis amigos después de dos años Cris y Wendy. Abrahan que además de ser mi amigo, te has convertido en alguien muy importante para mí y me ha gustado compartir contigo esta experiencia, Gracias por su apoyo.

A mi abuela, por ver por mis preocupaciones y recibirme con los brazos abiertos.

*Siempre tu boca con consejo sabio, consuelo dulce cuando atravesaba mi calvario.*

A Omar, por apoyarme y motivarme a llegar a donde estoy.

A mi madre, porque solo ella sabe lo que hemos pasado después de estos dos años. Por los esfuerzos de mi familia hemos llegado hasta aquí, porque es un logro de todos ustedes.

*Me amabas sin haberme concebido y sin haber nacido ya era el nene más querido  
Me diste un apellido y con tus brazos me tejiste el más extraordinario nido  
Cuidaste de mis sueños con ternura pura y eliminaste el miedo de mi habitación oscura. Tu amor interminable en esta vida y más allá, te llevé para siempre aquí conmigo; mamá.*

*Akil ammar, 2012.*

# 1. RESUMEN

---

Los microRNAs son moléculas pequeñas de RNA no codificantes, que tienen la capacidad de silenciar genes al inhibir su expresión o degradar el transcrito. Los microRNAs se encuentran de manera desregulada en diversas patologías entre ellas el cáncer; tal es el caso de miR-21, el cual se encuentra sobreexpresado en líneas celulares tumorales. Este microRNA regula negativamente algunos genes involucrados en apoptosis, ciclo celular y angiogénesis. Se ha reportado al inhibidor de metaloproteasas RECK como blanco de miR-21 en cáncer gástrico, osteoclastos y cáncer oral, sin embargo, en cáncer cervicouterino (CaCU) se desconoce esta relación. El inhibidor de metaloproteasas RECK regula las proteinasas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, la cual permite la comunicación intercelular, debido a que actúa sobre factores de crecimiento, receptores de superficie celular y moléculas de adhesión, esta condición promueve un ambiente que favorece a la angiogénesis y el desarrollo de cáncer. El objetivo de este trabajo fue restablecer la expresión del gen RECK mediante el silenciamiento de miR-21 a través de plásmidos de expresión de siRNAs específicos para miR-21, en líneas celulares cervicales humanas transformadas con VPH16+.

**METODOLOGÍA.** Se transfectaron células SiHa con el plásmido pSilencer 1.0 U6 y con el plásmido pSiMiR21 que expresa siRNAs. Se extrajo RNA y proteínas para observar los cambios en los niveles de expresión de RECK mediante qRT-PCR y Western Blot. **RESULTADOS.** Se identificaron cambios en los niveles de expresión del RNAm de RECK posterior al silenciamiento de miR-21. La expresión de la proteína de RECK se restableció al silenciar a miR-21. **CONCLUSIONES.** El silenciamiento de miR-21 mediante plásmidos que expresen siRNAs son eficientes para el restablecimiento de los niveles de expresión RECK en células derivadas de CaCU.

Palabras clave: microRNA, cáncer cervicouterino, RECK, VPH16+.

# TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| AGRADECIMIENTOS.....                                                               | 4  |
| 1. RESUMEN.....                                                                    | 5  |
| 2. INTRODUCCIÓN .....                                                              | 8  |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                                                | 10 |
| 4. ANTECEDENTES .....                                                              | 12 |
| 5. MARCO TEÓRICO .....                                                             | 14 |
| 5.1 Epidemiología de cáncer cervicouterino (CaCU) .....                            | 14 |
| 5.2 Caracterización del virus de papiloma humano (VPH) .....                       | 15 |
| 5.3 Infección por virus del papiloma humano (VPH) .....                            | 17 |
| 5.4 Biogénesis de microRNAs .....                                                  | 20 |
| 5.5 MicroRNA-21 (miR-21).....                                                      | 22 |
| 5.6 Función biológica de RECK .....                                                | 24 |
| 6. JUSTIFICACIÓN.....                                                              | 26 |
| 7. HIPÓTESIS .....                                                                 | 27 |
| 8. OBJETIVO GENERAL .....                                                          | 27 |
| 8.1 Objetivos particulares .....                                                   | 27 |
| 9. MATERIAL Y METODOS.....                                                         | 28 |
| 9.1 Plásmidos de expresión de siRNAs para miR-21.....                              | 28 |
| 9.2 Cultivo celular y transfecciones .....                                         | 29 |
| 9.3 Extracción de RNA con Trizol .....                                             | 30 |
| 9.4 Síntesis de cDNA .....                                                         | 30 |
| 9.5 Diseño de oligonucleótidos para detectar RECK y GAPDH por RT-PCR.....          | 30 |
| 9.6 Ensayos de RT-PCR punto final para detección de RECK y GAPDH.....              | 31 |
| 9.7 Ensayos de qRT-PCR.....                                                        | 32 |
| 9.8 Extracción de proteínas.....                                                   | 32 |
| 9.9 Western Blot para la detección de RECK y $\beta$ -actina en células SiHa ..... | 33 |
| 10. RESULTADOS.....                                                                | 35 |
| 10.1 Silenciamiento de miR-21 con el plásmido pSiMiR21 .....                       | 35 |

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 10.2 Efecto del plásmido pSiMiR21 en células SiHa .....                           | 36 |
| 10.3 Detección del gen RECK en células SiHa posterior al silenciamiento de miR-21 | 38 |
| 10.4 Expresión de la proteína de RECK posterior al silenciamiento de miR-21. .... | 41 |
| 11. DISCUSIÓN .....                                                               | 43 |
| 12. CONCLUSIONES .....                                                            | 46 |
| 13. PERSPECTIVAS .....                                                            | 47 |
| 14. ANEXOS.....                                                                   | 48 |
| 14.1 Comité de ética en investigación .....                                       | 48 |
| 14.2 Comisión de bioseguridad .....                                               | 49 |
| 14.3 Comité de investigación .....                                                | 50 |
| 15. BIBLIOGRAFÍA .....                                                            | 51 |

## 2. INTRODUCCIÓN

---

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema de salud pública global, debido a que es responsable de hasta un 20% de las muertes en países de ingresos bajos y medios, situación que permanece en los cinco primeros lugares de muerte en la comunidad femenina (1). En México, el CaCU ocupa la segunda causa de muerte en mujeres cuya tasa de mortalidad ajustada por edad fue de 9.1 por cada 100,000 mujeres (2).

Estudios epidemiológicos y moleculares han asociado el desarrollo de CaCU con una infección persistente del virus de papiloma humano (VPH), el cual se transmite mediante la actividad sexual, y se considera como el agente etiológico de esta enfermedad. Sin embargo, la infección por VPH no es determinante para el desarrollo de CaCU ya que existen otros factores asociados (3). Los factores asociados a esta enfermedad, considera aspectos genéticos, físicos, químicos y biológicos.

Los factores biológicos integran al transcriptoma, el cual en patologías como el cáncer se caracteriza por la expresión aberrante de proteínas y transcritos no codificantes. Una parte significativa de moléculas que conforman el transcriptoma no codificante son los microRNAs, los cuales son moléculas pequeñas de RNA que se unen complementariamente al extremo 3'UTR del RNA mensajero y mediante este mecanismo, se regulan aproximadamente el 30% de los genes. Existen interacciones entre microRNAs y genes blancos, que coordinan una serie de procesos biológicos los cuales se asocian a la patogénesis de esta enfermedad (4).

Una gran diversidad de microRNAs se encuentran desregulados en CaCU. Entre ellos, se ha reportado a miR-143, miR-21, Let-7c y miR-196b, que se encargan de regular genes involucrados en procesos metastásicos, regulación de apoptosis, e inhibición de genes supresores de tumores (5). MiR-21 se identificó como un microRNA oncogénico y la sobreexpresión de éste microRNA en CaCU, puede explicarse mediante la evidencia experimental la

cual apoya que la integración del VPH se localiza en un sitio adyacente al inicio de transcripción de miR-21 (6,7). Adicionalmente, miR-21 regula genes involucrados en procesos de metástasis, angiogénesis, y en el proceso de apoptosis (8).

Se ha reportado que miR-21 regula al inhibidor de metaloproteasas RECK (Reversión- Cysteine- with Kazal Motifs), el cual controla la actividad de las metaloproteasas que degradan a las proteínas que conforman la matriz extracelular, esta acción facilita la disociación de las células tumorales y permite que se presenten las condiciones necesarias para la formación de vasos sanguíneos, implicados en el acceso a nutrientes de las células tumorales (9).

Se desconoce la participación de miR-21 en CaCU sobre el inhibidor de metaloproteasas RECK, por lo tanto, se ha propuesto como modelo de estudio a la línea celular SiHa transformada con VPH-16 derivada de CaCU para evaluar el restablecimiento de RECK mediante el silenciamiento de miR-21.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Dada la incidencia de nuevos casos de CaCU y defunciones que se le atribuyen, esta neoplasia se considera un problema de salud pública en la población femenina en nuestro país. La falta de diagnóstico y tratamiento oportuno y adecuado para esta enfermedad se refleja en las altas cifras de mortalidad que ésta presenta.

Actualmente, se busca identificar herramientas potenciales para la disminución de estas cifras de mortalidad en la población femenina. Se ha identificado, que el mecanismo de RNA interferente presente en células eucariotes, podría jugar un papel importante en la regulación postranscripcional de genes. Recientemente, se ha considerado a este mecanismo como una herramienta con un alto potencial terapéutico en procesos neoplásicos. Para ello, es necesario conocer el perfil de expresión de microRNAs; tejido y tiempo específicos durante el proceso neoplásico, lo que nos permite conocer qué genes blancos se ven alterados por la regulación ejercida por los microRNAs expresados en ese momento. Conocer la función biológica de los genes que regulan los microRNAs, nos permite conocer cómo es que la función del gen se ve involucrado en el desarrollo y la malignidad de la neoplasia.

Se han identificado algunos grupos de microRNAs que se encuentran desregulados en CaCU y en líneas celulares derivadas de este carcinoma. Se ha reportado que miR-21 se sobre expresa en esta condición. Se ha propuesto que el silenciamiento de miR-21 mediante el mecanismo de RNA interferente podría favorecer la restauración de la expresión de uno de sus genes blanco; el gen que codifica al inhibidor de metaloproteasas RECK. Se ha reportado la disminución en la expresión de RECK en líneas celulares derivadas de diversos procesos neoplásicos. La importancia biológica de RECK es controlar la actividad de las metaloproteasas que degradan proteínas de matriz extracelular. La pérdida de esta función, conlleva a la degradación de las

proteínas que conforman la matriz extracelular y la formación de un microambiente óptimo para desarrollo de CaCU.

Por lo tanto, la pregunta de investigación de este proyecto fue: si el silenciamiento de miR-21, ¿permitirá un restablecimiento en la expresión de RECK en líneas celulares humanas transformadas con VPH16?

## 4. ANTECEDENTES

Previamente, el grupo de trabajo cuantificó la expresión de miR-21 en células SiHa y fue evaluado mediante por RT-qPCR tiempo real con sondas Taqman de Applied Biosystems. Gráfica 1. (Información generada por nuestro grupo de trabajo aún no publicada.)

Para llevar a cabo el silenciamiento de miR-21 mediante el mecanismo de interferencia se realizó la construcción del plásmido pSiMiR21 que expresa siRNAs. El plásmido consistió en el inserto de los oligos previamente diseñados de la secuencia sentido de 19 nucleótidos de miR-21. La secuencias clonadas en el vector fueron 5' CACCAGTCGATGGGCTGTCTTCAAGAGAGACAGCCCATCGACTGG-TGTTTTTT 3' y 5' AATTAAAAACACCAGTCGATGGGCTGTCTCTTTG-AAGACAGCCCATCGACTGGTGGGCC 3'. (Figura 1) (73)

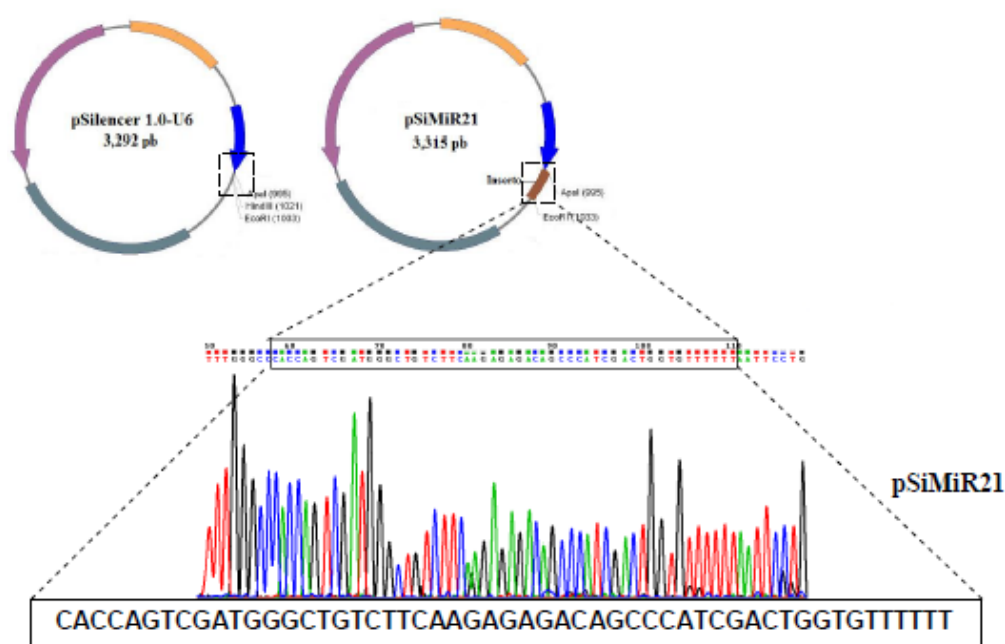
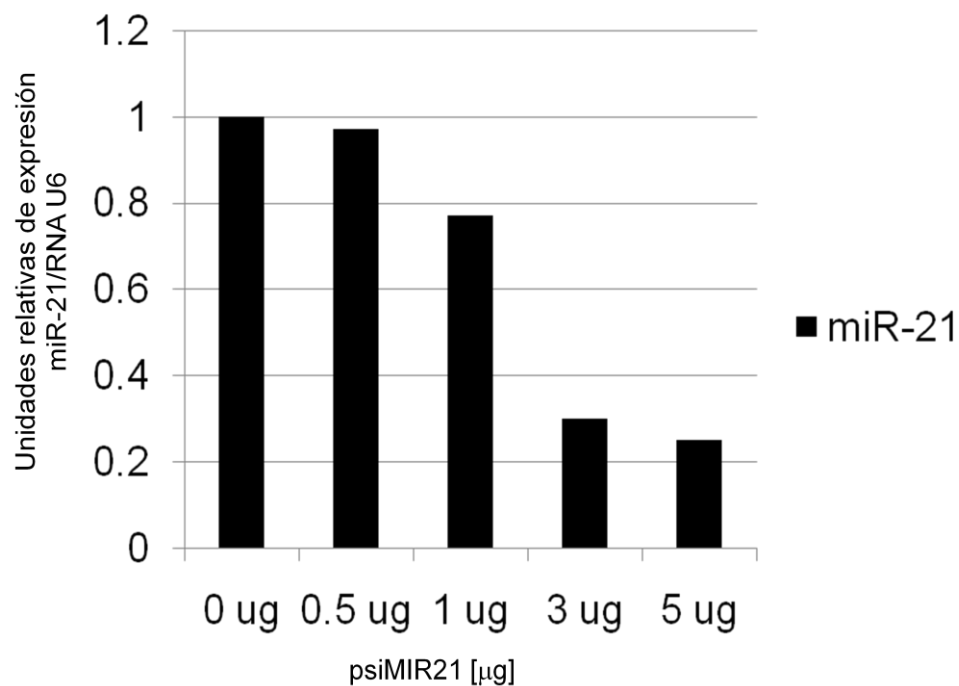


Figura 1. Construcción del plásmido de expresión de siRNAs para miR-21. Secuenciación capilar de DNA de plásmidos generados (pSiMiR21).

Posterior a la purificación del plásmido pSiMiR-21 por el sistema PureYield™ Plasmid Midiprep System Kit (Promega, Madison, EUA), se secuenció el inserto para identificar si los plásmidos contienen el templado que genera siRNAs y reconocen las secuencias en el precursor de miR-21.

Se realizó una curva de concentración del plásmido pSiMiR21 para ser administrado a las células SiHa mediante transfección. Se consideró que 3 y 5  $\mu\text{g}$  del plásmido es suficiente para evaluar el efecto del silenciamiento de miR-21.

Adicionalmente, se evaluó el silenciamiento del microRNA humano miR-21 mediante el plásmido pSiMiR21. Se midió la expresión del gen PTEN que es blanco de miR-21 posterior al silenciamiento de miR-21 en células SiHa (73).



Gráfica 1. Análisis de la expresión de miR-21 por el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  en células SiHa transfectadas con pSiMiR21.

## 5. MARCO TEÓRICO

---

### *5.1 Epidemiología de cáncer cervicouterino (CaCU)*

El CaCU es la cuarta causa de muerte a nivel mundial en mujeres en edad reproductiva (10). Principalmente en los países en vías de desarrollo, cada año, 500,000 mujeres se diagnostican con la enfermedad y cerca de 275,000 mueren por esta causa (11). En México, el CaCU causó 3,959 defunciones en el año 2010, esto representa la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres (2).

En la actualidad, se ha observado una disminución en la incidencia y mortalidad de CaCU en países desarrollados debido a la implementación de tecnologías eficaces de tamizaje y detección temprana. Sin embargo, en países en vías de desarrollo, no se observa una tendencia similar ya que no cuentan con las mismas estrategias (12).

Desde la década de los 80's se han descrito diferentes factores de riesgo para el desarrollo de CaCU. Se ha identificado al VPH como una causa necesaria más no suficiente en el desarrollo de esta enfermedad (13).

El tipo de VPH y carga viral presentes en la infección son elementos que incrementan el riesgo de los eventos iniciadores de la displasia. Estos elementos son determinantes e independientes uno del otro para aumentar la probabilidad para el desarrollo de CaCU (14).

Adicionalmente a la infección persistente por VPH, se han considerado como factores de riesgo para el desarrollo de CaCU: la edad de inicio de la actividad sexual y el número parejas sexuales (15), alta paridad (16), consumo de tabaco (17), raza, y el estado socioeconómico entre otras causas (18).

Walboomers y colaboradores reportaron que el CaCU invasor se asocia con la presencia del genoma VPH de alto riesgo en el 99.7% de los casos (19).

## *5.2 Caracterización del virus de papiloma humano (VPH)*

Se han identificado más de 100 genotipos de VPH que afectan el tracto anogenital y han sido asociados a lesiones intraepiteliales o carcinomas invasivos. De acuerdo a su capacidad oncogénica, los VPH han sido agrupados en VPH de bajo riesgo (VPH-BR), como son el tipo 6, 11, 42, 43 y 44 debido a su débil asociación con CaCU (20). Las variantes de VPH 16, 18, 31 y 33 son considerados VPH de alto riesgo (VPH-AR) por encontrarse asociadas al CaCU en más del 95% de los casos (21).



Figura 2. Esquema sobre la estructura de VPH.

Existe una gran variedad de VPH's, sin embargo, esta diversidad no altera la organización genómica entre ellos (22). Su genoma está constituido por 8000 pb aproximadamente; lo constituye una región temprana (Early) que consta de seis genes de expresión temprana; una región tardía (Late) consta de dos genes y una región larga de control (Large Control Region LCR) no codificante (23).

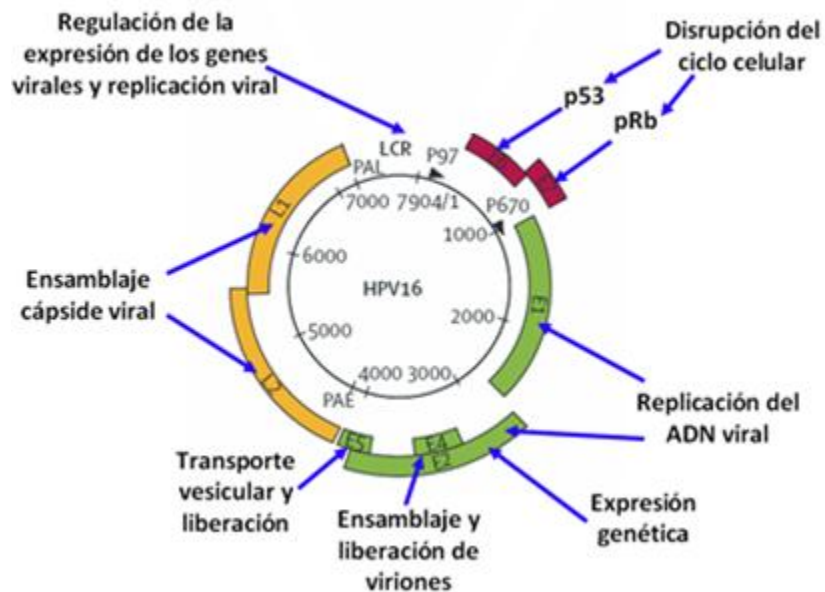


Figura 3. Organización genómica del VPH 16.

La región temprana consta de tres oncogenes; E5, E6 y E7, que codifican oncoproteínas involucradas en el proceso de transformación celular, dos proteínas; E1 y E2, que modulan la transcripción y replicación viral; mientras que en la región tardía se codifican dos proteínas estructurales de expresión tardía que dan pie a la formación de la cápside viral; L1 y L2. (24-26) (Cuadro 1.)

La LCR es una porción del genoma no codificante, en la que presenta la actividad de la regulación genética de los VPH. Este fragmento del genoma tiene un tamaño aproximado de 800 y 1000 pb, el cual varía dependiendo del tipo de VPH, sin embargo, conserva elementos de regulación comunes (27).

Cuadro 1. Proteínas virales de VPH involucradas en procesos celulares.

| Proteínas virales de VPH |                                       |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Proteína                 | Función                               |
| E1                       | Replicación viral                     |
| E2                       | Control de transcripción              |
| E4                       | Apoptosis y arresto del ciclo celular |
| E5                       | Transformación                        |
| E6                       | Transformación                        |
| E7                       | Transformación                        |
| L1                       | Cápside mayor                         |
| L2                       | Cápside menor                         |

### 5.3 Infección por virus del papiloma humano (VPH)

Aún no está bien definido cómo es que el VPH ingresa a la célula del hospedero, sin embargo, se propone que radica en la naturaleza específica de un receptor, el cual se compone de proteoglicanos de heparán sulfato implicados en la unión inicial del VPH a la célula (28). El epitelio cervical basal es la zona susceptible a la infección por VPH (29). Este epitelio se organiza de manera estratificada, donde las células localizadas en la parte basal mantienen su capacidad mitótica, mientras que las superficiales ya se encuentran diferenciadas (30).

Posterior a la infección por VPH, el genoma del virus se replica en las células basales y se mantiene de forma episomal (31). La progenie de estas células perpetuará la infección por VPH y los genes tardíos se expresan lo que permite que se lleve a cabo la fase de maduración del ciclo viral (32). El DNA viral se empaqueta en la cápside y se liberan los viriones que continúan con el ciclo viral en células nuevas (33). Figura 4.

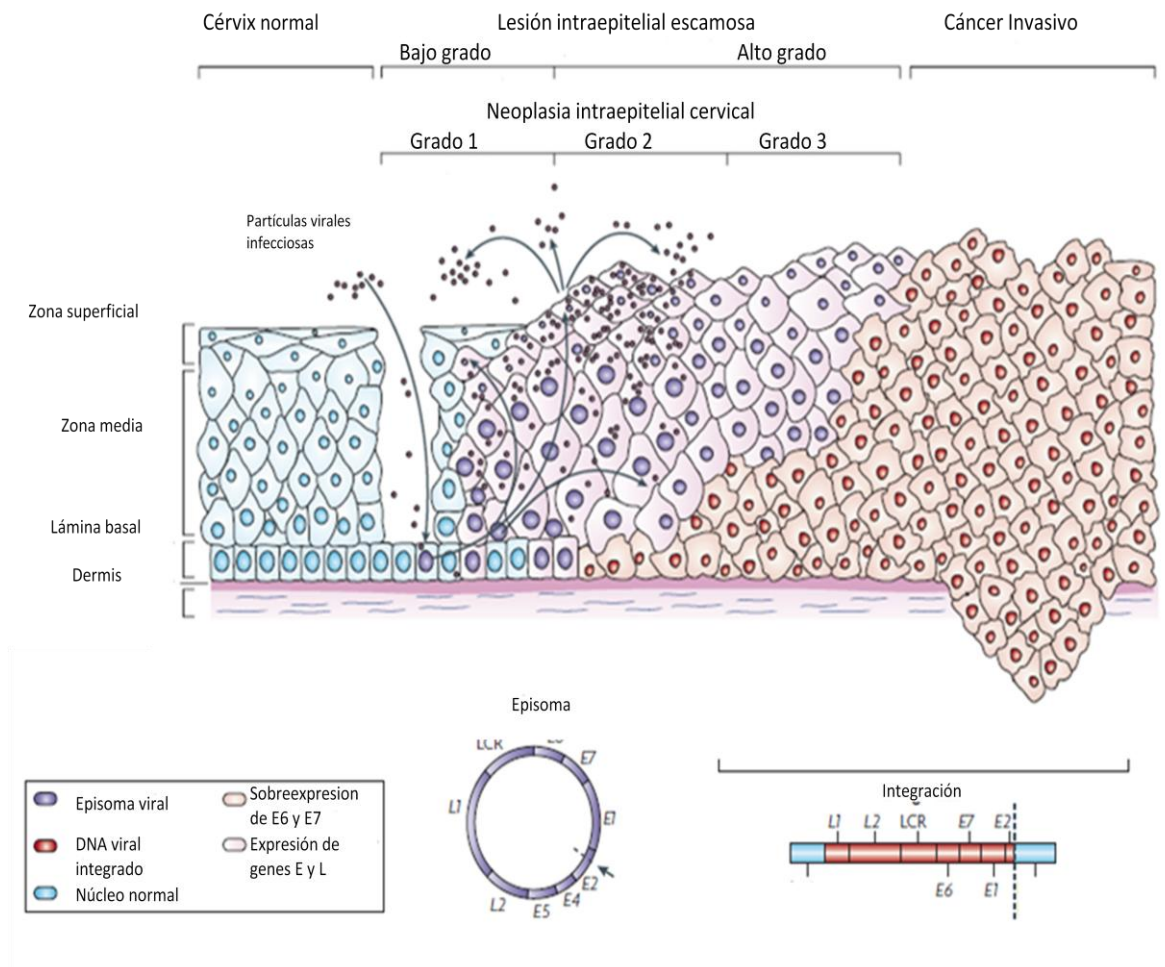


Figura 4. Progresión a CaCU por infección de VPH.

La integración del genoma viral al de la célula huésped, se debe a la ruptura en el marco de lectura del gen que codifica para la proteína de expresión temprana E2, la cual regula la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. Estas oncoproteínas han sido ampliamente estudiadas en VPH-AR debido a que favorecen la degradación de las proteínas p53 y pRb, respectivamente. La interacción de estas proteínas virales con múltiples factores celulares, inhiben la regulación normal del ciclo celular y los mecanismos de muerte celular (34,35). Las proteínas virales E6 y E7 son necesarias para que se lleve a cabo la progresión de lesiones intraepiteliales al desarrollo de CaCU (36,37).

Adicionalmente, el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16, han sido evaluadas en un grupo de metaloproteasas (MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP), las

cuales se han visto sobreexpresadas en CaCU. Las metaloproteasas tienen la capacidad de remodelar la célula mediante la degradación de proteínas de matriz extracelular (38). Particularmente, la expresión de E7 ha sido asociada con el incremento de la MMP-9, sin embargo, la co-expresión de E6 y E7 regulan negativamente la expresión de los inhibidores de estas metaloproteasas (RECK y TIMP-2). Por lo tanto, la infección de VPH promueve un proceso neoplásico, debido a que desencadena un desequilibrio entre las metaloproteasas y sus inhibidores, lo que favorece la progresión de tumores sólidos (39).

En carcinomas cervicales derivados de una infección persistente por VPH-AR, el genoma viral se integra en sitios específicos del genoma de la célula hospedera (40). Estos sitios del genoma han sido denominados sitios frágiles comunes, los cuales se caracterizan por una alta inestabilidad en el material genómico y porque en estos sitios se facilitan procesos como traslocaciones, deleciones y amplificación génica. Se ha descrito a FRA17B como un sitio de integración de VPH16 localizado en el cromosoma 17 q23 (6).

Adicionalmente a las metaloproteasas que se expresan anormalmente en CaCU, la expresión descontrolada de los microRNAs también conlleva la expresión de proteínas que favorecen el desarrollo de CaCU.

#### *5.4 Biogénesis de microRNAs*

Los microRNAs son un grupo de RNA's pequeños que desempeñan una función regulatoria de genes involucrados en vías de señalización, proliferación celular y metabolismo (41), muerte celular (42), hematopoyesis (43), desarrollo neuronal (44), y tumorigénesis (45).

Un gran número de organismos eucariotes tienen genes que se transcriben en forma de RNA pequeños conocidos como microRNAs, y fungen como moléculas efectoras del mecanismo de RNAi (RNA interferente) (46), cuya función es el silenciamiento de genes dependiente de la complementariedad de bases con los transcritos del RNAm (47). Una cuarta parte de los RNAs pequeños descritos se localizan en intrones y son transcritos por la RNA polimerasa II (48) y el resto son transcritos por la RNA polimerasa III (49).

El proceso de generación de los microRNAs maduros comienza en el núcleo, en donde los transcritos primarios de microRNAs (pri-microRNA), se procesan y dan origen a un microRNA precursor (pre-microRNA). Estos últimos están conformados por aproximadamente 60 a 110 nucleótidos y la estructura secundaria que forman es del tipo tallo-asa (50).

La transición de los pre-microRNAs a partir de los pri-microRNAs se lleva a cabo por actividad de la endonucleasa RNasa tipo III (Drosha), y su función es hidrolizar las cadenas de RNA en sitios aledaños a la estructura tallo-asa (51). A su vez, Drosha forma parte de un complejo mayor con proteínas asociadas al RNA, dentro de las cuales está una helicasa, proteínas de unión al dúplex de RNA, ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares, entre otras. Y el complejo menor denominado microprocesador, se compone propiamente por la endonucleasa Drosha, necesaria para mediar la generación de los microRNAs a partir de los pre-microRNAs (52).

Los pre-microRNAs se exportan del núcleo al citoplasma por medio de la exportina-5 (53), donde serán procesados por Dicer, una RNasa tipo III citoplasmática y darán origen a los microRNAs maduros de doble cadena con un tamaño de 21 a 25 nucleótidos. Los siRNA (RNA interferentes pequeños)

son el resultado de la separación de la doble cadena de los microRNAs maduros, y estos, son procesados por RISC (complejo ribonucleoproteico de silenciamiento inducido por RNAi) y regulan negativamente la expresión de genes blancos a nivel postranscripcional mediante la degradación del RNAm (46). La complementariedad de las bases entre el microRNA y el RNAm permite la degradación de los transcritos, de manera que las bases apareadas participan en el arresto de la traducción (54). Debido a ello, se han analizado los perfiles de expresión de miRNA's en diferentes patologías humanas se ha visto una desregulación en los niveles de expresión de microRNAs como miR-21 (55).

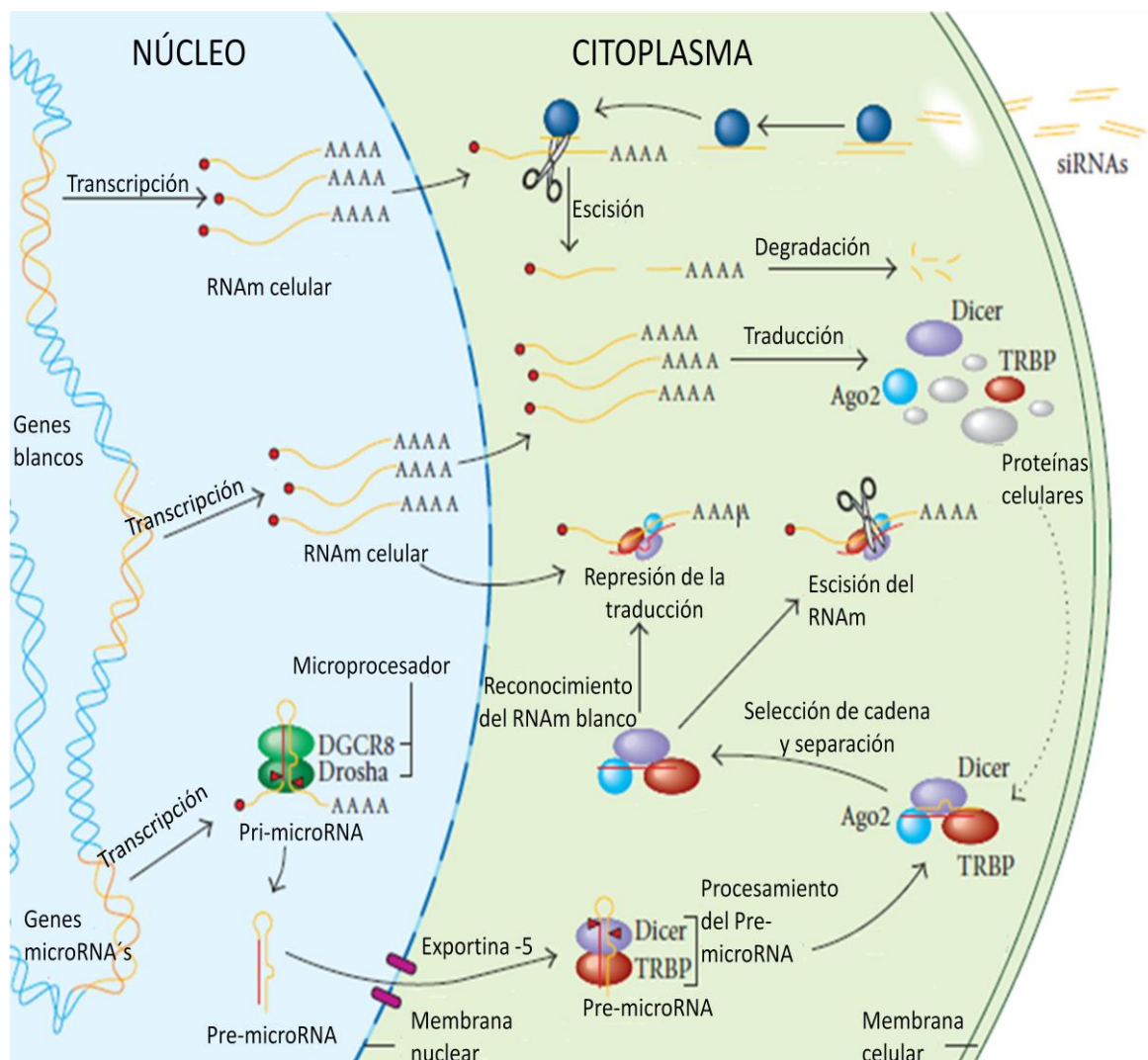


Figura 5. Esquema de la biogénesis de microRNAs. Modificado de Ouellet. (76)

### 5.5 MicroRNA-21 (miR-21)

En *Homo sapiens*, miR-21 se localiza en el cromosoma 17q23.2 (NR\_02493.1), dentro del intrón 10 del gen TMEM49 (56). Se ha reportado que miR-21 y TMEM49 se encuentran regulados de manera independiente, lo que sugiere que miR-21 tiene su propia unidad transcripcional, es decir, la expresión de miR-21 es independiente a la del gen al que se encuentra superpuesto (57). Adicionalmente, miR-21 se transcribe por acción de la RNA polimerasa II y produce pri-miR-21 (microRNA-21 primario), con varias kilobases de longitud (58). MiR-21 deriva de un precursor primario (pre-miR-21) poliadenilado de un tamaño aproximado de 3433 nucleótidos. Este pre-miR-21 contiene una señal consenso de poliadenilación (AAUAAA) entre los nucleótidos +3394 y +3399. El transcrito es procesado por la enzima RNAsa III, Drosha y DGCR8 (síndrome de DiGeorge gen crítico de la región 8) en el núcleo, el cual forma una estructura tallo asa que da origen al pre-miR-21 con un tamaño aproximado de 72 nucleótidos que reside entre los nucleótidos +2445 y +2516. Este pre-miR-21 se trasloca del núcleo a citoplasma mediante la actividad de la exportina 5. Para llevar a cabo la degradación de una de las cadenas del miRNA maduro, éste debe ser procesado por la actividad de RISC (52, 53). MiR-21 fue uno de los primeros microRNAs detectados en el genoma humano, que se encuentran sobre regulados en cáncer (59,60). Se ha reportado en diversos estudios que miR-21 determina funciones fisiológicas durante el desarrollo embrionario, proliferación, diferenciación y muerte celular (61), debido a la amplia gama de genes blancos celulares sobre los que actúa como se muestra en la figura 6.

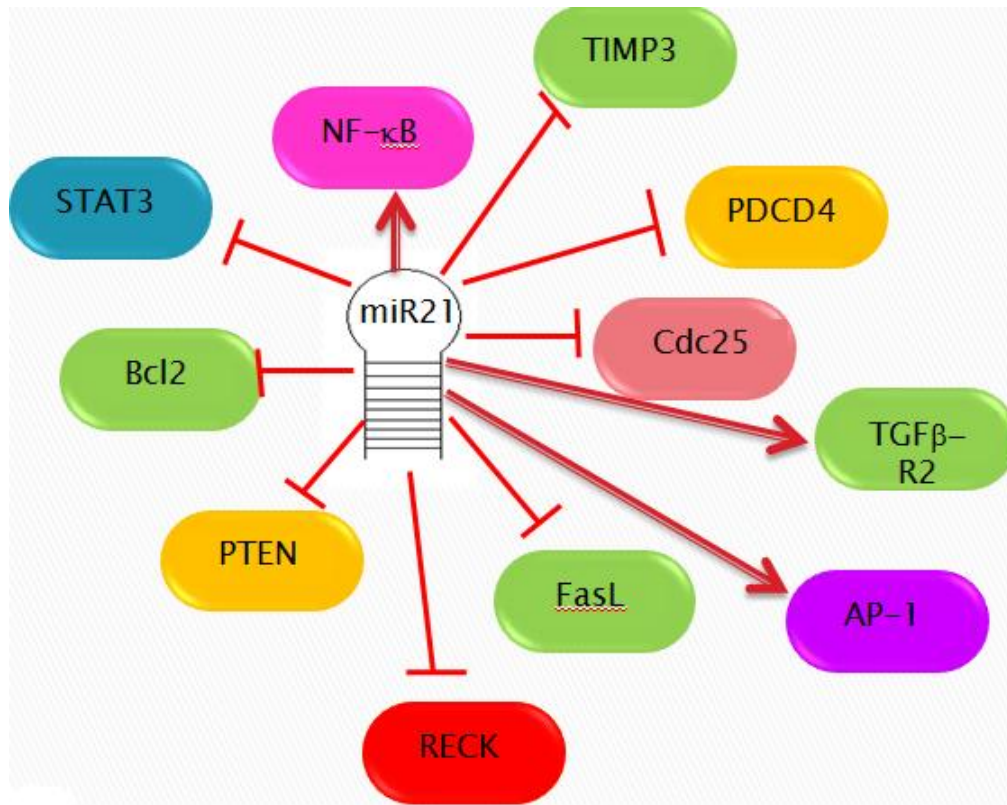


Figura 6. Genes blanco regulados por miR-21 de manera directa o indirecta. MiR-21 regula blancos involucrados en procesos de apoptosis, y regula genes supresores de tumores, vías de señalización, factores de transcripción y genes relacionados con ciclo celular (Modificado de Zhang et al. 2009).

En diversos tipos de cánceres, se han descrito que los genes blancos que regula miR-21 tienen múltiples funciones. Este regula genes con actividades de quimiotaxis, proliferación, genes supresores de tumores y genes involucrados en procesos de metástasis y angiogénesis, como es el caso del inhibidor de metaloproteasas RECK (62,63).

### 5.6 Función biológica de RECK

El inhibidor de metaloproteasas (MMP) RECK (Reversion- Cysteine- with Kazal Motifs), se reportó inicialmente como un gen localizado en la región p13-p12 del cromosoma 9 (NM\_021111.2) (64). Este gen codifica para una proteína de unión a la membrana, la cual consta de una región hidrófoba en cada extremo, cinco repeticiones de cisteína en el extremo amino, que tienen una importancia funcional particular debido a los numerosos sitios de glicosilación de residuos de asparagina, necesarios para interactuar con las MMP-9 y MMP-2. También contiene dos regiones de unión del factor de crecimiento epidermal (EGF), en la parte media de la proteína las cuales influyen en el desarrollo celular, adhesión e interacción con proteínas (65) y tres regiones con actividad inhibidora de serina-proteasa (SPIs), similares al motivo Kazal. Este motivo pertenece a una familia de inhibidores de peptidasa que contiene proteínas ricas en disulfuro, mientras que las otras dos SPI's inhiben a las MMP's (66).

En el extremo carboxilo presenta un sitio de anclaje a membrana celular, glicosilfosfatidilinositol (GPI) (67) (Figura 7).



Figura 7. Esquema de la estructura de la proteína RECK. Consta de dos regiones hidrófobas, cinco repeticiones de cisteína, dos dominios de EGF y tres dominios serpins (Kazal).

Las MMP's son una familia de aproximadamente 23 enzimas dependientes de zinc, que degradan la matriz extracelular (colágeno, elastina y gelatinasa) en estados fisiológicos y patológicos entre ellos las neoplasias. Se ha reportado que la MMP-2 y MMP-9 están asociadas estrechamente con la invasión y metástasis, estas son reguladas negativamente por el inhibidor de MMP's RECK (68).

En la región 3'UTR del RNAm de RECK, existe un elemento de respuesta a miR-21. Esta condición permite elucidar que RECK es blanco directo de miR-21 por el acoplamiento de sus bases al RNAm de RECK (69). (Figura 8) Se ha detectado la secuencia semilla de RECK para miR-21 en cáncer gástrico.

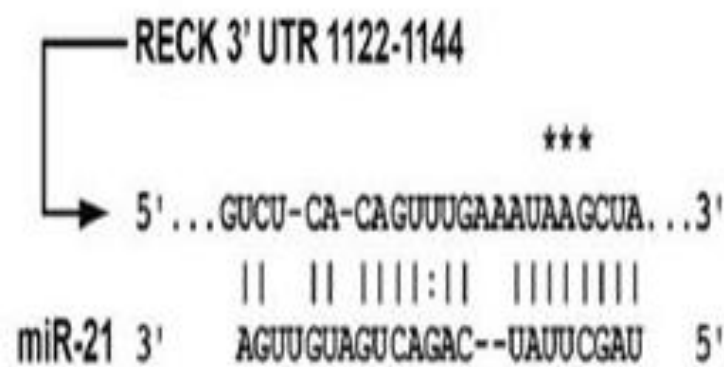


Figura 8. Región 3'UTR del RNAm de RECK que se acopla a miR-21.

Adicionalmente, se ha reportado que los niveles de RECK se encuentran disminuidos en tumores malignos a diferencia de los tejidos normales circundantes (70).

RECK es un gen regulado negativamente por miR-21, lo que conlleva a la pérdida de la función en el remodelamiento de la matriz extracelular, esta condición promueve la formación de un microambiente para la disociación de células tumorales del tumor primario, aumentando la malignidad de la enfermedad al producir procesos metastásicos y de angiogénesis (71).

## 6. JUSTIFICACIÓN

---

En México, el CaCU representa la segunda causa de muerte en mujeres en edad reproductiva, esta condición imposibilita a las mujeres y los años de vida perdidos por esta enfermedad incrementan. Desafortunadamente, en países en vías de desarrollo la falta de asistencia médica y de información en la población denotan estas cifras, a pesar de que esta enfermedad es prevenible.

El CaCU, es un cáncer que presenta la capacidad de invasión de células tumorales a tejidos u órganos diferentes a donde inicio el desarrollo de cáncer, sin embargo, se desconoce los eventos de metástasis y angiogénesis en el ámbito molecular, es decir, se desconoce la función de genes que codifican proteínas involucradas en la homeostasis, así como los microRNA's que regulan a estos genes. MiR-21 ha sido considerado un oncogen que inhibe la expresión de proteínas necesarias para el abatimiento del proceso tumoral.

En procesos neoplásicos la angiogénesis es esencial para el crecimiento tumoral. La formación de vasos sanguíneos que conlleva este proceso, es el resultado de alteraciones en la matriz extracelular causados por las metaloproteasas que se encargan de degradar las proteínas que la conforman.

Se ha demostrado que en diversas líneas celulares derivadas de cáncer, la expresión de RECK está disminuida debido a que es regulada negativa ejercida por miR-21. Sin embargo, se desconoce la expresión de RECK en líneas derivadas de CaCU. Por lo tanto, promover el restablecimiento de RECK mediante el silenciamiento de miR-21 en líneas celulares SiHa VPH16+ podría proponerse como una herramienta que actúe en contra del proceso de remodelación de la matriz extracelular que llevan a cabo las MMP's en procesos neoplásicos *in vivo*.

## 7. HIPÓTESIS

---

El silenciamiento de miR-21 favorecerá el restablecimiento de los niveles de expresión de RECK en células SiHa VPH16+.

## 8. OBJETIVO GENERAL

---

- ▶ Analizar el restablecimiento de la expresión de RECK mediante el silenciamiento de miR-21 en células SiHa VPH16+.

### *8.1 Objetivos particulares*

- ▶ Determinar la expresión del gen RECK en células SiHa VPH 16+, posterior al silenciamiento de miR-21.
- ▶ Determinar la expresión de la proteína RECK en células SiHa VPH 16+, posterior al silenciamiento de miR-21.

## 9. MATERIAL Y METODOS

### 9.1 Plásmidos de expresión de siRNAs para miR-21

Previamente el grupo de trabajo generó una construcción de plásmidos (pSiMiR21) que expresan siRNAs que silencian la expresión de miR-21 (72). Esta construcción fue validada y se realizó una curva para determinar la concentración de plásmido necesaria para que se lleve a cabo el silenciamiento de miR-21 como se muestra en la Grafica 1.

Las concentraciones de plásmidos que se utilizaron fueron de 0 $\mu$ g, 3 $\mu$ g y 5 $\mu$ g previamente estandarizadas por el grupo de trabajo, el control que se usó, fueron células sin tratamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2. Condiciones experimentales de transfección para las células SiHa.

| Condiciones de transfección | Sin Tratamiento | [0 $\mu$ g]   | [3 $\mu$ g]               | [5 $\mu$ g]               |
|-----------------------------|-----------------|---------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>pSilencer 1.0 U6</b>     |                 | Lipofectamina | Lipofectamina + pSilencer | Lipofectamina + pSilencer |
| <b>pSiMiR21</b>             |                 | Lipofectamina | Lipofectamina+ pSiMiR21   | Lipofectamina+ pSiMiR21   |

## 9.2 Cultivo celular y transfecciones

Se realizaron ensayos *in vitro* con la línea celular SiHa transformada con VPH16 obtenidas del ATCC (American Type Culture Cell) derivada de células cervicales tumorales humanas, las cuales sobre expresan al microRNA humano miR-21 (73). Las células SiHa se cultivaron en cajas de seis pozos con 2 ml de medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de suero fetal (SFB) y penicilina 100 U/ml más estreptomicina 100 µg/ml (Gibco) en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5% a una temperatura constante de 37 °C.

Se realizó una curva de transfección de 24 horas para identificar el efecto del plásmido pSiMiR21 sobre el silenciamiento de miR-21 en células SiHa. Las células se transfectaron con los plásmidos: pSiMiR21 (plásmido de expresión de siRNA para miR-21), pSilencer 1.0-U6 (plásmido vacío). La transfección se realizó en caja de seis pozos con un 80% de confluencia de las células SiHa crecidas en medio DMEM suplementado al 10% a temperatura constante de 37°C en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> 5%. Una vez alcanzada la confluencia requerida, se retiró el medio y las células se lavaron con 1ml de PBS 1X. Se agregaron 2 ml de medio sin suplementar a cada pozo. Se incubó en tubo eppendorf 10µl de lipofectamina y 250 µl de medio DMEM sin suplementar por 5 minutos. Posterior a la incubación de medio sin suplementar y la lipofectamina se colocan 3 y 5 µg del plásmido pSiMiR21 en cada condición experimental y se mezcló con los 2ml de medio DMEM sin suplementar. Las células se incubaron por 6 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub>. Posterior a la incubación las células se lavaron con 1 ml de PBS 1X. Transcurridas las 6 horas se le adicionó medio DMEM suplementado y se dejaron incubar por 24 horas.

### *9.3 Extracción de RNA con Trizol*

Se cosecharon las células SiHa a las 24 horas de transfección con el plásmido pSiMiR21. Las células se lavaron con 1ml de PBS (1X) y se les agregaron 500µl del reactivo de Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA) de acuerdo con las especificaciones del protocolo (Trizol® Reagent), posteriormente se agregaron 200µl de cloroformo, se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa incolora (RNA) y se precipitó con 500µl de isopropanol. El RNA se incubó a -20°C por una hora, posteriormente se centrifugó y se retiró el sobrenadante. El RNA se resuspendió en 25 µl de agua libre de RNasa y DNasa, se cuantificó y se almacenó a -70°C. Se comprobó la integridad del RNA mediante un gel de agarosa al 1.0%.

### *9.4 Síntesis de cDNA*

A partir del RNA extraído de las células SiHa con los diferentes tratamientos experimentales, se sintetizó cDNA por medio del kit SUPERSSCRIPT. Se realizó un coctel de reacción que contiene: una concentración de 2.5 µg de RNA total, 1µl de Oligo dT [500ug/ml], 1µl dNTPs [10mM], 2 µl DTT [0.1M], 1µl del inhibidor de RNAsas 40U, 4 µl First Strand Buffer (5X), hasta 12 µl de H<sub>2</sub>O/DEPC y 1 µl [200U] de la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA), esta mezcla de reacción se incubó una hora a 37°C y finalmente se incubó 15 minutos a 70°C. La reacción se preparó para un volumen final de 25µl. Transcurrido el tiempo de incubación, el cDNA se almacenó a -20° C hasta su uso.

### *9.5 Diseño de oligonucleótidos para detectar RECK y GAPDH por RT-PCR*

El diseño de oligonucleótidos para el gen constitutivo GAPDH y RECK se llevó a cabo mediante el programa CLC Workbench. El producto de amplificación de GAPDH fue de 85 pb y el producto de RECK fue de 198 pb. El criterio para

seleccionar los oligonucleótidos consistió en que tuvieran un tamaño aproximado de entre 18 y 25 nucleótidos de longitud, un porcentaje de GC del 40-60%, su temperatura de alineamiento fue de entre 50 y 65°C y que no formaran estructuras secundarias o dímeros. Se realizaron análisis por BLAST para identificar secuencias homologas y discriminar productos de amplificación inespecíficos al gen de interés.

Para la amplificación del gen GAPDH se usaron los oligonucleótidos GAPDH sentido 5'-AACAGCGACACCCACTCCTC y GAPDH antisentido 3'-AACAGTTCTGAGTAAAGGACCATAC; el producto de amplificación esperado fue de 85 pb. Los oligonucleótidos usados para amplificar RECK fueron los siguientes: sentido 5'- TACACCCTCCTCCCTCTAC y RECK antisentido 3'-GGACAAATCGCCTACAGG; los cuales amplifican un producto de 198 pb.

### *9.6 Ensayos de RT-PCR punto final para detección de RECK y GAPDH*

Se realizó un gradiente de temperatura para determinar la temperatura de alineamiento, observar la funcionalidad y especificidad de los oligonucleótidos para la detección del gen RECK y GAPDH para PCR. Mediante la expresión del gen constitutivo GAPDH y para el gen de interés RECK, donde se utilizó el cDNA sintetizado a partir de células SiHa.

Las reacciones de PCR para cada gen de interés se realizaron, usando los reactivos KAPA2G (KAPABIOSYSTEMS), la mezcla de reacción consistió en: [100ng] cDNA, 12.5 µl de 1X del reactivo 2X KAPA2G Robust HotStart ReadyMix y 1.25µl de DMSO al 5% para un volumen final de 25 µl. La concentración de oligonucleótidos por reacción fue de 20pmol/µl.

Las condiciones de amplificación para los genes de RECK y GAPDH fueron de desnaturalización 95°C por 1min, 35 ciclos de 95°C por 10s, la fase alineamiento 60 °C por 10s, 72°C por 10s y una fase de elongación de 4°C por 10 min.

Los productos de PCR para el gen constitutivo GAPDH y RECK se corrieron en geles de agarosa al 1%. Las condiciones de electroforesis fueron de 100 volts por 45min. El gen se tiñó con bromuro de etidio. Se observaron los productos amplificados en el fotodocumentador mediante UV.

### *9.7 Ensayos de qRT-PCR*

Se realizó una curva de concentración de cDNA o rango dinámico para determinar la concentración de cDNA necesarias para medir la expresión del gen GAPDH y RECK. Las concentraciones de trabajo para cDNA fueron de 100ng/μl, 10ng/μl, 1ng/μl, 0.1ng/μl y 0.01ng/μl. La mezcla de reacción consistió en 5μl de SYB-Green (Clontech), 0.2μl de ROX (Clontech), oligonucleótidos [2pmol] y 2.5 μl de agua por cada reacción. De esta mezcla se colocan 7.5 μl y 2.5 μl [10ng] de cDNA por cada reacción. Las muestras se corrieron por duplicado, en una placa de 96 pozos (Applied Biosystems, 2001). El programa de amplificación para este gen GAPDH fue 95°C por 20s, 95°C por 3s, 60°C por 30s, 72°C por 30s, y para el gen de RECK fue 95°C por 20s, 95°C por 3s, 57°C por 30s, 72°C por 30s. Finalmente se agregó un paso para que se lleve a cabo la curva de disociación para evidenciar un solo producto de amplificación de un tamaño aproximado de 100pb. Los ensayos de qPCR (el equipo utilizado fue ABI PRISMR 7500 HT Sequence Detection System Applied biosystems).

### *9.8 Extracción de proteínas*

Al transcurrir las 24 horas de transfección con el plásmido pSiMiR21 en las células SiHa, se retiró el medio y las células fueron lavadas con PBS 1X y despegadas con gendarme de la caja de 6 pozos. Posteriormente, las células con PBS se recuperaron en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se adicionó 150μl de buffer RIPA (Tris HCL pH7.5 50mM, NaCl 150 mM, EDTA pH 8.0 1mM, PMSF 1mM, NP40 1%, SDS 0.1%; inhibidores de proteasas (IP) e Inhibidores de Fosfatasa (IF). Se centrifugó por 30 min a 14 000 rpm a 4°C. Se determinó la

concentración de proteínas totales mediante una curva comparativa con respecto a una concentración determinada de BSA (albumina de suero bovino). Se cuantificó la concentración de proteínas a una longitud de onda de 540nm y se determinó la concentración requerida para los ensayos de Western Blot.

### *9.9 Western Blot para la detección de RECK y $\beta$ -actina en células SiHa*

Los ensayos de Western Blot se realizaron con las proteínas extraídas de la línea celular SiHa. Se preparó una muestra de proteínas a la cual se le adicionó un volumen 1:1 de buffer desnaturizador (SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol y azul de bromofenol). Las proteínas se desnaturalizaron a una temperatura de entre 95-100°C por 5 minutos. Las proteínas se corrieron en un gel resolutivo de poliacrilamida [7.5%] para obtener la separación de las proteínas y se realizó una electroforesis por 2 horas a 120 volts. Posteriormente, el gel se transfirió a una membrana de polivinilo (PVDF) humectada con 20 ml del buffer de transferencia (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0.1% y metanol 20%), este proceso se llevó a cabo en una cámara semi-húmeda (Biorad 170-3940), las condiciones de transferencia fueron por 1 hora a 200 mA. Al finalizar la transferencia se desechó el gel de poliacrilamida y la membrana se activó con metanol al 2% por 30 segundos. Para identificar las proteínas RECK y  $\beta$ -actina de las células SiHa transfectadas con pSiMiR21, se utilizó el equipo de detección de proteína SNAP Id (Merck Millipore) el cual mediante vacío se lleva a cabo la unión antígeno-anticuerpo, lo que permite que la unión sea más estrecha.

La membrana que contiene las proteínas totales extraídas de las células SiHa, se colocó en un cassette de 7.9 X8.8 cm. La membrana se bloqueo con 30ml de la solución bloqueadora Blok-CH Buffer (Merck Millipore) por un minuto. Finalizado el tiempo de bloqueo se realizó vacío para eliminar la solución bloqueadora. Se agregaron 3 ml de blok-CH buffer y una dilución 1:333 del anticuerpo policlonal de cabra conjugado con HRP y se dejó incubar por 10 min. Se lavó la membrana tres veces con 10ml de PBS-T 0.5%. Se eliminó el PBS-T por vacío.

Para llevar a cabo la detección de la proteína de  $\beta$ -actina por radiografía, se retiró del cassette la membrana y se le agregó 500  $\mu$ l de la solución quimiolumincente, y se incubó por un minuto. Se retiró el exceso de reactivo y se expuso la membrana a la placa radiográfica por 3 min. La placa se incubó por 2 min en solución reveladora, posteriormente se enjuagó con agua y finalmente se incubó en la solución fijadora por 2 min.

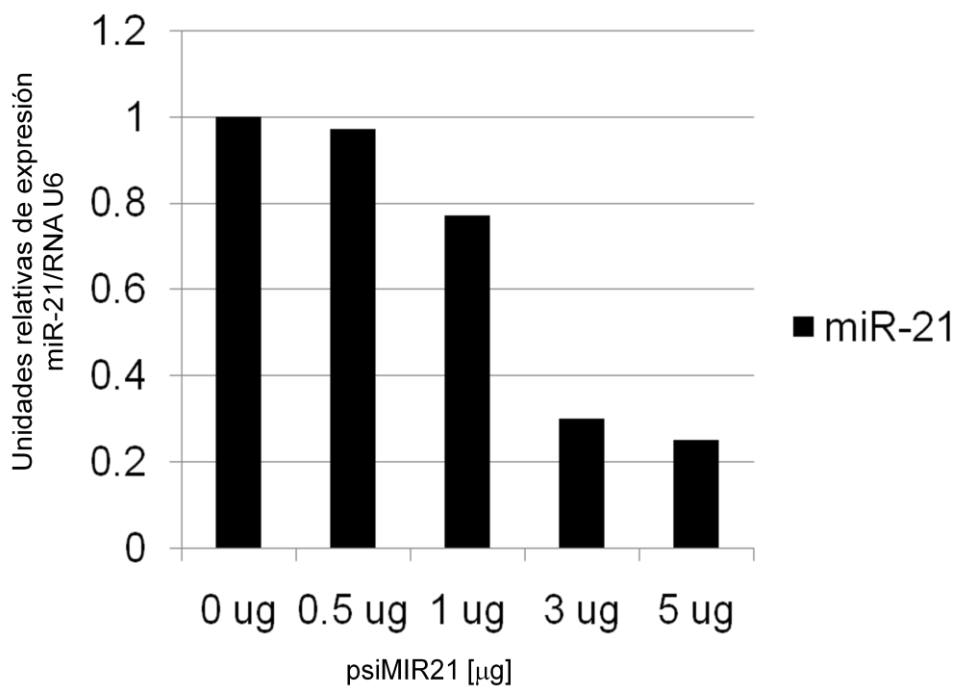
La misma membrana se lavó con PBS-T 0.5% para eliminar el exceso de anticuerpo y se utilizó para realizar el ensayo de detección de la proteína de RECK. La membrana se colocó en el cassette y se bloqueó por 1 min con 30 ml de la solución Blok-CH Buffer (Merck Millipore), posteriormente se eliminó por vacío y la membrana se incubó 10 min con el anticuerpo monoclonal RECK (Santa Cruz biotechnology, sc- 373929), a una dilución 1:333, transcurrido el tiempo se recupero el anticuerpo mediante vacío. Se lavó la membrana 3 veces con PBS-T 0.5% y se retiró el exceso mediante vacío. La membrana se incubó por 10 minutos con una dilución 1:3333 del anticuerpo secundario de cabra anti-ratón en 3ml de solución blok- CH buffer, se lavó con PBS-T 0.5%. Se reveló con placa radiográfica para observar la expresión de la proteína RECK con un tamaño esperado de 110KDa.

# 10.RESULTADOS

## 10.1 Silenciamiento de miR-21 con el plásmido pSiMiR21

Se ha reportado que miR-21 se encuentra sobre expresado en diversos tipos de patologías, entre ellas cáncer. Se sabe que en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino, también existe una sobreexpresión de este microRNA (5).

Anteriormente, el grupo de trabajo midió la expresión del RNAm de miR-21 por RTq-PCR en células SiHa y estos ensayos previos, sirvieron como control para la expresión de miR-21. Se observó una disminución en la expresión de miR-21 de aproximadamente un 70% y 80% con la concentración de 3 y 5  $\mu$ g del plásmido pSiMiR21 respectivamente como se muestra en la gráfica 1.



Gráfica 1. Análisis de la expresión de miR-21 por el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  en células SiHa transfectadas con pSiMiR21.

## 10.2 Efecto del plásmido pSiMiR21 en células SiHa

Para determinar el efecto del plásmido del silenciamiento de miR-21 sobre las células SiHa, se consideró como tiempo óptimo de transfección 24 horas, en el cual se observan cambios generados por el silenciamiento de miR-21 en las células SiHa. En la figura 9 se observó que a las 24 horas existe una disminución en la viabilidad celular.

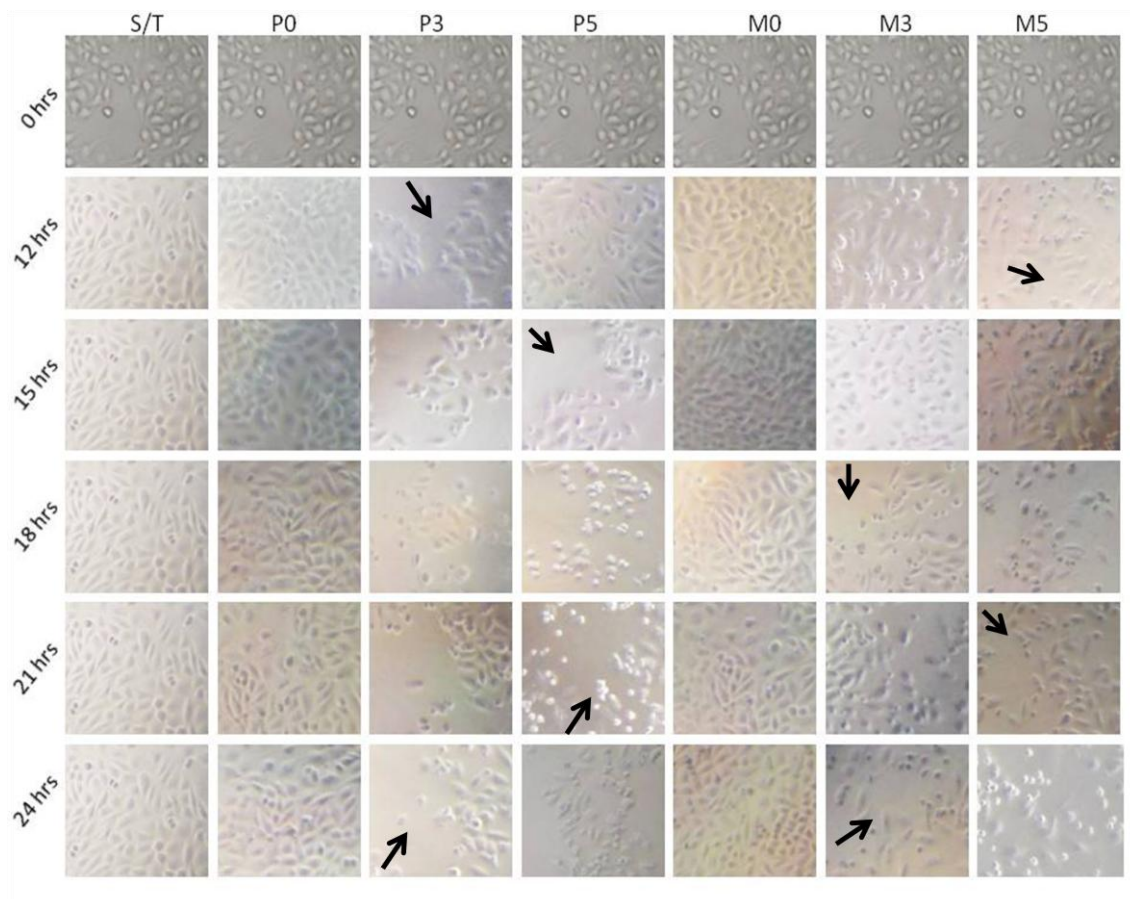


Figura 9. Efecto del silenciamiento de miR-21 en células SiHa.

Se ha reportado que la técnica de transfección de plásmidos que expresen siRNAs exógenos, pierden las características morfológicas clásicas. Por lo tanto, las células SiHa transfectadas con pSilencer 1.0 U6 y con pSiMiR21 se visualizaron por microscopia de contraste de fase con la finalidad de analizar los cambios morfológicos durante el evento de transfección. Se identificaron cambios en la morfología celular en los cultivos transfectados con el plásmido pSilencer 1.0 U6 (Figura 10A) y con el plásmido que contiene el inserto que silencia la expresión de miR-21 (Figura 10B), así también se observó la muerte

celular al cabo de las 24 horas. Como control de transfección se utilizó lipofectamina para determinar el efecto biológico de este reactivo sobre la muerte celular y fue determinado como control de transfección (0 $\mu$ g).

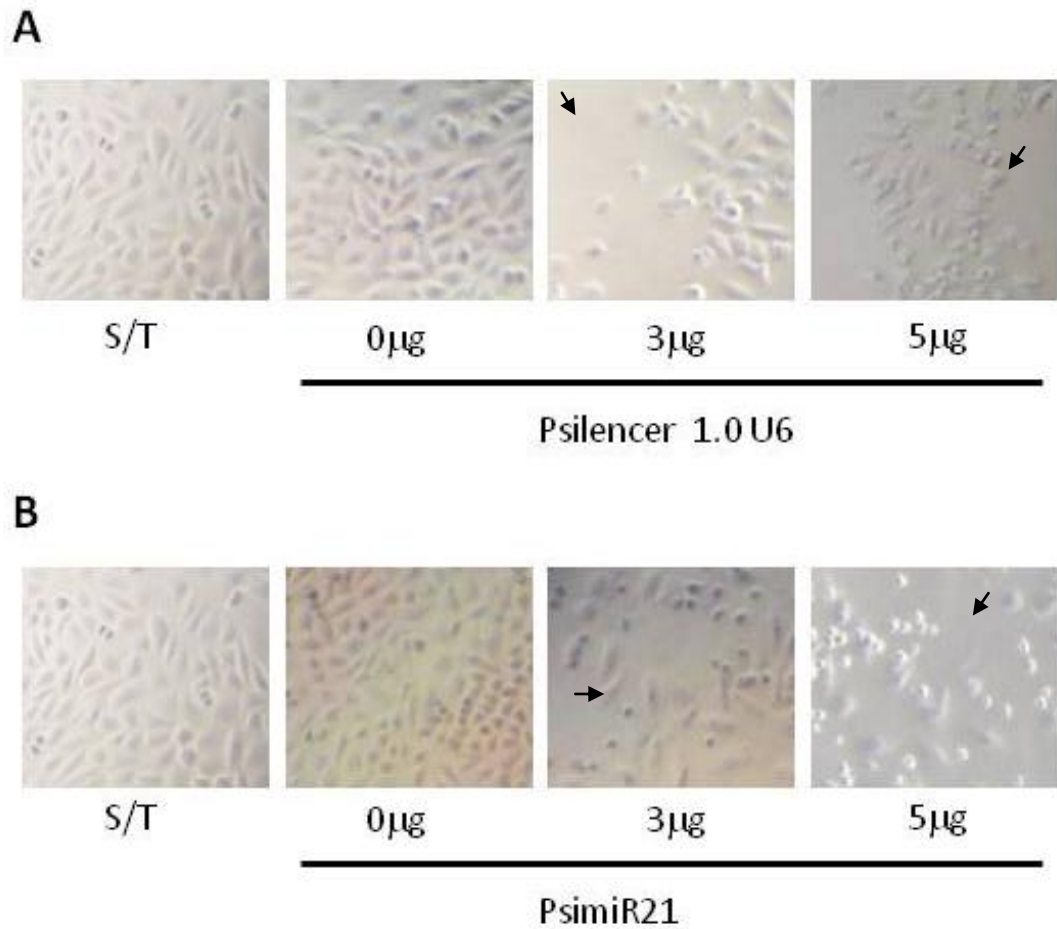


Figura 10. Microscopia óptica de células SiHa transfectadas con pSilencer 1.0 U6 y con pSiMiR21. A. Células SiHa sin tratamiento (S/T), Control de transfección (0 $\mu$ g), pSilencer 1.0 U6 (3 $\mu$ g) y pSilencer 1.0 U6 (5 $\mu$ g). B. Células SiHa sin tratamiento (S/T), Control de transfección (0 $\mu$ g), pSiMiR21 (3 $\mu$ g) y pSiMiR21 (5 $\mu$ g).

### 10.3 Detección del gen RECK en células SiHa posterior al silenciamiento de miR-21

Para identificar la expresión de RECK posterior al silenciamiento de miR-21, se validaron los oligonucleótidos diseñados previamente mediante RT-PCR punto final para ser usados en PCR tiempo real. La temperatura teórica para el uso de estos oligonucleótidos fue de 60°C. En la Figura 11, se muestra la calidad de cDNA sintetizado y los amplificados para el gen GAPDH con un tamaño aproximado de 85 pb, para cada una de las condiciones experimentales.

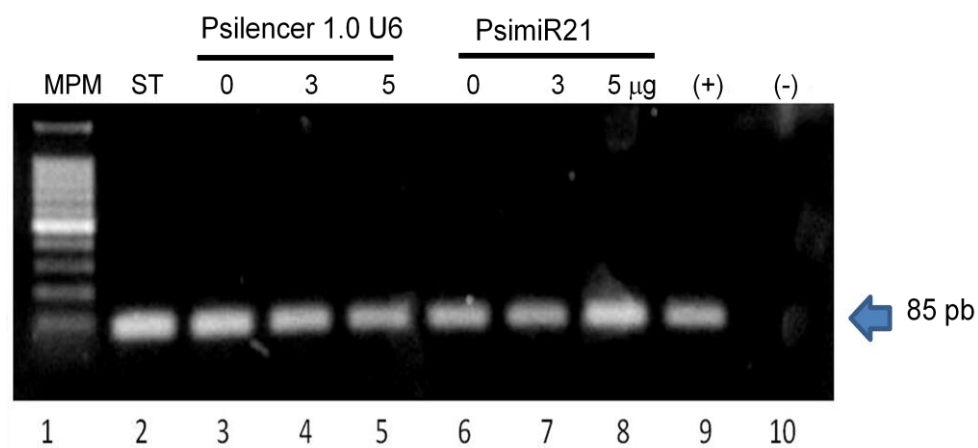


Figura 11. Productos de amplificación del gen GAPDH. 1. MPM (100pb), 2. Células SiHa sin tratamiento (S/T), 3. Control de transfección (0µg), 4. pSilencer 1.0 U6 (3µg), 5. pSilencer 1.0 U6 (5µg), 6. Control de transfección (0µg), 7. pSiMiR21 (3µg), 8. pSiMiR21 (5µg), 9. Línea celular HEK, 10. Control negativo (S/DNA).

Por otro lado, para determinar la expresión cuantitativa de los genes RECK y GAPDH se realizó un RT-PCR en tiempo real. Se realizó una curva de disociación para discriminar amplificaciones no específicas como se muestra en la figura 12A, en la que se observa la amplificación de un solo producto, comprobando así la especificidad para el gen GAPDH (Figura 12A).

Adicionalmente, se realizó una curva de rango dinámico, en donde se consideraron diferentes concentraciones de cDNA para comparar la expresión entre el gen endógeno y el gen de interés. En la figura 12B se observa la curva de rango dinámico visualizado con una regresión y una  $R^2 = 0.99$ , lo que indica que a mayor concentración de cDNA mayor amplificación y la concentración de

10ng de cDNA fue suficiente para poder observar las diferencias en la expresión del gen al silenciar a miR-21.

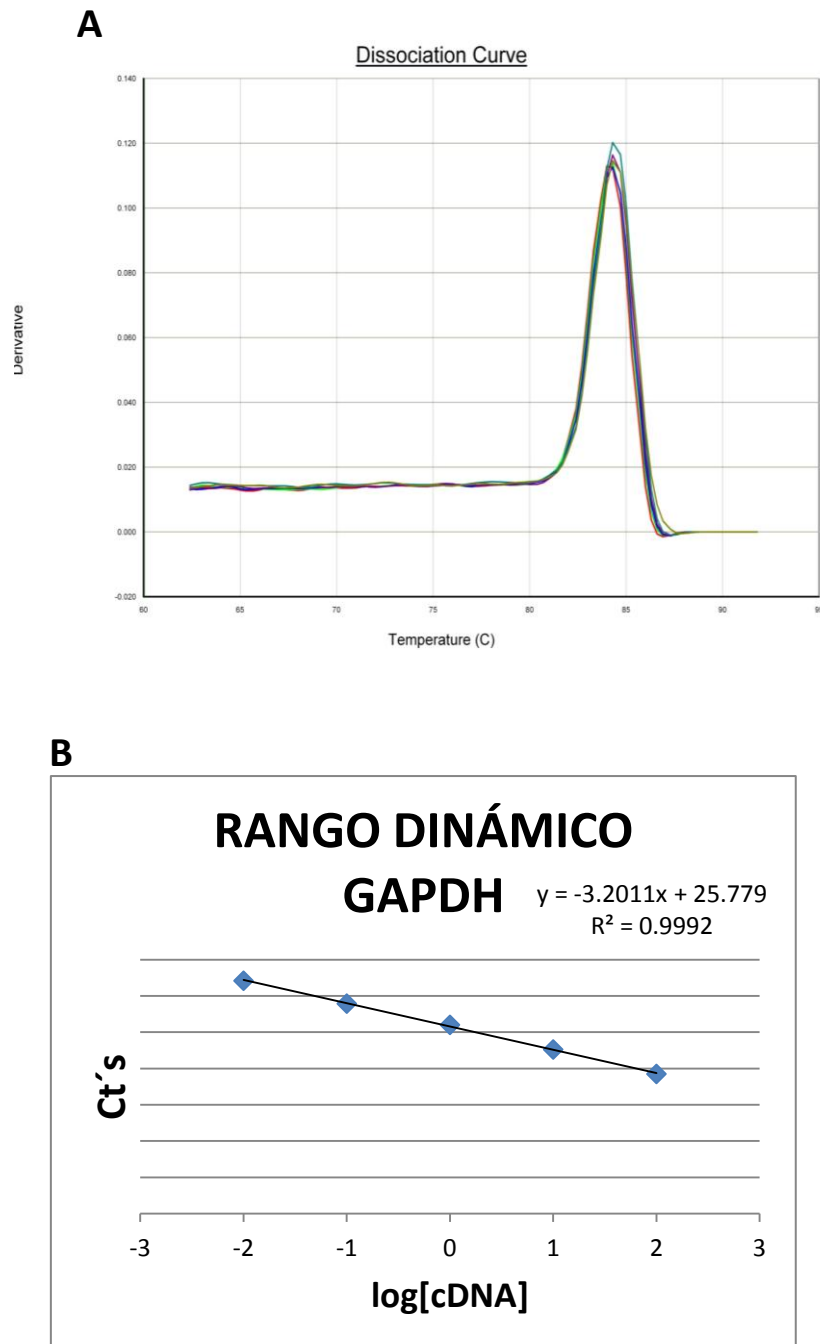


Figura 12. Validación de oligonucleótidos diseñados para GAPDH. A. Curva de disociación. B. Rango dinámico para el gen GAPDH.

Se determinaron los niveles de expresión del gen RECK posterior al silenciamiento de miR-21 mediante qPCR. En la figura 13 se observa una curva de disociación de oligonucleótidos para validar la especificidad de amplificación

para RECK y disminuir el error de una amplificación inespecífica. Por cuestiones logísticas, no se determinó rango dinámico para este gen, sin embargo, se consideró la concentración de 10ng de cDNA para realizar la cuantificación del RNAm de RECK.

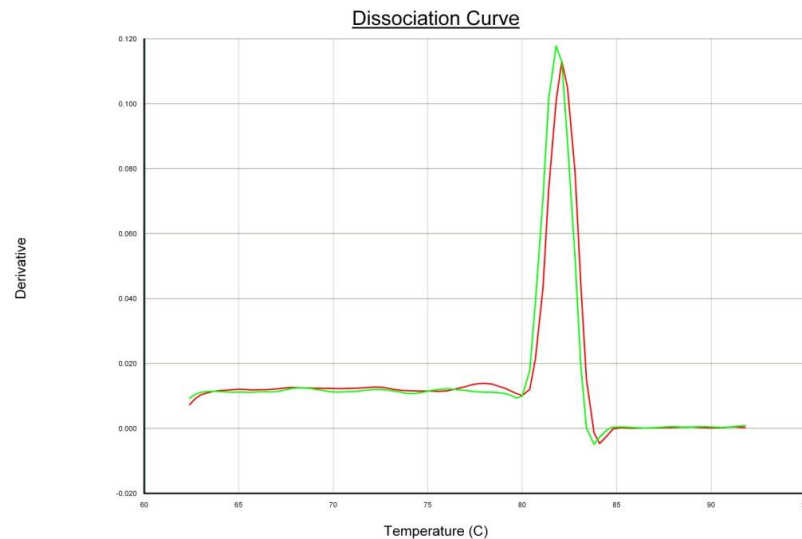
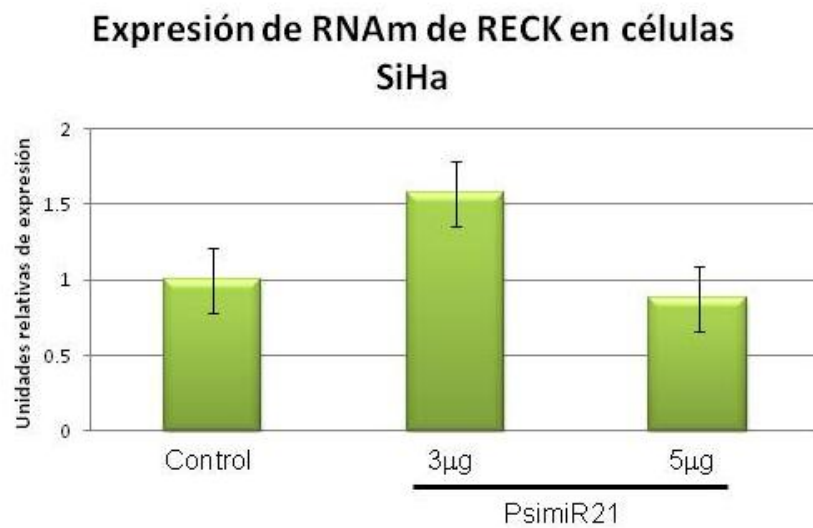


Figura 13. Curva de disociación para el gen RECK.

La determinación de los cambios en la expresión del RNAm de RECK mediante RT-PCR cuantitativo se realizó por el método Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), este método permite medir las diferencias de expresión del gen RECK en comparación con la expresión del gen endógeno GAPDH. Los resultados se graficaron como unidades relativas de expresión donde se puede observar que los niveles de expresión del RNAm de RECK. Se observó un cambio en el restablecimiento de la expresión del RNAm de RECK posterior al silenciamiento de miR-21. (Grafica 2).



Gráfica 2. Expresión del RNAm de RECK en células SiHa tratadas con el plásmido de silenciamiento pSiMiR-21.

#### *10.4 Expresión de la proteína de RECK posterior al silenciamiento de miR-21.*

Se realizaron ensayos de Western Blot para analizar las diferencias en la expresión de la proteína de RECK con los tratamientos de transfección. (Figura 14 A).

Mediante densitometría se compararon los niveles de expresión de la proteína de RECK en células SiHa posterior al silenciamiento de miR-21 (Figura 14B). En este análisis se muestra los niveles de expresión relativa de la proteína de RECK, en donde se comparan los diferentes tratamientos administrados a las células con el gen constitutivo  $\beta$ -actina. Se observa un aumento en la expresión de RECK en la condición máxima de silenciamiento que se estableció en este ensayo, el cual fue de 5µg.

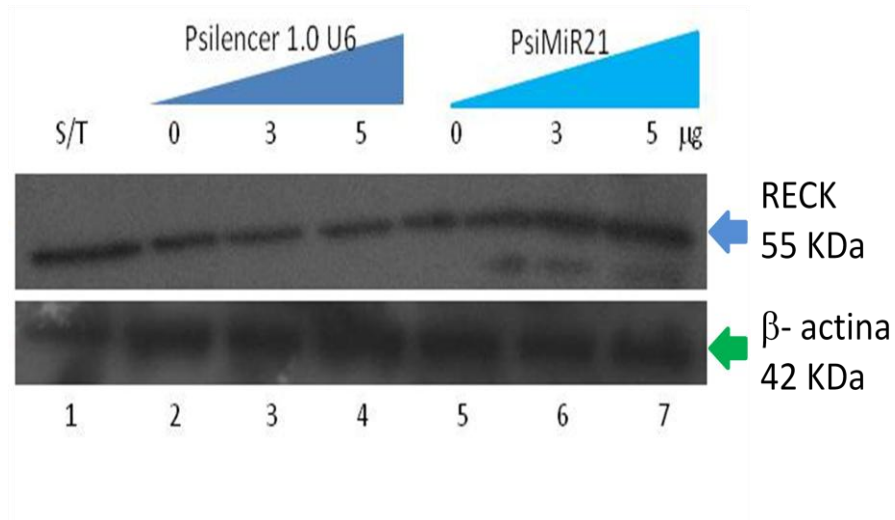
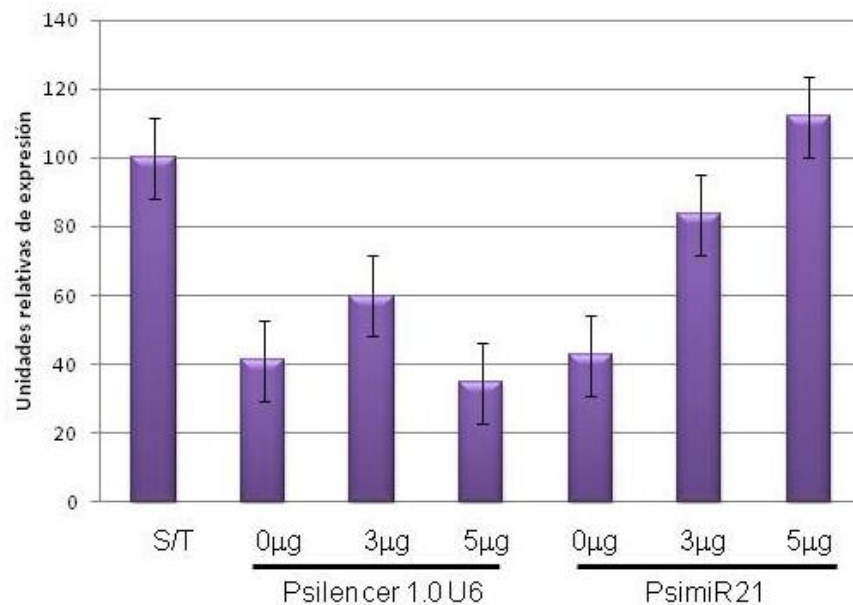
**A****B**

Figura 14. Análisis de la expresión de la proteína RECK en células SiHa en células SiHa transfectadas con los plásmidos pSilencer 1.0 U6 y pSiMiR21 **A**. Expresión de la proteína de RECK. 1. Células SiHa sin tratamiento (S/T), 2. Control de transfección (0μg), 3. pSilencer 1.0 U6 (3μg), 4. pSilencer 1.0 U6 (5μg), 5. pSiMiR21 (0μg), 6. pSiMiR21 (3μg), 7. pSiMiR21 (5μg), **B**. Análisis de la expresión de la proteína de RECK por densitometría en células SiHa transfectadas con los plásmidos pSilencer 1.0 U6 y pSiMiR21. 1. Células SiHa sin tratamiento (S/T), 2. Control de transfección (0μg), 3. pSilencer 1.0 U6 (3μg), 4. pSilencer 1.0 U6 (5μg), 5. Control de transfección (0μg), 6. pSiMiR21 (3μg), 7. pSiMiR21 (5μg).

# 11.DISCUSIÓN

---

Actualmente se ha asociado que los perfiles de expresión de microRNAs se encuentran desregulados en diversas enfermedades humanas entre ellas el cáncer. Por la función que algunos microRNAs presentan en cáncer se han denominado oncomirs. Dentro de los oncomirs descritos primeramente en cáncer fue miR-21 (74), el cual inhibe la traducción de genes involucrados en apoptosis (bcl2), vías de señalización (STAT3), caspasas y genes involucrados en la integridad de la homeostasis de matriz extracelular como RECK lo que promueve la gravedad de la neoplasia (75).

Se ha identificado la desregulación de miR-21 en cáncer cervicouterino y en un estudio realizado por Deftereos y colaboradores en el 2011, identifican los niveles de expresión de miR-21 por RT-PCR tiempo real de líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino, se incluyeron las líneas celulares HeLa y SiHa y se compararon con muestras de tejido normal de cérvix. Se concluyó que miR-21 esta sobreexpresado en estas condiciones (73).

En los ensayos de transfección se observó la muerte celular en cultivos transfectados con el plásmido pSilencer 1.0 U6 y con el plásmido pSiMiR21. Este efecto podría explicar que el silenciamiento de miR-21 se lleva a cabo, por el mecanismo de RNA interferente que no permite a la secuencia madura de miR-21 la unión con la región 3'UTR de los RNAs mensajeros de STAT3, Bcl2, TGF- $\beta$ RII, entre otros, lo cual demuestra de manera indirecta el restablecimiento de genes blancos de miR-21 involucrados en procesos celulares de apoptosis (75). Por otro lado, este mismo evento podría deberse al efecto biológico de la transfección de exo-microRNAs, los cuales compiten por la maquinaria de RISC la cual es necesaria para procesar los microRNAs endógenos, que también están involucrados con la regulación postranscripcional de sus genes blancos e incluso de otros microRNAs que regulan de manera indirecta genes importantes para mantener funcionalidad celular (77). Adicionalmente, Zhao y colaboradores en el 2013, realizaron un estudio de inhibición de c-Myc en células HepG2 derivadas de

hepatocarcinoma humano mediante el uso del vector de expresión de siRNAs pSilencer 1.0 U6, que a diferencia de nuestro trabajo, ellos evidencian que el vector no altera la expresión del gen c-Myc al transfectar las células con el plásmido sin la secuencia que expresa la inhibición de c-Myc (78).

En este trabajo se demostró que existe un restablecimiento en el transcrito de RECK al silenciar a miR-21, estos resultados son congruentes con los reportados por Gabrielly y colaboradores en el 2008, en donde observaron el restablecimiento de los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de RECK y TIMP3 en glioblastoma, posterior a la inhibición específica de miR-21 mediante oligonucleótidos antisentido (61). Adicionalmente, a la similitud de los resultados de ambos trabajos, podría haber una diferencia en la expresión debido al método de inhibición empleado, a la naturaleza y vida media del RNAm así como al modelo de estudio usado. (61).

Por otro lado, se observó el restablecimiento de la expresión de proteína mediante plásmidos que silencian la expresión de miR-21, estos resultados concuerdan con los presentados por Gabrielly en el 2008, en donde validan la expresión de la proteína de RECK en líneas A172 y LN229 derivadas de glioblastoma al silenciar a miR-21 con plásmidos antisentido.

En este estudio se muestra la modulación de la expresión de la proteína de RECK en células SiHa sin tratamiento y células SiHa tratadas con el plásmido de silenciamiento (pSiMiR21), en las cuales se observó una diferencia en la expresión de la proteína. Por otro lado, se detectó un producto de 55kDa menor al peso de 110 kDa reportados por otros autores, esto puede explicarse por la variedad de las líneas celulares usadas para los ensayos. Adicionalmente, Nagata y colaboradores en el 2013, reportan la detección de la proteína de RECK en un tamaño menor al incubar las muestras con las metaloproteasas que son reguladas por este, en este caso la detección de la proteína de 55KDa corresponde a la unión de una parte fraccionada de la proteína de RECK con la metaloproteasa 7 (MMP-7) (77), esta evidencia propone la proteólisis a la cual se somete esta proteína y muestra una forma soluble (79).

La regulación de la expresión génica en procesos neoplásicos se desconoce parcialmente, ya que se ha descrito el proceso de RNAi que regula la expresión de RNAm que codifican para proteínas necesarias en el mantenimiento de la homeostasis celular. Por otro lado, el silenciamiento de genes de microRNAs como es el caso de miR-21 podría disminuir la expresión alterna de sus genes blancos que participan en apoptosis, ciclo celular e inhibidores de matriz extracelular está fuertemente regulan.

El CaCU, es de las neoplasias que son prevenibles con una detección oportuna de la infección persistente del VPH. Sin embargo, la falta de información en cuestiones de enfermedades de transmisión sexual y la falta de acceso a los servicios de salud cobra la vida de mujeres en edad reproductiva, afectando principalmente a las mujeres pertenecientes a las regiones marginadas de todo el país.

Se han propuesto como alternativas tentativas al tratamiento durante el proceso de CaCU el silenciamiento de genes por el mecanismo de RNAi. El campo

## 12.CONCLUSIONES

---

- Se restableció la expresión del RNAm de RECK por el silenciamiento de miR-21 en células SiHa transfectadas con el plásmido pSiMiR21.
- La proteína de RECK se restableció al silenciar a miR-21 en células SiHa transfectadas con el plásmido pSiMiR21.
- Estos resultados sugieren que la inhibición de miR-21, podría favorecer al restablecimiento del RNAm y proteína de RECK, en líneas celulares SiHa.

## 13.PERSPECTIVAS

---

- Silenciar a miR-21 mediante un anti-miR21 sintético, para disminuir el procesamiento por la maquinaria celular de microRNAs.
- Determinar la expresión diferencial de microRNAs en las etapas que predisponen la neoplasia y cuantificar la expresión de los genes que son regulados por estos microRNAs.
- Identificar en la región 3'UTR del RNAm en el que se une la secuencia de miR-21.
- Secuenciar la proteína de RECK de 55 KDa identificada con un peso menor al esperado mediante inmunoprecipitación.

# 14.ANEXOS

## 14.1 Comité de ética en investigación



Instituto Nacional  
de Salud Pública

Comisión de Investigación y  
Evaluación de la Investigación

### Comité de Ética en Investigación

Cuernavaca, Morelos, a 7 de mayo de 2013

CI Tesis: 563

**Selma Eugenia Medina García**

Maestría en Ciencias

Área de Concentración: Enfermedades Infecciosas

Presente

En relación a su protocolo de tesis titulado ***"EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE miR-21 SOBRE EL RESTABLECIMIENTO EN LA EXPRESIÓN DE RECK EN CELULAS SiHa VPH16 +"***, me permito informarle que los miembros de este Comité han acordado otorgarle el dictamen de:

### ***Exento de Revisión***

Lo anterior debido a que su investigación no incluye sujetos humanos y/o la base secundaria que está utilizando ya ha sido revisada y aprobada por este u otro Comité de Ética.

Le solicito atentamente que en caso de ocurrir algún cambio o actualización de datos que afecten el planteamiento actual de su protocolo de tesis, lo comunique oportunamente para someterlo a consideración de este Comité.

Atentamente

Dra. Julieta Ivone Castro Romero  
Presidenta

ccp.- Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán - Coordinador Maestría en Ciencias - Enfermedades Infecciosas  
Mtro. Miguel Ángel Reyes - Depto. Asuntos Escolares

Comisión de Investigación y  
Evaluación de la Investigación  
Instituto Nacional de Salud Pública  
Av. Cuernavaca 1000, Cuernavaca, Morelos  
C.P. 62000, México  
www.insp.mx

## 14.2 Comisión de bioseguridad



# INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA COMISION DE BIOSEGURIDAD



CB13-125.

Cuernavaca, Mor., a 30 de Abril del 2013.

CB: 537

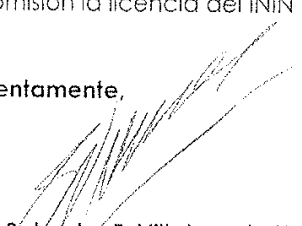
C. Medina García Selma Eugenia  
Tesis Maestría en Enfermedades Infecciosas (MC)  
Instituto Nacional de Salud Pública  
P r e s e n t e

Por medio del presente informo a usted que el dictamen de la Comisión de Bioseguridad a su proyecto titulado: **"EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE miR-21 SOBRE EL RESTABLECIMIENTO EN LA EXPRESIÓN DEL GEN RECK EN CELULAS SiHa VPH16 POSITIVAS"**; es **APROBADO** debido a que dicho proyecto establece todas las medidas de uso y manejo de residuos peligros biológico infecciosos (RPBI) y CRETI; por lo que desde el punto de vista de Bioseguridad no existe ninguna objeción para continuar su proceso.

Le recordamos que cuando algún proyecto de investigación haga uso de agentes infecciosos o maneje muestras clínicas de origen humano y/o animal y no sean procesadas en este instituto, deberá enviar una carta de la institución o instituciones en la cual se responsabilizan del manejo y disposición final de los RPBI y tóxicos generados durante el transcurso de la investigación.

Asimismo, si el proyecto maneja materiales radiactivos, será necesario enviar a esta Comisión la licencia del ININ del responsable encargado.

Atentamente,

  
Dr. Salvador F. Villalpando Hernández  
Presidente de la Comisión  
de Bioseguridad-INSP

Col. Santa María Ahuacatlán  
62100 Cuernavaca, Morelos  
México

e-mail: svillaip@insp.mx

Tel-Fax:01 (777) 3293000 ext 7204  
Secretaría: 7204

### 14.3 Comité de investigación



Instituto Nacional  
de Salud Pública

Comisión de Investigación

*Centro de Investigación  
en Epidemiología y Salud*

No. de Proyecto 557.

*"2013, Año de la Lealtad institucional y Centenario del Ejército Mexicano"*

Cuernavaca, Mor., a 09 de mayo del 2013.

C. Selma Eugenia Medina García  
Maestría en Ciencias de la Salud  
Área de Concentración en Enfermedades Infecciosas  
Instituto Nacional de Salud Pública  
Presente

Por medio del presente informo a usted, que la Comisión de Investigación evaluó su proyecto de tesis titulado: **"Efecto del silenciamiento de miR-21 sobre el restablecimiento en la expresión de RECK en células SiHa VPH16+"**; el dictamen de esta comisión es: **aprobado**.

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce  
Presidente de la Comisión  
de Investigación-INSP

Ccp.- Mtra. Lorena Elizabeth Castillo Castillo.- Jefe del Departamento de Asuntos Escolares-INSP.- Presente

# 15.BIBLIOGRAFÍA

---

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Version 1.0. IARC Cancer Base No 5. Lyon: IARC Press, 2001. Edición limitada disponible en <http://www.dep.iarc.fr/globocan.htm> [Online]
2. INEGI. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA Y GEOGRAFIA (INEGI). 2011. (Último acceso: 21 enero de 2013).
3. Atalah E, Urteaga C, Rebolledo A, Villegas RA, Medina E, Csendes A. Diet, smoking and reproductive history as risk factor for cervical cancer. *Rev Med Chil* 2001; 129:597-603.
4. Karreth F.A, Panddifi PP. ceRNA Cross-Talk in Cancer: When ce-bling Rivalries Go Awry. *Cancer Discov.* 2013; 3(10):1113-21.
5. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res.* 2007; 67 (13): 6031-43.
6. Calin GA, Sevignani C, Dumitru C. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**, 2999-3004.
7. Nambaru L, Meenakumari B, Swaminathan R, Rajkumar T. Prognostic significance of HPV physical status and integration sites in cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009 Jul-Sep;10(3):355-60.
8. Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2009 Feb;84(1):55-71.
9. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell.* 2001 Dec 14;107(6):789-800.

10. Organización Mundial de la Salud [OMS] y Unión Internacional Contra"Acción mundial contra el Cáncer". <http://www.who.int/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf>. 7 de enero de 2011.
11. IARC (2008). International Agency for Research on Cancer (IARC).
12. Detailed Guide: What are the key statistics about cervical cancer? Sitio web de la American Cancer Society: [www.cancer.org/Cancer/Cervical-Cancer/Detailedguide/cervical-cancer-key-statistics](http://www.cancer.org/Cancer/Cervical-Cancer/Detailedguide/cervical-cancer-key-statistics). Revisado el 16 de diciembre del 2010. Última consulta: 31 de enero del 2011.
13. Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002; 89:183-190.
14. Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Integrated humanpapillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 886-91.
15. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76: 41-7.
16. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. MulticentricCervical Cancer Study Group.Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359(9312): 1093-101.
17. Castellsague X, Munoz N. cofactors in human papillomavirus carcinogenesis role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 20-8.
18. Palacio LS, Rangel G, Hernandez M, Lazcano E. Cervical cáncer a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in México. *Salud Pública Mex* 2003; 45: S376-S387.
19. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1):12-9.
20. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jan 13;88(1):63-73.

21. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27.
22. Bernard, H. U. (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* **32** (Suppl. 1), S1–S6.
23. Munger, K., Howley, P.M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*.2002. 89, 213– 228.
24. Hamid NA, Brown C, Gaston K: The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci* 2009, 66:1700-1717.
25. Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M: Papillomavirus DNA replication – from initiation to genomic instability. *Virology* 2009, 384:360-368.
26. Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods*. 2009 Jun;158(1-2):180-3. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.01.005. Epub 2009 Jan 31.
27. Bhattacharjee B, Sengupta S. HPV16 E2 gene disruption and polymorphisms of E2 and LCR: some significant associations with cervical cancer in Indian women. *Gynecol Oncol*. 2006 Feb;100(2):372-8.
28. Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol*. 2009 Mar;83(5):2067-74.
29. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*. 2004 Jan;50(1-2):9-19.
30. Patterson, N. A., Smith, J. L. and Ozbun, M. A. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J. Virol*. 2005: **79**, 6838–6847.
31. Spartz, H., Lehr, E., Zhang, B., Roman, A. & Brown, D. R. Progression from productive infection to integration and oncogenic transformation in human papillomavirus type 59-immortalized foreskin keratinocytes. *Virology* (2005). **336**, 11–25.
32. Jo H, Weon Kim J. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Therapy* 2005. Vol 3, 419-434.

33. Modis, Y., Trus, B. L. and Harrison, S. C. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* (2002) **21**, 4754–4762.
34. McLaughlin-Drubin ME, Mu'ninger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* (2009);143(2): 195–208.
35. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology* (2009);20;384(2): 324–34.
36. Goodwin EC, DiMaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2000) 7;97(23): 12513–8.
37. Goodwin EC, Yang E, Lee CJ, Lee HW, DiMaio D, Hwang ES. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2000) Sep 26;97(20): 10978–83.
38. Cardeal LB, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, di Loreto C, Longatto Filho A, Villa LL, Maria-Engler SS. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS One.* 2012;7(3):e33585. doi: 10.1371.
39. da Silva Cardeal LB, Brohem CA, Corrêa TC, Winnischofer SM, Nakano F, Boccardo E, Villa LL, Sogayar MC, Maria-Engler SS. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochem Cell Biol.* 2006 ;84(5):713-9.
40. Nambaru L, Meenakumari B, Swaminathan R, Rajkumar T. Prognostic significance of HPV physical status and integration sites in cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009 Jul-Sep;10(3):355-60.
41. Baehrecke EH. miRNAs: micro managers of programmed cell death. *Curr Biol.* 2003 Jun 17;13(12):R473-5.
42. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 2004. 2;303(5654):83-6.
43. Johnston RJ, Hobert O. A microRNAs controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2003 Dec 18; 426(6968): 845-9.
44. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003 Oct: 1(12):882-91.

45. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 2003 Feb 15;17(4):438-42.
46. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell.* 1990 Apr;2(4):279-289.
47. Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet.* 2002;36:489-519.
48. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001 Oct 26;294(5543):853-8.
49. Peralta-Zaragoza, O., Bermúdez- Morales, V., & Madrid- Marina, V. «RNA de interferencia: biogénesis, mecanismos moleculares y sus aplicaciones en cáncer cervical.» (*Revista de Investigación Clínica*) 62 (2010): 63-80.
50. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):231-5.
51. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):235-40.
52. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 2004 Jan 2;303(5654):95-8.
53. Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* 2006 Apr 1;20(7):759-71.
54. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA.* 2008 Jan 30;299(4):425-36.
55. Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans.* 2009 Aug;37(Pt 4):918-25.
56. Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K, Iba H. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a

- double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol.* 2008 May 2;378(3):492-504.
57. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
  58. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2257-61.
  59. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004 Dec;10(12):1957-66.
  60. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature.* 2010 Sep 2;467(7311):86-90.
  61. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol.* 2008 Sep;28(17):5369-80.
  62. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6029-33.
  63. Eisenberg I, Hochner H, Sadeh M, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S. Establishment of the genomic structure and identification of thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human RECK gene. *Cytogenet Genome Res.* 2002;97(1-2):58-61.
  64. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J.* 2004 Mar 15;378(Pt 3):705-16.
  65. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990 May 15;265(14):7709-12.
  66. Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitauro Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13221-6.

67. Fisher JF, Mobashery S. Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Mar;25(1):115-36.
68. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):52-67.
69. Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, Xiao S, Lu H. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest.* 2008 Dec;88(12):1358-66.
70. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell.* 2001 Dec 14;107(6):789-800.
71. Clark JC, Thomas DM, Choong PF, Dass CR. RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec;26(3-4):675-83.
72. De la O, F. (2011). Análisis funcional del microRNA humano miR-21 en la expresión del gen *PTEN* en células cervicales tumorales humanas transformadas por VPH 16. Tesis de maestría no publicada. INSP, Cuernavaca Morelos.
73. Deftereos G, Corrie SR, Feng Q, Morihara J, Stern J, Hawes SE, Kiviat NB. Expression of mir-21 and mir-143 in cervical spe143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer. *PLoS One.* 2011;6(12):e28423. doi: 10.1371.
74. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Apr;6(4):259-69.
75. Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulyk ML, Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell.* 2010 Aug 27;39(4):493-506.
76. Ouellet DL, Perron MP, Gobeil LA, Plante P, Provost P. MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006(4):69616.
77. Nagata Y, Shimizu E, Hibio N, Ui-Tei K. Fluctuation of Global Gene Expression by Endogenous miRNA Response to the Introduction of an Exogenous miRNA. *Int J Mol Sci.* 2013 May 27;14(6):11171-89.

78. Zhao Y, Jian W, Gao W, Zheng YX, Wang YK, Zhou ZQ, Zhang H, Wang CJ. RNAi silencing of c-Myc inhibits cell migration, invasion, and proliferation in HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line: c-Myc silencing in hepatocellular carcinoma cell. *Cancer Cell Int.* 2013 Mar 8;13(1):23. doi: 10.1186/1475-2867-13-23.
79. Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, Okawa K, Kitayama H, Takahashi C, Sato C, Noda M. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem.* 2009 Feb 6;284(6):3461-9.