

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA SECUENCIA AP-1 EN EL PROMOTOR DE MIR-21 EN CÉLULAS CERVICALES TUMORALES HUMANAS TRANSFORMADAS CON HPV

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD CON
CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

PRESENTA EL:

Q.F.B. EDUARDO DANIEL RODRÍGUEZ AGUILAR

COMITÉ DE TESIS:

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

**ASESORES:
DR. VÍCTOR HUGO BERMÚDEZ MORALES
DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA**

Dedicatoria

Más allá de mi propia vida esperaré tu encuentro.

Más allá del mismo tiempo y la eternidad habré de encontrarme contigo.

Más intenso que el calor del sol será el momento de nuestro encuentro.

Con tus caricias sentiré que nunca te has ido, que sólo fue una pesadilla en una noche de lágrimas.

Sé que en el trascender de mis años llegará el momento exacto en donde al estar frente a ti volveré a tocar tu rostro,

sentiré el respirar de tu aliento sin miedo a volver a perderlo.

Más allá del cielo azul será nuestro encuentro.

Estaré contigo de nuevo

En el abrazo perfecto

sin miedos, sin angustias, ya no nos separaremos

Tu voz en mis oídos, tus caricias en mi cara, tus besos en mi mejilla,

nieto y abuelita como siempre juntos,

y para jamás perdernos.

Padre desde mi planeta y en la noche del tiempo yo te quiero rezar,

por mi abuelita, que en el cielo está.

Dile que la quiero, que la echo de menos,

dile que la extraño, que algún día nos veremos.

Dale un besito, y dile que su nieto, no se olvida de ella,

dile que en mi corazoncito siempre la llevaré y que nunca la olvidaré.

Para ti abuelita estés donde estés,

tu nieto no se olvida de ti,

porque fuiste una mama para mí,

porque fue muy fácil quererte pero es muy difícil olvidarte.

Un beso de tu nieto que no te olvida.

Para mis abuelas que son mis Ángeles, a ellas les dedico este triunfo.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a:

A Dios misericordioso, por permitirme a lo largo de mi vida caminar por la senda del saber.

A ALICIA AGUILAR MÁRQUEZ, con el afecto, gratitud y admiración que siento hacia ella, por sus enseñanzas, y por su confianza en mí; gracias por ser mi madre.

A mi familia, que sin el regalo incondicional de su apoyo y amor que de ellos recibo, posiblemente nunca hubiera perseverado en mi esfuerzo.

A mi novia Jumara Martínez Barranca, por su entusiasta motivación y su constante apoyo en la realización de éste trabajo, así como en mi vida personal, mil gracias.

Agradezco a cada uno de los miembros del jurado de tesis: Dr. Oscar Peralta Zaragoza, Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales y Dra. Angélica Meneses Acosta, por sus valiosas recomendaciones para esta tesis.

A mis compañeros, amigos que se convirtieron en mi familia, gracias por todo su apoyo.

No quisiera omitir mis agradecimientos a todas y cada una de las personas que me brindaron su apoyo de alguna u otra manera y que fueron decisivas en algún momento durante la realización de esta tesis y de mi vida. A todas ellas y sin excepción alguna, muchas gracias.

Finalmente le agradezco al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) por haberme permitido incorporarme a un programa de postgrado (Maestría en Ciencias de la Salud Ciencias Biomédicas). Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento obtenido con número de becario 277439, y por la obtención de una beca de postgrado para maestría con número de expediente 432007.

Resumen

Antecedentes. Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes, endógenas y conservadas evolutivamente de alrededor de 22 nt de largo que funcionan como reguladores post-transcripcionales; los cuales actúan sobre los RNA mensajeros y reprimen su traducción, por lo que tienen influencia sobre diversas funciones celulares como la regulación del desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis. Estudios de expresión génica en muestras de tumores y células cancerosas mostraron que el microRNA humano 21 (miR-21) se encuentra sobre expresado en al menos seis tipos de tumores sólidos, lo que sugiere fuertemente su función en la progresión de neoplasias. La regulación del promotor de miR-21 es controlada por AP-1, PU.1, el complejo SWI / SNF y δ EF1. Se ha demostrado BMP-6 reprime la expresión de miR-21 al inhibir la unión de las proteínas de la familia AP-1 y δ EF1 al promotor de miR-21. **Objetivo.** Analizar el efecto regulatorio de las secuencias AP-1 sobre la activación del promotor de miR-21 en células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV. **Metodología.** Se generaron plásmidos reporteros con diferentes delecciones de los elementos de respuesta a los factores de transcripción AP-1 del promotor de miR-21 y se evaluó la actividad del gen reportero de Luciferasa en las líneas celulares HeLa, C-33 y HaCat, transfectadas con las diferentes construcciones de plásmidos, para evaluar la funcionalidad de los diferentes sitios AP-1 encontrados en el promotor de miR-21. **Resultados.** Los resultados obtenidos muestran una tendencia de disminución en la actividad del gen reportero con cada delección de los sitios AP-1 del promotor de miR-21 en las líneas celulares HeLa y C-33; en la línea celular HaCat no se observaron cambios. La actividad del gen reportero en la línea celular HeLa no mostró cambios respecto a la línea celular C-33. **Conclusión.** En conclusión nuestros resultados sugieren que los tres sitios AP-1 encontrados en el promotor de miR-21 son funcionales en las líneas celulares HeLa y C-33, donde posiblemente participen en la sobre expresión de miR-21. Además sugieren que la infección por el HPV no es una condición primordial en la activación de estos sitios, como lo es para el proceso neoplásico.

Índice

Introducción.....	6
Hipotesis.....	32
Justificación.....	32
Objetivos.....	33
Material y métodos.....	34
Resultados.....	40
Discusión.....	50
Conclusiones.....	54
Referencias.....	56

Introducción

Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, ocurre en 10% de todos los cánceres y es la tercera neoplasia más diagnosticada en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con unas 300.000 muertes al año. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo y a nivel mundial se presentan cerca de 500 000 casos nuevos cada año a pesar de que la enfermedad podría prevenirse casi por completo gracias a los conocimientos y tecnologías actualmente disponibles. Afecta principalmente a mujeres de bajo nivel socioeconómico, socialmente vulnerables, que no acceden a los servicios de tamizaje. La enfermedad y muerte de estas mujeres tiene consecuencias devastadoras para las condiciones de vida de sus familias, ocasionando la pérdida de trabajo, ingresos, y el ausentismo escolar de los niños del hogar [1].

La evidencia epidemiológica sugiere, desde hace varios años, que el cáncer cervicouterino se comporta como una enfermedad de transmisión sexual por lo que sus factores de riesgo tienden a ser similares a los de este grupo de enfermedades, es decir, el inicio de relaciones a edad temprana, promiscuidad, bajo nivel socioeconómico, paridad, edad del primer parto, inmunosupresión, uso de anticonceptivos orales (ACO), déficit nutricional, tabaquismo y antecedentes de infecciones de transmisión sexual (ITS) provocadas por virus del herpes simple tipo 2, *Chlamydia trachomatis*, virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, ninguno de estos factores de riesgo puede originar CaCu, sino es junto a una infección persistente por el virus del papiloma humano (HPV) [2].

Cáncer cervicouterino y HPV

Los virus oncogénicos desempeñan un papel etiológico de gran importancia en varios de los tumores malignos que afectan al hombre. Los estudios moleculares han demostrado la relación entre las células intraepiteliales y escamosas de cérvix con numerosas infecciones inducidas por los virus Epstein Barr, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), herpes virus tipo II (VSH-2), citomegalovirus (CMV) y particularmente por el Virus de Papiloma Humano (HPV). Observaciones clínicas y estudios moleculares han permitido establecer un importante papel del HPV en el origen de las lesiones preinvasivas de cuello uterino. Desde hace casi 30 años se sugirió que el HPV era el agente causal del cáncer de cérvix uterino [2]. Esta hipótesis le concedió el Premio Nobel en 2009 al profesor Harald Zur Hausen. Actualmente se ha establecido que la infección persistente por tipos oncogénicos de HPV es la causa necesaria del cáncer de cérvix. Mediante múltiples estudios epidemiológicos, moleculares y clínicos se ha demostrado que esta neoplasia es una secuela de una infección no resuelta de ciertos genotipos de HPV [3]. Se ha podido demostrar que este virus es el agente desencadenante de más del 95% de los casos de cáncer cervical y las lesiones cervicales de alto grado. El HPV ha sido considerado un factor importante en el origen y evolución de las lesiones premalignas del CaCu sin embargo, la exposición al virus no es suficiente para originar o causar una neoplasia intraepitelial cervical [4].

Virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano, pertenece a la familia Papillomaviridae, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV) [5]. Basado en el análisis de secuencia de DNA, se han reconocido más de 100 genotipos de HPV que causan un diverso rango de lesiones epiteliales. Estos genotipos también han sido clasificados epidemiológicamente de acuerdo a su asociación con la aparición de lesiones malignas en el cuello uterino, donde se catalogaron a 15 genotipos como de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) [6].

La partícula del virus papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral. El genoma del HPV consiste de una molécula de DNA circular de doble cadena, de aproximadamente 7200 pares de bases. Se divide en tres regiones: una región de transcripción temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la replicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular. Una región de transcripción tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales (L1 y L2), además de una región reguladora que no se transcribe conocida como región larga de control LCR (Long Control Region), que contiene la secuencia de DNA que permite el control de la replicación y de la expresión del genoma viral [7].

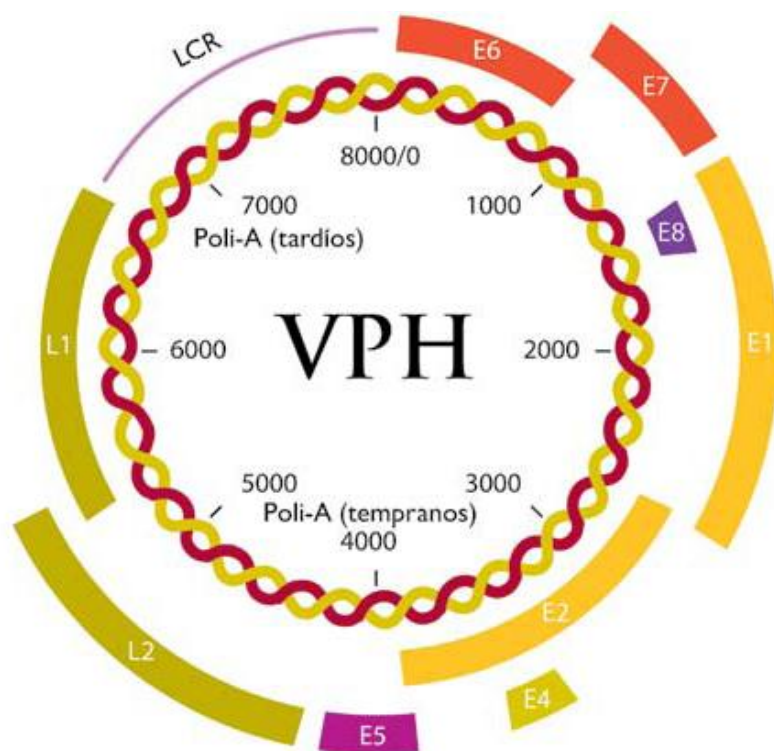


Figura 1. Organización del Genoma del HPV. El genoma del HPV es una molécula de ADN circular de doble cadena. Se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR), que no tiene marco de marco de lectura alguno; la región de expresión temprana, que contiene a los genes E1 a E8; y la región de expresión tardía que contiene a los genes L1 y L2. López Saavedra y Lizano Soberón [4].

Región E1 del HPV

El gen E1 es el más grande y de los más conservados de los HPV, presenta 2 Kb de secuencia y de 67.5 a 76.2 KDa. La proteína se divide en tres regiones: un dominio amino terminal, que se sospecha regula las actividades de E1 residentes en el C-terminal, pues es blanco de una serie de fosforilaciones que influyen positiva o negativamente en la función; una región espaciadora de longitud variable y una región carboxilo terminal más grande, relacionada en función a las ATPasas y helicasas. E1 es una 3' → 5' helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del ADN viral. E1 se une al origen de replicación, en una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T que se halla en la LCR, formando hexámeros y dobles hexámeros. El hexámero rodea al ADN de modo que el sustrato pasa a través del centro del anillo hexamérico [8]. La unión de E1 al sitio de origen causa una curvatura, vital para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación y para las primeras etapas de desenrollamiento de la doble hélice (Figura 2) [9].

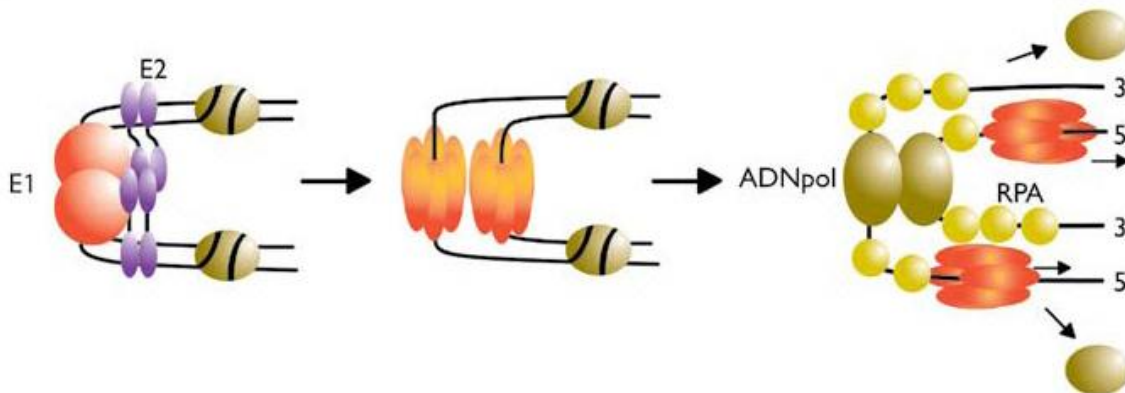


Figura 2. E1, E2 y la replicación del DNA viral. E1 es una 3'-5' helicasa hexamérica dependiente de ATP. Se une a su sitio en la LCR para formar hexámeros. E1 interacciona con la ADN polimerasa α mientras que esta necesita de las proteínas de replicación A (RPA) que estabilizan la cadena sencilla del dúplex abierto, para que se realice la replicación. Sin embargo la afinidad de E1 por su sitio de unión en la LCR depende de su acoplamiento con el dominio N-terminal de E2. López Saavedra y Lizano Soberón [4].

Región E2 del HPV

El producto del gen E2, de aproximadamente 1100 pb, es una proteína nuclear de 45 kDa. Se divide en tres dominios funcionales, el primero, en el extremo amino terminal, es el dominio de activación (E2TAD), responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. Promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes, provocando una curvatura en la molécula de ADN y otros cambios conformacionales (Figura 3) [10]. El segundo dominio es el de bisagra o dominio central, de longitud y secuencia más variables entre los HPV. En el subtipo 11 es importante para regular la función de E2 durante la transcripción del ARNm y la replicación viral, además que le da estabilidad al complejo E2 - ADN. El tercer dominio, en el extremo carboxilo terminal, es de dimerización y de unión al ADN, de casi 100 aminoácidos E2 se une al palíndromo de 12 pb ACCgNNNNcGGT, llamado el sitio de unión de E2 (E2BS), que sufre un cambio de conformación al unirse a la proteína. La región NNNN se llama espaciadora, su longitud es conservada entre los diferentes tipos de HPV pero la secuencia varía con el genotipo viral. El genoma de los HPV-AR contiene 4 sitios E2BS ubicados en la LCR, que están localizados en el extremo 5' del promotor viral que regula la expresión de los genes tempranos. La unión de E2 al ADN provoca la represión o activación de dicho promotor y la replicación del ADN viral. A su vez, estas funciones dependen de la concentración intracelular de E2, así como del sitio, de los cuatro existentes, al que se haya unido. La unión al sitio más próximo del promotor, BS1, no solo interfiere con la unión de TBP a la caja TATA, sino también afecta la estabilidad del complejo de pre inicio de la transcripción una vez que TBP ya se unió a su sitio. La unión a los sitios BS2 y BS3 también contribuye a la represión del promotor compitiendo con factores de transcripción como SP1. La unión a BS3 es necesaria para la replicación viral. E2 es más afín a BS4 y la unión a este sitio regula positivamente la expresión génica, aunque los mecanismos para que se lleve a cabo no son del todo claros. E2 puede también activar al complejo de preinicio de la transcripción e influye en el remodelaje de la cromatina [11].

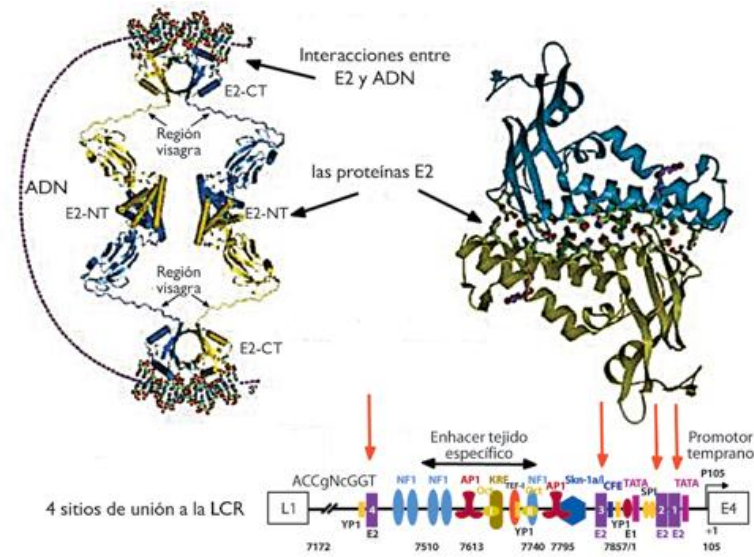


Figura 3. Interacción de E2 con la LCR. E2 se une al genoma de los VP-AR que contiene 4 sitios de unión a E2 (E2BS) ubicados en la LCR. La unión de E2 a su sitio promueve la oligomerización e interacción entre moléculas E2 unidas al ADN en sitios distantes, lo que provoca una curvatura en la molécula de ADN y otros cambios conformacionales. López Saavedra y Lizano Soberón. [4].

Región E4 del HPV

La secuencia codificante de E4 es de aproximadamente 260 pb, está contenida dentro del marco de lectura de E2. La proteína E4, posee de 10 a 44 kDa, se expresa a partir de un ARNm procesado de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del ADN viral. La expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza en parte en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma (IF) durante las LSIL causadas por VPH 16, pero también se halla de manera difusa en regiones perinucleares y citoplasmáticas. E4 causa el colapso de dichas queratinas y esto se ha relacionado con la liberación de los viriones. E1⁺E4 de HPV16 causa arresto en la fase G2 del ciclo celular cuando se expresa en células HeLa y SiHa. Esto sugiere un papel antagónico con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como el requerimiento de E1⁺E4 y E2 para inhibir la división celular durante el ciclo viral [12].

ONCOGEN E5 DEL HPV

El gen viral E5 es, aproximadamente 230 a 250 pb, codifica para una proteína de 90 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa. Es una proteína de membrana e hidrofóbica que se halla principalmente en el retículo endoplásmico y Golgi, pero también en la membrana citoplasmática [13]. La función principal de la proteína E5 es formar complejos y sobre regular la actividad de los receptores de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGFR) o el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) [14]. También se ha identificado que E5 del HPV-16 une a la subunidad de 16 KDa de la ATPasa vacuolar. La ATPasa es un complejo proteico, de unión a membrana, cuya subunidad de 16 KDa forma el poro por el que pasan los iones H^+ que acidifican el contenido de los endosomas. Se sabe que E5 del HPV-16 inhibe la acidificación de los endosomas, lo que resulta en la retención del receptor, en la prolongación de su señal activa y en el reciclaje del 40% de los receptores para anclarse de nuevo en la superficie en ausencia del ligando [15].

En un modelo murino transfectado con el gen E5, se ha observado aumento en la expresión de c-Fos y c-Jun, en especial en presencia de EGF. La LCR de los HPVs tiene sitios de unión a AP-1 y en presencia de E5 aumenta la actividad transcripcional del promotor en células NIH3T3 que expresan E5, influyendo así en la producción de los mensajeros tempranos. Dado que el EGF es necesario en la fase G1 del ciclo celular, se sugiere que la actividad de E5 estimula a las células a través de esta fase y en la fase S del ciclo celular [16].

Si E5 inhibe la acidificación de los endosomas en queratinocitos normales humanos (HFK), podría también afectar la interacción de los péptidos antigénicos con las moléculas del MHC-II, disminuyendo el reconocimiento de los queratinocitos infectados [17].

ONCOGEN E6 DEL HPV

El oncogén E6, de entre 450 y 500 pb, codifica para una proteína de aproximadamente 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. El oncogén E6 es uno de los primeros que se expresan durante el ciclo viral y tiene la capacidad de unirse a una gran cantidad de blancos celulares, lo que le permite bloquear la apoptosis, regular la transcripción viral, abatir la diferenciación celular y las interacciones célula-célula, e incrementar la inestabilidad cromosómica [18]. La oncoproteína E6 puede activar la telomerasa, una ribonucleoproteína con función enzimática, importante para el mantenimiento de las estructuras teloméricas contenidas al final de los cromosomas. La actividad de la subunidad catalítica de la transcriptasa reversa de la telomerasa (hTERT), se presenta en más del 90% de las células immortalizadas y cancerosas, pero está ausente en las células somáticas normales [19]. La oncoproteína E6 se une a la proteína celular p53 y la conduce a su degradación a través de la vía de la ubiquitina. En este proceso, también participa la proteína celular asociada a E6 (E6-AP), que actúa como una ubiquitin ligasa [20]. Las mutantes de E6-AP incapaces de unirse a E6 no pueden interactuar con p53 y las proteínas mutantes de p53 que no se unen a E6, no son susceptibles a la degradación inducida por E6-AP, lo que sugiere que E6 es requerida para mediar la interacción p53/E6-AP. E6 al unirse a p53 también puede producir su retención en el citoplasma, bloqueando su translocación hacia el núcleo y por tanto inhibiendo su función, independiente del proceso de degradación [21]. La oncoproteína E6, también ha sido implicada en la prevención de apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de p53. E6, es capaz de unirse a Bak (un miembro pro apoptótico de la familia Bcl-2) a través de un mecanismo independiente de p53 y degradándolo muy probablemente por su reclutamiento, por medio de la proteína E6-AP vía ubiquitinación. Estudios bioquímicos, han revelado que Bak puede unirse a E6-AP en ausencia de E6, a diferencia de p53 [22]. La oncoproteína E6 por si sola tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares, pero coopera con la proteína E7 para tener una plena capacidad de transformación e immortalización celular.

ONCOGEN E7 DEL HPV

El oncogén E7, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica para una proteína de aproximadamente de 100 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa. La oncoproteína E7, puede unirse con la forma hipofosforilada de pRb, e induce su degradación. La inactivación de pRb induce la activación constitutiva del factor de transcripción E2F, el cual induce la transcripción de genes involucrados en la síntesis de DNA, durante la fase S del ciclo celular. El mecanismo por el cual, la oncoproteína E7 induce la degradación de pRb aún no ha sido completamente dilucidado, sin embargo, algunos estudios han demostrado que la actividad de E7, está mediada por la proteasa de cisteínas activada por calcio, llamada calpaina, la cual es reclutada por E7, antes de unirse a pRb [23].

La oncoproteína E7, posee otras funciones independientes de pRb, como su unión a miembros de la familia de factores de transcripción AP-1, como c-jun, junB, junD y c-fos, todos ellos, cruciales en las vías de señalización relacionadas con proceso mitogénico y de diferenciación celular. La oncoproteína E7 se une a c-jun y activa a su promotor por un mecanismo de transactivación. El efecto de E7 en la progresión del ciclo celular vía factores de transcripción AP-1, puede ser independiente de pRb o dependiente de este. El mecanismo dependiente de pRb, se presenta por que el promotor de c-jun, contiene sitios AP-1, que son regulados por el complejo pRb/c-Jun. La unión de c-jun a los sitios AP-1 a través de pRb, produce la activación de promotores inducidos por c-jun. En presencia de E7, este mecanismo de activación de la transcripción, es inhibido. El mecanismo de acción de E7 independiente de pRb, consiste en la unión de esta oncoproteína a c-jun, lo cual potencia la transactivación de genes involucrados en la progresión del ciclo celular y la mitosis [24].

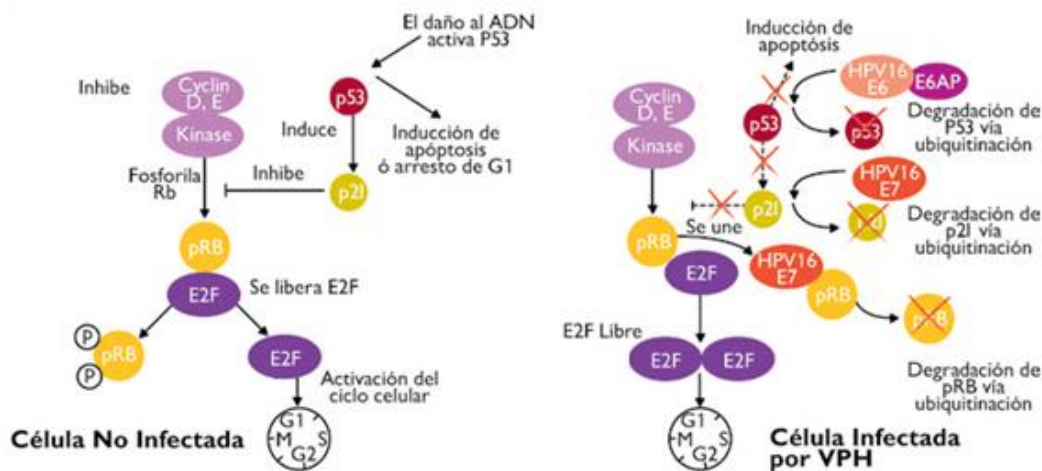
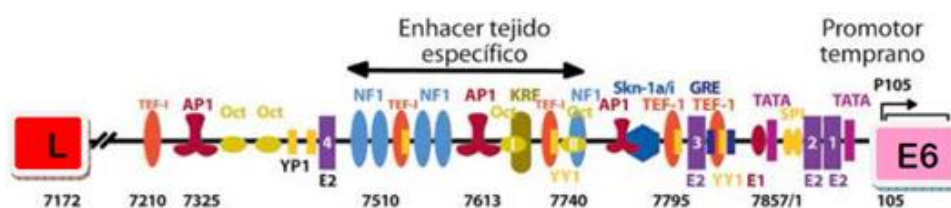


Figura 4. Efecto de la interacción entre las oncoproteínas virales E6 y E7 con las proteínas celulares involucradas en el control del ciclo celular. Las proteínas virales promueven la proliferación e inhiben la apoptosis a través de la degradación de p53 y pRB, vía ubiquitinación. Tomada y modificada de López Saavedra y Lizano Soberón [4].

Proteínas L1 Y L2 del HPV

La proteína L2 posee 43 a 53 kDa, representando la menor proporción de la cápside viral, que junto a L1, se producen en células que expresan E4. La proteína mayoritaria L1, de 57 kDa conforma cerca del 80 % de la cápside y se expresa después de L2. La cápside está constituida por 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia promonocítica (PML) durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del ADN viral y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento [25].

La región larga de control (LCR) es un segmento genómico, que no contiene marco de lectura alguno, por el contrario posee numerosos elementos de respuesta en cis que regulan la expresión génica y la replicación viral. Numerosos factores, celulares y virales, interaccionan con esta región, ejemplo de ello son las proteínas virales E1 y E2, las cuales modulan la actividad transcripcional y la replicación del virus; componentes de la maquinaria basal de transcripción como SP1 y TBP; receptores de glucocorticoides que modulan positivamente la transcripción, así como otros factores que parecen intervenir en la especificidad por el tejido como KRF, Skn – 1a/i, TEF, AP1, etc. [26]. El promotor temprano, responsable de la transcripción de los oncogenes virales, es activo en células de tejido de cáncer cervical o en los queratinocitos de la piel. Sin embargo, no es activo en las células epiteliales del hígado (HepG2) o del seno (MCF7). Esta especificidad por el tejido, no muy común en muchos virus, corresponde al amplificador transcripcional o enhancer [27].



16

Ciclo viral del HPV

La infección por el HPV ocurre cuando las partículas infecciosas del virus entran a las células basales en el epitelio cervical estratificado a través de una micro lesión que puede ocurrir en condiciones donde la piel tenga algún micro trauma. Para los HPVs de alto riesgo como el HPV-16, la formación de lesiones cervicales se facilita por la infección de células columnares que después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación. No se ha identificado un receptor de membrana definido para la entrada del virus, aunque el complejo integrina $\alpha 6 - \beta 4$ se ha propuesto como candidato. Además se ha visto que la entrada depende de la presencia de los proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana citoplasmática, que podrían ser el lugar de unión inicial previo a la unión con el receptor [28, 29].

La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina. El desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, lo que permitiría el transporte del DNA viral al núcleo celular [30].

Una vez que el genoma viral se encuentra en el núcleo se expresan las proteínas E1 y E2 para mantener su genoma episomal en bajo número de copias, 10 a 200 por célula, y además facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral, para lo que se requiere la expresión de las proteínas E6 y E7 del HPV que estimulan el progreso de la fase de ciclo celular de la fase G1 a la fase S [31].

La expresión de E6 y E7, de un RNAm bicistrónico bajo el control del promotor temprano en la LCR, evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que esta migra al estrato supra basal del epitelio. Estas proteínas retardan la diferenciación celular y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables del control del ciclo celular [32].

Para que se produzcan viriones infecciosos, el virus debe amplificar su genoma y empaquetarlo en la partícula proteica. Esto ocurre en las capas superiores del epitelio, en el estrato espinoso, donde aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío en el genoma viral y que es dependiente de la diferenciación celular. Este promotor se halla en el marco de lectura del gen E7 y promueve la transcripción de proteínas involucradas en la replicación del DNA viral, tales como E1, E2, E4 y E5, así como las constituyentes de la cápside, L1 y L2. Para la replicación viral se necesita que E2 se una a la LCR y que promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral. El ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman de la capa superior de este. El virus del papiloma humano no es lítico y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye a la salida del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina [33].

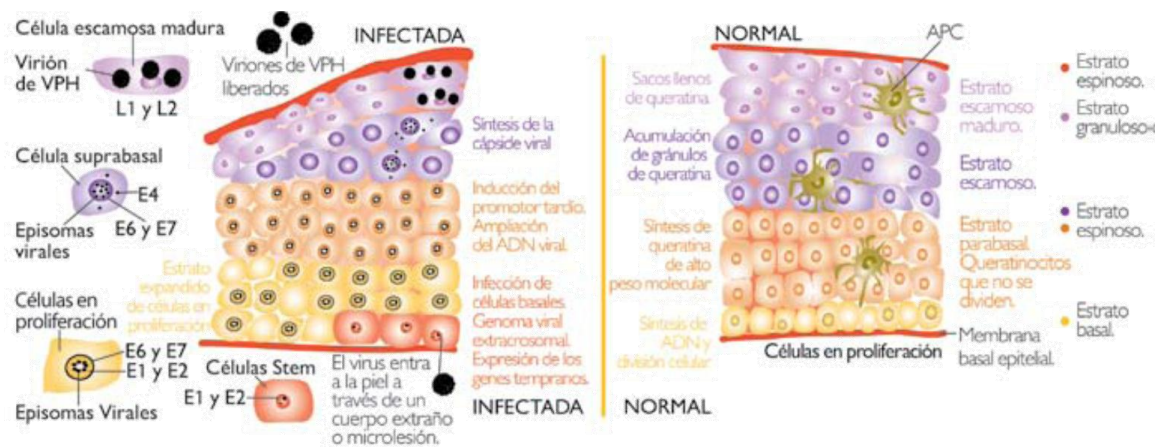


Figura 6. Ciclo viral en el epitelio estratificado. Arquitectura de la célula epitelial estratificada del cérvix y expresión de las proteínas virales después de la infección. Las células germinales normales se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente a través del epitelio sin división posterior (derecha). Después de que el HPV infecta estas células de la membrana basal (izquierda), se expresan las proteínas tempranas. Bajo la influencia de estas proteínas, las células que están en división se expanden verticalmente y la diferenciación celular es retrasada e incompleta. Las proteínas virales se expresan secuencialmente con la diferenciación y los viriones se producen en las capas superiores del epitelio. Las células presentadoras de antígenos intraepiteliales (APC) son abatidas en una célula infectada por HPV. López Saavedra y Lizano Soberón [4].

MicroRNAs

Como ya se mencionó, la infección por HPV en las células cervicales altera una gran cantidad de procesos celulares mediante la expresión de las proteínas de fase temprana (principalmente E6 y E7), y uno de los procesos que se han visto afectados durante la progresión del cáncer cervicouterino es el transcriptoma celular, y en consecuencia la expresión de los microRNAs [34].

Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes, endógenas y conservadas evolutivamente de alrededor de 22 nt de largo que funcionan como reguladores post-transcripcionales; que actúan sobre los RNAm reprimiendo la traducción por lo que tienen influencia sobre diversas funciones celulares como la regulación del desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis [35].

Los primeros indicios de la existencia de los microRNA datan de los años 80, gracias al grupo de Rich Jorgensen que trabajaba en la modificación del color de flores de petunia. La estrategia experimental consistía en introducir en la planta, una copia extra del gen codificante de la enzima chalcona sintasa, que participa en la producción de pigmentos de antocianina, los cuales le proporcionan el color púrpura a las flores. Así al sobre-expresar este gen, se esperaba obtener petunias de color púrpura más intenso, sin embargo todas las plantas obtenidas tenían flores blancas, el color natural cuando no se producen pigmentos de antocianina. La introducción de una copia extra del gen que codifica para la chalcona sintasa parecía inhibir el gen endógeno de la planta, resultando en flores blancas. Estos hallazgos fueron publicados con el término de co-supresión [36]. Un fenómeno similar fue descrito por Romano et al, que trabajaban en el hongo *Neurospora crassa* y fue denominado “quelling”. Experimentos realizados por varios grupos habían demostrado para entonces que la supresión era un fenómeno que ocurría a nivel postranscripcional, por lo que se denominó a este fenómeno Silenciamiento de Genes Postranscripcional o PTGS (“Post Transcriptional Gene Silencing”) [37].

Los primeros microRNAs endógenos, lin-4 y let7, fueron descubiertos a través de análisis por cribado genético (“genetic screening”) en poblaciones de *C. elegans*, donde observaron que las mutaciones en ambos genes afectaban al tiempo de desarrollo de los individuos que las portaban [38], [39].

La reciente introducción de la tecnología de secuenciación masiva ha permitido el análisis simultáneo de millones de secuencias. Esto permite el descubrimiento, no solo de nuevos miRNAs, sino de otras moléculas pequeñas de RNAs con funciones específicas pero basadas en la generación y dinámica de RNA de doble cadena. Entre ellos se han descrito: piRNAs [40], endo-siRNAs [41], snoRNAs [42] y TSSa-RNAs (pequeños RNAs que se localizan en regiones de origen de la transcripción en células de mamíferos) [43].

Organización genómica de los microRNAs.

Los microRNAs se originan a partir de moléculas precursoras de tamaño variable, doble cadena y bucles a modo de horquilla, capaces de originar RNA con estructuras secundarias. Aproximadamente el 80% de los genes de microRNAs se encuentran localizados en regiones intrónicas del genoma, y el 20% restante se distribuyen en regiones exónicas y regiones intergénicas. Alrededor de la mitad se encuentran formando parte de familias (microRNAs que comparten la secuencia de nucleótidos que se une a la región 3'UTR del RNA mensajero diana, conocida como región semilla o “seed”) o grupos génicos (“clusters” de microRNAs) formados por microRNAs localizados en la misma región dentro del genoma, transcritos en forma de policistrones primarios como una larga cadena de RNA [44].

Sin embargo, no todos los miembros de un mismo grupo o familia de microRNAs se expresan al mismo nivel, lo que sugiere que estos microRNAs pueden ser procesados y/o modificados de manera específica y postranscripcionalmente. Al compartir la totalidad o parte de la región “seed”, los miembros de una misma familia de microRNAs son potenciales reguladores del mismo conjunto de mRNAs [45].

Biogénesis de microRNAs

El microRNA primario de aproximadamente 1 kb, es inicialmente transcrito por la RNA polimerasa II a partir de una región no codificante o un gen microRNA. Un pri-miRNA regularmente contiene la secuencia de diferentes microRNAs y es caracterizado por una horquilla imperfecta de bases apareadas. Esta horquilla es reconocida por una RNasa III nuclear denominada Drosha que junto a una proteína denominada DGCR8 corta el pri-miRNA en RNA de doble cadena, formando un RNA de aproximadamente 70 nucleótidos con una estructura de horquilla y con dos nucleótidos sin aparearse en la región 3', denominado pre-microRNA. El cual, una vez reconocido por la exportina 5 y una Ran-GTPasa, el pre-miRNA es transportado del núcleo al citoplasma (Figura 7) [46].

En el citoplasma, el pre-miRNA es cortado por una proteína llamada Dicer, la cual reconoce RNA de doble cadena, generando un microRNA de doble cadena de aproximadamente 22 nucleótidos. La cadena termodinámicamente más estable (generalmente la de 3' a 5') funciona como un microRNA maduro, el cuál se agrega a un complejo de ribonucleoproteínas denominado RISC. Este complejo RISC está compuesto por una familia de proteínas llamadas Argonautas (AGO), las cuáles reconocen al mRNA blanco, que será reconocido por el microRNA maduro por complementariedad total o parcial [47].

En humanos, se han reconocido a cuatro proteínas AGO, pero solo AGO2 es capaz de cortar al mRNA blanco. Las cuatro proteínas AGO tienen dominios conservados característicos, un N terminal, MID (Amino de en medio), PAZ (Zwile Piwi Argonauta) y un dominio PIWI. El dominio PAZ reconoce al microRNA maduro y lo incorpora al complejo RISC. El dominio PIWI presenta un sitio conservado para la unión de la región 5' del mRNA y actividad de endonucleasa. Se ha observado que la asociación del complejo RISC con el microRNA unido a su mRNA blanco, puede inhibir la traducción, evitando la unión de los ribosomas al mRNA. Por otro lado, el complejo RISC contiene proteínas reguladoras como GW182, la cual es una proteína que interactúa con las proteínas AGO, reclutando al complejo de desadenilación hacia el dúplex de microRNA-mRNA.

El complejo de desadenilación llamado CCR4-NOT, tiene la capacidad de quitar el la cola de poli(A) del extremo 3' de los mRNAs blanco, lo que representa la primera etapa de la degradación de los mRNA en los denominados P-bodies en el citoplasma [48].

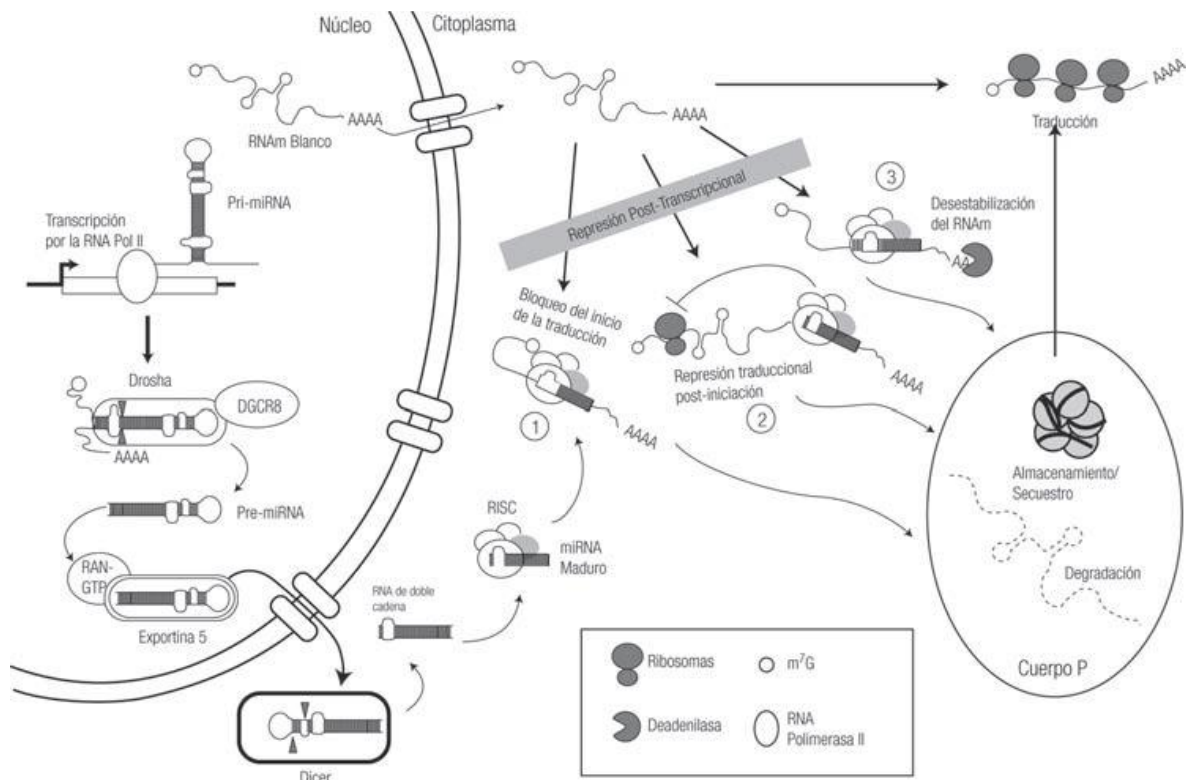


Figura 7. Biogénesis de los miRNA y mecanismos de regulación de expresión génica. Los miRNA se generan a partir de un precursor (pre-miRNA), que a su vez se genera a partir de un transcrito primario (pri-miRNA). Los mecanismos utilizados por los miRNA para silenciar la expresión génica incluyen: a) inhibición al inicio de la traducción; b) represión traduccional pos-inicio, y c) desestabilización del RNAm blanco a través de un proceso de desadenilación. Lugo Trampe [49].

Regulación de la biogénesis de microRNAs.

La regulación de la biogénesis de microRNAs puede ocurrir a tres niveles: a) durante la transcripción, b) por medio del fenómeno de la edición de moléculas de dsRNA y c) durante los procesamientos por el complejo Drosha/Dgcr8 y por Dicer.

- a) La transcripción es controlada mediante factores que regulan la producción de pri-microRNAs, que a su vez son específicos del tipo celular, del proceso de desarrollo en que se encuentren las células y de la respuesta de las células a diferentes estímulos. Por ejemplo, factores de transcripción específicos de células troncales embrionarias como Sox2 y Nanog, regulan promotores de genes de microRNA, siendo estos microRNAs preferencialmente expresados en células troncales embrionarias [50].

Otro ejemplo asociado a estrés celular se produce tras el inicio del daño en el DNA, P53 activa la transcripción del pri-microRNA-34 (pri-microRNA policistrónico que contiene varios miRNAs de la familia miR-34) y la expresión de los microRNAs de la familia del miR-34 induce la parada del ciclo celular [51].

Por otra parte la metilación de secuencias promotoras del genoma puede afectar a la expresión de los genes de microRNA del mismo modo que afecta al resto de genes de un organismo. Algunos microRNAs actúan como supresores de tumores y se han observado patrones de hipermetilación de estos microRNAs en líneas celulares cancerosas [52].

- b) El fenómeno de “edición” de miRNAs genera modificaciones a nivel de la secuencia de nucleótidos de las moléculas precursoras de miRNAs, aumentando la diversidad de formas maduras originadas a partir de un mismo gen de miRNA. La desaminación de nucleótidos de adenina, transforman estas bases púricas en inosinas, que son reconocidas por la maquinaria celular como guaninas, modificándose el apareamiento de bases de las moléculas

precursoras de miRNAs que sufren la edición. En dicho mecanismo, participan las proteínas de la familia ADAR. Las Adenosinas Desaminasas que actúan sobre dsRNA (ADAR) son una familia de proteínas capaces de modificar la secuencia de nucleótidos de las moléculas precursoras de miRNAs [53].

Los cambios introducidos a nivel de secuencia pueden afectar tanto a nivel del procesamiento de las moléculas precursoras durante la biogénesis de miRNAs, como a nivel del reconocimiento del miRNA y el mRNA objeto de la regulación. Un ejemplo de esto es la edición del pri-microRNA-142, la cual parece interferir en su posterior procesamiento por el complejo Drosha/Dgcr8, provocando una reducción de la expresión de las formas maduras miR-142-3p y miR-142-5p [54]. Un caso parecido se observó en el procesamiento de las moléculas precursoras del miRNA-151 en cerebro [55].

- c) También la actividad del complejo microprocesador y de Dicer puede ser modulada durante la biogénesis de miRNAs concretos. Por ejemplo, la ribonucleoproteína hnRNPA1 (“heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1”) se une a la horquilla del pri-microRNA-18a facilitando su procesamiento por delante del resto de los miRNAs de su mismo grupo (grupo miR-17-92) [56]. La activación de la proteína Erk puede fosforilar a Trbp (proteína que forma un complejo con Dicer para el procesamiento de los pre-microRNAs), estabilizando la unión Trbp/Dicer y aumentando la eficiencia del procesamiento de pre-microRNAs [57].

Las perturbaciones en la regulación de la biogénesis de los microRNAs, se han asociado con una creciente gama de tipos de cáncer. Informes recientes muestran una fuerte evidencia de que los microRNAs son moléculas clave que participan en la iniciación y progresión del cáncer [58].

MICRORNA HUMANO miR-21

Se ha demostrado que la infección por HPV en las células cervicales altera una gran cantidad de procesos celulares mediante la expresión de las oncoproteínas virales de fase temprana (principalmente E6 y E7), y uno de los procesos que se han visto afectados durante la progresión del cáncer cervicouterino es la expresión de los microRNAs, donde se ha encontrado que el microRNA humano miR-21 es el más abundantemente expresado (Acceso NC_000017 en GeneBank y MI0000077 de miRBase) [59].

La primera indicación de la expresión aberrante de miR-21 se detectó en un perfil de miRNAs de glioblastoma humano (GBM). Donde miR-21 se encontró sobre expresado fuertemente en todas las muestras de glioma de alto grado analizadas. Incrementos similares en la expresión de miR-21 se han encontrado en seis líneas celulares derivadas de GBM comúnmente usadas como modelo, un hallazgo importante ya que los tumores GBM y los de las líneas celulares son extremadamente diversas genéticamente, con un gran número de genes supresores de tumores y proto-oncogenes frecuentemente mutados, y ningún marcador genético común fue identificado antes del descubrimiento de miR-21. En la mayoría de los casos, la sobre expresión concomitante del miRNA precursor de 72-nt (pre-miR-21) también fue evidente en los Northern blots. El estudio donde se detectó la sobre expresión de miR-21 en glioma se realizó al medir, mediante micro arreglos, los niveles de expresión de miR-21 en glioma y compararlos con una variedad de controles que incluyen adulto tejidos humanos y de cerebro de ratón no neoplásicos (corteza y materia blanca), fetos humanos y tejido de cerebro de ratón en múltiples etapas de desarrollo, neuronas y astrocitos de rata. Todos estos controles mostraron ya sea trazas o ninguna expresión de miR-21 en comparación con las muestras de glioma [60].

En un perfil a gran escala de la expresión de miRNAs en 540 muestras humanas derivadas de 363 especímenes que representan seis tipos de tumores sólidos y 177 respectivos tejidos normales de control [61], miR-21 fue el único miRNA sobre expresado en todos los tipos de los tumores analizados , incluyendo el de mama,

colon, pulmón, páncreas, próstata y estómago. Estudios adicionales demostraron elevada miR-21 expresión en carcinomas hepatocelulares [62], el cáncer gástrico [63], el cáncer de ovario [64], carcinoma cervical [65], líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello [66] y carcinoma papilar de tiroides [67]. Generalmente, los niveles de expresión de miR-21 son también muy altos en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de diversos orígenes, y en algunas líneas celulares representa hasta el 15-25% del microRNA celular [68]. Por lo tanto, la sobre expresión de miR-21 puede ser una característica general de las células tumorales.

La forma madura de miR-21 está perfectamente conservada en los mamíferos, y está codificada por un solo gen. El gen de miR-21 en humano está relativamente bien caracterizado y mapeado en el cromosoma 17q23.2, donde se superpone con el gen que codifica para la proteína VMP1 (TMEM49), un homólogo humano de la de la proteína de membrana vacuolar de rata [69].

La amplificación de la región cromosómica 17q se asocia con varios cánceres, incluyendo cáncer de mama [70] y el cáncer de próstata [71], y se produce en aproximadamente el 50% de los casos de meduloblastoma [72]. Sin embargo, el locus genómico que codifica a miR-21 no se encuentra amplificado en la mayoría de los cánceres, incluyendo aquellos que expresan niveles muy altos de miR-21, tales como glioblastoma y leucemia linfocítica crónica [73, 74]. Del mismo modo, no hay evidencia actual de asociación entre la región cromosómica 17q y GBM, aunque la amplificación de 17q23 es frecuente y predictiva en neuroblastomas [75], uno de los pocos tipos de cáncer "atípicos" con bajos niveles de miR-21.

El gen de miR-21 se encuentra en el sitio frágil FRA17B dentro de la región cromosómica 17q23.2, que es uno de los loci de integración de HPV16 [76]. Se sabe que la integración de HPV en el genoma de la célula huésped puede causar alteraciones genéticas y epigenéticas. La infección con VPH 16 o 18 es un factor de riesgo importante para desarrollar cáncer cervical, y los sitios frágiles comunes son objetivos preferentes para integraciones HPV16 en los tumores de cuello uterino [77]. La sobre expresión de miR-21 en el carcinoma de cuello uterino, puede estar asociada con la integración HPV16 o 18, sin embargo miR-21 también

se ha encontrado sobre expresado en líneas celulares de cáncer cervical negativas a la infección por HPV (C-33) [78].

En conjunto, no existe una correlación clara entre la amplificación del locus genómico de miR-21 y su elevada expresión en el cáncer, lo que sugiere que la desregulación de la expresión de este microRNA se produce, ya sea en la transcripción, el nivel post-transcripcional o ambos.

Regulación génica de miR-21

La primera descripción de una región reguladora de miR-21 fue reportada por Cai et al. Este promotor, fue mapeado de -3403 a -2395 Kb río arriba del pre-miR-21, fue constitutivamente activo en 293 estudios de genes reporteros en células de riñón embrionarias. El análisis de la secuencia reveló la presencia de un elemento de control de la transcripción denominado caja "CCAAT", pero no se identificó una caja "TATA" en la ubicación esperada ~ 25 pb del sitio de inicio de la transcripción [79].

Loffler et al analizaron una región promotora muy similar que se extiende -3,565 a -2,415 río arriba del pre-miR-21 [80]. En este estudio se confirmó la actividad del promotor de miR21 por ensayos de genes reporteros y se identificó que IL-6 incrementa su actividad mediante STAT3. En un reciente estudio más completo Fujita et al utilizaron un algoritmo informático para identificar un promotor independiente y conservado en el intrón 10 del TMEM49. Este promotor se denominó específicamente como miPPR-21. Este enfoque de la bioinformática se restringió a 100 Kb río arriba del microRNA y se encontró que la secuencia está altamente conservada entre los vertebrados, así como la presencia de los elementos básicos del promotor para la RNA Pol II (cajas TATA, CCAAT y GC). Fujita et al aplicaron matrices de TRANSFAC para analizar miPPR-21 y se asignan varios elementos potenciadores conservados incluyendo sitios de unión para la proteína de activación 1 (AP-1), Ets/PU.1, C/EBP, NFI, SRF, p53 y STAT3 [69].

El promotor miPPR-21 (-3,770 a -3337 en relación al pre-miR-21), muestra una mínima superposición con el promotor reportado por Cai y reside dentro del intrón 10 de TMEM49 [79]. En una serie de experimentos utilizando plásmidos de genes reporteros con miPPR-21 completo y varias formas truncadas, Fujita et al confirmaron la región como un promotor y demostraron la actividad de los tres elementos de la AP-1 y dos Ets/PU.1 después del tratamiento con PMA. En un estudio realizado por Ozsolak et al, utilizaron mapeo de nucleosoma combinado con las firmas de la cromatina para descifrar la posición de los promotores de varios microRNAs. Ellos identificaron y analizaron la actividad transcripcional de 4 regiones río arriba del pre-miR-21. Dos de ellas eran muy similares a los promotores descritos por Cai y Fujita. Al comparar estos promotores, se observó una inducción superior con la región promotora identificada por Fujita (miPPR-21) en comparación con Cai. Curiosamente, Ozsolak reportó que el promotor descrito por Cai fue activo en células HeLa, aunque el mismo promotor no fue capaz de inducir la transcripción en una línea celular de melanoma. Por lo tanto, estas evidencias sugieren que puede haber especificidad de linaje de células para la regulación transcripcional del promotor de miR21 [81].

Los primeros estudios sobre la regulación de miR-21 revelaron que las parejas IL-6/STAT3 y forbol12-miristato13-acetato (PMA)/AP-1, son inductores eficaces de la expresión de miR-21. Los informes adicionales han identificado reguladores alternativos para este microRNA, por ejemplo a través de la inducción de Ras, ERK1/2, EGFR y el receptor de estrógeno. En contraposición, también se ha reportado que la expresión de miR-21 es suprimida por NFI, C/EBP, Gfi1 y el receptor de estrógeno. Algunas de estas vías han sido bien caracterizadas a través de estudios de ChiP y plásmidos con genes reporteros, mientras que otros estudios han reportado niveles de expresión alterados de miR-21 [69].

La regulación del promotor de miR-21 es controlada por AP-1, PU.1, el complejo SWI/SNF y δ EF1. BMP-6 reprime la expresión de miR-21 al inhibir la expresión y la unión de AP-1 y δ EF1 en el promotor de miR-21. c-Jun y c-Fos son los

principales reguladores del promotor de miR-21 entre los miembros de la familia AP-1 después de la estimulación con PMA [82].

Dentro de la secuencia consenso para el promotor de miR-21 se han identificado varios elementos potenciadores conservados incluyendo sitios de unión para el factor de transcripción AP-1 (Figura 8). El factor de transcripción AP-1 está formado por un dímero de proteínas pertenecientes a las familias Jun (c-Jun, v-Jun, JunB y JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1 y Fra2) o ATF (ATF2 y ATF3) capaces de unirse a una secuencia consenso de DNA denominada TRE (TPA response element, TGACTCA). La transformación oncogénica se asocia frecuentemente con el aumento de la actividad endógena de AP-1 a través de varias vías de transducción de señal, y la sobre activación de AP-1 contribuye fuertemente al potencial oncogénico [83].

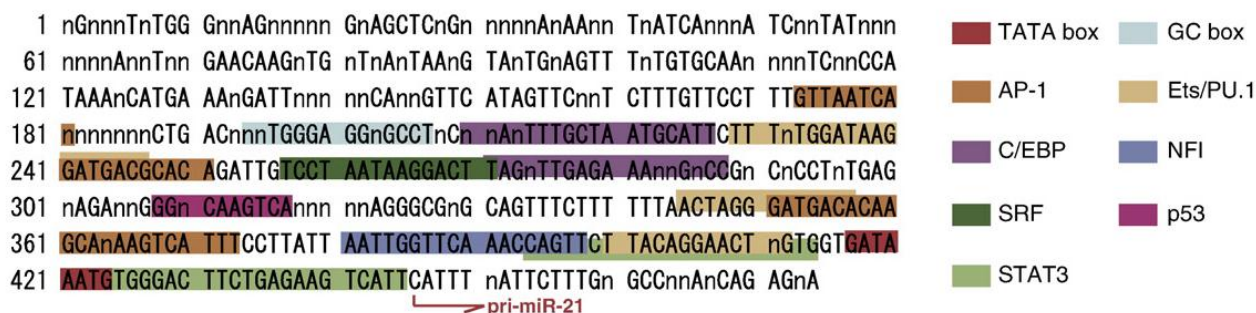


Figura 8. La secuencia de consenso de la región promotora putativa de miR-21. Las Bases conservadas a través de los vertebrados se muestran en mayúsculas y las bases no conservadas o supresiones se indican con 'n'. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción de pri-miR-21. Las regiones conservadas de diversos factores de transcripción se indican con diferentes colores [69].

EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL AP-1

El factor de transcripción AP-1 (Activator protein 1) es un complejo dimérico que comprende miembros de las familias de proteínas JUN, FOS, ATF (Activating Transcription Factor) y MAF (Musculoaponeurotic fibrosarcoma). El complejo puede por ello formarse a partir de diferentes combinaciones de heterodímeros y homodímeros, y es dicha combinación la que determina el conjunto de genes regulados por AP-1 [84].

Las proteínas AP-1 se conocen como proteínas básicas de cremalleras de leucina (bZip) porque dimerizan a través de un motivo de cremalleras de leucina y contienen un dominio básico para la interacción con el esqueleto del ADN. La estructura canónica del dímero consiste en dos hélices α paralelas que forman una espiral dentro de otra espiral. La característica típica de esta estructura es la repetición periódica de una leucina cada siete residuos en cada una de las hélices α . En el dímero las leucinas de ambas proteínas se alinean e interaccionan mediante puentes hidrofóbicos y los puentes salinos son los que estabilizan la interacción [85].

Las proteínas AP-1 más importantes en mamíferos son c-Jun y c-Fos. Éstas proteínas, fueron en un principio identificadas como oncoproteínas virales v-Jun y v-Fos en el virus del sarcoma aviar 17 y en el virus del osteosarcoma Finkel-Biskis-Jinkis, respectivamente [86]. C-Jun presenta un homólogo en levaduras, la proteína Gcn4, que puede también formar dímeros para regular la expresión génica en este caso de enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos. La secuencia a la que se une AP-1 es TGA(C/G)TCA, muy similar a la de GCN4, ATGA(C/G)TCAT. Gcn4 y AP-1 reconocen el mismo elemento de respuesta en el ADN, el elemento TRE (TPA Response Element) llamado así porque su expresión es fuertemente inducida por el promotor de tumores 12-Otetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Este elemento se identificó por primera vez en el promotor del gen de la metalotioneína I y en el virus de mono 40 (SV40) [87]. Pero además de los promotores de tumores, la unión del complejo AP-1 a la secuencia TRE del ADN también es inducida por factores de crecimiento, citoquinas y oncoproteínas, los

cuales están relacionados con procesos de proliferación, supervivencia, diferenciación y transformación celular [87].

Con respecto a c-Fos, aunque ya en 1984 se había descrito que la expresión de c-fos era inducida de manera rápida y transitoria por factores de crecimiento, no fue incluida en la familia hasta 1988 cuando se demostró que la proteína c-Fos se unía a secuencias reguladoras que coincidían con las del factor AP-1, y posteriormente que c-Fos y otras proteínas relacionadas se unían formando dímeros con Jun, JunB y JunD. Así, se pudo comprobar la existencia de dos familias de genes: la familia jun, formada por c-jun, junB y junD; y la familia fos, que incluye a c-fos, fosB, fra-1 y fra-2. El factor AP-1 está compuesto por homodímeros formados por dos moléculas de la familia Jun o heterodímeros formados por una proteína de la familia Fos y otra de la familia de Jun. No se forman dímeros entre proteínas de la familia Fos [88].

Además de unirse a las secuencias ya mencionadas, existe un heterodímero entre c-Jun y otro factor de transcripción llamado ATF2 que es capaz de unirse a otra secuencia muy similar, TGACGTCA, análoga al elemento de respuesta que media la inducción de genes por el AMP cíclico denominado CRE (Cyclic AMP Response Element). Esto relaciona a c-Jun con la acción de múltiples hormonas que actúan elevando los niveles de este segundo mensajero en las células [89].

Dentro del conjunto de genes regulados por AP-1 destacan, los de proteínas fundamentales para el crecimiento celular como oncogenes (los mismos genes c-jun y c-fos), genes supresores de tumores, genes de proteasas implicadas en invasividad, en la respuesta inflamatoria (colagenasa I, estromelisin), genes de factores angiogénicos (VEGF), citoquinas y otros factores reguladores del sistema inmune, lo que hace que AP-1 sea un factor clave en la aparición y/o progresión de cánceres [87]. De aquí la importancia de estudios sobre la regulación de miR-21 a través del factor de transcripción AP-1, los cuales pueden ayudar al entendimiento de los mecanismos mediante los cuales miR-21 se encuentra sobre expresado, en células cervicales tumorales humanas transformadas por HPV.

HIPOTESIS

La expresión de mir-21 es regulada por los elementos de respuesta AP-1 presentes en el promotor de miR-21 en células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV.

Justificación

La expresión aberrante de los microRNAs en células de distintos tipos de cáncer sugiere su participación en la pérdida de control del ciclo celular. En las células de cáncer cervical se ha determinado la expresión alterada de muchos microRNAs en comparación con el tejido del cuello uterino normal, donde se encontró a miR-21 como el microRNA más abundantemente expresado. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de miR-21 en células de cáncer cervical, pueden ayudar a tener un mejor conocimiento de cómo los microRNAs influyen en el proceso de carcinogénesis cervical, y de cómo el proceso neoplásico puede afectar la expresión de los microRNAs. El microRNA humano miR-21 está involucrado en la vía de regulación global conocida como RNA de interferencia. Estudios funcionales han demostrado que miR-21 puede funcionar como un oncomiR y, en consecuencia, los perfiles de sobre expresión de miR-21 se han observado en cáncer cervicouterino y otros tipos de cáncer. Sin embargo, las vías de regulación transcripcional ascendentes que controlan la expresión de este microRNA mediadas por factores de transcripción están en estudio en la actualidad. Dentro de la secuencia consenso para el promotor de miR-21 se han identificado varios elementos potenciadores conservados incluyendo sitios de unión para el factor de transcripción AP-1. Aumentos en la actividad de dicho factor de transcripción se ha visto asociado a la transformación oncogénica. Por lo tanto, estudios sobre la regulación de miR-21 a través del factor de transcripción AP-1, ayudaran al entendimiento de los mecanismos mediante los cuales miR-21 se encuentra sobre expresado, en células cervicales tumorales humanas transformadas por HPV.

Objetivos

General:

Analizar el efecto regulatorio de las secuencias AP-1 sobre la activación del promotor de miR-21 en células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV.

➤ Objetivos específicos

1. Generar plásmidos reporteros con diferentes fragmentos del promotor de miR-21 que contengan 1, 2 y 3 secuencias AP-1.
2. Analizar la funcionalidad de los plásmidos reporteros generados en las líneas celulares HeLa (HPV18+), C-33 A (HPV-) y HaCat (queratinocitos humanos normales).
3. Correlacionar la actividad del gen reportero de luciferasa de cada plásmido con la funcionalidad de los diferentes sitios AP-1 del promotor de miR-21.

Material y métodos

A). GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS REPORTEROS

Células y condiciones de cultivo. Se utilizaron células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV18 (células HeLa), no transformadas por HPV (células C33 A) y queratinocitos normales (HaCat). Las cuales fueron adquiridas del ATCC (ATCC American Type Culture Cells). Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, antibiótico-antimicótico, en una atmósfera de 5% de CO₂, a 37°C, a una densidad celular de 2.5 a 5 x 10⁶ células. Los ensayos de transfección se realizaron con los diferentes plásmidos por lipofección.

Extracción de DNA de células cancerosas

Se crecieron células HeLa en botellas T25 hasta obtener una confluencia del 100%, se despegaron las células con tripsina (60 µl de tripsina/1 ml de PBS 1x), se centrifugaron en un tubo eppendorff a 2500-3000 rpm/5 min. Se desechó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de reactivo TriPure, se homogenizó en vórtex por 15 segundos, se incubó por 5 min a 4°C, se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezclaron los tubos por inversión (10-15 veces), se incubaron por 5 min a 4°C, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C, y se transfirió la fase acuosa intermedia lechosa blanca a un nuevo tubo, posteriormente se agregaron 500 µl de alcohol al 100%, se incubó a -20°C durante 2 horas, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C y se desechó el sobrenadante, se agregó 1 ml de Citrato de Sodio en Etanol al 10%, se incubó en agitación a temperatura ambiente por 30 min, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante, se resuspendió en 1 ml de Etanol al 75% en H₂O/DEPC, y se mezcló en vórtex por 15 segundos, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante, se secó el DNA con aire seco por 10 min, y se resuspendió en 100 µl de H₂O, se incubó entre 55 y 60°C por 10 min, se cuantificó la concentración de DNA por espectrofotometría y se almacenó a -20°C.

Análisis bioinformático del promotor de miR-21

Se realizó un análisis bioinformático del promotor de miR-21 mediante las bases de datos ncbi (www.ncbi.nlm.nih.gov) [90] y miRBase (www.mirbase.org) [91] para identificar y confirmar los diferentes elementos de respuesta al factor de transcripción AP-1 contenidos en la región promotora de miR-21. Primero se realizó la búsqueda de la localización genómica de miR-21 mediante la base de Datos miRBase, donde se encontró que el gen del microRNA-21 (número de acceso MI0000077) se localiza en la cadena positiva del cromosoma 17q23.2 (55273409 a 55273480) dentro del gen que codifica la proteína TMEM49 (también llamada proteína de membrana vacuolar). A pesar de estar situado en regiones intrónicas de un gen que codifica en la dirección de la transcripción, se encontró que tiene sus propias regiones promotoras y forma un transcrito primario de ~ 3433-nt de largo (conocido como PRI-miR-21) que se transcribe de forma independiente. El precursor tallo-bucle de miR-21 (pre-miR-21) reside entre los nucleótidos 2445 y 2516 del TSS de pri-miR-21. Posteriormente se realizó la búsqueda de sitios AP-1 reportados en el promotor de miR-21 mediante la base de datos del NCBI, donde se encontraron tres sitios AP-1 localizados en las siguientes posiciones respecto al TSS de pri-miR-21, el más alejado de -270 a -262 nt, el siguiente de -202 a -192 nt y el más cercano de -95 a -72 nt.

Obtención de la región promotora de miR-21

La región reguladora del gen humano miR-21 fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir de DNA genómico de células HeLa extraído como previamente se describió. El fragmento de DNA de 474 pb amplificado, contiene 337 pb antes y 119 pb después del TSS del pri-miR-21, además de una secuencia de 9 nt en el extremo 3' que corresponde a la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Kpn I* y otra secuencia de 9 nt en el extremo 5' que corresponde a la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Hind III*. Para la amplificación de este fragmento del promotor de miR-21 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Forward 5'-CGG GGTA CCC TGT GCAAAC TGTCTA CC-3' y Reverse 5'-GCC AAG CTT ACA TGT CTG GGA GAA ACC-3'.

El siguiente fragmento del promotor de miR-21 de 392 pb, contiene 237 pb antes y 137 pb después del TSS del pri-miR-21, además de una secuencia de 9 nt en el extremo 3' que corresponde a la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Kpn I* y otra secuencia de 9 nt en el extremo 5' que corresponde a la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Hind III* (Figura 9). Para la amplificación de este fragmento del promotor de miR-21 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Forward 5'-CGG GGT ACC CTC CCA AGT TTG CTA ATG C-3' y Reverse 5'-GCC AAG CTT CAA AAT CTC TCC CAC CAA C-3'.

El siguiente fragmento del promotor de miR-21 de 302 pb, contiene 147 pb antes y 137 pb después del TSS del pri-miR-21, además de una secuencia de 9 nt en el extremo 3' que corresponde a la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Kpn I* y otra secuencia de 9 nt en el extremo 5' que corresponde a la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Hind III* (Figura 9). Para la amplificación de este fragmento del promotor de miR-21 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Forward 5'-CGG GGT ACC GAG AAG AGG GGA CAA GTC-3' y Reverse 5'-GCC AAG CTT CAA AAT CTC TCC CAC CAA C-3'. El tamaño e integridad de los fragmentos del promotor de miR-21 fue verificada mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa.

Ensayo de PCR para obtención del promotor de MIR21

Para la amplificación de los 3 diferentes tamaños del promotor de miR-21 se utilizó el sistema kapa2g ready mix. Cada 25 µl de reacción contuvo: 5 µl de 2x Kappa Robust ready mix que contiene la Taq Pol, los dNTPs, el buffer de la enzima y el MgCl₂; 1 µl de cebador 5' (Concentración 20pmol/ µl), 1 µl de cebador 3' (Concentración 20pmol/ µl), 1 µl de DMSO (100%), 1 µl de DNA HeLa y 16 µl de Agua. Para el programa del termociclador se utilizaron los siguientes tiempos y temperaturas: 10 min a 95°C para una desnaturalización inicial del DNA, 1 min a 95°C para desnaturalización del DNA (35 ciclos), 1 min a 55°C para el alineamiento de los cebadores (35 ciclos), 1 min a 72°C temperatura optima de funcionamiento de la Taq polimerasa (35 ciclos).

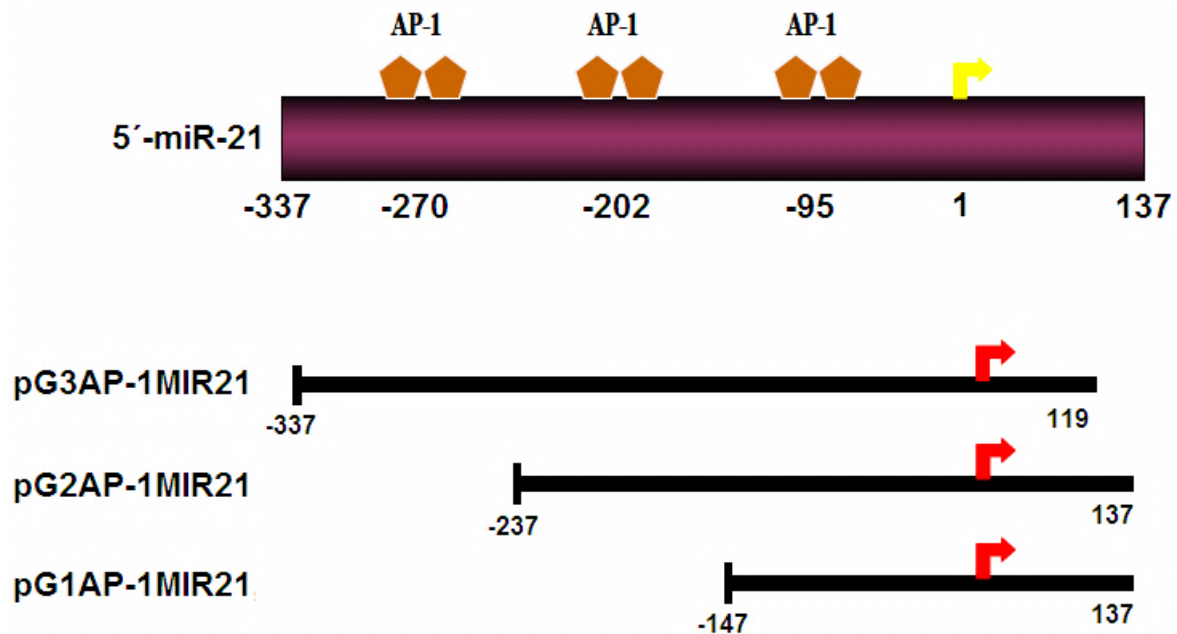


Figura 9. Fragmentos del promotor de miR-21. Se amplificaron 3 regiones del promotor de miR-21, para la construcción de tres plásmidos reporteros (pG3AP-1MIR21, pG2AP-1MIR21 y pG1AP-1MIR21). En pG3AP-1MIR21 se incluyó el fragmento del promotor que contiene los tres sitios AP-1. En pG2AP-1MIR21 se deletó parcialmente el extremo 5' y se respetaron los dos sitios AP-1 más cercanos al sitio de inicio de la transcripción. En pG1AP-1MIR21 deletó nuevamente el extremo 5' y se respetó solo el sitio AP-1 más cercano al sitio de inicio de la transcripción.

Digestión enzimática de pGL2 y de los insertos

Para la digestión enzimática tanto del vector pGL2 Basic, como del inserto (3 productos de PCR que contienen 1,2 y 3 sitios AP1 del promotor de miR21) se utilizaron las enzimas de restricción *Kpn I* y *Hind III*, con la siguiente mezcla de reacción: 2 µl de Fast Digest Buffer, 1 µg de DNA (Vector o inserto), 1 µl de enzima *Kpn I*, 1 µl de enzima *Hind III*, agua suficiente para llevar la reacción a 20 µl para la digestión del vector y 30 µl para la digestión de los insertos. Se incubó a 37°C durante 15 min y posteriormente se inactivaron las enzimas a 85°C durante 5 min.

Reacción de ligación del inserto con el vector

Para la reacción de ligación se utilizó la DNA T4 ligasa y 3 relaciones diferentes entre el vector y el inserto (1:1, 1:3 y 1:5 en relación a la concentración picoMolar del vector vs inserto) con la siguiente mezcla de reacción: 2 µl de buffer, 0.2 pmol de vector (previamente digerido con *Kpn I* y *Hind III*), de acuerdo a la relación 1:1, 1:3 y 1:5 se utilizaron 0.2, 0.6 y 1 pmol de inserto (previamente digerido con *Kpn I* y *Hind III*) respectivamente, 1 µl de DNA T4 ligasa y agua suficiente para llevar la reacción a 20 µl. Se incubó a 22°C durante una hora y se inactivó la ligasa por incubación a 60°C durante 10 min.

Transformación de células competentes

Se agregaron 40 µl de H₂O MQ (estéril) más cada mezcla de ligación en un tubo etiquetado, se agregaron 200 µl de bacterias DH5-α competentes, se incubó 30 min a 4°C, se aplicó un choque térmico de 42°C por 90 segundos, rápidamente se incubó 5 min a 4°C, se agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico, se incubó 1 hora a 37°C, se centrifugó 5 min a 2000 rpm, se extrajeron 800 µl del sobrenadante y se homogenizaron las bacterias en los 200 µl restantes, se transfirieron los 200 µl de bacterias a una placa (etiquetada) con medio LB + Ampicilina [100 µg/µl], se estrió la solución hasta que se homogenizó en la placa y se incubó a 37°C por 24 h. Posteriormente se comprobó la presencia de los diferentes insertos mediante una reacción de PCR de colonias, posterior a esta prueba se realizó la extracción de plásmido por miniprep de las bacterias transformadas y se mandaron a secuenciar los diferentes plásmidos generados.

B). TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS TRANSFORMADAS CON HPV CON LOS PLÁSMIDOS pG1AP-1MIR21, pG2AP-1MIR21 y pG3AP-1MIR21

Transfección de células tumorales por lipofección

Se dejaron crecer entre 150 000 y 200 000 células (HeLa, C-33 o HaCat) en placas de 6 pozos con 2 ml de medio DMEM completo por 2 días hasta tener entre 70-75 % de confluencia, se removió el medio, se lavó cada pozo con 1mL de PBS y se agregaron 2 ml de medio DMEM completo a los pozos. En un tubo Eppendorf se colocaron 10 µl de reactivo para lipofección FuGene® con 250 µl de medio DMEM completo y se incubó por 5 min. En otros tubos Eppendorf se colocaron 0, 3 y 5 µl de plásmido extraído y purificado por el kit de fermentas (midiprep). Transcurrido el tiempo de incubación con el FuGene® con el medio, se mezcló el contenido de los tubos y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min, se tomó el contenido de los tubos, y se incubó por 72 horas.

C). ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LA LUCIFERASA

Ensayo de la luciferasa

Transcurridas las 72 horas de la transfección, se removió el medio de cultivo de las células y se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS 1X, se despegaron las células con un raspador de células, se cuantificaron las células en una cámara de Neubauer, se sembraron 100 000 células en los pozos de la placa para luminómetro, se incubó 4 horas a 37° C. Transcurridas las 4 horas se removió el medio y se agregó el reactivo de luminiscencia, con el que se incubaron las células por 10 min y finalmente se analizó la actividad del gen reportero de luciferasa en el equipo GloMax 20/20 Luminometry System. La actividad de luciferasa fue normalizada con el kit del ensayo de gen reportero para luciferasa Dual-Glo(TM) Luciferase Assay System (Promega). La luminiscencia se normalizó por la medición del vector vacío.

Resultados

GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS REPORTEROS

Obtención de la región promotora del gen humano de miR-21

Con la intención de analizar si los elementos de respuesta al factor de transcripción AP-1 encontrados en el gen de miR-21 son funcionales, y sí la activación de estos elementos de respuesta se ve afectada por la infección del HPV en las células tumorales cervicales; se realizó la obtención de la región promotora del gen humano de miR-21. La secuencia del promotor de miR-21 fue previamente reportada por Fujita et al [69] y se encuentra disponible en la base de datos del GenBankTM/EMBL con número de acceso: NR_029493. A partir de la secuencia del promotor de miR-21, se realizó el diseño de tres pares de oligonucleótidos: El primero para amplificar la región del promotor que contiene 3 sitios AP-1 (sentido de -337 a -320 y antisentido de +102 a +119 respecto al TSS de pri-miR-21), un fragmento de DNA de 474 pb; el segundo para amplificar la región del promotor que contiene 2 sitios AP-1 (sentido de -237 a -220 y antisentido de +119 a +137 respecto al TSS de pri-miR-21), un fragmento de DNA de 392 pb; y el tercero para amplificar la región del promotor que contiene 1 sitio AP-1 (sentido de -147 a -130 y antisentido de +119 a +137 respecto al TSS de pri-miR-21), un fragmento de DNA de 302 pb. Con estos oligonucleótidos se estandarizaron las condiciones de amplificación por PCR y se obtuvieron tres productos de DNA de 474 pb, 392 pb y 302 pb (Figura 10).

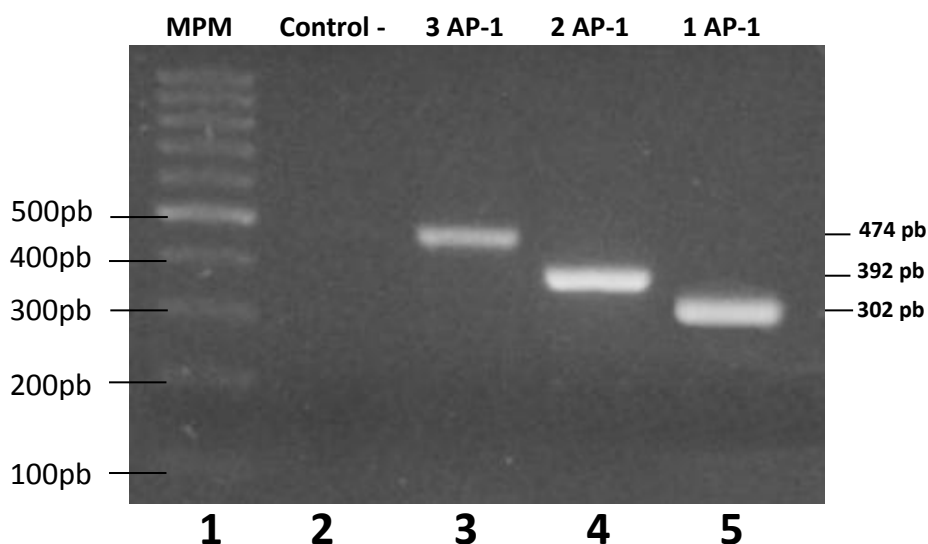


Figura 10. Amplicones obtenidos por PCR para la generación de plásmidos reporteros con 1, 2 y 3 elementos de respuesta en el promotor de miR-21, (Carril 1: Marcador de peso molecular de 500pb, carril 2: Control negativo, carril 3: amplicón que contiene 3 secuencias AP-1, carril 4: amplicón que contiene 2 secuencias AP-1, carril 5: amplicón que contiene 1 secuencia AP-1) Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x.

Clonación de los productos de PCR en el plásmido pGL2 Basic

Con el objetivo de obtener los tres diferentes plásmidos reporteros para evaluar la funcionalidad de los diferentes sitios AP-1 del promotor de miR-21, los productos del PCR de 474 pb, 392 pb y 302 pb se clonaron en la región 5' del gen de luciferasa del plásmido pGL2 Basic. Dicho vector pGL2-basic es un vector reportero de actividad transcripcional, al poseer el gen de la luciferasa de luciérnaga (carente de promotor), inmediatamente después del sitio de clonaje.

Primero el vector pGL2 Basic fue linearizado con la enzima *Kpn I* y *Hind III*, el resultado obtenido muestra la integridad del vector verificada por electroforesis (**Figura 11**).

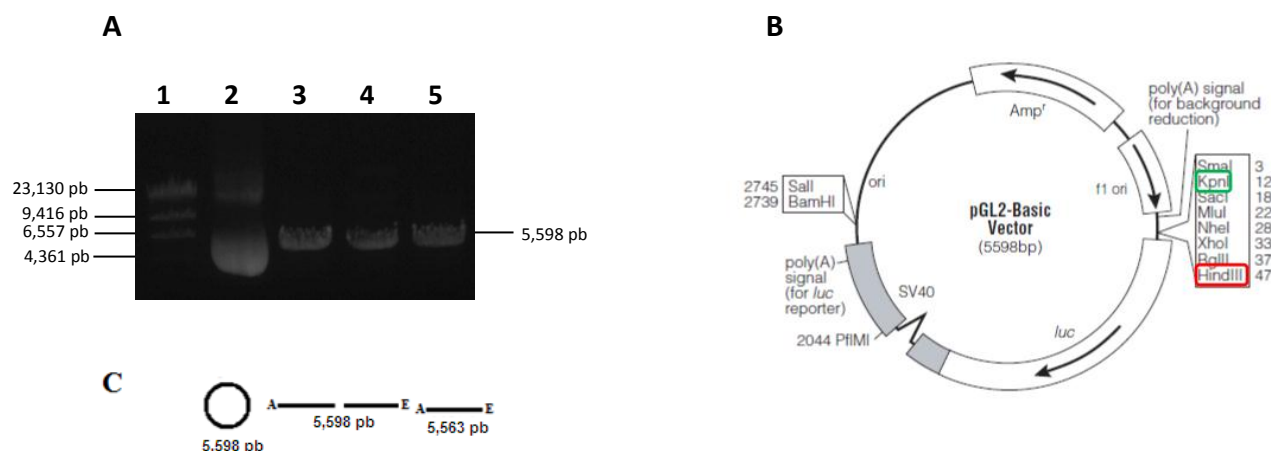


Figura 11. Análisis de la digestión enzimática del vector pGL2 Basic con enzimas de restricción *Kpn I* y *Hind III*. A) Vector no digerido (carril 2), vector digerido con *Kpn I* (carril 3), vector digerido con *Hin III* (carril 4), doble digestión del vector *Kpn I-Hind III* (carril 5). B) Representación esquemática del vector, sitio de clonación con secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción. C) Representación esquemática de productos (pb) obtenidos tras la digestión enzimática.

Una vez linearizado el vector y el inserto se realizaron las reacciones de ligación cuyos productos obtenidos que corresponden a la generación de los plásmidos (pG1AP-1MIR21, pG2AP-1MIR21 y pG3AP-1MIR21), fueron utilizados para transformar bacterias *E. Coli* de la cepa DH5- α calcio competente. Se seleccionaron las clonas positivas con la finalidad de aislarlas en nuevos cultivos y purificar el producto de ligación (pG1AP-1MIR21, pG2AP-1MIR21 y pG3AP-1MIR21) (**Figura 12**). El resultado obtenido mostró el crecimiento de clonas positivas transformadas con los plásmidos pG1AP-1MIR21, pG2AP-1MIR21 y pG3AP-1MIR21 (panel B), identificadas por el marcador de selección (gen de resistencia a la ampicilina). Por lo tanto las bacterias adquirieron la capacidad de crecer sobre medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina en comparación con bacterias no transformadas (panel A).

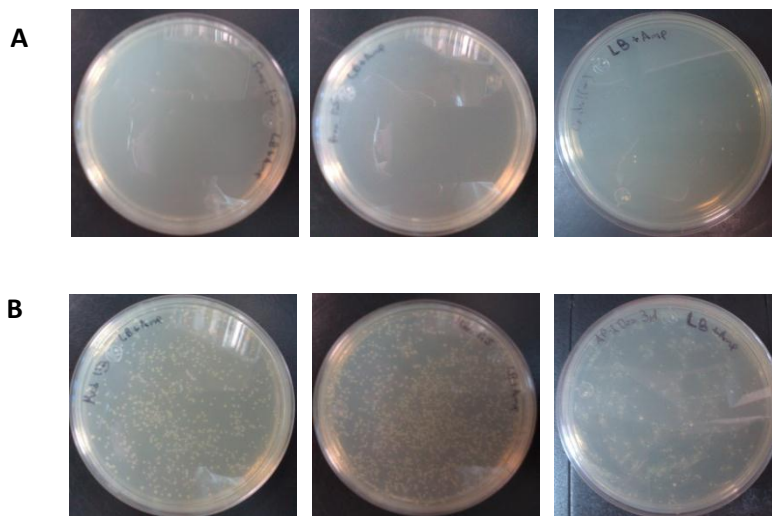


Figura 12. Clonas bacterianas positivas transformadas con las diferentes construcciones. A) Control negativo B) Colonias de bacterias *E. Coli* DH5- α transformadas con los plásmidos: pG1AP-1MIR21, pG2AP-1MIR21 y pG3AP-1MIR21

Con la finalidad de verificar la integridad y clonación exitosa de los plásmidos generados (pG1AP-1MIR21, pG2AP-1MIR21 y pG3AP-1MIR21), a partir de clonas positivas, se realizaron reacciones de PCR con los mismos oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos del promotor de miR-21 (**Figura 13**). Esta prueba resultó positiva para algunas colonias de las bacterias transformadas con las construcciones previamente realizadas. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los plásmidos generados (pG3AP-1MIR21, pG2AP-1MIR21 y pG1AP-1MIR21) contienen el templado de DNA que corresponde a los diferentes fragmentos del promotor de miR-21 con 3, 2 y 1 secuencias AP-1 (**Figura 14**).

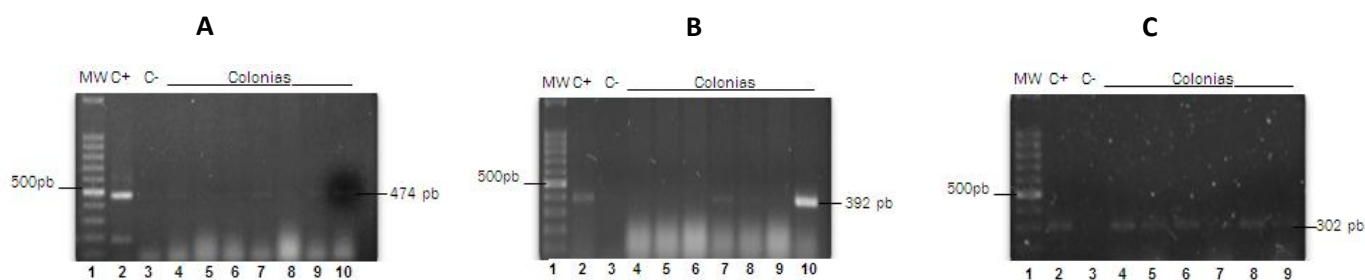


Figura 13. PCR realizado a las colonias transformadas con los tres plásmidos generados. A) Bacterias transformadas con pG3AP-1MIR21 B) Bacterias transformadas con pG2AP-1MIR21 C) Bacterias transformadas con pG1AP-1MIR21.

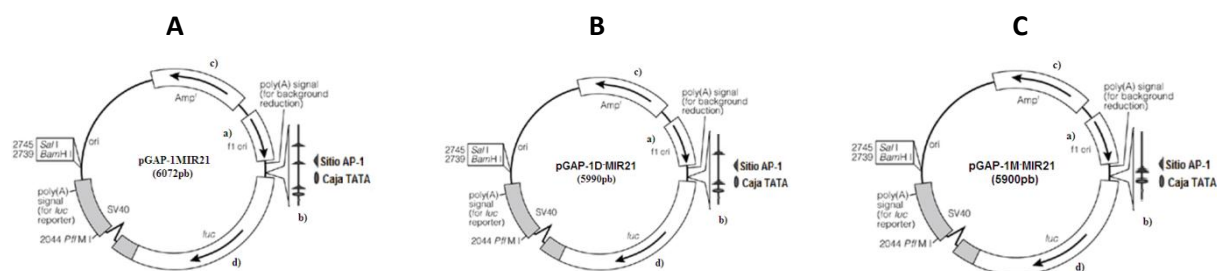


Figura 14. Representación esquemática de los plásmidos generados. A) pG3AP-1MIR21 B) pG2AP-1MIR21 C) pG1AP-1MIR21.

ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN

Con el objetivo de estandarizar las condiciones de transfección para obtener la cantidad de proteína suficiente para los posteriores ensayos de luminiscencia, se realizó una curva de concentración del plásmido y la optimización del tiempo de incubación posterior a la transfección, con las siguientes concentraciones de plásmido; 0, 3, 5 μ g del plásmido pGL2 Basic y pGL2 Control en células HeLa a una confluencia de 70-75%, en un tiempo de incubación post-transfección de 24, 48 y 72 h. Los resultados muestran que no existe toxicidad evidente en las células HeLa a las 24, 48 o 72 h posteriores a la transfección con 5 μ g del plásmido pGL2 Basic y pGL2 Control (**Figura 15**).

Una vez revisada la inocuidad de la transfección, se realizaron ensayos de luminiscencia para las siguientes condiciones de transfección: 0, 3, 5 μ g del plásmido pGL2 Basic y pGL2 Control en células HeLa a una confluencia de 70-75% en un tiempo de incubación de 48 y 72 h. El efecto más evidente se observó a las 72 horas posteriores a la transfección con 5 μ g del plásmido pGL2 Control, al comparar su actividad de luciferasa con la de las células HeLa sin transfectar (control) o con las células ensayadas 48 h posteriores a la transfección (**Figura 15**).

De acuerdo a estos resultados concluimos que el tiempo y cantidad de plásmido apropiados para alcanzar la producción de luciferasa que nos permita observar diferencias entre la actividad de las construcciones con diferentes fragmentos del promotor de miR-21, fueron realizar la transfección con 5 μ g de plásmido, durante 72 h de incubación, por lo que se decidió utilizar estas condiciones de transfección para los posteriores ensayos de funcionalidad.

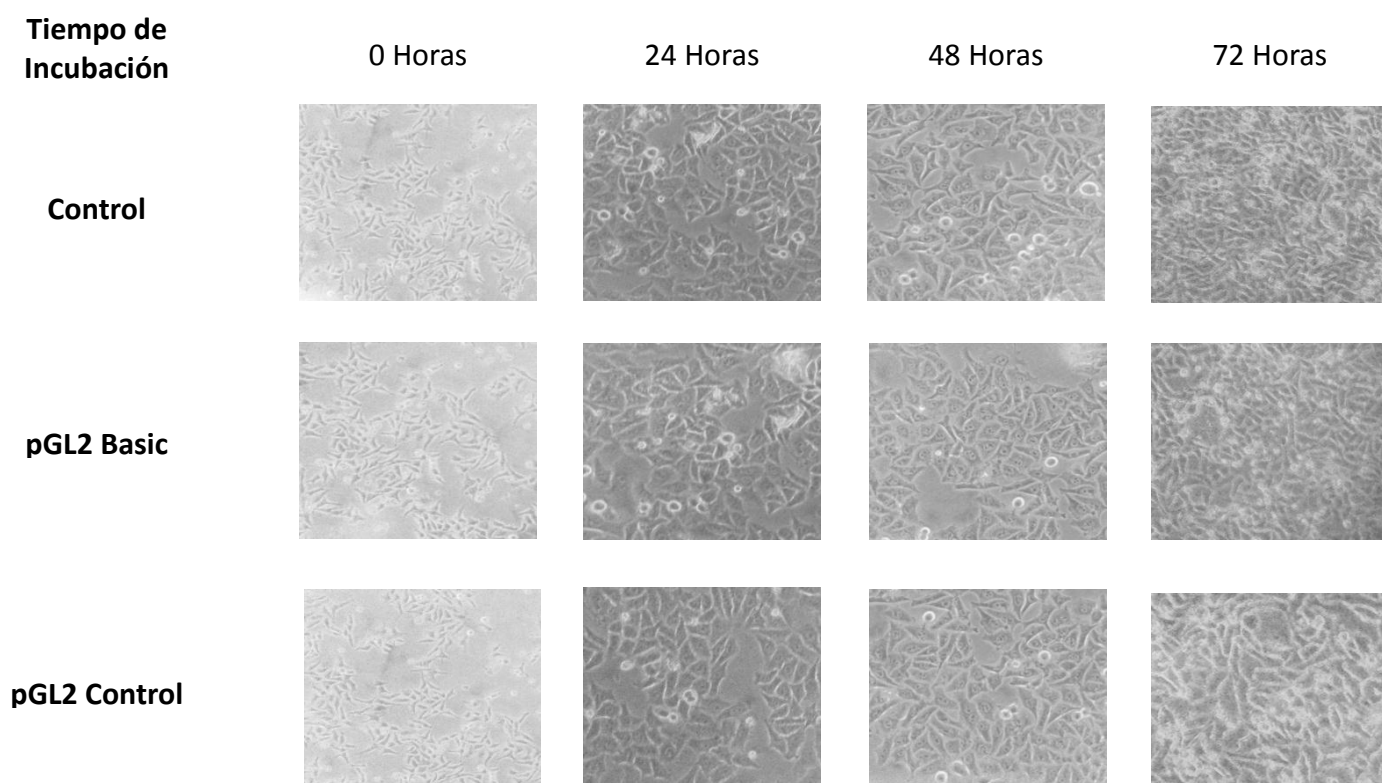


Figura 15. Micrografía de Células HeLa transfectadas con el vector pGL2 Basic y pGL2 Control. Se observa el aumento en la cantidad de células conforme aumenta el tiempo posterior a la transfección, también se puede observar la ausencia de citotoxicidad a los diferentes tiempos posteriores a la transfección. Las células se encuentran delimitadas por la membrana celular, la cual se observa bien definida con bordes regulares, en algunas células también se observa la presencia de un núcleo redondeado y definido.

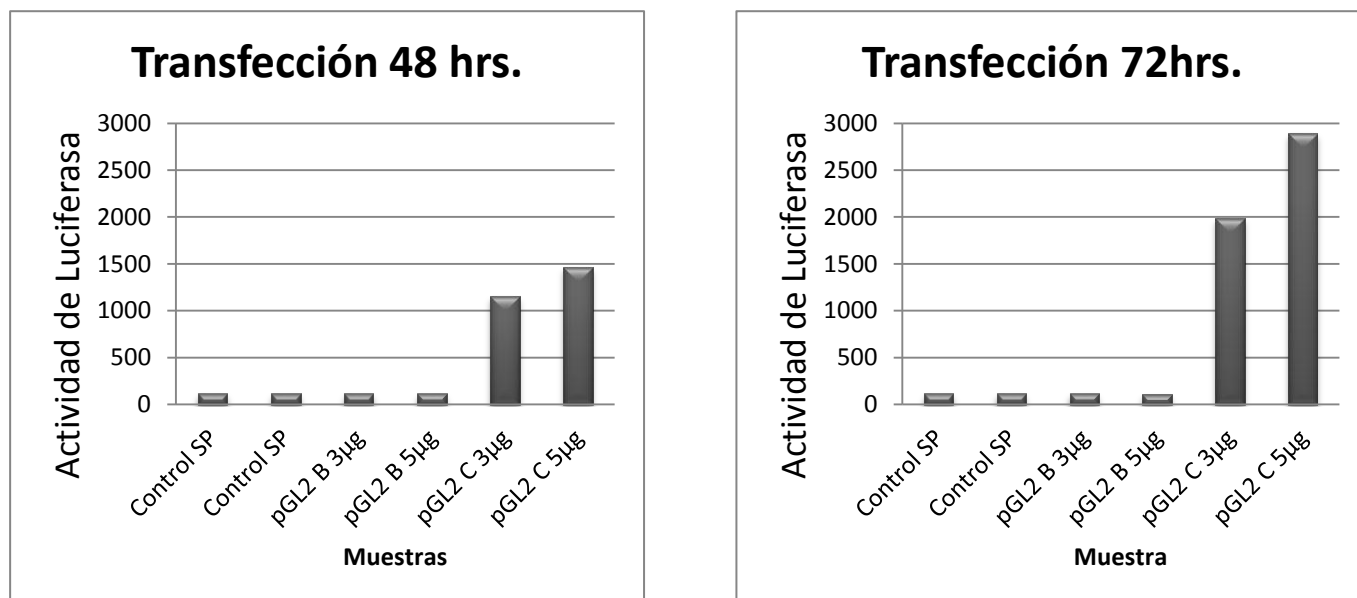


Figura 16. Ensayos de actividad de luciferasa con 0, 3, 5 µg del plásmido pGL2 Basic y pGL2 Control en células HeLa a 24 y 72 h. El efecto más evidente se observó a las 72 horas posteriores a la transfección con 5 µg del plásmido pGL2 Control.

ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS TRES SITIOS AP-1 DEL PROMOTOR DE miR-21 EN LAS LÍNEAS CELULARES HeLa, C-33 Y HaCaT

Para determinar la funcionalidad de los tres diferentes sitios AP-1 encontrados en el promotor de miR-21, se evaluó la actividad de luciferasa en las líneas celulares HeLa (HPV 18+), C-33 (HPV -) y HaCat (Queratinocitos). Estas líneas celulares también nos permitieron determinar si la activación de alguno de estos tres sitios se ve afectada por la infección del HPV o por el proceso neoplásico.

Las diferentes líneas celulares se transfectaron con los tres diferentes plásmidos generados con los diferentes fragmentos del promotor de miR-21 que contienen 1, 2 y 3 sitios AP-1 (pG1AP-1MIR21, pG2AP-1MIR21 y pG3AP-1MIR21 respectivamente), posteriormente se incubaron y se evaluó la actividad de luciferasa para cada condición.

Para las líneas celulares HeLa (HPV 18+) y C-33 (HPV-) se puede observar una tendencia de disminución en la actividad de la luciferasa, conforme se trunca la longitud del promotor de miR-21 y se eliminan los 3 diferentes sitios AP-1 (**Figura 17 y 18**). Estos resultados sugieren que la actividad que se ve disminuida en el promotor de miR-21 es debida a la ausencia de los sitios AP-1 que se eliminaron, y por lo tanto que los tres sitios AP-1 descritos, son funcionales en las líneas celulares HeLa (HPV 18+) y C-33 (HPV-), cabe mencionar que en estas líneas celulares la actividad de miR-21 se encuentra sobre expresada. Para la línea celular HaCat el resultado fue diferente, ya que no parece haber un cambio en la actividad de la luciferasa conforme cambia la longitud del promotor de miR-21 y la cantidad de sitios AP-1 (**Figura 19**). Este resultado sugiere que en las condiciones de un queratinocito “normal” estos tres sitios AP-1 del promotor de miR-21 se encuentran inactivos, lo que concuerda con la actividad de miR-21 en esta línea celular, ya que la expresión de miR-21 se encuentra reprimida en estas células.

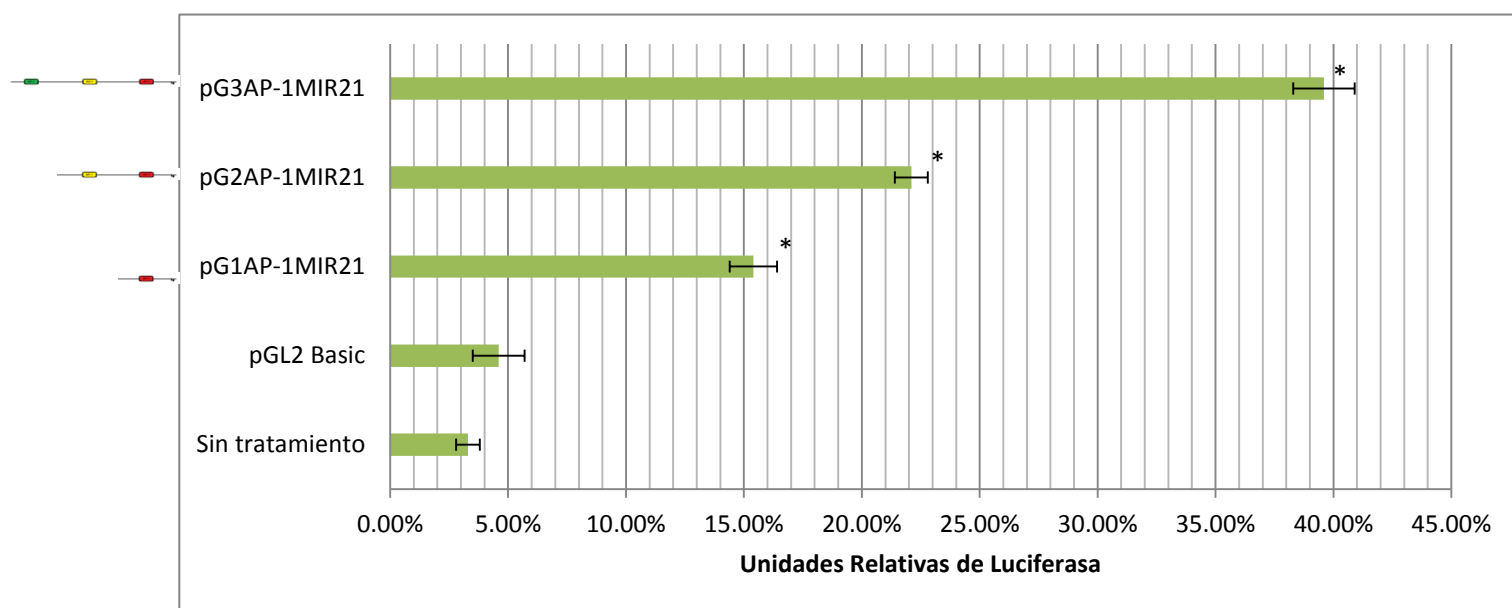


Figura 17. Los tres sitios AP-1 del promotor de mir-21 son funcionales en la línea celular HeLa. La actividad de la luciferasa en las células HeLa se ve disminuida conforme se recorta la longitud del promotor de miR-21 y se eliminan los diferentes sitios AP-1. La actividad de luciferasa fue normalizada respecto a la actividad del plásmido pGL2 Control. * Valor de $P < 0.005$

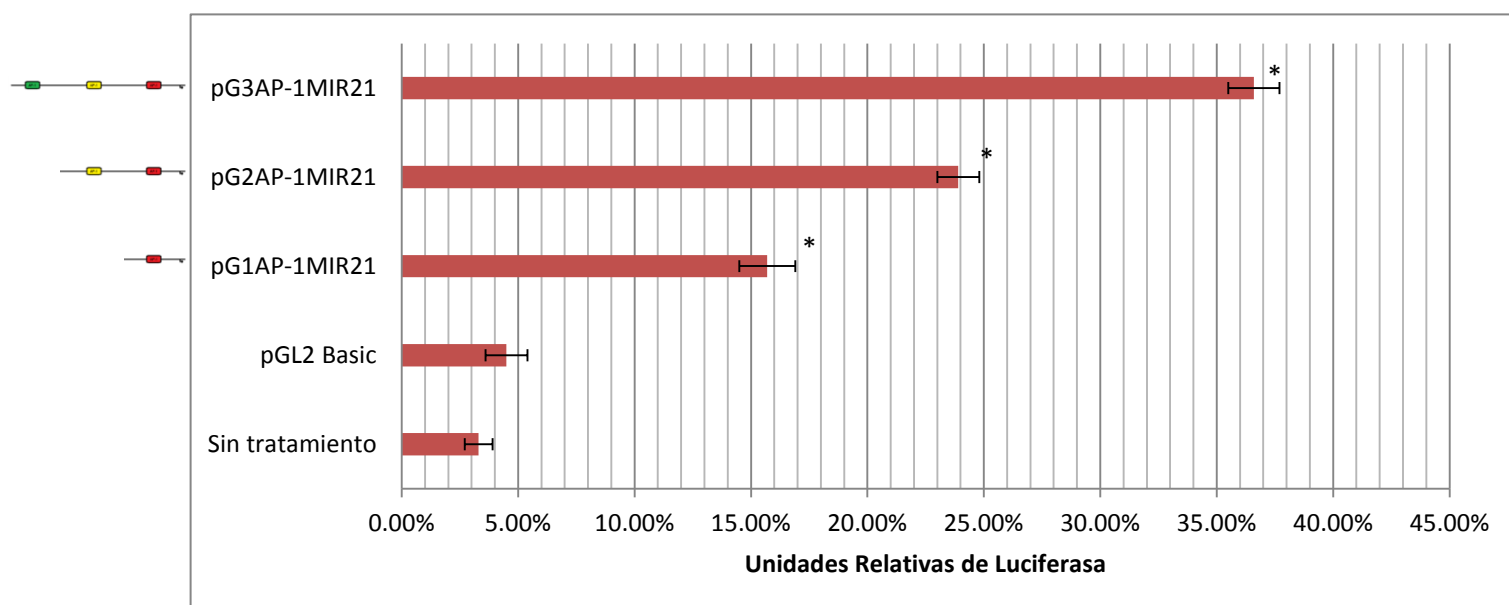


Figura 18. Los tres sitios AP-1 del promotor de mir-21 son funcionales en la línea celular C-33. La actividad de la luciferasa en las células C-33 se ve disminuida conforme se recorta la longitud del promotor de miR-21 y se eliminan los diferentes sitios AP-1. La actividad de luciferasa fue normalizada respecto a la actividad del plásmido pGL2 Control. * Valor de $P < 0.005$.

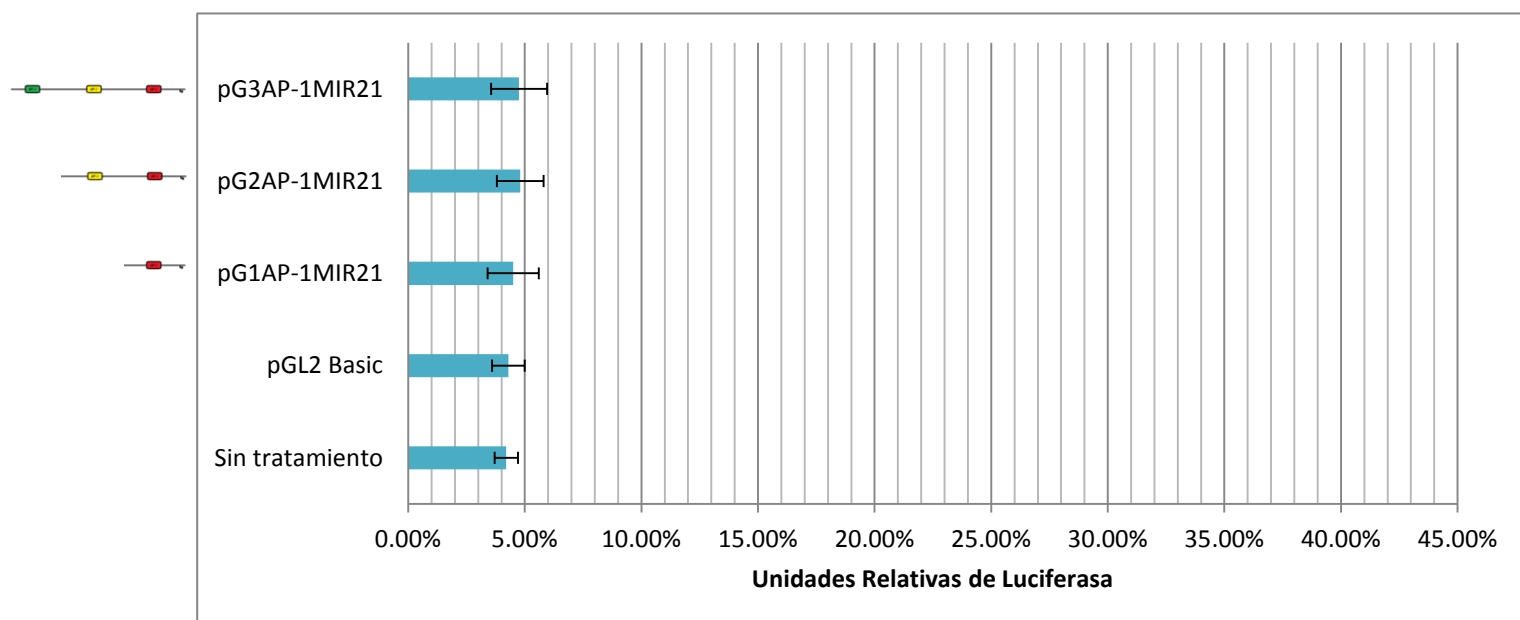


Figura 19. Los tres sitios AP-1 del promotor de mir-21 se encuentran inactivos en la línea celular HaCat. La actividad de la luciferasa en las células HaCat no se ve afectada conforme se recorta la longitud del promotor de miR-21 y se eliminan los diferentes sitios AP-1. La actividad de luciferasa fue normalizada respecto a la actividad del plásmido pGL2 Control. * Valor de $P < 0.005$.

Para determinar si la activación de los diferentes sitios AP-1 del promotor de miR-21 se ve afectada por la infección viral o por el proceso tumoral se comparó la actividad de los sitios AP-1 en las líneas celulares HeLa (HPV 18+), C-33 (HPV-) y HaCat (Queratinocitos). Al comparar las actividades de los diferentes sitios AP-1 del promotor de miR-21 en las líneas celulares HeLa (HPV 18+) y C-33 (HPV-) no se observan cambios evidentes en la actividad de la luciferasa para ninguno de los tres sitios. Sin embargo, cuando se compara la actividad de los diferentes sitios AP-1 de la línea celular HaCat (Queratinocitos) con la línea celular HeLa o C-33 (Lineas celulares tumorales) se puede observar un aumento en la actividad de estos sitios (**Figura20**). Estos resultados sugieren que la actividad de los tres sitios AP-1 del promotor de miR-21 es independiente a la infección por el HPV (HPV 18 para este caso), sin embargo, la actividad de estos mismos sitios si se ve afectada por el proceso tumoral de las células.

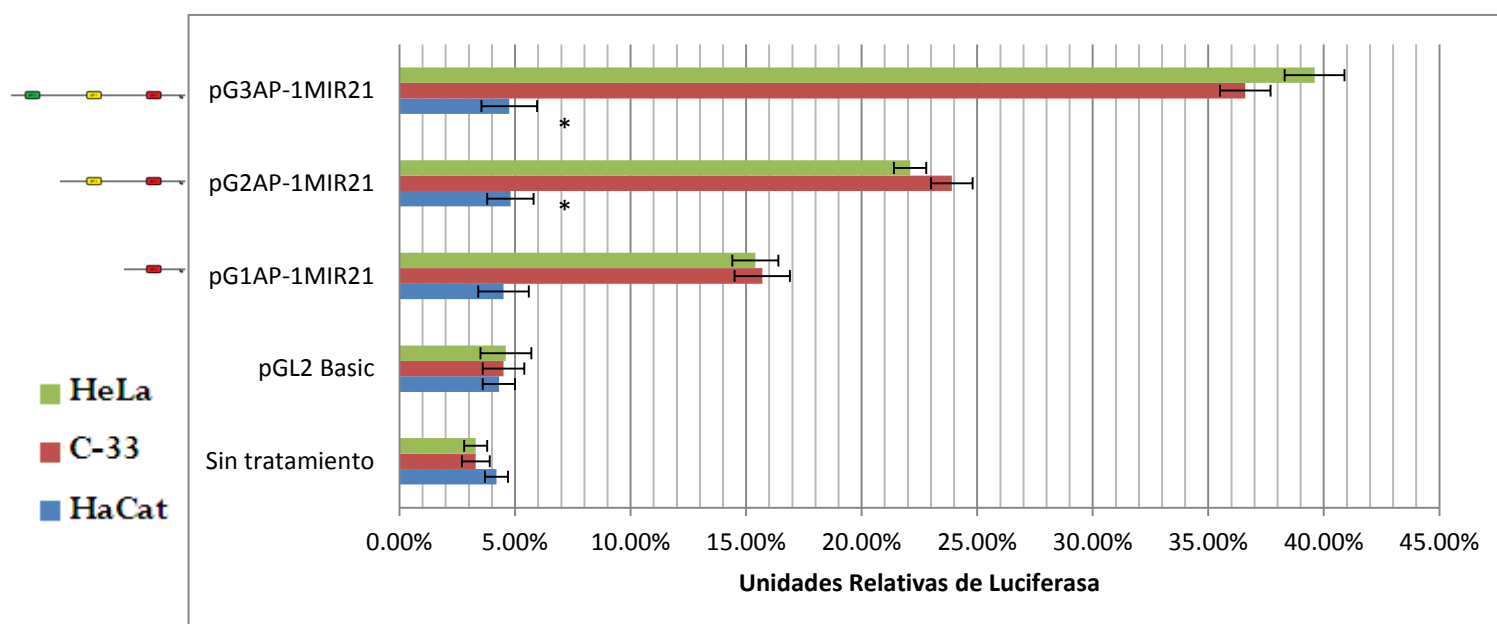


Figura 20. La activación los sitios AP-1 del promotor de miR-21 es independiente a la infección por el HPV, pero no lo es del proceso tumoral. Al comparar las actividades de los diferentes sitios AP-1 del promotor de miR-21 en las líneas celulares HeLa (HPV 18+) y C-33 (HPV-) no se observan cambios significativos en la actividad de la luciferasa para ninguno de los tres sitios. Sin embargo, cuando se compara la actividad de los diferentes sitios AP-1 de la línea celular HaCat (Queratinocitos) con la línea celular HeLa o C-33 (Lineas celulares tumorales) se puede observar un aumento significativo en la actividad de estos sitios. * Valor de $P < 0.005$.

DISCUSIÓN

El cáncer es una enfermedad compleja que se produce como resultado de una acumulación progresiva de aberraciones genéticas y cambios epigenéticos que permiten a las células, escapar de los controles endógenos y ambientales normales [92]. El cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, lo que representa la tercera causa más común y de muerte por cáncer. Sin embargo, todavía se sabe muy poco acerca de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de carcinogénesis. Aun cuando la función de los microRNAs en el cáncer ya ha sido descrita, los mecanismos moleculares por los cuales los microRNAs son capaces de modular el crecimiento y la proliferación de células cervicales tumorales humanas se desconocen. Los microRNAs han mostrado tener un papel importante en la biología del tumor, incluyendo la oncogénesis, la progresión, invasión, metástasis y angiogénesis. De la misma forma los microRNAs, son ahora reconocidos como actores clave del control postranscripcional de la expresión génica y se ha demostrado que estos se expresan de forma aberrante o mutados en el cáncer, lo que sugiere que pueden funcionar como una nueva clase de oncogenes o genes supresores de tumores, y las investigaciones en curso se han de comenzar a implicar a microRNAs específicos para cada tipo y etapa del cáncer [78].

Se ha reportado que los genes microRNA son transcritos por la ARN polimerasa II para producir pri-miRNAs con una modificación terminal de capucha de metilguanilato 5'–7' (m7G) y una cola de poli (A) 3', como los genes que codifican proteínas. También se ha reportado que este proceso es regulado por factores de transcripción conocidos. miR- 21 es uno de los primeros microRNAs humanos cuya estructura fue determinada [82] y estudios de expresión de genes en diferentes muestras de tumores humanos reportaron que el miR-21 está sobre expresado especialmente en los tejidos cáncer cervicouterino [59].

Sin embargo, la regulación transcripcional de miR-21 no es totalmente conocida y tampoco está clara en cuanto a la posición de su sitio de inicio de la transcripción (TSS). Cai et al [79] reportaron un TSS a 2445 pb río arriba del gen del pri-miR-21, en el intrón 11 del gen TMEM-49, que es constitutivamente activo, en la línea celular 293 de riñón embrionario. Loffler et al [80] reportaron un TSS diferente 50 pb río arriba del TSS reportado por Cai et al, que está regulado por un enhancer conservado capaz de unirse a motivos del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) en células de melanoma. Un tercer TSS del pri-miR-21 se reportó por Fujita, para líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa) y leucemia (HL-60) [69], el cual fue ubicado en el intrón 10 del gen TMEM-49. Sin embargo, en el estudio de Fujita et al no se detectaron los sitios de inicio de transcripción reportados anteriormente [69]. Por otra parte, el TSS reportado por Fujita et al, se superpone mínimamente, cerca de 60 bases con el TSS reportado por Cai et al, y ambos son funcionan por separado, lo que sugiere que cada uno es un promotor independiente [79, 69]. En la presente tesis utilizamos el TSS del pri-miR-21 descrito por Fujita et al, ya que es el único TSS que se ha reportado activo en las líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa), de la misma forma nuestros datos sugieren que el promotor río arriba de dicho TSS se encuentra activo para las líneas celulares HeLa y C-33 A, lo que apoya los resultados reportados por Fujita et al.

De la misma forma en otro estudio realizado por Mudduluru et al [93] en células de cáncer colorrectal, el TSS reportado por Cai et al no fue capaz de inducir actividad promotora en contraposición al TSS reportado por Fujita et al, lo que sugiere que el TSS reportado por Cai et al, no es esencial para el promotor del pri-miR-21 en células de cáncer colorrectal. Estas observaciones apoyan la idea de que puede haber linaje de células y/o el tipo de tumor específico para el uso de cada TSS y la regulación transcripcional del pri-miR-21.

En el estudio realizado por Fujita et al, un análisis del promotor de pri-miR-21 reveló que el factor de transcripción AP-1, inducido por PMA, desencadena la transcripción de miR-21 y que c-Fos y c-Jun son los principales contribuyentes entre los componentes de la inducción de AP-1 en células HL-60.

Esta activación transcripcional está asociada con el reclutamiento del complejo de remodelación de la cromatina SWI / SNF, que es conocido por ser reclutado de manera eficiente por el dímero c-Fos/c-Jun a una cromatina relativamente inactiva. Esto sugiere que una vez c-Fos/c-Jun se une al promotor, estos sitios conservados mejoran la transcripción de forma sinérgica, como se ha reportado para otros por los promotores estimulados por AP-1 [84]. En nuestro estudio obtuvimos un resultado similar al reportado por Fujita et al, para las líneas celulares HeLa y C-33 donde los tres sitios AP-1 descritos se encuentran activos, ya que incrementan la actividad del promotor de pri-miR-21 (Figuras 17 y 18). De la misma forma para estas dos líneas celulares, encontramos que hay una actividad sinérgica conforme se aumenta la cantidad de sitios AP-1 activos en el promotor de pri-miR-21. Este resultado nos sugiere que las proteínas que se unen a los sitios AP-1 del promotor de miR-21 pueden interactuar entre ellas para aumentar la transcripción, o bien, pueden interactuar con proteínas de otras familias de factores de transcripción que se encuentren en las cercanías de los sitios AP-1. Este fenómeno se ha observado para los dímeros formados por Jun/Fos, los cuales pueden interactuar con factores de transcripción de las familias NFAT, Ets, Smad y bHLH, para aumentar la transcripción [84].

Posteriormente, en el estudio de Mudduluru et al realizaron un análisis del promotor pri-miR-21 donde reportaron que el factor de transcripción AP-1 inducido por acetato de forbol-miristato (PMA) se une al promotor pri-miR-21 y activa la transcripción del gen pri-miR-21. Además, reportaron un nuevo motivo de unión al factor de transcripción AP-1 (-663/-659 pb en la secuencia río arriba TSS de pri-miR-21 reportado por Fujita et al), que también es importante para la actividad del promotor estimulada por PMA en cáncer colorrectal [93].

Se ha demostrado que la regulación transcripcional de pri-miR-21 es controlada por AP-1, el complejo SWI/SNF y STAT3 [69]. También que un aumento en la actividad endógena de AP-1 puede ser inducida a través de diversos ejes de señalización, y está asociado con la transformación oncogénica [95]. De igual forma se ha demostrado que el aumento de la expresión de miR-21 en varios tipos de cáncer se debe en parte a la regulación de su transcripción por un aumento de la activación de AP-1 [59, 94] como también nuestros resultados lo sugieren.

Una consecuencia de la inducción tanto de c-Fos como de c-Jun en respuesta a señales oncogénicas es que la actividad de AP-1 se encuentra sobre expresada en un gran número de tumores y líneas celulares transformadas. Los experimentos que inhiben la actividad AP-1 en estos sistemas, sugieren un papel crítico de AP-1 en la transformación oncogénica [95]. En nuestro estudio encontramos que miR-21 es regulado por AP-1, lo que sugiere que parte del potencial oncogénico de AP-1 puede deberse a la sobre expresión de miR-21 ocasionada por este factor de transcripción.

En otra investigación en células de cáncer cervical, se muestra que suprimir selectivamente la expresión del factor de transcripción AP-1 se suprime la transcripción del HPV y la expresión de sus oncogenes, lo que culminó en la pérdida de la viabilidad celular a través de la inducción de la apoptosis [96]. Esto sugiere que la actividad del HPV es dependiente de AP-1. En la presente tesis encontramos que esta dependencia no se lleva a cabo de manera inversa, ya que la actividad de AP-1 no se vio afectada por la presencia de la infección por el HPV.

Otros estudios han demostrado la sobreexpresión, activación constitutiva y la afinidad de unión de AP-1 al ADN en células de cáncer cervical, así como la expresión de sus miembros constituyentes, varía en función de la gravedad de las lesiones de cuello uterino [97]. Por lo tanto el factor de transcripción, AP-1 se puede considerar como un blanco terapéutico potencial para el cáncer de cuello de útero.

CONCLUSIONES

Por el análisis y discusión de los resultados de la presente tesis, las conclusiones a las que se pueden llegar son las siguientes:

1. Los tres sitios AP-1 del promotor de miR-21 evaluados, son funcionales para las líneas celulares HeLa y C-33 A donde probablemente contribuyen a la sobre expresión de miR-21 observada en estos tipos de células.
2. Los tres sitios AP-1 del promotor de miR-21 tienen un efecto sinérgico sobre la activación del promotor de miR-21, en las líneas celulares HeLa y C-33.
3. Los tres sitios AP-1 del promotor de miR-21 evaluados no son funcionales en la línea celular HaCat, lo cual puede ser debido a la ausencia de un proceso de transformación celular.
4. La activación de estos sitios AP-1 se ve afectada por el proceso de transformación celular.
5. la activación de estos sitios AP-1 no se afecta por la infección del virus del papiloma humano (HPV 18).

Consideraciones éticas y de bioseguridad

La presente investigación fue dictaminada COMO exenta de revisión por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública, ya que se realizó con líneas celulares provenientes de un banco comercial y no incluye sujetos humanos.

El comité de bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública dictaminó a la presente investigación como aprobada, debido a que el proyecto establece todas las medidas de uso y manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) y CRETI. Debido que se cuenta con la capacidad para poder mantener a las líneas celulares, todos los procedimientos se realizaron bajo los protocolos ya establecidos por el laboratorio. El manejo y disposición de los materiales biológico-infecciosos, corrosivos, reactivos, tóxicos y solventes se manejaron y confinaron de acuerdo a la Guía para el Manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Tanto el Investigador responsable del proyecto como los estudiantes participantes tenían acreditación del curso de manejo integral de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos que ofrece el CISEI-INSP. Además, todas las áreas de trabajo tenían las características necesarias de requerimientos de bioseguridad para trabajo de laboratorios de acuerdo a la Guía para el Manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) del CISEI-INSP, basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

Referencias

- [1]. Arrossi S., Matos E., Zengarini N., Roth B., Sankaranarayanan R., Parkin M., "The socio-economic impact of cervical cancer on patients and their families in Argentina, and its influence on radiotherapy compliance. Results from a cross-sectional study", *Gynecologic Oncology*, 2007, 105:335-340.
- [2]. Villiers E M L, Zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol* 1981; 40:932-935.
- [3]. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55: 244-265.
- [4]. Lizano M, Carrillo A, Contreras A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología* 4. 2009; 205-216.
- [5]. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, 2004: Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324:17-27.
- [6]. Reimers LL, Anderson WF, Rosenberg PS, Henson DE, Castle PE. Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:792-800. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0965.
- [7]. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 2001; 82:15-33.
- [8]. Fouts ET, Yu X, Egelman EH. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *J Biol Chem* 1999;274:4447-4458.
- [9]. Gillitzer E, Chen G, Stendlund A. Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *EMBO J* 2000; 19:3069-3079.
- [10]. Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: Structure, function, and biology. *Annu. Rev Biomol Struct* 2002;31:343-60.
- [11]. Lefebvre O, Steger G, Yaniv M. Synergistic transcriptional activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure. *J Mol Biol* 1997; 266:465-78.
- [12]. Deborah E, Jackson J, Doorbar J. Identification of a G2 Arrest Domain in the E1^{E4} Protein of Human Papillomavirus Type 16. *J Virol* 2002; 76:9806-9818.
- [13]. Sparkowski J, Anders J, Schlegel R, 1995: E5 oncoprotein retained in the endoplasmic reticulum/cis Golgi still induces PDGF receptor autophosphorylation but does not transform cells. *EMBO J.* 14, 3055-3063.

- [14]. Hwang ES, Nottoli T, DiMaio D, 1995: The HPV 16 E5 protein; expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* 211, 227–233.
- [15]. Straight SW, Herman B, McCance DJ, 1995: The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* 69, 3185–3192.
- [16]. Leechanachi P, Banks L, Moreau F, 1992: The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 7, 19-25.
- [17]. Benyue Z, Ping L, Exing W, 2003: The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ . *Virology* 310, 100 – 108.
- [18]. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20:7874-7878.
- [19]. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, et al. Both Rb and p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998; 396: 84-88.
- [20]. Werness B, Levine A, Howley B. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.
- [21]. Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of ‘ high risk ’ human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci* 2003; 28: 337-348.
- [22]. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV 18 E6. *Oncogene* 1998; 17:2943-2954.
- [23]. Darnell GA, Schroder WA, Antalis TM, et al. Human papillomavirus E7 requires the protease calpain to degrade the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 2007; 282: 37492-37500.
- [24]. Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ: Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol* 2006; 151: 2321-2335.
- [25]. Day PM, Roden RBS, Lowy DR. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 1998;72: 142-50.
- [26]. Bouallaga I, Thierry F. Control of Human Papillomavirus type 18 transcription: role in carcinogenesis. *Recent Research Developments in Virology* 1999;1:369-383.
- [27]. May M, Dong XP. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV-16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J* 1994; 13:1460-1466.

- [28]. Girolglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M, 2001: Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75, 1565-1570.
- [29]. Yoon CS, Kim KD, Park SN and Cheong SW, 2001: Alpha (6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 668-673.
- [30]. Day PM, Lowy DR, Schiller JT, 2003: Papillomavirus infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 307: 1- 1.
- [31]. Wilson VG, West M, Woytek K, 2002: Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 24: 275-90.
- [32]. Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, 1997: Inhibition of serum and calcium induced differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6 oncoprotein: role of P53 inactivation. *Virology*. 237: 296–306.
- [33]. Doorbar J, Ely S, Sterling J, 1991: Specific interaction between HPV 16 E1 - E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 352: 824–7.
- [34]. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* 115: 2007. 1090–1106.
- [35]. Zhao, Y. and Srivastava, D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.* (2007) 32, 189-197.
- [36]. 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* 2 1990; 279-289.
- [37]. Romano N. Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6 1992; 3343-3353.
- [38]. Lee R.C. Feinbaum R.L. Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75, 843-854.
- [39]. Reinhart, B.J.; Slack, F.J.; Basson, M.; Pasquinelli, A.E.; Bettinger, J.C.; Rougvie, A.E.; Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- [40]. Grivna S.T. Beyret E. Wang, Z. Lin H. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* 20. 2006; 1709-1714.
- [41]. Tam, O.H.; Aravin, A.A.; Stein, P.; Girard, A.; Murchison, E.P.; Cheloufi, S.; Hodges, E.; Anger, M.; Sachidanandam, R.; Schultz, R.M., et al. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453, 2008; 534-538.

- [42]. Nielsen, H.; Orum, H., and Engberg, J. (1992). A novel class of nucleolar RNAs from Tetrahymena. FEBS Lett 307, 337-342.
- [43]. Preker, P.; Nielsen, J.; Kammler, S.; Lykke-Andersen, S.; Christensen, M.S.; Mapendano, C.K.; Schierup, M.H., and Jensen, T.H. (2008). RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. Science 322, 1851-1854.
- [44]. Kim, S.; Hwang do, W., and Lee, D.S. A study of microRNAs in silico and in vivo: bioimaging of microRNA biogenesis and regulation. FEBS J 276, 2009. 2165-2174.
- [45]. Slezak-Prochazka, I.; Durmus, S.; Kroesen, B.J., and van den Berg, A. MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing. RNA 16, 2010. 1087-1095.
- [46]. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF and Hannon GJ: Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. Nature 2004; 432: 231-235.
- [47]. Yi R, Qin Y, Macara IG and Cullen BR: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev 2003; 17: 3011-3016.
- [48]. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ and Dahiya R: MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 1608-1613.
- [49]. Lugo, A. Trujillo, K. "MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica". Medicina Universitaria 2009; 11(44):187-192.
- [50]. Marson, A.; Levine, S.S.; Cole, M.F.; Frampton, G.M.; Brambrink, T.; Johnstone, S.; Guenther, M.G.; Johnston, W.K.; Wernig, M.; Newman, J., et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. Cell 2008; 134, 521-533.
- [51]. He L. He X. Lim L.P. de Stanchina E. Xuan Z. Liang Y. Xue W. Zender L. Magnus J. Ridzon D. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. Nature 2007; 447, 1130-1134.
- [52]. Lujambio, A.; Calin, G.A.; Villanueva, A.; Ropero, S.; Sanchez-Cespedes, M.; Blanco, D.; Montuenga, L.M.; Rossi, S.; Nicoloso, M.S.; Faller, W.J., et al. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 13556-13561.
- [53]. Blow M.J. Grocock R.J. van Dongen S. Enright A.J. Dicks E. Futreal, P.A.; Wooster, R., and Stratton, M.R. RNA editing of human microRNAs. Genome Biol 2006; 7, R27.
- [54]. Yang W. Chendrimada T.P. Wang Q. Higuchi M. Seeburg P.H.; Shiekhattar R, Nishikura K. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. Nat Struct Mol Biol 2006; 13, 13-21.
- [55]. O'Connell M.A. Keegan L.P. Drosha versus ADAR: wrangling over pri-miRNA. Nat Struct Mol Biol 1 2006; 3, 3-4.
- [56]. Michlewski G. Sanford J.R. Caceres J.F. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. Mol. Cell 2008; 30, 179-189.

- [57]. Paroo Z. Pertsemlidis A. microRNAs mature with help from cancer biology. *Genome Biol* 2009; 10, 310.
- [58]. Cho, W. C. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer*. (2007) 6, 60.
- [59]. Selcuklu, S. D., Donoghue, M. T. and Spillane, C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans*. (2009) 37, 918-925.
- [60]. Chan, J. A., Krichevsky, A. M. and Kosik, K. S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. (2005) 65, 6029-6033.
- [61]. 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 micro-RNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 2257–61.
- [62]. Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*. 2006; 99: 671–8.
- [63]. 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.
- [64]. Nam EJ, Yoon H, Kim SW, Kim H, Kim YT, Kim JH, Kim JW, Kim S. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 2690–5.
- [65]. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res*. 2007; 67: 6031–43.
- [66]. Tran N, McLean T, Zhang X, Zhao CJ, Thomson JM, O'Brien C, Rose B. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 358: 12–7.
- [67]. Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, Livolsi VA, Baloch ZW. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol*. 2007; 18: 163–73.
- [68]. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et. al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007; 129: 1401–14.
- [69]. Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K. and Iba, H. (2008) miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol*. 378, 492-504.
- [70]. Wu GJ, Sinclair CS, Paape J, Ingle JN, Roche PC, James CD, Couch FJ. 17q23 amplifications in breast cancer involve the PAT1, RAD51C, PS6K, and SIGma1B genes. *Cancer Res*. 2000; 60: 5371–5.

- [71]. Kasahara K, Taguchi T, Yamasaki I, Kamada M, Yuri K, Shuin T. Detection of genetic alterations in advanced prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002; 137: 59–63.
- [72]. Griffin CA, Hawkins AL, Packer RJ, Rorke LB, Emanuel BS. Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res.* 1988; 48: 175–80.
- [73]. Roversi G, Pfundt R, Moroni RF, Magnani I, van Reijmersdal S, Pollo B, Straatman H, Larizza L, Schoenmakers EF. Identification of novel genomic markers related to progression to glioblastoma through genomic profiling of 25 primary glioma cell lines. *Oncogene.* 2006; 25: 1571–83.
- [74]. Fulci V, Chiaretti S, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007; 109: 4944–51.
- [75]. Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, Hosoi H, Nakagawara A, Sugimoto T, Inazawa J. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2003; 63: 1876–83.
- [76]. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene.* 2003; 22: 1225–37.
- [77]. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 342–50.
- [78]. Krichevsky, A. M. and Gabriely, G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med.* (2009) 13, 39-53.
- [79]. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microR-NAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004; 10:1957–66. [PubMed: 15525708].
- [80]. Loffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., Stocsits, C., Hackermuller, J., Kretzschmar, A. K., Burger, R., Gramatzki, M., Blumert, C., Bauer, K., Cvijic, H., Ullmann, A. K., Stadler, P. F. and Horn, F. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood.* 2007; 110, 1330-1333
- [81]. Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 2008; 22:3172–83. [PubMed: 19056895].
- [82]. Du, J., Yang, S., An, D., Hu, F., Yuan, W., Zhai, C. and Zhu, T. (2009) BMP-6 inhibits microRNA-21 expression in breast cancer through repressing deltaEF1 and AP-1. *Cell Res.* 19, 487-496.
- [83]. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell. Sci.* 117 (Pt 25): 2004. pp. 5965–73.
- [84]. Chinenov, Y. and T. K. Kerppola "Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity." *Oncogene* 2001; 20(19): 2438-52.

- [85]. O'Shea, E. K., R. Rutkowski, et al. "Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer." *Cell* 1992; 68(4): 699-708.
- [86]. Vogt, P. K. "Fortuitous convergences: the beginnings of JUN." *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 465-9.
- [87]. Angel, P. and M. Karin. "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cellproliferation and transformation." *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072(2-3): 129-57.
- [88]. O'Shea, E. K., R. Rutkowski, et al. "Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun." *Science* 1989; 245(4918): 646-8.
- [89]. Ivashkiv, L. B., H. C. Liou, et al. "mXBP/CRE-BP2 and c-Jun form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate, response element." *Mol Cell Biol* 1990; 10(4):1609-21.
- [90]. NCBI [webpage on the Internet]. Data Base [updated Aug 2013]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acceso Septiembre 20, 2013.
- [91]. miRBase [webpage on the Internet]. microRNA Data Base [updated Aug 2013]. Available from: www.mirbase.org Acceso Septiembre 20, 2013.
- [92]. Weinberg, R. A. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;758, 331-338.
- [93]. Mudduluru G, Nesson J, William G, Muppala S, Asangani A, Regalla K, D Nelson L, Allgayer H. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Bioscience Reports* 2010; manuscrito BSR20100065.
- [94]. Ui, M., Mizutani, T., Takada, M., Arai, T., Ito, T., Murakami, M., Koike, C., Watanabe, T., Yoshimatsu, K. and Iba, H. Endogenous AP-1 levels necessary for oncogenic activity are higher than those sufficient to support normal growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 278, 97-105.
- [95]. BW Ozanne, HJ Spence, LC McGarry y RF Hennigan. Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene.* 2007; 26, 1–10.
- [96]. Sutapa Mahata, Alok C Bharti, Shirish Shukla, Abhishek Tyagi, Syed A Husain y Bhudev C Das. Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells. *Molecular Cancer* 2011, 10:39.
- [97]. Prusty BK, Das BC: Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer* 2005, 113:951-960.