



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PAPEL FUNCIONAL DE miR-125a y miR-125b EN LA MODULACIÓN DEL PROCESO DE RESISTENCIA A LA
RADIOTERAPIA EN CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Biol. Exp. Elena Verónica Romo Téllez

Comité Tutorial:

Director Externo

Dr. Carlos Pérez Plasencia

Director interno

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor

Dr. Eduardo López Urrutia

Fecha:

12-Abril-2016

“El programa de Maestría en biología experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Durante el desarrollo de este Proyecto de Tesis la Biol. Exp. Elena Verónica Romo Téllez fue depositaria de la beca de CONACYT No 301996, que le fue otorgada para sus estudios de Maestría durante el periodo 1 de Septiembre 2013 a 31 de Agosto 2015

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

"PAPEL FUNCIONAL DE miR-125a y miR-125b EN LA MODULACIÓN DEL PROCESO DE RESISTENCIA A LA RADIOTERAPIA EN CÁNCER CÉRVICO-UTERINO ", que presentó

Elena Verónica Romo Téllez

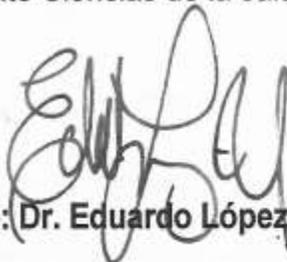
El día 12 de Abril del año 2016

Sinodales:



Presidente: Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento Ciencias de la salud UAM-I



Secretario: Dr. Eduardo López Urrutia

UBIMED FES IZTACALA-UNAM



Vocal: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento Ciencias de la Salud UAM-I



Vocal: Dr. Abraham Pedroza Torres

Instituto Nacional de Cancerología

Miembros de comité tutorial

Director Externo

Dr. Carlos Pérez Plasencia
Instituto Nacional de Cancerología

Director Interno

Dr. Francisco José Fernández Perrino
Departamento de biotecnología UAM-I

Asesor

Dr. Eduardo López Urrutia
UBIMED FES IZTACALA-UNAM

Dedicatorias y agradecimientos

Principalmente al **Dr. Carlos Pérez Plasencia** por brindarme su persistencia, su paciencia, sus conocimientos y su apoyo incondicional. Le agradezco el que me haya inculcado en hábito de buscar, investigar y trabajar duro los cuales son primordiales para mi formación.

Al **Dr. Abraham Pedroza** y **Dr. Eduardo Urrutia**, por su dedicación, esfuerzo y paciencia aportada durante la elaboración del proyecto.

A mis compañeros, amigos y todo el equipo de trabajo de ambos laboratorios, por sus consejos y ayuda, por las bromas y risas que hacían del laboratorio un lindo lugar.

A mi familia por el constante apoyo durante toda mi vida, a mi **tía Patricia**, a **mi abuelita** y a **mi prima Aileen** por adoptarme durante mi permanencia, agradezco todo lo que han hecho por mí, gracias por enseñarme e inculcarme tantas cosas. A **mi madre** por ser mi ejemplo a seguir gracias por todo tu amor, cariño y tolerancia. A **mis hermanos** que a pesar de la distancia siempre me apoyaron en todas mis decisiones y me procuraron, sin todos ustedes no sería lo que soy ahora.

A mis amigos por todos los buenos momentos, en especial a **Ursula, Claudia** y **Fahiel** por ser parte de mi vida y por el apoyo incondicional que cada una me ha brindado.

A **Mauricio** el cual estuvo conmigo durante todo el proceso, por soportarme, cuidarme y siempre brindarme su cariño cuando sentía que ya no podía seguir adelante, gracias por todo lo que me has enseñado y por compartir grandes aventuras. Por último a **Zekrom, Lambda** y **Shade** mis amores.

Resumen

En nuestro país el cáncer cérvico-uterino (CCu) es una de las principales causas de mortalidad por cáncer en mujeres, representando el 11.9% de muertes por cáncer. Lamentablemente la falta de políticas de salud provoca que los estadios localmente avanzados prevalezcan en las mujeres mexicanas, por lo que el principal tratamiento para esta neoplasia es la quimioterapia basada en cisplatino con radioterapia. Sin embargo, entre el 30 y 50% de las pacientes con CCu generan radio-resistencia o presentan el fenotipo de resistencia al tratamiento. Diversas moléculas se han asociado a la progresión del cáncer y la resistencia a los tratamientos, Entre estas se encuentran los microRNAs, los cuales regulan negativamente a sus genes blanco, genes que participan en procesos como; la reparación del DNA, proliferación y evasión de la apoptosis. miR-125a y miR-125b son microRNAs que pertenecen a la familia miR-125 los cuales se ha reportado que actúan como supresores y promotores de una gran variedad de carcinomas. El objetivo del trabajo fue evaluar a miR-125a y miR-125b en el proceso de la modulación de radio resistencia en un modelo *in vitro* de cáncer cérvico-uterino. Los resultados demuestran que la sub expresión de ambos microRNAs favorece la resistencia a la radioterapia en líneas celulares derivadas de CCu (HeLa). Interesantemente, p21 es un blanco en común de miR-125a y miR-125b, el cual se

encontraba sobre-expresado y se relaciona con la evasión de la apoptosis promoviendo la radio-resistencia en CCu.

Abstract

In Mexico, cervical cancer is one of the leading causes of cancer deaths in women, it represents around 12% of them. Unfortunately, deficient health policies in our country lead to advanced stages prevalence. One of the main treatments for these stages is cisplatin-based chemotherapy combined with radiotherapy. However, 30-50% of cervical cancer patients generate resistance to treatment and several modulators such as microRNAs have been associated with this process as well as with cancer progression. MicroRNAs as negative regulators of their target genes have the capability to regulate processes such as DNA damage repair, proliferation and evasion of apoptosis among others.

miR-125a and miR-125b are members of the miR-125 family. It has been reported previously that deregulation of miR125 family is frequent in several tumors. In this work, we evaluated the role of miR-125a and miR-125b in the process of radioresistance in an in vitro cervical cancer model. Results demonstrate that downregulation of both microRNAs promote resistance to radiation in HeLa cell line. In addition, p21 which is one of the targets of miR-125a and miR-125b, was found overexpressed, this result suggest its association with radioresistance in CCu promote the evasion of apoptosis

Índice

Índice	x
Introducción	1
Antecedentes.....	3
Cáncer.....	3
Cáncer cérvico-uterino	7
Morbilidad de cáncer cérvico-uterino.....	9
Carcinogénesis cervical mediada por el VPH	11
Tratamiento	15
Radioterapia	15
microRNAs	17
miRNAs asociados al proceso de carcinogénesis en CCu.....	19
miR-125a y miR125b.....	21

Justificación	22
Pregunta de investigación.....	23
Hipótesis	23
Objetivos.....	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares.....	24
Material y métodos	24
Cultivo celular.....	24
Ensayo clonogénico	25
Extracción de RNA.....	25
Determinación de los niveles de expresión de miRNAs mediante sondas TaqMan	26
RT-qPCR.....	27
Selección de probables blancos y cuantificación del nivel de expresión en líneas radio-sensibles y radio-resistentes.....	30

Selección de blancos.....	30
Diseño de oligonucleotidos para amplificación por RT-qPCR de los blancos moleculares.....	31
Transcripción reversa	32
Estandarización de las condiciones de amplificación (PCR de punto final)	33
RT-qPCR.....	34
Análisis estadístico.....	36
Detección del nivel de proteína de los blancos moleculares	37
Extracción de proteína.....	37
Western Blot	37
Viabilidad de las líneas radio-resistentes.....	39
Purificación de RNA	41
Valoración de los microRNAs control para el modelo de radio-resistencia y radio-sensibilidad.....	42

Obtención de la expresión relativa de los microRNAs a partir de las líneas celulares.....	44
La expresión de miR-125a y miR-125b es dependiente de la radiación ionizante	46
Determinación de posibles blancos de unión de miR125a y miR-125b	48
Determinación de los blancos por medio de RT-qPCR.....	49
Expresión de p21 blanco de miR-125a	52
Discusión	54
Conclusión.....	64
Bibliografía.....	65

Introducción

De los distintos tipos de cáncer que padecen las mujeres en nuestro país, el cáncer cérvico-uterino (CCu) es la segunda causa de muerte: sólo en 2012 se registraron 13,960 nuevos casos y 4,730 muertes ¹. El cáncer cérvico-uterino es una neoplasia maligna que se desarrolla en el epitelio del útero. Su principal factor etiológico es el virus del papiloma humano (VPH), ya que el 99.7% de los tumores tienen ADN de este virus. El VPH es el principal factor para el desarrollo de este tipo de cáncer, sin embargo lo es el único, existen algunas moléculas que permiten regular diversos procesos celulares los cuales ayudan a promover el desarrollo de la carcinogénesis.

De manera general, el tratamiento para los pacientes con CCu incluye esquemas de radioterapia en combinación con quimioterapia basada en cisplatino. Lamentablemente, cerca del 50% de los pacientes mueren debido a un fenómeno mejor conocido como “resistencia al tratamiento”. Se han asociado diversos procesos moleculares con la resistencia al tratamiento en pacientes con CCu, dentro de los cuales destacan: la sobre-expresión de proteínas asociadas con el daño al ADN, la evasión de la apoptosis y la desregulación de diversos microRNAs. Los microRNAs (o miRNAs) son RNAs pequeños, no codificantes, de aproximadamente 21-26 nt, los

cuales regulan eventos post-transcripcionales a través de la unión de las bases 2-8 de la región semilla del miRNA y la 3'UTR de su mRNA blanco^{8 16}. miR-125a y miR-125b son miRNAs asociados con la resistencia a la quimioterapia en diferentes tipos de tumores por lo que podrían ser intermediarios en modulación de la radio-resistencia en CCu⁶⁹. El objetivo principal de este trabajo fue determinar el papel de miR-125a y miR-125b en el proceso de radio-resistencia en CCu. Para comprobar nuestra hipótesis se evaluó la expresión relativa de ambos miRNAs en un modelo de líneas celulares radio-resistentes contra su respectivo control sin radiación (líneas celulares parentales). Los resultados demostraron que existen diferencias significativas entre en los niveles de expresión de ambos microRNAs. Adicionalmente, uno de los blancos de miR-125a y miR-125b es p21 el cual al estar subexpresado se asocia con la progresión de la fase G1/S del ciclo celular, sin embargo, en nuestro estudio la subexpresión de miR-125a y miR-125b resulta en la sobreexpresión de p21 lo cual promueve la inhibición de factores pro-apoptóticos como las caspasas, lo que permite evadir la apoptosis en el proceso de radio-resistencia en CCu.

Antecedentes

Cáncer

El cáncer es un conjunto de patologías que dan como resultado el crecimiento anormal de las células, causado por múltiples factores, que van desde cambios en la expresión genética hasta cambios efectuados por elementos exógenos⁷⁹. Las células neoplásicas adquieren una serie de modificaciones que les permiten proliferar y adaptarse al medio para su supervivencia, estas pueden ser adquiridas por diferentes tipos de tumores y por distintos mecanismos celulares²⁵, se distinguen ocho características intrínsecas a la célula tumoral (*ver figura 1*)²⁶.

Autonomía en señales de crecimiento; Los factores de crecimiento como EGF (epidermal growth factor) e IGF (Insulin-like growth factor) son los actores en este fenómeno; participando en el control del ciclo celular, la proliferación, supervivencia y el metabolismo; además de ser moléculas clave en la comunicación intercelular, iniciando un evento de transformación tumoral a través de la activación de cascadas de señalización como PI3K/AKT y RAF/MAPK⁸⁷.

Evasión de señales supresoras de crecimiento; Uno de los mecanismos mejor conocidos es la inhibición de p53 y Rb; los cuales son reguladores celulares que gobiernan las decisiones de proliferación, activan la senescencia y la apoptosis por medio de la activación de otras proteínas y factores de transcripción por lo que

mutaciones o inactivación de estos, por medio de degradación proteolítica, promueven la proliferación celular⁶⁵.

Evasión de la muerte celular programada; Bcl2 y Bcl-XL son genes antiapoptóticos que encuentran sobreexpresados en las células tumorales, se encargan de impedir la liberación del citocromo c en la mitocondria o secuestrando a las caspasas, las cuales promueven la apoptosis, permitiéndole a la célula proliferar de manera aberrante y sin limitantes. Además, promueven la necrosis de algunas células neoplásicas para que el microambiente tumoral contenga factores necesarios para el constante crecimiento del tumor²¹.

Replicación ilimitada; Los telómeros determinan el número de veces que se puede replicar una célula normal, cuando estos se acortan el número de replications celulares se limitan; sin embargo la sobreexpresión de la telomerasa, enzima que se encarga de extender los telómeros en cada ciclo replicativo del DNA, impide que la célula tumoral no se va afectado por esta restricción⁶⁴.

Angiogénesis sostenida; La formación de nuevos vasos sanguíneos es una consecuencia del crecimiento de la masa tumoral. La difusión del oxígeno en nuestros tejidos tiene un límite de aproximadamente 8 μ m; cuando el tumor ha superado este diámetro; es necesaria la formación de nuevos vasos sanguíneos. Diferentes citocinas como VEGF (vascular endotelial growth factor) participan en las

cascadas de señalización necesarias para la angiogénesis que suministran a las células tumorales de los nutrientes necesarios además de ser vías de acceso a vasos sanguíneos distantes⁵⁵.

Invasión y metástasis; Con el paso del tiempo los recursos de las células neoplásicas se pueden ver limitados, pues el microambiente tumoral ya no es apto para su proliferación y crecimiento. Algunas células tumorales modifican los niveles de expresión de enzimas capaces de degradar la matriz extracelular; tales como las metaloproteasas. Inhibiendo la expresión de enzimas de adhesión celular como E-cadherina. Estos procesos le permiten a la célula tumoral incorporarse al torrente sanguíneo y colonizar un tejido distante generando metástasis⁸⁸.

Desregulación del metabolismo celular; Las células neoplásicas tienen la capacidad de reprogramar o modificar el metabolismo. La sobreexpresión de transportadores de glucosa como GLUT1 y enzimas involucradas en las vías metabólicas facilitan el flujo y oxidación de la glucosa, promoviendo y optimizando la generación de ATP²⁸.

Por último, la evasión de la destrucción inmunológica; La respuesta inmunológica es el principal mecanismo por el cual un organismo pueden combatir infecciones por microorganismos y parásitos. Las células tumorales no son una excepción, por ende la secreción de factores inmunosupresores como TGF- β o el

reclutamiento de células inflamatorias como las células T o las células MDSC (por sus siglas en inglés, myeloid-derived suppressor cells) pueden suprimir la función citotóxica de los linfocitos y así superar la barrera del sistema inmune⁷⁸.

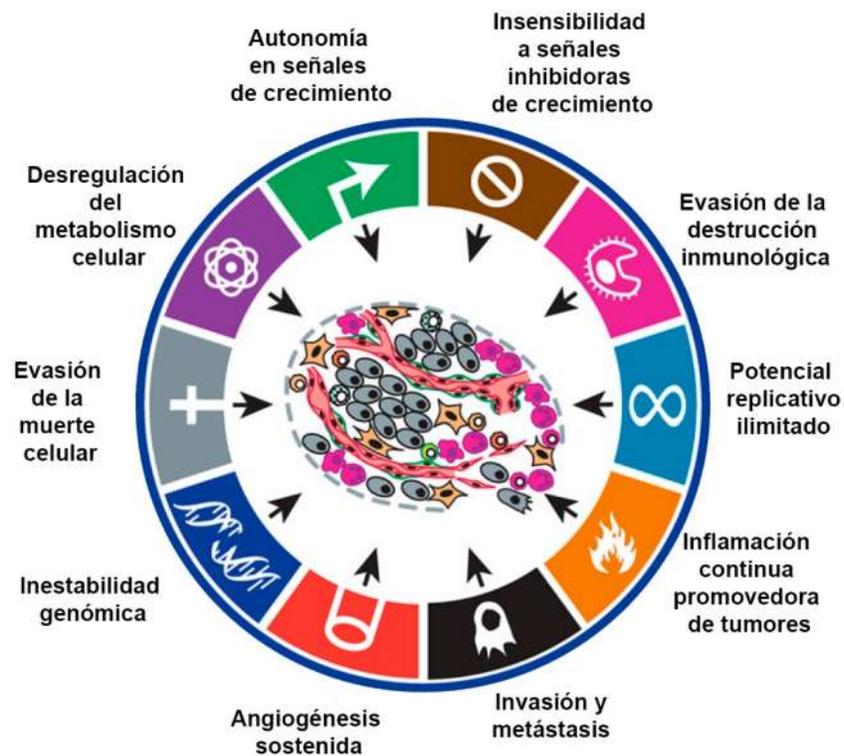


Figura 1. Características las células tumorales que adquieren durante el proceso de carcinogénesis²⁶.

Cáncer cérvico-uterino

El cérvix se encuentra en la parte baja del útero y conecta la vagina con el útero. La parte próxima a la vagina se le conoce como exocervix, esta zona está recubierta por células escamosas, mientras que la parte cercana al útero se encuentra recubierta con células glandulares y se conoce como endocervix²⁷. Entre el 80 y 90% de los casos de CCu se dan en la exocervix, mientras que el resto se presentan en la endocervix, y se conocen como carcinoma de células escamosas y adenocarcinomas, respectivamente⁶⁶. Este proceso de carcinogénesis no es instantáneo. Las células adquieren gradualmente los cambios para transformarse en una célula neoplásica, proceso que puede durar décadas (15 a 20 años)⁶². Por esta razón, se debe de evaluar año con año los cambios morfológicos en las células del cuello uterino por medio del Papanicolaou; examen necesario en la prevención del cáncer. Por otro lado, los estudios histopatológicos en los que requieren una biopsia, ya sea por colposcopia o toma directa, son utilizados en pacientes que ya presentan células tumorales⁷⁵. En este sentido el tratamiento para las pacientes depende del estadio en el que se encuentre el tumor. A este respecto, la estadificación clínica actual del CCu está basada en el sistema de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO)⁸³, que se puede observar en la **tabla 1**.

Estadio FIGO	Característica
I	Carcinoma cervical confinado al útero (la extensión al cuerpo no debe ser tenida en cuenta).
IA	Carcinoma invasor diagnosticado sólo mediante microscopía. Invasión del estroma con una profundidad máxima de 5 mm y una extensión horizontal \leq a 7 mm. El compromiso del compartimento vascular, venoso o linfático no afecta la clasificación.
IA1	Invasión estromal \leq 3 mm en profundidad y \leq 7 mm de extensión horizontal.
IA2	Invasión estromal $>$ 3 mm y \leq 5 mm en profundidad, con una extensión horizontal \leq a 7 mm.
IB	Lesión clínicamente visible confinada al cuello uterino o lesión microscópica mayor que T1a/IA2.
IB1	Lesión clínicamente visible \leq 4 cm en su mayor diámetro.
IB2	Lesión clínicamente visible $>$ 4 cm en su mayor diámetro.
II	Carcinoma cervical que invade más allá del útero, pero no compromete la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina.
HA	Tumor sin invasión de parámetros.
IIA1	Lesión clínicamente visible \leq 4 cm en su mayor diámetro.
IIA2	Lesión clínicamente visible $>$ 4 cm en su mayor diámetro.
IIB	Tumor con invasión de parámetros, sin llegar a la pared pélvica.
III	Tumor que se extiende a la pared pélvica y/o compromete el tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis o alteración de la función renal.
IIIA	El tumor compromete el tercio inferior de la vagina, sin extensión a la pared pélvica.
IIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o alteración de la función renal.
IVA	El tumor invade la mucosa de la vejiga o del recto y/o se extiende más allá de la pelvis (el edema buloso no es suficiente para clasificar un tumor como T4).

Tabla 1. Estadificación del cáncer cérvico-uterino de acuerdo a los criterios de FIGO.

A pesar de los esfuerzos por realizar campañas de detección oportuna; en los países con economías emergentes; una gran cantidad de pacientes son diagnosticados se diagnostica con CCu localmente avanzado (IIB – IVA)⁵¹.

Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo del CCu; el más importante es el Virus del Papiloma Humano (VPH), ya que hasta el 99.7% de las pacientes con CCu están infectadas con VPH. Hay aproximadamente 130 tipos de VPH, de los cuales 13 son considerados de alto riesgo y claramente se han asociados al inicio de la carcinogénesis cervical¹¹. Los tipos de alto riesgo 16 y 18 se

encuentran en un 70% de los casos de cáncer cervical; por lo que son un factor importante en el desarrollo de esta neoplasia³⁴. Por el hecho de estar presente en el 99.7 % de los pacientes diagnosticados con CCu; se considera que el virus es una causa necesaria, pero no suficiente, para el desarrollo de la carcinogénesis⁵⁰. El principal factor para que se lleve a cabo la transformación de la célula tumoral es la desregulación de las proteínas (por medio de las oncoproteínas del VPH) que se encargan de mantener el adecuado crecimiento celular de la célula hospedera, lo que a su vez activa o desregula otras moléculas que van a promover la tumorigénesis^{33; 73}.

Morbilidad de cáncer cérvico-uterino

En las neoplasias que afectan a la mujer, el cáncer cérvico-uterino ha sido y sigue siendo una de las neoplasias malignas más comunes. Desde 1975 a 2008 el CCu se encontraba en segundo lugar a nivel mundial seguido del cáncer de mama, en 2008 se reportaron 529,000 casos y 274,000 muertes. Con el paso del tiempo, y gracias a los programas de detección oportuna, los casos descendieron, ocupando el quinto lugar contabilizando ambos sexos y el tercer lugar sólo en mujeres, disminuyendo un 0.4% en la incidencia y un 3.3% en la mortalidad ^{4;20}. Lamentablemente, en los países emergentes como México los estadios localmente avanzados son los que prevalecen (*ver figura 2*).

Estimación de casos en mujeres con cáncer (2012)

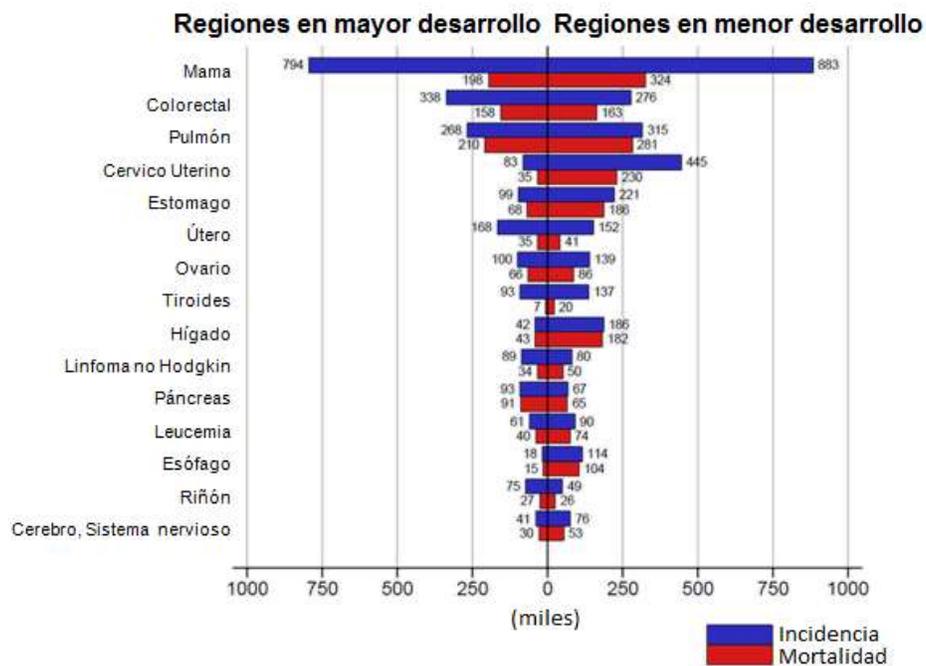


Figura 2. Distribución de casos en mujeres con cáncer en las regiones con mayor desarrollo contra las de menor desarrollo ²⁰.

Debido a que el principal factor de riesgo del CCu es el VPH (el cual se transmite por relaciones sexuales) muchas mujeres jóvenes llegan a estar infectadas, pero dado que el proceso de carcinogénesis es largo no se llega a detectar hasta una edad avanzada (35-40 años). La deficiencia de los programas para la prevención del CCu en los países con menor desarrollo promueve una mayor tasa de mortalidad en comparación a los países desarrollados (*ver figura 3*)^{10; 53}.

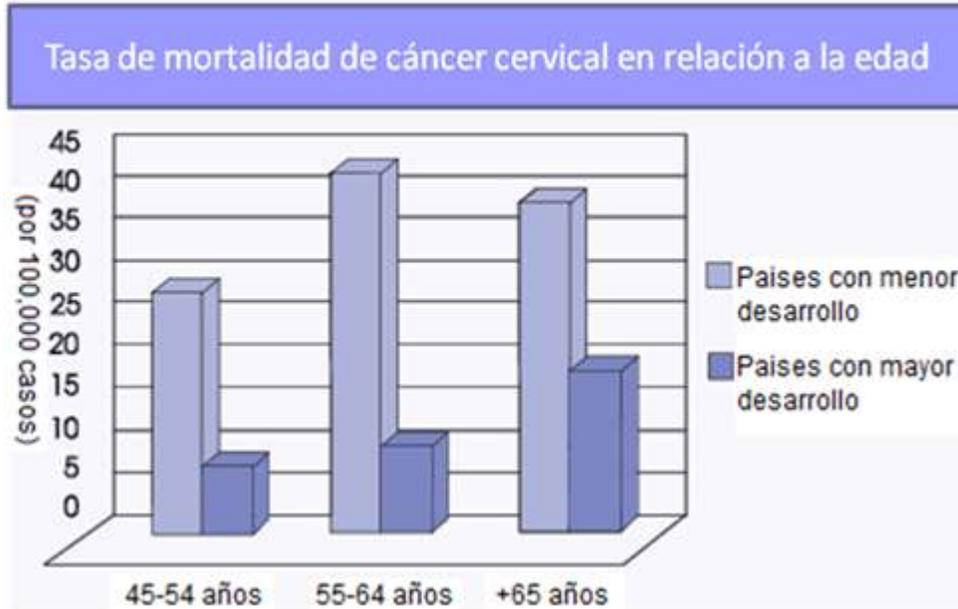


Figura 3. Distribución de la mortalidad en relación con la edad en mujeres con cáncer cérvico-uterino.

Actualmente, el CCu es uno de los principales problemas de salud en nuestro país. A pesar de contar con los medios para poder prevenir la neoplasia, el CCu permanece en segundo lugar de incidencia (14,000 casos) y mortalidad (5,000 casos) en cáncer en mujeres. Por lo que es de suma importancia implementar políticas de salud que ayuden a disminuir la tasa de incidencia en CCu y reducir los estadios avanzados en los que pronostican a las pacientes ²⁰.

Carcinogénesis cervical mediada por el VPH

Normalmente, el VPH infecta células proliferantes indiferenciadas de la capa basal del epitelio estratificado escamoso que pudiera quedar expuesto a través de

microheridas⁶⁸. El virus interactúa con la célula hospedera por medio de la unión de los proteoglicanos heparan sulfato y la oncoproteína L1 (la cual compone la mayor parte de la cápside). Una vez que se da esta interacción el virus entra por endocitosis mediada por clatrina o por caveolina y ahí el DNA viral es liberado y transportado al núcleo a través del rompimiento de enlaces disulfuro de la cápside³⁰. El genoma del VPH tiene un tamaño aproximado de 8 kb y no tiene las enzimas que necesarias para la replicación del genoma viral, por lo que utiliza la maquinaria de la célula hospedera⁵². Consecutivamente, el genoma del VPH se mantiene como un elemento extracromosómico gracias a la expresión de E1, una DNA helicasa dependiente de ATP necesaria para la replicación y la amplificación del episoma viral⁹, y E2 que es un factor de transcripción que permite la regulación de los genes E6 y E7⁴⁸. Adicionalmente, las proteínas E1 y E2 facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular.

El episoma viral permanece con un número bajo de copias en el núcleo y sólo se expresan las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7). La integración del genoma del VPH es un evento crucial para la progresión del tumor el cual ocurre con la escisión de los sitios E1/E2, ocasionando corrimiento del marco abierto de lectura y conllevando a la sobre expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7. Para que el DNA del VPH pueda ser replicado, E6 y E7 alteran el ciclo celular, ocasionando que la célula entre en fase S para la síntesis del DNA viral^{16; 89}. Para ello, E6 se encarga

de ubiquitinar a p53 por medio de la unión con E6AP (por sus siglas en inglés, termed E6-associated protein), y así p53 pueda ser degradado en el proteosoma, reprimiendo la reparación del DNA de la célula hospedera⁷⁶. A su vez, E7 se encarga de inactivar a la proteína pRb mediante su fosforilación, la hiper-fosforilación de pRb permite que se separe de factores de transcripción, como la familia E2F, y así se lleve a cabo la expresión de genes que participan en la progresión del ciclo celular⁶⁰. Por su parte, la oncoproteína E5 se asocia con la proliferación celular ya que se interactúa con el receptor del factor de crecimiento epidermal (REGF), además permite la evasión el sistema inmune inhibiendo la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (CMH de clase I)⁷⁷.

La siguiente fase se da por la diferenciación de las células epiteliales infectadas con VPH, debido a la replicación del DNA viral y también a la activación de la fase productiva del ciclo viral. En este punto se expresan los genes tardíos del VPH (L1 y L2). Las proteínas tardías L1 y L2 se expresan activamente en las capas superiores del epitelio cervical; su función es empaquetar el DNA viral para su posterior liberación e infección de otras células epiteliales con la ayuda de la oncoproteína E4. La infección por VPH puede estar asociada con cambios en la morfología epitelial que provocan verrugas planas benignas hiperproliferativas, condilomas o papilomas. El patrón de expresión del gen de VPH de alto riesgo en lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL) es muy similar al observado

en las verrugas, en donde los genes tardíos presentan una baja expresión y se completa el ciclo viral. Por el contrario, en las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL) y en el cáncer invasivo los genes E6 y E7 se expresan en todas las capas epiteliales de la mucosa y el ciclo de vida normal del virus no se puede completar por lo que no se producen partículas infecciosas (ver figura 4) ⁷⁴.

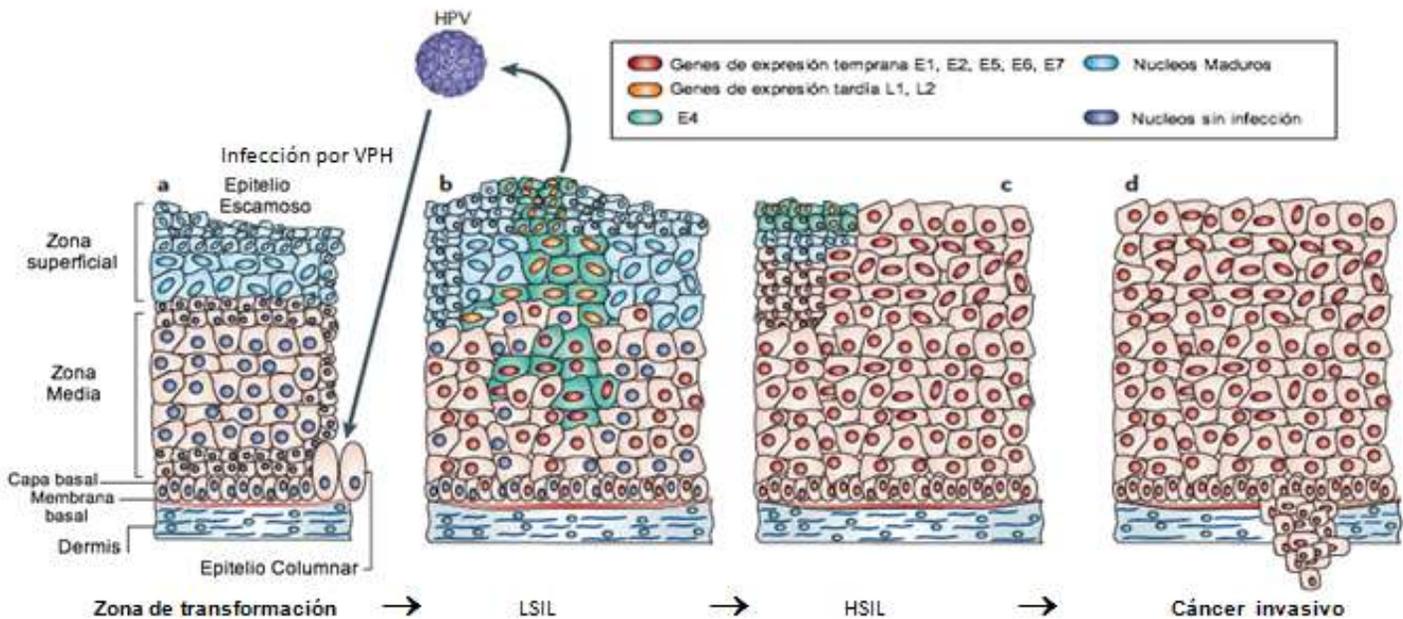


Figura 4. Carcinogénesis cervical mediada por el virus del papiloma humano. a) El VPH infecta las células columnares, que posteriormente formarán parte de la capa basal del epitelio estratificado en la zona de transformación, el virus penetra al interior de la célula por endocitosis. b) En las etapas posteriores a la infección se da la producción de las proteínas virales E1, E2, E5, E6 y E7, necesarias para la fase proliferativa. La etapa final en la infección por VPH es la producción de viriones, lo que ocurre en las capas superiores del epitelio, en el estrato promoviéndose la formación de las proteínas E1, E2 E4 y E5, así como la de las constituyentes de la cápside, L1 y L2. El VPH no es lítico y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye al egreso del virus de las capas superiores del epitelio ⁵⁹.

Tratamiento

Comúnmente se utilizan diferentes tratamientos contra el CCu, como cirugía, radioterapia y quimioterapia. Generalmente, la cirugía se utiliza como primera opción para las pacientes en estadios tempranos, lamentablemente en México hay prevalencia en pacientes que presentan estadios localmente avanzados. En estos casos la radioterapia es el principal tratamiento para las pacientes con CCu. En ocasiones el cisplatino se utiliza como tratamiento adyuvante de la radioterapia, ya que se ha reportado que radio-sensibiliza las células^{51; 66}.

Radioterapia

La radioterapia consiste en usar rayos X, gamma o partículas alfa de alta energía que afectan a células neoplásicas en constante división celular; sus aplicaciones principales son:

- Tratamiento del tumor primario.
- Reducción del tamaño del tumor antes de la cirugía.
- Eliminación de células cancerosas después de la cirugía y para el cáncer metastásico.

Sin embargo, aproximadamente del 30 al 50% de las pacientes que han sido tratadas con terapia convencional (dosis fraccionadas de 2 Gy, sumando 60 Gy)

presentan recurrencia de la enfermedad, debido a que adquieren resistencia a la radiación, siendo este el principal obstáculo para los pacientes que reciben radioterapia y quimio-radioterapia, ocasionando un pronóstico desfavorable para las pacientes^{39; 61; 82}.

Hasta el momento se conocen algunos de los factores que podrían estar asociados con la radio-resistencia, como p53, RAS, RAF-1, BCL-2 y survivina, los cuales son clave para la supervivencia y evasión de la apoptosis. Por otra parte, se ha visto que la radiación produce efectos letales en células a través de modificaciones en la expresión de enzimas antioxidantes y mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan el DNA, RNA y lípidos, ocasionando graves efectos citotóxicos. Proteínas como ATM, MRE11, RAD50, BRCA, Rad-3 y la proteína cinasa dependiente de ADN, todas involucradas con la reparación del ADN durante la radiación, se encuentran asociadas (directa o indirectamente) con la resistencia al tratamiento, sin embargo aún falta elucidar la forma en la que pudieran estar involucradas⁵⁷.

Aunque se conocen los posibles genes implicados en la resistencia a la radiación, aún permanecen inciertos cuáles son los mecanismos moleculares que regulan el fenotipo de multirresistencia^{5; 56 86}. Los miRNAs son moléculas que están implicados en la regulación negativa de genes involucrados en una gran variedad de

procesos oncogénicos ²³, por lo que podrían estar implicados en el proceso de radio-resistencia en tumores de CCu.

microRNAs

Los miRNAs son RNAs pequeños de cadena sencilla, que miden entre 20 y 25 nucleótidos de longitud y están involucrados en la regulación de la expresión génica. A nivel genómico, la mayoría se localizan en regiones intergénicas tanto como intrónicas. Los miRNAs se transcriben en forma de transcritos primarios (pri-miRNA) por medio de la RNA polimerasa II. Muchos de estos transcritos son poliadenilados, además de ser marcados con la 5' CAP para evitar su degradación. Posteriormente, la enzima RNasa III (Drosha) y la proteína DGCR8 interactúan con ellos: el papel de DGCR8 es reconocer las zonas de corte de los extremos 5' y 3' del pri-miRNA para que Drosha pueda cortar y así se produzca el pre-miRNA, el pre-miRNA es exportado del núcleo hacia el citoplasma por medio de la exportina 5. Una vez en el citoplasma la RNasa tipo III (Dicer), junto con TRBP, corta el loop del pre-miRNA para generar una doble cadena de miRNA. A continuación, la proteína argonauta 2 (Ago2) se encarga de cortar la doble hebra lo que produce un miRNA de una sola hebra (a partir de este momento se conoce como ac-pre-miRNA). En este punto, se forma el complejo denominado RISC (RNA-induced silencing complex), formado por Dicer, TRBP, Ago2 y la hebra de miRNA. Este complejo permite la hibridación del miRNA directamente con la región 3'UTR del mRNA blanco, lo que facilita la

posterior inhibición o degradación: si la unión del miRNA se complementa con mRNA éste será degradado; por el contrario, sólo si la unión es parcial se inhibirá el mRNA (ver figura 5)^{6, 84}.

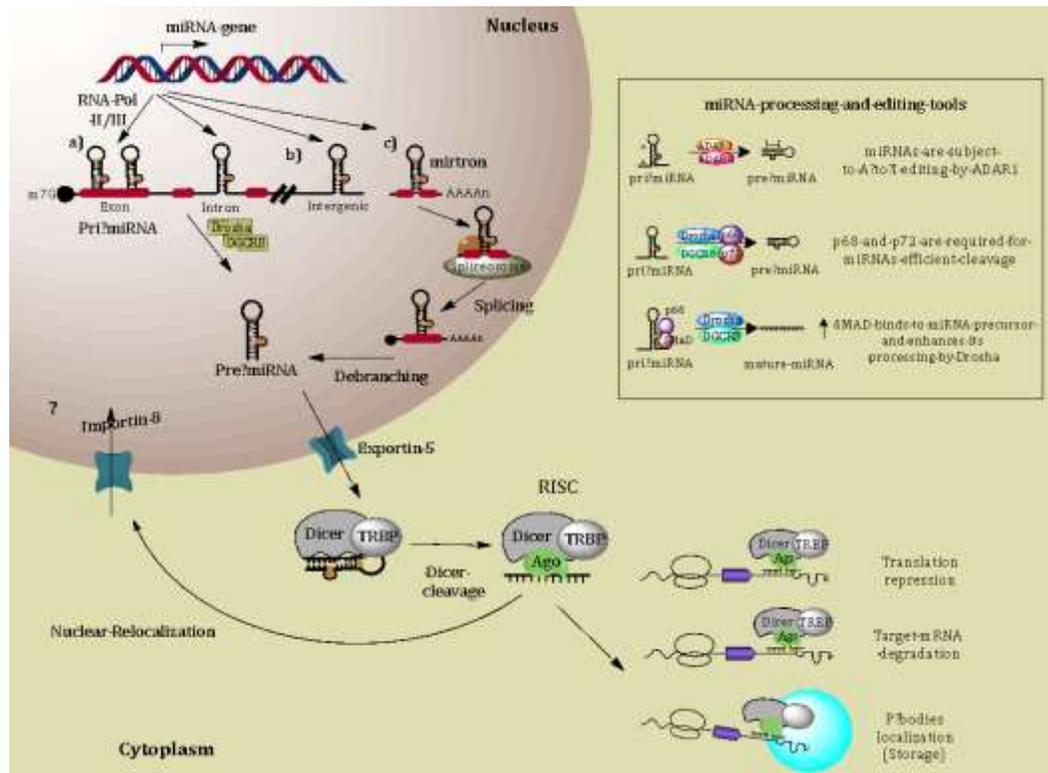


Figura 5. Procesamiento de miRNA. La RNA polimerasa II transcribe los miRNAs y son madurados a transcrito primario por medio de Drosha y DGCR8, el pri-miRNA es exportado al citoplasma, una vez ahí el complejo proteico DICER se encarga de cortar la estructura de horquilla del miRNA, quedando solamente un dúplex de RNA y una de ellas da lugar al miRNA maduro de unos 20-25 nt que se incorpora al complejo ribonucleoprotéico conocido como RISC el cual presenta el miRNA a la secuencia complementaria del mRNA blanco para su silenciamiento o degradación. Recientemente se ha visto que existen unas estructuras llamadas P-bodies, las cuales reconocen la interacción miRNA-mRNA, ocasionando que se almacene dentro de ellas el mRNA, por lo que no se lleva a cabo la traducción⁵⁷.

miRNAs asociados al proceso de carcinogénesis en CCu

Estudios recientes han demostrado que en diferentes tipos de cáncer se alteran los perfiles de expresión de varios miRNAs, y que estos regulan genes clave como oncogenes y genes supresores de tumores. Diferentes trabajos reportan que las oncoproteínas de VPH pueden inducir una expresión aberrante en algunos miRNAs. Por ejemplo, miR-25, miR-27a, miR-92a y miR-378 tienen la característica de suprimir la expresión de supresores de tumores, por lo que se conocen como miRNAs oncogénicos u oncomirs. Por el contrario, miR-16, miR-22, miR-29 y miR-100 actúan como miRNAs supresores de tumores, todos modulados por p53, E2F y c-Myc. Estas proteínas, a su vez, son reguladas por las proteínas E6 y E7, especialmente en VPH del tipo 16 y 18^{23; 81}. Se requiere la expresión activa de las proteínas E6 y E7 para la proliferación de las células tumorales, puesto que la alteración de centros de control del ciclo celular (como p53 y pRb) promovería la señalización autoproliferativa, la evasión de la muerte celular programada y la inmortalidad replicativa, entre otra⁵⁷.

Ejemplos de perfiles alterados durante la progresión del CCu demuestran que existe un papel importante entre la expresión de los miRNAs y la metástasis, observándose la sobreexpresión de miR-126, miR-96 y miR144 y una baja expresión en miR-657, miR-490-5p y miR323-3p. Estos resultados sugieren que los diferentes estadios de la patología están regulados por miRNAs específicos¹⁷.

En otro trabajo relacionado con CCu, demostró que la sub-expresión de miR-143 y la sobreexpresión de miR-21 están asociados con la regulación de PTEN. La sobreexpresión de miR-21 inhibe a PTEN provocando una mayor señal de supervivencia a través de la vía PI3K, la cual activa a AKT y mTOR, lo que conlleva a la reducción de la apoptosis y permite la proliferación celular ⁴⁵.

Por otro lado, en cáncer de mama se ha observado que la desregulación de miR-221 y miR-222 está asociada a la resistencia al tamoxifen, un quimioterapéutico utilizado en pacientes con receptor de estrógenos positivo ²². Además, Nataša Anastasov y colaboradores ³ propusieron que la sobreexpresión de miR-21 está directamente relacionada con la resistencia a la radiación en cáncer de mama, ya que este regula diversos genes que reparan el ADN, como Cdc25A. Otro estudio realizado en CCu propone que la sobre-expresión de miR-181a tanto en pacientes que no respondieron al tratamiento como en la línea celular SiHa contribuye a la radio-resistencia, debido a que inhibe la expresión de PRKCD, un gen pro-apoptotico

³⁶.

. Estudios de la interacción microRNAs-mRNA en cáncer de mama han demostrado que los miRNAs regulan diversos genes, como p53, JUN, Myc, BRCA1, PTEN, entre otros, los cuales a su vez regulan a otras proteínas o genes que le confieren a la célula la característica de proliferar, reparar el daño en el ADN y la

evasión de la apoptosis⁴¹. Estos análisis sugieren la participación de diferentes miRNAs involucrados en los mecanismos de la reparación del daño al DNA.

miR-125a y miR125b

En un trabajo previo, en nuestro grupo de investigación se observó que la expresión de miR-125a y miR-125b se inhibe significativamente en tumores de CCu, y que estos microRNAs podrían participar en la regulación de genes involucrados con la resistencia a la radiación. Hasta el momento no se ha establecido el papel que juegan miR-125a y miR-125b en el desarrollo de resistencia a la radioterapia en CCu, sin embargo se prevé que estos dos miRNAs podrían regular genes que promueven la supervivencia y la reparación del ADN ya que también se han visto involucrado en la resistencia a drogas^{41; 91}. Hasta ahora se sabe que p53 está implicado en la resistencia de algunos quimioterapéuticos y la radiación ionizante, además, este gen podría ser regulado por miR-125a y miR-125b^{32; 42; 43}. Por ello, el presente estudio permitirá conocer si miR-125a y miR-125b juegan realmente un papel en la radioresistencia de CCu y, de ser así, eventualmente podría servir para definir nuevas estrategias para el tratamiento de radioterapia. Por otra parte, podría permitir elucidar la posible interacción de los miRNAs con genes que se asocian al proceso de radioresistencia en CCu y los mecanismos por el cual la célula evade el tratamiento.

Justificación

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial: sólo en 2012 hubo 8.2 millones de muertes por esta enfermedad. Hasta el momento, se han hecho grandes esfuerzos para poder determinar los factores involucrados en la resistencia a los tratamientos convencionales en cáncer. Dentro de los distintos tipos de cáncer, el cervical es la segunda causa de muerte de mujeres mexicanas, esto se debe a que prevalecen las etapas localmente avanzadas (IIB-IVa), reflejando que el programa de detección oportuna con citología cervi-covaginal no es lo suficientemente adecuado⁵¹; para estas pacientes la tasa de supervivencia a cinco años es aproximadamente del 50%¹². La falla en el tratamiento convencional puede ser explicada por factores genéticos y epigenéticos, entre ellos los miRNAs. Los miRNAs intervienen en la regulación de genes implicados en el desarrollo y mantenimiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo CCu, y más recientemente se han implicado en el proceso de radio-resistencia. Un análisis previo de nuestro grupo de trabajo encontró que miR-125a y miR-125b están subexpresados significativamente en muestras de tumores radio-resistentes de CCu, por lo que podría sugerirse que miR-125a y miR-125b están asociados a la radio-resistencia. Además, trabajos recientes sugieren que miR-125a y miR-125b regulan una gran variedad de genes involucrados con la proliferación celular, reparación de ADN y evasión de apoptosis,

entre otros ⁴³. El objetivo del presente trabajo es determinar cuál es el papel de miR-125a y miR-125b en el proceso de radioresistencia.

Pregunta de investigación

¿Podrían miR-125a y miR-125b estar involucrados en la regulación del proceso de radio-resistencia en cáncer cervical? Y ¿Qué genes y mecanismos son regulados por estos miRNAs?

Hipótesis

Debido a que miR-125a y miR-125b se han visto involucrados en la regulación de diversos procesos moleculares que llevan a la resistencia a diferentes fármacos, estos miRNAs podrían participar en la modulación de la radio-resistencia del cáncer cervical.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar a miR-125a y miR-125b en el proceso de la modulación de radioresistencia en un modelo *in vitro* de cáncer cérvico-uterino.

Objetivos particulares

- Identificar los niveles de expresión de miR-125a y miR-125b en un modelo de línea celular radio-resistente.
- Identificar los posibles blancos moleculares de miR-125a y miR-125b que posiblemente intervengan en el proceso de radio-resistencia.

Material y métodos

Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares HeLa, CasKi y SiHa, las cuales fueron cultivadas en medio DMEM F12 con 2.5 mM de L-glutamina y 5% de suero fetal bovino a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Para generar las líneas tumorales radio-resistentes, se expusieron a dosis de radiación ionizante de 50-60 Gy, en dosis fraccionadas de 2 Gy, seleccionando aquellas células resistentes a la radiación. A las líneas tumorales radio-resistentes se abreviaron como HeLa RR, CasKi RR y SiHa RR mientras que las radio-sensibles, que no recibieron ninguna dosis de radiación, como HeLa RS, CasKi RS y SiHa RS.

Ensayo clonogénico

Para la realización del ensayo clonogénico, se sembraron 500 células en cada pozo de una placa de seis pozos: los primeros tres pozos corresponden al control en donde las células no fueron expuestas a radiación. Seguido de esto, se sembraron las células que previamente fueron sometidas a una dosis fraccionada de 2 Gy. Las células se resuspendieron en medio DMEM con 5% de suero fetal bovino y 1% de ampicilina y se dejaron incubar de 1 a 2 semanas. Una vez que se formaron las colonias de más de 50 células, se fijaron las células con 1:7 ácido acético/metanol y se tiñeron con cristal violeta al 1%. Finalmente se cuantificaron las colonias que estaban formadas por más de 50 células.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo con el reactivo TRIzol Reagent para cada una de las líneas celulares (HeLa RS y HeLa RR, CasKi RS y CasKi RR, SiHa RS y CasKi RR). Rapidamente, se agregaron 500 μ L de TRIzol en cajas de 25 mL despegando la monocapa celular. El extracto se traspaso a un tubo de 1.5 mL y posteriormente se le agregaron 200 μ L de cloroformo y se incubo durante 3 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min, a 4°C. Se recuperó la fracción acuosa y se adicionaron 500 μ L de isopropanol, dejándose durante 30 min a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm durante 25 min a 4°C. Una vez

centrifugado, se descartó el sobrenadante y se recuperó el precipitado de RNA. Se hicieron lavados con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7,500 rpm durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se repitieron los lavados dos veces más. Una vez sin el precipitado se adicionaron 30 µL de agua inyectable. Finalmente, el RNA fue cuantificado mediante un espectrofotómetro de la marca EPOCH. Se verificó la integridad del RNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. A continuación, las muestras con el buffer de carga se depositaron en los pozos en un gel de agarosa con bromuro de etidio y se dejó migrar a 90 V durante 50 min, visualizándose con luz ultravioleta.

Determinación de los niveles de expresión de miRNAs mediante sondas TaqMan

Se cuantificó la expresión de miR-125a y miR-125b en las líneas celulares radio-resistentes (RR) y radio-sensibles (RS), para lo cual se utilizaron los ensayos *TaqMan MicroRNA assays* de *Applied Biosystems*.

RT-qPCR

Síntesis de cDNA. Se utilizó el kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription*, el cual permite sintetizar el cDNA específico para miR-125a y miR-125b en las muestras RR y RS, el procedimiento se realizó con base a la **tabla 2**:

Componentes	Volumen de Master mix por reacción (15 µL)
100 nM dNTPs	0.15 µL
Transcriptasa reversa 50 U/µL	1 µL
Buffer de transcriptasa reversa	1.50 µL
Inhibidor de la transcriptasa	0.19 µL
Agua libre de nucleasas	4.16 µL
Volumen total	7 µL

Tabla 2. Componentes del RT (reverse transcription)

Una vez preparado la mezcla de reacción para cada una de las muestras RR y RS se agregaron 100 ng RNA en un volumen de 5 µL y 3 µL del oligonucleótido correspondiente a miR-125a, miR-125b y U6. Las condiciones para la amplificación de las reacciones se enlistan en la **tabla 3**.

Tiempo	Temperatura
30 min	16°C
30 min	42°C
5 min	85°C
∞	4°C

Tabla 3. Condiciones del RT

Una vez obtenido el cDNA de ambos microRNAs (miR-125a, miR-125b) y el control U6 en cada condición (RR y RS) se procedió a la qPCR para medir el nivel de expresión. Para la mezcla de reacción se utilizaron los siguientes componentes que se encuentran en la **tabla 4**.

Componentes	Volumen de mezcla por duplicado de la reacción (10 µL)
Sonda TaqMan pequeños RNAs	1.2 µL
Mezcla Taqman	12 µL
Agua libre de nucleasas	9.2 µL
Volumen total	22.4 µL

Tabla 4. Componente del qPCR

Posteriormente, se tomó 1.6 μL del producto de RT de la muestra y se agregaron 22.4 μL de la mezcla de reacción. A continuación, se colocaron 10 μL de la reacción final (por duplicado) en una placa de 96 pozos para su amplificación en el equipo LightCycler 480 de Roche, utilizando los parámetros de la **tabla 5**.

Paso	Activación de la enzima	PCR	
	Hold	Ciclo (40 ciclos)	
		Desnaturalización	Alineamiento / extensión
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tiempo	10 min	15 seg	60 seg

Tabla 5. Parámetros del qPCR

Los C_T de la amplificación se obtuvieron mediante el software LightCycler 480 software release 1.5.0 SP4. Para calcular la cuantificación relativa se utilizó el método de Livak ($\Delta\Delta C_t$). El método de Livak mejor o método del delta-delta C_t o $2^{-\Delta\Delta C_t}$ considera dos tipos de muestra, las muestras que se denominan muestras control (en nuestro caso las muestras consideradas muestras radio-sensibles, MC) y las muestras denominadas muestras problema (muestras radio-resistentes, MP).

A su vez, este método considera dos tipos de miRNAs los denominados miRNAs problema (cada unos de los miRNAs candidatos a marcadores moleculares,

miP) y los miRNAs de referencia (miRNAs empleados para la normalización de los datos de expresión, miR).

Con base a estos conceptos se realizaron los siguientes cálculos

$$DCt(MP) = Ct(miP, MP) - CT(miR, MP)$$

$$DCt(MC) = CT(miP, MC) - CT(miR, MC)$$

El cálculo de DDCt se realizó de la siguiente manera

$$DDCt = DCT(MP) - DCT(MC)$$

Finalmente, la tasa de expresión de cada miRNA fue evaluada con la siguiente fórmula;

$$2^{-DDCt} = \text{tasa de expresión normalizada.}$$

Selección de probables blancos y cuantificación del nivel de expresión en líneas radio-sensibles y radio-resistentes.

Selección de blancos

Los genes blanco de interacción de miR-125a y miR-125b fueron seleccionados por medio de la plataforma miRTarBase, la cual contiene una base de datos que nos permite obtener blancos validados (por diferentes técnicas

moleculares) y no validados (predicción bioinformática). Con esta información elegimos seis blancos en base a su función y posible participación en el proceso de radio-resistencia (*ver tabla 13*).

Diseño de oligonucleótidos para amplificación por RT-qPCR de los blancos moleculares

Los oligos se diseñaron por medio del algoritmo primer-BLAST y se analizaron en Genome Browser in silico PCR ³⁷; que nos permite observar la región flanqueada por los oligonucleótidos. Las propiedades de los oligos se encuentran enlistadas en la **tabla 6**.

Nombre	Num. de bases	Secuencia	Tm
CDKN1A-Fw	20	CGAAGTCAG TTCCTTGTGGA	58.4°C
CDKN1A-Rv	19	CATTAGCGCATCACAGTCG	57.5°C
SP1 -Fw	20	GGGAAACGCTTCACACGTTT	60.5°C
SP1-Rv	20	ACCTGGGCCTCCCTTCTTAT	60.5°C
E2F7-Fw	19	TTGTTGACAGACAGCAAGC	55°C
E2F7-Rv	20	CTGTTTTCTGCTTGGCCTTT	56.4°C
AKT1-Fw	20	TCTTTGCCGGTATCGTGTGG	60.5°C
AKT1-Rv	20	GTGATCATCTGGGCCGTGAA	60.5°C
RAF1-Fw	16	GGCCTGGCTCCCTCAG	58.4°C
RAF1-Rv	19	CGGCGCTGATAGCCAACT	59.5°C

Tabla 6. Características de los oligos

Transcripción reversa

Para la síntesis de cDNA se emplearon 500 ng de RNA en un volumen de 10 μ L de cada una de las muestras RR y RS, la mezcla de reacción se preparó con base a la **tabla 7**.

Componentes	Volumen por reacción
10X RT Buffer	2 μ L
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 μ L
10X Random Primers	2 μ L
Transcriptasa Reversa	1 μ L
Inhibidor de RNAsa	1 μ L
Agua libre de nucleasas	3.2 μ L
RNA 500 ng	10 μ L
Total	20 μ L

Tabla 7. Componentes de la reacción de transcripción reversa

Las condiciones de amplificación se describen en la **tabla 8**.

Tiempo	Temperatura
10 min	25°C
120 min	37°C
5 min	85°C
∞	4°C

Tabla 8. Parámetros del RT

Estandarización de las condiciones de amplificación (PCR de punto final)

Antes de poder realizar la qRT-PCR para medir el nivel de expresión de los blancos, es necesario determinar las condiciones que favorezcan la amplificación de la región flanqueada por medio de PCR punto final. Para ello, se modificaron las condiciones de amplificación y las concentraciones de cada uno de los componentes de la PCR. Las condiciones de amplificación que fueron utilizadas para cada par de oligonucleótidos se enlistan en la **tabla 9**.

Componentes	20 μ L	Concentración final
10X Buffer -Mg	2 μ L	1X
25 mM MgCl ₂	1.2 μ L	2.5 mM
10 mM dNTPs Mix	0.5 μ L	0.2 mM
10 mM Forward Primer	0.2 μ L	0.5 mM
10 mM Reverse Primer	0.2 μ L	0.5 mM
Molde de DNA	1 μ L	50 ng
Taq DNA Polimerasa	0.1 μ L	1-2.5 unidades por reacción
H ₂ O	14.4	

Tabla 9. Componentes del PCR

Se utilizaron las condiciones de amplificación recomendadas por el protocolo *Taq DNA polimerase recombinant* de la marca *thermo fisher scientific*, las cuales se

muestran en la **tabla 10**. La temperatura de alineamiento fue de 61°C para cada par de oligonucleótidos.

Paso	Temperatura °C	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	10 s	35
Alineamiento	61	30 s	
Elongación	72	30 s	
Elongación final	72	10 min	1
Enfriamiento	4	∞	1

Tabla 10. Condiciones de amplificación.

El producto de PCR punto final se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, el cual migró a 90 V durante 50 min. El resultado fue visualizado con luz ultravioleta.

RT-qPCR

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación para los oligonucleótidos se prosiguió con la qRT-PCR. Para ello, se preparó la mezcla de reacción para cada una de las muestras RR y RS a partir del cDNA previamente

sintetizado.. Se utilizó el kit SYBR Select Master Mix for CFX, en la **tabla 11** se muestran los componentes.

Componentes	20 μ L por pozo
SYBR Select Master Mix for CFX	10 μ L
Forward Primers	0.4 μ L
Reverse Primers	0.4 μ L
cDNA	1 μ L
H ₂ O libre de nucleasa	8.2 μ L

Tabla 11. Componentes del qRT-PCR

En una placa de 96 pozos se colocó la mezcla de reacción de cada muestra (por duplicado). Se utilizaron las condiciones recomendadas en el protocolo SYBR Select Master Mix for CFX como se enlistan en la **tabla 12**.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación UDG	50°C	2 min	1

Activación UP AmpliTaq® Fast DNA Polymerase	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	15 sec	40
Alineación/extensión	60°C	1 min	

Tabla 12. Condiciones de amplificación de la qRT-PCR.

Los CT de la amplificación se obtuvieron mediante el software Bio-Rad CFX Manager. Para normalizar la expresión de los mensajeros se cuantificó el mRNA de GAPDH. Se calculó el valor relativo de expresión de los genes bajo los diferentes condiciones utilizando el método de Livak ($\Delta\Delta Ct$).

Análisis estadístico

Se analizaron las diferencias en los niveles de expresión de miR-125a, miR-125b y los blancos moleculares en las células resistentes y sensibles a radiación ionizante mediante una prueba de t-student, con el objeto de ver si los niveles de expresión eran significativamente diferentes en las condiciones comparadas.

Detección del nivel de proteína de los blancos moleculares

Los datos obtenidos en la RT-qPCR de los blancos fueron correlacionados con el nivel de proteína, para lo que se utilizó la técnica de Western Blot.

Extracción de proteína

La extracción de proteína de las células RR y RS se realizó con el reactivo RIPA, al cual se le adiciono un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete ROCHE), siguiendo las instrucciones del fabricante (Santa Cruz Biotechnology). La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo con el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) en un espectrofotómetro de microplacas a una longitud de onda de 595 nm (Biotek).

Western Blot

Se separaron 50 µg de proteínas en cada pozo de electroforesis SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis) en geles de poliacrilamida al 12% y al 18%, utilizando un equipo Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad) a 80 volts durante 2 horas. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (povinil difluoropropilideno) con un poro de 0.45 µm, mediante transferencia semi-seca en el equipo Trans-blot turbo (Bio-Rad) a

20 volts durante 30 min. Al terminar la transferencia, la membrana de PVDF se bloqueó con una solución de leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.1% durante 2 horas. Posteriormente se hicieron tres lavados de la membrana con TBS-Tween 0.1% y se incubó de 14 a 16 h a 4°C con el anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados en el estudio fueron: Anti-p21 (SC-817, Santa Cruz Biotechnology), Akt1/2/3 (SC-8312), Sp1 (SC-420), E2f-7 (SC-66870) y β -actina (SC-47778) como control de carga.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo primario se hicieron dos lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1%, posteriormente dos de 10 min y por último un lavado con TBS durante 10 min. Se prosiguió con la incubación del anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peroxidasa de rabano (Horseradish peroxidase, HRP 34095 Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas a 4°C. Finalmente, se hicieron tres lavados de 10 min con TBS-Tween 0.1% y por último un lavado con TBS durante 10 min. Se cubrió la membrana con el sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (#34095, Thermo Scientific). La detección de las proteínas se realizó a través del digitalizador C-Digit Blot Scanner (Li-COR), empleando el software ImageStudio.

Resultados

Viabilidad de las líneas radio-resistentes.

Para corroborar que las células radio-resistentes tenían una Dosis Letal 50 (dosis en la cual el 50% de las células tiene la capacidad de formar colonias) mayor que las líneas radio-sensibles se realizaron ensayos clonogénicos. Estos ensayos nos permitieron validar que las células radio-resistentes mantuvieron diferencias respecto de su contraparte radio-sensible. En la *figura 6* puede observarse que más del 50% de las células HeLa radio-resistentes son capaces de generar colonias bajo una dosis de 3.3 Gy, mientras que sus parentales resisten menos bajo estas dosis (en este caso, sólo el 30% de ellas puede generar colonias). En el caso SiHa (*ver figura 7*) el 50% de las células radio-resistentes generan colonias en una dosis de 2 Gy. Mientras que CasKi radio-resistente tiene una DL50 bajo 3 Gy (*ver figura 8*). Esto indica que las líneas celulares radio-resistentes tienen la capacidad de sobrevivir a dosis mayores que sus respectivas parentales.

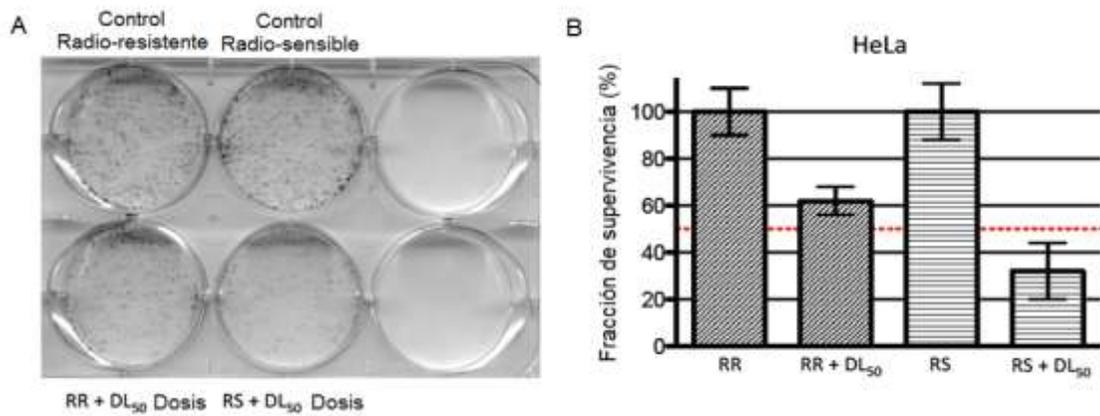


Figura 6. Ensayo clonogénico de HeLa, Imagen de las colonias formadas (A), DL50 de las líneas RR contra su parental (B).

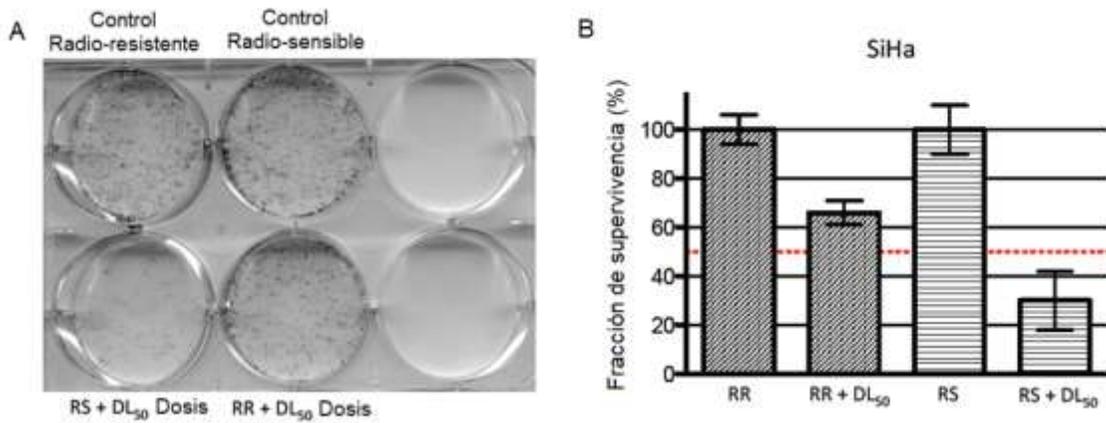


Figura 7. Ensayo clonogénico de SiHa, Imagen de las colonias formadas (A), DL50 de las líneas RR contra su parental (B).

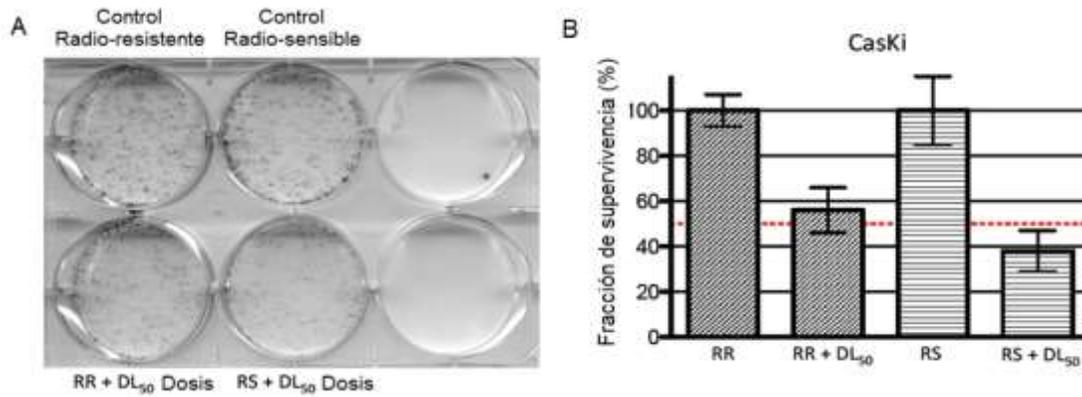


Figura 8. Ensayo clonogénico de CasKi, Imagen de las colonias formadas (A), DL50 de las líneas RR contra su parental (B).

Purificación de RNA

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se analizó la integridad del RNA obtenido de las líneas celulares RR y RS, se colocaron 500 ng de cada muestra en los pozos de un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, el cual migró a 60V durante 40 min. En la *figura 9* se pueden apreciar las bandas que corresponden al RNA 28s y el RNA 18s y lo cual nos indica que nuestro RNA se encuentra íntegro por lo que se procedió a realizar la reacción de RT-qPCR.

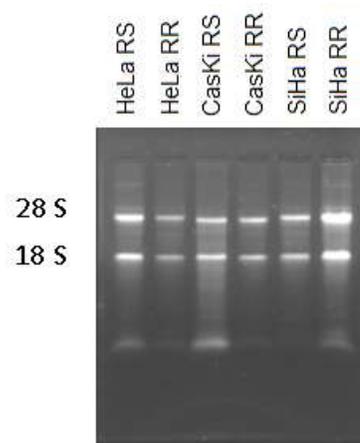


Figura 9. Gel de integridad del RNA. En la banda superior se observa el RNA 28S seguido del RNA 18S.

Valoración de los microRNAs control para el modelo de radio-resistencia y radio-sensibilidad.

Para poder normalizar nuestros datos se evaluaron dos microRNAs endógenos, RNU44 y U6 (referencia), en las líneas celulares radio-resistentes y radio-sensibles, seleccionando el que tuviera una expresión homogénea entre todas las líneas celulares de estudio. En la *figura 10A y 10B* se observa que U6 tiene un comportamiento homogéneo en todas las líneas celulares radio-resistentes y radio-sensibles en comparación con RNU44, por esta razón se decidió utilizar a U6 como control.

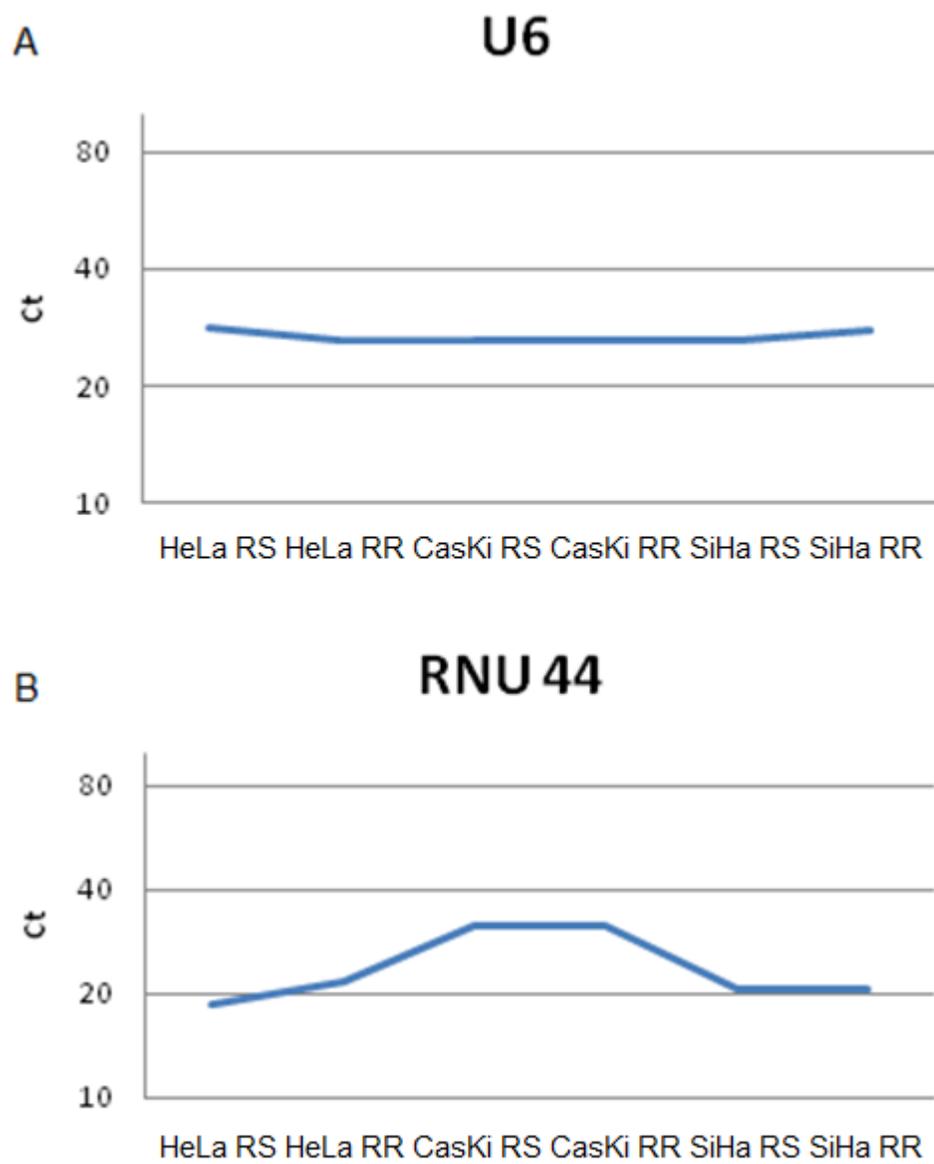


Figura 10. Señal detectable de fluorescencia de U6 y RNU 44 en las diferentes líneas celulares Radio-sensible (RS) y Radio-resistente (RR).

Obtención de la expresión relativa de los microRNAs a partir de las líneas celulares.

Una vez que valoramos cual sería el mejor control endógeno para nuestro trabajo se procedió a medir los niveles de expresión de miR-125a y miR-125b en las líneas celulares RR con dosis de 2 Gy contra sus parental, y los resultados revelan que la expresión de miR-125a es 0.85 veces menor en HeLa RR con respecto a HeLa RS. De igual forma, miR-125b se encontró 0.61 veces menos expresado en HeLa RR comparada con su respectivo control sin radiación (*ver Figura 11*). Por el contrario, la expresión de miR-125a se encontró 2.14 veces más elevada en SiHa RR contra su control radio-sensible, mientras que la de miR-125b es 3.36 veces más elevada en células SiHa RR con respecto a su parental (*ver Figura 12*). Además, ambas líneas celulares muestran diferencias significativas entre los niveles de expresión de miR-125a y miR-125b (*ver figuras 11 y 12*). En el caso de CasKi (*ver figura 13*) no hubo diferencias significativas entre los miRNAs de estudio bajo las diferentes condiciones. Con estos resultados se podría pensar que la expresión de miR-125a y miR-125b se asocia con el fenómeno de radio-resistencia en las líneas celulares HeLa y SiHa, sin embargo, en CasKi no muestra la misma desregulación de estos microRNAs. Posiblemente se deba a su origen tisular. Debido a que HeLa presentó el mismo

comportamiento que los tumores de CCu que no respondieron al tratamiento, se utilizó este tipo celular como modelo de radio-resistencia.

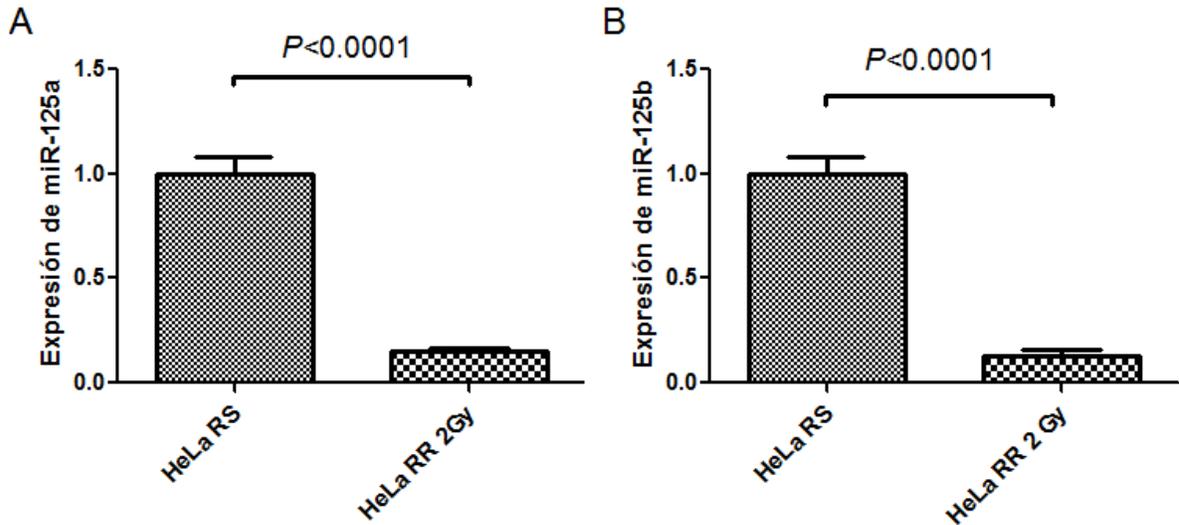


Figura 11. Perfiles de expresión de los miRNAs. (A) Expresión relativa de miR-125a en la línea celular HeLa RR sometidas a 2 Gy contra su parental. (B) Expresión de miR-125b HeLa RR con 2 Gy contra su control.

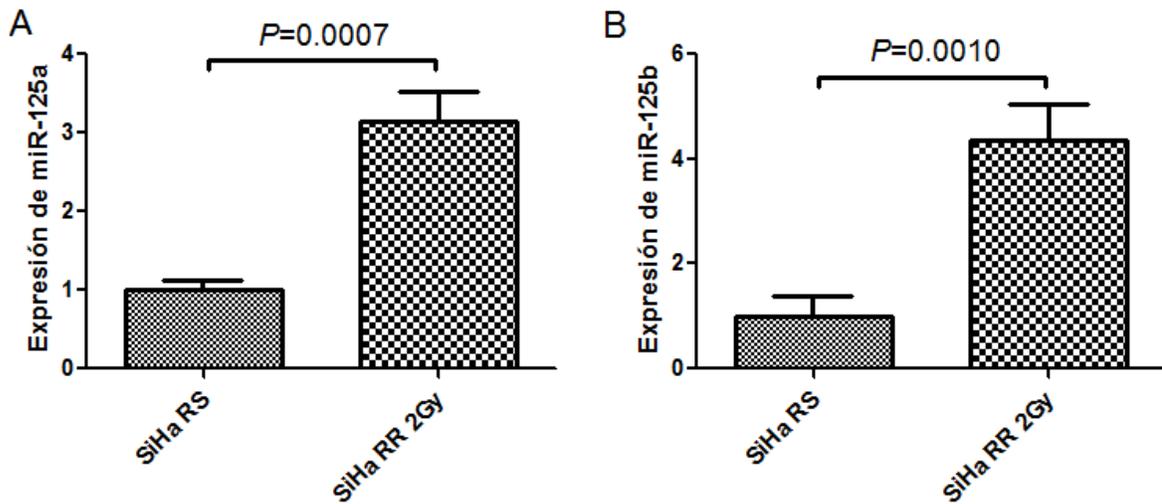


Figura 12. Perfiles de expresión de miR-125b y miR-125b (A) Expresión relativa de miR-125a en la línea celular SiHa RR sometidas a 2 Gy contra su parental. (B) Expresión de miR-125b SiHa RR con 2G y contra su control.

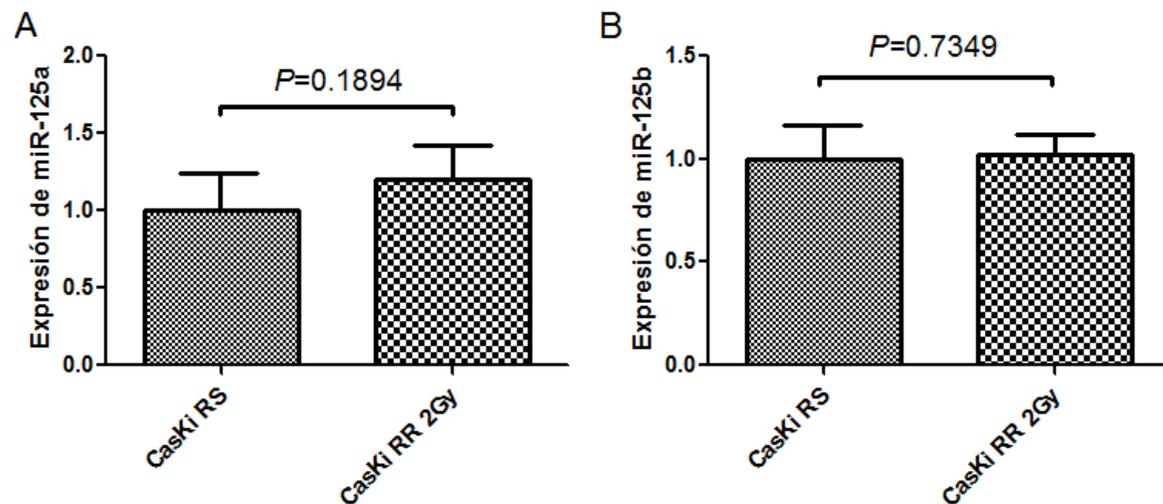


Figura 13. Perfiles de expresión de los miRNAs. (A) Expresión relativa de miR-125a en la línea celular CasKi RR sometidas a 2 Gy contra su parental. (B) Expresión de miR-125b CasKi RR con 2 Gy contra su control.

La expresión de miR-125a y miR-125b es dependiente de la radiación ionizante

Para evaluar si miR-125a y miR-125b eran dependientes del estímulo (dosis fraccionada de 2 Gy), se midieron los niveles de expresión en las líneas HeLa RS,

HeLa RS con 2Gy, HeLa RR y HeLa RR con 2Gy. En la *figura 14* se observan los niveles de expresión de ambos microRNAs en las cuatro condiciones, la expresión de miR-125a y miR-125b disminuye bajo una dosis subletal (2Gy) en células sensibles, indicando que ambos miRNAs dependen del estímulo de radiación en células que no habían sido expuestas a radiación ionizante. Notablemente, HeLa RR (con y sin 2 Gy) mantiene el mismo nivel de expresión a pesar del estímulo. Lo cual nos lleva a especular que el fenotipo en las líneas radio-resistente es diferente al de las radio-sensibles.

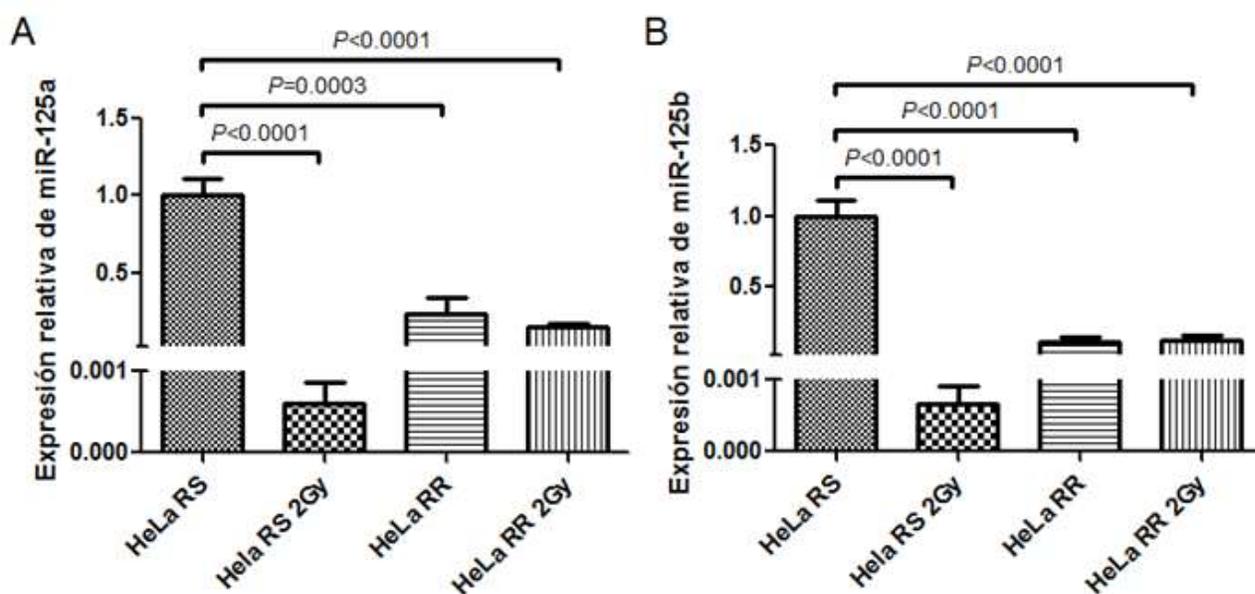


Figura 14. Perfiles de expresión de los miRNAs. (A) Expresión de miR-125a en HeLa bajo dosis de radiación (2 Gy). (B) Expresión de miR-125b en HeLa bajo dosis de radiación (2 Gy).

Determinación de posibles blancos de unión de miR125a y miR-125b

Mediante un análisis bioinformático en la plataforma miRTarBase se determinaron los posibles blancos de miR-125a y miR-125b que pudieran estar involucrados en el proceso de resistencia a la radiación, moléculas en principio implicadas en procesos de reparación del ADN, proliferación y supervivencia. A su vez se tomaron en cuenta cuales ya han sido validados por medio de técnicas de biología molecular, y los que han sido pronosticados por análisis bioinformáticos (ver *tabla 13*).

miR-125a		miR-125b	
Validados	No validado	Validados	No validado
CDKN1A	SPI	AKT1	E2F7
	E2F7	RAF1	

Tabla 13. Posibles blancos de miR-125a y miR-125b involucrados con la radioresistencia utilizando los algoritmos de miRTarBase, los genes validados ya se encuentran reportados con blancos de estos miRNAs mientras que los no validados sólo se han determinado por análisis bioinformático.

Determinación de los blancos por medio de RT-qPCR

Para determinar si había correlación entre los niveles de expresión de los microRNAs y los niveles de expresión de posibles blancos moleculares, se valoró su expresión por medio de qRT-PCR. Para ello, en primer lugar se estandarizaron las condiciones de amplificación por medio de PCR punto final (*ver figura 15*). Posteriormente se realizó una qRT-PCR. En la *figura 16* se muestran las gráficas de los niveles de expresión relativa de cada blanco. Los resultados no fueron los esperados pues no se encontró correlación del nivel de expresión de miR-125a y miR-125b con los mensajeros de SP1, E2F7, AKT1 Y RAF1; sin embargo, se observó que CDKN1A sí tiene correlación con la expresión de los microRNAs (*ver figura 16A*). La expresión de CDKN1A en las células HeLa radio-sensibles se encuentra disminuida, mientras que en las HeLa radio-resistentes aumenta significativamente. Interesantemente aumentó la expresión en HeLa RS con 2Gy contra Hela RS, lo cual nos estaría indicando que la expresión de CDKN1A es dependiente del estímulo de radiación (2Gy) como sucede con ambos miRNAs. Una vez que se determinó que CDKN1A podría ser un posible blanco de miR-125a y/o miR-125b se prosiguió con el análisis del nivel de proteína de este gen.

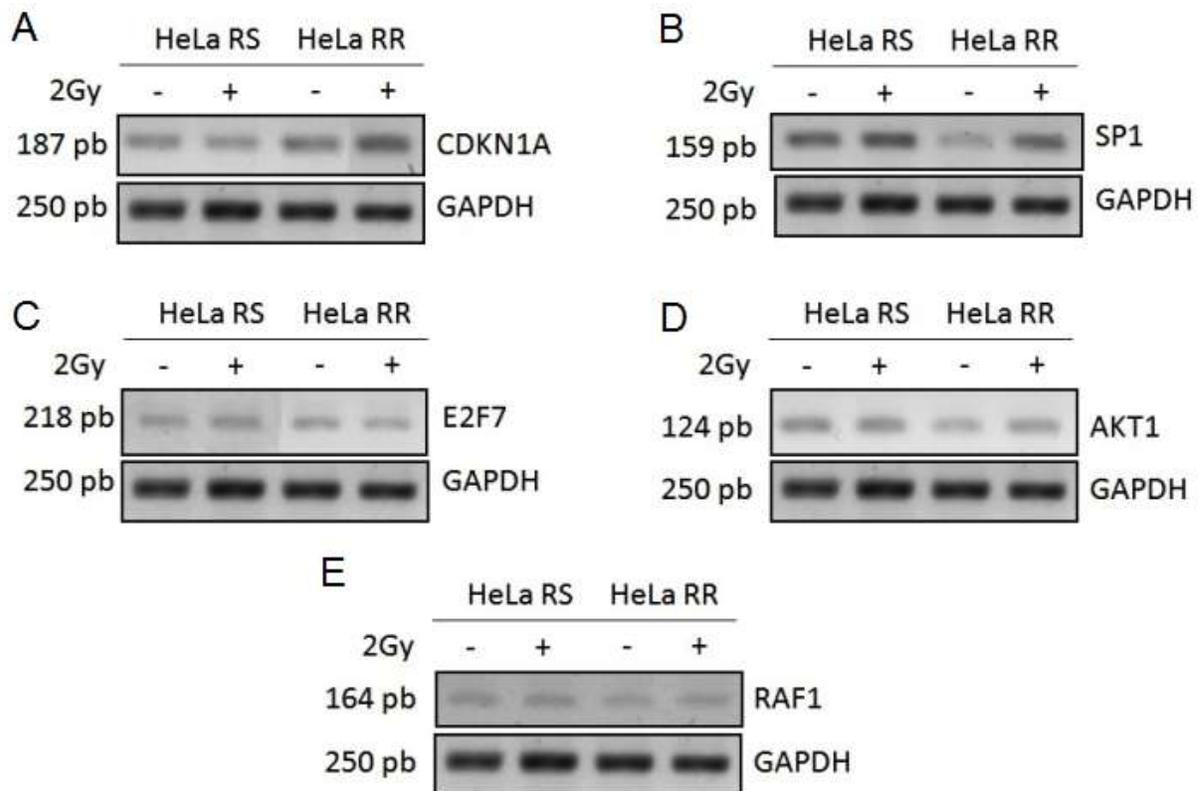


Figura 15. Detección de la amplificación de los blancos por PCR de punto final por medio de electroforesis con HeLa RS contra HeLa RR. (A)CDKN1A, (B)SP1, (C)E2F7, (D)AKT1 y (E)RAF1.

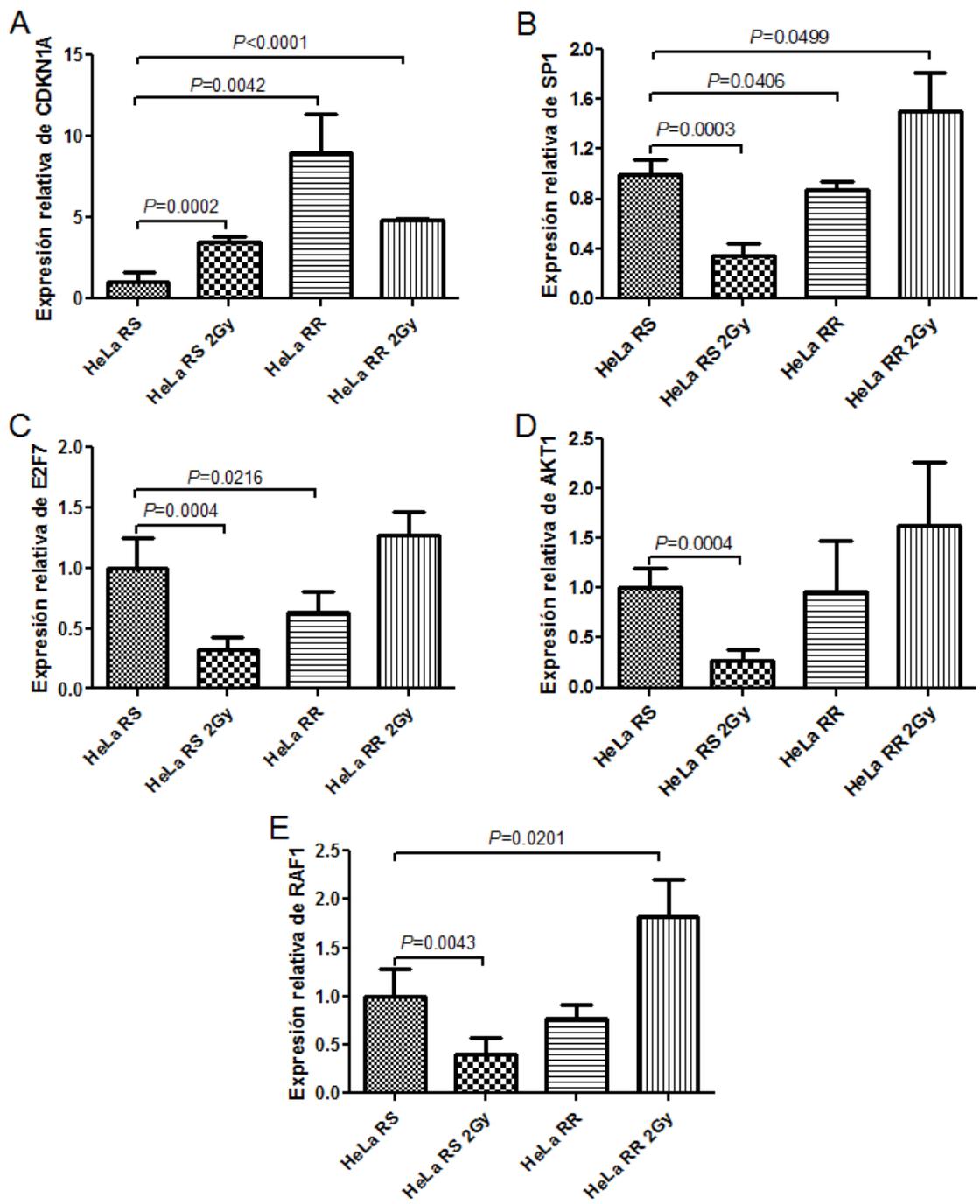


Figura 16. Perfiles de expresión de los posibles blancos. (A) Expresión de CDKN1A en HeLa bajo diferentes condiciones (B) Expresión de SP1. (C) Expresión de E2F7. (D) Expresión de AKT1. (E) Expresión de RAF1.

Expresión de p21 blanco de miR-125a

De acuerdo al resultado anterior se analizó el nivel de proteína de CDKN1A (p21) por medio de Western Blot, además se realizó la densitometría. En la *Figura 17* puede observarse la detección de p21. Notablemente existe un patrón similar entre mRNA (*ver figura 16A*) y la proteína, lo cual nos indica que miR-125a y miR-125b tiene un efecto sobre p21 a nivel de mRNA como a nivel de proteína.

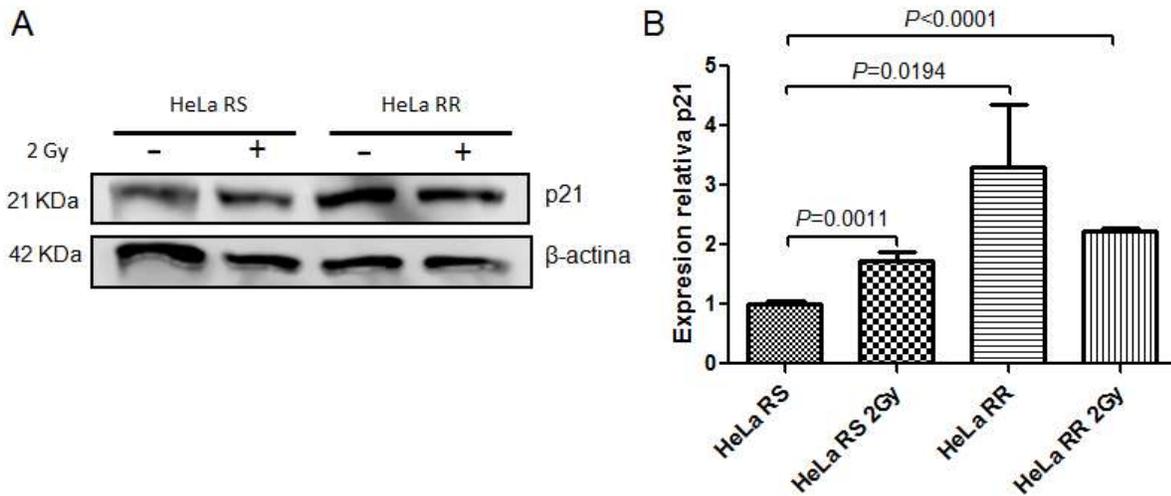


Figura 17. Expresión relativa de p21. (A) Western Blot de p21 con las diferentes condiciones. (B) Densitometría de p21 bajo los distintos tratamientos.

En conclusión, existe una correlación entre el nivel de expresión de CDKN1A y miR-125a y miR-125b, por lo que podría ser un blanco potencial. Que además podría estar involucrada en la radio-resistencia en cáncer cervical. Por otra parte, los blancos validados como AKT1 y RAF-1 no se ven afectados por la expresión de ambos microRNAs.

Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos la sobreexpresión de miR-125a y miR-125b se asocia con el proceso de radio-resistencia adquirida en CCu. Mediante el análisis bioinformático descubrimos que algunos de sus blancos como p53, algunos miembros de E2F, AKT1, RAF-1, lin-28a, SP1, CDKN1A, entre otros, están involucrados en procesos biológicos como la reparación del DNA, crecimiento celular y evasión de la apoptosis. Nuestro estudio demuestra que miR-125a y miR-125b actúa como supresor de tumores por medio de la regulación de p21 el cual fue el principal blanco asociado al proceso de radio-resistencia en CCu. En este sentido es importante recalcar que los miembros de la familia miR-125 son microRNAs que puede promover el desarrollo del fenotipo tumoral o inhibirlo en diferentes tipos de tumores, por ejemplo; cáncer de mama, hepatocarcinoma, melanoma, cáncer de vejiga, osteosarcoma, carcinoma celular cutáneo escamoso entre otros, sin embargo aún no se ha descrito la relación entre la familia de miR-125 con CCu. Distintos estudios han demostrado que estos miRNAs tienen una gran cantidad de blancos que le permiten regular diversos procesos que promueven el desarrollo del cáncer ⁶⁹.

Scott y colaboradores determinaron que miR-125a y miR-125b actúan como supresores de tumores por medio de la regulación de ERBB2 y ERBB3 en cáncer de mama. Al estar subexpresado ambos microRNAs, ERBB2/3 se sobre expresa aumentando la resistencia a los fármacos en las líneas celulares⁶³. De igual forma,

Hofmann y colaboradores hallaron correlación entre los niveles de expresión de miR-125b y c-Raf-1 en cáncer de mama, La presencia de miR-125b tiene como resultado la disminución de los niveles de proteína endógena de c-Raf-1, ocasionando una disminución la proliferación celular y aumento en la apoptosis²⁹. Estos trabajos demostraron su función como supresor de tumores sin embargo, miR-125b también puede actuar como onco-miR induciendo metástasis por medio de STARD13 en cáncer de mama⁷¹. En otro estudio se confirmó la participación de miR-125b en el proceso de resistencia a la Temozolomida, indicando que miR-125b es un regulador indirecto de la actividad de NF-kB por medio de TNFAIP3 Y NKIRAS2, ocasionando la evasión de la apoptosis y la proliferación celular en Glioblastoma²⁴. Sorprendentemente, un estudio en cáncer de ovario demostró que miR-125b se encontraba subexpresado en una línea celular de ovario resistente a paclitaxel, sin embargo en la misma línea celular de ovario, resistente a cisplatino, miR-125b se sobreexpresaba, lo cual sugirió que miR-125b puede tener un rol opuesto en diferentes líneas celulares resistentes a los fármacos⁶⁷. Esto nos indica que la regulación de miR-125b puede ser fármaco específico. Tomando en cuenta lo anterior podemos ver que la familia de miR-125 está involucrada en el proceso de carcinogénesis actuando como supresor de tumores u onco-miR. Sin embargo, debido a la gran cantidad de blancos que presentan esta familia de miRNAs el proceso de carcinogénesis puede no ser similar en los diferentes tipos de tumores⁵⁸;

En este estudio buscamos y evaluamos los blancos candidatos de miR-125a y miR-125b (*ver tabla 13*), los cuales tienen funciones asociadas a la reparación del DNA, evasión de apoptosis y proliferación, además de estar relacionados con la resistencia al tratamiento en distintos tipos de cáncer. Uno de ellos es el factor de transcripción Sp1 que regula la expresión de diversos genes involucrados en proliferación, apoptosis y reparación de DNA. Sus modificaciones post-traduccionales pueden ser fosforilaciones, acetilaciones, glucosilación y sumoilación, modulando así su interacción con los factores de remodelación de cromatina, el DNA, la maquinaria de transcripción así como otros factores de transcripción que incrementen o inhiban la expresión de genes⁷. Principalmente se le asocia con la respuesta a la radiación ionizante y H₂O₂ ya que ATM se encarga de fosforilarlo para que facilite la reparación del rompimiento de doble cadena, por medio del reclutamiento de proteínas que se unen al promotor impidiendo su expresión de los genes⁷⁰. Interesantemente se ha reportado en numerosos estudios que Sp1 se encuentra sobre expresado en diversos tipos de tumores incluso en CCu y que esto promueve la carcinogénesis^{13; 15; 49}. Un estudio reporto que Sp1 se encuentra sobre expresado en cáncer nasofaríngeo y que se correlaciona con tumores en estadios avanzados y metástasis, además que los pacientes con una alta expresión de Sp1 tienen menos respuesta a la radioterapia contra los que presentan una baja expresión⁸⁰. De acuerdo a los datos obtenidos en nuestro estudio SP1 (*ver figura 16B*) cuando HeLa radio-resistente es expuesta a una dosis de radiación de 2Gy SP1 se sobre-expresa,

lo cual podría suponer que se están llevando a cabo mecanismos de reparación del DNA y la supervivencia de las células. Por otra parte, cuando expusimos a las células radio-sensibles a la dosis de 2Gy SP1 se sub expresó. Aunque este resultado no concuerda con los antecedentes reportados; Jian-Ying Chuang y colaboradores sugirieron que SP1 tiene un papel dual, y que la sobre expresión de Sp1 promueve la apoptosis por medio de p53. Como es conocido HeLa se encuentra infectada por el virus VPH, lo que conlleva a una deficiencia de p53. Pero ellos sugieren que HeLa a pesar de estar infectada puede contener una cantidad suficiente de p53 que promueve la apoptosis a través de SP1, por lo que al sobre expresar a Sp1 las células inhiben su crecimiento y promueven la apoptosis¹⁵, partiendo de este razonamiento podríamos suponer que HeLa RS a 2Gy disminuyó la expresión de Sp1 para evadir la apoptosis y así seguir proliferando sin importar el daño al DNA. Nuestros resultados referentes a la regulación de SP1 por medio de miR-125a no son contundentes, ya que no hay correlación entre los niveles de expresión, posiblemente SP1 esté regulado por otros factores como los descritos e impiden ser regulados por miR-125a.

En el caso de E2F7, el cual es un factor de transcripción dentro de la familia E2F, que actúa como un inhibidor de la progresión del ciclo celular cuando hay daño al DNA pero también tiene una influencia en el proceso de reparación del mismo ⁹⁰, además un estudio en cáncer de mama sugiere que la sobreexpresión de E2F7

reprime la expresión de miR-15a/16 lo cual incrementa la sobreexpresión de Ciclina E1 y Bcl-2 ocasionando la resistencia al tamoxifen¹⁴, con base a lo anterior se propuso que existe una relación entre E2F7 y el cáncer, sin embargo en nuestro modelo no encontramos asociación entre miR125a y/o miR125b con E2F7, y a su vez no existió asociación con la radioresistencia en este modelo(*ver figura 16C*).

Al contrario de los blancos antes mencionados AKT1 si se ha descrito que es regulado por miR-125a-3p y miR-125b incluso se ha involucrado en la radioresistencia. La activación aberrante de Akt prevalece en las células tumorales, por lo que se encuentra sobre expresada, y está involucrada con la proliferación, la supervivencia, el crecimiento celular, el metabolismo de la glucosa, la motilidad y la angiogénesis⁷². Lihi Ninio-Many y colaboradores demostraron que miR-125a-3p se encuentra regulando a Akt de manera indirecta teniendo un impacto en la proliferación y la migración en células de cáncer de próstata⁵⁴. Por otra parte estudios han sugerido que miR-125b regula la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR ya que al restaurar la expresión de miR-125b en la línea celular A673 se observó inhibición de la proliferación celular, migración e invasión así como el arresto del ciclo celular y la inducción de la apoptosis⁴⁴. Además se ha reportado en diferentes líneas celulares la influencia de PI3K/Akt con la respuesta a la radiación ionizante, específicamente se ha demostrado que la fosforilación de Akt1 en S473 está asociada con la respuesta a la radioterapia en pacientes con CCu en estadios

localmente avanzados, aún se desconoce el mecanismo por el cual Akt regula la supervivencia celular sin embargo unos de los principales mecanismos sería su actividad anti-apoptótica, ya que Akt fosforilado puede desactivar proteínas pro-apoptóticas como BAD, BAX y caspasa 9⁴⁶. Sin embargo, en nuestro trabajo no encontramos diferencias entre el nivel de expresión de AKT y miR-125b (*ver figura 16D*), tal vez esto se deba a que generalmente AKT se encuentra sobreexpresado en HeLa RS y aunque lo exponamos a la radiación ionizante no genera cambios en su expresión. Por otra parte se desconoce la razón por la cual AKT se sub-exprese en HeLa RS a 2Gy ya que AKT claramente es un proto-oncogen.

Raf-1, también conocido como c-Raf, es un intermediario de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK que se encarga de regular la proliferación celular. Por lo que la activación excesiva de esta vía está asociada al desarrollo de la carcinogénesis diversos tumores^{38; 47}. Se ha reportado que miR-125b se une complementariamente a la 3'UTR de Raf-1, reduciendo el nivel de proteína endógeno provocando que se inhiba la proliferación y la supervivencia en cáncer de mama²⁹. Adicional a esta información la sobreexpresión de Raf-1 se ha visto involucrado en la resistencia a la radioterapia en cáncer de próstata³⁵. Lo cual concuerda con datos del estudio donde HeLa RR 2Gy se sobre-expresa (*ver figura 16E*), sin embargo no hay correlación entre el nivel de miR-125b con HeLa RR ni HeLa RS 2Gy, por lo que se podría suponer que existe otro mecanismo regulador de Raf-1 bajo esas condiciones.

De acuerdo a la literatura CDKN1A, que codifica para p21, es un inhibidor de las cinasa dependientes de ciclina, la cual al unirse con la cilina-CDK2, CDK1 y CDK4/6 inhibe su función regulando la progresión del ciclo celular en la fase G1-S (*ver figura 18*), por lo cual también puede ocasionar senescencia. Uno de los principales factores que activan a p21 es p53 ya que al existir un daño en el DNA es necesario detener el ciclo celular para su posterior reparación, en caso de que la restauración sea inadecuada p53 promueve la apoptosis¹⁹. p21 es bien conocido como un supresor de tumores debido a su función, pero recientes estudios han demostrado que dependiendo del contexto celular y las circunstancias puede actuar como pro-oncogen o supresor de tumores independientemente de p53².

Un estudio en el 2010 determino que CDKN1A es blanco directo de miR-125a por medio de ensayos de luciferasa⁸⁵. Adicionalmente p21 se ha asociado con la resistencia a la radioterapia. En el 2001 se propuso que la sobreexpresión de p21 estaba relacionada con la resistencia a los rayos gamma en gliomas, ya que aumentaba la supervivencia y suprimía la apoptosis con o sin la presencia de p53⁴⁰. Stephen G. Maher y colaboradores sugirieron que el arresto celular y la acumulación de los mecanismos de p21 contribuyen a la radio-resistencia en adenocarcinoma de esófago³¹. Nuestros resultados son muy parecidos a lo reportado ya que al estar reprimida la expresión de miR-125a y miR-125b en HeLa RR (*ver figura 13*) los niveles de CDKN1A aumentan tanto a nivel de mRNA (*ver figura 16A*), como de

proteína (*ver figura 17*). Aún se desconoce el mecanismo por el cual p21 puede mediar la radio-resistencia pero lo que podría estar pasando en nuestro modelo se asocia al papel anti-apoptótico de p21, ya que cuando p21 es fosforilado se acumula en el citoplasma, ocasionando la represión de factores pro-apoptóticos (*ver figura 18*). p21 también puede regular indirectamente la transcripción de diversos genes. Otro papel importante es el de la regulación de la síntesis y reparación del DNA, ya que se une a PCNA (un complemento de la DNA polimerasa), por lo que cuando p21 es fosforilado en Thr₄₅ se inhibe la interacción con PCNA, ocasionando la reparación y síntesis del DNA². Otro mecanismo de reparación que se propone es el de PARP-1 ya que p21 estimula la unión de PARP-1 con los intermediarios de la reparación del rompimiento del DNA de una sola cadena como la de doble cadena¹⁸.

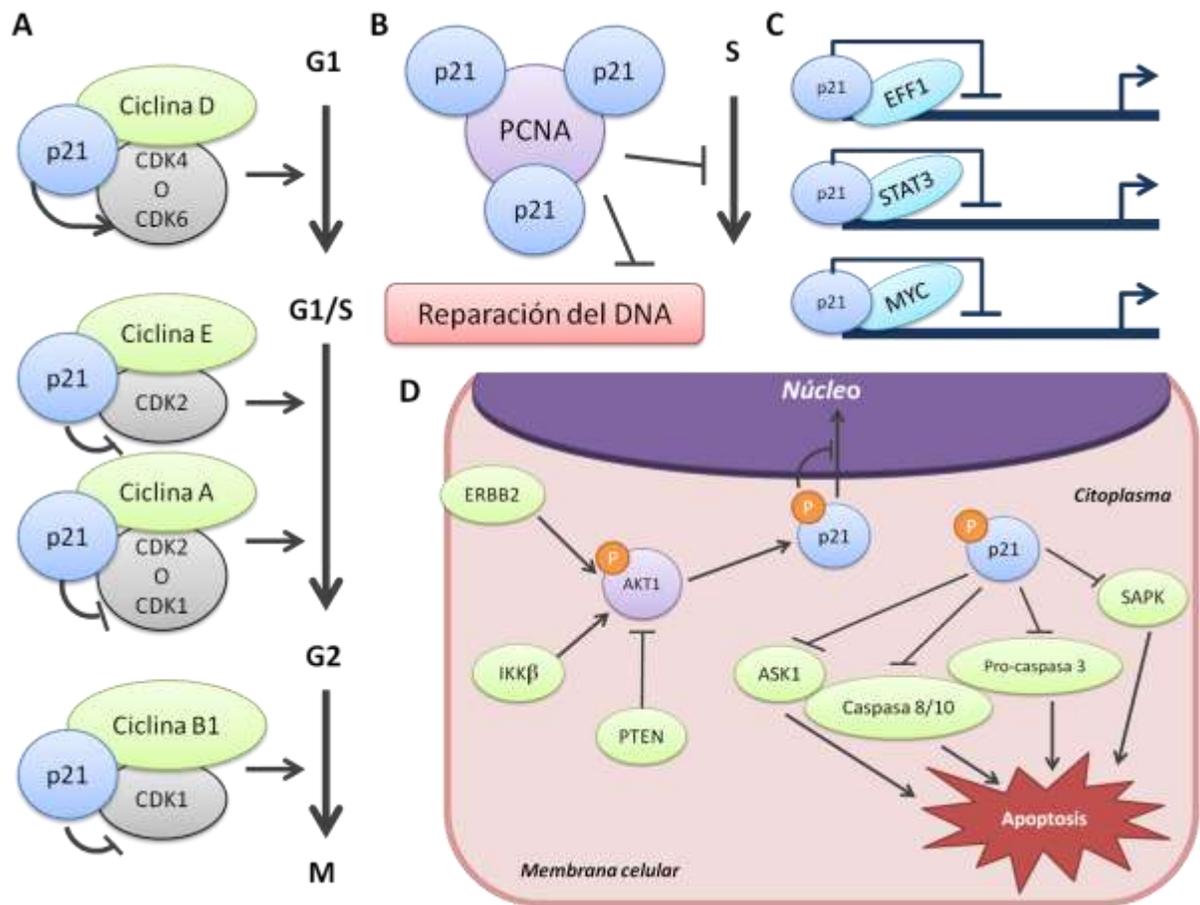


Figura 18. Función molecular de p21 involucradas con cáncer. (a) Bajo ciertas condiciones p21 regula la actividad de algunas ciclinas dependientes de cinasa. (b) p21 regula a PCNA de manera negativa por lo que regula indirectamente la reparación del DNA. (c) La expresión de genes regulados por E2F1, STAT3 y MYC también es regulada por p21. (d) Como oncoproteína p21 regula la evasión de la apoptosis.

En conclusión nuestro trabajo demuestra que p21 es blanco de miR-125a y miR-125b que promueve la radio-resistencia en CCu. La disminución de miR-125a y miR-125b permite que el transcrito de CDKN1A sea traducido ocasionando la

acumulación de p21 en el citoplasma e inhibiendo a factores pro-apoptóticos como caspasa 8 y 10, SAPK, ASK1 y la pro-caspasa 3 (ver figura 19). En la mayoría de los trabajos se reporta a p21 sub expresada en líneas celulares radio-resistentes, por lo cual es de interés el comportamiento que tiene en nuestro modelo. No obstante falta elucidar cual es el mecanismo por el cual la célula tumoral de CCu no responde al tratamiento cuando hay un aumento de p21.

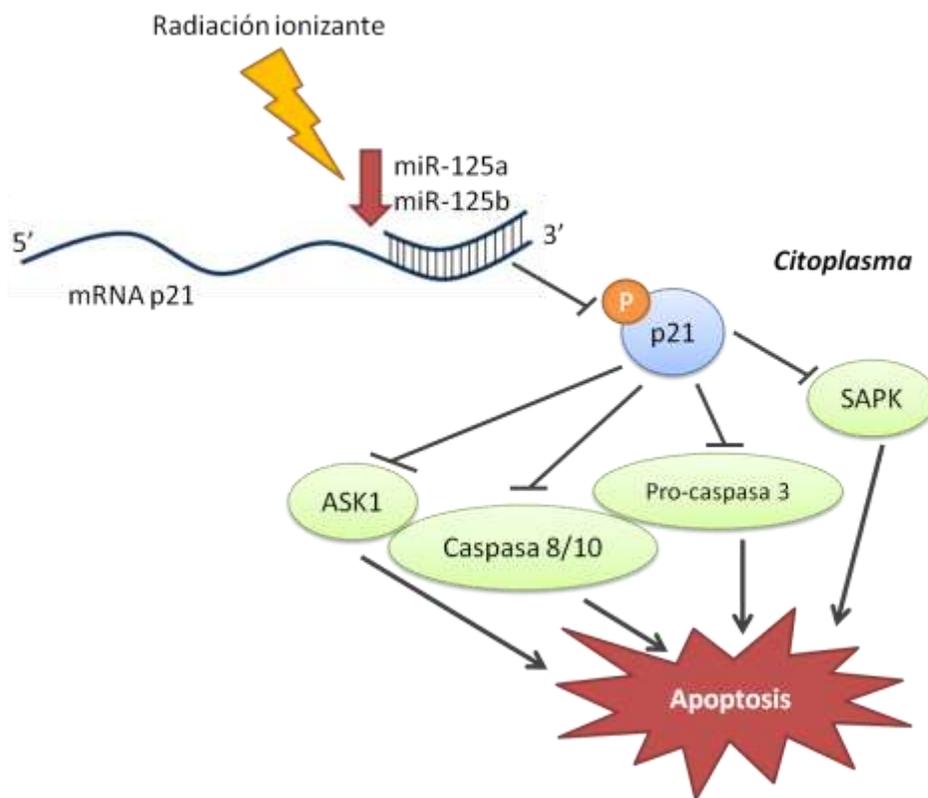


Figura 19. Mecanismo de radio-resistencia propuesto en nuestro modelo.

Conclusión

- Se logró determinar los niveles de expresión de miR-125a y miR-125b en un modelo in vitro de CCu radio-resistente.
- Se evaluaron cinco posibles blancos de unión con miR-125a y miR-125b de los cuales p21 fue el único en estar asociado con el nivel de expresión de ambos microRNAs.
- miR-125a y miR-125b puede estar participando en la radio-resistencia en CCu mediante la regulación negativa de p21 por el proceso de evasión de la apoptosis.

Bibliografía

1. (2012). Mexico Cancer Profile. (http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=1866&Itemid=3904).
2. Abbas, T y Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9, 400-414.
3. Anastasov, N, Hofig, I, Vasconcellos, IG, Rappl, K, Braselmann, H, Ludyga, N, Auer, G, Aubele, M y Atkinson, MJ. (2012). Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. *Radiat Oncol* 7, 206.
4. Arbyn, M, Castellsague, X, de Sanjose, S, Bruni, L, Saraiya, M, Bray, F y Ferlay, J. (2011). Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol* 22, 2675-2686.
5. Arora, A, Singh, S, Bhatt, AN, Pandey, S, Sandhir, R y Dwarakanath, BS. (2015). Interplay Between Metabolism and Oncogenic Process: Role of microRNAs. *Transl Oncogenomics* 7, 11-27.
6. Bartel, DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

7. Beishline, K, Kelly, CM, Olofsson, BA, Koduri, S, Emrich, J, Greenberg, RA y Azizkhan-Clifford, J. (2012). Sp1 facilitates DNA double-strand break repair through a nontranscriptional mechanism. *Mol Cell Biol* 32, 3790-3799.
8. Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat Rev Genet* 12, 846-860.
9. Bergvall, M, Melendy, T y Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology* 445, 35-56.
10. Clifford, G, Franceschi, S, Diaz, M, Munoz, N y Villa, LL. (2006). Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/26-34.
11. Cuschieri, K, Brewster, DH, Graham, C, Nicoll, S, Williams, AR, Murray, GI, Millan, D, Johannessen, I, Hardie, A y Cubie, HA. (2014). Influence of HPV type on prognosis in patients diagnosed with invasive cervical cancer. *Int J Cancer*.
12. Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis, C. (2008). Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 26, 5802-5812.

13. Choi, ES, Nam, JS, Jung, JY, Cho, NP y Cho, SD. (2014). Modulation of specificity protein 1 by mithramycin A as a novel therapeutic strategy for cervical cancer. *Sci Rep* 4, 7162.
14. Chu, J, Zhu, Y, Liu, Y, Sun, L, Lv, X, Wu, Y, Hu, P, Su, F, Gong, C, Song, E, Liu, B y Liu, Q. (2015). E2F7 overexpression leads to tamoxifen resistance in breast cancer cells by competing with E2F1 at miR-15a/16 promoter. *Oncotarget* 6, 31944-31957.
15. Chuang, JY, Wu, CH, Lai, MD, Chang, WC y Hung, JJ. (2009). Overexpression of Sp1 leads to p53-dependent apoptosis in cancer cells. *Int J Cancer* 125, 2066-2076.
16. de Freitas, AC, Coimbra, EC y Leitaõ Mda, C. (2014). Molecular targets of HPV oncoproteins: potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1845, 91-103.
17. Ding, H, Wu, YL, Wang, YX y Zhu, FF. (2014). Characterization of the microRNA expression profile of cervical squamous cell carcinoma metastases. *Asian Pac J Cancer Prev* 15, 1675-1679.
18. Dutto, I, Sukhanova, M, Tillhon, M, Cazzalini, O, Stivala, LA, Scovassi, AI, Lavrik, O y Prosperi, E. (2016). p21CDKN1A Regulates the Binding of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 to DNA Repair Intermediates. *PLoS One* 11, e0146031.

19. Elbendary, AA, Cirisano, FD, Evans, AC, Jr., Davis, PL, Iglehart, JD, Marks, JR y Berchuck, A. (1996). Relationship between p21 expression and mutation of the p53 tumor suppressor gene in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Clin Cancer Res* 2, 1571-1575.
20. Ferlay, J, Soerjomataram, I, Dikshit, R, Eser, S, Mathers, C, Rebelo, M, Parkin, DM, Forman, D y Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.
21. Fernald, K y Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* 23, 620-633.
22. Gan, R, Yang, Y, Yang, X, Zhao, L, Lu, J y Meng, QH. (2014). Downregulation of miR-221/222 enhances sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen through upregulation of TIMP3. *Cancer Gene Ther* 21, 290-296.
23. Greco, D, Kivi, N, Qian, K, Leivonen, SK, Auvinen, P y Auvinen, E. (2011). Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One* 6, e21646.
24. Haemmig, S, Baumgartner, U, Gluck, A, Zbinden, S, Tschan, MP, Kappeler, A, Mariani, L, Vajtai, I y Vassella, E. (2014). miR-125b controls apoptosis and

temozolomide resistance by targeting TNFAIP3 and NKIRAS2 in glioblastomas. *Cell Death Dis* 5, e1279.

25. Hanahan, D y Weinberg, RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

26. Hanahan, D y Weinberg, RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

27. Heather, H. (2009). *Cervical Cancer*.(New York: Rosen Publishing)

28. Hirschey, MD, DeBerardinis, RJ, Diehl, AM, Drew, JE, Frezza, C, Green, MF, Jones, LW, Ko, YH, Le, A, Lea, MA, Locasale, JW, Longo, VD, Lyssiotis, CA, McDonnell, E, Mehrmohamadi, M, Michelotti, G, Muralidhar, V, Murphy, MP, Pedersen, PL, Poore, B, Raffaghello, L, Rathmell, JC, Sivanand, S, Vander Heiden, MG, Wellen, KE y Target Validation, T. (2015). Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 35 Suppl, S129-150.

29. Hofmann, MH, Heinrich, J, Radziwill, G y Moelling, K. (2009). A short hairpin DNA analogous to miR-125b inhibits C-Raf expression, proliferation, and survival of breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7, 1635-1644.

30. Horvath, CA, Boulet, GA, Renoux, VM, Delvenne, PO y Bogers, JP. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* 7, 11.

31. Hotte, GJ, Linam-Lennon, N, Reynolds, JV y Maher, SG. (2012). Radiation sensitivity of esophageal adenocarcinoma: the contribution of the RNA-binding protein RNPC1 and p21-mediated cell cycle arrest to radioresistance. *Radiat Res* 177, 272-279.
32. Jiang, L, Chang, J, Zhang, Q, Sun, L y Qiu, X. (2013). MicroRNA hsa-miR-125a-3p activates p53 and induces apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Invest* 31, 538-544.
33. Jimenez-Wences, H, Peralta-Zaragoza, O y Fernandez-Tilapa, G. (2014). Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol Rep* 31, 2467-2476.
34. Johannsen, E y Lambert, PF. (2013). Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology* 445, 205-212.
35. Kathleen M. Woods Ignatoski, NKG, Sonja M. Markwart, Adaikkalam Vellaichamy, Arul M. Chinnaiyan, Kam Yeung, Michael E. Ray, and Evan T. Keller. (2008). Loss of Raf Kinase Inhibitory Protein (RKIP) induces radioresistance in prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72, 153-160.
36. Ke, G, Liang, L, Yang, JM, Huang, X, Han, D, Huang, S, Zhao, Y, Zha, R, He, X y Wu, X. (2013). MiR-181a confers resistance of cervical cancer to radiation therapy through targeting the pro-apoptotic PRKCD gene. *Oncogene* 32, 3019-3027.

37. Kent WJ, SC, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. (2002). The human genome browser at UCSC. In *Genome Res.* pp 996-1006.
38. Khazak, V, Astsaturov, I, Serebriiskii, IG y Golemis, EA. (2007). Selective Raf inhibition in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 11, 1587-1609.
39. Kitahara, O, Katagiri, T, Tsunoda, T, Harima, Y y Nakamura, Y. (2002). Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. *Neoplasia* 4, 295-303.
40. Kokunai, T, Urui, S, Tomita, H y Tamaki, N. (2001). Overcoming of radioresistance in human gliomas by p21WAF1/CIP1 antisense oligonucleotide. *J Neurooncol* 51, 111-119.
41. Kutanzi, KR, Yurchenko, OV, Beland, FA, Checkhun, VF y Pogribny, IP. (2011). MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenetics* 2, 171-185.
42. Le, MT, Teh, C, Shyh-Chang, N, Xie, H, Zhou, B, Korzh, V, Lodish, HF y Lim, B. (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev* 23, 862-876.

43. Lee, CH, Kuo, WH, Lin, CC, Oyang, YJ, Huang, HC y Juan, HF. (2013). MicroRNA-Regulated Protein-Protein Interaction Networks and Their Functions in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 14, 11560-11606.
44. Li, J, You, T y Jing, J. (2014). MiR-125b inhibits cell biological progression of Ewing's sarcoma by suppressing the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Prolif* 47, 152-160.
45. Lui, WO, Pourmand, N, Patterson, BK y Fire, A. (2007). Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res* 67, 6031-6043.
46. Mahmoud Toulany, HPR. (2013). Potential of Akt mediated DNA repair in radioresistance of solid tumors overexpressing erbB-PI3K-Akt pathway. *Transl Cancer Res* 3, 190-202.
47. Matallanas, D, Birtwistle, M, Romano, D, Zebisch, A, Rauch, J, von Kriegsheim, A y Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer* 2, 232-260.
48. McBride, AA. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445, 57-79.
49. Meng, Z y Gan, YH. (2015). Activating PTEN by COX-2 inhibitors antagonizes radiation-induced AKT activation contributing to radiosensitization. *Biochem Biophys Res Commun* 460, 198-204.

50. Molano, M, Van den Brule, A, Plummer, M, Weiderpass, E, Posso, H, Arslan, A, Meijer, CJ, Munoz, N, Franceschi, S y Group, HPVS. (2003). Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 158, 486-494.
51. Montalvo Esquivel Gonzalo, CMJA, Alvarado Zermeño Adriana, Cantú de León David F., Flores Alatraste Daniel, Ortega Rojo Andrea, González Enciso Aarón, Isla Ortiz David, Muñoz González David E., Robles Flores Juan U., Solorza Luna Gilberto, Mota García Aida, Dolores Gallardo Rincón, Flavia Morales Vázquez, M. Lucely Cetina Pérez y Ángel Herrera Gómez. (2011). Oncoguía: Cáncer Cervicouterino. In. (México D.F., Instituto Nacional de Cancerología), pp 61-69.
52. Moody, CA y Laimins, LA. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10, 550-560.
53. Moscicki, AB, Schiffman, M, Kjaer, S y Villa, LL. (2006). Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/42-51.
54. Ninio-Many, L, Grossman, H, Levi, M, Zilber, S, Tsarfaty, I, Shomron, N, Tuvar, A, Chuderland, D, Stemmer, SM, Ben-Aharon, I y Shalgi, R. (2014). MicroRNA miR-125a-3p modulates molecular pathway of motility and migration in prostate cancer cells. *Oncoscience* 1, 250-261.

55. Nishida, N, Yano, H, Nishida, T, Kamura, T y Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2, 213-219.
56. Oom, AL, Humphries, BA y Yang, C. (2014). MicroRNAs: Novel Players in Cancer Diagnosis and Therapies. *Biomed Res Int* 2014, 959461.
57. Pedroza-Torres, A, Lopez-Urrutia, E, Garcia-Castillo, V, Jacobo-Herrera, N, Herrera, LA, Peralta-Zaragoza, O, Lopez-Camarillo, C, De Leon, DC, Fernandez-Retana, J, Cerna-Cortes, JF y Perez-Plasencia, C. (2014). MicroRNAs in cervical cancer: evidences for a miRNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance. *Molecules* 19, 6263-6281.
58. Qingling Yang, YW, Xiaohui Lu, Zunlan Zhao, Lihua Zhu, Sulian Chen, Qiong Wu, Changjie Chen and Zhiwei Wang. (2014). MiR-125b regulates epithelial-mesenchymal transition via targeting Sema4C in paclitaxel-resistant breast cancer cells. *Oncotarget*, 1-12.
59. Roden, R y Wu, TC. (2006). How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* 6, 753-763.
60. Roman, A y Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445, 138-168.

61. Rose, PG, Bundy, BN, Watkins, EB, Thigpen, JT, Deppe, G, Maiman, MA, Clarke-Pearson, DL y Insalaco, S. (1999). Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 340, 1144-1153.
62. Ruth, D. (2009). *Cervical Cancer: A guide for nurses.*(Wiley Blackwell)
63. Scott, GK, Goga, A, Bhaumik, D, Berger, CE, Sullivan, CS y Benz, CC. (2007). Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem* 282, 1479-1486.
64. Shay, JW y Wright, WE. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol* 21, 349-353.
65. Sherr, CJ y McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.
66. Society, AC. (2013). *Cervical cancer.* In, C.A.C. Society, ed. (Atlanta, Georgia, American Cancer Society), pp 1-62.
67. Sorrentino, A, Liu, CG, Addario, A, Peschle, C, Scambia, G y Ferlini, C. (2008). Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 111, 478-486.

68. Stanley, MA. (2012). Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev* 25, 215-222.
69. Sun, YM, Lin, KY y Chen, YQ. (2013). Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol* 6, 6.
70. Tan, NY y Khachigian, LM. (2009). Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 29, 2483-2488.
71. Tang, F, Zhang, R, He, Y, Zou, M, Guo, L y Xi, T. (2012). MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *PLoS One* 7, e35435.
72. Testa, JR y Tschlis, PN. (2005). AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene* 24, 7391-7393.
73. Tommasino, M. (2014). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 26, 13-21.
74. Tornesello, ML, Buonaguro, L, Giorgi-Rossi, P y Buonaguro, FM. (2013). Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int* 2013, 519619.
75. V., SJ. (2009). *Cervical Cancer*. (New York: Chelsea House Publishers)

76. Vande Pol, SB y Klingelutz, AJ. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445, 115-137.
77. Venuti, A, Paolini, F, Nasir, L, Corteggio, A, Roperto, S, Campo, MS y Borzacchiello, G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 10, 140.
78. Vinay, DS, Ryan, EP, Pawelec, G, Talib, WH, Stagg, J, Elkord, E, Lichtor, T, Decker, WK, Whelan, RL, Kumara, HM, Signori, E, Honoki, K, Georgakilas, AG, Amin, A, Helferich, WG, Boosani, CS, Guha, G, Ciriolo, MR, Chen, S, Mohammed, SI, Azmi, AS, Keith, WN, Bilsland, A, Bhakta, D, Halicka, D, Fujii, H, Aquilano, K, Ashraf, SS, Newsheer, S, Yang, X, Choi, BK y Kwon, BS. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 35 Suppl, S185-198.
79. W., RR. (2007). *Cancer Biology*.(Oxford New York: Oxford University Press)
80. Wang, J, Kang, M, Qin, YT, Wei, ZX, Xiao, JJ y Wang, RS. (2015). Sp1 is over-expressed in nasopharyngeal cancer and is a poor prognostic indicator for patients receiving radiotherapy. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 6936-6943.
81. Wang, X, Wang, HK, Li, Y, Hafner, M, Banerjee, NS, Tang, S, Briskin, D, Meyers, C, Chow, LT, Xie, X, Tuschl, T y Zheng, ZM. (2014). microRNAs are

biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 4262-4267.

82. Whitney, CW, Sause, W, Bundy, BN, Malfetano, JH, Hannigan, EV, Fowler, WC, Jr., Clarke-Pearson, DL y Liao, SY. (1999). Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 17, 1339-1348.

83. Wiebe, E, Denny, L y Thomas, G. (2012). Cancer of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet* 119 Suppl 2, S100-109.

84. Winter, J, Jung, S, Keller, S, Gregory, RI y Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11, 228-234.

85. Wu, S, Huang, S, Ding, J, Zhao, Y, Liang, L, Liu, T, Zhan, R y He, X. (2010). Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene* 29, 2302-2308.

86. Xu, QY, Gao, Y, Liu, Y, Yang, WZ y Xu, XY. (2008). Identification of differential gene expression profiles of radioresistant lung cancer cell line established by fractionated ionizing radiation in vitro. *Chin Med J (Engl)* 121, 1830-1837.

87. Yewale, C, Baradia, D, Vhora, I, Patil, S y Misra, A. (2013). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials* 34, 8690-8707.
88. Yilmaz, M, Christofori, G y Lehembre, F. (2007). Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med* 13, 535-541.
89. Yugawa, T y Kiyono, T. (2009). Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 19, 97-113.
90. Zalmas, LP, Coutts, AS, Helleday, T y La Thangue, NB. (2013). E2F-7 couples DNA damage-dependent transcription with the DNA repair process. *Cell Cycle* 12, 3037-3051.
91. Zhou, M, Liu, Z, Zhao, Y, Ding, Y, Liu, H, Xi, Y, Xiong, W, Li, G, Lu, J, Fodstad, O, Riker, Al y Tan, M. (2010). MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *J Biol Chem* 285, 21496-21507.