

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**SILENCIAMIENTO GÉNICO DE *HoxB13* EN LA LÍNEA
CELULAR B16F10 USANDO RNAi'S**

POR

MANUELA CITLALI CHACÓN CARDOSA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

FEBRERO 2012

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA

SILENCIAMIENTO GÉNICO DE *HOXB13* EN LA LÍNEA CELULAR
B16F10 USANDO RNAI'S

COMITÉ DE TESIS

Dra. Diana Reséndez Pérez
Director de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

AGRADEZCO A LA DRA. DIANA RESÉNDEZ POR PERMITIRME INICIAR Y TERMINAR ESTA TESIS EN SU LABORATORIO, A LA DOCTORA CRISTINA RODRÍGUEZ POR PERMITIR LA ESTANCIA EN EL LIV, AL DOCTOR PABLO ZAPATA POR SUS BUENOS CONSEJOS, A LA DRA. DIANA ZAMORA TAMBIÉN POR SU AYUDA EN EL INICIO DE ESTE PROYECTO Y CLARO A *HOXB13*.

A NANCY VILLAREAL, POR SU AMISTAD Y SU AYUDA INCONDICIONAL, A CLAUDIO MORENO ROCHA POR TODA SU BUENA ASESORÍA Y AMISTAD A FRANCISCO ALVARADO (PACO) POR TODA SU AYUDA Y AMISTAD, A JEANNIE SALINAS POR SU PACIENCIA, A DIANA CÁRDENAS POR SUS SINCERIDAD, A CLAUDIA DALILA POR MOTIVARME XD, A ANGEL POR LOS RATOS CULTURALES, A DELIA REYNA POR POPULAR XD, A DIEGO Y HO POR SUS AMENAS PLATICAS, A SALOMÉ POR SU SARCASMO, A MI ESPOSO (MIKE) POR TODA SU AYUDA Y COMPRENSIÓN A TODOS LOS QUE ME HAN AYUDADO.

***QUIERO DEDICAR ESTA TESIS A DIOS, A MIS PADRES,
A MI ESPOSO QUE SIEMPRE CONFIARON EN MI A
PESAR DE TODO, POR SU AMOR Y COMPREHENSIÓN A
FENRRY Y A TISHA.***

TABLA DE CONTENIDO

| SECCIÓN | PÁGINA |
|--|--------|
| AGRADECIMIENTOS | I |
| LISTA DE TABLAS | II |
| LISTA DE FIGURAS | III |
| NOMENCLATURA | IV |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 5 |
| 3. OBJETIVOS | 6 |
| 3. OBJETIVO GENERAL | 6 |
| 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES | 6 |
| 4. ANTECEDENTES | 7 |
| 4.1 Genes <i>HOX</i> | 7 |
| 4.2 Mutaciones en los genes <i>HOX</i> | 10 |
| 4.3 Mecanismos de regulación de los genes <i>HOX</i> y su relación con el cáncer | 12 |
| 4.3.1 Desregulación en cáncer de los genes <i>HOX</i> | 13 |
| 4.3.1.1 Desregulación Espacio-Temporal y Dominancia Génica | 13 |
| 4.3.1.2 Desregulación Epigenética | 16 |
| 4.3.1.3. Genes <i>HOX</i> desregulación en tejidos mamario | 17 |
| 4.4 Sobre-Expresión de <i>HOXB13</i> en Cáncer | 19 |
| 4.5 Silenciamiento Génico con RNAi's | 22 |
| 4.5.1 Rnai y su Biogénesis | 22 |
| 4.5.2 Uso de RNAi como Herramienta para el Silenciamiento Génico | 23 |
| 4.6 Silenciamiento génico de genes <i>HOX</i> | 25 |
| 4.6.1 Silenciamiento Génico de <i>HOXB13</i> | 25 |
| 5. Materiales y Métodos | 27 |
| Detección de la expresión de <i>HOXB13</i> en las líneas celulares mediante RT-PCR | 27 |

| | |
|--|----|
| 5.1.1 Cultivo de las líneas celulares | 27 |
| 5.1.2. Aislamiento de los RNA's totales a partir de líneas celulares | 29 |
| 5.1.3 Amplificación de <i>HOXB13</i> mediante PCR punto final | 31 |
| 5.2 Construcción de los plásmidos para el silenciamiento Génico de <i>HOXB13</i> usando RNAi's de interferencia | 32 |
| 5.2.1 Diseño de RNAi's | 32 |
| 5.2.2 Alineamiento de los oligonucleótidos | 32 |
| 5.2.3 Construcción de los plásmidos codificantes con los RNAi's para <i>HoxB13</i> | 33 |
| 5.2.3.1 Preparación de Bacterias Ca Competentes | 33 |
| 5.2.3.2 Ligación de los RNAi's en el vector lineal pGSH1-HoxB13 I-IV | 33 |
| 5.2.3.3 Transformación y minipreparación de los DNA's plasmídicos | 34 |
| 5.2.3.4 Análisis de restricción de los plásmidos recombinantes | 35 |
| 5.2.3.5 Purificación de los plásmidos pGSH1-HoxB13 I-IV | 35 |
| 5.3 Detección del silenciamiento de <i>Hoxb13</i> con los RNAi's | 37 |
| 5.3.1 Transfección de los plásmidos pGSH1-HoxB13 RNAi's | 37 |
| 5.3.2 Detección del transcrito de <i>Hoxb13</i> | 38 |
| 5.4 Inmunodetección de <i>HoxB13</i> mediante western blot por el silenciamiento de los RNAi's | 39 |
| 5.5 Silenciamiento génico de <i>Hoxb13</i> en la viabilidad celular | 40 |
| 5.6 Silenciamiento génico de <i>Hoxb13</i> por RNAi's en combinación con los quimioterapéuticos Cisplatino y Doxorubicina | 41 |
| 6. RESULTADOS | 43 |
| 6.1 Estandarización de la amplificación del gen <i>Hoxb13</i> en líneas celulares | 43 |
| 6.1.1 Obtención de los RNA's totales a partir de líneas celulares | 43 |
| 6.1.2 Amplificación del gen <i>β-actina</i> mediante RT-PCR | 44 |
| 6.1.3 Amplificación del gen <i>Hoxb13</i> mediante RT-PCR | 45 |
| 6.2 Construcción de los plásmidos Recombinantes con los RNAi's para el silenciamiento de <i>HoxB13</i> | 46 |
| 6.2.1 Diseño de los oligonucleótidos codificantes a los RNAi's de interferencia para <i>Hoxb13</i> | 46 |
| 6.2.2 Clonación de los RNAi's de interferencia para Hoxb13 I-V en el vector pGSH1-GFP | 48 |
| 6.2.3 Caracterización de los plásmidos pGSH1-HOXB13 -RNAiI-V | 49 |
| 6.2.4 Confirmación de los RNAi's I-IV mediante secuenciación | 53 |

| | |
|--|----|
| 6.3. Efecto de los RNAi's el silenciamiento del RNA mensajero de <i>HoxB13</i> | 53 |
| 6.4. El silenciamiento génico de <i>HoxB13</i> afectó la expresión de GFP y de HoxB13 | 55 |
| 6.5 Efecto del silenciamiento Génico de <i>HoxB13</i> en la viabilidad celular | 58 |
| 6.5.1 Silenciamiento de <i>HoxB13</i> con el RNAi I en la viabilidad celular de B16F10 | 57 |
| 6.5.2 Silenciamiento de <i>HoxB13</i> con el RNAi II en la viabilidad celular de B16F10 | 58 |
| 6.5.3 RNAi III en la viabilidad celular de B16F10 | 58 |
| 6.5.2 Efecto del Silenciamiento de <i>HoxB13</i> con el RNAi IV en la viabilidad celular | 59 |
| 6.5.5 Uso del RNAi V como control en la viabilidad celular de B16F10 | 60 |
| 6.6 Análisis del silenciamiento génico de los RNAi's I y II sobre la viabilidad de la línea celular B16F10 | 61 |
| 6.7 Análisis del silenciamiento génico con los RNAi's I-V sobre la viabilidad de la línea celular B16F10 | 62 |
| 6.8 Silenciamiento génico de <i>HoxB13</i> por RNAi's en combinación con los quimioterapéuticos Cisplatino y Doxorrubicina | 63 |
| 6.8.1 Sensibilización de la línea celular B16F10 a Doxorrubicina | 63 |
| 6.8.2 Efecto Combinado de Doxorrubicina y el RNAi I <i>Hoxb13</i> en la línea celular B16F10 | 63 |
| 6.8.3 Efecto de la sensibilización de la línea celular B16F10 con Doxorrubicina y el RNAi II | 65 |
| 6.8.4 Sensibilización de la línea celular B16F10 con el quimioterapéutico Cisplatino | 65 |
| 6.8.5 Efecto de la sensibilización de la línea celular B16F10 con Cisplatino y el RNAi I | 66 |
| 6.8.6 Silenciamiento Génico de <i>Hoxb13</i> de la línea celular B16F10 con cisplatino y el RNAi II | 67 |
| 6.9 Análisis Bioestadístico del efecto de los RNAi's I-IV sobre la viabilidad celular de B16F10 | 68 |
| 7. DISCUSIÓN | 71 |
| 8.CONCLUSIONES | 79 |
| 9.LITERATURA CITADA | |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Genes <i>HOX</i> involucrados en tumorigénesis y metastásis | 14 |
| Tabla 2. Uso de RNAi sintéticos y RNAi con estructura de “harpin” (shRNAs) | 24 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>HOXB13</i> | 31 |
| Tabla 4. Programa de amplificación de <i>HOXB13</i> | 32 |
| Tabla 5. Oligonucleótidos para la detección del silenciamiento de <i>HOXB13</i> | 38 |
| Tabla 6. Programa de amplificación para la detección del silenciamiento de <i>HOXB13</i> | 39 |
| Tabla 7. Análisis de Varianza usando ANOVA en el silenciamiento génico de <i>HOXB13</i> | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Expresión co-lineal de los genes <i>HOX</i> | 8 |
| Figura 2. Estrategia Experimental para el silenciamiento de <i>HOXB13</i> | 27 |
| Figura 3. Extracción de RNA's totales en las líneas celulares SiHa, B16F10 y MCF-7. | 43 |
| Figura 4. Amplificación del gen β - <i>actina</i> en los DNAc's obtenidos de las células SiHa, MCF-7 y B16F10 mediante RT-PCR punto final | 44 |
| Figura 5. Amplificación del gen <i>HOXB13</i> en los DNAc's obtenidos de las células SiHa, MCF-7 y B16F10 mediante RT-PCR punto final | 45 |
| Figura 6. Diseño y alineamiento de las secuencias de los RNAi's para <i>HOXB13</i> | 47 |
| Figura 7. Diagrama de clonación de los RNAs de interferencia en el vector pGSH1- <i>GFP</i> | 48 |
| Figura 8. Clonación de los RNAs de interferencia de <i>HOXB13</i> I-V | 49 |
| Figura 9. Caracterización de las clonas en pGSH1-RNAi <i>HOXB13</i> I-IV con <i>HindIII</i> | 50 |
| Figura 10. Caracterización de las clonas pGSH1- <i>HOXB13</i> I-V con <i>BamHI</i> y <i>NotI</i> . | 51 |
| Figura 11. Purificación de los plásmidos pGSH1- <i>HOXB13</i> I-V. | 52 |
| Figura 12. Secuencia nucleotídica del RNAi- <i>HOXB13</i> -III mediante secuenciación | 53 |
| Figura 13. Estrategia para determinar el silenciamiento de <i>HOXB13</i> con los RNAi's | 54 |
| Figura 14. Silenciamiento del RNAm <i>Hox13</i> con los RNAi's I y II | 55 |
| Figura 15. Efecto de RNAi's I y II en la expresión de <i>GFP</i> e inmunodetección de la proteína HOXB13 | 56 |
| Figura 16. Silenciamiento de <i>Hoxb13</i> con el RNAi I en la viabilidad celular de B16F10 | 57 |
| Figura 17. Silenciamiento génico de <i>Hoxb13</i> con el RNAi II en la viabilidad celular de B16F10. | 58 |
| Figura 18. RNAi-III de <i>Hoxb13</i> en la viabilidad celular de B16F10 | 59 |
| Figura 19. Efecto de el RNAi-IV en la viabilidad celular de B16F10 | 59 |
| Figura 20. Uso del RNAi-V como control en la viabilidad celular de B16F10 | 60 |
| Figura 21. Efecto de los RNAi's I y II en la viabilidad celular de B16F10 | 61 |
| Figura 22. Efecto de los RNAi's I-V sobre la viabilidad celular de B16F10 | 62 |

| | |
|---|----|
| Figura 23. Efecto del quimioterapéutico Doxorubicina sobre la viabilidad celular de B16F10 | 63 |
| Figura 24. Efecto del quimioterapéutico Doxorubicina y el RNAi I sobre la viabilidad celular | 64 |
| Figura 25. Efecto del quimioterapéutico Doxorubicina y el RNAi II sobre la viabilidad celular | 65 |
| Figura 26. Efecto del quimioterapéutico cisplatino sobre la viabilidad celular de B16F10 | 66 |
| Figura 27. Efecto del quimioterapéutico Cisplatino y el RNAi I sobre la viabilidad celular | 67 |
| Figura 28. Efecto del quimioterapéutico Cisplatino y el RNAi II sobre la viabilidad celular | 68 |
| Figura 29. Análisis del silenciamiento génico de <i>Hoxb13</i> con los RNAi's en la viabilidad celular de B16F10 mediante prueba de medias Dunnet | 70 |

II. LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

| | |
|------------------------------------|---|
| % | Por ciento |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAc | ADN complementario |
| DNAp | ADN plasmidico |
| <i>Ant-C</i> | Complejo <i>Antennapedia</i> |
| Antp | Antennapedia |
| AP | antero-posterior |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNAsas | Ribonucleasas |
| °C | Grados Celsius |
| CaCl₂ | Cloruro de Calcio |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> cepa DH5 α |
| DH5α | |
| CC50 | Concentración Citotóxica Media |
| CO₂ | Dioxido de Carbono |
| BamHI | Ezima de restricción de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |
| B16F10 | Células de melanoma murino |
| DEPC | Diethylpirocarbonato |
| DMEMF12 | Dulbecco's Modificado Eagle Medio: Nutriente Mezcla F-12 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| dNTPs | Desoxinucleótidos Trifosfato |
| dT | Desoxitimidinas |
| DTT | Dithiothreitol |
| E.E.U.U. | Estados Unidos de Norteamérica |
| ECL | ECL reactivo de bloqueo |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| EGF | Factor de Crecimiento Epidermal |
| ELISA | Ensayo de inmunoabsorción asociado a enzimas |
| ERE | Elementos de Respuesta a Esteroides |
| <i>et al.</i> | en latín, " <i>et alia</i> ", y otros |
| FDA | Del inglés, Food and Drug Administration |
| FISH | Del inglés, Hibridación <i>in situ</i> fluorescente |
| g | Gramos |
| G | Gravedades |
| GB | Genbank |
| H | Horas |
| H₂BO₄ | Ácido Bórico |

| | |
|-----------------------------|---|
| HCl | Ácido Clorhídrico |
| HindIII | Enzima de restricción de <i>Haemophilus influenzae</i> |
| HOM-C | Complejo Homeótico |
| HOX | Genes <i>homeobox</i> en humanos |
| HOX | Proteínas con homeodominio en humanos |
| Hox | Genes <i>homeobox</i> en murinos |
| Hox | Proteínas con homeodominio en murinos |
| H₂O miliQ | Agua ultrapura por milipore |
| IgG HRP | Inmunoglobulina G, acoplado a peroxidasa de rábano |
| IgG | Inmunoglobulina G, proteína HOXB13 |
| HOXB13 | Gen 13 de la serie B de los genes <i>HOX</i> |
| KCl | Cloruro de potasio |
| Kpb | Kilopares de bases nucleotídicas |
| L | Litro |
| LB | Medio Luria Bertani |
| M | Concentración Molar |
| min | Minutos |
| MCF-7 | Línea celular de adenocarcinoma ductal infiltrante con receptor de estrógeno positivo |
| mg | Miligramos |
| µg | Microgramos |
| MgCl₂ | Cloruro de magnesio |
| MgSO₄ | Sulfato de Magnesio |
| mL | Mililitro |
| µl | Microlitro |
| mM | Concentración Milimolar |
| M-MLV | Enzima Reversa Transcriptasa, Virus de leucemia murina Moloney |
| mQ | Agua procesada en filtros MilliQ |
| MspI | Enzima de restricción de <i>Moraxella species</i> |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| NaOH | Hidróxido de Sodio |
| ng | Nanogramos |
| nm | Nanómetros |
| NotI | Enzima de restricción de <i>Nocardia otitidis-caviarum</i> |
| Oligo | Oligonucleótido |
| P | Valor P, probabilidad de la hipótesis nula |
| PA | Producto Amplificado |
| Pax | Gen <i>Pair</i> |
| pb | Pares de bases nucleotídicas |
| PEI | Polietilenimina |
| pg | Picogramos |
| RNAi | RNA de interferencia |
| RNaseZap | Solución descontaminante RNase |
| rpm | Revoluciones por minuto |

| | |
|-----------------|---|
| SDS- | Dodecilsulfato de Sodio |
| PAGE | Electroforesis en gel de Poliacrilamida |
| seg | Segundos |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| SiHa | Línea celular de células escamosas infectadas con el virus de papiloma humano tipo 16 |
| SOC | Medio súper óptimo con represión catabólica |
| Taq | Enzima de restricción de <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBS-T | Buffer Tris Salino- Tween |
| Tris-HCl | tris(hidroximetil)aminometano |
| U | Unidades |
| UV | Rayos Ultravioleta |

RESUMEN

Estudios realizados en diferentes tejidos malignos indican la expresión diferencial de varios genes *HOX* en los que la sobre-expresión de *HOXB13* en tejidos mamario, ovárico y cervical muestra una fuerte correlación con la presencia de malignidad. La cuantificación de los niveles de expresión *HOXB13* mediante PCR Tiempo Real en tejido mamario con patología maligna muestra una sobre expresión de hasta 132,364. 63 veces. Para realizar el silenciamiento del gen *HOXB13*, en esta tesis se diseñó una estrategia experimental usando diferentes RNAs de interferencia (RNAi's) dirigidos a *HOXB13*. Los RNAi's I y II mostraron el silenciamiento de la expresión del RNAm y de la homeoproteína HOXB13 y afectaron la viabilidad celular de B16F10 en un 64% con el RNAi II y en un 47% con el RNAi I a 0.8µg totales mientras que el efecto combinado de estos RNAi's no mostraron un efecto aditivo (45%). Los RNAi's III y IV no afectaron la expresión del mensajero mientras que la viabilidad celular fue afectada en un 47% con 0.8µg totales del RNAi IV. Por otro lado, la combinación del RNAi I con el quimioterapéutico Doxorrubicina incrementó el efecto en la viabilidad celular en un 16% con 0.8µg y un 26% con 0.6 µg totales en contraste no se detectó el efecto aditivo del quimioterapéutico Doxorrubicina con el RNAi II. Asimismo, la combinación del RNAi II con el quimioterapéutico Cisplatino incrementó el efecto en 16 y 15% de la viabilidad celular con 0.8 y 0.6 µg totales respectivamente, en contraste con el RNAi I que no mostró un efecto aditivo con este quimioterapéutico. En ésta tesis demostramos que el silenciamiento de *Hoxb13* con los RNAi's I y II afectó la expresión génica y la viabilidad de las células B16F10 mostrando el mayor efecto con el RNAi II, que en combinación con cisplatino presentó un efecto máximo del 79% en la reducción de la viabilidad celular, por lo que la inhibición mediada por RNAi's a *Hoxb13* es un modulador proliferativo de las células B16F10 de melanoma de ratón. El silenciamiento del gen *HOXB13* mediante RNAi's mostrado abre la posibilidad de explotar su uso potencial con fines terapéuticos en carcinomas donde se ha detectado *HOXB13* sobre-expresado con una alta relación con la malignidad.

ABSTRACT

Studies in different malignant tissues showed differential expression of several *HOX* genes in which *HOXB13* over-expression in breast, ovarian and cervical cancer is associated to malignancy. Quantification of *HOXB13* expression levels by Real Time PCR in breast tissue malignancy show *HOXB13* over-expression of up to 132,364. 63 times. Therefore, in this thesis we designed an experimental strategy using different interfering RNAs (RNAi's) for *HOXB13* gene silencing. *HOXB13* RNAi's I and II showed silencing of mRNA and HOXB13 homeoprotein expression, and also affected B16F10 cell viability by 64% with RNAi II and 47% with RNAi I while combination of these RNAi's did not show an additive effect (45%). At the contrary, *HOXB13* RNAi's III and IV did not affect the expression of mRNA while cell viability was affected in 47% with RNAi IV. On the other hand, combination of RNAi I with Doxorubicin increased the effect on cell viability by 16% with 0.8µg and 26% with 0.6 mg total whereas no additive effect was detected with Doxorubicin in combination with RNAi II. Also, combination of RNAi II with Cisplatin increased the effect in 16 and 15% cell viability with 0.8 and 0.6 mg total respectively, in contrast RNAi I showed no additive effect with this chemotherapeutic. In summary, our results show silencing of *Hoxb13* with RNAi's I and II with effect on the viability of B16F10 cells showing the greatest effect with the RNAi II, which in combination with Cisplatin had a maximum effect of 79% in reduction of cell viability, so *Hoxb13* RNAi's is a modulator of cell proliferation of B16F10 mouse melanoma. *HOXB13* gene silencing by RNAi's opens the possibility of exploiting their potential use for therapeutic purposes in carcinomas where *HOXB13* was detected over-expressed with a strong association with malignancy.

1. INTRODUCCIÓN

Un gran número de genes *HOX* se encuentran expresados en patrones aberrantes con efectos oncogénicos que contribuyen a la malignidad. Dentro de estos *HOXB13* se encuentra sobre-expresado en un alto porcentaje de líneas celulares de cáncer de ovario, de mama, de cáncer de cérvix y su alta expresión en cáncer de mama está asociada con la agresividad del curso clínico de la enfermedad comparado con tumores de cáncer de mama donde no está expresado. Por lo que se ha postulado a *HOXB13* con un papel clave en la progresión tumoral del cáncer mamario. Adicionalmente, la pérdida del fenotipo en ratones knock-out de *Hoxb13* sugiere una fuerte relación con la diferenciación y reparación epidermal ya que *HOXB13* está expresado en piel de adulto y feto, en humanos (Kömüves *et al.*, 2003 y Stelnicki *et al.*, 1998) y su expresión está regulada negativamente en piel fetal, permitiendo la regeneración en cicatrices. Estos resultados sugieren que la supresión de *Hoxb13* puede ser un componente necesario para obtener la reparación óptima en piel (Mack *et al.*, 2005) y los ratones knock-out sanan con menos cicatrices comparados con los wild-type (Passi *et al.*, 2004).

La desregulación de genes *HOX* está presente en diversos tipos de cáncer incluyendo melanomas (Grier *et al.*, 2005) sin embargo la comprensión de la genética y biología molecular del cáncer no han permitido a la fecha el uso de tratamientos eficaces en patologías metastásicas. Además, en la epidermis adulta se expresan varios genes *HOX*, entre ellos *HOXB13* y continuamente se renueva en un programa de arresto del crecimiento celular, diferenciación y una forma especializada de apoptosis cornificación; (Mack *et al.*, 2005). Utilizando fibroblastos del segundo tercio de la etapa fetal de ratones y piel de humano adulto se ha demostrado que *Hoxb13* es diferencialmente expresado en feto comparado con adulto. Interesantemente, *Hoxb13* sobre expresado en keratinocitos de rata cambia radicalmente el crecimiento de las células por lo que estos resultados sugieren que la regulación negativa de *Hoxb13* es necesaria para la reparación en etapa fetal (Lu *et al.*, 2010).

Debido a la sobre-expresión de *HOXB13* en diferentes tipos de las células con patología maligna y a la evidencia que la regulación negativa de *HOXB13* es necesaria para la reparación en etapa fetal en esta tesis se utilizó una estrategia experimental con RNAi's como una herramienta directa para el knockdown o silenciamiento del gen *Hoxb13* en la línea celular B16F10 de melanoma de ratón que expresa esta homeoproteína.

2. JUSTIFICACIÓN

El uso de RNAi's que permitan el silenciamiento de la expresión del gen *HOXB13* es de gran importancia para el análisis de métodos eficaces que permitan combatir diversas patologías malignas que presentan sobre-expresión de *HOXB13*. Así mismo, esta estrategia experimental de silenciamiento génico puede ser utilizada potencialmente en la reparación de tejido cutáneo y abre la posibilidad para estudios *in vivo* en ratones que permitan el análisis de tratamientos eficaces en diversos procesos patológicos metastáticos así como de reparación tisular cutánea.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del silenciamiento de los RNAi's para *HOXB13* en la expresión génica y viabilidad celular.

3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Seleccionar la línea celular con mejor expresión de *HOXB13* mediante RT/PCR para la detección del silenciamiento génico.
- 2) Analizar el efecto de los RNAi's para *HOXB13* en la expresión de los RNAs en la línea celular seleccionada.
- 3) Determinar el efecto del silenciamiento de los RNAis para *HOXB13* en la expresión de la homeoproteína HOXB13.
- 4) Analizar el efecto del silenciamiento los RNAi's para *HOXB13* en la viabilidad celular.
- 5) Determinar el efecto combinado de los RNAi's para *HOXB13* con los quimioterapéuticos Cisplatino y Doxorubicina.

4. ANTECEDENTES

4.1 Genes *HOX*

Los genes homeóticos descubiertos en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, permiten la regulación del control maestro de la morfogénesis y diferenciación celular durante el desarrollo del cuerpo de los organismos multicelulares así como el mantenimiento de los tejidos y órganos en el adulto.

La clave para la identificación de los genes involucrados en el control genético del desarrollo fueron las mutaciones espontáneas en *Drosophila melanogaster*, con transformaciones que substituyen una parte del cuerpo por otra, como dos pares de alas en vez de uno (bithorax) o patas en lugar de antenas. Estas mutaciones fueron denominadas transformaciones homeóticas en base al término “homeosis”, que describe la transformación de un segmento por uno de estructura homóloga y fueron descubiertas desde inicios del siglo pasado por el grupo de H. Morgan *et al.* Estas aportaron la clave para la identificación de los genes maestros que regulan la especificación del plan del cuerpo (García-Bellido, 1977, Lewis, 2000).

El advenimiento de la tecnología del DNA recombinante permitió clonar los genes homeóticos responsables de éstas mutaciones en el complejo Bithorax y Antennapedia (Complejo Homeótico o HOM-C) dando inicio al estudio de los mecanismos mediante los cuales éstos genes controlan el desarrollo (Karch *et al.*, 1985, Scott, *et al.*, 1983, Kuroiwa *et al.*, 1985). Como consecuencia, el aislamiento de los genes homeóticos en *D. melanogaster* inició una época dorada que ha permitido el mejor entendimiento de los mecanismos del control genético del desarrollo.

El locus del complejo *Antennapedia* (*Antp*) se extiende en una larga región del cromosoma (100 Kpb) con exones e intrones tan grandes como 60 Kpb. Experimentos realizados en *Antp* por Walter Gehring *et al.*, demostraron que los genes homeóticos comparten un segmento de DNA de 180 pb altamente conservado “Homeobox” el cual codifica para una secuencia aminoacídica denominada homeodominio (HD) de 60 residuos altamente conservados y en consecuencia reconocen secuencias de unión al DNA muy similares mediante una hélice de reconocimiento (Gehring *et al.*, 1987, Gehring *et al.*, 1994).

Durante las últimas décadas, varios cientos de genes conteniendo el homeobox han sido aislados en organismos tan diversos que van desde las levaduras hasta los vertebrados superiores (Sheperd *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1993, Wysocka *et al.*, 1989, Holland *et al.*, 1992, Acampora *et al.*, 1989).

Los homeodominios de anfibios y vertebrados superiores tales como los del ratón y el hombre difieren en un sólo residuo aminoacídico con Antp, que es el ortólogo en la mosca de la fruta. Esto demuestra la presencia de una fuerte presión evolutiva para conservar la secuencia de aminoácidos de los homeodominios, si consideramos que los vertebrados e insectos se separaron y evolucionaron independientemente por más de 500 millones de años. Por otro lado, la distribución co-lineal de los genes *HOX* agrupados y distribuidos en el cromosoma de acuerdo a su expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo (Figura 1), corroboran sin lugar a dudas su alto grado de conservación evolutiva (Gehring *et al.*, 1994, Grier *et al.*, 2005).

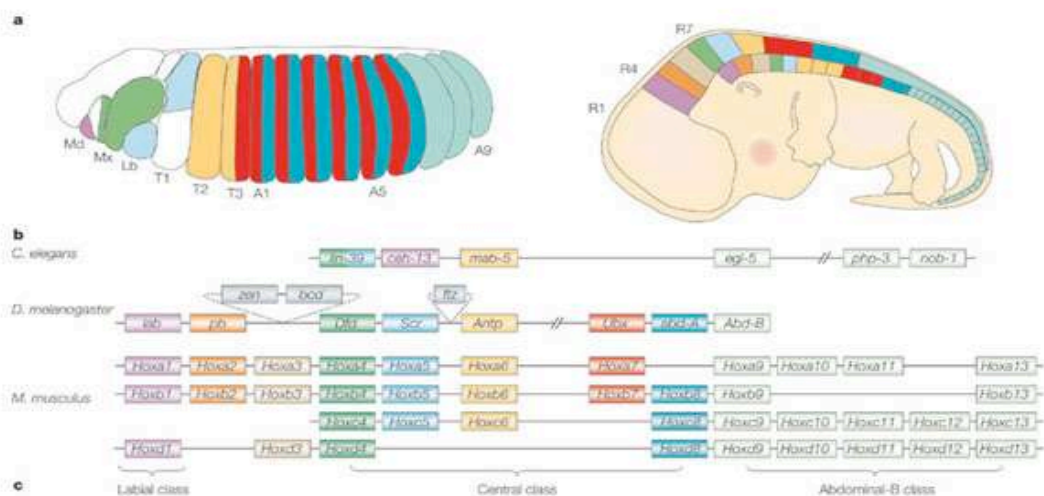


Figura 1. Expresión co-lineal de los genes *HOX*. Se muestra la expresión de los genes *HOX* a lo largo de los ejes antero-posteriores y cráneo-caudales en *Drosophila melanogaster* y vertebrados respectivamente.

En mamíferos, los 39 genes *HOX* que han sido identificados hasta la fecha están organizados en cuatro grupos cromosómicos individuales (A-D en humano, a-d en ratones), probablemente surgidos de dos eventos de duplicación de un grupo ancestral. Basados en homología de secuencias y localización dentro del grupo, a los genes *HOX* se les han asignado trece grupos parálogos. Los genes *HOX* en

vertebrados se dividen en dos clases: genes Clase 1 organizados en cuatro complejos (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC*, y *HOXD*); y la Clase 2 o genes divergentes, en donde se encuentran los genes *Pax*, *Msx*, *Irx*, y *Dlx*, llamados de acuerdo a su respectivo ortólogo en *D. melanogaster* (*pair*, *muscle segment*, *iroquois*, y *distal-less*, respectivamente (Fu *et al.*, 2003).

La familia de genes *HOX* de la clase 1 es homóloga funcional como estructuralmente al complejo homeótico (*HOM-C*) de *D. melanogaster*. Esta familia de 39 genes corresponde a la familia de “genes *HOX*” en humanos y ratones donde están organizados en cuatro complejos genómicos localizados en diferentes cromosomas, *HOXA* en 7p, *HOXB* en 17p, *HOXC* en 12p y *HOXD* en 2p, y cada uno de ellos comprende de 9 a 11 genes acomodados en una secuencia homóloga a la que tienen en el genoma de *D. melanogaster*. Como se puede observar en la Figura 1 la relación entre los genes de los complejos *Antennapedia* (*Ant-C*) y *Bithorax* (*Bx-C*) de *D. melanogaster* y los genes *HOX* en vertebrados, muestran la expresión co-lineal de éstos en su patrón corporal (Favier y Dollé, 1997; Grier *et al.*, 2005).

La relación entre el arreglo cromosomal de los genes homeóticos y la localización de su expresión fue establecida por Ed Lewis en 1978, quien determinó la expresión co-lineal de éstos genes de acuerdo a su posición en el cromosoma. Además, el patrón axial se considera que puede ser el resultado de tres características de los genes *HOX*. La primera es que su expresión se presenta en bandas semi-definidas en el embrión, teniendo como ejemplo la expresión de *HOXA11* y *HOXA13* en las extremidades de los vertebrados. La segunda es que los genes del extremo 3' se expresan en todo el eje antero-posterior (AP), mientras que los genes del 5' se restringen a las estructuras posteriores, siendo el “Código *HOX*” el que determina la estructura. El tercer caso es el de la prevalencia posterior, donde los genes del extremo 5' inactivan a los genes del extremo 3', determinando así la identidad de las estructuras (Grier *et al.*, 2005).

El papel de los genes *HOX* en la construcción de la organización del cuerpo humano es esencialmente importante aunque los mecanismos moleculares finos de expresión son todavía una pregunta fundamental para la biología del desarrollo. La relación entre el arreglo cromosomal de los genes *HOX* y la localización de su expresión fue establecida por Ed Lewis en 1978, quien determinó dos tipos de mutaciones homeóticas, las llamadas pérdida de ó ganancia de función, en la forma corporal dependiendo de la posición en el grupo (Alberts *et al.*, 2002).

4.1. Mutaciones en los genes HOX

En 1894, William Bateson acuñó el término “homeosis” para referirse al fenómeno de la transformación parcial o completa de una estructura corporal por otra homóloga. Bithorax, fue la primer mutante homeótica descrita en *D. melanogaster* (Bridges et al., 1923); presentaba el tercer segmento torácico transformado al segundo y los halterios (órganos de equilibrio) fueron sustituidos por un segundo par de alas. Posteriormente, se describió un segundo tipo de mutante homeótica, Antennapedia, en la cual, las antenas fueron reemplazadas por un segundo par de patas (LeCalvez, 1948).

En 1978, al estudiar la mutante Bithorax, Edward Lewis demostró la existencia de genes involucrados en el control de la segmentación en *D. melanogaster*. La identidad de los segmentos que componen la porción posterior del cuerpo de la mosca (metatórax). En ratones homocigotos para mutaciones “knockout” en los genes *Hoxa10*, *Hoxc10* y *Hoxd10* (seis alelos mutantes), las vértebras lumbares presentan proyecciones de costillas transformadas en vértebras torácicas. Por lo tanto, los genes del grupo *Hox10* están involucrados en la restricción de la morfogénesis de las costillas. Los ratones con un alelo tipo silvestre y cinco alelos mutantes sólo presentaron un par de costillas en la primera vértebra lumbar, mientras que los que tenían dos alelos tipo silvestre y cuatro alelos mutados presentaron una morfología esquelética normal, indicando que la morfogénesis vertebral depende de una regulación cuantitativa más que cualitativa como en el caso de *D. melanogaster* (Wellik y Capecchi, 2003).

Las mutaciones homeóticas producen una gran cantidad de anomalías morfológicas debidas al descontrol de la expresión de las homeoproteínas en el desarrollo y diferenciación de distintos tejidos. La simpodactilia constituye la primera malformación asociada a una mutación en *HOXD13* (Sayli et al., 1995). Las mutaciones en *HOXA13* se asocian con el síndrome “mano-pie-genital” (hand-foot-genital syndrome). Una mutación en *HOXD10* se asocia con el talo vertical congénito y la enfermedad dental de Charcot-Marie. La expresión alterada de genes *HOX*, en especial de *HOXA11* y *C11* es provocada por la exposición *in útero* al ácido valproico que produce el síndrome de valproato fetal, que se asocia a un mayor riesgo de espina

bífida, y otras anormalidades como defectos del corazón, paladar hendido y anormalidades craneofaciales y en las extremidades (Grier *et al.*, 2005).

Las mutaciones homeóticas producen una gran cantidad de anormalidades morfológicas que demuestran el control de las homeoproteínas en el desarrollo y diferenciación de distintos tejidos. Estas mutaciones por lo general llevan a transformaciones homeóticas del segmento más anterior en donde se expresa el gen. Las mutaciones de pérdida de función por lo general resultan en el desarrollo de estructuras que se encuentran en segmentos más anteriores, mientras que las mutaciones de ganancia de función producen segmentos con estructuras encontradas en segmentos más posteriores. A este efecto se le denominó “dominancia posterior” o “prevalencia posterior” y es el resultado del patrón de expresión traslapada de los genes del HOM-C. En vertebrados no se observan alteraciones muy marcadas en la morfogénesis, y algunas probablemente debido a la redundancia de expresión de la red *HOX* dada por la duplicación de genes (Grier *et al.*, 2005).

Esto se observa en ratones sin los genes del grupo C, los cuales mostraron anormalidades estructurales menores, aunque murieron de disfunción pulmonar al nacer (Suemori y Noguchi, 2000).

Se ha investigado también extensamente la función de los genes *HOX* en la hematopoyesis, encontrándose un patrón característico de estos genes en cada linaje y etapa de diferenciación de estas células. Utilizando estrategias de sobre-expresión y ratones “knock-out” se han encontrado que disrupciones en la expresión de los genes *HOX* conducen a cambios en la progenie celular. Como el papel de *Hoxa5* que llevó a la expansión de las células progenitoras mieloides y a la reducción de la diferenciación eritroide; por el contrario, hubo una proliferación de la población eritroide e inhibición de la hematopoyesis granulocítica/monolítica al inhibir la expresión de *Hoxa5* (Crooks *et al.*, 1999).

A la par de estos experimentos, varios grupos de investigadores asociaron el gen *Hoxa9* con el desarrollo de células T, donde se observó una disminución de éstas células al bloquear la expresión de éste gen (Izon *et al.*, 1998, Lawrence *et al.*, 1997). El potencial oncogénico de los genes *HOX* fue observado por primera vez en leucemia donde se encontró la sobre-expresión de *Hoxa9* y *Meis1* (gen del tipo Abd-B) simultáneamente en ratones sinérgicos que permitió el desarrollo de leucemia mieloide oligoclonal aguda en menos de tres meses, pero no se obtuvo este resultado con la sobre-expresión de los genes por separado (Kroon *et al.*, 1998).

Este fenómeno podría ser debido a la interacción de *Meis* en la transportación al núcleo de la homeoproteína *Hoxa9*. Estos estudios permitieron concluir que muchos, si no todos los genes *HOX* eran potencialmente leucemogénicos y se inició a analizar el papel de los genes del desarrollo en otros tipos de cáncer, basados en la hipótesis que se expresan durante la embriogénesis, pero no en tejido adulto pueden re-expresarse en tejido neoplásico. Estos descubrimientos dieron la pauta para el análisis del papel de los genes *HOX* en cáncer (Kirito *et al.*, 2004).

4.3. Mecanismos de Regulación de los genes *HOX* y su relación con el cáncer

Los mecanismos por los cuales los genes *HOX* controlan y son regulados en el desarrollo de los vertebrados ocurre de acuerdo a tres preceptos básicos. Como observamos anteriormente el primero es la posición del gen *HOX* de 3' a 5' dentro del cluster correspondiente a la posición antero – posterior (A-P axial). Esto es conocido como colinearidad espacial. Generalmente en el 3' los genes están expresados en tejidos anteriores y en 5' están en tejidos posteriores. El segundo, los genes *HOX* que se encuentran más hacia el 5' en el cluster tendrán un fenotipo dominante en relación a los que se encuentra hacia el 3', es lo que se denomina prevalencia posterior. El tercero, los genes *HOX* están expresados temporalmente en un orden correspondiente de posiciones 3' a 5' dentro de cada cluster, conocido como colinearidad temporal. Usando estos preceptos, los patrones de expresión de los genes *HOX* regulados han sido identificados en cáncer (Shah y Sukumar 2010).

Los mecanismos de esta regulación son variados y sólo en el inicio pueden ser identificados. En algunos tejidos de ciertos genes *HOX* se encuentran normalmente silenciados como supresores de tumor. Algunos genes *HOX* en particular se encuentran expresados en patrones aberrantes espacio-temporal con efectos oncogénicos. Por ejemplo *HOXB13* puede funcionar como un supresor de tumores que es necesario para el desarrollo normal de cierto tipo de tejido y está asociado con tumorogénesis y agresividad en otro tipo de tejidos (Jung *et al.*, 2004).

Las vías por las cuales los genes *HOX* ejercen sus efectos son muy similares, con una notable especificidad sobre el tejido (Jung *et al.*, 2004) 2007). En algunos cánceres, como la leucemia, la fusión de proteínas media la sobre expresión de genes que promueven la expansión, en otros casos como en neuroblastoma es la expresión

de un solo gen que induce la diferenciación e induce la tumorigénesis(Calvo *et al.*, 2002).

En algunos tumores la expresión anormal de genes *HOX* se dirige directamente mediante su expresión durante la apoptosis, alteraciones de receptores de señalización, transiciones epitelio-mesénquima e invasión celular-tumoral (Chen *et al.*, 2007).




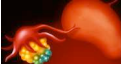




4.3.1. Desregulación en cáncer de los genes *HOX*


Numerosos ejemplos de expresión de genes *HOX* han sido encontrados en cáncer. Existen tres mecanismos de regulación que clasifican los cambios de tejido normal a maligno. El primero es la desregulación espacio-temporal, en la cual el patrón de expresión de los genes *HOX* en un tumor se eleva en un tejido y es espacio-temporal diferente de un tejido normal. El segundo mecanismo es la dominancia génica, en el cual los genes están expresados en un nivel incrementado fuera de lo normal. El tercer mecanismo es la desregulación epigenética en el cual el silenciamiento ó regulación negativa de un gen *HOX* es evidente en un tejido en un tiempo y lugar cuando normalmente no está expresado. El primer y segundo mecanismo ocurre cuando la expresión de genes *HOX* es asociada con oncogénesis (Tabla I) y el tercero es evidente en tejidos en los cuales los genes *HOX* tienen la función de supresores tumorales (Abate-Shane., 2002).

4.3.1.1. Desregulación espacio-temporal y dominancia génica

La regulación espacio-temporal, es crucial para el desarrollo de órganos y la oncogénesis puede estar asociada con la perturbación de la organogénesis normal y diferenciación, algunos grupos han investigado y examinado exhaustivamente la desregulación espacio-temporal. Por ejemplo, se han evaluado todos los niveles de expresión de genes *HOX* en 48 diferentes tipos de tejidos primarios de carcinoma esofágico primario escamoso (ESCC) y siete muestras de esófago normal mediante PCR cuantitativo (PCRq). Para el mejor entendimiento de cada uno de los efectos que produce la desregulación de los genes *HOX* anteriormente mencionados, en la Tabla 1 se resume el gen afectado, el mecanismo mediante el cual se efectúa la desregulación, el cambio que se produce en el gen *HOX* y su efecto sobre la salud (Takahashi *et al.*, 2007).

Tabla 1. Genes *HOX* involucrados en tumorigénesis y mestástasis

| Tipo de tumor | Gen <i>HOX</i> | Mecanismo | Expresión del gen <i>HOX</i> | Efecto oncogénico |
|--|----------------------------------|----------------------------------|--|---|
| Carcinoma de esófago en células escamosas  | <i>Genes HOX en 5'</i> | Desregulación espacio – temporal | Sobre-expresión | Asociado con tumores primarios |
| Carcinoma de pulmón  | <i>HOXA, HOXD, HOXA1 y HOXC5</i> | Dominancia génica | Sobre-expresión | Asociado con tumores primarios |
| | <i>HOXA7 y HOXA9</i> | Desregulación epigenética | Metilación del promotor | Asociado con tumores primarios |
| Neuroblastoma  | <i>HOXD1 y HOXD8</i> | Desregulación espacio – temporal | Expresión | Expresado en diferentes líneas celulares |
| | <i>HOXC6 y HOXC11</i> | Desregulación espacio – temporal | Expresión | Causa diferenciación de la línea celular GOTO tipo S |
| Carcinoma de Ovario  | <i>HOXB13</i> | Dominancia Génica | Sobre-expresión | Asociado con tumores primarios; regulación positiva de ER; y resistencia al tamoxifen <i>in vitro</i> |
| | <i>HOXA7 y HOXA9-11</i> | Desregulación espacio – temporal | Expresión | Asociado con tumores primarios y subtipos histológicos específicos |
| Carcinoma Cervical  | <i>Cluster HOXC</i> | Dominancia Génica | Sobre-expresión | Asociado con tumores primarios |
| | <i>HOXC10</i> | Dominancia Génica | Sobre-expresión | Invasión incrementada; necesaria para la transición de HGSIL a células de carcinoma escamoso |
| Carcinoma de próstata  | <i>HOXB13</i> | Desregulación Espacio-temporal | Regulación negativa | Pérdida de diferenciación; permite la transactivación de RA y proliferación |
| | <i>HOXC8</i> | Dominancia Génica | Sobre-expresión | Asociado con tumores primario; pérdida de diferenciación y crecimiento independiente de RA |
| Carcinoma de mama   | <i>HOXA5</i> | Desregulación Epigenética | Promueve la metilación y regulación negativa | Regulación negativa de p53, disminución RARβ como efecto apoptótico a través de caspasa 2 y caspasa 8 |
| | <i>HOXA10</i> | Desregulación Espacio-temporal | Regulación negativa | Regulación negativa de p53 en RE positivo en tumores primarios |
| | <i>HOXB7</i> | Dominancia Génica | Sobre-expresión | Regulación positiva de FGF2 en cultivo celular, asociada con metástasis en hueso cuando se comparó con tumores primarios y otras metástasis, incremento de invasión y vascularización <i>in vitro</i> |
| | <i>HOXB13</i> | Dominancia Génica | Sobre-expresión | Asociado con resistencia a |

| | | | | |
|--|---|----------------------------------|-----------------|--|
| | | | | tamoxifen en tumores primarios con RE-positivo; incremento en migración e invasión <i>in vitro</i> : regulación negativa de RE y resistencia <i>in Vitro</i> |
| Leucemia  | <i>HOXA9</i> , <i>HOXA10</i> , <i>HOXC6</i> y <i>MEIS1</i> | Dominancia Génica | Sobre-expresión | Regulación positiva mediante translocación MLL, en leucemia aguda asociada ALL |
| | <i>HOXA9</i> | Desregulación espacio - temporal | Sobre-expresión | Indicador pobre pronostico de AML; incremento de proliferación, con fenotipo incrementado cuando expresó en la proteína de fusión NUP98-HOXA9; regulación positiva de MEIS1 y FLT3 |
| ALL, leucemia linfoblástica aguda; AML, leucemia mieloide aguda; RA, receptor de andrógenos; FGF2, factor 2 de crecimiento en fibroblastos; FLT3, tirosina kinasa 3 relacionada-fms; HGSIL, lesión intraepitelial con grado alto escamoso; MLL, leucemia mieloide/linfoide o leucemia mixta; RAR β , receptor de ácido retinóico β | | | | |

Modificado de Shah y Sukumar, 2010

4.3.1.2 Desregulación epigenética

Es un mecanismo común interno para el control de la expresión de los genes *HOX*. Un ejemplo son las islas de CpG (Citocina promotor Guanina) en los promotores de genes *HOX* silenciados, comúnmente se encuentran metiladas (Hershko *et al.*, 2003). Por ejemplo el grupo polycomb y el complejo trithorax dirigen una metilación triple de histonas: el grupo policomb resultó en una metilación triple (lisina 27 de la histona 3, lisina 4 de la histona 3). Los cambios en la conformación de la cromatina por estas modificaciones en histonas permiten metilación o desmetilación en promotores característicos de islas CpG (Fanti *et al.*, 2008, Faber *et al.*, 2009).

Estas modificaciones llegan influir incluso en genes homólogos un ejemplo es MLL (Leucemia Mieloide y/o Linfoide) homólogo de trithorax y se encuentra mutado en algunas leucemias, usualmente como proteína de fusión que no tiene la función de metilación H3K4 (Hanson *et al.*, 1999). Y es recurrente esta desregulación en leucemias linfoblásticas, provocando la translocación del gen MLL sobre la histona 3 (H3K79) que incrementa la expresión génica en un patrón diferente a la expresión normal que resulta en la trimetilación de H3K4. Las leucemias linfoblásticas con co-translocaciones MLL a su vez incrementan la expresión de múltiples genes *HOX* incluyendo *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA7* y *HOXA9*, con un pobre pronóstico (Golub *et al.*, 1999).

Estos ejemplos muestran como la expresión de los genes *HOX* en tumores es alterada tanto por la metilación como por la modificación de histonas.

Otro ejemplo de regulación génica y genes *HOX* es la llevada cabo por los microRNAs (miRNAs) codificados en los clusters de los genes *HOX* están conservados entre *D. melanogaster* y humanos, e incluyen a mir-10a y mir-196b (Yekta *et al.*, 2008). En 2007 la regulación de estos miRNAs y sus blancos río abajo; mediante estudios *in silico* que sugirieron que mir-10a puede interactuar con *HOXA3* y *HOXD10*. Además, construcciones con el promotor de luciferasa de estos genes *HOX* confirman la regulación negativa de mir10a (Han *et al.*, 2007). El 10% de los miRNAs del genoma humano se encuentran silenciados por metilación en líneas celulares de carcinoma de colon indicando que esta es otra ruta de regulación genética *HOX*, a través de la metilación de miRNAs que regulan genes *HOX*, sin embargo esta ruta puede ser

perturbada por tumorigénesis, donde una alta metilación es característico de las células de cáncer (Han et al.,2007).

En la regulación de la expresión génica de los genes *HOX* actúan también RNAs de gran tamaño no codificantes (linc-RNAs) esta regulación se lleva a cabo en el extremo cis (Sessa *et al.*, 2007), comúnmente se encuentran con orientación antisentido en el cluster *HOX* y pueden controlar su expresión dentro del cluster aún a grandes distancias (Sessa *et al.*, 2007).

En 2007 se demostró que también este tipo de regulación se puede llevar a cabo en trans, con un nuevo RNA no codificante (ncRNA), llamado *HOXAIR*, (RNA transcrito *HOX* antisentido intergénico) directamente desde el cluster de *HOXC* controlando la expresión de *HOXD*. La regulación de la expresión de los genes *HOX* por lincRNAs es otra forma compleja de regulación y tiene efecto durante el desarrollo y tumorigénesis. Para un mejor entendimiento los lincRNAs actúan como complejos formando estructuras secundarias modificando la cromatina y otras proteínas (Rinn *et al.*,2007).

4.3.1.3. Genes *HOX* desregulación en tejidos mamario

La alteración en la expresión en tejidos mamarios normales, tumorales benignos y malignos puede inducir o contribuir en la malignidad del cáncer de mama al regular el ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis, y/o la metástasis (Makiyama *et al.*, 2005).

La expresión de los genes *HOX* en neoplasias mamarias es compleja debido a que existen distintos tipos de neoplasias y distintas líneas celulares modelo. De los 39 genes *HOX* analizados en los tejidos normales, benignos, y tumorales se encontraron niveles alterados de expresión en los siguientes genes:

El aumento de la expresión *HOXA1* ha sido asociada a cáncer de mama, aunque los resultados obtenidos por Cantile *et al.*, en 2003 y Makiyama *et al.*, en 2005 no muestran su presencia en la mayoría de las muestras tumorales, por el contrario, se observa disminución en la expresión de *HOXA1*(Zhang *et al.*, 2003, Waters y Conway-Campbell, 2004; Friedmann *et al.*, 1994). Además, la expresión diferencial de los distintos transcritos de *HOXA1* generados por splicing alternativo no ha sido ampliamente revisada, esto podría conducir a determinar cuál o cuáles transcritos se expresan de manera alterada en cáncer de mama. Por otra parte, la pérdida de la expresión de *HOXA5* también se ha correlacionado con la pérdida de p53, y aunque Cantile *et al.*, en 2003 no detectaron *HOXA5* en tejido mamario normal, Makiyama *et*

al., en 2005 detectaron una disminución significativa en carcinomas con respecto a tejidos tumorales benignos (Raman *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004).

En nuestro grupo Webb-Vargas en 2007 realizó la amplificación mediante RT-PCR de los genes *HOXA1*, *A5*, *B2*, *D3*, *D4* y *D10* en 35 muestras de tejido mamario maligno, siete de tejido no maligno y la línea celular MCF-7 de cáncer de mama receptor de estrógeno positivo y SiHa de células escamosas de carcinoma de cérvix. La amplificación de los genes *HOX* en los DNAc's de las células MCF-7 mostraron la presencia de los tres transcritos de *HOXA1* y la expresión de *HOXA5*, *B5* y *B13*. También, se amplificaron los genes *HOXA1* transcrito corto, medio, largo, *A5*, *B2*, *B5*, *B13*, *D3*, *D4* y *D10* en los DNAc's obtenidos de la línea SiHa. Los resultados mostraron la expresión del transcrito corto de *HOXA1* en muestras de tejido mamario en asociación débil con la presencia de éste y la ausencia de malignidad, así como una alta correlación entre la ausencia de malignidad y la presencia del transcrito medio del gen *HOXA1* en las muestras analizadas. La pérdida de la expresión de *HOXA5* en 17 de 35 se asocia a la regulación de la apoptosis, pues se ha demostrado que la pérdida de expresión de expresión de p53 es concurrente en 20 de 30 de tumores mamarios primarios analizados, donde 16 de las 20 muestras negativas para p53 presentaron una metilación en el promotor *HOXA5* (Rama *et al.*, 2000). Por otro lado, la expresión de *HOXB2* en tejido mamario mostró variabilidad, ya que se expresó sin diferencia alguna en tejido con y sin cáncer de mama (Webb-Vargas 2007).

Se ha descrito la expresión de *HOXB5* en tejido normal de mama (Cantile *et al.*, 2003, Yamamoto *et al.*, 2003 y Makiyama *et al.*, 2005). Así mismo, la presencia de *HOXB5* en tejido maligno fue detectada en más de la mitad de las muestras analizadas, mientras que los trabajos de Makiyama *et al.*, -en (2005) y Cantile *et al.*, en (2003), la expresión se encuentra a la mitad en un 36% de las muestras, respectivamente.

Por otra parte, Webb-Vargas en 2007 encontró en las muestras de tejido mamario analizadas una correlación estadísticamente significativa entre la pérdida de la expresión de *HOXD3* y la presencia de malignidad en el tejido mamario analizado. La regulación negativa de la expresión de *HOXD3* se encontró en las muestras de estadios I y II (4 de 4), y en 6 de 10 muestras del estadio III. Se ha demostrado que *HOXD3* induce la angiogénesis en células endoteliales y es parte de la ruta de activación por el factor de crecimiento de fibroblastos básico, promoviendo la expresión de integrina 51 (bFGF, Boudreau *et al.*, 1997; Boudreau & Varner, 2004).

Además, la sobre-expresión de este gen se ha asociado con invasividad y movilidad en células de melanoma y cáncer de pulmón, regulando la pérdida de caderina-E y plakoglobina, la nueva expresión de caderina-N e integrina alfa4, incrementando la expresión de integrina alfabvbeta3, de la metaloproteinasa-2 y del activador de uroquinasa-plasminógeno, ambas degradadoras de la matriz extracelular; creando una línea altamente metastásica (Hamada *et al.*, 2002; Hamada *et al.*, 2002; Ohta *et al.*, 2006).

Así mismo, Webb-Vargas 2007 detectó la expresión de *HOXD4* en todos los tejidos no malignos y en el 88% de los tejidos malignos, sin ser significativa la disminución y encontró expresado *HOXD10* en la mayoría de los tejidos, tanto malignos como no malignos, cuya disminución no se asoció a la presencia de malignidad (Webb-Vargas., 2007).

También en nuestro grupo de trabajo se analizó la expresión de los genes *HOX A1, A5, B13, C5, C10, D9 y D13* en líneas celulares así como en muestras de tejido cervical normal y neoplásico encontrando predominantemente la expresión de estos genes *HOX* en la mayoría de los tejidos cervicales analizados con patología maligna. En contraste, los transcritos de *HOXB4* y *D13* no fueron detectados en las muestras de tejido cervical neoplásico aunque *HOXD13* se expresó en las líneas celulares SiHa, CaSki, C33a, excepto en HeLa, mientras que *HOXB4* se activó solamente en las líneas celulares CaSki y SiHa (2009 Arreola-Triana).

4.4. Sobre-expresión de *HOXB13* en cáncer

Yamamoto *et al.*, 2003 no detectaron en tejido normal mamario la expresión del gen *HOXB13* mientras que se encontró en 11 de 14 muestras de tejido maligno de cáncer de mama (Cantile *et al.*, en 2003). Así mismo, el transcrito de *HOXB13* fue detectado en la línea de cáncer mamario MCF-7 receptor de estrógeno (RE) positivo por Svingen y Tonissen en 2003. La sobre-expresión de *HOXB13* aumenta la motilidad y propiedades invasivas de las células (Ma *et al.*, 2004).

Durante la diferenciación de médula ósea a partir de células madre endoteliales, Chung *et al.*, en 2009 encontraron que la expresión *HOXB13* disminuyó durante la diferenciación endotelial, sin embargo se vuelve a detectar *HOXB13* cuando las células endoteliales de médula ósea entran en angiogénesis. Jerevall *et al.*, en 2008 cuantificaron la presencia del gen *HOXB13* e *IL17BR* mediante PCR tiempo real en

tumores de 264 pacientes post-menopausia tratadas con tamoxifen y 93 pacientes en pre-menopausia sistemáticamente no tratadas, encontrando en un gran número de muestras la presencia de *HOXB13:IL17BR* asociados con agresividad tumoral, mientras un número muy bajo de muestras presentaron solo el gen *IL17BR*. El ratio *HOXB13:IL17* en muestras de pacientes que presentaron solo la expresión de *HOXB13*, sobrevivieron después del tratamiento endócrino, con una baja expresión de *HOXB13* como beneficio del tratamiento prolongado, en pacientes con receptor de estrógenos positivo (Gotez *et al* 2006).

La sobre expresión de *HOXB13* se ha detectado en células de cáncer endometrial y tejido de pacientes por medio de RT-PCR cuantitativo. Para identificar si la sobre-expresión de *HOXB13* está involucrada en la invasión o metástasis del cáncer endometrial, transfectaron la línea celular AN3CA con el antisentido *HOXB13*/pcDNA3.1 en un plásmido por electroporación *in vitro*, encontrando hasta un 90% en la disminución en la actividad invasiva de las células comparadas con células parentales y el control transfectante. Adicionalmente, le administraron 17 β -estradiol a las células AN3CA induciendo la expresión de *HOXB13*. Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de *HOXB13* en cáncer endometrial puede ser asociada con la habilidad invasiva de las células de cáncer con la regulación por estrógeno (Zhao *et al.*, 2005).

HOXB13 también se encuentra presente en algunos tejidos sin generar ningún tipo de carcinogénesis, un ejemplo son las glándulas salivales donde el transcrito de *HOXB13* está presente de manera diferencial en acinos mucosos y cerosos de glándulas salivales (Cazal *et al.*, 2006).

HOXB13 no siempre actúa en la activación de malignidad en el cáncer de próstata (CaP) durante su desarrollo y progresión las señales del receptor de andrógeno (RA) actúa en la regulación de genes blanco durante el CaP. La homeoproteína *HOXB13* actúa como represor del RA. *HOXB13* no solo actúa como un factor de transcripción de unión a DNA, si no que juega un papel importante como un represor del RA modulando las señales del RA, lo que lo postula como un represor transcripcional de no-unión a DNA (Kim *et al.*, en 2010).

En nuestro grupo de trabajo se detectó la expresión del gen *HOXB13* en muestras de cáncer de mama pertenecientes a los estadios I y II demostrando claramente la expresión selectiva del transcrito de *HOXB13* en 27 de 35 muestras neoplásicas analizadas, con una alta incidencia en la presencia de malignidad. Interesantemente, la

expresión del gen *HOXB13* mostró una fuerte asociación entre la presencia del mensajero de este gen y la presencia de cáncer de mama. Además, el encendido de *HOXB13* se detectó en la gran mayoría de las muestras (14 de 15), estando presente desde el estadio I hasta el estadio III. Estos resultados sugieren que *HOXB13* se enciende temprano y se mantienen durante el desarrollo del carcinoma, lo que lo propone como un biomarcador molecular temprano (Webb-Vargas 2007).

Además, *HOXB13* se encontró encendido tanto en muestras positivas como negativas al RE, contrastando con lo descrito por Rodríguez *et al.*, en 2006 que mostraron la ausencia de expresión de *HOXB13*, posiblemente debida a la metilación de su promotor, en tejido y líneas celulares de cáncer de mama positivos para RE. La expresión nula de *HOXB13* se detectó en tejido mamario normal, con la excepción de un subgrupo de muestras normales en las que este gen se expresó en baja concentración en la unidad terminal ducto-lobular (Yamamoto *et al.*, en 2003; Svingen y Tonissen en 2003; Cantile *et al.*, en 2003; y Ma *et al.*, en 2004). Por otro lado, trabajos previamente descritos en 2003 muestran una asociación entre la presencia de cáncer y la sobre-expresión de *HOXB13*, distinguiéndose su expresión en adenocarcinomas ductales *in situ* y en carcinoma ductal invasivo mientras que no se detecta esta expresión en células epitelio mamario normal (Ma *et al.*, y Cantile *et al.*, 2004).

Asimismo, el análisis de expresión de *HOXB13* con microarreglos correlacionó la sobre-expresión de este gen con la disminución de la expresión del receptor B de IL-17, en recurrencia del cáncer de mama ductal al ser tratado con Tamoxifen (Ma *et al.*, 2004). Además, la expresión de *HOXB13* en la línea celular MCF-10A -de fenotipo normal redujo las uniones de tipo epitelial y al tratarse con factor de crecimiento epidermal (EGF) aumentó la movilidad y la invasión *in vivo*. Por otra parte, se ha indicado que este gen se sobre-expresa en la presencia de estrógenos en líneas celulares de cáncer de endometrio, respondiendo de manera dependiente a tiempo y dosis (Zhao *et al.*, 2005). Es importante mencionar que la expresión de los genes del complejo *HOXB* requiere de la fase S concordando con la posible expresión de *HOXB13* limitada a células en proliferación del epitelio en este caso mamario, ya sea durante la fase lútea en cada ciclo menstrual, o en los carcinomas de mama (Fisher y Méchali, 2003).

Posteriormente, también en nuestro grupo Cuaranta-Monrroy en el 2008 detectó la expresión diferencial del gen *HOXB13* en muestras de tejido ovárico con una tendencia muy clara a la sobre-expresión en tejidos con patología maligna. Este gen se expresó en solamente una muestra de tejido con patología benigna de ovario y se

cuantificó mediante PCR cuantitativa, encontrando la sobre-expresión de *HOXB13* de 76 a 4985 veces en muestras de patología maligna de ovario comparada con las muestras normales y con patología benigna. Interesantemente, también se detectó la sobre-expresión del gen *HOXB13* en tejidos cervicales con patología maligna. Los niveles de expresión de *HOXB13* en las muestras de tejido cervical fueron de 3900 veces en comparación con el tejido con patología benigna (Arreola-Triana, 2008 y Cuarenta-Monrroy, 2008).

En 2010 también en nuestro grupo de trabajo se realizó la cuantificación relativa por PCR cuantitativo mostrando la sobre-expresión de *HOXB13* en 33 de los 56 tejidos mamarios con una expresión relativa que fue desde 2.3 a 132,364 (63 veces). La sobre-expresión de *HOXB13* en las muestras de tejido mamario con patología maligna mostró valores de sobre-expresión que van desde 1.08 a 33,406.42 veces comparándolas con la línea celular MCF-7 (Reyna-Alvarado 2010).

Por otro lado, en el 2010 se descubre que *HOXB13* actúa como un gen supresor de tumor en cáncer de próstata y cáncer renal. Estos órganos expresan *HOXB13* en tejidos normales sin alteraciones malignas donde su expresión se vuelve aberrante y/o nula por lo que el silenciamiento se convierte en la herramienta de regulación génica óptima, por el contrario al sobre-expresar *HOXB13* provocó la supresión tumoral en tejido considerado como maligno es decir *HOXB13* no se altera durante la tumorogénesis debido a la importancia de la expresión de este gen se ha buscado por diferentes herramientas moleculares encontrar su función a nivel celular y de tejido, una de las más relevantes es el silenciamiento génico mediante RNAs de interferencia (Kim 2010, Sahah y Sukumar 2010).

4.5. Silenciamiento génico con RNAi's

4.5.1. RNAi y su Biogénesis

Los estudios para determinar los mecanismos involucrados con el RNA de interferencia (RNAi) se realizaron principalmente en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, introduciendo RNA de doble cadena (dsRNA) de ~500 nucleótidos (dsRNA “largos”). Como primer paso, el dsRNA “largo” penetra la célula y es reconocido por la RNAasa de tipo-III llamada Dicer (Figura 2). A continuación, Dicer escinde el dsRNA en RNA pequeños de doble hebra (siRNA, por sus siglas en inglés) de 22-25 nucleótidos de largo con 2-3 nucleótidos no pareados en el extremo 3' de cada hebra, un grupo fosfato en el extremo

5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3' (Hammond *et al.*,2011). Estos siRNA son reclutados por el *complejo* protéico *de silenciamiento-inducido por RNA* (RISC, por sus siglas en inglés). RISC separa las hebras del siRNA y utiliza la hebra anti-sentido como guía para reclutar la molécula del mRNA que presenta la secuencia complementaria (mRNA blanco). A continuación, RISC escinde el mRNA, el cual es rápidamente degradado. La hebra guía del siRNA y el mRNA blanco debe presentar una perfecta complementariedad cerca del sitio de rompimiento/ruptura, el cual se sitúa a 10-11 nucleótidos del extremo 5' del siRNA (Elbashir *et al.*, 2001).


4.5.2. Uso de RNAi como herramienta para el silenciamiento génico

La inhibición artificial de la expresión de genes mediante RNAi es conocido como “silenciamiento” o “knocking down” debido a que la pérdida no es total, a diferencia del “knocking out” donde el gen es eliminado completamente del genoma. Usando la información acerca del RNAi en mamíferos, se desarrollaron los siguientes métodos para el “silenciamiento” de genes:

- 1) El uso de siRNAs sintéticos de 21 nt introducidos directamente a la célula mediante transfección o electroporación.
- 2) El uso de RNAs “pequeños” con estructuras de “hairpin” (shRNA o “short hairpin RNA”) expresados en vectores-plásmidos, introducidos a la célula mediante transfección o electroporación.
- 3) El uso de shRNA expresados en vectores de expresión virales, introducidos a la célula mediante infección con pseudo-partículas virales.

El método a escoger depende de dos factores: la duración del efecto de silenciamiento que se requiera y el tipo de células que se desea trabajar (Tabla 2).

Tabla 2. Uso de RNAi sintéticos y RNAi con estructura de “harpin” (shRNAs)

|  | <p>RNAi</p> | <p>shRNA/vector-plásmido</p> | <p>Sh RNA/vector lentiviral o retroviral</p> |
|---|--|---|--|
| <p>Ventajas</p> | <p>Fácil de sintetizar Fácil de usar</p> | <p>Estable expresión del RNAi con mayor tiempo de duración del “silenciamiento”</p> | <p>Estable expresión del RNAi con mayor tiempo de duración del “silenciamiento”. Son introducidos a prácticamente cualquier tipo de célula mediante infección</p> |
| <p>Desventajas</p> | <p>Poco tiempo de “silenciamiento”. Difíciles de usar en células, difíciles de transfectar como cultivos primarios</p> | <p>Difíciles de usar en células, difíciles de transfectar como cultivos primarios</p> | <p>Mayor tiempo para obtener las células de interés Medidas de bioseguridad (nivel II) para la recolección de las pseudopartículas virales e infección de las células blanco</p> |

Tomado de Ortiz-Quintero 2009

4.6. Silenciamiento génico de genes *HOX*

La inhibición de la producción de la homeoproteína *HOXD3* mediante un vector que expresó un antisentido, redujo la capacidad de invasión en Matrigel, incrementó la expresión de la proteína 4 que interactúa con cdc-42, KIAA0554 y la tropomiosina 1, las cuales están asociadas al sistema del citoesqueleto (Okubo *et al.*, 2002).

La expresión exógena y estudios de knockdown mediante RNA de interferencia establecen que *HOXA10* regula la hipermetilación de cromatina y trimetilación de la histona K4 (H3K4) así como la metilación del gen *RUNX2*. *HOXA10* contribuye a la temprana expresión de genes osteogénicos a través del remodelamiento de la cromatina subsecuentemente soporta la formación de hueso por regulación directa de genes fenotípicos de osteoblastos (Hassan *et al.*, 2007).

4.6.1. Silenciamiento génico de *HOXB13*

HOXB13 se expresa en múltiples líneas celulares de cáncer de ovario, tumores en tejido de mama y que el Knockdown endógeno de *HOXB13* mediante RNAi expresado en vectores lentivirales en líneas celulares de cáncer de ovario de humano está asociado con la reducción de la proliferación celular. La expresión ectópica de *HOXB13* es capaz de inducir proliferación celular en los fibroblastos de embriones murinos con el p53 *-/-* a. Estos autores demostraron que *HOXB13* colabora activando *ras* que promueve el crecimiento tumoral *in vivo* (Miao *et al.*, en 2007).

El hecho de que *HOXB13* está expresado en un alto porcentaje de líneas celulares de cáncer de ovario, de mama, de cáncer de cérvix así como el antecedente de *HOXB13* en cáncer de mama que está asociada con la agresividad del curso clínico de la enfermedad comparado con tumores de cáncer de mama donde no está expresado, aumenta la posibilidad de que *HOXB13* juegue un papel clave en la progresión tumoral. La pérdida del fenotipo en ratones knock-out de *Hoxb13* sugiere una fuerte relación con la diferenciación y reparación epidermal. *HOXB13* está expresado en piel de adulto y feto, en humanos su expresión está regulada negativamente en piel fetal, permite la regeneración en cicatrices pero su expresión no cambia en adultos lo anterior se probó en explantes de ratones SCID (por sus siglas en inglés "Severe Combined Immuno Deficiency) (Kömüves *et al.*, 2003 y Stelnicki *et al.*, 1998). En 2003 se postula ha *HOXB13* en piel adulta como un promotor de diferenciación celular debido a que su sobre expresión en piel produce morfogénesis aberrante (Mack *et al.*, 2003).

Estos resultados sugirieron que la supresión de *HOXB13* puede ser un componente necesario para obtener la reparación óptima (Mack *et al.*, 2005) en piel. También se reportó que los ratones knock-out sanan con menos cicatrices comparados con los wild-type (Passi *et al.*, 2004).

La desregulación de genes *HOX* está presente en diversos tipos de cáncer incluyendo melanomas (Grier *et al.*, 2005). A pesar de los avances considerables en nuestra comprensión de la genética del melanoma, hasta el momento, no hay tratamientos eficaces para el melanoma metastásico, y el pronóstico después de que la enfermedad ha avanzado a esta etapa es extremadamente pobre (Chudnovsky *et al.*, 2005). En particular *Hoxb13* funciona como una proteína proapoptótica y antiproliferativa durante el desarrollo de la médula espinal y las vértebras caudales de la cola en ratones, pero también está implicado en la reparación de heridas cutáneas en adulto (Chudnovsky *et al.*, 2005). Las epidermis adulta en la cual se expresan varios genes *HOX* entre ellos *HOXB13* es continuamente renovada en un programa de arresto del crecimiento celular, diferenciación y una forma especializada de apoptosis cornificación (Mack *et al.*, 2005).

Utilizando fibroblastos de ratones en etapa fetal y piel de humano adulto se demostró que *Hoxb13* es diferencialmente expresado en feto que en adulto. Interesantemente, *Hoxb13* fue sobre expresado en queratinocitos de rata y cambió radicalmente el crecimiento de las células (Lu *et al.*, 2010).

Debido a la sobre-expresión de *HOXB13* en diferentes tipos de las células con patología maligna, en esta tesis se utilizó una estrategia experimental con RNAi's como una herramienta directa para el knockdown o silenciamiento del gen *Hoxb13* en la línea celular B16F10 de melanoma de ratón que expresa esta homeoproteína.

Estrategia Experimental

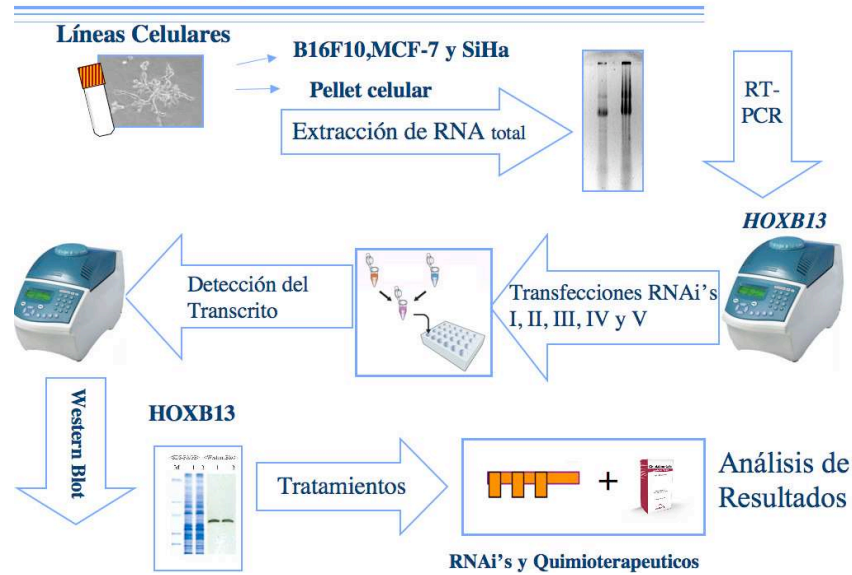


Figura 2. Estrategia Experimental para el silenciamiento de *HOXB13*. Para seleccionar la línea celular adecuada se llevó a cabo la amplificación del gen *HOXB13* en las líneas celulares B16F10, SiHa y MCF-7, a su vez se diseñaron los RNAi's I, II, III IV y V este último no codificante de *HOXB13*. Posteriormente, se clonaron los RNAi's en el vector pGSH1-*GFP* para transfectarse en la línea celular B16F10, a su vez se detectó el transcrito de *HOXB13* después del silenciamiento, se llevó a cabo la inmunodetección de la homeoproteína *HOXB13* antes y después del silenciamiento en la misma línea celular. Para determinar el efecto máximo del silenciamiento por los RNAi's se realizaron ensayos de viabilidad celular y se analizó el efecto con los quimioterapéuticos Cisplatino y Doxorubicina.

Para el silenciamiento génico de *HOXB13*, se analizó la expresión del gen mediante RT-PCR punto final en las líneas celulares MCF-7, SiHa y B16F10 y se determinó el efecto de cuatro RNAi's dirigidos a diferentes posiciones del RNA mensajero de *HOXB13* en la expresión de su RNAm y de la homeoproteína *HOXB13*. Además, se analizó el efecto de los RNAi's en la expresión de la proteína Verde Fluorescente (*GFP*), la viabilidad celular así como el efecto de los quimioterapéuticos Doxorubicina y Cisplatino en combinación con los RNAi's (Figura 2).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Detección de la expresión de *HOXB13* en las líneas celulares mediante RT-PCR

5.1.1. Cultivo de las líneas celulares

Las líneas celulares empleadas para la estandarización fueron la línea celular de adenocarcinoma ductal infiltrante con receptor de estrógeno positivo (MCF-7), la línea celular de carcinoma de cérvix de células escamosas infectadas con el virus de papiloma humano tipo 16 (SiHa) y la línea B16F10 de melanoma de ratón (C57BL/6J).

Los crioviales de cada línea celular almacenados en nitrógeno líquido -196°C se descongelaron y se sembraron en botellas de cultivo de 25cm^2 en medio de cultivo Dulbecco's Medio Esencial Mínimo (DMEMF12) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y antibióticos para cultivo celular (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 10ug/ml). Las botellas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2 .

Las líneas celulares se mantuvieron mediante sub-cultivos semanales en una confluencia del 70% con un total aproximado de 600 000 células por cajas de cultivo de 25cm^3 . Para la disgregación de la monocapa celular, se incubaron uno a dos min usando de uno a dos ml de tripsina-ácido diaminotetracético (EDTA) al 0.25%, posteriormente se retiró la tripsina-EDTA para la colecta de la pastilla celular. Las células se colocaron en tubos para centrifuga de 15 mL, se centrifugaron a 2,500 rpm por un tiempo de cinco min, se retiró el medio de cultivo y se colocaron de dos a tres ml de Buffer PBS 1X (dependiendo del tamaño de la pastilla), se agitó suavemente, y se centrifugó a 2,500 rpm por minutos min. Se repitió este paso de lavado con buffer PBS 1X, se retiró el sobrenadante, y la pastilla celular se congeló a -70°C o se procedió inmediatamente al aislamiento de los RNA's totales (modificado de Sambrook & Russell, 2001).

5.1.2. Aislamiento de los RNA's totales a partir de líneas celulares

La extracción de los RNA's totales se realizó con material libre de RNAsas, como tubos para microcentrífuga certificados, agua DEPC, soluciones disueltas en agua DEPC, micropipetas reservadas para uso con RNA's y cámaras de electroforesis tratadas con RNasa Zap (Invitrogen, Carlsbad California, E.E.U.U.). Se usaron guantes para evitar la contaminación con las RNAsas y se trató el área de trabajo con agua DEPC y RNasa Zap. El agua DEPC se preparó añadiendo 1mL de Dietilpirocarbonato (DEPC) 6.9M (dietilpirocarbonato, Sigma, St. Louis Missouri, U.S.A.) en 1 L de agua procesada en filtros MiliQ, se homogenizó por agitación, se incubó a 37°C por un mínimo de 12 h, y se esterilizó por autoclave durante 15 min para hidrolizar el DEPC.

La extracción de los RNA's totales se realizó utilizando el método de Trizol descrito por Simms y cols. (1993), en donde mediante pipeteo se homogeneizaron los cultivos celulares con Trizol (1 ml trizol con aproximadamente 10×10^6 células) en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y posteriormente se incubó la solución homogenizada durante cinco min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se añadió 0.2 ml de cloroformo a cada tubo por ml de Trizol utilizado para la homogenización, se mezcló mediante vórtex vigorosamente durante 15 s la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente 6 min y se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 15 min. Una vez terminada la centrifugación se retiró el tubo gentilmente observando dos fases, la fase orgánica de color rojo (inferior) es el cloroformo, una interfase y la fase acuosa incolora (superior) donde se encuentran los RNA's totales.

Para la precipitación de los RNA's, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregaron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol utilizado en la homogenización inicial. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugaron a 13 200 rpm por 8 min a 4°C y se procedió al lavado de la pastilla de los RNAs, donde se removió el sobrenadante y se mezcló en vortex con 1 ml de etanol 75% por cada mililitro de Trizol empleado en la homogenización inicial. Se centrifugó a 13 200 rpm y una vez obtenida la pastilla de RNA's, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de los RNA's a temperatura ambiente de 20 a 25 min, sin permitir que se secase totalmente. Por último, se resuspendió la pastilla en 20 µl de agua DEPC.

La visualización de los RNA's se realizó en geles de agarosa al 0.8% colocándose en una cámara de electroforesis horizontal sumergidos en buffer SB 1X. Las muestras de los RNA's fueron mezcladas con 2 μ l de jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y fueron depositadas en los carriles del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V por 40 min. Posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio 5 μ g/ml durante 10 min. La fotodocumentación de los geles con los RNA's se realizó utilizando un transiluminador de luz UV. Se determinó la calidad de los RNA's, así como su integridad con la presencia de las dos bandas prominentes de los RNA's ribosomales de aproximadamente 5 y 2 kb (28S y 18S, respectivamente).

Posteriormente, se cuantificó la concentración de los RNA's extraídos en ng/ μ l y se evaluó su pureza en un rango de longitud de onda 260/280 (λ) en el Nanodrop ND-100 TM (Termo Scientific) para lo cual se inicializó el aparato colocando 2 μ l de agua miliQ, posteriormente se colocaron 2 μ l del blanco y por último 2 μ l de cada una de las muestras de los RNA's totales para determinar la lectura de cada una de las muestras.

Después de la extracción de los RNAs totales, se realizó la síntesis del DNA complementario al RNAm (DNAc) mediante la técnica de transcripción reversa (RT). Para lo cual, se tomaron 5 μ g/ μ l del RNA, 1 μ l de oligo dT (0.5 μ g/ μ l; Invitrogen, Carlsbad C.A., USA), 0.5 μ l de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) 10 mM y se llevó la reacción a un volumen final de 12 μ l con agua libre de nucleasas. Posteriormente se incubó a 65 °C por 5 minutos y se colocó en hielo rápidamente. A continuación, se agregaron 4 μ l de buffer de reacción 5X, 2 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l de inhibidor de ribonucleasa (Promega, Madison WI, USA) RNAsin 1u/ μ l y 1 μ l de agua DEPC. La mezcla de reacción se mezcló por pipeteo y se añadió 1 μ l de la enzima M-MLV Transcriptasa reversa 50 U/ μ l; Invitrogen, Carlsbad C.A., USA). Las reacciones se incubaron a 37 °C por 50 min y al finalizar se inactivaron cada una de ellas calentando a 70 °C por 15 min y por ultimo los DNAc's se almacenaron a -20 °C.

5.1.3. Amplificación de *HOXB13* mediante PCR punto final

Todas las reacciones de amplificación del gen *HOXB13* se realizaron básicamente con el método previamente descrito por Webb-Vargas en el 2007. La reacción consistió de 1 µl del producto de la reacción RT, en un tubo eppendorff de 1.5 ml al que se le añadió además 18.35 µl de H₂O miliQ, 2.5 µl de buffer 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl y 1% Triton X-100), 0.75 µl de Cloruro de Magnesio 50 mM, 0.25µl de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) 20mM, 0.5 µL de los oligonucleótidos tanto 5' como 3' (Tabla 3). Finalmente, se agregaron 0.25µl de la enzima Taq polimerasa 5U/µl (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las condiciones de amplificación fueron 2 min de desnaturalización inicial a 94 °C , 45 s de desnaturalización inicial a 94 °C, 45 seg de alineamiento por 35 ciclos a 62 °C, 45 s de extensión a 72 °C y 10 min de extensión final durante un ciclo a 72 °C como se muestran en la Tabla 4

Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación del gen *HOXB13*

| Gen | Oligonucleótido | Secuencia |
|---------------|-----------------|------------------------------------|
| <i>HOXB13</i> | HOXB135' | 5'-GCTCTTACGGCTACAATTACA ATG-3' |
| <i>HOXB13</i> | HOXB133' | 5'-GCTGTAGCCAGGCTCATACT-3' |
| β-actina | βact 276 5' | 5'-CGTGATGGTGGGCATGGG- 3' |
| β-actina | βact 276 3' | 5'-ACGTACATGGCTGGGGTGTT-3' |

Tabla 4. Programa de amplificación de *HOXB13*

| Temperatura | Tiempo | Ciclos | Etapas |
|-------------|--------|-----------|---------------------------|
| 94 °C | 2 min | 1 ciclo | Desnaturalización inicial |
| 94 °C | 45 seg | 1 ciclo | Desnaturalización |
| 62 °C | 45 seg | 35 ciclos | Alineamiento |
| 72 °C | 45 seg | 1 ciclo | Extensión |
| 72 °C | 10 min | 1 ciclo | Extensión Final |

□□□ Para la visualización de los productos de amplificación se cargaron en el gel de agarosa 10 µl de la muestra de teñidos con bromuro de etidio 5µg/µl adicionada con 2 µl de jugo azul 6X.

5.2. Construcción de los plásmidos para el silenciamiento génico de *HOXB13* usando RNAs de interferencia

5.2.1. Diseño de los RNAi's

Se procedió al diseño de cuatro RNAi's para silenciar el gen *HOXB13* utilizando el programa de diseño (sirNA Target Finder) de la casa comercial Ambion que analizó la secuencia y determinaron las secuencias funcionales para ser utilizadas como RNAi's. De los cuatro RNAi's se seleccionaron las secuencias nucleotídicas sentido y anti-sentido.

5.2.2. Alineamiento de los oligonucleotidos

Para la preparación del inserto con los cuatro RNAi's los oligonucleotidos se resuspendieron con agua miliQ para obtener una concentración de 1µg/µl y se alinearon 2µl de cada oligonucleótido en 46µl de buffer de alineación (100mM de acetato de Potasio, 30mM HEPES-KOH pH 7.4 y 2mM de acetato de Magnesio). Posteriormente, se incubaron las mezclas a 90°C por 3 min después a 37°C por 1h y se adicionaron

350µl de agua grado PCR a la mezcla de reacción de alineación para obtener un volumen final de 400µl y una concentración de trabajo de 10ng/µl.

5.2.3. Construcción de los plásmidos codificantes con los RNAi's para *HOXB13*

5.2.3.1. Preparación de *E. coli* Ca competentes

Las bacterias calcio competentes *Escherichia coli* cepa DH5α, se prepararon en un matraz estéril con 100ml de medio Luria Bertani (LB) un ml del preinóculo. El cultivo se incubó a 37°C aproximadamente por dos horas, hasta que alcanzó la absorbancia óptima a 0.375nm en una densidad óptica λ de 590 nm. Enseguida se centrifugó a 4°C por 10 min a 5000 revoluciones por minuto (rpm). Una vez formada la pastilla se decantó el medio y se añadieron 10 ml de Cloruro de calcio (CaCl₂) 0.1 M a 4°C, se agitó mediante vortex a la pastilla y se dejó incubar por media hora en hielo. Posteriormente, se centrifugaron las bacterias en CaCl₂ 0.1 M a 4°C por 10 min a 5000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 2ml de CaCl₂ para un volumen final de 4ml (protocolo modificado de Sanbrocks). Finalmente, se transformaron las bacterias calcio competentes con un plásmido control a 1ng/µl para verificar la eficiencia de las bacterias (aproximadamente entre 1x10⁶ y 1x10⁷ pueden ser usadas para la transformación de las ligaciones).

5.2.3.2. Ligación de los RNAi's en el vector lineal pGSH1-HOXB13

La reacción de ligación del vector lineal pGSH1-GFP (GELANTINS San Diego, CA, ASA) se realizó con un µl en el vector pGSH1-GFP (50ng/µl), 1µl de oligos alineados (10ng/µl), 5µl del buffer de ligación 2X(Tris-HCl 250 mM (pH 7.6), MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM, 5 mM DTT), 1µl de la enzima T4 ligasa (5u/µl) y 2µl de agua miliQ para un volumen final de reacción de 10µl. Las reacciones de ligación se incubaron a 4°C toda la noche.

5.2.3.3. Transformación y minipreparación de los DNA's plasmídicos

Las ligaciones correspondientes a los RNAi's se transformaron en 50µl de bacterias *Escherichia coli* competentes cada una con 5µl del producto de ligación (aproximadamente a 0.2 ng/µl) y se incubaron las bacterias por 30 min en hielo, después se aplicó un choque térmico a 42°C por 45 seg, se agregaron 100µl de medio SOC (tryptone-Bacto® 2.9g, extracto de levadura-Bacto® 0.5g, NaCl 1M 1ml, KCl 1M 0.25ml, Mg₂ stock (MgCl₂ 1M 1ml• 6H₂O, MgSO₄ 1M• 7H₂O) y glucosa 2M 1m aforado a 100ml de agua destilada) se colocaron a 37°C por 30min en un incubador, horizontal agitándose a 225rpm. Finalmente se plaquearon 50µl en cajas petri con agar LB con Kanamicina 0.5 µg/µl, se crecieron toda la noche a 37°C.

Las colonias bacterianas obtenidas de la transformación de los plásmidos pGSH1-HoxB13 RNAi's así como el plásmido control, se inocularon en tubos de ensayo con 3ml de medio LB y 15µl de Kanamicina 0.5 µg/µl. Los tubos fueron puestos en agitación constante a 250rpm a 37°C durante toda la noche para la posterior obtención de los DNA's plasmídicos por el método de lisis alcalina modificado de Birnboim y Doly en 1979 como se describe a continuación.

Un volumen de 1.5ml de cada cultivo bacteriano fue colocado en tubos eppendorf de 1.5ml. Los cultivos se centrifugaron por 2 min a 14000 rpm (este paso se realizó dos veces para procesar los 3ml de medio LB), se descartó el sobrenadante y se les agregó 150µl de solución I (Tris-HCl 25mM pH 8, EDTA 10mM pH 8), los paquetes celulares se resuspendieron mediante agitación con vórtex y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se les añadió 150µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezclaron por inversión, y se incubaron 3min en hielo. Posteriormente, se les adicionaron 150µl de solución III (KOAc 5M, CH₃COOH), se agitaron por inversión y se incubaron 10min a - 20°C. Pasado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron durante 10min a 14000rpm y los sobrenadantes, que contenían los DNA's plasmídicos, se transfirieron a tubos eppendorf estériles de 1.5ml, se les agregó un volumen de cloroformo (450µl), se mezclaron mediante vórtex y se centrifugaron durante 5min a 14000rpm.

Las fases superiores se transfirieron a tubos eppendorf estériles de 1.5ml agregándoles inmediatamente 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío (1.13ml), se agitaron los tubos por inversión y se incubaron mínimo 30min a -20°C, para que los DNA's plasmídicos se precipitaran al fondo del tubo. Terminada la incubación, los tubos se centrifugaron durante 5min a 14000 rpm, se descartaron los sobrenadantes y las pastillas de DNA's se lavaron con 400µl de etanol al 70% mediante vórtex, después se centrifugaron por 5min a 14000rpm, se eliminó completamente el sobrenadante y se secaron a 37°C durante 10min. Finalmente, los DNA's plasmídicos fueron resuspendidos en 20µl de H₂O miliQ que contenía RNAsa a una concentración final de 0.02mg/ml. Los DNA's aislados fueron utilizados para el análisis con enzimas de restricción y/o almacenados a -20°C.

5.2.3.4. Análisis de restricción de los plásmidos recombinantes

Se realizaron reacciones de digestión con enzimas de restricción para verificar los DNA's plasmídicos con los RNAi's utilizando el sitio único de restricción *HindIII* en cada uno de los RNAi's con 17.2µl de agua miliQ, 2µl del buffer de restricción 10X, 0.2µl de la enzima *HindIII* 10u/µl, y por último 0.5µl del DNA plasmídico (DNAP) para obtener un volumen final de 20µl. Se incubaron las reacciones a 37°C por 2 horas y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% para la verificación de la linealización del vector en una sola banda.

Posteriormente, se utilizó una segunda estrategia para reconfirmar los insertos de los RNAi's, se llevó a cabo una doble digestión con las enzimas que se encuentran a los extremos 5' y 3' de los oligonucleotidos codificantes de los RNAi's esperando la liberación de un fragmento de 64 pares de bases. Cada una de las reacciones se llevó a cabo con 16.4µl de agua miliQ, 2µl de buffer H 10X (Tris-HCl 500 mM pH 7.5, MgCl₂ 100 mM, Dithiothreitol (DTT), NaCl 10 mM y 0.3µl de *NotI* 50U/µl y *BamHI* 10U/µl y un µl de DNAP 100ng/µl.

5.2.3.5. Purificación de los plásmidos pGSH1-HOXB13

Una vez caracterizados los plásmidos recombinantes éstos fueron purificados mediante preparación a mediana escala usando columnas Qiagen (Qiagen® Plasmid Handbook CA, USA). Las bacterias conteniendo los plásmidos se crecieron en 100ml de medio LB, posteriormente se centrifugaron a 6000g por 15 min a 4° C, se

resuspendieron las pastillas en dos ml de buffer P1 (Tris-Cl 50mM pH 8.0, EDTA 10mM y RNasa 100 µg/ml), se unieron en 4ml y se les agregó 4 ml de buffer de lisis P2 (NaOH 200mM y SDS 1%) se incubó cada uno de los plásmidos cinco minutos a temperatura ambiente, mientras tanto se realizó el preenfriado del buffer P3 de neutralización (Acetato de Potasio 3.0 M PH 5.5), posteriormente se agregaron 4ml del buffer P3 pre-enfriado y incubaron durante 15 minutos. Al final de los 15 min de incubación se centrifugaron a 20 000g por 30 min a 4°C, se removió el sobrenadante y se centrifugó de nuevo el sobrenadante a 20 000g por 15 min a 4°C, mientras tanto se equilibraron columnas QIAGEN-*tip 100* con 4 ml de buffer QBT (NaCl 750 Mm, MOPS 50 mM, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v) y Tritón® X-100 0.15%). El equilibrio de las columnas se llevó a cabo por gravedad y por último se eluyó el DNAP con 5 ml de buffer QF NaCl 1.25 M, Tris-Cl 50mM, pH 8.5 y isopropanol al 15%) que por ultimo se precipitó el DNAP con 3.5 ml de isopropanol se mezcló por inversión y centrifugó inmediatamente a 15 000g 30 min a 4 °C para después lavar la pastilla con dos ml de etanol al 70% y se centrifugó a 15 000g por 10 min, para dejar secar la pastilla y finalmente resuspender en uno a dos ml de agua miliQ. Finalmente. se cuantificó la concentración de los DNAP's extraídos en ng/µl y se evaluó su pureza en un rango de longitud de onda 260/280 (λ) en el Nanodrop ND-100 TM (Termo Scientific) para lo cual se inicializó el aparato colocando 2µl de agua miliQ, posteriormente se colocaron 2µl del blanco y por último 2µl de cada uno de los plásmidos purificados. La concentración de los DNAs purificados varió de 495 a 720 ng/µl y la relación de absorbancia 260/280 de los plásmidos fue de 1.8 a 1.9 lo que indica que estos plásmidos tienen una buena calidad para ser transfectados en la línea celular B16F10.

5.3 Detección del silenciamiento del RNAm de *HOXB13* con los RNAi's

5.3.1. Transfección de los plásmidos pGSH1-HOXB13 RNAi's

Para la transfección de la línea celular B16F10 con los plásmidos conteniendo los RNAi's, primero se plaquearon las células en cajas de 96 pozos con 3000 células por pozo y al día siguiente se procedió a la introducción de los DNAs plasmídicos purificados usando el método de polietilenimina (PEI). Se probaron los cuatro RNAi's a partir de un stock de los plásmidos de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para transfectar a las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 μg totales en un volumen de 20 μl y las diluciones se llevaron a cabo con NaCl 150 mM y se utilizó una relación de un volumen/volumen del agente transfectante PEI (150mM) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\mu\text{lPEI} = ((\mu\text{g DNAP} \times 3 \times \text{NIP}^5) / 150 \text{mM})$$

PEI= agente transfectante polietilenimina

DNAP= DNA plasmídico

NIP= Número de fosfatos relación constante 5

Se mezclaron los DNA plasmídicos codificantes de los RNAi's en una proporción de vol/vol y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente para que se formara el complejo PEI/DNAP. Posteriormente, se agregaron 20 μl de éste complejo a las células B16F10 previamente tratadas con medio fresco DMEMF12. Estas células se incubaron a 37 °C por 48 horas para el posterior ensayo de viabilidad.

5.3.2. Detección del transcrito *Hoxb13*

Para la detección del transcrito de *Hoxb13* en las células B16F10 de melanoma murino correspondientes a los sitios de silenciamiento génico de cada uno de los RNAi's se diseñaron los oligonucleótidos descritos en la tabla 5 que permitieron amplificar 234, 202, 173 y 189 pb correspondientes al sitio del silenciamiento de los RNAi's I, II, III y IV. La reacción consistió de 1 µl del producto de la reacción RT, en un tubo eppendorff de 1.5 ml al que se le añadió además 14 µl de H₂O miliQ, 2.5 µl de buffer 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl y 1% Triton X-100), 0.75 µl de Cloruro de Magnesio 50 mM, 0.25µl dNTP's 20mM, 3µl de los oligonucleótidos 5' y 3' 5µM (Tabla 5) y finalmente se agregaron 0.5µl de la enzima Taq polimerasa 5U/µl (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las condiciones de amplificación fueron un min de desnaturalización inicial un ciclo, 94 °C un min de desnaturalización, 55 a 65 °C un min, y un min de extensión a 72 °C 35 ciclos, extensión final 72 °C durante 5 min como se muestran en la Tabla 6. La temperatura de alineamiento fue 63.5, 65.3, 64.2 y 63.2 °C respectivamente para las amplificación de *Hoxb13* con los RNAi's I-IV y como control interno se utilizó el gen endogeno β-actina.

Tabla 5. Oligonucleótidos para la detección del silenciamiento de *Hoxb13*

| Gen | Oligonucleótido | Secuencia |
|----------|-----------------|-----------------------------|
| HOXB13 | DTHB13-11 5' | 5'-CTTGGATGGAGCCAAGGATA-3' |
| HOXB13 | DTHB13-12 3' | 5'-CCGCTCCAAAGTAACCATA-3' |
| HOXB13 | DTHB13-21 5' | 5'-GTTGCCAGGGAGAACAGAAC-3' |
| HOXB13 | DTHB13-22 3' | 5'-GAGATCTTGCGCCTCTTGTC-3' |
| HOXB13 | DTHB13-31 5' | 5'-TGAGAGGGCCCCTAGAGACAA-3' |
| HOXB13 | DTHB13-32 3' | 5'-GCCACTGTCAGGATGAATGA-3' |
| HOXB13 | DTHB13-41 5' | 5'-TTCATCGTCAGGATGAATGA-3' |
| HOXB13 | DTHB13-42 3' | 5'-GGTGTAATGGAAGGGGGTCT-3' |
| β-actina | βact 276 5' | 5'-CGTGATGGTGGGCATGGG- 3' |
| β-actina | βact 276 3' | 5'-ACGTACATGGCTGGGGTGTT-3' |

Tabla 6. Programa de amplificación para la detección del silenciamiento de *HOXB13*

| Temperatura | Tiempo | Ciclo | Etapa |
|-------------|--------|-----------|-------------------|
| 94 °C | 1 min | 1 ciclo | Desnaturalización |
| 55-65°C | 1 min | 35 ciclos | Alineamiento |
| 72 °C | 1min | 1 ciclo | Extensión |
| 72 °C | 5 min | 1 ciclo | Extensión Final |

5.4 Inmunodetección de HOXB13 mediante Western Blot por el silenciamiento de los RNAi's

Las muestras de las células transfectadas con los RNAi's fueron también utilizadas para la inmunodetección de la proteína HOXB13. Para ello, se corrieron mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% y se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de Nitrocelulosa (OSMONICS, Minnesota, MN, USA) acomodando el gel y la membrana en una cámara de transferencia húmeda vertical Mini PROTEAN® 3 Cell (BIO RAD, CA, U.S.A). La membrana fue tratada previamente con buffer de transferencia 1X (preparado a partir de una solución 10X: TRIS BASE 15.15g, Glicina 72g) para aumentar su permeabilidad. También las esponjas y los papeles filtros fueron sumergidos en el buffer de transferencia 1X. La cámara de electroforesis se llenó con el buffer de transferencia hasta cubrirla totalmente y se corrió a 10 V toda la noche. Posteriormente, se tomó la membrana y se lavó con agua miliQ y se colocó en la solución rojo de Ponceu concentrado (Sigma-Aldrich Química, Toluca, México) por 5 min para verificar la transferencia. Después, se bloqueó con la solución TBS-T 1X (preparado a partir de una solución 10X: TWEEN® 20 al 2%)(Sigma-Aldrich Química, St. Louis , MO, USA) por 2 h a temperatura ambiente y agitación constante a 150 rpm. Terminado el bloqueo se incubó con el anticuerpo primario IgG anti-HoxB13 (Santa Cruz, CA, USA) disuelto en TBS 1X en la dilución 1:10 000 a temperatura ambiente con agitación constante a 150 rpm por 2 horas. Al término de la incubación se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con TBS-T 1X. Posteriormente, se incubó con

el anticuerpo secundario IgG HRP acoplado a peroxidasa de rábano disuelto en TBS 1X por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente, se dieron tres lavados más de 10 min cada uno con TBS-T 1X. Enseguida la membrana se colocó en contacto con 500 μ l (Volúmen/Volúmen) con los sustratos de quimioluminiscencia solución 1 y 2 de ECL (Amersham Biosciences, Buckingham, England) por 1 min. El exceso del reactivo se eliminó tomando la membrana con cuidado con las pinzas y colocándola sobre una sanita. La membrana se expuso por varios tiempos (1, 3, 5 y 30 min) o desde 1 hora a toda la noche hasta detectar las bandas de interés en oscuridad dentro del casete y sobre esta una película (Daigger, IL, USA). La película se secó con cuidado y con la ayuda de una pinza se colocó por 1 min en la solución reveladora (Estman Kodak Company, NY, USA) agitando suavemente, después se enjuagó con agua corriente por 1 min y finalmente se pasó a la solución fijadora (Estman Kodak Company NY, USA) por 1min.

5.5. Silenciamiento génico de *Hoxb13* por RNAi's en la viabilidad celular

Tres mil células B16F10 se utilizaron por pozo en los ensayos de viabilidad celular usando tres repeticiones en tres experimentos independientes, en un volumen de 200 μ l de medio de cultivo DMEMF12 y se incubaron por 12 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ para permitir que las células se adhirieran al fondo de la microplaca. Al término de la incubación se retiró el medio de cultivo de los pozos y se aplicaron los tratamientos de dosis respuesta de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 μ g totales de cada uno de los plásmidos codificantes a los RNAi's en un volumen de 200 μ l. Posteriormente, se incubó por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Al término del periodo de incubación se eliminó el medio de cultivo con cuidado utilizando una pipeta de 200 μ l y se colocaron 200 μ l de medio fresco y 20 μ l de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5mg/ml. Las células se incubaron nuevamente a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 2 horas y media, al terminar se removió el medio con una pipeta de 200 μ l y se añadieron 100 μ l de dimetilsulfóxido concentrado (DMSO; Sigma-Aldrich) para disolver los cristales de formazán, los cuales fueron formados por la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Esta reacción permitió determinar la viabilidad celular, la cual depende directamente proporcional de la cantidad de cristales formados, que difractan la longitud de onda a 570nm analizada en el espectrofotómetro (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioteK, Winooski,

VT, USA). En éste experimento se utilizó como control las lecturas de cada uno de los experimentos células sin los RNA de interferencia y como blanco de lectura pozos vacíos solo con un volumen de 100µl DMSO. Al finalizar las lecturas se llevaron a cabo los cálculos para determinar la viabilidad celular:

$$\% = \frac{\text{D.O (a) de las células tratadas} \times 100}{\text{D.O (b) de las células controles}}$$

- D.O (a) es la densidad óptica del cultivo después de la exposición a una concentración de los RNAi's (promedio de los experimentos por triplicado).
- D.O (b) es la densidad óptica del cultivo control (células sin los RNAi's).

A partir de ello se calcularon las concentraciones que producen la reducción de la viabilidad celular en un 50 %,(concentración citotóxica media CC50).

5.6 Silenciamiento génico de *Hoxb13* por RNAi's en combinación con los Quimioterapéuticos Cisplatino y Doxorrubicina

Se llevó a cabo el mismo protocolo que en el punto anterior donde se aplicaron los tratamientos de los plásmidos codificantes de los RNAi's I y II en la dosis que presentaron un mayor efecto sobre la viabilidad celular (0.8µg totales en un volumen de 200µl). Posteriormente, se incubó por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y se aplicaron los tratamientos de dosis respuesta de los quimioterapéuticos Doxorrubicina a 10, 30, 50, 70 y 90 picogramos por µl (pg/µl) y de igual forma Cisplatino a una curva dosis respuesta de 1, 3, 5 y 7 µg/µl. Al término del periodo de incubación se eliminó el medio de cultivo con cuidado utilizando una pipeta de 200µl y se colocaron 200µl de medio fresco y 20µl de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5mg/ml. Las células se incubaron nuevamente a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 2 horas y media, al terminar se removió el medio con una pipeta de 200µl y se añadieron 100 µl de dimetilsulfóxido concentrado (DMSO; Sigma-Aldrich) para disolver los cristales de formazán, los cuales fueron formados por la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Esta reacción permitió determinar

la viabilidad celular, la cual es directamente proporcional de la cantidad de cristales formados, que difractan la longitud de onda a 570nm en el espectrofotómetro (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Winooski, VT, USA). En éstos experimentos se utilizaron como control las lecturas de cada uno de los experimentos células sin los RNA de interferencia y como blanco de lectura pozos vacíos solo con un volumen de 100µl DMSO al 99.5%. Al finalizar las lecturas se llevaron a cabo los siguientes cálculos para determinar la viabilidad celular:

$$\% = \frac{\text{D.O (a) de las células tratadas} \times 100}{\text{D.O (b) de las células controles}}$$

- D.O (a) es la densidad óptica del cultivo después de la exposición a una concentración de los RNAi's (promedio de los experimentos por triplicado).
- D.O (b) es la densidad óptica del cultivo control (células sin los RNAi's).

A partir de ello se calcularon las concentraciones que producen la reducción de la viabilidad celular en un 50 %, (concentración citotóxica media CC50).

Además, se analizó el probable efecto aditivo de los RNAi's y de los inmunomoduladores a la CC50. Para analizar el efecto aditivo de la combinación de los RNAi's, se llevaron a cabo curvas dosis respuesta para cada uno de los quimioterapéuticos en el caso de Doxorubicina las concentraciones utilizadas son 10, 30, 50, 70, 90 pg/µl en el caso del Cisplatino las concentraciones fueron 1, 3, 5 y 7 µg/µl al detectar las CC50 usaron buscando un efecto aditivo con las dosis CC50 de los RNAi's I y II ya que estos mostraron una diferencia significativa comparados con el control y esto correspondió a 0.6 y 0.8µg totales de los plásmidos codificantes a los RNAi I y RNAiII. Para dicho análisis realizamos tratamientos con 50pg Doxorubicina, en combinación del RNAi I y II así como 5 y 3 µg/µl de cisplatino en combinación de 0.6 y 0,8µg totales del plásmido codificante del RNAi I y II).

6. RESULTADOS

6.1. Estandarización de la amplificación del gen *HOXB13* en líneas celulares

Para estandarizar la amplificación del gen *HOXB13* en líneas celulares se eligieron las líneas celulares B16F10, MCF-7 y SiHa. La expresión de *HOXB13* en MCF-7 y SiHa fue descrita previamente por Alami *et al.*, 1999 y Chu *et al.*, 2004 respectivamente.

6.1.1. Obtención de los RNA's totales a partir de líneas celulares

El aislamiento de los RNA's totales de los paquetes celulares MCF-7, SiHa y B16F10 se llevó a cabo mediante el método de Trizol descrito previamente en materiales y métodos. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos de la extracción de los RNA's totales con buena calidad electroforética ya que se observan de manera definida las bandas de los RNA's ribosomales 28S y 18S que indican la buena calidad de los RNA's obtenidos de las tres líneas celulares MCF-7, SiHa y B16F10.

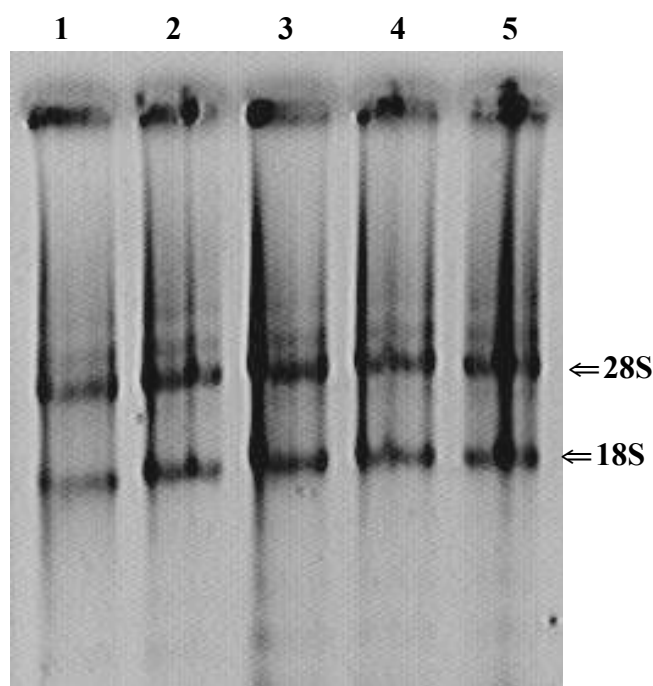


Figura 3. Extracción de RNA's totales en las líneas celulares SiHa, B16F10 y MCF-7. Los RNA's totales obtenidos de las líneas celulares por el método de Trizol se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Los RNA's totales de células SiHa (carriles 1 y 2), MCF-7 (carril 3) y B16F10 (carriles 4 y 5) muestran las bandas 28S y 18S de los RNA ribosomales que indican la integridad de los RNA's totales extraídos de las líneas celulares.

6.1.2. Amplificación del gen β -actina mediante RT-PCR

Los RNA's totales obtenidos de las líneas celulares SiHa, MCF-7 y B16F10 fueron utilizados para la síntesis de los DNAc's mediante transcriptasa reversa. La amplificación gen constitutivo β -actina se realizó para corroborar la calidad de los RNA's totales obtenidos y analizar la eficiencia de la reacción de retrotranscripción. El producto amplificado obtenido de 276pb correspondió al tamaño esperado para β -actina (Figura 4) en todas las reacciones de transcripción reversa.

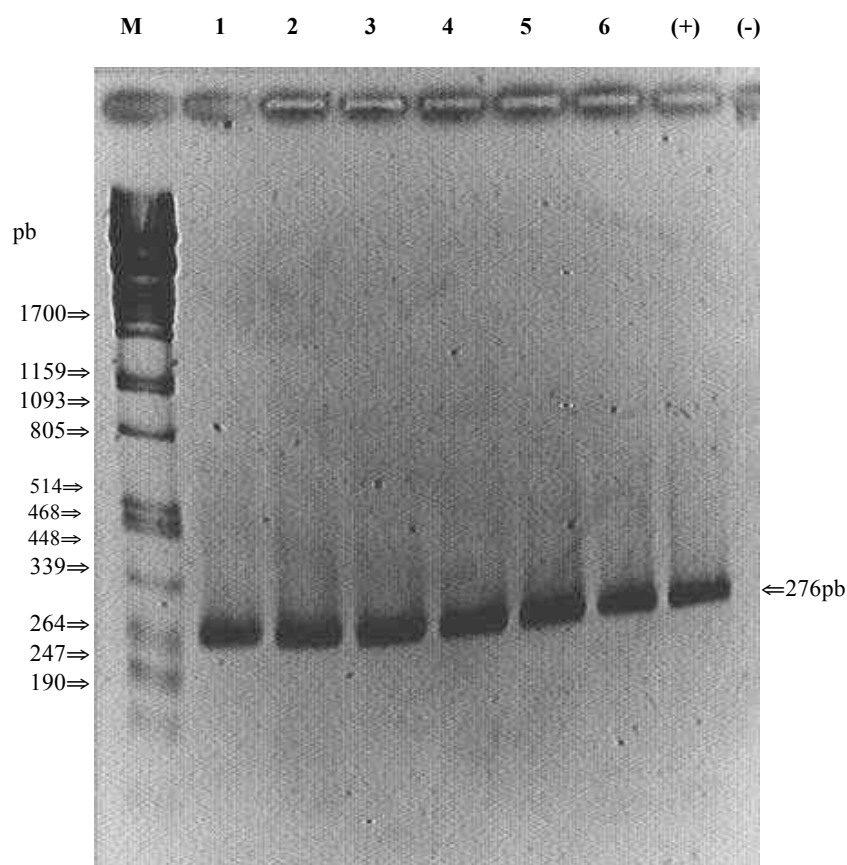


Figura 4. Amplificación del gen β -actina en los DNAc's obtenidos de las células SiHa, MCF-7 y B16F10 mediante RT-PCR punto final. La amplificación de β -actina a partir de los DNAc's de las células SiHa (carril 1), MCF-7 (carriles 2 y 3) y B16F10 (carriles 4 y 5) muestran la banda de amplificación esperada de 276 pb usando una temperatura de alineamiento de 60°C y una concentración de 1.5mM de MgCl₂. El carril (-) contiene a la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene los DNAc's totales de células HeLa, M es el marcador de peso molecular λ digerido con la enzima de restricción *Pst*I.

La amplificación de β -actina en los DNAc's obtenidos de las líneas celulares mostró una buena intensidad en la banda que indica una calidad óptima de las extracciones de RNA incluso para la línea B16F10 donde se encontró que β -actina amplifica a las mismas condiciones que las líneas MCF-7 y SiHa.

6.1.3. Amplificación del gen *HOXB13* mediante RT-PCR

Una vez confirmada la calidad de los DNAc's se realizó la amplificación mediante PCR punto final del gen *HOXB13* que muestra la banda de 300pb esperada a partir de los DNAc's de las líneas celulares, MCF-7, SiHa y B16F10. En estas líneas celulares se realizó la estandarización exitosa de la amplificación del gen *HOXB13* como se muestra en la Figura 5.

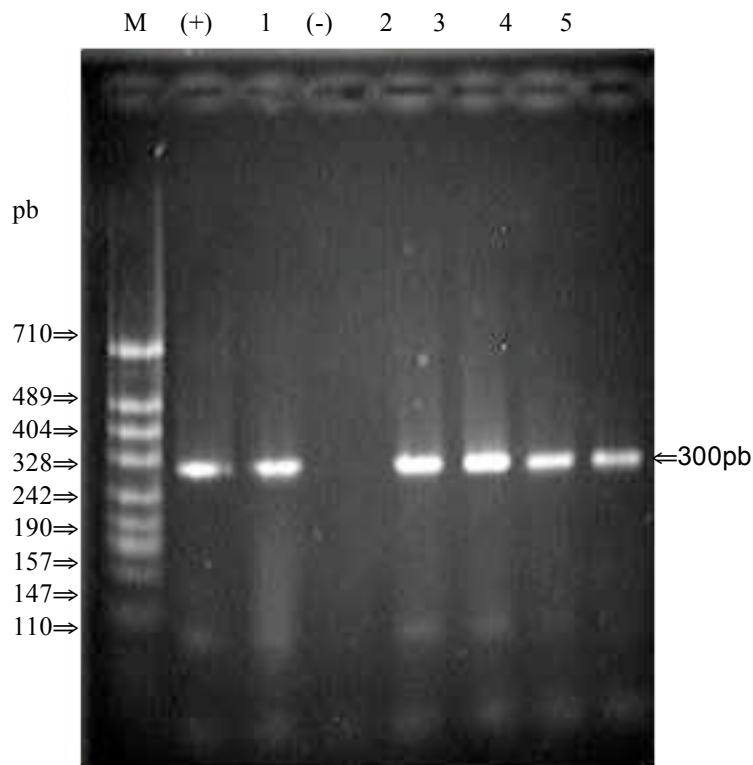


Figura 5. Amplificación del gen *HOXB13* en los DNAc's obtenidos de las células SiHa, MCF-7 y B16F10 mediante RT-PCR punto final. La amplificación de *HOXB13* a partir de los DNAc's obtenidos de las células SiHa (carril 1), MCF-7 (carriles 2 y 3) y B16F10 (carriles 4 y 5) muestra la banda de amplificación esperada de 300pb usando una temperatura de alineamiento de 62°C y una concentración de 1.5 mM de MgCl₂. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene los DNAc's totales de las células HeLa. El carril M es el marcador de peso molecular pBS SK digerido con la enzima de restricción *Msp* I.

6.2. Construcción de plásmidos recombinantes con los RNAi's para el silenciamiento de *HOXB13*

6.2.1. Diseño de los oligonucleótidos codificantes a los RNA's de interferencia para *HOXB13*

Usando el programa *siRNA Target Finder* de la compañía AMBION (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) se diseñaron cuatro oligonucleótidos antisentido (Figura 6A) que se dirigieron al RNAm del gen *HOXB13* para su silenciamiento cada uno de los oligonucleótidos presentaron un contenido máximo de el 50% de GC (guanina-citocina) además de 4 o más A's o T's (Adeninas o Timinas) recomendado por los algoritmos del programa *siRNA Target Finder* para su posterior clonación en vectores con el promotor de la polimerasa III. Cada uno de los oligonucleótidos correspondientes a los RNAs de interferencia (RNAi's) I al IV se unen al mensajero de *HOXB13* en las posiciones nucleotídicas 193, 868, 1235 y 1365pb para el silenciamiento. En el programa AmplifiX se llevó a cabo la alineación virtual de los RNAi's (Figura 6B) que muestran las secuencias de apareamiento en *HoxB13*. Además, los oligonucleótidos presentan los sitios de restricción *BamHI* y *NotI* en los extremos 5' y 3' respectivamente y contienen un sitio *HindIII* en la estructura del asa para su caracterización.

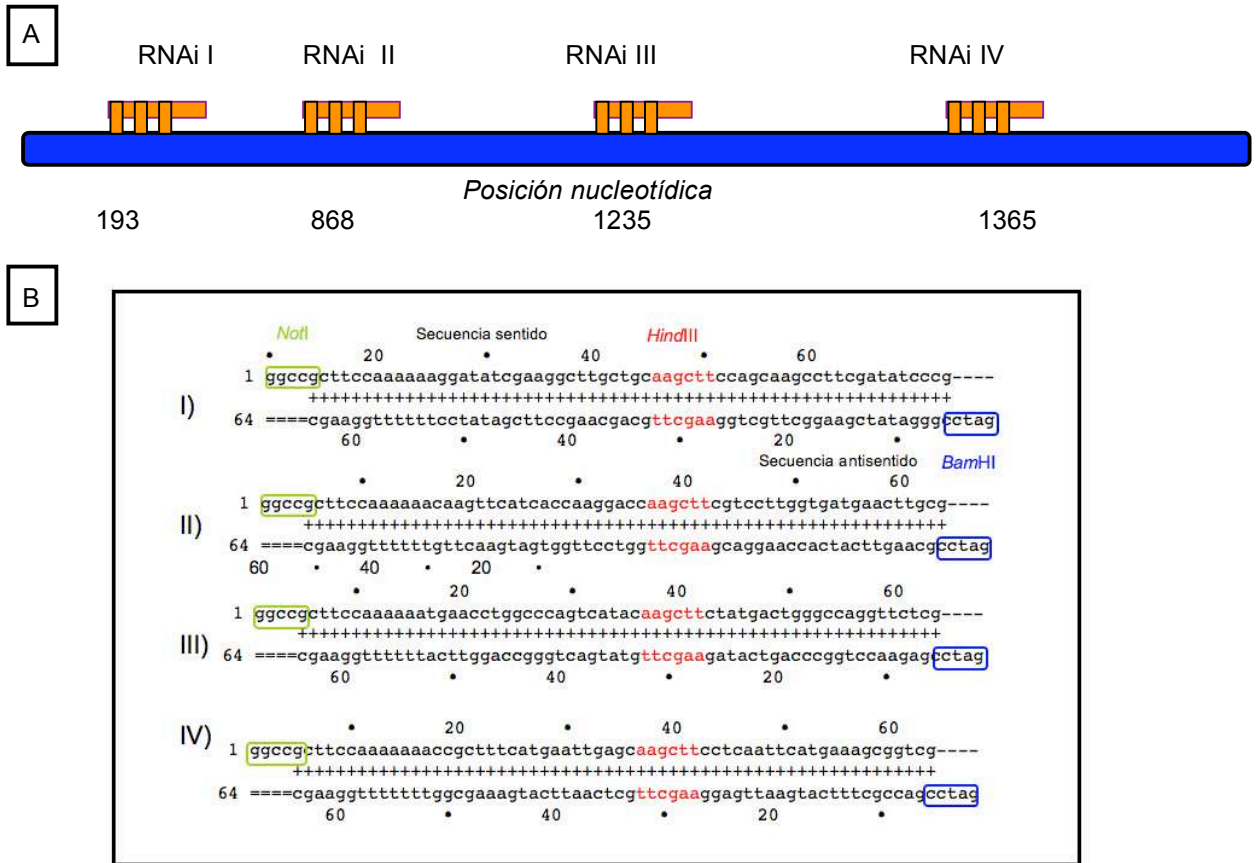


Figura 6. Diseño y alineamiento de las secuencias de los RNAi's para *HOXB13*. A) Se diseñaron cuatro diferentes RNAi's para el transcrito *HOXB13* usando el programa Target-finder de la compañía Ambion descrito en materiales y métodos. Los RNAi's se dirigieron a las posiciones nucleotídicas 193, 868, 1235 y 1365 correspondiendo a los RNAi's I, II, III y IV respectivamente. B) La estructura secundaria de los RNAi's presentan los sitios de restricción *BamHI* y *NotI* en los extremos 5' y 3' respectivamente; además contienen un sitio *HindIII* en la estructura del asa para su caracterización. Se alinearon las secuencias nucleotídicas de los RNAi's mediante un gradiente de temperaturas descrito en materiales y métodos.

6.2.2. Clonación de los RNAs de interferencia para *HOXB13* I-V en el vector pGSH1-GFP

Para la construcción de los plásmidos codificantes de los RNAi's I al IV que permitieron el silenciamiento del gen *Hoxb13* en la línea celular B16F10 (de melanoma murino); se ligaron los RNAi's previamente alineados mediante un gradiente de temperatura a el vector lineal pGSH1-GFP (Figura 8A) que tiene como gen reportero a GFP (*Green Fluorescent Protein*) que permitió visualizar cualitativamente la eficiencia de las transfecciones con los RNAi's. Los RNAi's corresponden a 64pb (Figura 7B) con tres sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI, *Hind*III y *Not*I para su caracterización. Se ligaron las secuencias correspondientes a los RNAi's I-IV al vector pGSH1-GFP (Figura 7C) permitiendo la construcción de los plásmidos pGSH1-GFP-RNAiI-IV.

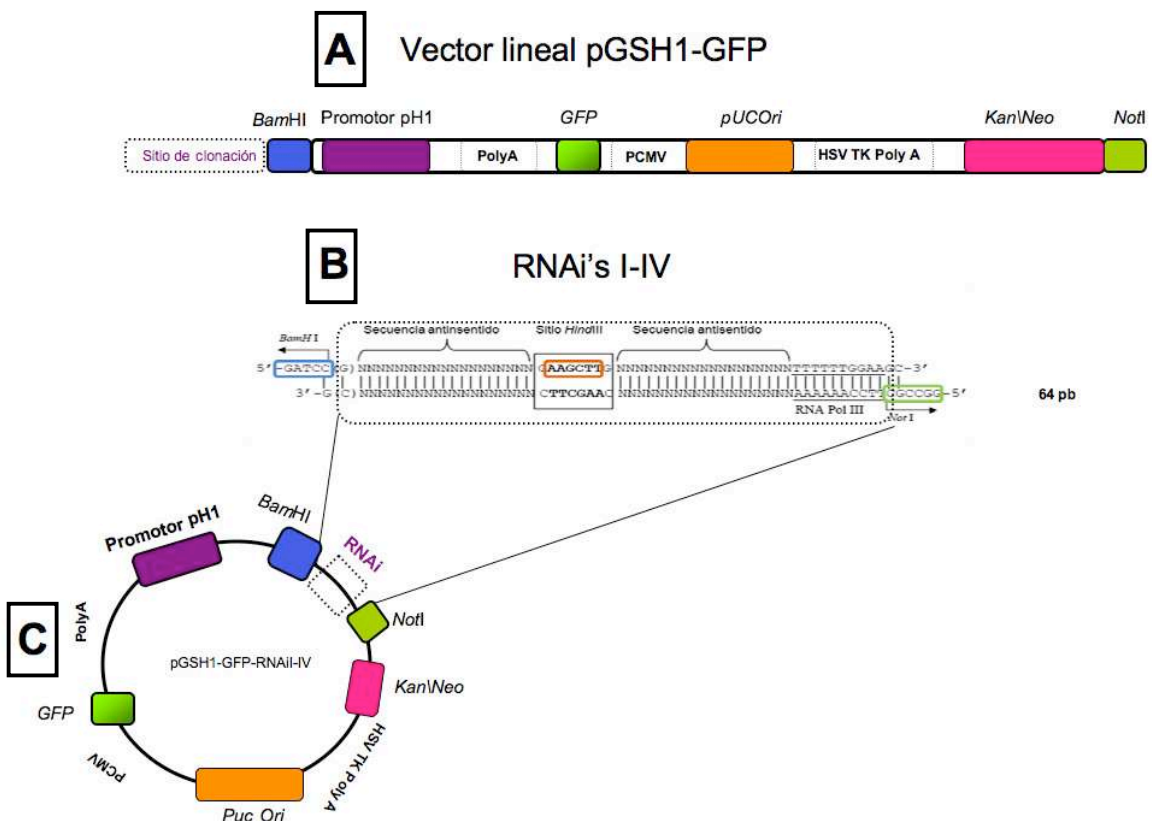


Figura 7. Diagrama de clonación de los RNAs de interferencia en el vector pGSH1-GFP. A) El vector pGSH1-GFP lineal (Gelantis San Diego, CA) digerido con las enzimas *Bam*HI y *Not*I se ligó a los RNAi's I-IV, previamente alineados con un gradiente de temperatura B) como se describe en materiales y métodos. C) La ligación vector inserto permitió la construcción de los plásmidos pGSH1-GFP-RNAiI-IV.

Los resultados mostraron trece clones (Figura 8) de las transformaciones para los plásmidos pGSH1-*GFP*-RNAiI-IV de las cuales cinco pertenecen a el RNAi I (carriles 1-5), tres al RNAi II (carriles 6-8), dos al RNAi III (carriles 9-10) y tres al RNAi IV (carriles 11-13). Además, se transformó una quinta secuencia correspondiente a un RNAi que no se dirige al gen *Hoxb13* proporcionada como control en el kit GeneSilencer® shRNA Expression Vectors compañía GELANTIS (10190 Telesis Court San Diego, CA 92121 U.S.). De la cual se obtuvieron seis clones (carriles 14-19).

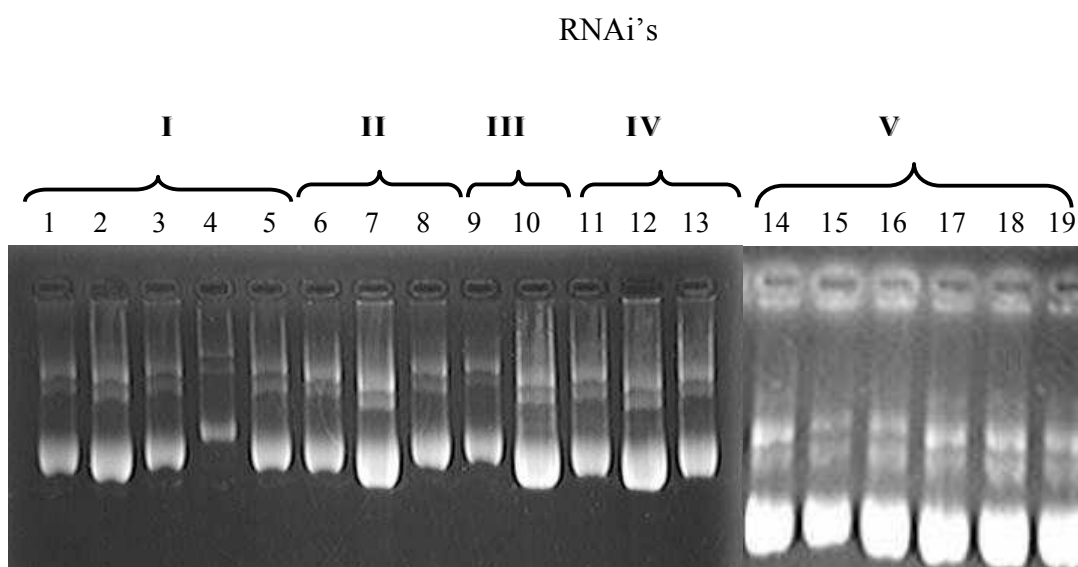


Figura 8. Clonación de los RNAs de interferencia de HOXB13 I-V. La ligación del vector a los insertos (RNAi's) fueron transformados en *E. coli* DH5 α calcio competentes y las colonias obtenidas fueron utilizadas para el análisis de los DNAs plasmídicos recombinantes que fueron analizados en un gel de agarosa 0.8%. Los plásmidos recombinantes con los RNAi I (carriles 1-5), RNAi II (carriles 6-8), RNAi III (carriles 9 y 10), RNAi IV (carriles 11-13) y RNAi V (carriles 14-19)

6.2.3. Caracterización de los plásmidos pGSH1-HOXB13 –RNAi's I-V

La caracterización de los plásmidos codificantes de los RNAi's I-V se inició con la obtención de los DNAs pGSH1-*HOXB13* RNAi I-V, mediante el método de minipreparación por lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Los plásmidos fueron caracterizados con la enzima de restricción *Hind*III debido a que es un sitio único de restricción en la estructura asa en cada una de las secuencias de los RNAi's (Figura 9A). La Figura 9B muestra la digestión de los plásmidos con la enzima *Hind*III que permitió

seleccionar como clonas positivas todas las reacciones en las que se linearizó el DNAP (DNA plasmídico). Para ello se tomó como control positivo el DNAP sin digerir correspondiente a la clona identificada como 1 de cada una de las transformaciones. Para el plásmido pGSH1-HOXB13 RNAi I las cinco clonas resultaron positivas, para el plásmido pGSH1-HOXB13-RNAi II las tres clonas obtenidas fueron positivas, de igual forma para los plásmidos pGSH1-HOXB13-RNAi III y IV; con excepción del plásmido pGSH1-HOXB13- RNAi V en que solo la clona número 4 resultó positiva.

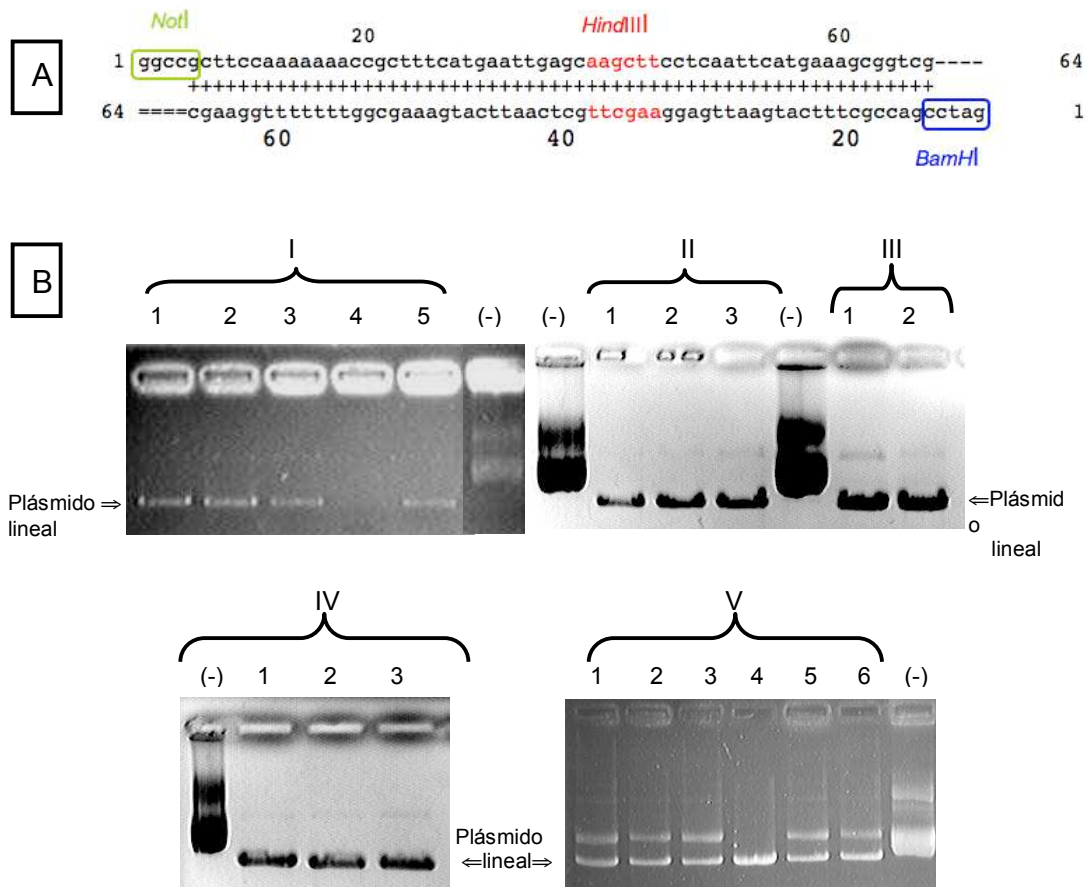


Figura 9. Caracterización de las clonas en pGSH1-RNAiHOXB13 I-IV con HindIII. Los DNAs plasmídicos recombinantes conteniendo los RNAi's fueron digeridos con la enzima *HindIII* para determinar la presencia de los RNAi's. El producto de la digestión con *HindIII* sitio único de restricción en la estructura asa del RNAi se linearizó A) lo que permitió determinar las clonas positivas. Los números romanos indican los RNAs interferencia y los testigos (-) corresponden al DNAP sin digerir como se muestra en B). El RNAi V corresponde a una secuencia que no codifica como antisentido de *HoxB13* (Genlantis San Diego, CA) utilizada como control (-).

Se decidió re-confirmar cada clona, utilizando los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I localizados en los extremos 5' y 3' de los RNAi's respectivamente (Figura 9A). La Figura 10B muestra los plásmidos pGSH1-RNAiHOXB13 I-IV digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Not*I que corroboran la presencia de los insertos codificantes de los RNAi's I-IV. Las colonias positivas liberan un fragmento de 64 nucleótidos que corresponde al inserto de cada uno de los RNAi's, a la par se corrió como testigo positivo un par de oligonucleótidos alineados previamente mediante un gradiente de temperatura.

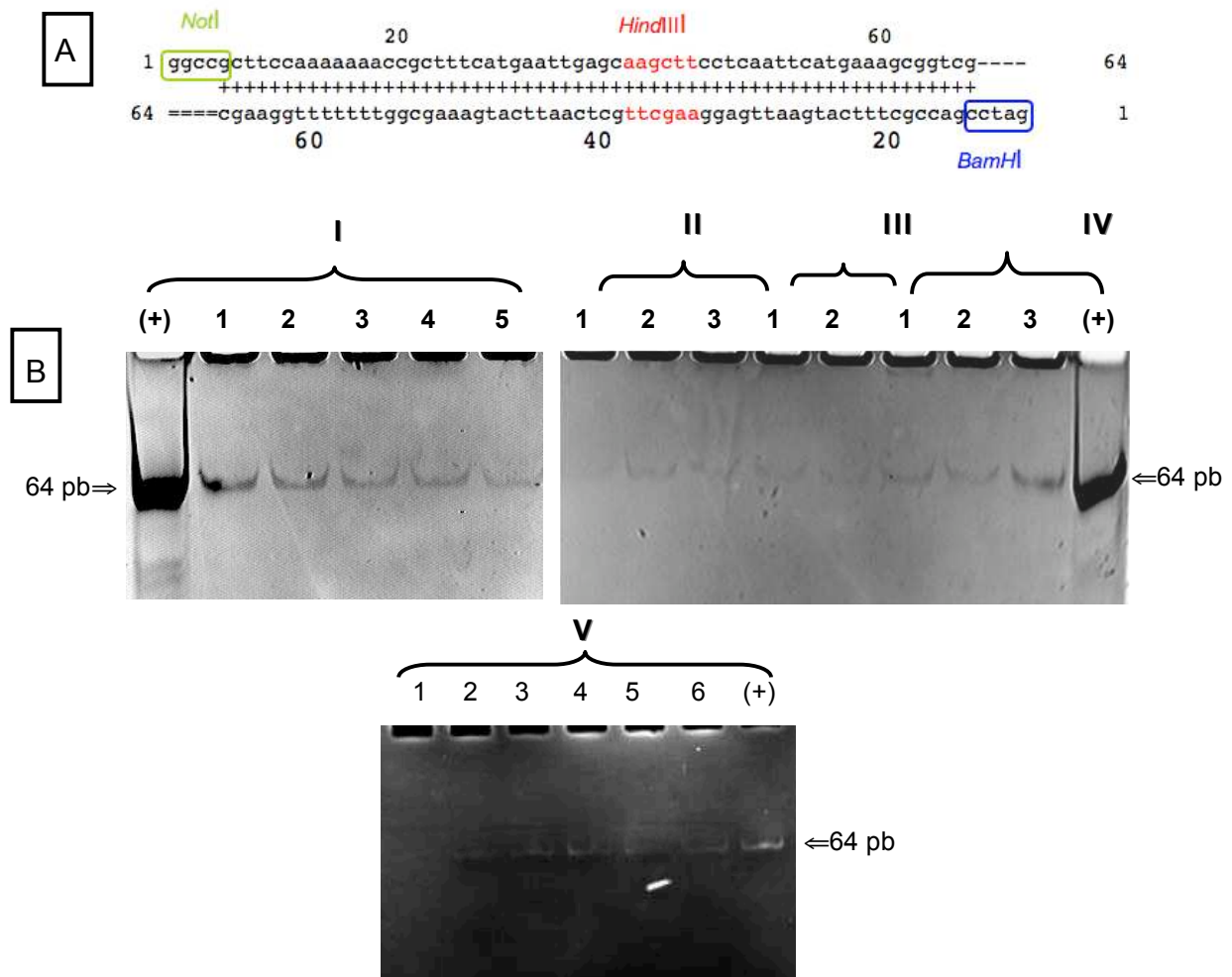


Figura 10. Caracterización de las clonas pGSH1-HOXB13 I-V con *Bam*HI y *Not*I. Los DNAs plasmídicos recombinantes con los RNAi's fueron confirmados mediante doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Not*I que constituyen sitios únicos de restricción en los extremos 5' y 3' de los RNAs de interferencia. Los controles (+) muestran los oligonucleótidos alineados de los RNAs de interferencia .

Una vez caracterizados los plásmidos recombinantes éstos fueron purificados mediante preparación a mediana escala usando columnas de Qiagen (Qiagen® Plasmid kit) como se describe en materiales y métodos. Los plásmidos fueron cuantificados en concentración y pureza mediante absorbancia con luz ultravioleta a 260 y 280 nm como se muestra en la Figura 11. La concentración de los DNAs purificados varió de 495 a 720 ng/μl y la relación de absorbancia 260/280 de los plásmidos fue de 1.8 a 1.9 lo que indica que estos plásmidos tienen una buena calidad para ser transfectados en la línea celular B16F10.

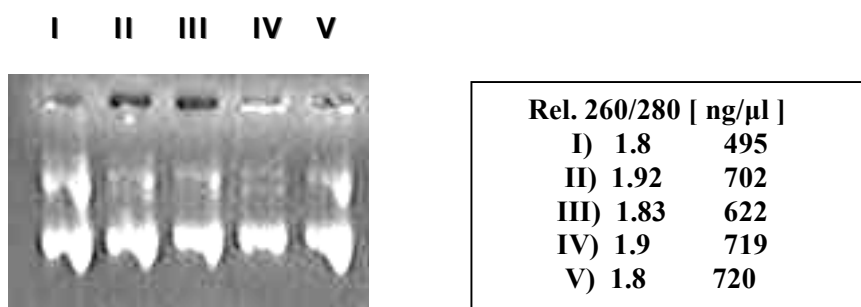


Figura 11. Purificación de los plásmidos pGSH1-HOXB13 I-V. Los DNAs plasmídicos correspondientes a la clona positiva número 1 de los RNAi's-HOXB13 I-IV y a la clona 4 del RNAi-HOXB13 V. Las concentraciones de los DNAs purificados fueron de 495 a 719 ng/μl con una pureza mayor a 1.8 en la relación 260/280 de absorbancia que indica la buena calidad de los DNAs plasmídicos obtenidos.

6.2.4. Confirmación de los RNAi's I-IV mediante secuenciación

Una vez purificados los plásmidos codificantes pGSH1-*HOXB13*-RNAi-IV se confirmaron mediante determinación de la secuencia nucleotídica en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología en la UNAM, Cuernavaca; Morelos. La secuencia nucleotídica de los RNAi's I-IV fue confirmada en todas las clonas e incluso se logró secuenciar más de 1000 pares de bases en todos los casos como se muestra en la Figura 12 con la secuencia obtenida en el RNA'i HOXB13-III.

Los resultados descritos anteriormente muestran la exitosa caracterización y purificación de cada uno de los plásmidos pGSH1-*HOXB13*-RNAi-IV que nos permitieron su posterior transfección en la línea celular B16F10.

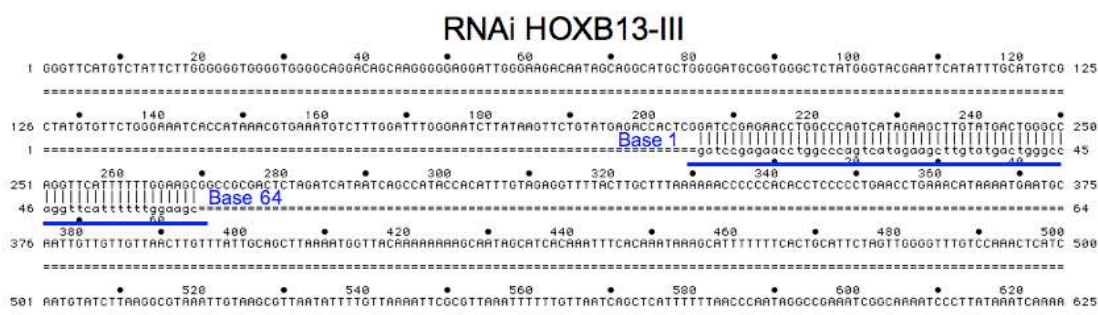


Figura 12. Secuencia nucleotídica del RNAi-*HOXB13*-III mediante secuenciación. El DNA plasmídico pGSH1-*HOXB13* III fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología en la UNAM, Cuernavaca, Morelos. La secuencia nucleotídica del RNAi's III fue confirmada ya que se lograron secuenciar más 1000 pares de bases.

6.3. Efecto de los RNAi's en el silenciamiento del RNA mensajero de *HOXB13*

Para analizar el efecto de los RNAi's en el silenciamiento del gen *HOXB13* por PCR punto final se diseñaron oligonucleótidos sitio específicos para el RNAm de *HOXB13* (Figura 13). Cuando el silenciamiento de *HOXB13* es efectivo no se detecta la amplificación de la banda esperada para el RNA mensajero. Por el contrario, la amplificación de las bandas 234, 202, 173 y 189 pb del mensajero *HOXB13* muestran la presencia de los sitios donde fueron dirigidos los RNAi's I-IV respectivamente mostrando la falta de silenciamiento.

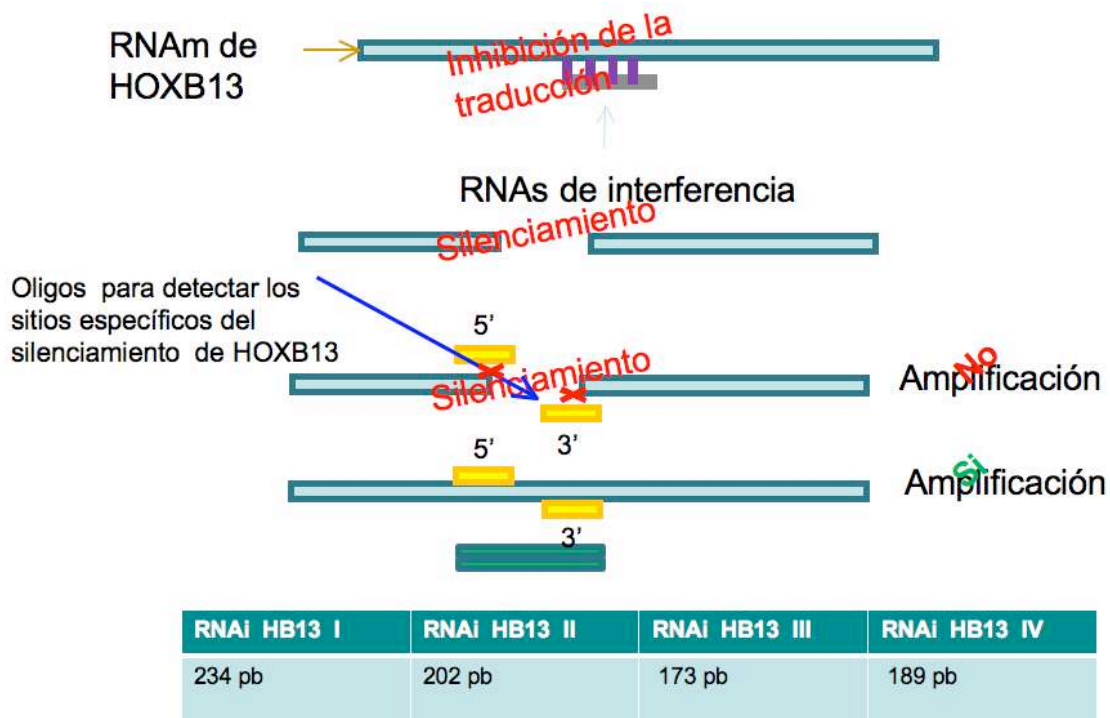


Figura 13. Estrategia para determinar el silenciamiento de *Hoxb13* con los RNAi's. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para detectar el mensajero de *Hoxb13* en los sitios a donde se dirigió el silenciamiento con (amarillo) de los RNAi's I al IV respectivamente. La falta de amplificación muestra que no se detecta la presencia del mensajero de *HOXB13* mostrando que el silenciamiento es efectivo; por el contrario la amplificación de las bandas 234, 202, 173 y 189pb corresponde a los sitios donde fueron dirigidos los RNAi's I-IV respectivamente mostrando la falta de silenciamiento.

La Figura 14 muestra la amplificación mediante punto final del gen *Hoxb13* a partir de los DNAc's de la línea celular B16F10 transfectada con los plásmidos contienen los RNAi's *Hoxb13* a concentraciones que variaron de 0.1, 0.2 y 0.4 μ g totales a las 48 horas de su transfección con el método PEI descrito en materiales y métodos. Los resultados mostraron la amplificación de la banda de 234pb (Figura 14A) a 0.2 μ g totales del plásmido con el RNAi I en contraste a 0.4 μ g no se detectó la amplificación del RNAm de *Hoxb13* lo que indica el silenciamiento del mensajero. De la misma forma a los DNAc's transfectados con 0.1 μ g totales del RNAi II amplificó la banda de 202pb pero a las concentraciones de 0.2 y 0.4 μ g totales tampoco se detectó la amplificación de *Hoxb13* indicando de nuevo el silenciamiento exitoso (Figura 14B). En contraste, los DNAc's de células transfectadas con los RNAi's III y IV amplificaron las bandas de 173 y 189pb respectivamente a 0.2 y 0.4 μ g totales indicando la falta de

silenciamiento de *Hoxb13* (Figs. 14C y D). En conjunto estos resultados muestran el silenciamiento del mensajero de *Hoxb13* con los RNAi's I y II a concentraciones de 0.4 μ g y 0.2 μ g respectivamente que fueron validados con la amplificación simultanea del gen constitutivo β -actina en las mismas condiciones en todas las transfecciones.

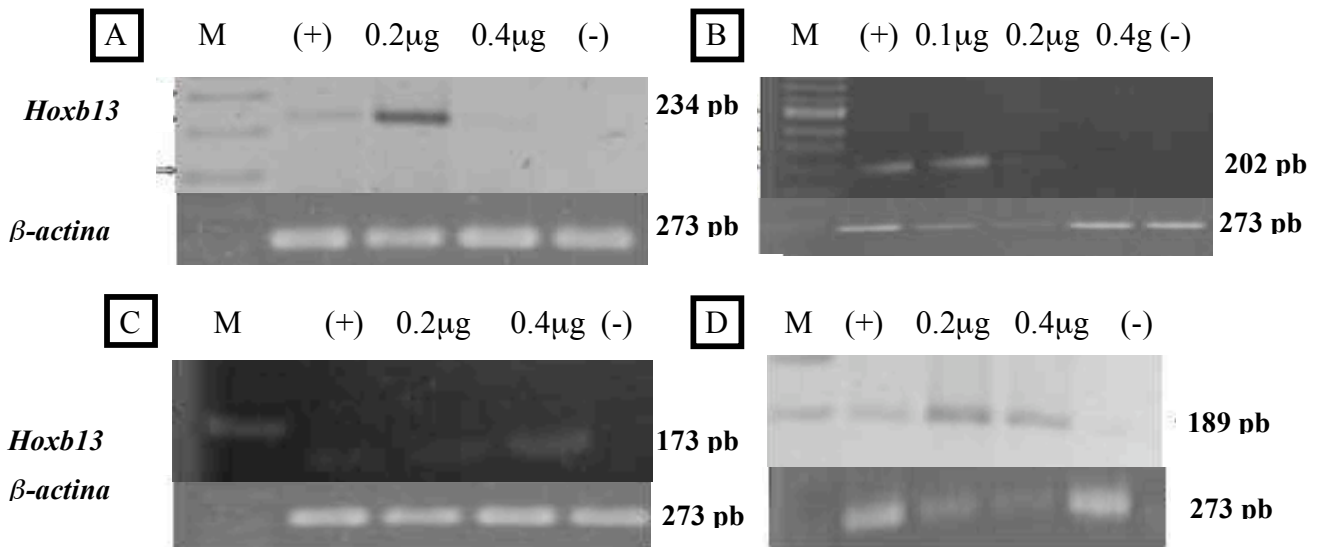


Figura 14. Silenciamiento del RNAm *Hoxb13* con los RNAi's I y II. La detección del RNAm de *Hoxb13* se realizó mediante PCR punto final en los DNAc's obtenidos de las células B16F10 transfectadas con los plásmidos que codifican los RNAi's I al IV. Los plásmidos conteniendo los RNAi's A) pGSH1-HOXB13 I, B) pGSH1-HOXB13 II, C) pGSH1-HOXB13 III y D) pGSH1-HOXB13 IV corresponden a cada una de las transfecciones analizadas mediante PCR. Los resultados muestran el silenciamiento de *Hoxb13* en los RNAi's I y II; además de la amplificación del gen endógeno β -actina como gen de referencia y control interno. M corresponde al marcador ladder 100pb y el control positivo(+) corresponde al DNAc de la línea celular B16F10 sin transfectar.

6.4. El Silenciamiento génico de *HOXB13* afectó la expresión de *GFP* y de la proteína *HOXB13*

El silenciamiento génico de *HOXB13* con los RNAi's I y II fue visualizado con la expresión de la proteína verde fluorescente (*GFP*) a 48 horas después de la transfección, donde se muestra el mayor efecto en la viabilidad celular de B16F10 con el RNAi II. La Figura 15 muestra en A) células B16F10 sin transfectar, B) células B16F10 tratadas con 0.2 μ g totales del RNAi II que mostró un ligero efecto en la muerte celular ya que se visualizan, C) un gran número de células fluorescentes. Las células B16F10 tratadas en D) con 0.8 μ g totales del RNAi II mostraron un mayor efecto en la viabilidad que en E) muestra la reducción del número de células que expresan *GFP*. Adicionalmente, el silenciamiento de *HOXB13* también se detectó a nivel de la proteína

analizada mediante inmunodetección. La presencia de la homeoproteína HOXB13 de 32 kDa en F) muestra la disminución de la expresión cuando es transfectada con el plásmido codificante al RNAi I con 0.8µg totales (carril 2). Así mismo en también se observa una disminución mayor en la expresión de la proteína HOXB13 con el RNAi II. El silenciamiento de HOXB13 fue validado usando el control del gen endógeno β-actina detectado a 42 kDa. Estos resultados en conjunto demostraron que el silenciamiento de *HOXB13* afecta notablemente la viabilidad de las células B16F10 así como la expresión de GFP y de la expresión de la homeoproteína HOXB13 en concordancia con los resultados previamente mostrados en el silenciamiento génico del RNAm de *HOXB13*.

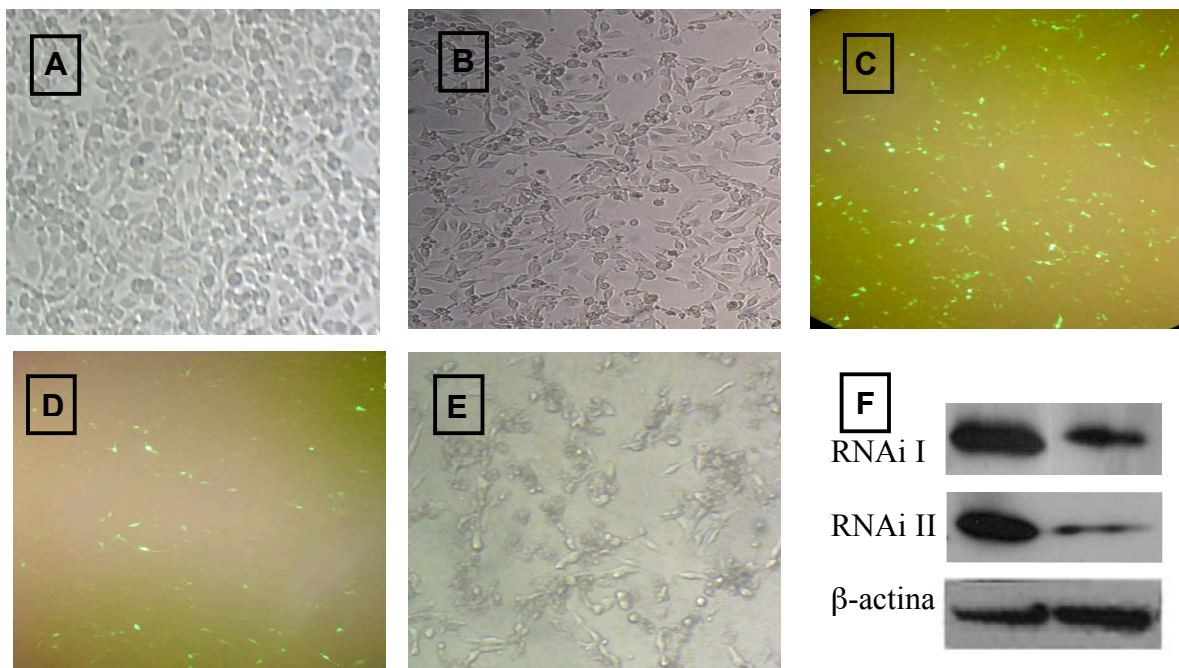


Figura 15. Efecto de RNAi's I y II en la expresión de *GFP* e inmunodetección de la proteína *HOXB13*. A) células B16F10 sin transfectar, B) células 48 horas después de transfección con el plásmido codificante para el RNAi-II 0.2 µg totales y C) visualización de la expresión de *GFP*, D) visualización de *GFP* en células transfectadas con el plásmido RNAi II a 0.8 µg totales E) y F). Disminución de la expresión de la proteína *HOXB13* mediante western blot en células B16F10 transfectadas con 0.8µg totales del los plásmidos pGSH1-*HOXB13*-RNAi-I y II (carril 2) comparadas con la expresión de *HOXB13* en células sin transfectar (carril 1). Se utilizó proteína β- actina como testigo positivo.

6.5. Efecto del silenciamiento génico de *HOXB13* en la viabilidad celular

Para analizar el efecto del silenciamiento génico de *HOXB13* sobre la viabilidad de la línea celular B16F10 se utilizaron concentraciones crecientes de cada plásmido con los RNAi's usando MTT. Este ensayo evalúa la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas y su supervivencia; el protocolo es descrito a detalle en materiales y métodos.

6.5.1. Silenciamiento de *HOXB13* con el RNAi I en la viabilidad celular

El silenciamiento génico de *HOXB13* usando el RNAi I afectó la viabilidad celular de B16F10 de un 69% hasta un 53% usando concentraciones de 0.2 a 0.8 μ g totales. El efecto máximo en la viabilidad celular se correspondió aproximadamente a la concentración citotóxica media (CC50) de concentración 0.8 μ g totales con el RNAi I (Figura 16), que afectó el 47% de la viabilidad celular de B16F10.

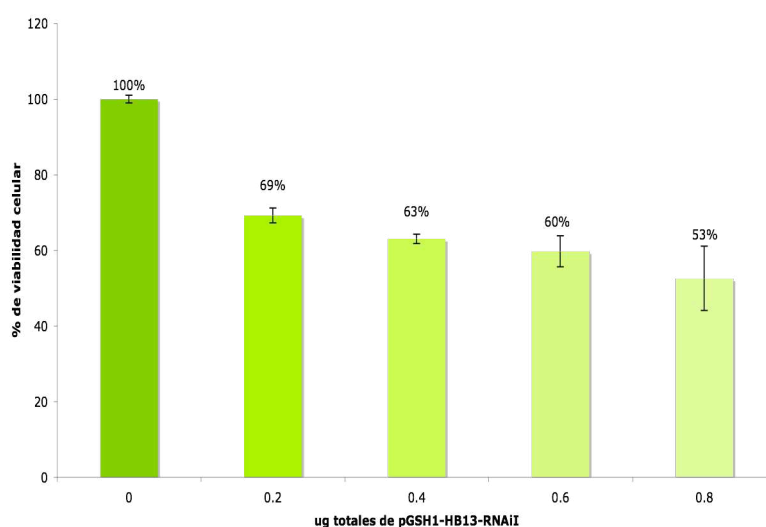


Figura 16. Silenciamiento de *HOXB13* con el RNAi I en la viabilidad celular de B16F10. Las células fueron transfectadas usando concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 μ g totales del plásmido pGSH1-HOXB13RNAiI con el método PEI descrito en la metodología. La viabilidad celular analizada mediante el método MTT después de 48 horas de incubación mostró que la concentración de 0.8 μ g del plásmido pGSH1-I afectó severamente la viabilidad celular de B16F10 en un 47%.

6.5.2. Silenciamiento de *HOXB13* con el RNAi II en la viabilidad celular de B16F10

En la figura 18 el silenciamiento génico de *HOXB13* con el RNAi II afectó la viabilidad celular con mayor potencia que el RNAi I ya que a partir de 0.2 μg se afectó la viabilidad celular de B16F10 en un 41%. Así mismo el efecto máximo del silenciamiento a 0.8 μg totales (Figura 17) afectando severamente la viabilidad celular de B16F10 hasta en un 64% a las 48 horas de la transfección. La CC50 se estimó aproximadamente a 0.4 μg totales del RNAi II.

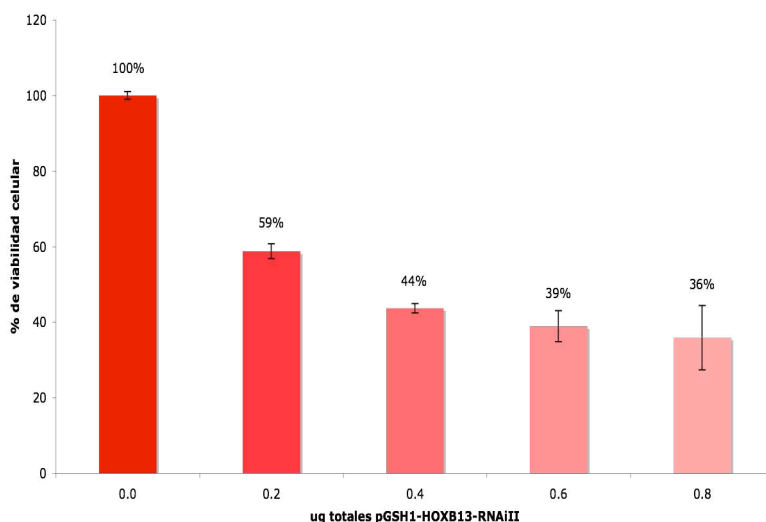


Figura 17. Silenciamiento génico de *HOXB13* con el RNAi II en la viabilidad celular de B16F10. Las células fueron transfectadas usando concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 μg totales del plásmido pGSH1-HOXB13RNAiII con el método PEI descrito en la metodología. La viabilidad celular analizada mediante el método MTT después de 48 horas de incubación mostró que la concentración de 0.8 μg del plásmido pGSH1-II afectó severamente la viabilidad celular de B16F10 en un 64%.

6.5.3. RNAi III en la viabilidad celular de B16F10

La figura 18 muestra que el RNAi-III a 48 horas de transfectado a concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 μg totales no mostró efecto significativo sobre la viabilidad de la línea celular B16F10. Estos resultados apoyan lo previamente descrito en la Figura 15 C donde se amplificó el RNAm de *HOXB13* en todos los casos, es decir

no hubo silenciamiento sobre *HOXB13* al transfectar la línea celular B16F10 con el plásmido codificante del RNAi III.

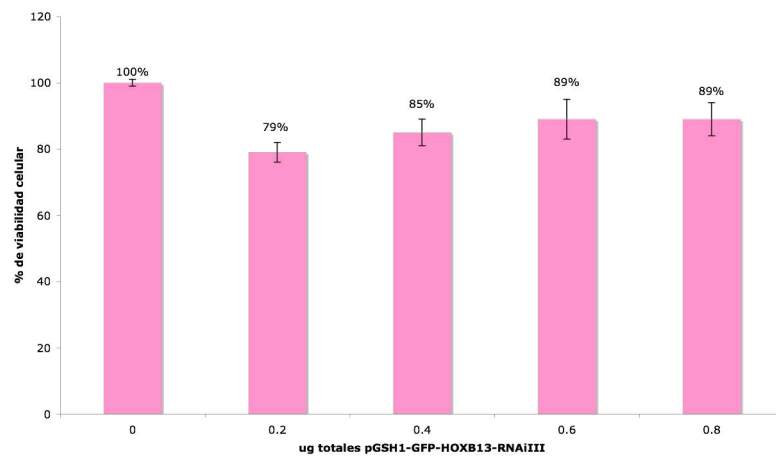


Figura 18. RNAi-III de *HOXB13* en la viabilidad celular de B16F10. Las células fueron transfectadas usando concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 µg totales del plásmido pGSH1-III con el método PEI descrito en la metodología. La viabilidad celular analizada mediante el método MTT después de 48 horas de incubación mostró que todas las concentraciones usadas del plásmido pGSH1-HOXB13-RNAi-III no afectaron la viabilidad celular de B16F10 significativamente.

6.5.4. Efecto del silenciamiento de *HOXB13* con el RNAi IV sobre la viabilidad celular de B16F10

El análisis del silenciamiento génico de *HOXB13* con el RNAi IV estimó que la CC50 fue de aproximadamente 0.8µg totales (Figura 19) afectando la viabilidad celular de B16F10 en un 46% a las 48 horas de la transfección.

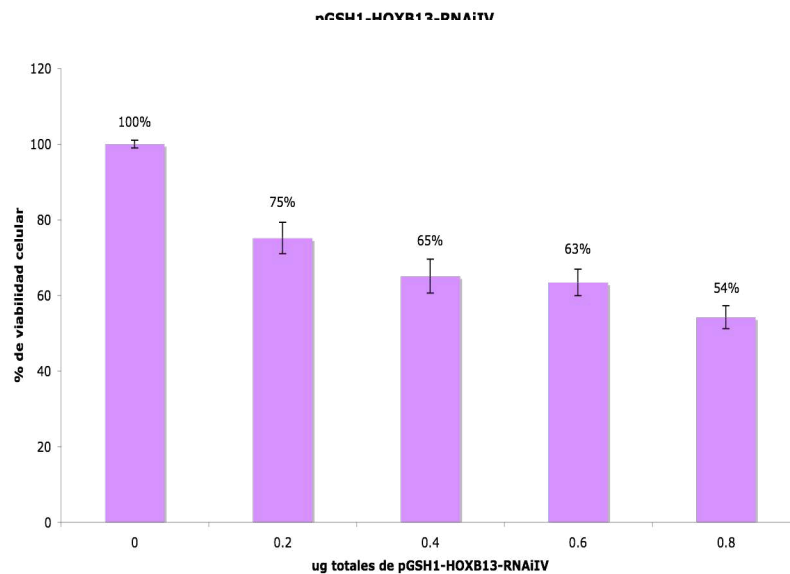


Figura 19. Efecto del RNAi-IV en la viabilidad celular de B16F10. Las células fueron transfectadas usando concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 µg totales del plásmido pGSH1-HOXB13-RNAi-IV con el método PEI descrito en la metodología. La viabilidad celular analizada mediante el método MTT después de 48 horas de incubación mostró el mayor efecto a 0.8µg totales del plásmido pGSH1-IV con un 46% de disminución en la viabilidad celular.

6.5.5 Uso del RNAi V como control en la viabilidad celular de B16F10

Como se esperaba el plásmido pGSH1-HOXB13-RNAi-V que contiene secuencias al azar, usado como control negativo (figura 20) no afectó el silenciamiento génico de *HOXB13* ya que no mostró ningún efecto significativo sobre la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones utilizadas.

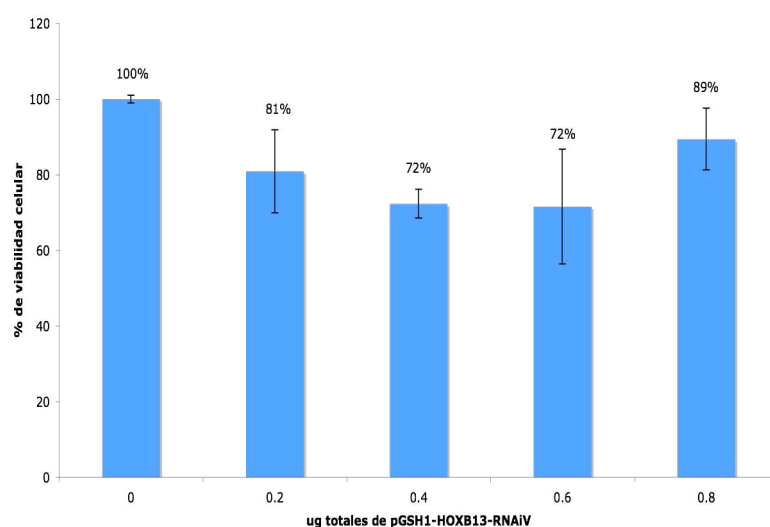


Figura 20. Uso del RNAi-V como control en la viabilidad celular de B16F10. Las células B16F10 fueron transfectadas usando concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 µg totales del plásmido pGSH1-HOXB13-RNAi-V con el método PEI descrito en la metodología. Las concentraciones del plásmido usadas no afectaron significativamente la viabilidad celular de B16F10 determinada mediante MTT después de 48 h de incubación. El plásmido pGSH1- HoxB13-RNAi-V contiene secuencias que no afectan la viabilidad celular de B16F10 significativamente.

6.6. Análisis del silenciamiento génico con los RNAi's I y II sobre la viabilidad de la línea celular B16F10

En la figura 21 se muestra el efecto combinado de los RNAi's I y II a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 μg totales de cada uno de los plásmidos donde la CC50 se estimó a 0.6 μg totales. El mayor efecto en la viabilidad celular de 45% se observó a 0.6 μg . Estos resultados no mostraron el efecto aditivo esperado ya que para el RNAi I mostró el 40% de efecto a 0.6 μg totales (Fig. 14) y para el RNAi II mostró el 61% de efecto a 0.6 μg totales (Fig. 15) lo que mostraría un efecto del 101%.

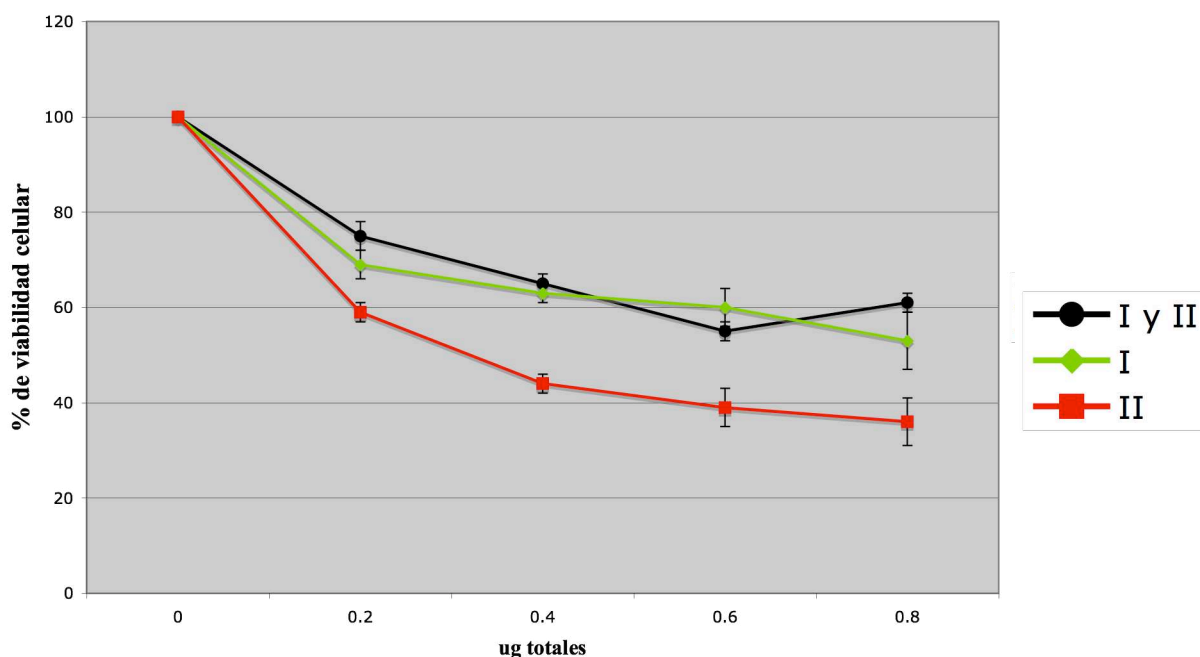


Figura 21. Efecto combinado de los RNAi's I y II en la viabilidad celular de B16F10. Las células B16F10 fueron transfectadas usando concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 μg totales de los plásmidos pGSH1-HOXB13-RNAi I y II con el método PEI descrito en la metodología. La concentración de 0.6 μg afectó la viabilidad celular en un 45% determinada mediante MTT después de 48 horas de incubación.

6.7 Análisis del silenciamiento génico con los RNAi's I-V sobre la viabilidad de la línea celular B16F10

En resumen el efecto de los cuatro RNAi's contra *Hoxb13* sobre la viabilidad de la línea celular B16F10 se muestra simultaneamente en la Figura 22. Los resultados muestran claramente que el mayor efecto del silenciamiento de *Hoxb13* se obtuvo con el RNAi II que disminuyó la viabilidad celular de B16F10 hasta un 64%. Un efecto en menor grado se obtuvo con el RNAi I que disminuyó la viabilidad celular de B16F10 en un 47%. De forma similar pero con menor efecto el RNAi IV alcanzó el máximo efecto (47%) en la viabilidad celular con 0.8 μ g totales. En contraste, el RNAi III no presentó un ningún efecto en la viabilidad celular de B16F10 ya que muestra menor efecto que el control negativo (RNAi V).

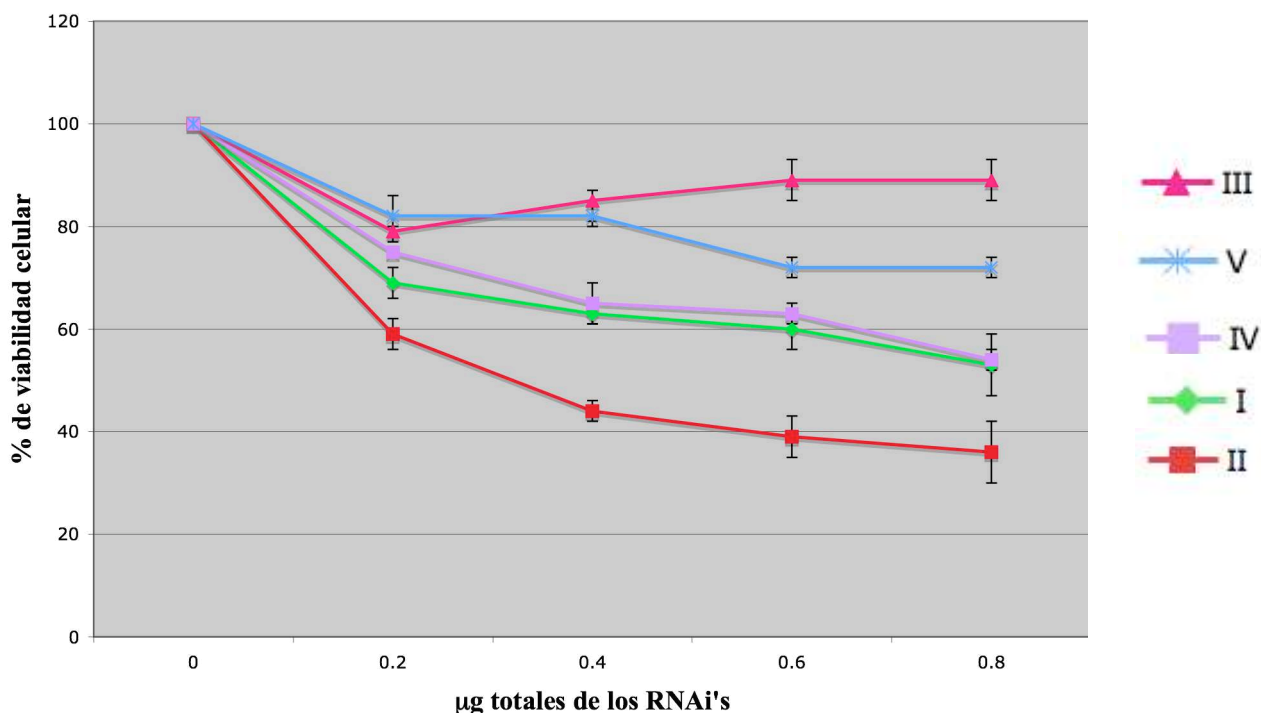


Figura 22. Efecto de los RNAi's I-V sobre la viabilidad de B16F10. Las células B16F10 fueron transfectadas usando concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 μ g totales de los plásmidos pGSH1-HOXB13-I-V con el método PEI descrito en la metodología. Los plásmidos pGSH1-HOXB13-I y II obtuvieron el mayor efecto en la viabilidad de B16F10 con un 47% y 64% a la concentración de 0.8 μ g totales respectivamente. El plásmido pGSH1-HOXB13-III no tuvo efecto sobre la viabilidad celular sin embargo el plásmido pGSH1-HOXB13-IV afectó en un 48% la viabilidad celular a la concentración de 0.8 μ g totales. El plásmido V que codifica para un RNAi quimérico no afectó la viabilidad celular de B16F10. Se transfectaron por el método PEI y se determinó el % de mediante MTT descritos en materiales y métodos después de 48 horas de incubación a la concentración descrita

6.8. Silenciamiento génico de *HOXB13* por RNAi's en combinación con los quimioterapéuticos Cisplatino y Doxorrubicina

6.8.1. Sensibilización de la línea celular B16F10 a Doxorrubicina

En la figura 23 se muestra el efecto de la sensibilización de la línea celular B16F10 con el quimioterapéutico Doxorrubicina donde la concentración citotóxica media se estima a 60 pg/μl a 48 horas de tratamiento en las células B16F10.

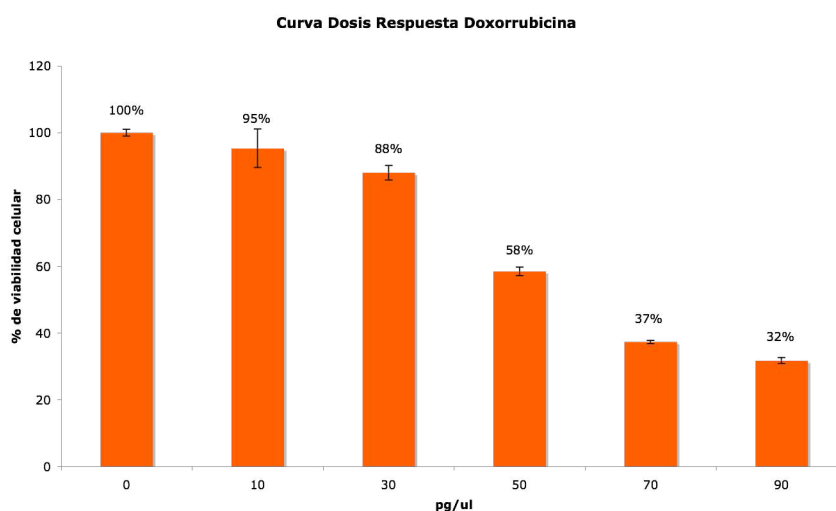


Figura 23. Efecto del quimioterapéutico Doxorrubicina sobre la viabilidad celular de B16F10. Las células fueron tratadas usando concentraciones de Doxorrubicina de 10, 30, 70 y 90 pg/μl. La viabilidad celular analizada mediante el método MTT después de 48 horas de incubación mostró la CC50 a 50 pg/μl aproximadamente y el mayor efecto sobre la viabilidad celular a 90 pg/μl de Doxorrubicina con un 68 % de disminución de la viabilidad celular.

6.8.2. Efecto combinado de Doxorrubicina y el RNAi I *HOXB13* en la línea celular B16F10

Se sensibilizó la línea celular B16F10 con el quimioterapéutico Doxorrubicina a 50 pg/μl correspondiente a la concentración citotóxica media y se transfectó a 0.8 y 0.6 μg totales del RNAi I Figura 24. Los resultados mostraron un efecto del 73% sobre la viabilidad celular de B16F10 que correspondió a 0.6 μg totales del RNAi I y 50 pg de Doxorrubicina y un 63% de efecto al ser transfectada con 0.8 μg totales del RNAi I y 50

pg de Doxorubicina, encontrando mayor efecto al transfectar 0.6 μg totales comparado con los 0.8 μg totales correspondientes a la CC50 y a el mayor efecto sobre la viabilidad celular encontrado en experimentos anteriores al transfectar el plásmido con el RNAi I, por lo que se puede concluir que a 0.6 μg totales es el máximo efecto de silenciamiento génico de *HOXB13* y un quimioterapéuticos en este caso la Doxorubicina en B16F10 sin embargo no se detectó el efecto aditivo esperado, que sería de un 100% sobre la viabilidad celular.

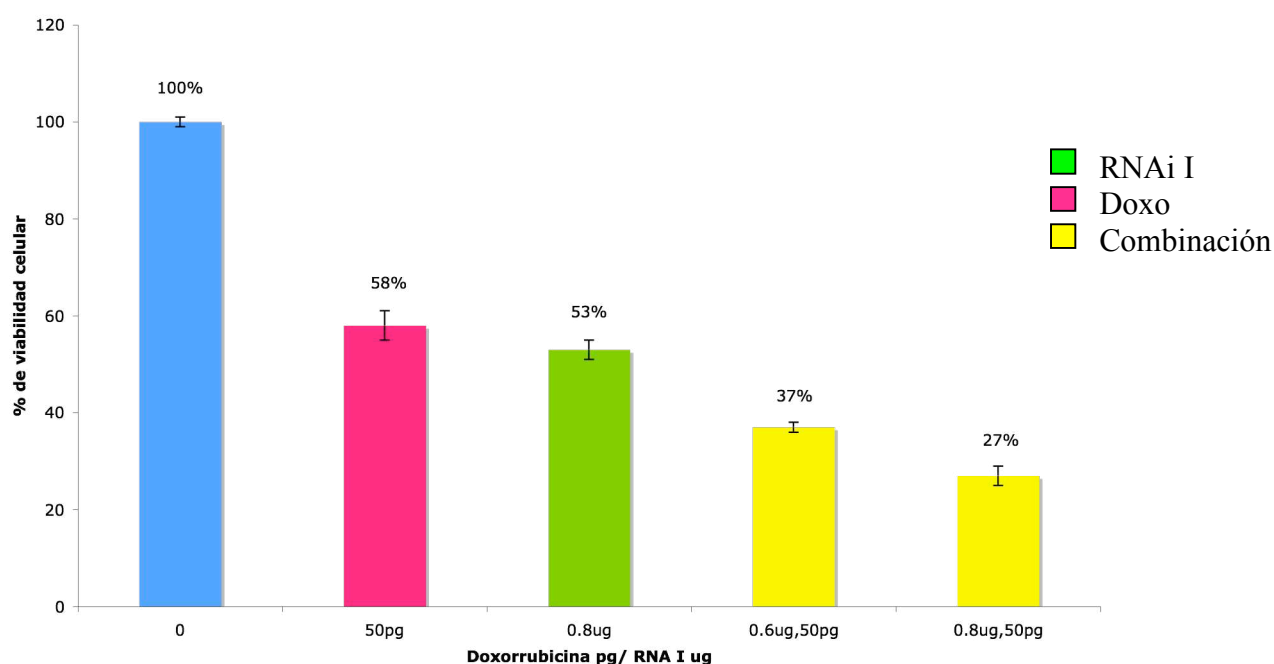


Figura 24. Efecto del quimioterapéutico Doxorubicina y el RNAi I sobre la viabilidad celular. Las células fueron tratadas usando la concentración citotóxica media del Doxorubicina 50pg/ μl y a la vez transfectadas con 0.8 y 0.6 μg totales del RNAiI, con el método PEI descrito en la metodología. La concentración de 0.6 μg del RNAi I y 50 pg de doxorubicina afectó severamente la viabilidad celular en un 63%

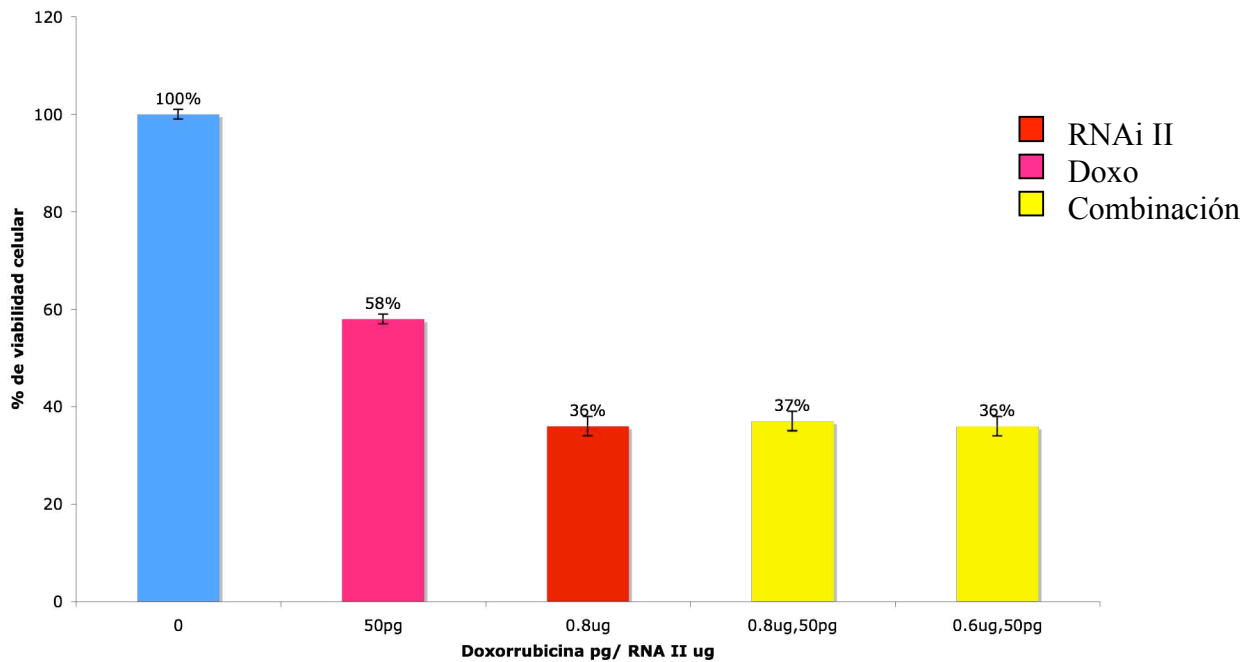


Figura 25. Efecto del quimioterápico Doxorrubicina y el RNAi II sobre la viabilidad celular. Las células B16F10 fueron tratadas usando la concentración citotóxica media del Doxorrubicina 50pg/ μ l y a la vez transfectadas con 0.6 y 0.8 μ g totales del RNAi II, con el método PEI descrito en la metodología. La concentración de 0.6 y 0.8 μ g del RNAi I y 50 pg de Doxorrubicina afectaron la viabilidad celular en un 64% y 63% respectivamente.

6.8.3. Efecto de la sensibilización de la línea celular B16F10 con Doxorrubicina y el RNAi II

Se sensibilizó la línea celular B16F10 con el quimioterapéutico Doxorrubicina a 50 pg/ μ l correspondiente a la concentración citotóxica media (CC50) y se transfectó con 0.8 y 0.6 μ g totales del RNAi (Figura 25). Los resultados mostraron que el efecto en la viabilidad celular correspondió a un 63 y 64% con 0.6 y 0.8 μ g del RNAi II respectivamente y 50 pg de Doxorubicina. Sin embargo, si se toma en cuenta que 0.8 μ g totales corresponden al efecto máximo de silenciamiento (64%) sobre B16F10 con el RNAi II no se detectó efecto aditivo con el quimioterapéutico Doxorrubicina.

6.8.4. Sensibilización de la línea celular B16F10 con el quimioterápico cisplatino

En la figura 26 se muestra el efecto de la sensibilización de la línea celular B16F10 con el quimioterápico cisplatino donde la concentración citotóxica media (CC50) se estimó a 7 μ g/ μ l a 48 horas del tratamiento.

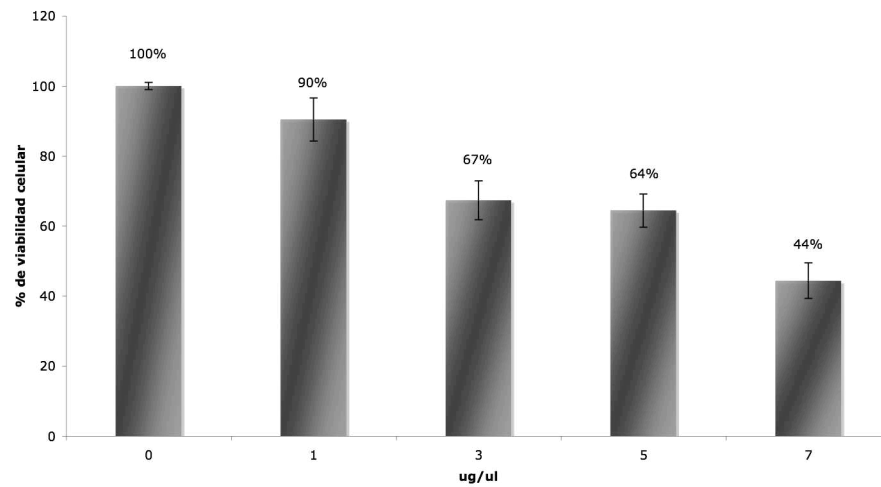


Figura 26. Efecto del quimioterápico cisplatino sobre la viabilidad celular de B16F10. Las células fueron tratadas usando concentraciones de Cisplatino de 1, 3, 5, y 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La viabilidad celular analizada mediante el método MTT después de 48 horas de incubación mostró la concentración citotóxica media a 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y el mayor efecto sobre la viabilidad celular.

6.8.5. Efecto de la sensibilización de la línea celular B16F10 con cisplatino y el RNAi I

Se sensibilizó la línea celular con el quimioterápico cisplatino a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ correspondiente a un efecto del 63% en la viabilidad celular en ensayos preliminares se había transfectado con 0.6 y 0.8 μg totales del RNAi I obteniendo un efecto del 40 y 47% sobre la viabilidad celular. Los resultados mostrados en la Figura 27 correspondieron a un efecto en la viabilidad celular del 19% y 31% con 0.6 y 0.8 μg respectivamente del RNAi I en combinación con 3 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cisplatino. Lo que nos indica que no se encontró efecto combinado sobre la viabilidad celular de B16F10 con el quimioterápico cisplatino y el RNAi I ya que incluso el efecto del RNAi I sin el quimioterápico Cisplatino es mayor.

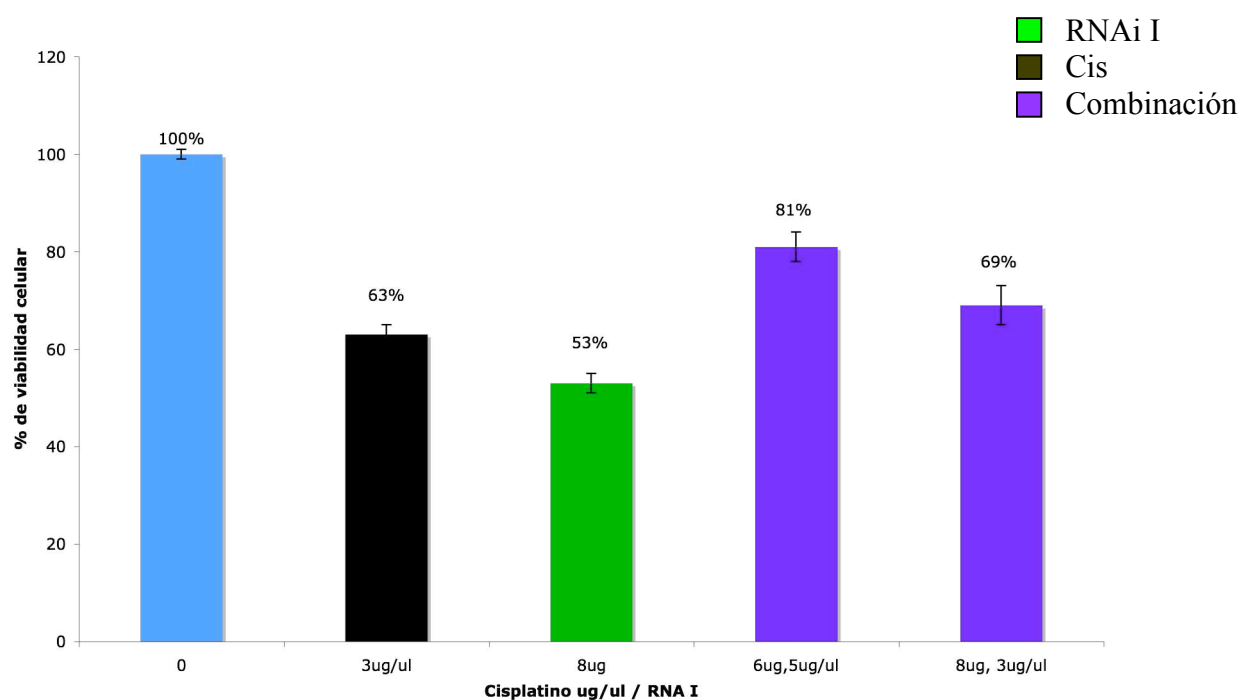


Figura 27. Efecto del quimioterápico Cisplatino y el RNAi I sobre la viabilidad celular. Las células fueron tratadas usando concentraciones las 3µg/ul de cisplatino y a la vez transfectadas con 0.8 y 0.6 µg totales de el RNAi I con el método PEI descrito en materiales y métodos; al mismo tiempo sensibilizadas con 5µg/ul y 3µg/ul respectivamente, afectaron la viabilidad hasta en un 19% y 31%

6.8.6. Silenciamiento génico de *HOXB13* de la línea celular B16F10 con cisplatino y el RNAi II

Se sensibilizó la línea celular B16F10 con el quimioterápico cisplatino a 5 µg/µl correspondiente a un efecto del 63% en la viabilidad celular en ensayos preliminares y se transfectó con 0.6 y 0.8 µg totales del RNAi II. Los resultados mostraron (Figura 28) que el efecto en la viabilidad celular correspondieron a un 77 y 79% con 0.6 y 0.8 µg respectivamente del RNAi II en combinación con 3 y 5µg/µl de cisplatino respectivamente. El efecto en la viabilidad fue de un 61% y 64% con el RNAi II a 0.6 y 0.8µg totales respectivamente, con la sensibilización de B16F10 con cisplatino a 5 y 3µg/µl a la par de la transfección con 0.6 y 0.8µg totales del RNAi II afectó severamente la viabilidad celular en un 77 y 79%. Lo que nos indica que aún cuando 0.6µg no corresponde a el efecto máximo sobre la viabilidad celular es una concentración óptima para aumentar el efecto sobre la viabilidad celular del RNAi II en tratamiento con el cisplatino a 5µg/µl, por otra parte el aumento de la concentración del

RNAi II a 0.8µg totales (CC50) y 3µg/µl en el tratamiento solo nos aumentó el efecto en un 2%, de 77% (a 0.6µg del RNAi II y 3µg/µl) sugiriendo que el máximo de efecto sobre la viabilidad celular del RNAi II con el quimioterapéutico cisplatino es del 79%.

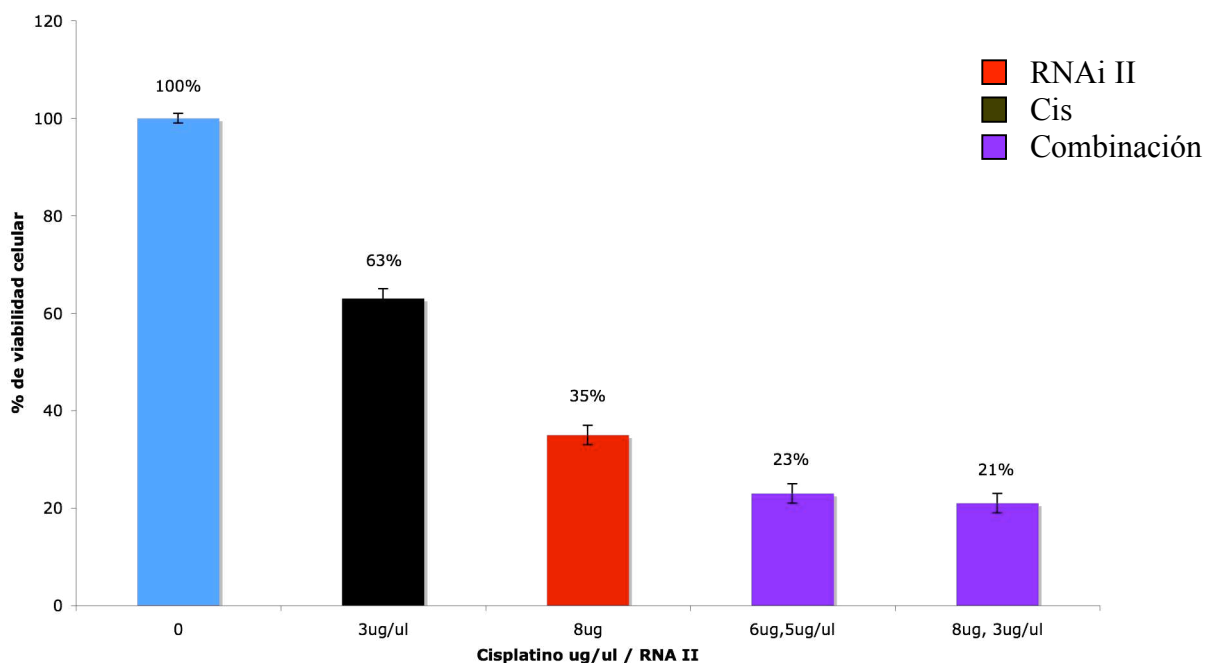


Figura 28. Efecto del quimioterapéutico Cisplatino y el RNAi II sobre la viabilidad celular. Las células fueron tratadas usando concentraciones las 3 ug/ul de cisplatino y a la vez transfectadas con 0.8 y 0.6ug totales de el RNAi II con el método PEI descrito en materiales y métodos; al mismo tiempo sensibilizadas con 5ug/ul y 3ug/ul respectivamente, afectaron la viabilidad hasta en un 77% y 79%

6.9. Análisis Bioestadístico del efecto de los RNAi's I-IV sobre la viabilidad celular de B16F10

La tabla 7 muestra el análisis de varianza mediante un ANOVA de una vía en el silenciamiento génico de *HOXB13*, donde se muestra una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre los RNAi's I-IV, pero no así entre las concentraciones usadas de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 µg totales ($p = 0.1579$); en cada uno de los experimentos la n fue igual a 40 con una $\alpha = 0.05$. Lo que indica que la diferencia significativa corresponde a las secuencias de los RNAi's y no es debida a la concentración. Por otro lado, al llevar a cabo la prueba Dunnet de medias (Figura 29) se corroboró el comportamiento de cada uno de los RNAi's, donde se muestra que los RNAi's I y II se comportan diferente al control con una disminución de la viabilidad celular y aunque de una forma menos

marcada el RNAi III también es diferente al control, suficiente para mostrar una diferencia significativa al afectar la viabilidad celular de B16F10. Por último, el RNAi IV se comportó similar al control ya que se traslaparon y por lo tanto no mostró diferencia significativa. Se muestra en la Figura 29 como se traslapa el control y tratamiento con el RNAi IV lo que significa que no se afectó la viabilidad celular.

Tabla 7. Análisis de Varianza usando ANOVA en el silenciamiento génico de *Hoxb13*

| Fuente de variación | Grados de Libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados medios | F(prueba de Snedecor) | <i>p</i> |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------------|----------|
| RNAi's I,II,III,IV | 4 | 74610.63 | 18652.7 | 60.1628 | <.0001 |
| Concs 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 µg totales | 3 | 1629.17 | 543.1 | 1.7516 | 0.1579 |
| Error | 192 | 59526.95 | 310.0 | | |
| C. Total | 199 | 135766.76 | | | |

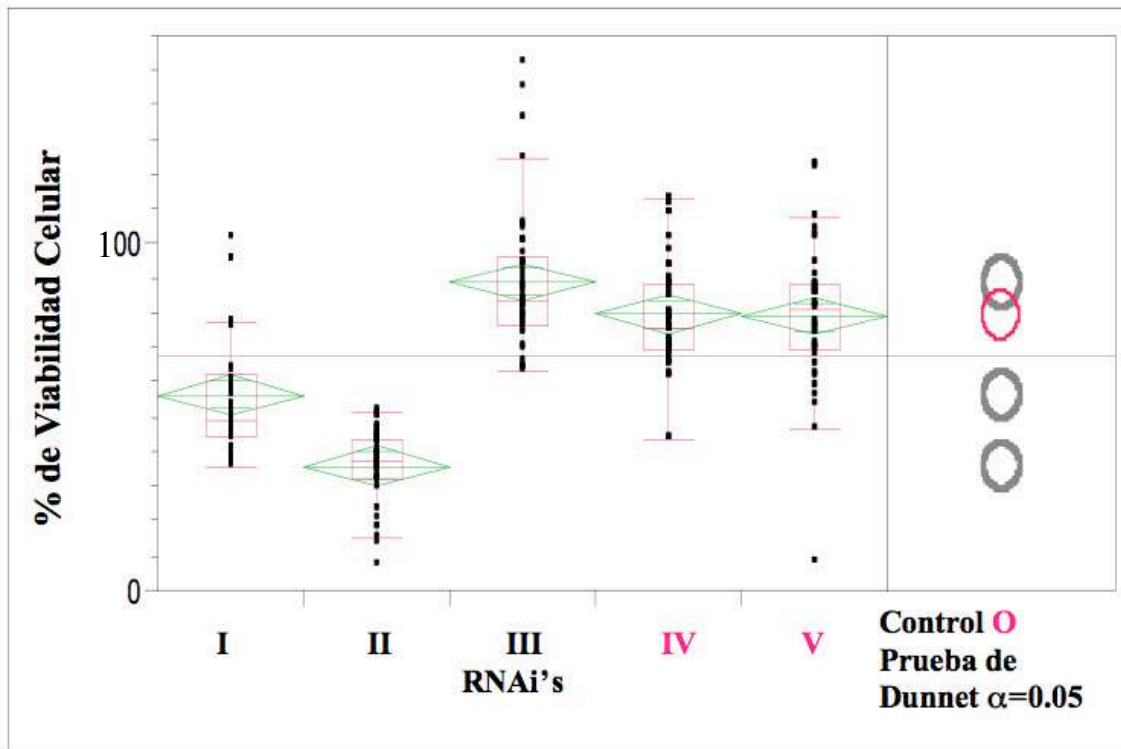


Figura 29. Análisis del silenciamiento génico de *HOXB13* con los RNAi's en la viabilidad celular de B16F10 mediante prueba de medias Dunnet. La gráfica muestra los valores de las medias de Dunnet en la viabilidad celular en el silenciamiento génico de *HoxB13* presentan diferencia significativa ($p < 0.0001$) con los RNAi's I y II comparados con el control (RNAi V) en contraste con los RNAi III y IV que no mostraron diferencia significativa. Aunque el RNAi III se comportó diferente al control ya que tiende a aumentar la viabilidad celular y el RNAi IV no mostró diferencia significativa con el control (RNAi V).

7. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta tesis se realizó el silenciamiento génico de *Hoxb13* en la línea celular B16F10 de melanoma murino con dos diferentes RNAi's. Para llegar a este propósito se amplificó el gen *Hoxb13* mediante RT-PCR punto final en tres líneas celulares, MCF-7 de cáncer de mama, SiHa de carcinoma cervical y la línea celular B16F10. A la par se llevó a cabo el diseño de cuatro oligonucleótidos antisentido dirigidos al mensajero de *HoxB13* denominados RNAi's I, II, III, IV con la particularidad de que fueron dirigidos a las posiciones 193, 868, 1235 y 1365 pb respectivamente del RNAm de *Hoxb13*. Posteriormente, se realizó la clonación de los RNAi's I-IV en el vector pGSH1-*GFP* que posteriormente permitieron el silenciamiento del gen *Hoxb13* en la línea celular B16F10; se ligaron los RNAi's previamente alineados mediante un gradiente de temperatura al vector lineal pGSH1 que posee el gen reportero *GFP* para visualizar cualitativamente la eficiencia de las transfecciones con los RNAi's. Una vez caracterizados los plásmidos codificantes con los RNAi's, se secuenciaron las clonas positivas, y se purificaron los DNA's para tener una buena eficiencia de transfección con el agente PEI (polietilenimina). Las células B16F10 fueron seleccionadas debido a que presentaron una mayor eficiencia de transfección comparadas con MCF-7 y SiHa, ya que después de 48hrs de transfección fue posible detectar la proteína Verde Fluorescente, en comparación con las otras dos líneas celulares (SiHa y MCF-7) en las cuales desde las primeras horas se detectaba la baja eficiencia de transfección, y muy pocas células fluorescentes. Además, la línea celular B16F10 proporciona mayores perspectivas para el análisis del silenciamiento génico en un modelo murino *in vivo*.

La estrategia para detectar si el silenciamiento de *Hoxb13* fue efectivo, se diseñó mediante la detección de la falta de amplificación de la banda esperada para su RNA mensajero. Por el contrario, la amplificación de las bandas de 234, 202, 173 y 189pb del mensajero *Hoxb13* mostraron la presencia de los sitios donde fueron dirigidos los RNAi's I-IV respectivamente y su falta de silenciamiento. La amplificación se realizó mediante punto final del gen *Hoxb13* a partir de los DNAc's de la línea celular B16F10 transfectada con los plásmidos que contienen los RNAi's a concentraciones variaron de 0.1, 0.2 y 0.4 μ g totales a las 48 horas de su transfección con el método PEI descrito en

materiales y métodos. Los resultados mostraron la amplificación de la banda de 234pb cuando las células fueron transfectadas con 0.2µg totales del plásmido con el RNAi I en contraste con la transfección de 0.4µg totales donde no se detectó la amplificación del RNAm de *Hoxb13* lo que indica efectivamente el silenciamiento del mensajero. De la misma forma, los DNAc's transfectados con el RNAi II amplificaron la banda de 202pb a las concentraciones de 0.1 µg totales mientras que a concentraciones de 0.2 y 0.4 no detectaron la amplificación de *Hoxb13* indicando de nuevo el silenciamiento exitoso. En contraste, los DNAc's de células transfectadas con los RNAi's III y IV amplificaron las bandas de 173 y 189pb respectivamente a 0.2 y 0.4µg totales indicando la ausencia del silenciamiento de *Hoxb13* a estas concentraciones. Estos resultados fueron validados con la amplificación simultánea del gen constitutivo *β-actina* en las mismas condiciones experimentales en todas las transfecciones realizadas. En conjunto estos resultados muestran evidentemente el silenciamiento del mensajero de *Hoxb13* con los RNAi's I y II a concentraciones de 0.4 µg y 0.2 µg respectivamente. La ausencia de silenciamiento génico para los RNAi's III y IV se debe probablemente a que estos RNAi's se encuentran dirigidos a regiones río arriba del 3' del RNAm, lo cual no es extraño ya que existen factores que influyen sobre la efectividad del silenciamiento génico, uno de ellos es el sitio de unión al mensajero lo que es independiente de cada gen (Ortiz-Quintero 2009). Sin embargo, a la fecha no han sido publicados sitios de mayor efectividad de silenciamiento por interferencia por lo que es posible que este factor influya en un punto y momento clave la transcripción del gen.

El silenciamiento génico de *Hoxb13* con los RNAi's I y II a nivel del RNAm fue corroborado con los experimentos de inmunodetección de la proteína HOXB13 en la línea celular B16F10. Los resultados mostraron una disminución drástica en la inmunodetección de esta homeoproteína al ser transfectada con los RNAi's I y II a la concentración de 0.8µg totales respectivamente; en comparación con el control (línea celular B16F10 sin transfectar). Esto confirma los resultados del efecto de los RNAi's I y II sobre el transcrito de *Hoxb13*, al comparar visual y cualitativamente el efecto de los RNAi's I y II sobre la homeoproteína HOXB13. De la misma forma que lo descrito anteriormente el RNAi II disminuye drásticamente a HOXB13 a pesar de que las transfecciones fueron hechas en las mismas condiciones para los dos RNAi's. En conclusión el silenciamiento de *Hoxb13* afectó la expresión de la Homeoproteína

HOXB13 con los RNAi's I y II en las células B16F10 transfectadas a 0.8µg totales, mostrando el mayor efecto del RNAi II en comparación con el RNAi I.

Para corroborar estos resultados se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular en una curva dosis respuesta para cada uno de los RNAi's, a las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8µg totales de DNA de cada uno de los plásmidos codificantes y un quinto RNAi quimera proporcionado por la compañía GELANTIS utilizado como control negativo. Los resultados con el RNAi I a 0.2µg totales transfectados mostraron un 69% de viabilidad celular ya que aún se detectaba el transcrito del RNAm de *Hoxb13* por punto final y a 0.4µg la viabilidad celular disminuyó al 63% cuando el transcrito ya no se detectó indicando el inicio del silenciamiento génico de *Hoxb13*. El efecto máximo del RNAi I se encontró a 0.8 µg totales donde la viabilidad celular correspondió a la concentración citotóxica media (CC50) de 53% en el que no se detectó el RNAm de *Hoxb13*. Así mismo, para el RNAi II los resultados de viabilidad celular corroboran en mayor medida lo obtenido en el silenciamiento de *Hoxb13* por punto final ya que a 0.2 y 0.4µg se obtuvo un 59 y 44% respectivamente en la viabilidad celular coincidiendo con el punto final donde ya no se detectó el transcrito, apoyando el silenciamiento génico del RNAm de *Hoxb13*. El mayor efecto se obtuvo a 0.8 µg totales con solamente un 36% de la viabilidad celular. En contraste, para el RNAi III el efecto sobre la viabilidad celular no fue significativo ratificando los resultados de punto final donde se amplificó el transcrito de *Hoxb13* en todas las concentraciones usadas. De forma sorprendente, el RNAi IV mostró efecto sobre la viabilidad celular de B16F10 a pesar que por RT-PCR aún se detectó el transcrito post-transfección a 0.2, y 0.4 µg totales y el máximo efecto de este RNAi fue encontrado a 0.8µg totales concentración que no fue analizada por RT-PCR.

Para confirmar los resultados obtenidos se llevó a cabo el análisis bio-estadístico de las curvas dosis respuesta de los cuatro RNAi's HOXB13 I-IV en la línea B16F10 utilizando como control el RNAi quimera proporcionado por *GELANTIS* para determinar si el silenciamiento génico de los RNAi's afectaba la viabilidad celular de manera significativa. El análisis de varianza ANOVA de una vía muestra que existe una diferencia significativa entre los RNAi's I y II ($p < 0.0001$) comparados con el control. Sin embargo, el efecto entre las concentraciones usadas no mostró diferencia significativa en cada uno de los experimentos la $n=40$ y una $\alpha=0.05$. Lo que indica que

la eficiencia del silenciamiento se lleva a cabo por la secuencia del RNAi y no por la concentración a la que es transfectada.

Por otro lado, al llevar a cabo la prueba Dunnett se corroboró que los RNAi's I y II mostraron efecto significativo sobre la viabilidad celular de B16F10 ($p=0.0001$). Esto indica que existe diferencia significativa entre los RNAi I y II es decir, se comportan diferente al control (RNAi V). Por otro lado, el RNAi IV tiene también efecto sobre la viabilidad celular aunque no es tan drástico como el de los RNAi I y II, mientras que el RNAi III completamente se traslapa con el control lo que indica que se comporta igual a nuestro control negativo por lo que no tiene efecto sobre la viabilidad.

En ésta tesis demostramos el silenciamiento génico de *Hoxb13* con los RNAi's I y II a nivel de RNAm usando la detección de los mensajeros mediante RT-PCR punto final y a nivel de la homeoproteínas HOXB13 mediante inmunodetección western blott en las células transfectadas. Así mismo, el silenciamiento génico de *Hoxb13* afectó drásticamente la viabilidad celular por lo que la inhibición mediada por RNAi's a *HoxB13* es un modulador proliferativo de las células B16F10 de melanoma de ratón.

También, se analizó el efecto aditivo de los RNAi's I y II en una curva dosis respuesta a las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 μg totales de cada uno respectivamente, presentando un efecto máximo de 45% a 0.6 μg totales en contraste con lo encontrado anteriormente para esta concentración donde el RNAi I mostró individualmente un efecto del 40% y el RNAi II un 61% por lo que se puede afirmar que aumentó un 5% el efecto combinado de los RNAi's I y II en comparación al RNAi I sin embargo no mostró mayor efecto que el RNAi II por lo que su efecto no fue aditivo. Estos resultados se deben a que probablemente existe una competencia entre los RNAi's I y II desde su biogénesis para asegurar su eficiencia al silenciar *Hoxb13*.

Además, se realizó la sensibilización de la línea celular B16F10 con los quimioterapéuticos Doxorubicina y Cisplatino con curvas dosis respuesta. Los resultados determinaron la CC50 de Doxorubicina a 50 $\text{pg}/\mu\text{l}$ y el efecto máximo del 68% a 90 $\text{pg}/\mu\text{l}$ con un 32% de la viabilidad celular. Así mismo, la CC50 de Cisplatino se obtuvo a aproximadamente a 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ correspondiente a su mayor efecto. Tomando en cuenta estos resultados, se sensibilizó la línea celular B16F10 con Doxorubicina a 50 $\text{pg}/\mu\text{l}$ que corresponde a la CC50 y se transfectó con 0.8 y 0.6 μg totales del RNAi I. Se obtuvo un efecto del 63% sobre la viabilidad celular con 0.8 μg totales del RNAi I y 50 $\text{pg}/\mu\text{l}$ y para 0.6 μg un efecto del 73%. Si se toma en cuenta que 0.8 μg totales

corresponden al máximo efecto de silenciamiento en B16F10 (47%) se encontró un aumento de un 16% y 26% en la viabilidad celular, sin embargo a pesar de la drástica disminución el efecto no fue aditivo. Es muy posible que al aumentar la concentración de la transfección con 0.8µg totales del RNAi I y los 50pg de Doxorubicina se observe menor efecto terapéutico que con la concentración de 0.6µg del RNAi I y los 50pg debido a que las células no alcanzaron a metabolizar tanto el quimioterapéutico como el RNAi lo que probablemente indujo una forma alterna de eliminación rápida de los compuestos sin permitirles el 100% del efecto. En resumen, el quimioterapéutico Doxorubicina incrementó el efecto en la viabilidad celular en un 16% con 0.8µg y un 26% a 0.6 µg totales del RNAi I.

Al repetir este mismo experimento pero con el RNAi II se observó un efecto muy diferente, a 0.8 µg totales para el primer tratamiento encontramos un efecto del 64% y a 0.6 µg totales un 63% lo que resultó en el mismo efecto que tuvieron las células con el RNAi II sin el quimioterapéutico que fue de el 64% sobre la viabilidad celular por lo que concluimos que no se detectó efecto aditivo del quimioterapéutico Doxorubicina en combinación con el RNAi II debido a que probablemente esta concentración es la máxima eficiencia de transfección y las células no alcanzan a metabolizar los quimioterapéuticos por lo tanto no tienen efecto sobre la viabilidad celular.

Al sensibilizar la línea celular con el quimioterapéutico Cisplatino a 5 µg/µl correspondiente a un efecto del 63% en la viabilidad celular en combinación con el RNAi I a 0.6 y 0.8 µg totales se obtuvo un efecto del 40 y 47% sobre la viabilidad celular respectivamente. Los resultados correspondieron a un efecto en la viabilidad celular de 19% y 31% con 0.6 y 0.8 µg respectivamente del RNAi I en combinación con 3 y 5µg/µl de cisplatino. Lo que indica que no se encontró efecto sobre la viabilidad celular de B16F10 con el quimioterapéutico cisplatino y el RNAi I, incluso el efecto del RNAi I sin el quimioterapéutico Cisplatino es mayor.

Al analizar el efecto del quimioterapéutico Cisplatino a 5 y 3 µg/µl con el RNAi II a 0.6 y 0.8 µg totales mostraron sorprendentemente un efecto del 77 y 79 % respectivamente sobre la viabilidad celular aumentando el efecto en un 16 y un 15% respectivamente comparado con el efecto con el RNAi II individualmente .

El efecto de los quimioterapéuticos con los RNAi's disminuyeron la viabilidad celular en más de un 20% sobre el efecto de RNAi I con el quimioterapéutico

Doxorrubicina por el contrario se obtuvo mayor efecto con el RNAi II y Cisplatino, aunque fue una disminución drástica en la viabilidad celular de B16F10 no se obtuvo el 100% de efecto lo que nos indica que no constituyó un efecto aditivo. Sin embargo, si se obtuviera el 100% de efecto en la viabilidad nos plantearía que la apoptosis de las células depende básicamente de *HOXB13* como factor de transcripción y existen otros genes pro-apoptóticos como *Bcl1* y *Bcl2* que no se tiene evidencia a la fecha que sean controlados por *HOXB13*. Lo anterior indica que la disminución del 80% con los quimioterapéuticos es un resultado muy eficiente de la hipótesis planteada.

Interesantemente, en nuestro trabajo encontramos un efecto significativo en la viabilidad de B16F10 células de melanoma murino donde se mostró el silenciamiento de *HOXB13* incluso logramos aumentar este efecto al combinarlo con Doxorrubicina y Cisplatino. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de probar este efecto *in vivo* con fines terapéuticos en melanoma.

Estos resultados concuerdan con los propuestos por Ma *et al.*, en el 2004 que subrayan la importancia de este gen debido a que los tejidos y células donde existe una sobre expresión de *HOXB13* presentan el fenotipo maligno incrementando la migración, la motilidad celular e incluso la metástasis. Adicionalmente, postulan a este gen como asistente y/o marcador molecular en la determinación de la prognosis clínica de los pacientes con cáncer de mama, cervix y ovario para ayudar a un diagnóstico temprano. En este punto los RNAi's I y II en combinación con los quimioterapéuticos ofrecen una alternativa terapéutica para la supresión de tumores en tejido como un tratamiento eficaz en dichos cánceres.

La disminución obtenida en esta tesis de la proliferación en la línea celular B16F10 así como la disminución de la proteína HOXB13 y del transcrito en esta línea celular nos da pie a proponer el silenciamiento de este gen con los RNAi's I y II acompañada de los quimioterapéuticos Doxorrubicina y Cisplatino de vital importancia en la terapia génica de diversos procesos de cáncer mamario, cervical, de ovario , así como el melanoma maligno metastático distal.

En contraste, estudios han mostrado el papel modulador de *HOXB13* en humanos en próstata donde al aumentar su expresión funciona como un supresor de crecimiento de células malignas en próstata (Young-Rang *et al.*, 2010). También en 2010, Kalpana *et al.*, encuentran que *HOXB13* funciona como un supresor en tumores primarios de cáncer colo-rectal ya que este factor de transcripción se transcribe aberrantemente en células de cáncer colo-rectal y disminuye el crecimiento tumoral en

nódulos de ratón. Interesantemente, éstos autores postulan que *HOXB13* actúa como un gen supresor de tumor en cáncer de próstata y lo proponen también como supresor de tumor en cáncer colo-rectal. Adicionalmente, un solo estudio en melanoma murino sugiere a *HoxB13* como un gen supresor de tumor ya que al deletarlo y al volverlo a expresar reducen su conteo de colonias por placas (Muthusamy *et al.*, 2006). Los resultados de esta tesis contrastan con lo obtenido por éstos autores quienes identificaron 17 genes que fueron silenciados por metilación usando un inhibidor de la metilación (5-aza-2-deoxycytidine). En éste trabajo expresaron establemente *HOXB13* en la línea celular de melanoma humano MelJuSo (deficiente de *HOXB13*) a niveles semejantes a los encontrados en Keratinocitos primarios, resultando en la reducción de formación de colonias en placa y la proliferación celular. *HOXB13* transfectado en esta línea exhibió una disminución tumoral de cuatro veces comparada con el control, estos resultados indicaron a *HOXB13* como un gen supresor de tumor.

Una diferencia significativa entre piel, próstata y colon es que *HOXB13* se encuentra normalmente expresado en epidermis adulta junto con otros genes *HOX* (Mack *et al.*, 2005) mientras que se encuentra altamente expresado en próstata y colon (RangKim *et al.*, 2010 y Ghoshal *et al.*, 2010). En la epidermis adulta *HOXB13* tiene un importante papel en la diferenciación epitelial; ya que es continuamente renovada en un programa de crecimiento, diferenciación y tiene influencia sobre la forma especializada de apoptosis (cornificación) en piel (Mack *et al.*, 2005). Mack *et al.*, en 2005 demostraron que la sobre expresión de *HOXB13* en un modelo epidermal adulto provoca una excesiva diferenciación terminal y un aumento en el desarrollo de cornificaciones provocando fenotipos anormales.

Nuestros resultados apoyan también con lo obtenido por Lu *et al.*, 2010, quienes señalan que *HOXB13* tiene una función antiproliferativa, lo que se refleja en disminución de la angiogénesis y al medir los cambios morfológicos encuentran la disminución de cicatrices todo esto al probar en un cocktail los RNAi's de *HOXB13*, COX1, COX2 y TGF- β -1, en nanopartículas de un acarreador que es un polímero catiónico en queratinocitos de Rata, y células PC3 (Lu *et al.*, 2010). Por lo que el silenciamiento de *HOXB13* puede llegar a ser una ventaja en el mejoramiento de la cicatrización celular al estar *HOXB13* expresado en piel de feto y adulto en humanos permite la regeneración de cicatrices y su expresión no cambia en adultos (Komuves *et al.*, 2003 y Stelnicki *et al.*, 1998). Los autores proponen el uso de una molécula acarreadora con múltiples RNAi's como terapia para el mejoramiento de las

condiciones de la piel en lesiones cutáneas provocadas por psoriasis y lupus eritematoso. Estas moléculas inhiben la expresión de más de un gen que promueven procesos , debido a que intervienen en rutas proinflamatorias, pro-angiogénicas y de proliferación celular entre ellos *HOXB13*, *HOX1*, *TGFβ1*, *TGFβ2* y *COX2* en keratinocitos de rata e *in vivo*. El método usado dérmico y epidérmico permite el silenciamiento génico de no solo un gen sino de varios, debido a que estas nanopartículas acarreadoras son estables por lo que el tratamiento es más efectivo y permite su uso terapéutico ya que además son farmacéuticamente aceptables.

Los resultados obtenidos en esta tesis abren un campo muy amplio en la terapia del cáncer al proponer la formulación de un cocktail con las moléculas de RNAi's I y II que presentaron un mayor efecto sobre la viabilidad celular, en un acarreador eficiente que permita disminuir la sobre-expresión de *HOXB13* como una terapia eficaz en el tratamiento de patologías malignas.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en ésta tesis nos permitieron concluir:

- 1) Las células B16F10 presentaron altos niveles de expresión de *HOXB13* y fueron seleccionadas debido a que presentaron una mayor eficiencia de transfección comparadas con MCF-7 y SiHa .
- 2) El silenciamiento de *HOXB13* disminuyó la expresión de su RNAm con los RNAi's I y II a las concentraciones de 0.4 μg y 0.2 μg respectivamente, mostrando un mayor efecto del RNAi II comparado con RNAi I. En contraste los RNAi's III y IV no fueron capaces de afectar el silenciamiento de éste gen a 0.2 y 0.4 μg totales.
- 3) El silenciamiento de *HOXB13* afectó la expresión de la Homeoproteína HOXB13 con los RNAi's I y II en las células B16F10 transfectadas a 0.8 μg totales, mostrando el mayor efecto con el RNAi II en comparación con RNAi I.
- 4) El silenciamiento de *HOXB13* disminuyó la viabilidad celular de B16F10 con los RNAi's de interferencia I y II de 47 y 64% respectivamente. El análisis de varianza ANOVA de una vía muestra que existe una diferencia significativa entre los RNAi's I y II ($p < 0.0001$) y la prueba de Dunnet mostró efecto significativo sobre la viabilidad celular de B16F10 ($p = 0.0001$).
- 5) El RNAi IV mostró el máximo efecto en la viabilidad celular (47%) a 0.8 μg totales ($p = 0.0001$) mientras que el RNAi III no presentó un efecto significativo sobre la viabilidad celular de B16F10 de acuerdo a los análisis estadísticos de ANOVA y prueba de Dunnet.
- 6) La combinación de los RNAi's I y II no presentó un efecto aditivo ya que la disminución máxima fue de 45% a 0.6 μg totales mientras que para esa concentración el RNAi I mostró el 40% de efecto y el RNAi II un 66% .
- 7) La combinación del RNAi I con el quimioterapéutico Doxorubicina incrementó el efecto en la viabilidad celular en un 16% con 0.8 μg y un 26% con 0.6 μg totales mientras que no se detectó el efecto aditivo del quimioterapéutico Doxorubicina en combinación con el RNAi II.

- 8) La combinación del RNAi II con el quimioterapéutico Cisplatino incrementó el efecto en 16 y 15% en la viabilidad celular con 0.8 y 0.6 μg totales respectivamente dando un efecto máximo del 79% de reducción de la viabilidad, en contraste con el RNAi I que no mostró un efecto aditivo con este quimioterapéutico.

Nuestros resultados abren la posibilidad de proponer el silenciamiento de *HOXB13* con los RNAi's I y II como un nuevo blanco molecular terapéutico en diversas patologías neoplásicas en combinación con los quimioterapéuticos Doxorrubicina y Cisplatino. Así mismo, esta estrategia experimental de silenciamiento génico puede ser utilizada potencialmente en la reparación de tejido cutáneo y abre la posibilidad para estudios *in vivo* en ratones que permitan el análisis de tratamientos eficaces en diversos procesos patológicos metastáticos así como de reparación tisular cutánea.

LITERATURA CONSULTADA

- Abate-Shen, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? 2002 *Nature Rev. Cancer* 2, 777–785
- Acampora D, D'esposito M, Faiella A, Pannese M, Migliaccio E, Morelli F, A. Stornaiuolo, V. Nigro, A. Simeone & E. Boccinelli. 1989 The Human Hox gene family. *Nucleic Acids Res.* 17: 10385-10402.
- Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clausse N. 1999. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 257(3): 738-745
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Chapter 23. Cancer. Editorial Garland Science.
- Arreola-Triana A. 2008. “Expresión diferencial de los genes HOX A1, A5, B13, C5, C10 y D9 en líneas celulares y tejido cervical normal y neoplásico” Monterrey N.L. México Tesis para obtener el grado de Biólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Birnboim H C & Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bridges C & Morgan T H. (1923). The Third-Chromosome Group of Mutant Characters of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. of Washington Publ. 327-393.
- Boudreau N J, Andrews C, Srebrow A, Ravanpay A & Cheresch D. 1997. Induction of the Angiogenic Phenotype by Hox D3. *J Cell Biol* 1:257–264
- Boudreau N J, & JA Varner. 2004 The Homeobox Transcription Factor Hox D3 Promotes Integrin 51 Expression and Function during Angiogenesis. *J Biol Chem* 6:4862-8
- Calvo, K. R., Sykes, D. B., Pasillas, M. P. & Kamps, M. P. Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. 2002 *Oncogene* 21,4247–4256

- Cantile, M., L. Cindolo, G. Napodano, V. Altieri & C. Cillo. 2003 Hyperexpression of locus C genes in the HOX network is strongly associated in vivo with human bladder transitional cell carcinomas. *Oncogene*. 22 (41):6462-8.
- Cazal, C., Sobral, A.P., de Almeida, F.C., das Graças Silva-Valenzuela M., Durazzo, M.D., Nunes, F., 2006. The homeobox HOXB13 is expressed in human minor salivary gland. *Oral Dis*. Jul; 12(4):424-7.
- Chen, F. & M.R. Capecchi. 1999 Paralogous mouse Hox genes, Hoxa9, Hoxb9, and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:541-546
- Chen, H. *et al.* HOXA5 acts directly downstream of retinoic acid receptor beta and contributes to retinoic acid-induced apoptosis and growth inhibition. 2007 *Cancer Res*. 67, 8007-8013.
- Chu, M.C., F.B. Selam & H.S. Taylor. 2004 HOXA10 Regulates p53 Expression and Matrigel Invasion in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Biol Ther*. 3(6):568-72
- Chudnovsky, Y., Adams, A.E., Robbins, P.B., Lin, Q., Khavari, P.A. Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. 2005 *Nature Genetics*. 37(7):745-9.
- Crooks, G.M., J. Fuller & D. Petersen, *et al.* 1999 Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* 94: 519:528.
- Cuaranta Monrroy, I., 2008, "Sobre-expresión preferencial de los genes HOX A10 transcrito 2, HOX A11, y B13 en tejidos ovaricos con patología maligna." Monterrey N.L. México Tesis Maestría en Ciencias con acentuación en Inmunobiología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T., Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. 2001 *EMBO J*. 20(23):6877-88.
- Fanti, L., Perrini, B., Piacentini, L., Berloco, M., Marchetti, E., Palumbo, G., Pimpinelli, S. The trithorax group and Pc group proteins are differentially involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Cromosoma*. 2008 117: 25-39.
- Faber, J., Krivtsov, A.V., Stubbs, M.C., Wright, R., Davis, T.N., van den Heuvel-Eibrink, M., Zwaan, C.M., Kung, A.L., Armstrong SA. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood*. 2009 113:2375-2385.
- Favier, B. & P. Dolle. 1997 Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol Hum Reprod*. 3(2):115-31. Review.

- Fisher D, Mechali M. 2003. Vertebrate HoxB expresión requires DNA replication. *EMBO J.* 22(14):3737-48
- Franco-Marina, F., R. Lozano, B. Villa, P. Soliz. 2006 La Mortalidad en México, 2000-2004 “Muertes Evitables: magnitud, distribución y tendencias”. Dirección General de Información en Salud, Secretaría de Salud.
- Friedmann, Y., C.A. Daniel, P. Strickland & C.W. Daniel. 1994 Hox genes in normal and neoplastic mouse mammary gland. *Cancer Res.* 54(22):5981-5.
- Friedmann, Y. 1995. Expression and developmental role of homeobox containing genes during mouse mammary gland morphogenesis. In *Biology*. Santa Cruz, CA: University of California.
- Fu, S.W., A. Schwartz, H. Stevenson, J.J. Pinzone, G.J. Davenport, J.M. Orenstein, P. Gutierrez, S.J. Simmens, J. Abraham, I. Poola, D.A. Stephan & P.E. Berg. 2003 Correlation of expression of BP1, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 5(4):R82-7.
- García-Bellido, A. 1977 Homeotic and atavic mutations in insects. *Amer. Zool.* 17, 613-30.
- Gehring, W.J. 1987 Homeox boxes in the study of development. *Science* 236, 1245-52.
- Gehring, W.J., M. Affolter & T. Burglin. 1994 Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 437-526.
- Golub, T. R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., Lander, E.S., Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999 286: 531-537.
- Grier, D.G., A. Thompson, A. Kwasniewska, G.J. McGonigle, H.L. Halliday & T.R. Lappin. 2005 The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol.* 205: 154-71.
- Han, L., Witmer, P. D., Casey, E., Valle, D. & Sukumar, S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol. Ther.* 2007 (6): 1284–1288.
- Hanson, R. D., Hess, J.L., Yu, B.D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, N.M., Shashikant, C.S., Ruddle, F.H., Seto, M., Korsmeyer, S.J., Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1999 USA 96, 14372–14377 .
- Hamada, J., T. Omatsu, F. Okada, K. Furuuchi, Y. Okubo, Y. Takahashi, M. Tada, Y.J. Miyazaki, Y. Taniguchi, H. Shirato, K. Miyasaka, , T. Moriuchi. 2002 Overexpression of homeobox gene HOXD3 induces coordinate expression of metastasis-related genes in human lung cancer cells. *Int J Cancer.* 93(4): 516-25.

- Hamada, J., Y. Takahashi, M. Tada, A. Tsutsumida, K. Furuuchi, T. Aoyama, T. Sugihara, T. Morouchi. 2002 Transduction of HOXD3-antisense into human melanoma cells results in decreased invasive and motile activities. *Clin Exp Metastasis*. 19(6): 503-11.
- Hershko, A. Y., Kafri, T., Fainsod, A. & Razin, A. Methylation of HoxA5 and HoxB5 and its relevance to expression during mouse development. 2003 *Gene* 302: 65-72.
- Hammond, S. & Lee, K.H., RNA interference of cofilin in Chinese hamster ovary cells improves recombinant protein productivity. 2011 *Biotechnol Bioeng* doi: 10.1002/bit.23322.
- Hu, M., J. Yao, L. Cai, K. Bachean, F. van den Brûle, V. Velculescu & K. Polyak. 2005. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*. 37(8): 899-905.
- Hung, Y.C., M. Ueda, Y Terai, K. Kumagai, K Ueki, K. Kanda, H. Yamaguchi, D. Akise & M. Ueki. 2003. Homeobox expression and mutation in cervical carcinoma cells. *Cancer Sci*. 94(5):437-41.
- Holland, P.W.H., L.Z. Holland, N.A. Williams & N.D. Holland. 1992 An amphioxus homeobox genes: sequence conservation, spatial expression during development and insights into vertebrate evolution. *Development*. 116: 653-61.
- Izon, D.J., S. Rozenfeld, S.T. Fong, L. Komuves, C. Largman & H.J. Lawrence. 1998 Loss of function of the homeobox gene Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* 92: 383-93.
- Jerevall, P. L., Brommesson, S., Strand, C., Gruvberger-Saal, S., Malmström, P., Nordenskjöld, B., Wingren, S., Söderkvist, P., Fernö, M., Stål, O. Exploring the two-gene ratio in breast cancer—independent roles for HOXB13 and IL17BR in prediction of clinical outcome. *Breast Cancer Res. Treta*. 2008 (107):, 225-234.
- Jung, C., Kim, R. S., Lee, S. J., Wang, C. & Jeng, M. H. HOXB13 homeodomain protein suppresses the growth of prostate cancer cells by the negative regulation of T-cell factor 4. 2004 *Cancer Res*. 64,3046-3051
- Kalpana, G., Tasneem, M., Rainer, C., Pearly, Y., Huban, K., Jharna, D., Sarmila, M., Shoumei, B., Arnab, M., Tim, H., Christoph, P., Samson, T. J. 2010 HOXB13, a Target of DNMT3B, Is Methylated at an Upstream CpG Island, and Functions as a Tumor Suppressor in Primary Colorectal Tumors *PLoS One*. 5(4): e10338
- Karch, F., B. Weiffenbach, M. Pfeifer, W. Bender, I. Duncan, S. Celiniker, M. Crosby & E. B. Lewis. 1985 The abdominal region of the bithorax complex. *Cell*. 43, 81-96.
- Kim, S.D., Park, R.Y., Kim, Y.R., Kim, I.J., Kang, T., W., Nam, K.I., Ahn, K.Y., Bae, C.S., Kim, B.Y., Park, S.S., Jung, C., HOXB13 is co-localized with androgen receptor to suppress androgen-stimulated prostate-specific antigen expression. 2010 *Anat Cell Biol*. 43(4):284-93

- Kim, Y.R., Oh, K.J., Park, R.Y., Xuan N.T., Kang, T.W., Kwon, D.D., Choi, C., Kim M.S., Nam, K.I., Ahn, K.Y., Jung, C. HOXB13 promotes androgen independent growth of LNCaP prostate cancer cells by the activation of E2F signaling 2010 *Mol Cancer*. (9):124.
- Kim, R.Y., Shin, S.W., Kim, B.J., Lee, W., Baik, J.H., 2005 Dynamic regulation of hypothalamic neuropeptide gene expression and food intake by melanocortin analogues and reversal with melanocortin-4 receptor antagonist. *Biochem Biophys Res Commun*. 329(4):1178-85.
- Kirito, K., N. Fox & K. Kaushansky. 2004 Thrombopoietin induces HOXA9 nuclear transport in immature hematopoietic cells: potential mechanism by which the hormone favorably affects hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* 24: 6751–62.
- Kömüves, L., G. Ma, X., K. Stelnicki, E., Rozenfeld, S., Rozenfeld, S., Oda, Y., Largman, C., 2003 HOXB13 homeodomain protein is cytoplasmic throughout fetal skin development. *Developmental dynamic: an official publications of the American Association of Anatomists* 227(2):192-202
- Kroon, E., J. Kros, U. Thorsteinsdottir, S. Baban, A.M. Buchberg, G. Sauvageau. 1998 Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J* 17: 3714–25.
- Kufe, D., R.E. Pollock, R.R. Weichselbaum, R.C.Jr. Bast, T.S. Gansler, J.F. Holland, E. Frei III, editors. 2003. *Cancer Medicine. Part II. Scientific Foundation. Section 1. Cancer Biology.* Editorial BC Decker Inc.
- Kuroiwa, A., U. Kloter, P. Baumgartner & W.J. Gehring. 1985 Cloning of the homeotic Sex combs reduced gene in *Drosophila* and in situ localization of its transcripts. *Embo J*. 4: 3757-64.
- LeCalvez J. (1948). Mutation Aristopedia heterozygote dominante, homozygotelethal chez *Drosophila melanogaster*. *Bull. Biol. France Belg* 82: 97-113.
- Lewis, M.T. 2000. Homeobox genes in mammary gland development and neoplasia. *Breast Cancer Res*. 2(3):158-69.
- Lawrence, H.J., C.D. Helgason, Sauvageau, G., 1997 Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 89: 1922–30.
- López, R., E. Garrido, P. Piña, A. Hidalgo, M. Lazos, R. Ochoa, M Salcedo. 2006 HOXB Homeobox gene expression in cervical carcinoma. *Nt J Ginecol Cancer* 16: 1-8.
- Lu, Y., Li, L., Simonenko, V., 2010 Multi – Target RNAi Therapeutics for scarless wound healing skin. *Patente Application Publication* 1-25

- Miao, J., Wang, Z., Provencher, H., Muir, B., Dahiya, S., Carney, E., Leong, C.O., Sgroi, D.C., Orsulic, S. 2007 HOXB13 promotes ovarian cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(43):17093-8.
- Ma, X.J. Z. Wang, P.D. Ryan, S.J. Isakoff, A. Barmettler, A. Fuller, B. Muir, G. Mohapatra, R. Salunga, J.T. Tuggle, Y. Tran, D. Tran, A. Tassin, P. Amon, W. Wang, W. Wang, E. Enright, K. Stecker, E. Estepa-Sabal, B. Smith, J. Younger, U. Balis, J. Michaelson, A. Bhan, K. Habin, T.M. Baer, J. Brugge, D.A. Haber, M.G. Erlander, D.C. Sgroi. 2004 A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer cell.* 5(6):607-16.
- Mack JA, Anand S, Mytin EV. 2005. Proliferation and cornification during development of the mammalian epidermis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 75(4):314-29.
- Makiyama, K., J. Hamada, M. Takada, K. Murakawa, Y. Takahashi, M. Tada, E. Tamoto, G. Shindo, A. Matsunaga, K. Teramoto, K. Komuro, S. Kondo, H. Katoh, T. Koike, T. Moriuchi. 2005 Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. *Oncol Rep.* 13(4):673-9.
- Muthusamy, S., Andersson, S., Kim, H.J., Butler, R., Waage, L., Bergerheim, U., Gustafsson, J.A., 2011 Estrogen receptor β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 6, a growth regulatory pathway that is lost in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [Epub ahead of print]
- Ohta, H., J. Hamada, M. Tada, T. Aoyama, K. Furuuchi, Y. Takahashi, Y. Totsuka, T. Moriuchi. 2006 HOXD3-overexpression increases integrin α v β 3 expression and deprives E-cadherin while it enhances cell motility in A549 cells. *Clin Exp Metastasis.* 23(7-8):381-90.
- Okubo, Y., Hamada, J., Takahashi, Y., Tada, M., Tsutsumida, A., Furuuchi, K., Aoyama, T., Sugihara, T., Moriuchi, T. 2002 Transduction of **HOXD3**-antisense into human melanoma cells results in decreased invasive and motile activities. *Clin Exp Metastasis.* (6):503-11
- Ortíz-Quintero, B., 2009 RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Revista de investigación clínica* 61(5): 412-427.
- Parkin, D.,M. Fernandez., L.,M. 2006. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J* 12:S70-S80.
- Passi, A., Sadeghi. P., Kawamura, H., Anand. S., Sato, N., White, L.E., Hascall, V.C., Maytin, E.V., 2004 *Experimental Cell Research.* 296(2):123-34.
- Raman, V., S.A. Martensen, D. Reisman, E. Evron, W.T. Odenwald, E. Jaffee, J. Marks, S. Sukumar. 2000. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature.* 405(6789):974-8.

- Reyna Alvarado 2010 “Cuantificación de la expresión del gen HOXB13 en cáncer mamario usando PCR Tiempo real Monterrey N.L. México Tesis Maestría en Ciencias con acentuación en Inmunobiología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Rodríguez, B.A.T., V.X. Jin, A.S. Cheng, R.V. Davuluri, J.W. Gray & T.H-M. Huang. 2006. HOXB13 is an estrogen receptor responsive gene preferentially methylated in ER-positive breast cancer. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, **47** Cellular and Molecular Biology22: DNA Methylation and Imprinting, Abstract #1596.
- Russo, J. 2001 Homeobox genes mediates the biological functions of human Chorionic Gonadotropin (hCG) in human breast epithelial cells. Fox Chase Cancer Center Philadelphia, PA. Final rept. 1 Jul 1999-30 Jun 2001. 23 páginas.
- Sambrook J., Russell D.W. 2001 Molecular Cloning Laboratory Manual 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sessa, L., Breiling, A., Lavorgna, G., Silvestre, L., Casari, G., Orlando, V., Noncoding RNA synthesis and loss of Polycomb group repression accompanies the colindar activation of the human HOXA cluster. 2007 *RNA* (13), 223–239.
- Shah. N. & Sukumar, S. 2010 The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nature Reviews Cancer* 10: 361-369.
- Sayli, B.S., A.N. Akarasu, U. Sayli, O. Akhan, S. Ceylaner & M. Sarfarazi. 1995 A large Turkish kindred with syndactyly type II (synpolydactyly). 1. Field investigation, clinical and pedigree data. *J Med Genet* 32: 421-34
- Scott, M.P., A.J. Weiner, T.S. Hazelrigg, B.A. Polisky, V. Pirrota, F. Scalenghe & T.C. Kaufman. 1983 The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila*. *Cell*. 35:763-76.
- Shepherd, J.C.W., W. McGinnis, A.E. Carrasco, E.M. DeRobertis, W.J. Gehring. 1984 Fly and frog homeodomains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature*. 310, 70-1.
- Simms, D., P.E. Cizdziel, P. Chomczynski. 1993 TRIzol™ A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus®*. 15(4):99-102.
- Suemori, H. & S. Noguchi. 2000 Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. *Dev Biol*. 220: 333–42.
- Stelnicki., E.,J. Arbeit., J. Cass., D.,L. Saner., C. Harrison., M. Largman., C. 1998 Modulation of the human homeobox genes PRX-2 and HOXB13 in scarless fetal wounds. *J invest Dermatol* 111(1):57-63
- Svingen, T., K.F. Tonissen. 2003 Altered *HOX* gene expression in human skin and breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2(5):518-23.

- Takahashi, O., Hamada, J., Abe, M., Hata, S., Asano, T., Takahashi, Y., Tada, M., Miyamoto, M., Kondo, S., Moriuchi, T. Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma. 2007 *Oncol. Rep.* 17: 753–760.
- Wang, B.B., M. Muller-Immergluck, J. Austin, N.T. Robinson, A. Chisholm & C.A. Kenyon. 1993 Homeotic gene cluster patterns the anteroposterior body axis of *C. elegans*. *Cell.* 74, 29-42.
- Waters, M.J. & B.L. Conway-Campbell. 2004 The oncogenic potential of autocrine human growth hormone in breast cancer. *PNAS* 101(42): 14992-3
- Webb-Vargas Y.G., D.C. Reyna Alvarado, I. Cuaranta Monrroy, F. Mar Aguilar, C. Rodríguez Padilla, D. Reséndez Pérez. 2007. Expresión diferencial de los genes HOX en cáncer de mama: A1, A5, B13 y D3 como candidatos a biomarcadores moleculares. XXXII Congreso Nacional de Genética Humana. Oaxaca, Oax. 9 de Noviembre 2007.
- Webb -Vargas, Y. G. 2007. Expresión diferencial de genes HOX en tumores mamarios del noreste de México. Tesis de Licenciatura FCB, Monterrey N.L., México.
- Wellik, D.M. & M.R. Capecchi. 2003 Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 301: 363–7.
- Wysocka, D.J., G.O. Aisemberg, M. Baumgarten, M. Levine & E.R. Macagno. 1989 Characterization of a homologue of bithorax-complex genes in the Leech *Hirudo medicinalis*. *Nature.* 341:760-3.
- Yamamoto, M., D. Takai, F. Yamamoto, F. Yamamoto. 2003 Comprehensive Expresión Profiling of Highly Homologous 39 Hox Genes in 26 Different Human Adult Tissues by the Modified Systematic Multiplex RT-PCR Method Reveals Tissue-Specific Expression Pattern That Suggests an Important Role of Chromosomal Structure in the Regulation of Hox Gene Expression in Adult Tissues. *Gene Expr* 11(3-4):199-210.
- Yekta, S., Tabin, C. J. & Bartel, D. P. MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence. *Nature Rev. Genet.* 2008 (9):, 789–796.
- Young-Rang K., Kyung-Jin, Oh., Ra-Young P., Nguyen, Thi Xuan, Taek-Won K., Dong-Deu,k K., Chan, C., Min, Soo K., Kwang, Il N., Kyu, Youn A., Chaeyong, J. 2010 HOXB13 promotes androgen independent growth of LNCaP prostate cancer cells by the activation of E2F signaling *Mol Cancer.* (9): 124.
- Zhang, X., T. Zhu, Y. Chen, H.C. Mertani, K.O. Lee & P.E. Lobie. 2003 Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. *J Bio Chem* 278(9):7580-90.
- Zhao, Y., T. Yamashita, M. Ishikawa. 2005 Regulation of tumor invasion by HOXB13 gene overexpressed in human endometrial cancer. *Oncol Rep.* 13(4):721-6.