

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Efecto del miR-125a-5p en células tumorales  
cervicales cultivadas en un modelo tridimensional**

**T E S I S**

Que presenta

**Evelyn Gabriela Bañuelos Villegas**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**Director de la Tesis: Dr. Luis Marat Alvarez Salas**

**Ciudad de México**

**Agosto, 2018**

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Terapia Génica dirigido por el Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, siendo la Q.F.B. Evelyn Gabriela Bañuelos Villegas becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el número de registro 612451.

*A mis padres  
Margarita Villegas Serrano y Jorge Bañuelos Gómez  
Por su apoyo y amor infinito*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Marat Alvarez Salas gracias por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por guiarme de la mejor manera en este proyecto, además de brindarme sus conocimientos, apoyo incondicional y consejos en todos los aspectos personales.

A mis asesores el Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe y el Dr. Jesús Valdés Flores, por el tiempo regalado para leer este trabajo, sus acertadas observaciones y apoyos.

Al M. en C. Alejandro González Torres por su ayuda en mi formación, por sus enseñanzas en el laboratorio, paciencia y consejos. Gracias por todo.

A la Sria. Gabriela Mora Macías, por toda la ayuda brindada en el aspecto administrativo.

Al Sr. Héctor Vargas Sánchez por el apoyo técnico brindado.

A mis compañeros de laboratorio: Diana, Geovanni, Alejandro, Sergio, Fernanda y Mateo, por sus apoyos, consejos y compañía en las largas horas de trabajo.

A mis compañeros de generación, por los dos años que convivimos.

A mis amigos de la licenciatura, gracias por su amistad, porque a través de los años y la distancia pude sentir su cariño, amor, ánimo y apoyo.

A Sarahi Rodríguez, Dinorah Hernández y David Hernández, por ser las personas más incondicionales que he conocido, agradezco a la vida haberlos encontrado en mi camino. Gracias por todo su cariño y su apoyo en los momentos más difíciles de este viaje y las muchas alegrías que fueron capaces de brindarme, sin ustedes no creo que lo hubiera logrado.

Finalmente, a mis padres y a mi familia, por apoyarme en las decisiones que he tomado y que me han traído hasta aquí. Por todo su amor, comprensión y consejos en los momentos difíciles. Sin ustedes nada habría sido posible, gracias por creer siempre en mi e impulsarme en todo momento.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3.1</b> Cáncer Cervical .....	<b>3</b>
<b>3.2</b> MicroRNAs (miRNAs).....	<b>6</b>
<b>3.3</b> Cáncer, cáncer cervical y miRNAs .....	<b>9</b>
<b>3.4</b> miR-125a-5p .....	<b>10</b>
<b>3.5</b> Cultivos tridimensionales en cáncer .....	<b>11</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>7.1</b> Objetivo General .....	<b>19</b>
<b>7.2</b> Objetivos Particulares .....	<b>19</b>
<b>8. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>20</b>
<b>9. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>9.1</b> Cultivo Celular .....	<b>21</b>
<b>9.2</b> Transfección de las líneas celulares .....	<b>21</b>
<b>9.3</b> Evaluación del crecimiento tridimensional .....	<b>22</b>
<b>9.4</b> Viabilidad celular .....	<b>22</b>
<b>9.5</b> Extracción de RNA total.....	<b>22</b>
<b>9.6</b> RT-PCR en Tiempo Real (RT-qPCR) y cebadores.....	<b>22</b>
<b>10. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
<b>10.1</b> Perfil de expresión del miR-125a-5p en células tumorales cervicales cultivadas de manera bidimensional y tridimensional .....	<b>24</b>
<b>10.2</b> Efecto del miR-125a-5p en el crecimiento tridimensional de las células tumorales cervicales.....	<b>27</b>
<b>10.3</b> Efecto del miR-125a-5p en la viabilidad de las células tumorales cervicales ..	<b>29</b>
<b>11. DISCUSIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>12. CONCLUSIONES</b> .....	<b>35</b>
<b>13. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>36</b>
<b>14. REFERENCIAS</b> .....	<b>37</b>

## FIGURAS

## Página

<b>Figura 1.</b> Aparato reproductor femenino. ....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> VPH en el desarrollo de cáncer cervical.....	<b>5</b>
<b>Figura 3.</b> Biogénesis de los miRNAs: Vía canónica.....	<b>8</b>
<b>Figura 4.</b> Blancos validados de miR-125a-5p. ....	<b>11</b>
<b>Figura 5.</b> Representación de un cultivo bidimensional. ....	<b>12</b>
<b>Figura 6.</b> Representación de un tumor in vivo y el modelo tridimensional esferoideal. .....	<b>14</b>
<b>Figura 7</b> Perfil de expresión de miR-125a-5p en líneas derivadas de cáncer cérvico uterino.....	<b>15</b>
<b>Figura 8.</b> Efecto de miR-125a-5p en la proliferación y migración celular. ....	<b>16</b>
<b>Figura 9.</b> Efecto de miR-125a-5p en el crecimiento independiente de anclaje mediante la técnica de agar suave. ....	<b>17</b>
<b>Figura 10.</b> Integridad del RNA extraído. ....	<b>24</b>
<b>Figura 11.</b> Curvas de amplificación por RT-qPCR... ..	<b>25</b>
<b>Figura 12.</b> Análisis de especificidad de la RT-qPCR.....	<b>26</b>
<b>Figura 13.</b> Perfil de expresión de miR-125a-5p en cultivos bidimensionales y tridimensionales de las líneas celulares derivadas de cáncer cervical. ....	<b>27</b>
<b>Figura 14.</b> Crecimiento tridimensional de células tumorales cervicales que sobre- expresan miR-125a-5p. ....	<b>28</b>
<b>Figura 15.</b> Cuantificación del área de los esferoides de células tumorales cervicales que sobre-expresan miR-125a-5p.....	<b>29</b>
<b>Figura 16.</b> Efecto del miR-125a-5p en la Viabilidad de células HeLa.....	<b>30</b>
<b>Figura 17.</b> Viabilidad de las células tumorales cervicales que sobre-expresan miR- 125a-5p. ....	<b>31</b>

## TABLAS

## Página

<b>Tabla 1.</b> Cebadores utilizados para la amplificación del miR-125a-5p y del gen de referencia U6.....	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Pureza del RNA extraído. ....	<b>24</b>

## 1. RESUMEN

El cáncer cervical es un gran problema de salud pública a nivel mundial, este es el séptimo tipo de cáncer más común en el mundo y en México es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. El mayor factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer es la infección por el virus del papiloma humano (VPH), que codifica para dos oncoproteínas E6 y E7 las cuales son necesarias para el desarrollo de un tumor. Sin embargo, la infección por el VPH no es suficiente para desencadenar un proceso tumoral, ya que la mayoría de los pacientes infectados nunca llega a desarrollar cáncer. Así, deben existir otras moléculas endógenas desreguladas que en sinergia con el virus desencadenen el proceso tumoral. Se ha propuesto que estas moléculas pueden ser los microRNAs (miRNAs), los cuales son RNAs pequeños con la capacidad de regular la expresión génica gracias a que se unen por complementariedad a RNAs mensajeros blancos provocando su represión. El miRNA miR-125a-5p se ha descrito como un supresor de tumor en el cáncer cervical; sin embargo, en nuestro grupo de investigación encontró una dualidad contraria de sus funciones en cultivos bidimensionales de células tumorales cervicales. Por una parte, el miR-125a-5p potencia migración y por otra inhibe la proliferación celular. Para profundizar en el estudio del papel funcional de éste miRNA en cáncer cervical, se expresó un miR-125a-5p ectópico en cultivos tridimensionales de células tumorales cervicales ya que son un modelo más adecuado para estudiar cáncer al mimetizar casi perfectamente lo que ocurre en un tumor in vivo. Se encontró que la sobre-expresión del miR-125a-5p provoca una disminución significativa en el crecimiento tridimensional y en la viabilidad de las células. Por otro lado, la expresión del miR-125a-5p en células tumorales cervicales cultivadas bidimensional y tridimensionalmente es diferencial, siendo mayor en los cultivos bidimensionales. Con estos resultados concluimos que el miR-125a-5p actúa como supresor de tumor en cáncer cervical al inhibir el crecimiento tumoral y la viabilidad de células tumorales cervicales.

## 2. ABSTRACT

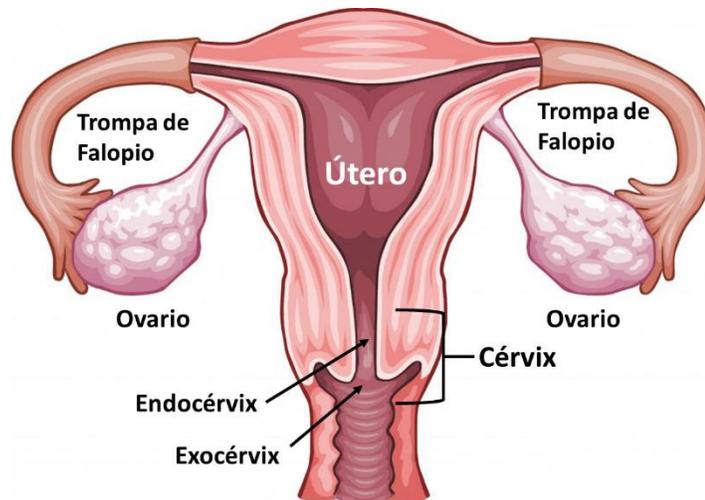
Cervical cancer is a major worldwide health issue. World-wide it is the seventh more common cancer type and in Mexico is the second cause of death by cancer in women. The primary risk factor for the development of cervical cancer is the infection with human papillomavirus (HPV). HPVs encode for two oncoproteins, E6 and E7, which are necessary for tumorigenesis. However, HPV infection is not sufficient for tumor development since most HPV-infected patients never develop cancer. Thus, other deregulated endogenous factors must act in synergy with HPV to trigger the tumor growth. It has been suggested that these synergic molecules are possibly microRNAs (miRNAs), which are small RNAs with the ability to regulate gene expression through translational repression of complementary target mRNAs. The miR-125a-5p has been described as a tumor suppressor in cervical cancer, although our previous research found a duality of functions in bidimensional (2D) cultures of cervical tumor cells. In such cells, miR-125a-5p enhances cell migration but otherwise inhibits cell proliferation. For a better understanding of miR-125a-5p functional in cervical cancer, we expressed ectopic miR-125a-5p in spheroid-like tridimensional (3D) cultures of cervical tumor cell lines. 3D cell culture is a more suitable model for the study of cancer because almost perfectly mimics what takes place in an in vivo tumor. The results showed that overexpression of miR-125a-5p caused a significant decrease in tumor growth and the viability of cervical tumor cells. Additionally, we found differential expression of miR-125a-5p depending on the cell culture model (2D vs. 3D), being higher in the 3D cultures. Hence, we conclude that miR-125a-5p acts as a tumor suppressor by inhibiting tumor growth and viability of cervical tumor cells.

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1 Cáncer Cervical

El cáncer cervical es el séptimo tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial y el cuarto más frecuente entre las mujeres con 528 mil casos nuevos al año, de los cuales el 85% se registran en países en vías de desarrollo. En México desde 2006 el cáncer cervical es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer<sup>1</sup>, siendo la edad promedio de manifestación 49.2 años. Anualmente se estima una ocurrencia de 13,960 casos en mujeres, con una incidencia 6.08 por 100,000 mujeres mayores de 10 años<sup>2</sup>. Además, México es el país con la mortalidad más alta por Cáncer Cervical dentro de los países de la OCDE, ya que en México se registran 12.3 defunciones por cada 100,000 mujeres mientras que en los países de la OCDE se reportan 3.7 defunciones por 100,000 mujeres<sup>3</sup>.

El cáncer cervical se origina en las células que recubren la parte baja del útero denominada cérvix, donde la vagina se conecta con el cuerpo del útero. El cérvix se compone de dos tipos celulares; de las células glandulares del endocérvix, la parte más cercana al cuerpo del útero y de las células escamosas del exocérvix que es la parte más cercana a la vagina (Figura 1). Estos dos tipos celulares convergen en la zona de transformación, donde comienzan la mayoría de los casos de cáncer cervical. Sin embargo, las células no se transforman repentinamente, si no que células normales del cérvix gradualmente desarrollan cambios pre-cancerosos que conllevan al desarrollo del tumor. Se utilizan diferentes términos para describir estos cambios pre-cancerosos, como neoplasia cervical intraepitelial (CIN), lesión escamosa intraepitelial (SIL) y displasia<sup>4</sup>.



**Figura 1. Aparato reproductor femenino.**

Se muestra la localización en la anatomía de la mujer del cérvix, endocervix y exocervix que contiene las células glandulares y las células escamosas respectivamente.

Existen diversos factores de riesgo implicados en el desarrollo del cáncer cervical, como tabaquismo, inmunosupresión, infección por clamidia, sobrepeso, uso de anticonceptivos por largos periodos de tiempo, número elevado de embarazos, entre otros<sup>5</sup>. No obstante, el principal factor de riesgo es la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Alrededor del 90% de las infecciones nuevas con VPH son eliminadas por el organismo, pero la reinfección constante con este virus aparece como un requisito para la progresión del cáncer cervical.

Los VPH son virus de DNA de doble cadena no envueltos pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*. Codifican para seis proteínas no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos proteínas estructurales (L1 y L2). El potencial oncogénico de los VPH recae en las oncoproteínas E6 y E7, debido a que inducen una proliferación aberrante y extendida de las células al alterar el ciclo celular y la apoptosis a través de la inactivación de la proteína pRB por E7 y de P53 por E6. Posteriormente, E6 activa la transcripción de hTERT desencadenando la inmortalización de las células. Finalmente, estas oncoproteínas en conjunto contribuyen a la progresión maligna mediante la inducción de anomalías mitóticas que resultan en una inestabilidad genómica (Figura 2)<sup>6</sup>.



**Figura 2. VPH en el desarrollo de cáncer cervical.**

Las oncoproteínas del VPH E6 y E7 contribuyen a los pasos iniciales y tardíos del desarrollo tumoral. Inicialmente E7 degrada a pRB, causando la entrada aberrante al ciclo celular, lo cual normalmente resultaría en la activación de p53 causando muerte celular, sin embargo, E6 degrada a p53 provocando una proliferación persistente. Además, para evadir la erosión de los telómeros que se ocasiona por la división celular extendida E6 activa la transcripción de hTERT causando inmortalización celular. Finalmente, estas oncoproteínas también generan inestabilidad genómica a través de la inducción de anomalías mitóticas contribuyendo a la progresión del tumor<sup>6</sup>.

A pesar de la capacidad oncogénica del VPH, la sola infección no es suficiente para inducir la formación de tumores, ya que no todas las mujeres infectadas por este virus desarrollan cáncer. Esto sugiere que deben existir otros mecanismos que desencadenen la transformación celular y la subsecuente formación del tumor. De acuerdo con esto diversos grupos de investigación han señalado a los microRNAs (miRNAs) como moléculas implicadas en procesos de transformación celular.

### 3.2 MicroRNAs (miRNAs)

Los miRNAs son RNAs pequeños de doble cadena que regulan negativamente la expresión génica a nivel post-transcripcional, son parte de la mayoría de los procesos biológicos hasta ahora descritos, incluyendo crecimiento celular, proliferación, diferenciación, metabolismo y desarrollo<sup>7,8</sup>. Estas moléculas tienen una longitud de 21-25 pares de bases y son producidas por transcripciones endógenas en forma de horquilla. Se encuentran localizados dentro de diversos contextos genómicos donde aproximadamente el 50% de los miRNAs tienen su propio promotor<sup>9</sup>. La otra mitad se encuentran en intrones de transcritos codificantes o no codificantes y algunos otros están codificados en regiones exónicas<sup>10,11</sup>.

La biogénesis de miRNAs comienza con la transcripción de un miRNA primario denominado pri-miRNA, generalmente producida por la RNA polimerasa II, que es controlada por los factores de transcripción que están asociados a la polimerasa y por reguladores epigenéticos<sup>12</sup> (Figura 3). El pri-miRNA puede medir hasta miles de nucleótidos y contiene una estructura de tallo-burbuja en donde se encuentran embebidas las secuencias del miRNA maduro<sup>13</sup>. Un pri-miRNA típico consiste en un tallo de 33-35 pb, un bucle terminal y segmentos de RNA de cadena sencilla en los extremos 5' y 3'<sup>14</sup>.

Una vez que el pri-miRNA es sintetizado, se escinde produciendo una estructura de tallo-burbuja más pequeña de aproximadamente 65 nucleótidos de longitud denominada pre-miRNA<sup>9</sup>. Esta reacción tiene lugar en el núcleo y se lleva a cabo por la ribonucleasa nuclear tipo III *Drosha*<sup>15</sup>. Este proceso de maduración requiere la participación de un cofactor llamado DGCR8 (también conocido como *Pasha* en *D. melanogaster*), que junto a *Drosha* forma un complejo denominado Microprocesador<sup>16</sup>. Este complejo corta el pri-miRNA a aproximadamente 11 pb de distancia de la base del tallo, y a aproximadamente 22 pb de distancia de la unión 'apical' conectada a un bucle terminal<sup>17</sup>. El corte realizado por *Drosha* es asimétrico, dejando dos bases salientes en el extremo 3' que define uno de los extremos de lo que será el miRNA maduro<sup>18</sup>. Cabe señalar que en los pri-miRNAs

intrónicos, no se utiliza el complejo Microprocesador. En su lugar, estos precursores usan la maquinaria de *splicing* y por tanto no son cortados por *Drosha*<sup>19</sup>.

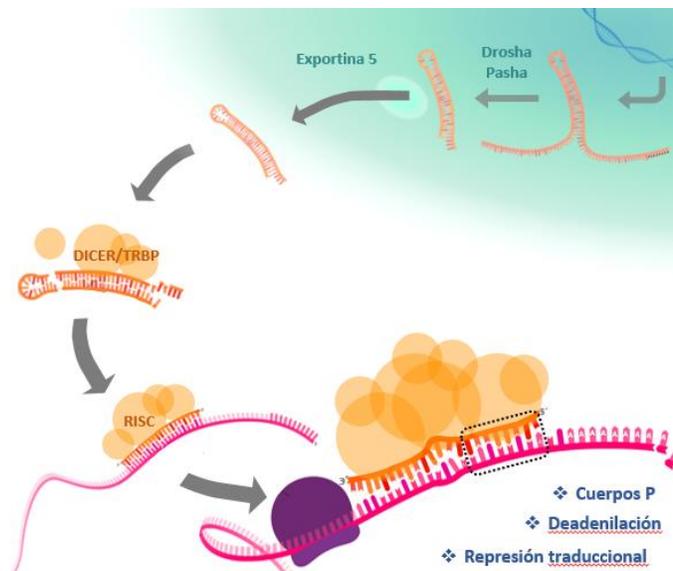
La eficiencia del procesamiento mediado por *Drosha* es crucial para determinar la abundancia de miRNAs. Existen múltiples mecanismos para controlar el nivel de expresión, actividad y especificidad de *Drosha*. Un ejemplo notable es la autorregulación entre *Drosha* y DGCR8. DGCR8 estabiliza *Drosha* a través de interacciones proteína-proteína, mientras que *Drosha* desestabiliza el mRNA de DGCR8 al cortarlo en una horquilla del segundo exón<sup>20</sup>. Asimismo, la modificación post-traducciona puede regular la estabilidad de la proteína, la localización nuclear y procesamiento, por ejemplo, la acetilación de *Drosha* inhibe su degradación y la estabiliza<sup>14</sup>.

Después del procesamiento por *Drosha*, el pre-miRNA es exportado al citoplasma, donde se completa la maduración. La proteína Exportina 5 es la encargada de llevar al pre-miRNA al citoplasma. La Exportina 5 forma un complejo de transporte con proteína nuclear de unión a RAN • GTP y el pre-miRNA<sup>21</sup>. Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es sometido a un segundo paso de procesamiento mediado por otra ribonucleasa tipo III, denominada *Dicer*, la cual se une al pre-miRNA al extremo saliente del pre-miRNA<sup>22</sup>. Los sitios de escisión de *Dicer* están situados a una distancia fija del extremo 3' del RNA de doble cadena, esta distancia es típicamente de 21-25 nucleótidos de longitud y depende de la especie y el tipo de *Dicer*<sup>23</sup>. El corte provoca la remoción de la horquilla del pre-miRNA generando un RNA de doble cadena (dsRNA) imperfecto de 22 nucleótidos de longitud que lleva 2 bases salientes en cada extremo 3'<sup>24</sup>.

Los dsRNA resultantes son incorporados a un complejo de proteínas denominado RISC (RNA-induced silencing complex), este complejo está formado principalmente por *Dicer*, TRBP/D2R2 y Argonauta (Ago)<sup>25</sup>. La proteína TRBP se une a la cadena dúplex de RNA y esto a su vez recluta a la proteína Argonauta (Ago2 en mamíferos), la cual es el componente principal del complejo RISC<sup>26</sup>. El papel del complejo RISC es seleccionar y reclutar la cadena de ARN que tiene la más baja estabilidad termodinámica en su extremo 5' (denominada cadena guía)<sup>27</sup>. Una vez seleccionada la cadena guía, Ago2

reconoce al extremo 3' de la cadena guía cortando a la cadena antisentido, favoreciendo su eliminación<sup>28</sup>.

Después de este proceso la cadena incorporada a RISC se emplea como guía para la identificación de los mRNAs blanco que deben ser silenciados. El reconocimiento de estos mRNAs blanco se basa en el apareamiento de bases entre la cadena incorporada al complejo RISC con secuencias localizadas generalmente en el extremo 3'UTR<sup>29</sup> o rara vez en el extremo 5'UTR de los mRNA blanco<sup>30</sup>. El grado de complementariedad miRNA:mRNA determina el mecanismo de silenciamiento<sup>31</sup>. Un apareamiento perfecto miRNA:mRNA provocará el corte endonucleolítico y degradación del transcrito blanco, mientras que un apareamiento imperfecto provocará el secuestro del mRNA evitando su traducción pero sin degradarlo.



### Figura 3. Biogénesis de los miRNAs: Vía canónica.

Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II dando origen al pri-miRNA. Este es reconocido y procesado por *Drosha/Pasha* generando una horquilla conocida como pre-miRNA. Esta horquilla es exportada al citoplasma por la exportina 5 donde es sometida por un segundo paso de procesamiento mediado por *Dicer/TRBP* generando un dúplex de RNA. Posteriormente una de las cadenas será seleccionada por el complejo RISC y será utilizada como guía para el reconocimiento de los transcritos blanco donde la unión mediará su silenciamiento.

### 3.3 Cáncer, cáncer cervical y miRNAs

Todos los tipos de cáncer siguen una serie de pasos consecutivos similar al sistema de progresión tumoral anteriormente descrito para el cáncer cervical, donde células normales experimentan cambios genéticos que provocan su progresión de estados pre-malignos (iniciación) a cáncer invasivo (progresión) el cual puede propagarse por todo el cuerpo (metástasis). Las células cancerosas son capaces de proliferar independientemente de las señales de crecimiento, carecen de respuesta a señales inhibitorias de crecimiento, evaden las vías de muerte celular programada (apoptosis), superan los límites intrínsecos de replicación celular y el sistema inmune del huésped es incapaz de identificar y eliminar adecuadamente este tipo de células<sup>32</sup>. Estas excepcionales capacidades se derivan de la desregulación de genes involucrados en proliferación, diferenciación y apoptosis, particularmente los genes ligados al desarrollo de cáncer se denominan oncogenes o supresores de tumor<sup>33</sup>.

Por otro lado, los miRNAs regulan la expresión génica de genes implicados en la mayoría de los procesos celulares; como proliferación y diferenciación celular, desarrollo, metabolismo, apoptosis, entre otros. Debido a la amplia participación de los miRNAs en procesos celulares fundamentales, su desregulación se ve implicada en diversas patologías, incluyendo cáncer, donde algunos miRNAs actúan como supresores de tumor, mientras que otros funcionan como oncogenes cuando son aberrantemente sobre-expresados, ya que promueven la iniciación tumoral, el crecimiento y/o progresión a la metástasis<sup>34,35</sup>.

Los mecanismos responsables de la desregulación de miRNAs en el cáncer son numerosos y variados, ya que las células cancerosas parecen capaces de manipular casi cada paso de la ruta de la biogénesis de miRNAs para promover la expresión desregulada<sup>35</sup>, además de que muchos miRNAs se localizan en sitios frágiles o en otras regiones genómicas que están sujetas a mutación, delección, amplificación o translocación en cáncer<sup>36</sup>.

El aumento de la transcripción de los miRNAs oncogénicos, por ejemplo la activación del grupo miR-17-92 por MYC, puede promover el cáncer<sup>37</sup>. Asimismo, la ausencia de miR15a/16 se asocia con una pérdida de regulación que resulta en niveles elevados de proteína BCL2 la cual es una proteína antiapoptótica<sup>38</sup>.

Se ha demostrado que el perfil de expresión de miRNAs depende del tipo de cáncer y estadio por lo cual se pueden utilizar como marcadores para diagnóstico y pronóstico de diferentes tipos de cáncer. En el caso particular de cáncer cervical, en una revisión escrita por Barbara Pardini y colaboradores, señalan que diferentes grupos de investigación han reportado a miR-21, miR-10a, miR-20b, miR-9, miR-15b, entre otros, como miRNAs sobre-expresados en lesiones precursoras y en el tumor completamente formado. Por otro lado, también reportan que miR-218, miR-99a, miR-29a, miR-125b, miR-125a y miR-34a se encuentran pobremente expresados en lesiones precursoras, así como también en tumores invasivos<sup>39</sup>.

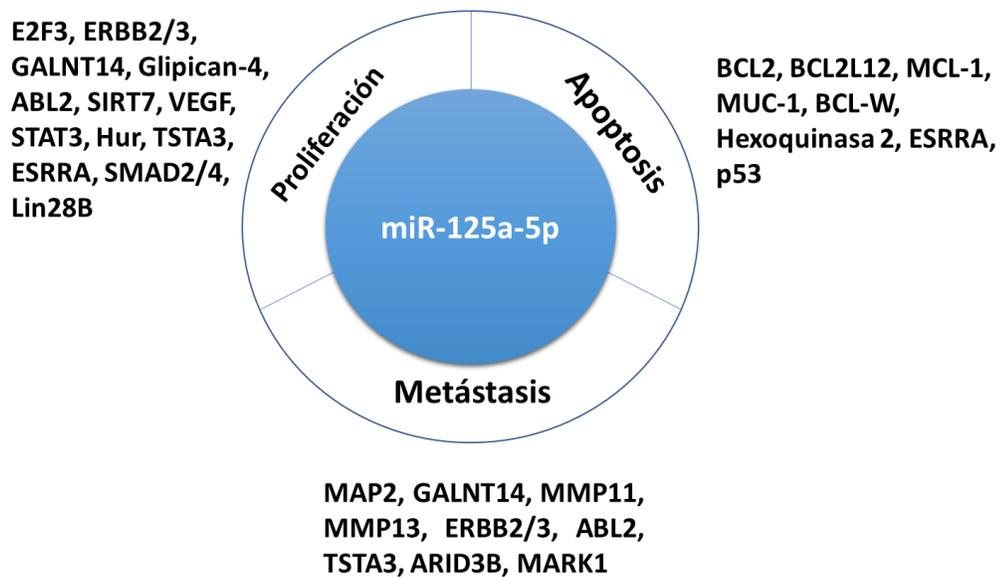
### **3.4 miR-125a-5p**

La desregulación del miR-125a-5p se encuentra involucrada en una amplia variedad de carcinomas y otras enfermedades. El miR-125a-5p se transcribe en forma policistónica (en conjunto con miR-99 y let-7e), a partir del locus 19q13<sup>40,41</sup>. Funcionalmente, se encuentra involucrado en procesos celulares como diferenciación celular, proliferación y apoptosis mediante la interacción con diferentes factores de transcripción, metaloproteinasas de matriz<sup>42</sup>, factores de crecimiento<sup>43</sup> y otras moléculas.

En el contexto del cáncer el miR-125a-5p puede actuar como un supresor de tumor en varios tipos de cáncer. Varios estudios señalan que inhibe la tumorigénesis a través de la interacción con diversos genes blanco. Por una parte, inhibe la proliferación celular al tener como blanco a E2F3<sup>44</sup>, ERBB2/3<sup>45</sup>, SIRT7<sup>46</sup>, VEGF<sup>47</sup>, STAT3, Hur<sup>48</sup>, TSTA3<sup>49</sup>, ESRR<sup>50</sup>, LIN28B<sup>51</sup>, entre otros. Por otro lado afecta la metástasis al tener como blanco a ABL2<sup>52</sup>, MAP2<sup>53</sup>, GALNT14<sup>54</sup>, MMP11<sup>53</sup>, MMP13<sup>53</sup>, TSTA3<sup>49</sup>. Además, tiene implicación en la apoptosis ya que tiene como blanco genes anti-apoptóticos como BCL2, BCL2L12, MCL-1, MUC-1<sup>55</sup>, BCL-W<sup>56</sup>, Hexoquinasa 2<sup>57</sup> (Figura 4). En contraste, miR-125a-5p también

puede actuar como oncogén. En carcinoma urotelial, miR-125a-5p favorece la capacidad de invasión de las células y se encuentra sobre-expresado en células basales de carcinoma comparado contra células sanas adyacentes<sup>58</sup>.

En el caso de cáncer cervical, miR-125a-5p se ha encontrado disminuido en tejido maligno en comparación con el tejido adyacente sano de pacientes con tumor cervical. Se ha reportado a miR-125a-5p como supresor de tumor en cáncer cervical ya que regula al gen STAT3 el cual potencia proliferación e inhibe la apoptosis<sup>59</sup>, también regula al gen ABL2 implicado en el re-arreglo del esqueleto, por lo cual se encuentra asociado a migración<sup>52</sup>. Por otra parte, en nuestro grupo de trabajo se encontró que el miR-125a-5p trabaja como un oncogén al regular a MARK1 promoviendo así la migración celular<sup>60</sup>, asimismo se observó que inhibe la proliferación celular.



**Figura 4. Blancos validados de miR-125a-5p.**

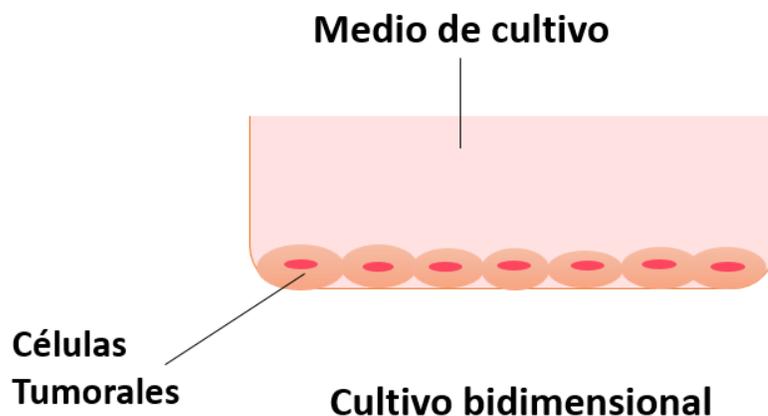
Genes blanco de miR-125a-5p implicados en procesos biológicos que tienen que ver con el desarrollo de cáncer; proliferación celular, apoptosis y metástasis.

### 3.5 Cultivos tridimensionales en cáncer

El microambiente tumoral tiene una fuerte influencia en el crecimiento de las células cancerosas, la movilidad y la expresión génica<sup>61</sup>. Este microambiente comprende la

matriz extracelular, factores de crecimiento, citocinas, oxígeno y la vasculatura, así como las células que proporcionan dichos factores, tales como fibroblastos, células adyacentes de tumor y/o células normales<sup>62</sup>.

Muchos modelos *in vitro* han sido desarrollados en un intento de imitar la complejidad del microambiente tumoral<sup>63</sup>. Sin embargo, en la mayoría de estos modelos, las células tumorales se cultivan en monocapa, es decir, en dos dimensiones (2D). Estos cultivos bidimensionales reflejan pobremente el comportamiento celular *in vivo*, ya que las células al estar adheridas a una superficie de plástico son incapaces de organizarse en estructuras similares a los tejidos de procedencia (Figura 5). Se ha demostrado que las células cultivadas bidimensionalmente difieren morfológica y fisiológicamente de las células de un tejido *in vivo*, y que la morfología anormal conferida por los cultivos bidimensionales influye en muchos procesos celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación, apoptosis, expresión de genes y de proteínas, obstaculizado así los estudios sobre los procesos tumorales.



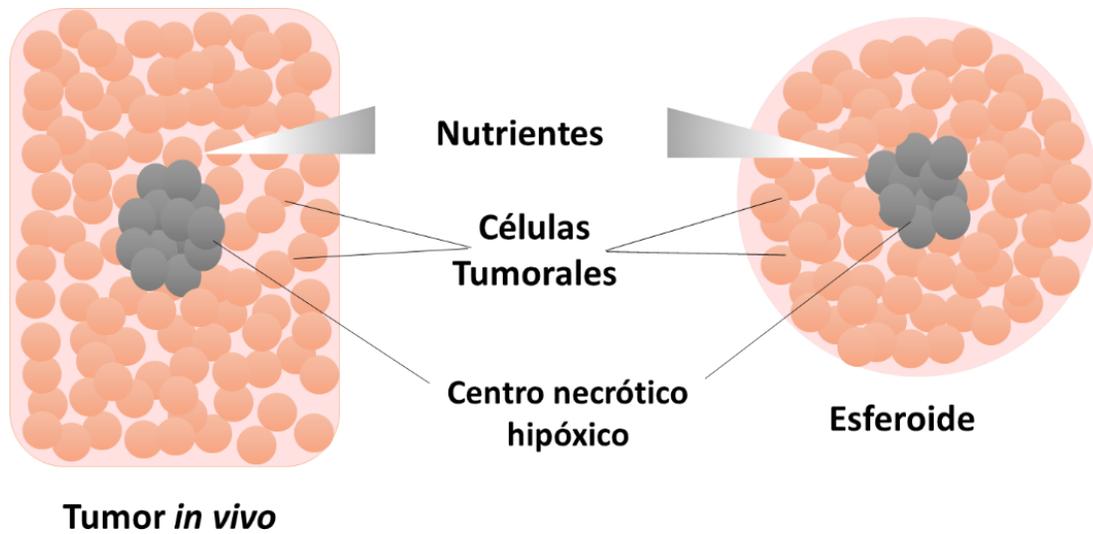
**Figura 5. Representación de un cultivo bidimensional.**

En el modelo de cultivo bidimensional las células son adheridas a una superficie plana generando una monocapa. A estas células en monocapa se les agrega de manera uniforme el medio de cultivo que lleva los nutrientes y factores de crecimiento, recibiendo así todas las células la misma cantidad de nutrientes, por lo que la mayoría de las células en este modelo de cultivo son altamente proliferativas.

La estructura tridimensional (3D) de los tumores y el microambiente circundante dentro y fuera de ellos es importante debido a que los procesos tumorales se ven afectados por

la estructuración celular, por ello el desarrollo de los cultivos tridimensionales (3D) ha sido revolucionario para el estudio de los tumores. Este tipo de cultivo permite mimetizar de mejor manera los tumores *in vivo*, ya que en este modelo las células tumorales establecen interacciones célula-célula y células-ECM, que son elementos importantes en la señalización tumoral y que modulan la respuesta tumoral<sup>64</sup>. Además, se pueden ver reflejadas otras características tumorales en los diferentes tipos de cultivo tridimensional. De acuerdo a esto, múltiples grupos de investigación han demostrado que el crecimiento de células en tercera dimensión, utilizando diversas metodologías, puede imitar muchos aspectos fisiológicos *in vivo* de mejor manera que las células cultivadas en monocapa<sup>65</sup>.

A través de los años se han generado diferentes métodos de cultivo tridimensional, como los explantes de tejidos u órganos, los microtransportadores, biorreactores de microgravedad, sistemas de matriz en gel, cultivo de una balsa epitelial, masas esferoidales de células, etc<sup>66</sup>. Sin embargo, un tipo de cultivo tridimensional ampliamente utilizado por ser un modelo sencillo y altamente reproducible son los esferoides. Éstos se forman en suspensión gracias a que las células tumorales tienden a agregarse entre sí de modo que la morfología celular se asemeja de mejor manera al tejido de procedencia. Los esferoides están conformados por capas formadas por células en diversas etapas; células altamente proliferativas, células quiescentes, apoptóticas, hipóxicas y necróticas<sup>67</sup>. Estas capas de células en diferentes etapas, también presentes en el tumor *in vivo*, se forman por un gradiente de nutrientes donde la capa externa está altamente expuesta al medio con nutrientes, es por ello que las células de esta capa son proliferativas, mientras que las células más al centro reciben menos oxígeno, factores de crecimiento y nutrientes del medio, por lo cual tienden a estar en reposo o estado hipóxico (Figura 6). Esto no se puede reflejar en el cultivo bidimensional ya que los nutrientes y factores de crecimiento se reciben de manera homogénea por todas las células, esto provoca que la monocapa esté compuesta mayormente por células en proliferación, además las células muertas usualmente se despegan de la superficie y son removidas en los cambios de medio.



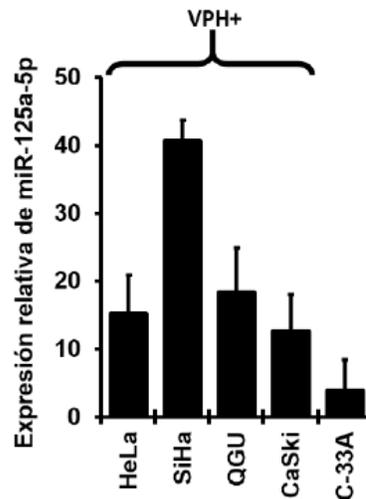
**Figura 6. Representación de un tumor *in vivo* y el modelo tridimensional esferoidal.**

El modelo tridimensional en esferoides tiene gran similitud estructural con un tumor *in vivo*, ya que las interacciones celulares tanto el esferoide como en tumor *in vivo* son similares, asimismo, existe un gradiente de nutrientes en ambos lo que genera capas que contienen células en diferentes estadios.

## 4. ANTECEDENTES

Se ha demostrado que miR-125a-5p funciona como supresor de tumor y se ha encontrado disminuido en muchos tumores incluyendo cáncer de ovario<sup>68</sup>, de vejiga, de mama<sup>69,70</sup> hepático<sup>42</sup>, melanoma<sup>71</sup>, carcinoma cutáneo de células escamosas<sup>72</sup>, osteosarcoma<sup>73</sup>, cáncer de pulmón<sup>74</sup>, de cérvix<sup>59</sup>, entre otros.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo se determinaron los niveles de expresión de miR-125a-5p en un panel de células tumorales cervicales (HeLa, SiHa, QGU, C-33A y CaSki), observándose que la expresión de miR-125a-5p es diferente entre cada línea celular. Además, se observó que miR-125a-5p presenta una mayor expresión en las células tumorales VPH positivas (HeLa, SiHa, QGU y CaSki) (Figura 7).

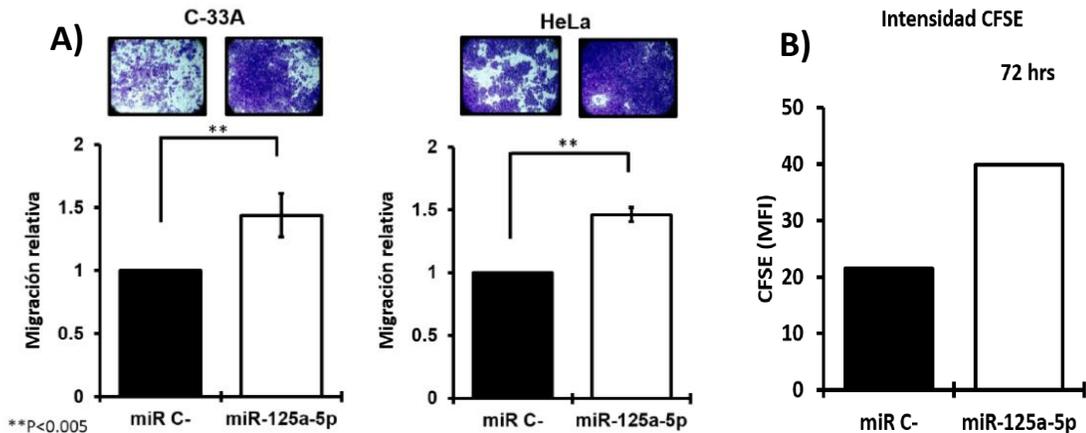


**Figura 7 Perfil de expresión de miR-125a-5p en líneas derivadas de cáncer cérvico uterino.**

Expresión del miR-125a-5p en líneas celulares derivadas de cáncer cervical, la expresión se determinó mediante RT-qPCR a partir de extractos de RNA pequeño <200 pb de las.

En este mismo estudio realizado por la Dra. Natalia Martínez Acuña, se llevaron a cabo ensayos de ganancia de función para caracterizar la función del miR-125a-5p en diversos procesos celulares asociados a cáncer. Por un lado, mediante el uso de cámaras de Boyden se evaluó la capacidad migratoria de las células HeLa y C-33A al sobre-expresar miR-125a-5p, encontrándose que miR-125a-5p provoca un aumento de manera significativa en la capacidad migratoria de las células transfectadas (Figura 8A)<sup>60</sup>. Por otra

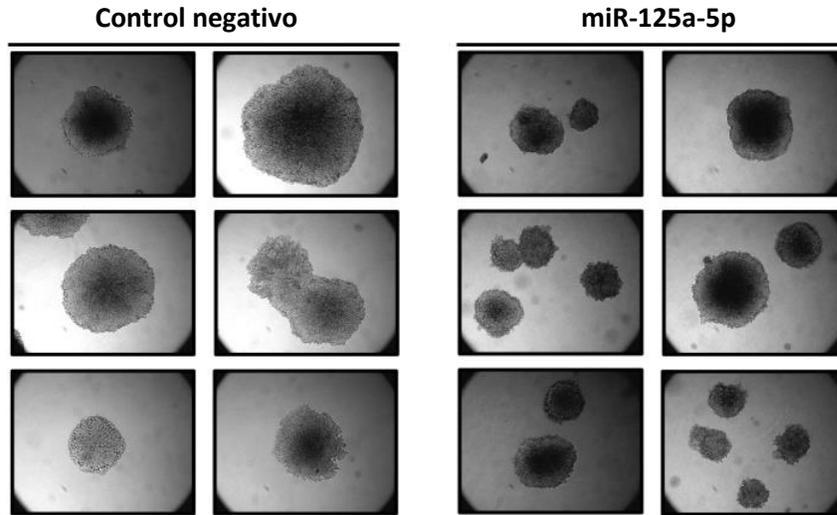
parte, se evaluó la proliferación de las células HeLa al sobre-expresarse miR-125a-5p mediante la tinción con Carboxi-Fluorescein-Succinidil-Ester (CFSE). La sobre-expresión del miR-125a-5p ocasionó una disminución en la proliferación de las células HeLa que sobre-expresan miR-125a-5p a las 72 h post-transfección (Figura 8B)<sup>53</sup>.



**Figura 8. Efecto de miR-125a-5p en la proliferación y migración celular.**

**A)** Células HeLa y C33-A fueron transfectadas con una dosis de 60nM del precursor sintético de miR-125a-5p. Las células que migraron fueron fijadas y teñidas con cristal violeta y visualizadas bajo el microscopio con el objetivo 10X. Después de ser teñidas, las membranas completas fueron escaneadas para su análisis por densitometría. Campos representativos (panel superior) y densitometría expresada en veces de cambio con relación al control (panel inferior). Valores promedio  $\pm$  DS. n=3. **B)** Análisis de la proliferación de células HeLa que sobre-expresan miR-125a-5p mediante tinción con CFSE, se muestra graficado el índice de fluorescencia media (MFI) de cada tratamiento a las 72 h.

Otra de las características que se evaluó en el mismo trabajo, fue el crecimiento independiente de anclaje ya que es un indicativo de la capacidad de las células para generar tumores. Se realizó un ensayo de formación de colonias en agar suave también en células HeLa. En este caso, la transfección con el miR-125a-5p ocasionó un aumento en el número de colonias por pozo. Sin embargo, al observar estas colonias bajo el microscopio se vio que el tamaño era menor en comparación con las colonias desarrolladas por las células transfectadas con el control negativo (Figura 9)<sup>53</sup>. Este efecto es consistente con la disminución en la tasa proliferativa vista en los experimentos de proliferación.



**Figura 9. Efecto de miR-125a-5p en el crecimiento independiente de anclaje mediante la técnica de agar suave.**

Sin embargo, existe un problema fundamental en los ensayos de agar suave ya que carecen de relevancia fisiológica para el estudio del cáncer, debido a que el ensayo es lento, laborioso, impreciso, inconsistente debido a definiciones subjetivas de colonias, y no es adecuado para ensayos de alto rendimiento.

En comparación, otros modelos de cultivo tridimensional como los esferoides, los cuales muestran un gran número de características que conllevan a la supervivencia de un tumor, son modelos más confiables para estudiar la biología de los tumores ya que el ensayo es sencillo y rápido de realizar lo que hace que sea fácil de reproducir y sea adecuado para ensayos de alto rendimiento a diferencia de los ensayos en agar suave.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Diversos grupos de investigación han demostrado que miR-125a-5p se encuentra disminuido en cáncer cervical. En nuestro grupo de trabajo encontramos que el miR-125a-5p inhibe la proliferación de las células tumorales cervicales, mientras que potencia la capacidad migratoria de estas mismas células. De acuerdo con estos resultados el miR-125a-5p parece poseer una dualidad en sus funciones, actuando como supresor de tumor al inhibir la proliferación celular, y a la vez, como oncogén al potenciar la capacidad de la migración celular, por lo cual no se ha podido esclarecer el papel de este miRNA en el cáncer cervical.

Cabe señalar que los resultados de la caracterización funcional del miR-125a-5p obtenidos por nuestro grupo de trabajo fueron realizados en células cultivadas de manera bidimensional. Sin embargo, un cultivo bidimensional no refleja de manera adecuada un tumor *in vivo* ya que las células al estar ancladas a una superficie pierden diversas características importantes para el fenotipo tumoral. Por lo tanto, si el cultivo tridimensional refleja de mejor manera un tumor *in vivo* este modelo nos dará una idea más acertada de la función del miR-125a-5p en las células tumorales cervicales.

## **6. HIPÓTESIS**

La sobre-expresión del miR-125a-5p en células derivadas de cáncer cervical disminuirá el crecimiento tumoral y la viabilidad de estas células cultivadas en un modelo tridimensional.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo General**

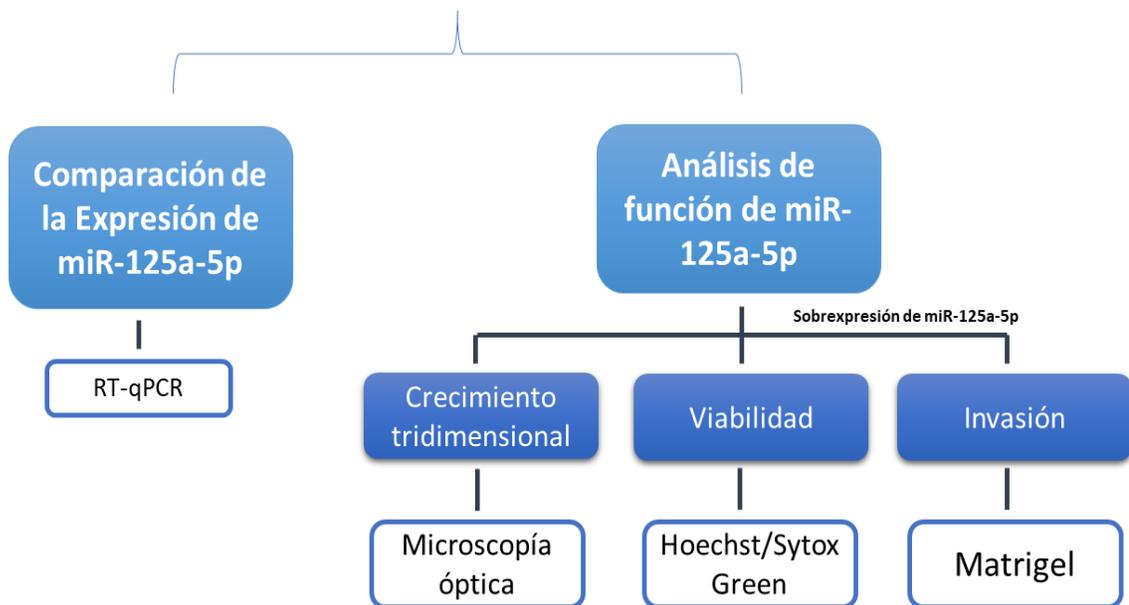
Caracterizar la función del miR-125a-5p en líneas celulares derivadas de cáncer cervical cultivadas en el modelo tridimensional de esferoides.

### **7.2 Objetivos Particulares**

1. Comparar los niveles endógenos de miR-125a-5p en cultivos bidimensionales y tridimensionales de células tumorales.
2. Evaluar el crecimiento tridimensional de células tumorales cervicales que sobre-expresan miR-125a-5p.
3. Evaluar el efecto de la sobre-expresión de miR-125a-5p en la viabilidad de cultivos tridimensionales y bidimensionales.

## 8. DISEÑO EXPERIMENTAL

### Cultivo Bidimensional y tridimensional de células tumorales cervicales



## **9. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **9.1 Cultivo Celular**

Se utilizaron las líneas celulares HeLa y CaSki, las cuales derivan de carcinoma de cérvix Humano, las líneas celulares fueron cultivadas de manera bidimensional (Monocapa o 2D) en cajas Petri, el cultivo tridimensional (3D) en esferoides se llevó a cabo en placas Ultra-Low Attachment Surface Corning® de 96 pozos de fondo redondo, donde las células HeLa y CaSki se sembraron a una densidad de 300 y 1200 células por pozo respectivamente. En ambos modelos de cultivo celular se utilizó medio DMEM, suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina y 10 mg/ml de gentamicina, las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **9.2 Transfección de las líneas celulares**

Para cultivos tridimensionales, se realizaron mezclas de Lipofectamine®RNAiMAX-siRNAs, la concentración de siRNA utilizada fue de 60 nM tanto con miR-125a-5p como con los respectivos controles, del reactivo Lipofectamine®RNAiMAX se adiciono .075 µl por reacción, esta mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 300 células en suspensión por pozo a la placa Ultra-Low Attachment Surface Corning® de 96 pozos de fondo redondo, finalmente se le agregó el complejo de Lipofectamine® RNAiMAX:siRNA a las células en suspensión, dando un volumen final de 100 µl por pozo. Para la transfección de cultivo bidimensional (Directa) células HeLa fueron cultivadas en el sistema Lab-Tek® Chamber Slide™ especializado para microscopía, se sembraron a una densidad de 1000 células por 200 µl de DMEM por cada pozo, al siguiente día se prosiguió con la transfección del miR-125a-5p o los controles, se realizó la misma mezcla de Lipofectamine®RNAiMAX-siRNAs descrita anteriormente y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente, por último, la mezcla se agregó a las células HeLa sembradas, dando un volumen final de 250 µl por pozo.

### **9.3 Evaluación del crecimiento tridimensional**

Células HeLa y CaSki fueron cultivadas tridimensionalmente y transfectadas de manera reversa como se describió anteriormente, se tomaron fotografías de los esferoides en campo claro mediante un microscopio invertido, a los días 3, 5 y 7 post-transfección, finalmente el área de los esferoides fue analizada mediante el software ImageJ<sup>75</sup>.

### **9.4 Viabilidad celular**

Cultivos 2D y 3D de células HeLa fueron transfectados como se describió anteriormente, al día 3 y 4 post-transfección respectivamente se realizó la co-tinción Hoechst/Sytox Green y se dejó teñir por 24 h. La tinción se observó mediante microscopía de epifluorescencia y la intensidad de la fluorescencia fue analizada mediante el software ImageJ. Para determinar la viabilidad de las células la intensidad de Sytox Green fue restada a la de Hoechst, obteniendo la fluorescencia de las células vivas<sup>76</sup>.

### **9.5 Extracción de RNA total**

Se realizaron cultivos 2D y 3D de células HeLa y CaSki, el RNA total de estos cultivos fue extraído con Trizol Reagent de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la extracción de RNA de los cultivos 3D fue necesario realizar un pool de esferoides para obtener suficiente cantidad de RNA, para ello 12 esferoides formados por 2400 y 7200 células de HeLa y CaSki respectivamente fueron recolectados 3 días post-cultivo, los esferoides fueron centrifugados para remover el medio y se adicionó 500 µl del reactivo Trizol, finalmente se procedió a la extracción del RNA como indica el fabricante. La cuantificación del RNA extraído se llevó a cabo con el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para verificar la integridad de RNA extraído este se corrió en un gel de agarosa al 1%, identificándose las bandas 28S y 18S.

### **9.6 RT-PCR en Tiempo Real (RT-qPCR) y cebadores**

El análisis de la expresión endógena de miR-125a-5p se realizó mediante RT-qPCR basada en SYBR Green® (Invitrogen™). Primero se realizó la retrotranscripción del miR-125a-5p, para ello se emplearon 100 ng del RNA extraído y la reacción se llevó a cabo mediante el

kit comercial SuperScript™ III siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación y detección del miR-125a-5p mediante qPCR se utilizó el kit comercial *Maxima SYBR Green/ROX* qPCR. El ciclaje de temperaturas fue realizado en un termociclador Gene-Rotor 3000 (Corbett Research). Los cebadores empleados fueron diseñados por la Dra. Natalia Martínez Acuña, para normalizar los niveles de expresión se utilizó el snRNA U6 como gen de referencia (Tabla 1). Las temperaturas utilizadas en los ciclos de amplificadas fueron las siguientes: **Retrotranscripción** [16°C/5'; 42°C/30'; 95°C/5'] **qPCR**: [50°C/2'; 95°C/10'; 95°C/15"; 60°C/60"] por 40 ciclos. La cuantificación se realizó mediante el método comparativo del  $2^{-\Delta Ct}$  normalizando los valores contra el snRNA U6, utilizando la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ gen blanco})-(Ct \text{ gen de referencia})}$$

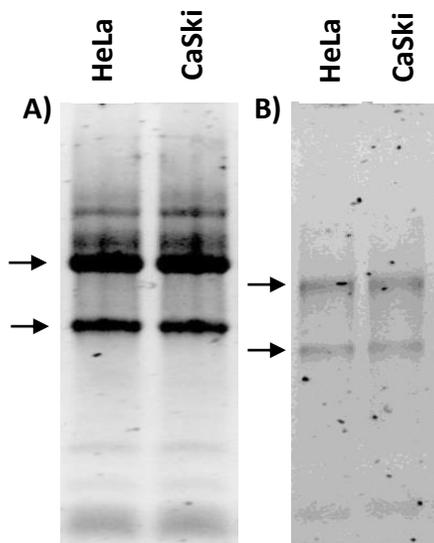
**Tabla 1.** Cebadores utilizados para la amplificación del miR-125a-5p y del gen de referencia U6

<b>Gen</b>	<b>RT</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>miR-125a-5p</b>	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT CAC AGG TTA AA-3'	5'-CTA TAG GGA GAA GAG TCC CTG AGA CCC-3'	5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
<b>U6</b>	5'-AAA ATA TGG AAC GCT TCA CGA ATT TG-3'	5'-CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT-3'	5'-ACG CTT CAC GAA TTT GCG TGT C-3'

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Perfil de expresión del miR-125a-5p en células tumorales cervicales cultivadas de manera bidimensional y tridimensional

Con el fin de determinar si el miR-125a-5p se expresa diferencialmente entre los modelos de cultivo celular 2D y 3D la expresión del miR-125a-5p se cuantificó a partir de extractos de RNA total de células HeLa y CaSki cultivadas en ambos modelos mediante RT-qPCR basada en SYBR Green. Primero se determinó la integridad y pureza del RNA obtenido, la integridad se comprobó en base a la presencia de las bandas de los rRNA 18S y 28S en gel de agarosa 1% (Figura 10), mientras que su pureza fue evaluada con la proporción de absorbancia 260/280 nm (Tabla 2).



**Figura 10. Integridad del RNA extraído.**

**A)** Gel de agarosa representativo que muestra la integridad del RNA aislado de cultivos bidimensionales HeLa y CaSki **B)** Gel de agarosa del RNA obtenido de cultivos tridimensionales. Las flechas indican las migraciones relativas del rRNA 18S y 28S.

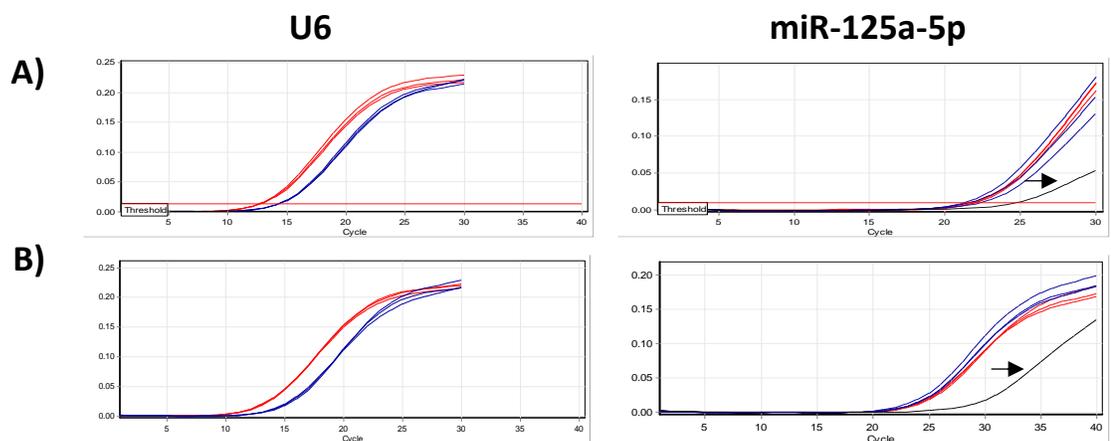
Línea Celular	A260/A280
HeLa Bidimensional	2.02
HeLa Tridimensional	1.94
CaSki Bidimensional	2
CaSki Tridimensional	2

**Tabla 2. Pureza del RNA extraído.**

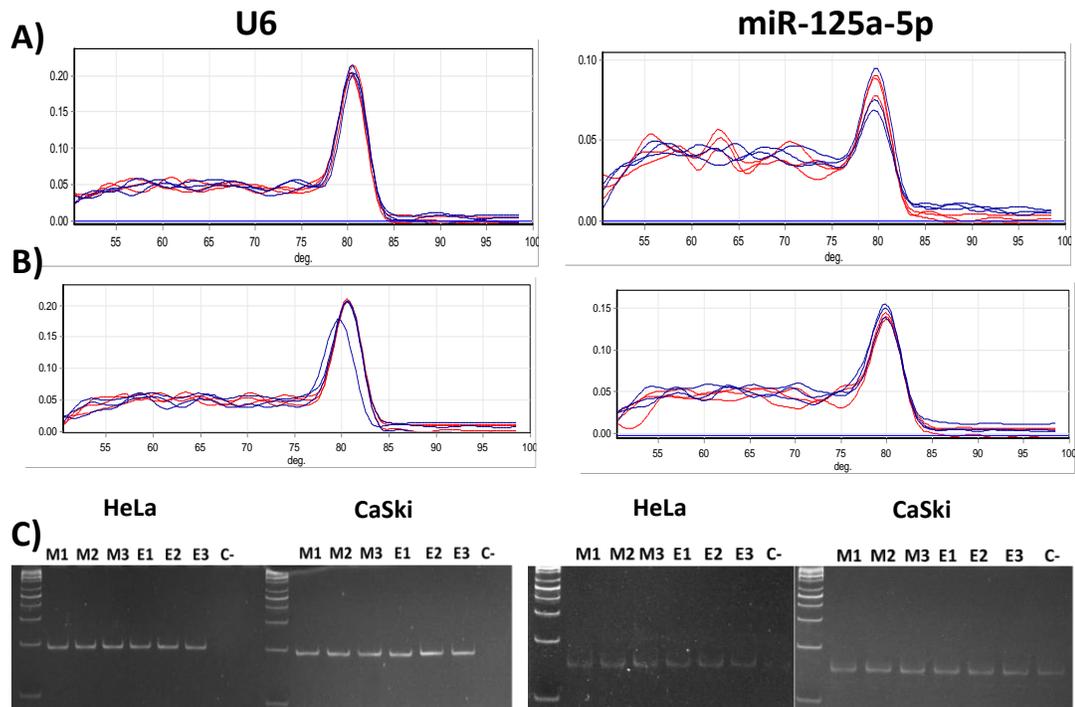
Relación de absorbancia 260/280 del RNA extraído de cultivos bidimensionales y tridimensionales de las células. HeLa y CaSki

Posteriormente, se procedió al análisis de expresión del miR-125a-5p en las líneas celulares HeLa y CaSki cultivadas en ambos modelos. Las curvas de amplificación del gen

snRNA U6 (gen de referencia) y del miR-125a-5p (gen blanco) son mostradas en la (Figura 11). En las imágenes se puede observar un solapamiento de las curvas de amplificación correspondientes a ambos modelos de cultivo de las líneas celulares evaluadas, lo que nos indica que en todas las reacciones la cantidad de RNA blanco añadido es muy semejante. De esta manera, aseguramos que aquella variación de expresión del gen a evaluar en los modelos de cultivo se debe a diferencias en el nivel de expresión y no se trata de un error de carga. El control negativo de amplificación es una reacción sin RNA, esto para determinar si los cebadores generan dímeros, los cuales al ser de doble cadena serán detectados artefactualmente por SYBR Green pudiendo afectar la cuantificación. A pesar de obtener una curva de amplificación en tales controles, los dímeros artefactuales aparecen 10 ciclos después del despegue de las curvas de interés, por lo que no afectan la cuantificación. Por otra parte, el análisis de fusión de DNA mostró la especificidad de la reacción ya que se obtuvo un único pico en todas las reacciones (Figura 12A y 12B). Los resultados de especificidad se corroboraron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 19:1 al 8% donde se observó una única banda de amplificación en 100 pb en el caso del gen de referencia U6 y de 68 pb del miR-125a-5p (Figura 12C).



**Figura 11. Curvas de amplificación por RT-qPCR.** A) Curvas de amplificación del gen de referencia U6 y del gen miR-125a-5p de cultivos bidimensionales (Curvas rojas) y tridimensionales (curvas azules) de células HeLa. B) Curvas de amplificación del gen de referencia U6 y del gen miR-125a-5p de cultivos bidimensionales (Curvas rojas) y tridimensionales (curvas azules) de células CaSki. Las flechas indican la curva del control negativo de amplificación, reflejando la producción de dímeros artefactuales.

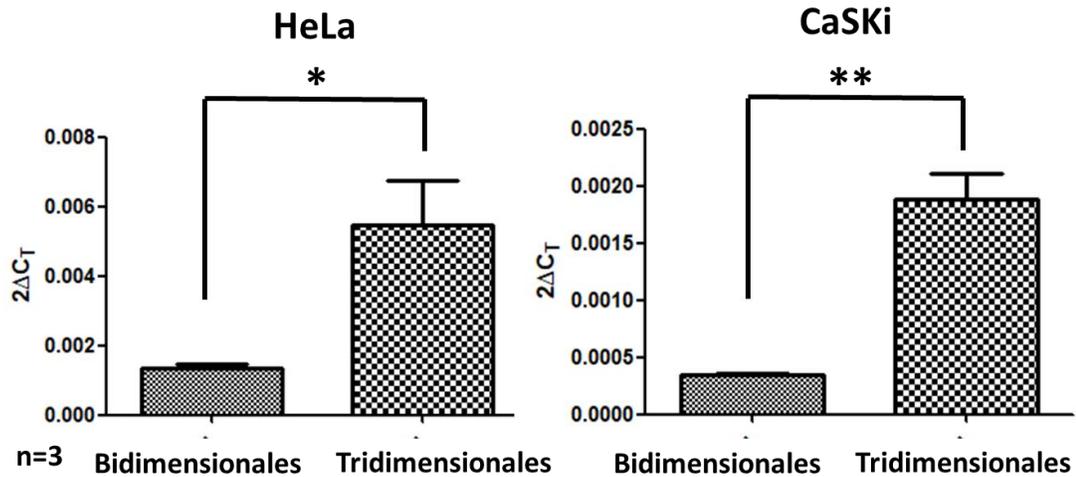


**Figura 12. Análisis de especificidad de la RT-qPCR.**

**A)** Análisis de fusión del gen de referencia U6 y del gen miR-125a-5p de cultivos 2D (Curvas rojas) y 3D (curvas azules) de células HeLa. **B)** Análisis de fusión del gen de referencia U6 y del gen miR-125a-5p de cultivos 2D (Curvas rojas) y tridimensionales (curvas azules) de células CaSki. **C)** Electroforesis en gel de poliacrilamida 19:1 al 8% de los productos de la reacción de RT-PCR arriba mostrados. Se muestra un único amplicón de 100 pb específico del snRNA U6 (derecha) y un único amplicón de 68 pb del miR-125a-5p (izquierda). M significa cultivo 2D y E cultivo 3D.

Se procedió a la cuantificación del miR-125a-5p en las líneas celulares cultivadas en ambos modelos de cultivo. El nivel de expresión promedio ( $n=3$ ) de las líneas celulares se muestra en la (Figura 13). En la gráfica se puede observar que la expresión miR-125a-5p es mayor en los cultivos tridimensionales que en los cultivos bidimensionales en ambos tipos celulares. El promedio de expresión de las células HeLa en el cultivo bidimensional es de  $1.36 \times 10^{-03}$ , mientras que el promedio de expresión obtenido en el cultivo tridimensional de HeLa es de  $5.48 \times 10^{-03}$  un valor 4 veces mayor que el obtenido en estas células cultivadas de manera bidimensional. Se observó algo similar en el caso de los cultivos de células CaSki, observándose una diferencia de 5 veces mayor en el promedio de expresión de las células cultivadas tridimensionalmente comparado con el cultivo bidimensional de células CaSki.

Con estos resultados, se sugiere que la expresión del miR-125a-5p es diferencial entre ambos modelos de cultivo, lo que indica que las células tumorales se comportan de manera diferente cuando son cultivadas en distintos modelos debido al microambiente distinto en el que se encuentran.



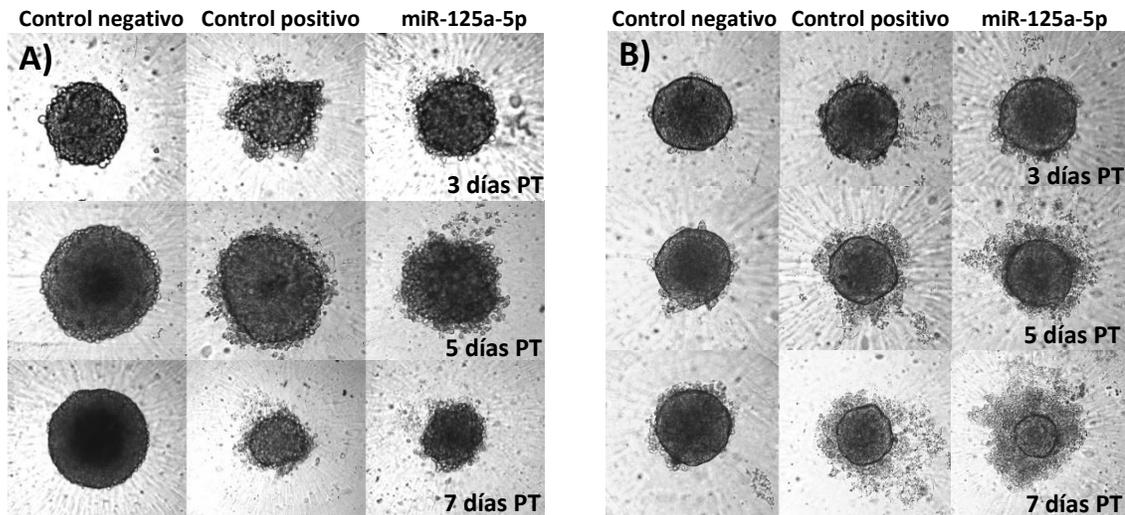
**Figura 13. Perfil de expresión de miR-125a-5p en cultivos bidimensionales y tridimensionales de las líneas celulares derivadas de cáncer cervical.**

Análisis realizado mediante RT-qPCR a partir de RNA total obtenido de células HeLa y CaSki en cultivos 2D y 3D. El nivel de expresión es mostrado en base al valor  $2^{-\Delta CT}$ , normalizando los valores contra el nivel del snRNA U6. La Prueba estadística realizada *t test* arrojó  $P < .05$  [\*  $P = 0.01$ ] y [**\*\***  $P = .0011$ ].

## 10.2 Efecto del miR-125a-5p en el crecimiento tridimensional de las células tumorales cervicales

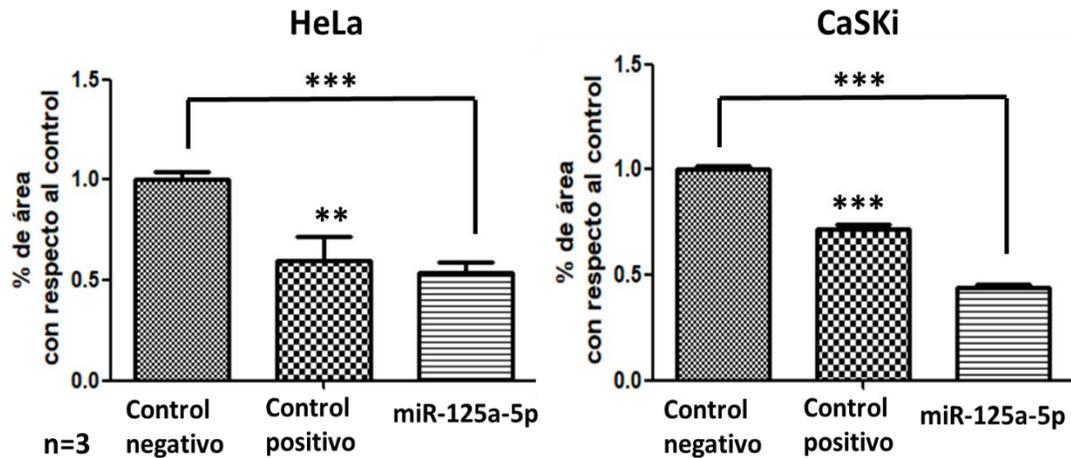
Con el propósito de evaluar el efecto del miR-125a-5p en el crecimiento tumoral, cultivos 3D de células HeLa y CaSki fueron transfectados con miR-125a-5p sintético, control positivo de transfección (*AllStars Hs Cell Death Control siRNA* de QIAGEN®), el cual consiste en una mezcla de siRNAs que provocan la muerte celular o bien con control negativo el cual es una mezcla de siRNAs irrelevantes, que no tienen como blanco ningún gen humano (Scramble). El crecimiento tridimensional de estos cultivos fue monitoreado diariamente. La sobre-expresión del miR-125a-5p causó una disminución observable del crecimiento tridimensional de los esferoides desde el día 5 post-transfección tanto en

células HeLa como CaSki, siendo al día 7 post-transfección cuando el efecto del miR-125a-5p en el crecimiento es más marcado (Figura 14).



**Figura 14. Crecimiento tridimensional de células tumorales cervicales que sobre-expresan miR-125a-5p.** A) Crecimiento tridimensional de células HeLa transfectadas con Control negativo, Control positivo y miR-125a-5p B) Crecimiento tridimensional de células CaSki transfectadas con Control negativo, Control positivo y miR-125a-5p. PT= Post-transfección.

De acuerdo con lo observado, al día 7 post-transfección se midió mediante el software ImageJ el área de los esferoides de las células HeLa y CaSki que sobre-expresaban miR-125a-5p y los respectivos controles. El área de los esferoides control negativo se tomó como el 100% y de acuerdo con esto se obtuvo el porcentaje de crecimiento tumoral de las células que sobre-expresaban miR-125a-5p con relación al control negativo. La cuantificación indicó que la sobreexpresión del miR-125a-5p causa una reducción del 50% en el crecimiento



**Figura 15. Cuantificación del área de los esferoides de células tumorales cervicales que sobre-expresan miR-125a-5p.** A) Porcentaje del área con respecto al control negativo de los esferoides de células HeLa transfectadas con Control positivo y miR-125a-5p B) Porcentaje del área con respecto al control negativo de los esferoides de células CaSki transfectadas con Control positivo y miR-125a-5p. La Prueba estadística realizada *t test* arrojó [**\*\*** P= 0.0025] y [**\*\*\***P= 0.0001]. **PT=** Post-transfección.

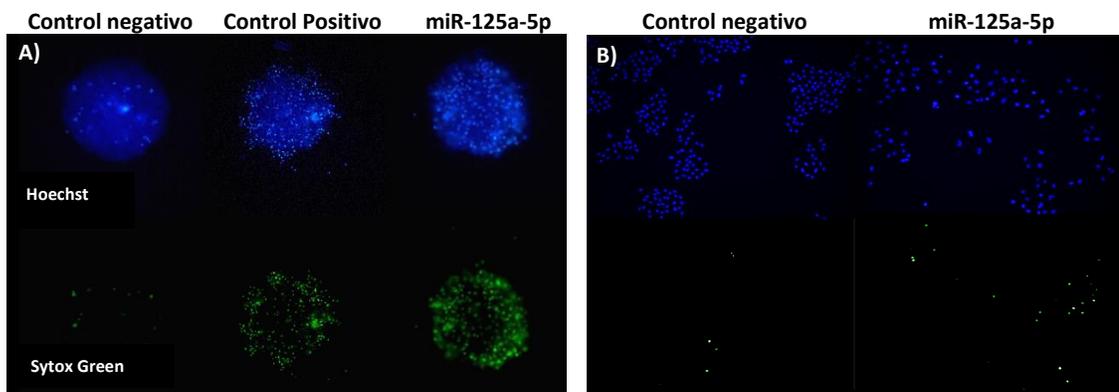
tridimensional de las células HeLa y CaSki (Figura 15). La reducción significativa ( $P < 0.05$ ) del área de los cultivos tridimensionales de las células tumorales cervicales que sobre-expresan miR-125a-5p nos indica que probablemente este miRNA está provocando una disminución de la viabilidad celular y/o inhibiendo la proliferación de las células tumorales cervicales.

### 10.3 Efecto del miR-125a-5p en la viabilidad de las células tumorales cervicales

El efecto causado por el miR-125a-5p en el crecimiento tridimensional de células tumorales cervicales puede deberse a la regulación de procesos como proliferación y muerte celular por el miRNA. Por lo anterior se decidió evaluar el efecto del miR-125a-5p en la viabilidad celular. Para ello se sobre-expresó el miR-125a-5p en células HeLa, las cuales se cultivaron tanto tridimensionalmente como bidimensionalmente. Las células fueron teñidas con los fluorocromos Hoechst y Sytox Green tres días post-transfección; Hoechst es permeable a las células por lo cual tiñe células vivas y células muertas, mientras que Sytox Green, es impermeable a las células por lo que solo tiñe células muertas. La tinción se observó mediante microscopía de epifluorescencia y la intensidad

de la fluorescencia fue analizada mediante el software ImageJ. El análisis de la viabilidad celular se realizó también a los tres días post-transfección debido a que en ese día el efecto del miR-125a-5p en el crecimiento tridimensional aun no es visible, por lo tanto, hay una cantidad similar de células totales entre los tratamientos, mientras que a partir del día 5 post-transfección el efecto del miR-125a-5p en crecimiento es notable habiendo una diferencia significativa en la cantidad total de células entre tratamientos por lo que puede verse sesgada la cuantificación de células viables.

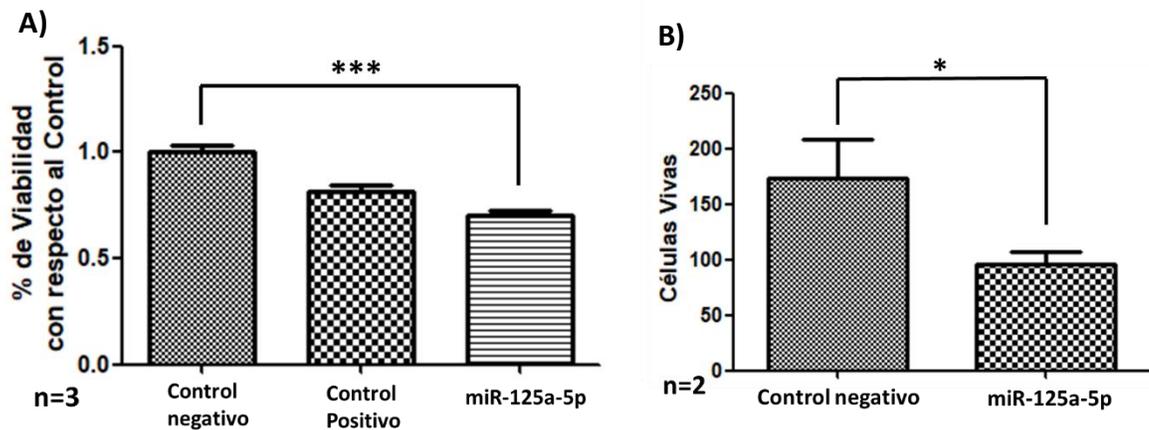
La sobre-expresión del miR-125a-5p afectó la viabilidad de las células HeLa cultivadas en ambos modelos comparado con el control negativo (figura 16). Para determinar la viabilidad de las células cultivadas de modo tridimensional la intensidad de Sytox Green fue restada a la de Hoechst, obteniendo la fluorescencia de las células vivas. Por otro lado, para determinar la viabilidad de las células cultivadas bidimensionalmente se restó el número de células muertas (Sytox Green) al número total de células (Hoechst), obteniendo así las células que quedaron vivas después de los tratamientos.



**Figura 16. Efecto del miR-125a-5p en la Viabilidad de células HeLa. A)** Cultivo 3D de células HeLa transfectadas con Control negativo, Control positivo y miR-125a-5p teñidas con Hoechst y Sytox Green **B)** Cultivo 2D de células HeLa transfectadas con Control negativo y miR-125a-5p teñidas con Hoechst y Sytox Green.

En la figura 17 se muestra el porcentaje de viabilidad con respecto al control negativo de las células HeLa cultivadas en ambos modelos de cultivo con cada uno de los tratamientos (Control positivo y miR-125a-5p). En el caso del análisis de viabilidad en el cultivo 3D, se tomó como el 100% de viabilidad a la fluorescencia de las células vivas de

los esferoides control negativo y de acuerdo con esto se obtuvo el porcentaje de viabilidad de las células que sobre-expresaban miR-125a-5p con relación al control negativo. En los cultivos 3D la viabilidad se ve inhibida un 30% mientras que en las células cultivadas bidimensionalmente hay casi 2 veces más células vivas en el control negativo (1.8), que en las que sobre-expresan miR-125a-5p. Cabe resaltar que, aunque en ambos modelos de cultivo se observa un decaimiento en la viabilidad celular el ensayo de viabilidad realizado en los cultivos tridimensionales es más reproducible de acuerdo con la prueba estadística *t de Student*, ya que arroja una mayor diferencia significativa en el ensayo de viabilidad en cultivo tridimensional que en el bidimensional.



**Figura 17. Viabilidad de las células tumorales cervicales que sobre-expresan miR-125a-5p. A)** Porcentaje de viabilidad con respecto al control negativo de los esferoides de células HeLa transfectadas con Control positivo y miR-125a-5p **B)** Ensayo de viabilidad en Células HeLa cultivadas bidimensionalmente, en la gráfica se muestra la cuantificación de células vivas después de la transfección con control negativo y miR-125a-5p. La Prueba estadística realizada *t de Student* mostró significancia [\*\*\* p= 0.001] y [\* p=0.03].

## 11. DISCUSIÓN

Los procesos que subyacen al desarrollo de un tumor son diferentes dependiendo del tipo de cáncer. Sin embargo, la expresión aberrante de genes es una característica general en todos los tipos de cáncer siendo la desregulación de los niveles normales de los miRNAs una de las causas principales. Los miRNAs tienen implicaciones en la mayoría de los procesos celulares, debido a que regulan de manera negativa la expresión de genes relacionados con la proliferación y diferenciación celular, desarrollo, apoptosis, metabolismo, entre otras. De acuerdo con esto la alteración de los niveles de un miRNA en particular puede afectar diversos procesos celulares provocando el desarrollo de un fenotipo tumoral, por lo cual múltiples grupos de investigación se han inclinado por caracterizar la función de cada una de estas moléculas en los distintos procesos celulares en distintos tipos de cáncer.

El perfil de expresión de miRNAs en células tumorales depende del tipo de cáncer. En el caso particular del cáncer cervical se han reportado diversos miRNAs que actúan como oncogenes o como supresores de tumor, como miR-21 y miR-29a respectivamente<sup>39</sup>. En nuestro laboratorio nos hemos enfocado en caracterizar el papel del miR-125a-5p en el cáncer cervical, el cual ha sido asociado tanto a un rol de supresor de tumor como de oncogén en distintos tipos de cáncer. En el presente trabajo demostramos que el miR-125a-5p actúa como supresor de tumor, dado que su sobre-expresión provoca inhibición del crecimiento tumoral, de la viabilidad y de las células tumorales cervicales cultivadas en un modelo tridimensional.

La relación entre el miR-125a-5p y el cáncer cervical ya ha sido estudiada por algunos grupos de investigación, por ejemplo, Fan y colaboradores en el 2015 encontraron que el miR-125a-5p se encuentra disminuido en el tejido maligno de cérvix en comparación con el tejido normal adyacente<sup>59</sup>. Sin embargo, debido a los pocos estudios sobre el papel de este miRNA en el cáncer cervical aún no se tiene una conclusión clara acerca de su rol funcional.

Funcionalmente, diversos grupos de investigación han observado que la sobreexpresión del miR-125a-5p inhibe la proliferación de células tumorales cervicales. En nuestro grupo de trabajo la Dra. Natalia Martínez Acuña observó que la sobre-expresión del miR-125a-5p en cultivos bidimensionales de células hela inhibe la proliferación celular y el crecimiento tumoral, mediante ensayos de CFSE y de agar suave<sup>53</sup>. Por otra parte, se ha observado que el miR-125a-5p inhibe la proliferación de células tumorales cervicales a través de la regulación directa del gen STAT3<sup>59</sup>. En otro estudio se validó al gen HUR como blanco del miR-125a-5p el cual está implicado en proliferación y angiogénesis, por lo tanto, la disminución de miR-125a-5p incrementa la expresión de HUR desencadenando una proliferación descontrolada<sup>48</sup>.

Aunque en el presente trabajo no se evaluó el efecto del miR-125a-5p en proliferación celular, la disminución del área del esferoide observada al sobre-expresar miR-125a-5p en las células tumorales cervicales cultivadas tridimensionalmente nos indica un efecto negativo sobre el crecimiento tumoral, lo cual es congruente con lo reportado en la literatura.

Por otra parte, estudios previos reportan que los genes asociados a proliferación tienen una expresión diferencial entre los modelos de cultivo utilizados en este trabajo. Los cultivos bidimensionales presentan una mayor expresión de genes que desencadenan proliferación celular y una menor expresión de los genes que la inhiben. Esto se debe a que en el cultivo 2D la mayoría de las células se encuentran en un estado altamente proliferativo. En el cultivo 3D se observa lo contrario ya que en este modelo de cultivo hay menos células proliferativas debido a la existencia de capas de células en diferentes estadios. Diversos autores señalan que las células que pasan de un cultivo 2D a un cultivo 3D recuperan casi completamente el comportamiento que mostraban en el tumor *in situ* por lo que la expresión de genes en estos cultivos 3D se asemeja más a lo *in vivo*<sup>77</sup>. De acuerdo con lo reportado por otros autores, en el presente trabajo se encontró que miR-125a-5p se encuentra más expresado en las células que son cultivadas tridimensionalmente en comparación a su contraparte bidimensional, lo cual refuerza nuestra idea de que el miR-125a-5p está inhibiendo la proliferación de las células.

Por otro lado, mediante la co-tinción con Sytox Green/Hoechst se determinó que la sobreexpresión del miR-125a-5p afecta la viabilidad de las células tumorales cervicales, lo cual coincide con lo reportado en la literatura, ya que diversos grupos de investigación reportan que miR-125a-5p desencadena procesos de apoptosis en distintos tipos de cáncer al tener como blanco genes que codifican proteínas anti-apotóticas como BCL2, BCL2L1, MCL-1<sup>55</sup>. Además, regula la expresión de la enzima hexoquinasa, con lo que se inhibe la glicolisis comprometiendo así la viabilidad celular<sup>57</sup>. Cabe señalar que el ensayo de viabilidad también fue realizado en cultivos bidimensionales y aunque si encontramos una disminución de la viabilidad celular en este modelo el efecto no fue tan fuerte como en los cultivos tridimensionales, por lo tanto, podemos decir que con el modelo bidimensional podríamos subestimar el efecto del miR-125a-5p.

El efecto del miR-125a-5p en la proliferación observado por la Dra. Martínez Acuña en cultivos bidimensionales y su efecto en la viabilidad de las células tumorales cervicales observado en este trabajo podría explicar el efecto tardío del miRNA en el crecimiento tumoral, ya que probablemente miR-125a-5p al estar regulando genes implicados en proliferación y muerte celular está provocando que las células se dejen de dividir y entren a un proceso de muerte, por lo que a 3 días post-transfección vemos una mayor muerte celular la cual se ve reflejado en la disminución de la viabilidad del esferoide comparado con el control negativo. Sin embargo, no hay una reducción del crecimiento tumoral y es solamente hasta los 7 días post-transfección que se observa el efecto en crecimiento tumoral.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten establecer la participación negativa del miR-125a-5p en el crecimiento tumoral y en la viabilidad de células tumorales cervicales, por lo que presumiblemente miR-125a-5p actúa como un supresor de tumor en cáncer cervical.

## 12. CONCLUSIONES

El miR-125a-5p es reportado como supresor de tumor en la mayoría de los tipos de cáncer, incluido el cáncer cervical, diversos grupos de investigación reportan que el miR-125a-5p tiene la capacidad de inhibir la proliferación y aumentar la apoptosis celular. En nuestro grupo de trabajo se empleó el modelo de cultivo tridimensional para determinar de manera apropiada la función de este miRNA en el cáncer cervical. En este modelo de cultivo observamos que la sobre-expresión del miR-125a-5p en células tumorales cervicales inhibe el crecimiento tumoral y además disminuye la viabilidad de las células. Cabe recalcar que, aunque el efecto del miR-125a-5p también fue observado en cultivos bidimensionales el efecto no fue tan visible ni tan reproducible como en los cultivos tridimensionales, lo cual afirma la eficiencia en el estudio del cáncer de este modelo de cultivo.

Por otro lado, encontramos que la expresión de miR-125a-5p es diferencial en ambos modelos de cultivo, encontrándose una mayor expresión del miR-125a-5p cuando las células son cultivadas de modo bidimensional a diferencia de cuando son cultivadas de manera tridimensional, lo cual concuerda con lo reportado sobre la expresión diferencial de genes que inhiben proliferación en ambos modelos de cultivo. Los resultados aquí mostrados nos dan un indicio acerca del papel como supresor de tumor del miR-125a-5p en el cáncer cervical.

### **13. PERSPECTIVAS**

- Determinar la expresión del miR-125a-5p en las diferentes capas del esferoide mediante FISH para observar en que estadio celular se encuentra disminuido.
- Evaluar el efecto de miR-125a-5p en la proliferación de las células tumorales cervicales cultivadas en el modelo tridimensional.
- Evaluar el efecto de miR-125a-5p en la apoptosis de las células tumorales cervicales cultivadas en el modelo tridimensional.
- Realizar co-cultivos con células asociadas a las células tumorales, como fibroblastos o células inmunes y con células tumorales cervicales que sobre-expresen miR-125a-5p para analizar el efecto de ello en el crecimiento del esferoide.
- Validar blancos de miR-125a-5p asociados con la proliferación, apoptosis y crecimiento celular, para elucidar el mecanismo por el cual el miR-125a-5p afecta estos procesos celulares.

## 14. REFERENCIAS

1. Cáncer de mama y cérvico-uterino. (ed. Género, S.d.l.d.) (México Gobierno de la República, INMUJERES, 2012).
2. Salud, S.d. Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino. (ed. Programas, A.y.) (México Gobierno de la República, Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013 - 2018, 2015).
3. Plan Nacional de Desarrollo. 2013-2018 edn (ed. Salud, P.S.d.) (México Gobierno de la República, 2018).
4. Society, A.C. What Is Cervical Cancer? Vol. 2018 (American Cancer Society, Cancer.org, 2016).
5. Society, A.C. What Are the Risk Factors for Cervical Cancer? Vol. 2018 (American Cancer Society, Cancer.org, 2017).
6. McLaughlin-Drubin, M.E. & Münger, K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research* **143**, 195-208 (2009).
7. Cuellar, T.L. & McManus, M.T. MicroRNAs and endocrine biology. *Journal of Endocrinology* **187**, 327-332 (2005).
8. Tétreault, N. & De Guire, V. miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry* **46**, 842-845 (2013).
9. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. & Kim, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal* **21**, 4663 (2002).
10. Kim, V.N., Han, J. & Siomi, M.C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 126-139 (2009).
11. Saini, H.K., Griffiths-Jones, S. & Enright, A.J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 17719-17724 (2007).
12. Cai, X., Hagedorn, C.H. & Cullen, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957-1966 (2004).
13. Adams, L. Non-coding RNA: Pri-miRNA processing: structure is key. *Nat Rev Genet* **18**, 145-145 (2017).
14. Ha, M. & Kim, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 509-524 (2014).
15. Lee, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419 (2003).
16. Han, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development* **18**, 3016-3027 (2004).
17. Zeng, Y., Yi, R. & Cullen, B.R. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO Journal* **24**, 138 (2004).
18. Han, J. et al. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* **125**, 887-901 (2006).
19. Westholm, J.O. & Lai, E.C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* **93**, 1897-1904 (2011).
20. Han, J. et al. Posttranscriptional Crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* **136**, 75-84.
21. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. & Kutay, U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* **303**, 95 (2004).

22. Ketting, R.F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development* **15**, 2654-2659 (2001).
23. MacRae, I.J. et al. Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* **311**, 195 (2006).
24. MacRae, I.J., Zhou, K. & Doudna, J.A. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 934-940 (2007).
25. Kawamata, T. & Tomari, Y. Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 368-376.
26. Chendrimada, T.P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740-744 (2005).
27. Wang, H.-W. et al. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1148-1153 (2009).
28. Hwang, H.W. & Mendell, J.T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer* **94**, 776-780 (2006).
29. Lai, E.C. Micro RNAs are complementary to 3[prime] UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* **30**, 363-364 (2002).
30. Kloosterman, W.P., Wienholds, E., Ketting, R.F. & Plasterk, R.H.A. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Research* **32**, 6284-6291 (2004).
31. Hutvagner, G. et al. A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the &lt;em>let-7&lt;/em> Small Temporal RNA. *Science* **293**, 834 (2001).
32. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57-70.
33. Sherr, C.J. Principles of Tumor Suppression. *Cell* **116**, 235-246.
34. Croce, C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews. Genetics* **10**, 704-714 (2009).
35. Adams, B.D., Kasinski, A.L. & Slack, F.J. Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer. *Current biology : CB* **24**, R762-R776 (2014).
36. Calin, G.A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2999-3004 (2004).
37. Hammond, S.M. MicroRNAs as oncogenes. *Current Opinion in Genetics & Development* **16**, 4-9 (2006).
38. Cimmino, A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13944-13949 (2005).
39. Pardini, B. et al. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review. *BMC cancer* **18**, 696 (2018).
40. Yanaihara, N. et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* **9**, 189-198.
41. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. & Bradley, A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research* **14**, 1902-1910 (2004).
42. Bi, Q. et al. Ectopic Expression of MiR-125a Inhibits the Proliferation and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Targeting MMP11 and VEGF. *PLOS ONE* **7**, e40169 (2012).
43. Ge, Y., Sun, Y. & Chen, J. IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis. *The Journal of Cell Biology* **192**, 69-81 (2011).
44. Song, C. et al. Over-expression of miR-125a-5p inhibits proliferation in C2C12 myoblasts by targeting E2F3. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **47**, 244-249 (2015).

45. Scott, G.K. et al. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem* **282**(2007).
46. Kyu, K.J. et al. Sirtuin7 oncogenic potential in human hepatocellular carcinoma and its regulation by the tumor suppressors MiR-125a-5p and MiR-125b. *Hepatology* **57**, 1055-1067 (2013).
47. Dai, J., Wang, J., Yang, L., Xiao, Y. & Ruan, Q. miR-125a regulates angiogenesis of gastric cancer by targeting vascular endothelial growth factor A. *International journal of oncology* **47**, 1801-1810 (2015).
48. Guo, X., Wu, Y. & Hartley, R.S. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA biology* **6**, 575-583 (2009).
49. Sun, Y. et al. Oncogenic potential of TSTA3 in breast cancer and its regulation by the tumor suppressors miR-125a-5p and miR-125b. *Tumor Biology* **37**, 4963-4972 (2016).
50. Tiwari, A., Shivananda, S., Gopinath, K.S. & Kumar, A. MicroRNA-125a Reduces Proliferation and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells by Targeting Estrogen-related Receptor  $\alpha$ : IMPLICATIONS FOR CANCER THERAPEUTICS. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 32276-32290 (2014).
51. Yasuo, T. et al. Suppression of lethal-7b and miR-125a/b Maturation by Lin28b Enables Maintenance of Stem Cell Properties in Hepatoblasts. *Hepatology* **64**, 245-260 (2016).
52. Qin, X., Wan, Y., Wang, S. & Xue, M. MicroRNA-125a-5p modulates human cervical carcinoma proliferation and migration by targeting ABL2. *Drug Design, Development and Therapy* **10**, 71-79 (2016).
53. Natalia, M.A. Cinvestav (2017).
54. Yang, J., Li, G. & Zhang, K. MiR-125a regulates ovarian cancer proliferation and invasion by repressing GALNT14 expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **80**, 381-387 (2016).
55. Tong, Z. et al. miR-125a-5p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colon cancer via targeting BCL2, BCL2L12 and MCL1. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **75**, 129-136 (2015).
56. Sebastiani, G. et al. Regulatory T-cells from pancreatic lymphnodes of patients with type-1 diabetes express increased levels of microRNA miR-125a-5p that limits CCR2 expression. *Scientific Reports* **7**, 6897 (2017).
57. Sun, Z., Zhang, W. & Li, Q. miR-125a suppresses viability and glycolysis and induces apoptosis by targeting Hexokinase 2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cell & Bioscience* **7**, 51 (2017).
58. Sun, Y.-M., Lin, K.-Y. & Chen, Y.-Q. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *Journal of Hematology & Oncology* **6**, 6 (2013).
59. Fan, Z. et al. MiR-125a suppresses tumor growth, invasion and metastasis in cervical cancer by targeting STAT3. *Oncotarget* **6**, 25266-25280 (2015).
60. Martínez-Acuna, N., Gonzalez-Torres, A., Tapia-Vieyra Juana, V. & Luis Marat, A.-S. MARK1 is a Novel Target for miR-125a-5p: Implications for Cell Migration in Cervical Tumor Cells. *MicroRNA* **7**, 54-61 (2018).
61. Junttila, M.R. & de Sauvage, F.J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* **501**, 346-354 (2013).
62. Schedin, P. & Elias, A. Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Research* **6**, 93 (2004).
63. Weigelt, B., Ghajar, C.M. & Bissell, M.J. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Advanced drug delivery reviews* **0**, 42-51 (2014).

64. Thoma, C.R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J.M. & Krek, W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **69–70**, 29-41 (2014).
65. Hirschhaeuser, F. et al. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology* **148**, 3-15 (2010).
66. Andrei, G. Three-dimensional culture models for human viral diseases and antiviral drug development. *Antiviral Research* **71**, 96-107 (2006).
67. Larson, B. 3D Cell Culture: A Review of Current Techniques. *BioTek Whit Papers* (2015).
68. Guan, Y., Yao, H., Zheng, Z., Qiu, G. & Sun, K. MiR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation. *International Journal of Cancer* **128**, 2274-2283 (2011).
69. Huang, L. et al. MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3. *Int J Cancer* **128**(2011).
70. Li, W. et al. Germline mutation of microRNA-125a is associated with breast cancer. *J Med Genet* **46**(2009).
71. Kappelmann, M., Kuphal, S., Meister, G., Vardimon, L. & Bosserhoff, A.K. MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression. *Oncogene* **32**, 2984-2991 (2013).
72. Xu, N. et al. MicroRNA-125b Down-regulates Matrix Metalloproteinase 13 and Inhibits Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 29899-29908 (2012).
73. Liu, L.H. et al. miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* **416**(2011).
74. Jiang, L. et al. Hsa-miR-125a-3p and hsa-miR-125a-5p are downregulated in non-small cell lung cancer and have inverse effects on invasion and migration of lung cancer cells. *BMC Cancer* **10**(2010).
75. Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nature methods* **9**, 671-675 (2012).
76. Wlodkowic, D., Faley, S., Darzynkiewicz, Z. & Cooper, J.M. Real-Time Cytotoxicity Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **731**, 285-291 (2011).
77. Birgersdotter, A., Sandberg, R. & Ernberg, I. Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. in *Seminars in cancer biology* Vol. 15 405-412 (Elsevier, 2005).