



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
Maestría en Ciencias Biomédicas**

**LABORATORIO DE VIROLOGÍA**

Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

# **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA**

Q.B.P Diego Armando Lechuga Mercado

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Oscar Del Moral Hernández

**CODIRECTOR:**

Dr. Fredy Omar Beltrán Anaya



Chilpancingo de los Bravo, Gro. Diciembre 2021



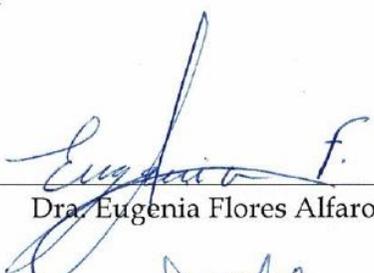
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

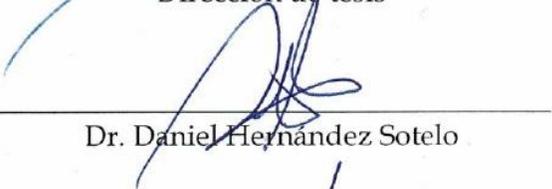
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 26 días del mes de noviembre de dos mil veintiuno, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “*Caracterización in silico y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16*”, presentada por el alumno Diego Armando Lechuga Mercado, para *obtener* el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

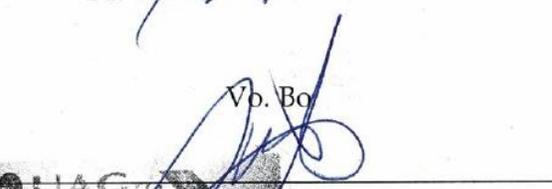
  
Dr. Oscar del Moral Hernández  
Dirección de tesis

  
Dra. Eugenia Flores Alfaro

  
Dr. Daniel Hernández Sotelo

  
Dr. Napoleón Navarro Tito

Vb. Bo

  
Dr. Daniel Hernández Sotelo  
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas

  
Dr. Oscar del Moral Hernández  
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la Dirección de:

**Dr. Oscar del Moral Hernández**

La Codirección de:

**Dr. Fredy Omar Beltrán Anaya**

La asesoría de:

**Dra. Eugenia Flores Alfaro**

**Dr. Napoleón Navarro Tito**

**Dr. Daniel Hernández Sotelo**

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Diego Armando Lechuga Mercado, percibió el apoyo para la formación de recursos humanos, por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de CVU: 923008.

## AGRADECIMIENTOS

Estoy muy agradecido con el Dr. Oscar, quien me permitió realizar mi proyecto de investigación y pertenecer en el grupo del trabajo a lo largo de estos 5 años. Gracias Dr. Oscar, por sus consejos, su confianza y su amistad sincera. Sin usted y sus virtudes, su paciencia y constancia este trabajo no lo hubiera logrado tan fácil.

Al Dr. Fredy Beltrán mi codirector, agradecerle su amistad sincera, su confianza, su paciencia, su orientación para la realización de este proyecto y sobre todo la humildad y profesionalismo con la que me apoyo para poder concluir este trabajo de investigación. Usted formó parte importante de este gran trabajo con sus aportes profesionales que lo caracterizan.

Quiero agradecer a mi comité tutorial:

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Dr. Napoleón Navarro Tito

Por su disponibilidad, su amistad, sus aportaciones y consejos que me permitieron culminar con este trabajo. Muchas gracias.

Al laboratorio de Biomedicina y Epigenética del cáncer por su apoyo, atención y asesoría técnica para realizar este trabajo. En especial a la C. Dra. Jaqueline, quien siempre tuvo la amabilidad de apoyarme en mis predicciones *in silico* y en lo que necesitaba del laboratorio.

Al laboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular, por permitirme realizar algunos experimentos dentro del laboratorio y por su amabilidad. En especial, a mis amigos Rey, Brenda y Fredy. Muchas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por permitirme formar parte del programa nacional de becas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre, abuelitos y hermanos

Este trabajo es dedicado con todo mi corazón a ellos. Realmente fueron mi energía y motivación para seguir luchando por mis objetivos. Gracias Mamá, decirte que este logro también es tuyo, por el enorme esfuerzo que has hecho a lo largo de estos años, por mantener firme y de pie a esta pequeña familia. A mis hermanos, Walfred y Marijose, agradecerles siempre su cariño y por ser mi motor para lograr lo que me proponga. A mi abuelita Martha, prácticamente le debo todo. Gracias abuelita, por ser parte importante de mi vida, decirte que este también es tu logro. Los amo a todos.

A mi novia Yannel Ramírez

Agradezco de corazón tu esfuerzo, y el apoyo que me diste a lo largo de esta travesía, sin duda, eres una parte fundamental en mi vida. Gracias por siempre estar conmigo, por motivarme y apoyarme a pesar de las adversidades. Te amo mi amor.

A la familia Ramírez Burgos

Les agradezco mucho su confianza y el apoyo que constantemente me brindaron todos. Realmente son una familia digna de admirar, basada en humildad, amor y perseverancia. Los quiero mucho.

A mis hermanos de laboratorio

Estaré siempre agradecido por su apoyo, su amabilidad, sus consejos y sobre todo su confianza. Realmente son grandes seres humanos y sin duda los llevaré siempre conmigo. Sé que en algún momento nos volveremos a encontrar. Éxito.

Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA  
MINCR y su posible papel en la migración en  
células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

## ÍNDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIÓN.....	30
PERSPECTIVAS.....	31
REFERENCIAS.....	32

## RESUMEN

La infección por el virus del papiloma humano 16 (VPH-16) es uno de los primeros eventos en el proceso de carcinogénesis en el cáncer cervical (CC). La expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 es esencial en este proceso para inactivar las proteínas supresoras de tumores p53 y pRb, respectivamente, además de sus interacciones con otras proteínas celulares. Se ha descubierto que los RNAs largos no codificantes (LncRNA), están desregulados en varios tipos de cáncer, lo que sugiere un papel importante en la tumorigénesis. En este trabajo, se determinó la expresión del LncRNA MINCR en células C33-A que expresan E6 de las variantes (AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350 y E-G350) del VPH-16. Se encontró que la expresión de la oncoproteína E6 regula positivamente la expresión de MINCR, interesantemente, E6 de la variante E-C188/G350 aumentó 40 veces la expresión de MINCR, seguida de la variante AA-c con 9 veces en comparación con el control (Mock). Mediante análisis bioinformáticos se predijo que los factores transcripción SP1 y MYC podrían modular la expresión de MINCR de manera dependiente de E6 del VPH-16. Adicionalmente, se predijo que MINCR tiene como objetivo a cinco miRNAs y 119 mRNAs, los cuales, participan en diferentes procesos celulares como proliferación, migración, ciclo celular y apoptosis. Nuestros resultados sugieren, un posible axis de regulación LncRNA-microRNAs-mRNAs en la migración de células C33-A/AA-c.

**Palabras clave:** Cáncer cervical, VPH-16, Variantes de E6, MINCR, RNAs largos no codificantes.

## ABSTRACT

Infection with human papillomavirus 16 (HPV-16) is one of the first events in the carcinogenesis process in cervical cancer (CC). The expression of the viral oncoprotein E6 and E7 is essential in this process to inactivate the tumor suppressor proteins p53 and pRb, respectively, in addition to their interactions with other cellular proteins. Long noncoding RNAs (lncRNAs) have been found deregulated in various types of cancer, suggesting an important role in tumorigenesis. In this work, we analyzed the expression of the LncRNA MINCR in HPV-16 E6 oncoprotein variants (AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350 and E-G350) C33-A cells. We found that the expression of E6 oncoprotein positively regulates MINCR. Interestingly, the E6 variant E-C188/G350 increased the MINCR expression for 40 times, followed by the E6 variant AA-c with 9 times compared to the control. Through bioinformatic analysis, we determined that SP1 and MYC transcription factors could modulate the MINCR expression by an HPV-16 E6- dependent pathway. Additionally, it was predicted that MINCR targets five miRNAs and 119 mRNAs, which participate in cellular processes such as proliferation, migration, cell cycle and apoptosis. Our results suggest a possible lncRNA-microRNAs-mRNAs regulation axis in the migration of C33-A/AA-c cells.

**Keywords:** Cervical cancer, HPV-16, E6 variants, MINCR, LncRNAs

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical (CC) a nivel mundial representa la cuarta causa de muerte en mujeres después del cáncer de mama, pulmón y colorrectal. Recientemente se reportó que el CC presentó una incidencia de 604,127 nuevos casos y una mortalidad de 341,831 (GLOBOCAN, 2020). La infección del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) (particularmente, VPH-16) es la principal causa del desarrollo y progresión del CC (Hausen, 2009). Las propiedades oncogénicas y de persistencia del virus se deben a la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 que degradan a proteínas involucradas en la supresión de la carcinogénesis, como los supresores de tumor p53 y pRb (Doorbar, 2015). Se han reportado variaciones intratípicas en el gen que codifica para la oncoproteína E6 y la región LCR del VPH-16 y hasta la fecha, se han clasificado en 4 linajes y 9 sublinajes con base en su ubicación geográfica: Asiática Europea (EAS); Africana 1 (AFR1); Africana 2 (AFR2) y Asiática Americana/Norte Americana (AA/NA) (Seedorf *et al.*, 1985) (Cornet *et al.*, 2012). En el sur de México, se ha reportado que las variantes más frecuentes del VPH-16 son E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350 y E-A176/G350 asociadas con CC (Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015). Por otro lado, se reportó que la oncoproteína E6 de las variantes del VPH-16 es capaz de inducir la expresión diferencial de genes involucrados en procesos celulares que contribuyen al desarrollo del CC (Zacapala-Gómez *et al.*, 2015). Adicionalmente, se encontró a través de un análisis bioinformático que las células que expresan las variantes de E6 del VPH-16 presenta un perfil de expresión diferencial de RNAs largos no codificantes (LncRNAs) (datos no publicados).

Los LncRNAs son transcritos por la polimerasa II, pueden ser cortados y empalmados (*splicing*). Además, estos LncRNAs se caracterizan principalmente por su longitud de >200 nucleótidos hasta ~100kb con presencia de 2 a 3 exones en promedio. De acuerdo a su localización en el genoma los LncRNAs pueden

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

clasificarse en intergénicas o génicos (Derrien et al., 2012). Actualmente, se ha descrito que las funciones de los LncRNAs dependen de su localización celular (núcleo o citoplasma). En núcleo, comprenden diversas funciones como; la regulación transcripcional, el procesamiento del RNA y la remodelación de la cromatina a través del reclutamiento de complejos asociados a la cromatina y por lo tanto, la expresión de genes específicos del tejido. En citoplasma, los LncRNAs pueden modular la estabilidad o la traducción del mRNA actuando como competidores endógenos (ceRNA) o esponjas hacia (LncRNA-miRNA) o andamio para la interacción de proteína-proteína (Koop and Mendell, 2018).

Se ha identificado que algunos LncRNAs están involucrados en procesos celulares como metástasis, proliferación celular, transición epitelio mesénquima, entre otros (Yang *et al.*, 2018). Una gran cantidad de LncRNAs se expresa de forma anormal en cáncer cervical (Aalijahan and Ghorbian, 2019) y algunos son regulados por E6 del VPH-16 (Evans *et al.*, 2016). Recientemente se determinó que E6 del VPH-16 participa en la regulación de la expresión del LncRNA FAM83H-AS1, mediante la interacción de E6 con el coactivador p300 en líneas de CC (Barr *et al.*, 2019). En otro estudio, demostraron que E6 regula indirectamente el incremento de la expresión del LncRNA TMPOP2, mediante la degradación de p53 (He *et al.*, 2019).

El LncRNA inducido por MYC (MINCR) es un LncRNA intergénico, de localización citoplasmática (Zhong, 2019), se correlaciona positivamente con la expresión de MYC en personas con linfoma de Burkitt (Doose *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha descrito que la expresión aumentada de MINCR promueve la proliferación y migración celular a través de la expresión de la proteína EZH2 en cáncer de vesícula biliar (Wang *et al.*, 2016). Otra investigación demostró que MINCR está aumentado en tejidos y líneas celulares de carcinoma hepatocelular (HCC), y su disminución suprime significativamente la proliferación, migración e inducción de la

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

apoptosis de células HCC (Cao, 2018). Recientemente, se determinó que el incremento en la expresión de MINCR se correlaciona con un mal pronóstico de los pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), y la disminución de la expresión inhibe significativamente la proliferación y migración, e induce apoptosis (Wang, 2019). En tejidos y líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas (OSCC) se encontró incrementada la expresión de este LncRNA y se correlacionó con un mal pronóstico de las personas con OSCC. Por el contrario, la disminución de MINCR inhibe significativamente la proliferación, migración e invasión celular, y la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 (Lyu, 2019).

Por lo anterior, es importante identificar los posibles mecanismos moleculares involucrados en la progresión del CC y la caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR podría ayudar a entender mejor su papel (en un modelo *in vitro*) en la regulación de la expresión de genes, mediado por las variantes del VPH-16.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo celular

Para este estudio se utilizaron células C33-A previamente transfectadas con el gen E6 de las diferentes variantes del VPH-16, como se reportó anteriormente (Zacapala *et al.*, 2016). Las células fueron cultivadas en medio *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (DMEM) (Corning Subsidiary Manassas, VA, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Byproducts, México), 100 U/ml de estreptomicina/penicilina (CAISSON LAB., Smithfield, UT, USA) y 500 µg/ml de geneticina G418 (Millipore Corp., Billerica, MA, USA). Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### Cuantificación de la expresión de MINCR

El RNA fue extraído a partir de células C33-A previamente transfectadas, a una confluencia del 80-90%, equivalente a  $6 \times 10^6$  células transfectadas, en un tiempo aproximado de 48-72 hrs de cultivo, utilizando el reactivo *TRizol® LS Reagent* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Posterior a la extracción, se realizó el tratamiento con DNAsa, utilizando 1 µl de enzima y 500 µg/µl. El cDNA se obtuvo por transcripción reversa utilizando 500 ng de RNA, enzima SuperScript™ III (200 U/µl), DTT (4µl) y oligo dT (0.5 µg/µl) (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). Para llevar a cabo la amplificación y cuantificación de MINCR se utilizaron los siguientes primers: MINCR forward: 5' AACCCTGTGAGTGCATTCT 3' y MINCR reverse: 5' TGGAATTTCAAGCCCAACTC 3'; Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) Forward: 5'GACCCCTTCATTGACCTCAAC 3' y Reverse: 5' GTGGCAGTGATGGCATGGAC 3'. Las condiciones para la qPCR fueron las siguientes: desnaturalización previa a 95 ° C durante 1 min, seguida de 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 30 s y 72 ° C durante 30 s por 40 ciclos. La expresión relativa se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### **Construcción de las redes de RNAs competidores endógenos.**

Se construyeron redes de interacción para posteriores análisis experimentales. Se utilizó la base de datos de la plataforma starbase v2.0 (<https://starbase.sysu.edu.cn>) para predecir las interacciones entre LncRNA-miRNA, se excluyeron aquellas interacciones débiles. Las interacciones entre miRNAs-mRNAs fueron establecidas utilizando la plataforma TarBase v.8 by DIANA Tools ([http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana\\_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex](http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex)). Se utilizaron los siguientes criterios para incrementar la precisión de la predicción: Un puntaje (score) de la predicción >0.65 respaldada con al menos una evidencia experimental de un artículo original.

### **Ontología de genes de los mRNA blanco de miRNAs con unión a MINCR.**

Para analizar y predecir los procesos funcionales de los mRNAs regulados indirectamente por MINCR, se realizó un análisis de ontología de genes (GO) con la base de datos DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>). Se consideró como proceso significativo aquellos procesos que presentaran puntuación de enriquecimiento superior a >0.05.

### **Predicción de unión de factores de transcripción al promotor de MINCR.**

Para predecir los sitios de unión de factores de transcripción que existen en la región promotora de MINCR, se utilizó la base de datos JASPAR (<https://jaspar.genereg.net>). La base de datos contiene un conjunto de datos curados y no redundantes de perfiles de unión derivados de colecciones publicadas de sitios de unión de factores de transcripción definidos experimentalmente para eucariotas. Se consideró una predicción significativa aquellas regiones que mostraran un puntaje de unión mayor a 500, con una significancia mínima de  $p < 0.00001$ .

### **Análisis de datos de expresión del LncRNA MINCR en muestras del TCGA**

Los datos de expresión normalizados de muestras de CC positivas a VPH se recuperaron del proyecto TCGA-CESC contenidos en el repositorio de datos del TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Fueron seleccionados únicamente los datos pertenecientes a las muestras positivas a VPH-16, las cuales fueron subclasificados de acuerdo al linaje europeo o asiático-americano correspondiente.

**Silenciamiento del LncRNA MINCR.** Para la disminución del LncRNA MINCR se utilizó un RNA de interferencia pequeño (siRNA), dirigido al exón 1 de la secuencia de MINCR, y como control negativo se utilizó una secuencia siRNA no homologa a ningún elemento del transcriptoma. Las células C33-A/AA-c se sembraron en placas de 6 pozos, posteriormente las células fueron transfectadas con 5 pmol de siRNA utilizando el reactivo de *Lipofectamine 3000* (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, el RNA se extrajo usando el reactivo de trizol de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se almacenó a -80° C hasta el procesamiento. La expresión de MINCR por RT-qPCR se evaluó como se mencionó previamente, realizando 3 experimentos independientes por duplicado.

### **Ensayo de migración celular**

El ensayo de migración celular se realizó utilizando cámaras *transwell* con poros de 8  $\mu\text{m}$  (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Las células C33-A/AA-c transfectadas con siRNAs fueron despegadas y resuspendidas en DMEM sin SFB a una concentración de  $2 \times 10^5$  células en 100  $\mu\text{L}$ , posteriormente fueron sembradas en la cámara superior de la placa. En la cámara inferior se colocaron 600  $\mu\text{L}$  de medio DMEM con 10% de SFB. Las células se incubaron por 24 h a 37° C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Cada experimento se realizó por duplicado. Posteriormente,

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

las células que migraron fueron fijadas con paraformaldehído al 3.7% durante 30 min y teñidas con cristal violeta al 0.1% durante 30 min. Las células fueron cuantificadas usando el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

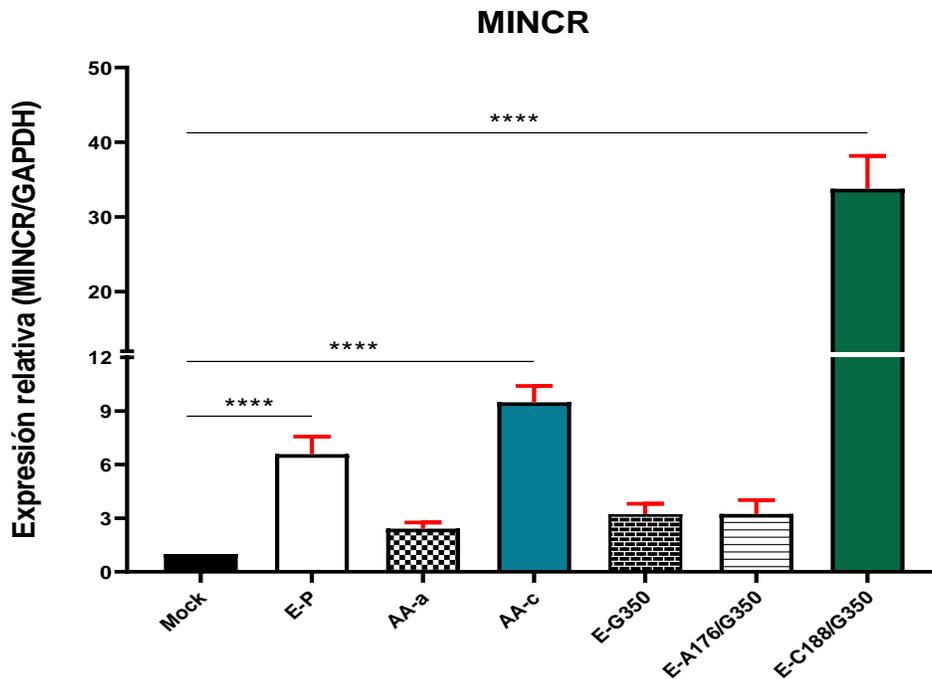
### **Análisis estadístico**

Para determinar las diferencias estadísticas entre la expresión de MINCR con las variantes de E6 del VPH-16 se utilizó el análisis de Kruskal-Wallis utilizando el software STATA V.15 con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett y mediante la prueba t-student, considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

## RESULTADOS

### Las células C33-A/E-C188/G350 y C33-A/AA-c sobreexpresan el LncRNA MINCR.

Con la finalidad de validar la expresión del LncRNA MINCR en células C33-A que expresan E6 de las variantes del VPH-16, se determinó su nivel de expresión relativa por PCR en tiempo real (RT-qPCR). Se encontró que cuando las células expresan la oncoproteína E6 del VPH-16 aumenta en la expresión del LncRNA MINCR en comparación con el control. Adicionalmente, encontramos que las células que expresan la oncoproteína E6 de la variante E-C188/G350, seguida de la variante AA-c tiene la mayor expresión de MINCR (figura 1,  $p < 0.0001$ ). Estos resultados indican que probablemente la oncoproteína E6 de las variantes del VPH-16 regulan diferencialmente la expresión del LncRNA MINCR.



## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

**Figura 1. Nivel de expresión del lncRNA MINCR en células C33-A que expresan E6 de las variantes del VPH-16.** Se muestra la expresión relativa del lncRNA MINCR en células C33-A que expresan E6 de las variantes del VPH-16. Los niveles de expresión de MINCR fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GADPH. Los datos se reportaron con mediana y error estándar de tres experimentos independientes por duplicado. La prueba estadística utilizada para comparación de medianas fue Kruskal Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunette (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.025$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

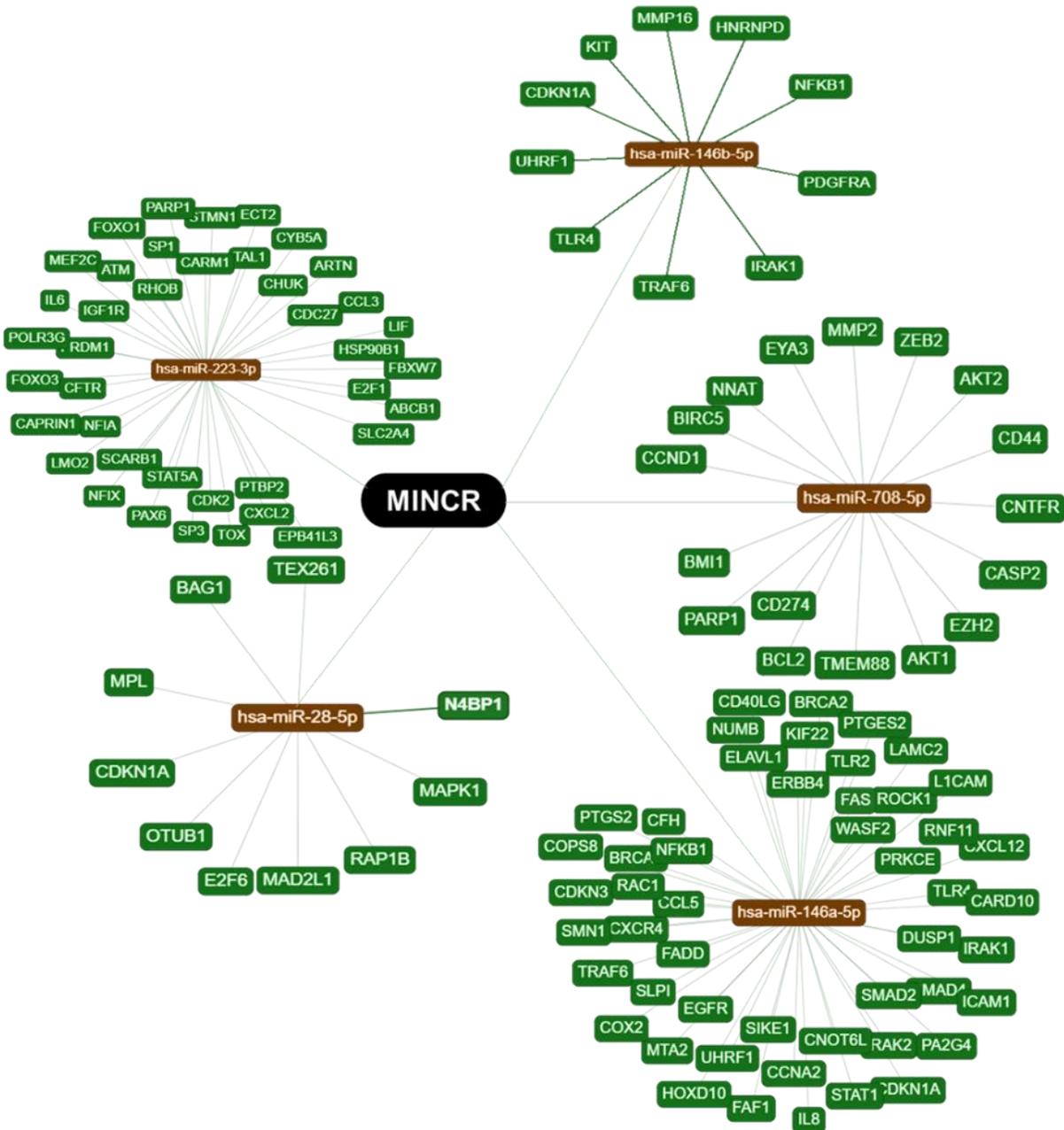
### **El LncRNA MINCR potencialmente podría regular cinco miRNAs y hasta 119 mRNAs**

Una de las funciones atribuibles a los lncRNAs es la de competidor endógeno, por lo tanto, para identificar las posibles funciones del LncRNA MINCR en cáncer cervical construimos una red de interacción de LncRNA-miRNAs-mRNA. En primer lugar, se predijo la interacción de LncRNA-miRNA, utilizando la base de datos de la plataforma *starbase v2.0*. Encontramos que MINCR regula 12 miRNAs, de los cuales se eligieron 5 miRNAs con base en el puntaje (*score*) de la predicción  $> 0.65$ . Además, identificamos posibles interacciones miRNA-mRNA (utilizando *TarBase v.8* y *miRTarBase*). También predecimos que MINCR podría afectar la expresión de hasta 1,004 mRNAs, sin embargo, considerando solo las interacciones fuertes serían 119 genes con un puntaje (*score*) de la predicción  $> 0.70$  respaldada con al menos una evidencia experimental de un artículo original publicado (Figura 2).

### **El LncRNA MINCR podría regular mRNAs involucrados en migración, proliferación, adhesión y ciclo celular.**

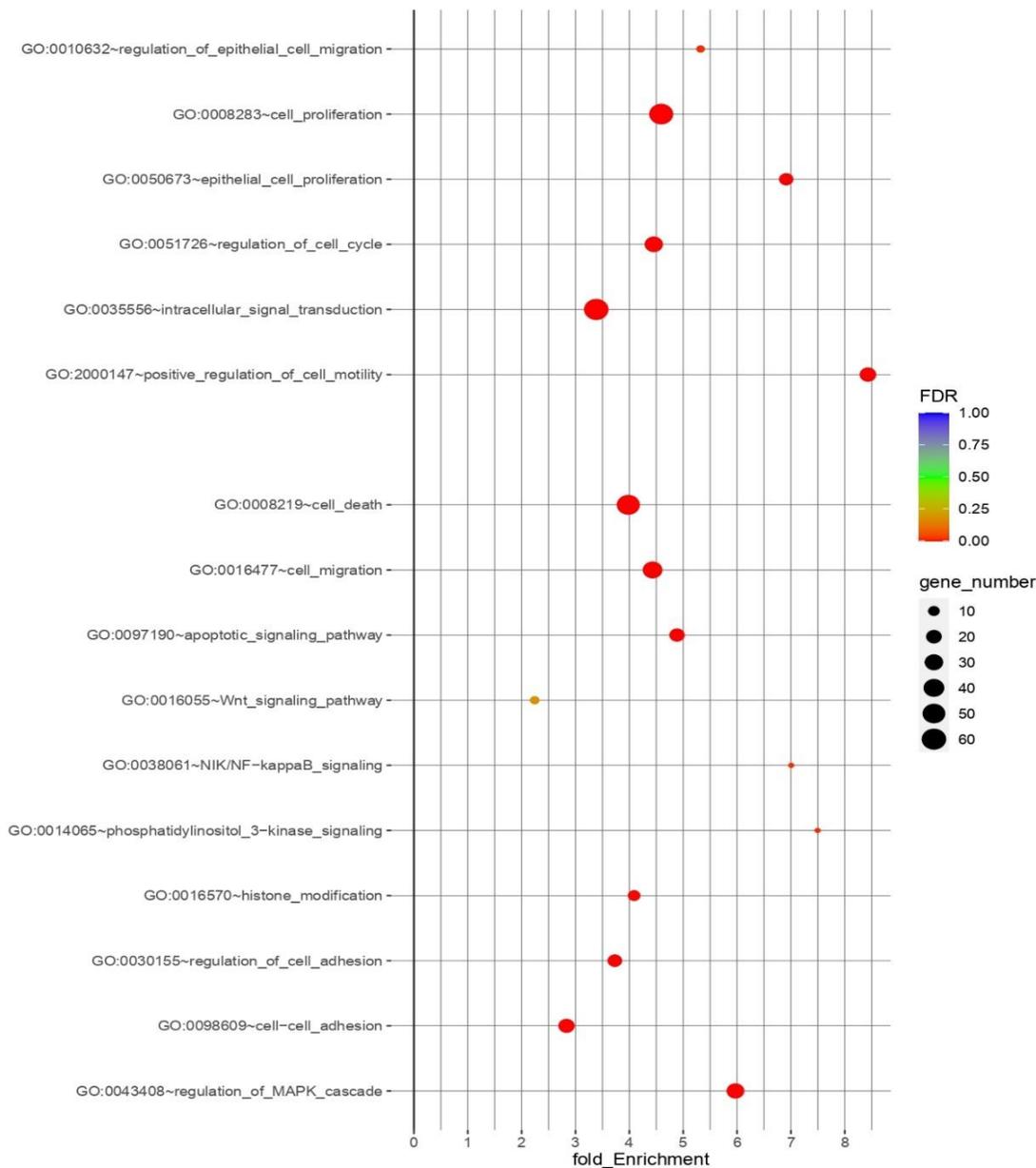
Con la finalidad de analizar y conocer en que procesos biológicos están participando los genes regulados por efecto del LncRNA MINCR, realizamos un análisis de enriquecimiento utilizando la base de datos *DAVID*. El LncRNA MINCR regula indirectamente 119 genes, los cuales participan en procesos celulares como la migración, proliferación, adhesión y ciclo celular. Además, se observó que participan en vías de señalización relacionadas con el desarrollo tumoral como la vías Wnt, NF $\kappa$ B y PI3K (Figura 3).

Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16



**Figura 2. Predicción de red de interacción MINCR-miRNA-mRNA.** La red consta de un LncRNA (MINCR), 5 miRNAs y 119 genes. En el esquema, las líneas de color verde que unen las diversas interacciones, entre más largas, mayor probabilidad de interacción y viceversa, entre más corta, menos probabilidad de interacción.

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

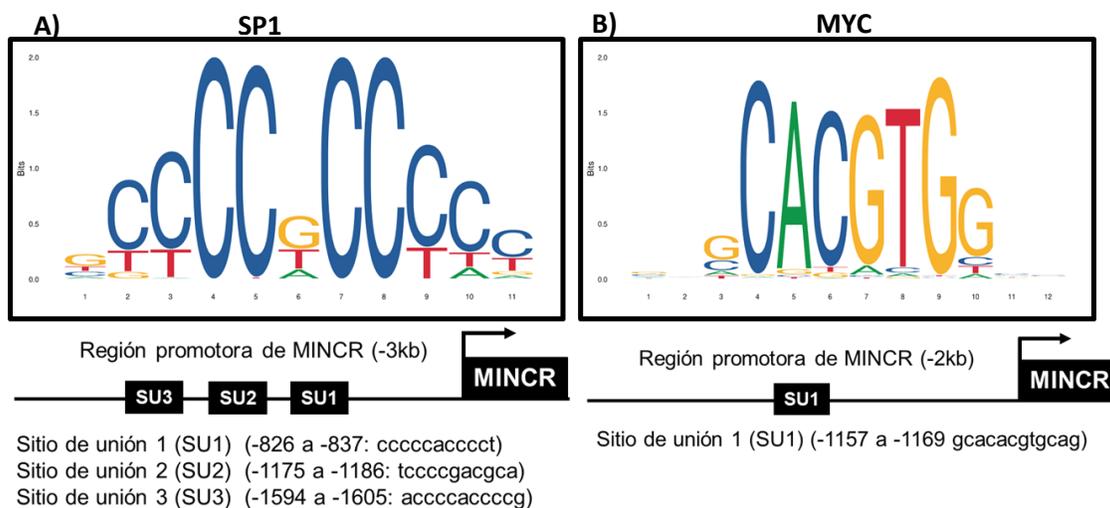


**Figura 3. Predicción de procesos biológicos regulados por la red de interacción del LncRNA MINCR-microRNAs-mRNAs.** El análisis de enriquecimiento de vías muestra la participación de los genes relacionados en la red de interacción de MINCR y sus miRNAs blanco. En el eje X del gráfico se representa las tasas de cambio en el enriquecimiento de procesos biológicos. El tamaño de los círculos representa el número de genes involucrados en los procesos celulares y el color indica la tasa de falsos descubrimientos (FDR). Todos los procesos biológicos representados en el gráfico presentaron un valor de  $p < 0.05$ .

# Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

## SP1 como probable regulador de la expresión de MINCR

Para estudiar el posible mecanismo involucrado en la regulación de la expresión de MINCR, identificamos por revisión bibliográfica los factores de transcripción que han demostrado actuar como moduladores de la expresión de los lncRNAs en modelos de cáncer. Utilizando la base de datos (JASPAR), se identificaron tres sitios de unión (SU1: cccccaccct, SU2: tccccgacgca, SU3: accccaccccg) del factor de transcripción (FT) SP1 (Figura 4a,  $p < 0.00001$ ) y un sitio de unión (SU1: gcacacgtgcag) del FT MYC (Figura 4b,  $p < 0.0001$ ) en el promotor del LncRNA MINCR. Si nuestras predicciones son certeras la expresión de MINCR podría ser regulada por la unión de los FT SP1 y MYC en el promotor de MINCR.



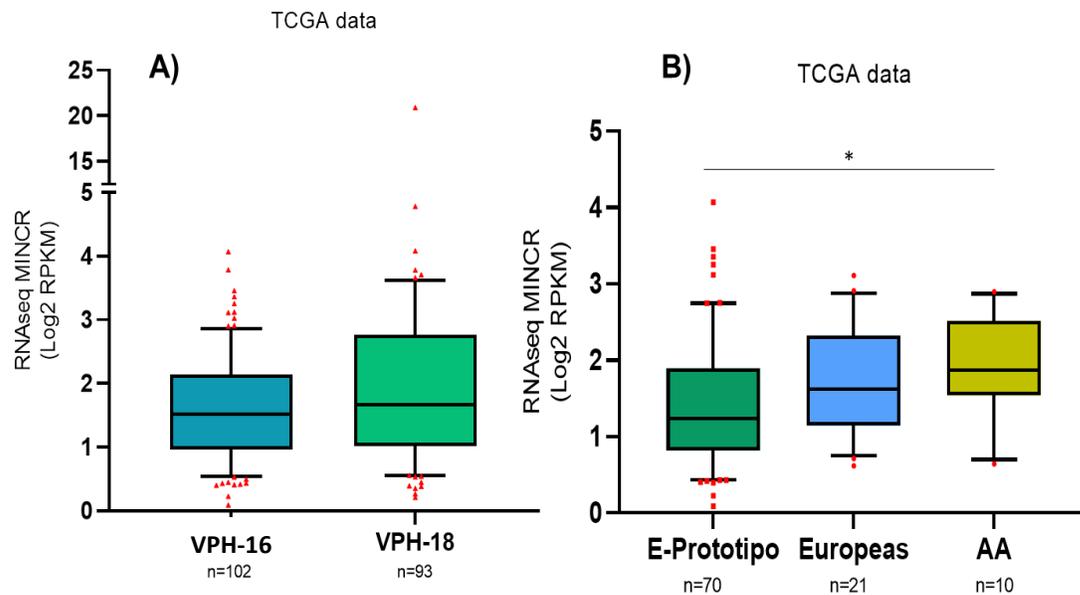
**Figura 4. Identificación de los sitios y secuencia genómica consenso de unión de los factores de transcripción SP1 y MYC.** Predicción de sitios de unión de SP1 y MYC en el promotor MINCR usando el conjunto de datos JASPAR, se consideró una predicción significativa con un score de 560 ( $p < 0.00001$ ).

## Expresión del LncRNA MINCR en cáncer cervical

Con el propósito de comparar nuestros resultados de expresión de MINCR en el modelo *in vitro* de células C33-A y en muestras de CC analizamos datos del TCGA. En primer lugar, comparamos la expresión del LncRNA MINCR en muestras positivas a dos

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

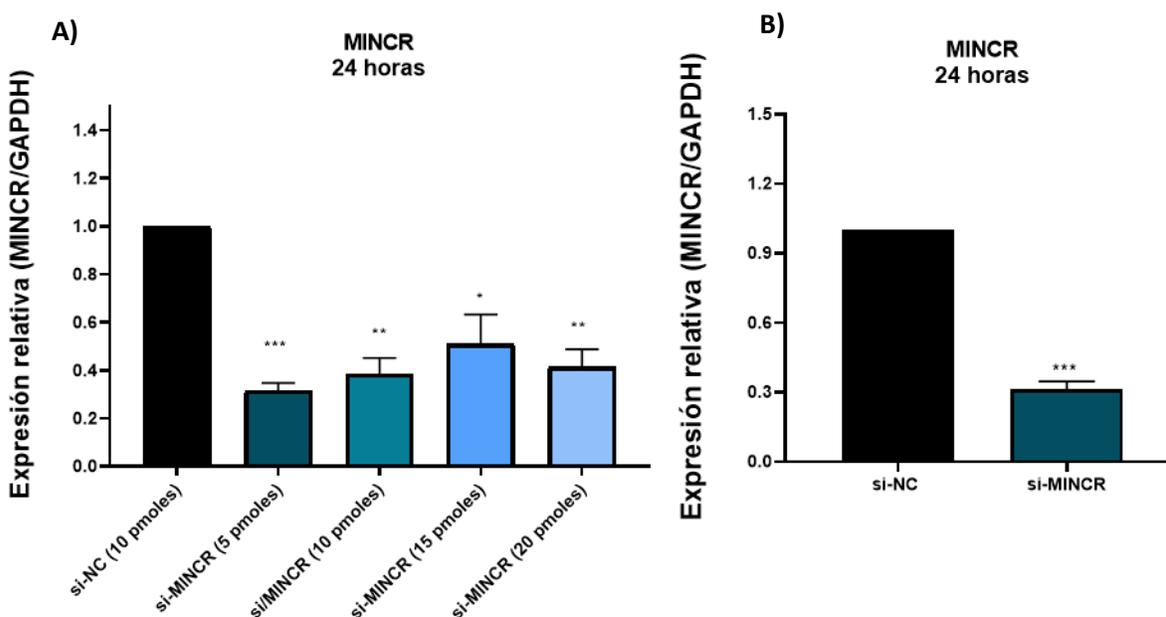
diferentes genotipos virales [VPH-18 (n=93) Vs. VPH-16 (n=102)], sin embargo, no encontramos diferencia significativa entre ambos grupos. De manera interesante cuando analizamos solo las muestras positivas a VPH-16 y clasificadas de acuerdo a la variante que contienen [variantes europeas (n=21), E-Prototipo (n=70) y Asiático-americanas (n=10)] encontramos que las muestras positivas a las variantes Asiático americanas del VPH-16 expresan mayores niveles de MINCR en comparación con las muestras positivas a las variantes Europeas (Figura 3,  $p < 0.05$ ).



**Figura 5. Nivel de expresión del LncRNA MINCR en muestras del TCGA-CESC.** A) Se gráfica la expresión de MINCR en muestras de TCGA positivas a VPH-16 y VPH-18. B) Se grafica la expresión de MINCR en muestras de TCGA positiva a las variantes Europeas y AA de E6 del VPH-16 en comparación de la E-Prototipo. Los niveles de expresión se representan como log2 RPKM. La prueba estadística utilizada para la comparación de medianas fue t-student considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

**El silenciamiento del LncRNA MINCR en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16 disminuye la migración celular.**

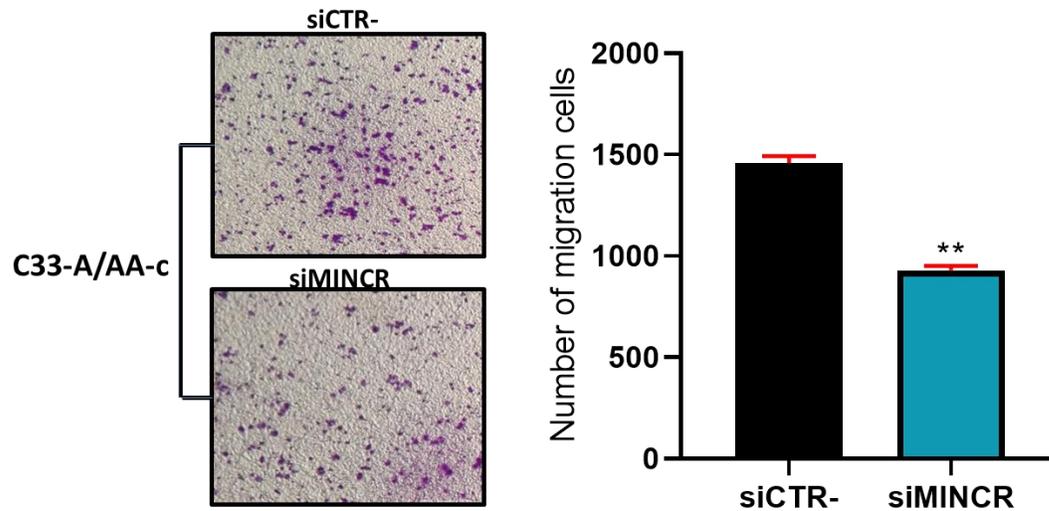
Para investigar la función del LncRNA MINCR en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16, se utilizó un siRNA dirigido a MINCR (siMINCR) para silenciar su expresión. Mediante un análisis de curva dosis respuesta se identificó la concentración óptima del siRNA (Figura 6). Encontramos que un mayor silenciamiento de MINCR se obtuvo a una concentración de 5 pmoles (69%), seguido de 10 pmoles (62%), 20 pmoles (59%) y 15 pmoles (50%).



**Figura 6. Silenciamiento de la expresión de MINCR.** A) Expresión relativa de MINCR en células C33-A que expresan E6 de la variante AA-c del VPH-16 tratadas con siMINCR a diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20 pmoles). B) Expresión relativa de MINCR en células C33-A que expresan E6 de la variante AA-c del VPH-16. Se graficaron las medias  $\pm$  desviaciones estándar de 1 experimento independiente por triplicado. Anova de una vía, prueba de comparación múltiple de Dunnett. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.025$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

Finalmente, para evaluar la función de MINCR, se hicieron ensayos de migración en cámaras *Transwell* con las células donde se disminuyó la expresión de MINCR. Como era de esperarse, la migración celular disminuyó por el silenciamiento de MINCR (Figura 7,  $p < 0.025$ ).



**Figura 7. Disminución de la migración celular por efecto del silenciamiento de MINCR en C33-A/AA-c.** Se hicieron ensayos de migración por medio de cámaras *Transwell*, se encontró que la migración celular disminuyó por el silenciamiento de MINCR. Se graficaron las medias  $\pm$  desviaciones estándar de 1 experimento independiente por duplicado. La prueba estadística utilizada para la comparación de medianas fue t-student considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.025$ ).

## DISCUSIÓN

En la actualidad, se considera que el cáncer cervical (CC) es el cuarto carcinoma más común en el mundo (GLOBOCAN, 2020). Se sabe que la infección persistente por el VPH-16 es el principal factor de riesgo para su desarrollo. Estudios recientes han determinado que existen variaciones en la secuencia de nucleótidos del gen E6 del VPH-16 que pueden traducirse en cambios en la secuencia de aminoácidos (a.a.) de la proteína correspondiente. Es altamente probable que estos cambios modulen la función de la oncoproteína E6 y por lo tanto su papel en el desarrollo de CC. Hasta la fecha, pocos estudios han analizado el efecto de las variaciones intratípicas del oncogén E6 del VPH-16 y su participación en el desarrollo del CC. (Cuninghame *et al.*, 2017, Jackson *et al.*, 2016, Jackson *et al.*, 2014). Sin embargo, recientemente ha surgido un interés en determinar los posibles mecanismos de una gran clase de RNA no codificantes, los LncRNA, en el contexto de la carcinogénesis asociada a la infección por VPHs de alto riesgo oncogénico.

Se ha demostrado que los LncRNAs tienen la capacidad de unirse a proteínas, mRNA o miRNA, y están involucrados en múltiples funciones biológicas como proliferación, migración e invasión celular (Dong *et al.*, 2017). El LncRNA MINCR se ha encontrado incrementado en una gran variedad de cánceres como nasofaríngeo (Zhong, 2020), pulmón (Chen, 2019), vesícula biliar (Wang, 2016), oral (Lyu, 2019) y hepatocelular (Cao, 2018). Por lo tanto, es de gran interés el estudio de los LncRNAs en el contexto de biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer, así como dianas terapéuticas (Arun *et al.*, 2018).

En este estudio, se analizó la expresión del LncRNA MINCR en células C33-A que expresan la oncoproteína E6 de las variantes del VPH-16. Nuestros resultados muestran que la oncoproteína E6 de referencia (E-Prototipo) y las variantes de E6 del VPH-16 (AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350 y E-G350) incrementan la

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

expresión del LncRNA MINCR en comparación con el control (Mock). De manera interesante, la variante E-C188/G350 incrementa 40 veces más la expresión de LncRNA MINCR seguida por la variante AA-c (que la incremento nueve veces) en comparación con el control. A la fecha no hay reportes que analicen la participación de la oncoproteína E6 del VPH-16 en la regulación de la expresión del LncRNA MINCR, sin embargo en nuestro grupo de trabajo se encontró que la expresión del LncRNA MINCR esta incrementada en las líneas celulares de CC HeLa, SiHa, y Caski en comparación con la línea celular C33-A (García-de Jesús, L., y Maldonado, L., 2020). Esto sugiere que probablemente la presencia de E6 de los VPH-16 o 18 modula la expresión de los lncRNAs como MINCR. Una posibilidad es que el incremento en la expresión de MINCR dependa del nivel de expresión de la oncoproteína E6 en las células C33-A que expresan las variantes de E6 del VPH-16. En nuestro modelo de estudio se ha determinado la expresión de E6 (de manera indirecta, a través de la detección de la GFP) por citometría de flujo y se han encontrado ligeras diferencias entre las variantes, sin embargo no podemos saber si son suficientes para modular la expresión de MINCR.

Recientemente, se reportó a través de un análisis *in silico* que los cambios de a.a. presentes en las variantes de E6 del VPH-16 no alteran su estructura 3D. Pero si presentan cambios en sus parámetros fisicoquímicos, que posiblemente estén involucrados en el patrón diferencial de interacciones con sus proteínas objetivos (Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2019). Es probable que los cambios de a.a. presentes en las variantes de E6 modifiquen los patrones de interacción proteína-proteína que pudieran estar implicados en la regulación de la expresión de MINCR.

Barr y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de E6 en queratinocitos primarios expresan una gran cantidad de LncRNA. De todos los LncRNAs regulados por E6 se seleccionó de manera aleatoria a FAM83H-AS1 y demostraron que la oncoproteína E6 y el coactivador CBP-P300 participan en su

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

regulación (Barr *et al.*, 2019). Por otro lado en otro estudio, se demostró que E6 regula la expresión del LncRNA TMPOP2 degradando a p53 (He *et al.*, 2019).

Por otra parte, en este estudio exploramos *in silico* la posible regulación de expresión positiva del LncRNA MINCR en los modelos *in vitro*, para esto usamos bases de datos públicas como la base de datos JASPAR, e identificamos tres sitios de unión del FT SP1 en el promotor de MINCR. Como se ha descrito por Sen y colaboradores, SP1 forma un complejo con p53, sin embargo, cuando existe una infección por VPH-16, E6 forma un complejo con E6AP, la cual degrada a p53 por la vía del proteasoma 26S, liberando y translocando a SP1 al núcleo para su unión a una región consenso de citocinas localizadas en el promotor de las metiltransferasas de DNA (DNMTs) e incrementando su expresión (Sen, 2018). Existen evidencias que muestran que el factor de transcripción SP1 induce la expresión del LncRNA LINC01234 relacionado con el aumento de OTUB1 en líneas celulares de cáncer de pulmón (Xie *et al.*, 2019), así como de FOXD3-AS1, un LncRNA que está involucrado en la tumorigenesis del CC a través de la vía de interacción FOXD3-AS1/miRNA-296-5p/HMGA1 (Ma *et al.*, 2021). Por otra parte, se ha reportado que SP1 es capaz de reclutar a histonas acetilasas (HAT) y desacetilasas (HDAC) conduciendo a la acetilación de histonas de nucleosomas adyacentes a la región de la cromatina y como resultado facilita la transcripción. Interesantemente, la unión de E6 con la HAT p300 induce la expresión del LncRNA FAM83H-AS1 y favorece la proliferación y migración celular en modelos de células de CC (Barr *et al.*, 2019). Se ha informado que el FT MYC, regula la expresión del 15% de todos los genes codificadores de proteínas humanas, así como algunos genes no codificantes (Winkle *et al.*, 2015). Hace unos años, Doose y colaboradores descubrieron que el LncRNA inducido por MYC (MINCR) era capaz de modular la red transcripcional de MYC (c-Myc) en células de linfoma de Burkitt. Por lo tanto, decidimos explorar si el FT MYC tenía sitios de unión en el

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

promotor de MINCR e interesantemente encontramos un sitio de unión. Se ha demostrado que E6 se une a MYC, induciendo modificaciones epigenéticas en el promotor de hTERT aumentando su expresión (Zhang *et al.*, 2017). De acuerdo a nuestro análisis, identificamos tres secuencias de unión de SP1 y una secuencia de unión a MYC río arriba de la región promotora de MINCR, lo que indica que este LncRNA podría estar siendo regulada su expresión por SP1 y MYC en nuestros modelos de C33-A que expresan a las variantes de E6 de VPH-16.

En la mayoría de los estudios se ha observado que el LncRNA MINCR, participa regulando indirectamente la expresión de los mRNAs blancos mediante la función ceRNAs al ser esponjas de miRNAs. Los miRNAs son reguladores críticos de la expresión génica, pueden guiar a los miRISC para que apunten a los mRNA mediante el emparejamiento de bases con las regiones 3' no traducidas (UTR) de los mRNA, lo que da como resultado la degradación o represión traduccional de los mRNA objetivos (Jonas and Izaurralde, 2015). Por lo tanto, se realizó un análisis bioinformático para predecir las redes de interacción de MINCR/miRNAs/mRNAs con la finalidad de proporcionar evidencias que apoyen los posibles mecanismos o funciones de MINCR. Los resultados mostraron la interacción de un total de 119 genes codificantes y 5 microRNAs como posibles moléculas con las que interactúa el LncRNA MINCR. Dichos genes fueron usados para obtener las posibles ontologías biológicas en las que podrían participar MINCR/miRNAs/mRNAs. De manera interesante, estos mRNAs están asociados en procesos celulares que contribuyen al desarrollo del cáncer como la proliferación, adhesión, ciclo y migración celular.

En este sentido, con base a la evidencia funcional, experimental y bioinformática de MINCR, realizamos el silenciamiento de MINCR en C33-A/AA-c con 5 pmoles de siRNA de acuerdo a nuestra curva dosis respuesta con 24 horas post-

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

transfección. Encontramos un silenciamiento del 69% de MINCR a una concentración de 5 pmoles.

Al evaluar el papel de MINCR en la migración celular, encontramos que silenciamiento de MINCR disminuye la migración celular en células C33-A/AA-c. Posiblemente, la regulación en la expresión de moléculas que participan en la red de interacción MINCR/miRNAs/mRNA, podría ser la causa de la disminución de la migración celular. MINCR, funciona como ceRNA para múltiples miRNAs en diferentes tipos de cáncer. En las diferentes evidencias experimentales, al disminuir la expresión de MINCR, se restaura la expresión de miRNAs y por lo tanto, se disminuye la expresión de los genes objetivos de los miRNAs, y como consecuencia podría disminuir la migración celular.

## CONCLUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que las células que expresan E6 de las variantes del VPH-16 incrementan la expresión del lncRNA MINCR y las evidencias experimentales y bioinformáticas aquí mostradas indican que probablemente los factores de transcripción SP1 y MYC regulan la expresión de MINCR a nivel transcripcional, a través de la unión a su región promotora. Por último, la disminución de la migración en C33-A/AA-c podría ser a causa de la restauración de la función de miRNAs en sus genes blancos, por efecto del silenciamiento de MINCR.

## PERSPECTIVAS

- Determinar la expresión de los factores de transcripción SP1 y MYC a nivel de mensajero y proteína.
- Realizar una correlación entre la expresión de SP1, MYC y MINCR.
- Evaluar la expresión genes involucrados en la migración celular.
- Evaluar el efecto de la disminución de MINCR en la proliferación celular.

## REFERENCIAS

- Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384(2), 260–265.
- Seedorf, K., Krämmer, G., Dürst, M., Suhai, S., & Röwekamp, W. G. (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 145(1), 181–185.
- Yang, J., Jiang, B., Hai, J., Duan, S., Dong, X., and Chen, C. (2019). Long noncoding RNA opa-interacting protein 5 antisense transcript 1 promotes proliferation and invasion through elevating integrin  $\alpha 6$  expression by sponging miR-143-3p in cervical cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 120(1), 907–916.
- Ortiz-Ortiz, J., Alarcón-Romero, L., Jiménez-López, M. A., Garzón-Barrientos, V. H., Calleja-Macías, I., Barrera-Saldaña, H. A., Leyva-Vázquez, M. A., & Illades-Aguiar, B. (2015). Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology journal*, 12, 29.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., et al., (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research*, 22(9), 1775-89.
- Zhang, P. F., Wang, F., Wu, J., Wu, Y., Huang, W., Liu, D., et al. (2019). LncRNA SNHG3 induces EMT and sorafenib resistance by modulating the miR-128/CD151 pathway in hepatocellular carcinoma. *Journal of cellular physiology*, 234(3), 2788–2794.
- Aalijahan, H., & Ghorbian, S. (2019). Long non-coding RNAs and cervical cancer. *Experimental and molecular pathology*, 106, 7–16.
- Evans, J., Feng, F., Chinnaiyan, A., (2016). The bright side of dark matter: lncRNAs in cancer. *J Clin Invest*;126:2775-2782.
- Zhong, Q., Chen, Y., & Chen, Z. (2020). LncRNA MINCR regulates irradiation resistance in nasopharyngeal carcinoma cells via the microRNA-223/ZEB1 axis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 19(1), 53–66.
- Doose, G., Haake, A., Bernhart, S. H., López, C., Duggimpudi, S., Wojciech, F., et al. (2015). MINCR is a MYC-induced lncRNA able to modulate MYC's transcriptional network in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), E5261–E5270.
- Barr, J., Hayes, K., Brownmiller, T., Harold, D., Jagannathan, R., et al., (2019). Long non-coding RNA FAM83H-AS1 is regulated by human papillomavirus 16 E6 independently of p53 in cervical cancer cells. *Scientific reports*, 9(1), 3662.

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R.D., Sylla, B.S., *et al.* (2012). Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virology*, 86: 6855-6861.

Doorbar, J., Egawa N., Griffin, H., Kranjec, C., Murakami, I. (2016). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.*;25:2–23.

He, H., Liu, X., Liu, Y., Zhang, M., Lai, Y., *et al.*, (2019). Human Papillomavirus E6/E7 and Long Noncoding RNA TMPOP2 Mutually Upregulated Gene Expression in Cervical Cancer Cells. *J Virol.*;93(8)

Xie, J. J., Guo, Q. Y., Jin, J. Y., & Jin, D. (2019). SP1-mediated overexpression of lncRNA LINC01234 as a ceRNA facilitates non-small-cell lung cancer progression via regulating OTUB1. *Journal of cellular physiology*, 234(12), 22845–22856

Zacapala-Gómez, A., Del Moral-Hernández, O., Villegas-Sepúlveda, N., Hidalgo-Miranda, A., Romero-Córdoba, S., Beltrán-Anaya F., *et al.* (2016). Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *J Virology*. 488:187-95.

Wang, S. H., Yang, Y., Wu, X. C., Zhang, M. D., Weng, M. Z., Zhou, D. *et al.* (2016). Long non-coding RNA MINCR promotes gallbladder cancer progression through stimulating EZH2 expression. *Cancer letters*, 380(1), 122–133.

Cao, J., Zhang, D., Zeng, L., & Liu, F. (2018). Long noncoding RNA MINCR regulates cellular proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 102, 102–106.

Rodríguez-Ruiz, H. A., Garibay-Cerdenares, O. L., Illades-Aguilar, B., Montaña, S., Jiang, X., & Leyva-Vázquez, M. A. (2019). In silico prediction of structural changes in human papillomavirus type 16 (HPV16) E6 oncoprotein and its variants. *BMC molecular and cell biology*, 20(1), 35.

Doose, G., Haake, A., Bernhart, S. H., López, C., Duggimpudi, S., Wojciech, F., Bergmann, A. K., *et al.* (2015). MINCR is a MYC-induced lncRNA able to modulate MYC's transcriptional network in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), E5261–E5270.

Wang, J., Ding, M., Zhu, H., Cao, Y., & Zhao, W. (2019). Up-regulation of long noncoding RNA MINCR promotes non-small cell of lung cancer growth by negatively regulating miR-126/SLC7A5 axis. *Biochemical and biophysical research communications*, 508(3), 780–784.

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

Jin, Z., Zhou, S., Ye, H., Jiang, S., Yu, K., et al., (2019). The mechanism of SP1/p300 complex promotes proliferation of multiple myeloma cells through regulating IQGAP1 transcription, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 119, 109434, ISSN 0753-3322.

Winkle, M., van den Berg, A., Tayari, M., Sietzema, J., Terpstra, M., Kortman, G., et al. (2015). Long noncoding RNAs as a novel component of the Myc transcriptional network. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(6), 2338–2346.

Ma, W. G., Shi, S. M., Chen, L., Lou, G., & Feng, X. L. (2021). SP1-induced lncRNA FOXD3-AS1 contributes to tumorigenesis of cervical cancer by modulating the miR-296-5p/HMGA1 pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 122(2), 235–248.

Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature reviews. Genetics*, 16(7), 421–433.

Lyu, Q., Jin, L., Yang, X., & Zhang, F. (2019). LncRNA MINCR activates Wnt/ $\beta$ -catenin signals to promote cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma. *Pathology, research and practice*, 215(5), 924–930.

Global cancer observatory (2020). Estimated number of new cases in 2020, worldwide, all cancer, female, all ages. Obtenida el 15 de noviembre de 2020, de <https://gco.iarc.fr/>.

Cuninghame, S., Jackson, R., Lees, S. J., & Zehbe, I. (2017). Two common variants of human papillomavirus type 16 E6 differentially deregulate sugar metabolism and hypoxia signalling in permissive human keratinocytes. *The Journal of general virology*, 98(9), 2310–2319.

Jackson, R., Togtema, M., Lambert, P. F., & Zehbe, I. (2014). Tumourigenesis driven by the human papillomavirus type 16 Asian-American e6 variant in a three-dimensional keratinocyte model. *PloS one*, 9(7), e101540.

Dong, J., Su, M., Chang, W., Zhang, K., Wu, S., et al. (2017). Long non-coding RNAs on the stage of cervical cancer (review). *Oncol Rep.* 38:1923–31.

Kent, W., Sugnet, C., Furey, T., Roskin, K., Pringle, T., Zahler, A., et al. (2002). El navegador del genoma humano en UCSC . *Genome Res* 12 , 996–1006.

Chen, S., Gu, T., Lu, Z., Qiu, L., Xiao, G., Zhu., et al. (2019). Roles of MYC-targeting long non-coding RNA MINCR in cell cycle regulation and apoptosis in non-small cell lung Cancer. *Respiratory research*, 20(1), 202

## Caracterización *in silico* y molecular del LncRNA MINCR y su posible papel en la migración en células C33-A/AA-c de E6 del VPH-16

---

Arun, G., Diermeier, S., y Spector, D., (2018). Therapeutic Targeting of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Trends in molecular medicine*, 24(3), 257–277.

Javier-Gonzalez D. Efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 en la apoptosis inducida por cisplatino (Tesis de maestría). Chilpancingo de los Bravo: Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero; 2019.

Sen, P., Ganguly, P., y Ganguly, N. (2018). Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. *Oncology letters*, 15(1), 11–22.

Xie, J. J., Guo, Q. Y., Jin, J. Y., y Jin, D. (2019). SP1-mediated overexpression of lncRNA LINC01234 as a ceRNA facilitates non-small-cell lung cancer progression via regulating OTUB1. *Journal of cellular physiology*, 234(12), 22845–22856.

Jin, Z., Zhou, S., Ye, H., Jiang, S., Yu, K., y Ma, Y. (2019). The mechanism of SP1/p300 complex promotes proliferation of multiple myeloma cells through regulating IQGAP1 transcription. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 119, 109434.

García-de Jesús, L., y Maldonado-Maldonado, L. Nivel de expresión de los RNAs largos no codificantes CASC15, MINCR, ZNF667-AS1 y EZR-AS1 en líneas celulares de Cáncer Cervical (tesis de licenciatura) Chilpancingo de los Bravo: Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero; 2020.