
TRABAJO FIN DE MÁSTER

MODALIDAD B: Proyecto de investigación

Estudio sobre la regulación de la expresión de miR-34a por el lncRNA MALAT1 en cáncer de esófago

Estudo sobre a regulación da expresión de miR-34a polo lncRNA MALAT1 no cancro de esófago

Regulation of miR-34a expression by lncRNA MALAT1 in esophageal cancer

Autora: Nuria Ferrando Monllor

Curso: 2019/2020

Directoras: M^a Esperanza Cerdán Villanueva y Aida Barreiro Alonso

**BARREIRO
ALONSO AIDA
INES - DNI
47385238V**

Firmado digitalmente por BARREIRO ALONSO AIDA INES - DNI 47385238V
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=UNIVERSIDAD DE A CORUÑA, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=BIOLOXIA, ou=45870, serialNumber=IDCES-47385238V, sn=BARREIRO ALONSO, givenName=AIDA INES, cn=BARREIRO ALONSO AIDA INES - DNI 47385238V
Fecha: 2020.09.16 22:25:28 +01'00'

**FERRANDO
MONLLOR
NURIA -
21690645N**

Firmado digitalmente por FERRANDO MONLLOR NURIA - 21690645N
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-21690645N, givenName=NURIA, sn=FERRANDO MONLLOR, cn=FERRANDO MONLLOR NURIA - 21690645N
Fecha: 2020.09.15 21:58:36 +01'00'

**CERDAN
VILLANUEVA
MARIA
ESPERANZA -
DNI 15811374R**

Firmado digitalmente por CERDAN VILLANUEVA MARIA ESPERANZA - DNI 15811374R
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=UNIVERSIDAD DE A CORUÑA, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=BIOLOXIA, ou=4845, serialNumber=IDCES-15811374R, sn=CERDAN VILLANUEVA, givenName=MARIA ESPERANZA, cn=CERDAN VILLANUEVA MARIA ESPERANZA - DNI 15811374R
Fecha: 2020.09.17 10:15:38 +02'00'

ÍNDICE

1. Resumen estructurado	2
2. Antecedentes y estado de la cuestión	3
2.1. Papel de los lncRNAs	4
2.1.1 <i>LncRNA MALAT1</i>	5
2.2. siRNA y microRNAs	5
2.2.1. <i>Silenciamiento de genes por siRNA</i>	5
2.2.2. <i>Silenciamiento de genes por miRNA</i>	6
2.2.2.1. <i>miR-34a</i>	8
3. Hipótesis	8
4. Objetivos	9
5. Metodología	9
5.1 Muestras de estudio	9
5.2. Líneas celulares	9
5.3. Análisis de los niveles de MALAT1 y miR-34a de las líneas celulares y muestras clínicas	10
5.4. Confirmación de la unión específica y la correlación negativa entre MALAT1 y miR-34a en la progresión de EC y su efecto sobre c-Myc y Met	11
5.4.1. <i>Ensayo por qPCR</i>	11
5.4.2. <i>Ensayo de la Luciferasa</i>	11
5.5. Confirmación de la unión directa y específica de MALAT1 a miR-34a en células de cáncer de esófago	14
5.5.1. <i>Biotin pull-down assay</i>	14
5.6. Confirmación de si MALAT1 y miR-34a están presentes en el mismo complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC)	15
5.6.1. <i>Ensayo de inmunoprecipitación de proteínas y qPCR</i>	15
6. Plan de trabajo	16
7. Cuestiones éticas	17
8. Aplicabilidad	18
9. Plan para la difusión de resultados	18
10. Recursos necesarios	18
10.1. Infraestructura (aparatos y servicios)	18
10.1.1. <i>Aparatos-equipos</i>	19
10.2. Fungibles	19
10.2.1. <i>Material específico del estudio</i>	19
10.2.2. <i>Reactivos y fungibles</i>	20
11. Bibliografía	23
11.1. <i>Bibliografía citada en el proyecto</i>	23
11.2. <i>Otra bibliografía consultada</i>	27

1. Resumen estructurado

El cáncer de esófago (EC), es una enfermedad que causa una gran cantidad de muertes en todo el mundo. Se ha observado que, en múltiples cánceres, los RNA largos no codificantes (lncRNAs) y los microRNAs, juegan papeles críticos en la progresión de los tumores. No obstante, su actuación a nivel molecular no ha sido descubierta en su totalidad. Este estudio plantea una metodología para explorar la posible función y mecanismos asociados del lncRNA MALAT1 en el desarrollo del cáncer de esófago, centrándose en su interacción con el microRNA miR-34a. Como objetivos, se cuantificará en primer lugar por qPCR, la expresión de MALAT1 y miR-34a tanto en tejidos como en líneas celulares sanas y de EC. Una vez conocida la expresión, se estudiará el papel de MALAT1 en la progresión de EC, inhibiendo su expresión en la línea celular correspondiente y cuantificando tanto la expresión de MALAT1 como de miR-34a nuevamente por qPCR. Además, también se estudiará en la línea celular de EC mediante el ensayo de la luciferasa, el efecto de dicha inhibición sobre miR-34a y los oncogenes c-Myc y Met. Con el ensayo de la luciferasa, se estudiará también el efecto de miR-34a sobre c-Myc y Met, así como la especificidad de la unión de MALAT1 y miR-34a, estudio que también se reforzará con el ensayo *biotin pull down*. Por último, se llevará a cabo un ensayo de inmunoprecipitación para estudiar la presencia de MALAT1 y miR-34a en el mismo complejo RISC (Ago2).

Abstract

Esophageal cancer (EC) is a malignancy that causes a lot of mortality worldwide. It is observed, that both microRNAs and long non-coding RNAs (lncRNAs) have critical roles in the progression of tumors. However, the underlying molecular mechanism has not been fully characterized. The present study aimed to explore the function and associated mechanisms of lncRNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript1 (MALAT1) in EC development by focusing on its interaction with miR-34a. The objectives will be, in the first place, the quantification of MALAT1 and miR-34a expression in tissues, healthy cell lines and EC. Once the expression is known, the role of MALAT1 in the progression of EC will be studied, inhibiting its expression in the corresponding cell line and quantifying the expression of MALAT1 and miR-34a again by qPCR. In addition, the effect of such inhibition on miR-34a, c-Myc and Met, will also

be studied in the EC cell line through the luciferase assay. With the luciferase assay, the effect of miR-34a on c-Myc and Met, as well as the specificity of the MALAT1 and miR-34a junction, will also be studied. This study, will also be reinforced with the biotin pull down experiment. Finally, an immunoprecipitation test will be conducted to study the presence of MALAT1 and miR-34a in the same RISC complex (Ago2).

Resumo

O cancro de esófago (EC) é unha enfermidade que causa un gran número de mortes en todo o mundo. En varios cancros, demostrouse que os lncRNAs e os microARN xogan un papel crítico na progresión do tumor. Non obstante, a súa acción a nivel molecular non se descubriu completamente. Este estudo propón unha metodoloxía para explorar o posible papel e os mecanismos asociados do lncRNA MALAT1 no desenvolvemento do cancro de esófago, centrándose na súa interacción co microRNA miR-34a. Como obxectivos, a expresión de MALAT1 e miR-34a cuantificarase primeiro por qPCR tanto nos tecidos como nas liñas celulares saudables e EC. Unha vez coñecida a expresión, estudarase o papel de MALAT1 na progresión do EC, inhibindo a súa expresión na liña celular correspondente e cuantificando tanto a expresión de MALAT1 como a miR-34a de novo por qPCR. Ademais, o efecto da devandita inhibición sobre miR.34a e os oncoxenes c-Myc e Met tamén se estudará na liña celular EC mediante o ensaio da luciferase. Co ensaio da luciferase, tamén se estudará o efecto do miR-34a sobre c-Myc e Met, así como a especificidade da unión de MALAT1 e miR-34a, un estudo que tamén se reforzará co ensaio de *biotin pull down*. Finalmente, levarase a cabo un ensaio de inmunoprecipitación para estudar a presenza de MALAT1 e miR-34a no mesmo complexo RISC (Ago2).

2. Antecedentes y estado de la cuestión

De todas las enfermedades debidas a tumores, el cáncer de esófago (EC) es el sexto en cuanto a mortalidad (1). Se pueden distinguir dos tipos principales de EC: carcinoma de células escamosas del esófago (ESCC) o adenocarcinoma de esófago (EAC). El EAC es el tipo más común en los países occidentales, mientras que el ESCC es el principal cáncer de esófago en países asiáticos y predomina generalmente sobre el EAC en todo el mundo

(2-3). A pesar de las numerosas diferencias entre los dos subtipos de EC, su tratamiento es muy similar: esofagectomía combinada con quimioterapia perioperatoria o quimiorradioterapia neoadyuvante. Con este procedimiento se han obtenido mejoras considerables en la supervivencia de los pacientes y actualmente es el tratamiento estándar para cáncer de esófago (4-5). No obstante, el EC es un tumor maligno caracterizado por presentar una severa agresividad, lo que resulta en una tasa de supervivencia general de 5 años para el 35 – 47% de los afectados (5-8). Además, se han observado diferencias notables en la respuesta al tratamiento de los pacientes, lo que ha elevado la demanda de terapias más personalizadas contra el EC. Por este motivo, es necesaria la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el EC.

2.1. Papel de los lncRNAs

Recientemente, los RNAs no codificantes (ncRNAs), han adquirido importancia como una potencial herramienta para la identificación y tratamiento de cánceres incluyendo el de esófago (9-10). Concretamente, numerosos trabajos se han centrado en el estudio de los *long non-coding* RNAs (lncRNAs), ya que se ha demostrado que están implicados en una gran variedad de procesos biológicos y juegan un papel importante en la oncogénesis y progresión tumoral (11-14). Los lncRNAs son RNA celulares endógenos que tienen más de 200 nucleótidos de longitud (14-15) e inicialmente se consideraban como “ruido” transcripcional dados sus niveles de expresión relativamente bajos en comparación con los RNA mensajeros y el hecho de no poder codificar proteínas (16). No obstante, en estudios recientes se ha revelado que los lncRNAs poseen algunas características de los mRNAs, como que los lncRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II y contienen un promotor y estructura consistente en múltiples exones (16-18). Cada vez hay más pruebas que evidencian que los lncRNAs pueden actuar como promotores o supresores tumorales y constituyen una nueva clase de biomarcadores tumorales o dianas terapéuticas (18).

Diferentes estudios basados en microarrays y secuenciación del RNA (RNA-seq), han revelado información sobre la relación de los lncRNAs y la progresión tumoral en el cáncer de esófago. Se ha visto, por ejemplo, que los lncRNAs PVT1, AFAP1-AS1 y FAL1, están estrechamente relacionados con el desarrollo del tumor, demostrando la potencialidad de los lncRNAs como futuras dianas para el desarrollo de terapias contra el EC (19).

2.1.1 LncRNA MALAT1

Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1), es otro lncRNA bien estudiado y que se encuentra localizado en el cromosoma 11q13.1 (20-21). Se ha demostrado que este lncRNA, es un marcador biológico de pronóstico para diferentes tipos de cáncer como el de pulmón, hígado y renal (22). Estudios recientes muestran que el nivel de MALAT1 es anormalmente alto en la mayoría de muestras de EC y está relacionado con un mal pronóstico de pacientes con EC (23). No obstante, actualmente sólo hay información preliminar del papel de MALAT1 en la progresión del EC. La señalización celular desencadenada por MALAT1 todavía se desconoce.

2.2. siRNA y microRNAs

Dentro de los RNA no codificantes de proteínas, además de los lncRNAs, existen otros tipos entre los que podemos encontrar: el siRNA y los microRNAs.

2.2.1. Silenciamiento de genes por siRNA

Los RNA pequeños interferentes (siRNA), son moléculas de RNA que suprimen la expresión de genes específicos, promoviendo la degradación del RNA mensajero (mRNA). Este mecanismo, consiste en el reconocimiento del RNA bicatenario (dsRNA), ya sea transcrito de genes celulares, patógenos infecciosos o introducido artificialmente en la célula, por la enzima Dicer. Esta enzima, se encarga de cortar el dsRNA en varios fragmentos de alrededor de 22 nucleótidos de longitud y, estos dsRNAs pequeños que pasan a denominarse siRNAs, interactuarán con el complejo silenciador inducido por RNA (RISC) activándolo. De las dos hebras del siRNA, este complejo degradará la directa y seleccionará la reversa (antisense), que utilizará como guía para encontrar el mRNA complementario y cortarlo (Figura 1). El componente activo del complejo RISC, es una proteína de la familia de las endonucleasas denominadas Argonautas, que son las encargadas de cortar la hebra de mRNA diana complementaria al siRNA que está asociada al RISC. Dado que la hebra guía solamente se unirá al mRNA que sea totalmente complementario, el siRNA causará un silenciamiento específico de genes (24-25). Aunque existen diferentes proteínas de la familia Argonauta (Ago1, Ago2 y Ago3), en mamíferos solamente Ago2 puede formar complejos RISC capaces de fragmentar el mRNA diana. Por este motivo, en este estudio se empleará Ago2 para verificar si MALAT1 y miR-34a están presentes en el mismo complejo RISC.

2.2.2. *Silenciamiento de genes por miRNA*

Los miRNA, también inhiben la expresión de genes en un nivel post-transcripcional. No obstante, a pesar de que intervienen enzimas comunes (Dicer y RISC), los efectos de silenciamiento de genes de los siRNA y miRNA son diferentes. La principal distinción entre ambos, es que mientras los siRNA inhiben la expresión de un mRNA en concreto, los miRNA regulan la expresión de múltiples mRNA. El pre-miRNA es procesado en el citoplasma por Dicer, convirtiéndolo en un miRNA dúplex de 18 -25 nucleótidos. A continuación, el miRNA se asocia con RISC formando el complejo miRISC. El miRNA se desenrolla, liberando y descartando la hebra directa. A diferencia del proceso de siRNA, donde Ago2 provoca la escisión de la hebra directa del siRNA, el miRNA monocatenario maduro guía el miRISC al mRNA diana (Figura 1). El miRNA se une a los mRNA diana a través de la unión parcial de bases complementarias resultando en que el silenciamiento del gen diana se produce mediante la represión, degradación y/o escisión traduccional (26-27).

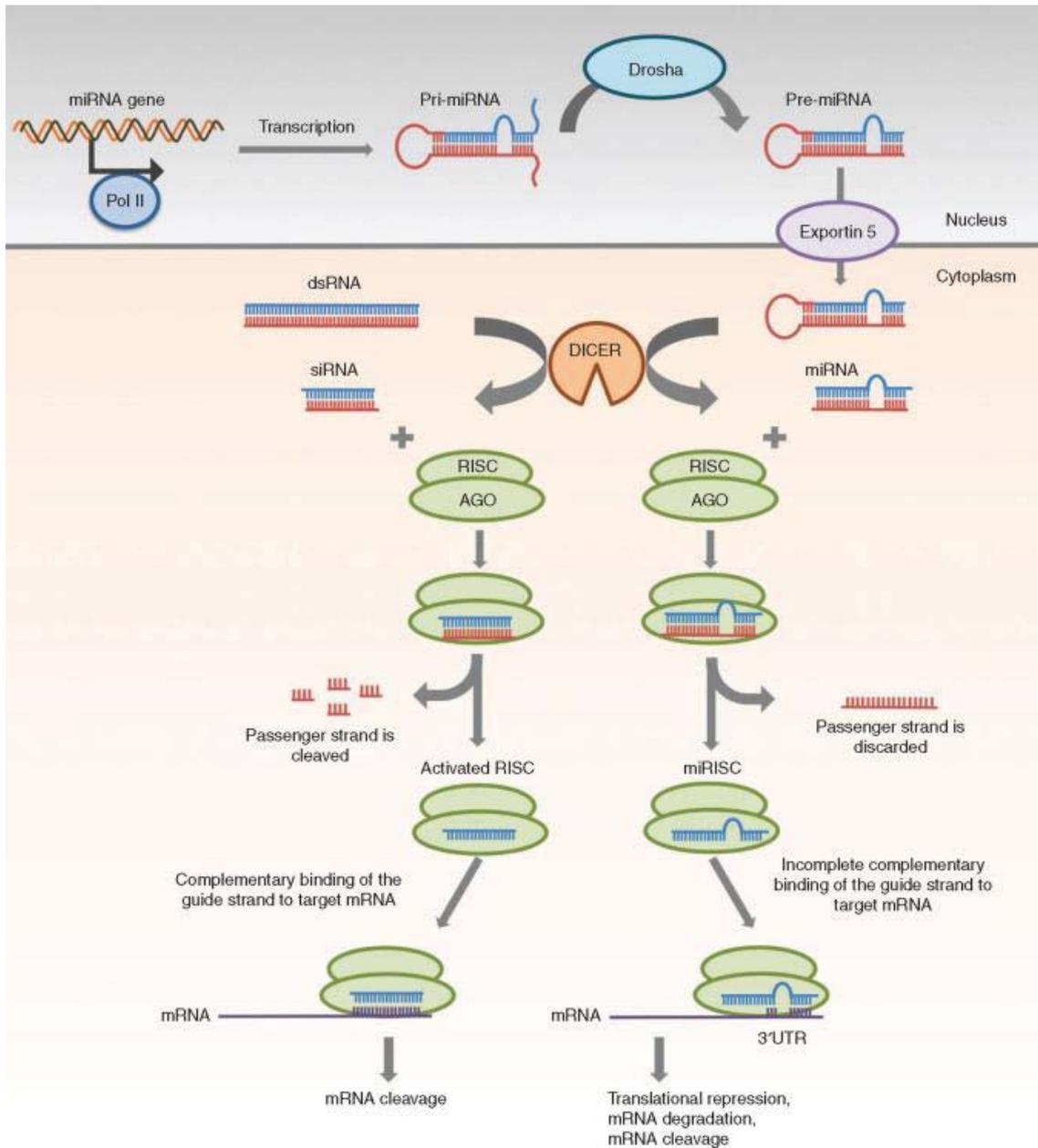


Figura 1. Mecanismo de silenciamiento de genes por siRNA y miRNA. **siRNA:** El dsRNA (ya sea transcrito o introducido artificialmente), es procesado por Dicer a siRNA, el cual se asocia con el complejo RISC. El componente de RISC, Ago2, degradará la hebra directa del siRNA y la hebra reversa actuará como guía para dirigir el complejo RISC activado al mRNA diana. **miRNA:** La RNA polimerasa II, realizará la transcripción del gen miRNA en el núcleo para obtener un pri-miRNA que será cortado por la enzima Drosha resultando en un pre-miRNA. El pre-miRNA será transportado por la Exportina 5 del núcleo al citoplasma, donde será procesado por Dicer a miRNA. El miRNA se asociará a RISC, la hebra directa será descartada y el miRNA monocatenario maduro, guiará el complejo miRISC al mRNA diana. La unión del complejo miRISC al mRNA diana será parcialmente complementaria y el mRNA diana será silenciado por represión, degradación y/o escisión traduccional (28)

2.2.2.1. miR-34a

En los últimos años, ha habido evidencias de que los lncRNAs participan en la red de RNAs competitivos endógenos (ceRNA) y funcionan como esponjas endógenas, uniéndose a los miRNA para regular su función (29-30). Un estudio reciente ha demostrado que uno de los miRNAs regulados por MALAT1, miR-34a, actúa como un supresor de tumores, en parte, vía la ruta SIRT1-p53 (31). Por lo tanto, la desregulación de miR-34a podría estar involucrada en el desarrollo de algunos cánceres (32 y 33). El gen c-Myc está a menudo, expresado constitutivamente en tumores malignos y se cree que la proteína codificada regula la expresión del 15% de todos los genes del genoma humano (34). Algunos de estos genes están involucrados en la proliferación celular, metástasis y apoptosis, contribuyendo así al desarrollo del cáncer (35-37). Por otro lado, el proto-oncogen *Met* codifica la proteína Met, un receptor miembro de la familia tirosina-quinasa. Una activación anormal de Met en cáncer, está relacionada con un pronóstico desfavorable, probablemente porque la sobreactivación de Met se asocia con el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis (38-41). Met está desregulado en muchos tipos de tumores malignos, incluyendo cáncer de mama, pulmón, vejiga, carcinoma hepatocelular y melanoma (42-47). Hasta la fecha, todavía no está claro si MALAT1 afecta a los niveles de expresión de c-Myc y Met a través de un RNA endógeno competitivo de miR-34a.

3. Hipótesis

Estudios recientes muestran que el nivel de lncMALAT1 es anormalmente alto en la mayoría de muestras de EC y está relacionado con un mal pronóstico de pacientes con EC (22).

Con esta premisa, en el proyecto se pretenden analizar las siguientes hipótesis que corroborarían que el mecanismo de acción de MALAT1 en cáncer de esófago es similar al recientemente descrito en melanoma (48), lo que permitiría el establecimiento de nuevas vías de terapia:

- MALAT1 inhibe la expresión de miR-34a en células de EC.
- MALAT1 y miR-34a interactúan en células de EC.
- miR-34a modula la abundancia de c-Myc y Met en líneas celulares de EC.

- MALAT1 y miR-34a se encuentran presentes en el mismo complejo RISC (Ago2).

4. Objetivos

1. Analizar los niveles de MALAT1 y miR-34a en las líneas celulares de EC y muestras clínicas seleccionadas para este proyecto.
2. Estudiar el papel de MALAT1 en la progresión de EC inhibiendo la expresión de MALAT1 en la línea celular de EC y estudiando su efecto sobre la expresión de miR-34, c-Myc y Met, en células de EC.
3. Estudiar el efecto de miR-34 sobre c-Myc y Met en células de EC.
4. Estudiar la posible interacción entre MALAT1 y miR-34a en EC.
5. Estudiar la posible participación de MALAT1 y miR-34a en el mismo complejo RISC (Ago2).

5. Metodología

5.1 Muestras de estudio

Se emplearán 50 muestras de biopsias de tejidos tumorales de pacientes con cáncer de esófago (25 mujeres y 25 hombres preferiblemente) y 50 muestras de tejidos esofágicos adyacentes no tumorales. La edad esperada de los pacientes será entre 65 y 74 años ya que es la franja de edad donde hay mayor probabilidad de casos (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/esoph.html>); dichos pacientes no habrán recibido quimioterapia o radioterapia antes de la cirugía para la toma de muestra. Las muestras de tejido serán congeladas antes de que pasen 30 minutos de la cirugía y se almacenarán en nitrógeno líquido hasta su uso.

5.2. Líneas celulares

Para los estudios con células inmortalizadas en cultivo, se utilizará una línea celular de células epiteliales sanas de esófago humanas, como por ejemplo Het-1A del American Type Culture collection (ATCC), con número de catálogo CRL-2692 y una línea celular humana de EC como por ejemplo KYSE-410 del Public Health England, con número de catálogo 94072023. Para cultivar la línea celular Het-1A, se utilizará el kit *BEGM Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BulletKit* (Lonza Corporation), que incluye el

medio basal BEBM y los aditivos extracto pituitario bovino (BPE), hidrocortisona, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), epinefrina, transferrina, insulina, ácido retinoico, triyodotironina y gentamicina/anfotericina-B. Por otro lado, la línea celular KYSE-410, se cultivará en medio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) al que se le añadirá un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Thermo Fisher Scientific Inc.), 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) y 100 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich; Merck KGaA). Las células se incubarán en una estufa a 37°C de temperatura y un 5% de CO₂.

5.3. Análisis de los niveles de MALAT1 y miR-34a de las líneas celulares y muestras clínicas

El RNA total de las líneas celulares y muestras clínicas, se extraerá empleando el método de *TriZol*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc.) Se analizará 1 µg de RNA por PCR de transcripción reversa empleando el *Kit Reverse Transcription System* (Promega) para conseguir moldes de ADNc siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, los moldes se utilizarán para analizar por qPCR, los niveles de MALAT1 y miR-34a. La qPCR se llevará a cabo empleando el *Kit QuantiTect SYBR Green PCR* (Qiagen GmbH) y el equipo *QuantStudio 3 Real-Time PCR system* (Thermo Fisher Scientific Inc.). La PCR se efectuará en un volumen final de 20 µL: 10 µL de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (concentración final 1X), 0.5 µL de cada uno de los cebadores (concentración final de 0.5 µM), 2 µL de ADNc y 4 µL de agua RNasa-free. El perfil térmico empezará con una activación de la polimerasa HotStart a 95°C durante 15 minutos y a continuación, 40 ciclos de 94°C (15 s), 55°C (25s) y 72°C (30 s). Además de analizar los niveles de MALAT1 y miR-34a, en esta qPCR se analizarán también los niveles del RNA nuclear pequeño U6 y el gen *GAPDH* como controles internos para poder realizar una cuantificación relativa de los niveles de miRNA y mRNA, respectivamente. Por tanto, se utilizarán 4 grupos de cebadores (sintetizados por Thermo Fisher Scientific Inc.), con las siguientes secuencias (Tabla 1.):

	Cebador directo	Cebador reverso
MALAT1	5'-TCCAGAAAGAGGGAGTTG-3'	5'-GAAGCCAGACCCAGTAAG-3'
miR-34a	5'-TGCCAGTGTCTTAGCTGGTTGT-3'	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTC-3'

U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
GADPH	5'-CCATGCCATCACTGCCACCC-3'	5'-GCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG-3'

El análisis de la expresión relativa de los genes, se efectuarán aplicando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a los resultados (49). Todas las reacciones se analizarán por triplicado.

El resultado esperado, a fin de confirmar estudios previos, será que los niveles de MALAT1 estarán más elevados en la línea celular y tejidos de EC que en la control y tejido sano, mientras que en los niveles de miR-34a ocurrirá lo contrario.

5.4. Confirmación de la unión específica y la correlación negativa entre la expresión de MALAT1 y miR-34a en la progresión de EC y su efecto sobre c-Myc y Met

5.4.1. *Ensayo por qPCR*

Este ensayo nos permitirá saber si también en cáncer de esófago hay una correlación negativa entre la expresión de MALAT1 y miR-34a. De ser así se esperaría que al inhibir la expresión de MALAT1, no exista regulación negativa del miR-34a y, por tanto, su expresión aumente.

El siRNA control y el siRNA de MALAT1, se podrán adquirir de Thermo Fisher Scientific Inc. La línea celular KYSE-410, se transfectará por un lado con el siRNA de MALAT1 y por el otro con el siRNA control. El RNA total se aislará de nuevo con el reactivo *TRIzol* y se analizará por qPCR empleando el mismo método que en el apartado anterior.

5.4.2 *Ensayo de la Luciferasa*

Este ensayo nos permitirá saber si se produce una unión entre lncRNA MALAT1 y miR-34a

Los siguientes miRNAs serán sintetizados por Qiagen GmbH:

- miR-34a
- Control negativo de miRNA (miR-NC)
- miR-34a mutante

- anti-miR-34a
- anti-miR34a-mut

Se diseñarán dos tipos de construcciones reporteras de la luciferasa para MALAT1 (Fig.2): una construcción luciferasa-MALAT1 wild-type (Luc-MALAT1-wt) y una construcción luciferasa-MALAT1 con mutaciones en el sitio de unión a miR-34a (Luc-MALAT1-mut). En esta construcción reportera la medida de actividad luciferasa es una medida de la cantidad de MALAT1 expresado. Para el diseño de esta mutación nos basamos en estudios previos llevados a cabo en melanoma (47). Estas mutaciones abarcarán una región de siete nucleótidos indicada en negrita en la Figura 2. Como se observa, la interacción entre miR-34a y MALAT1-wt es posible porque tienen secuencias complementarias, en cambio MALAT1-mut es un control negativo en el que no sería posible la interacción.

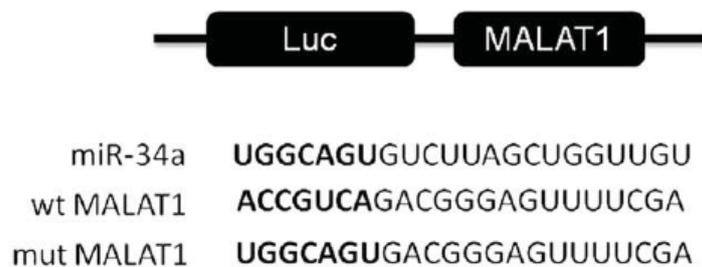


Figura 2. Construcciones reporteras de la luciferasa. Las letras en negrita representan los sitios de mutación (48).

Por otro lado, se diseñará también una construcción reportera de luciferasa para las regiones 3'-UTR no traducidas de c-Myc y c-Met, que nos permitirá saber si la traducción de los mRNAs de estos genes se ve afectada.

Las dos construcciones reporteras Luc-MALAT1-wt y mutante, serán subclonadas en plásmidos *psiCHECK-2* (Promega), y la línea celular KYSE-410, se transfectará con los distintos plásmidos derivados, empleando el reactivo *Lipofectamine 2000* (Thermo Fisher Scientific Inc.), según las instrucciones del fabricante. El ensayo de la luciferasa se llevará a cabo según el manual del kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Las células serán cotransfectadas con el miR-34a, una mutación del mismo y un control inespecífico (miR-NC), así como con los correspondientes anti-sentido. El plan de ensayo se distribuirá en los siguientes grupos y en cada uno de ellos se realizará la medida de la actividad relativa de la luciferasa con un luminómetro.

Ensayo	Medición de la actividad relativa de la luciferasa
A	Células KYSE-410, transfectadas con <i>psiCHECK-2</i> conteniendo wt-MALAT1 y cotransfectadas con el miRNA control (miR-NC), miR-34a o miR-34a-mut.
B	Células KYSE-410, transfectadas con <i>psiCHECK-2</i> conteniendo wt-MALAT1 y cotransfectadas con anti-miR-NC, anti-miR-34a o anti-miR-34a-mut.
C	Células KYSE-410, transfectadas con <i>psiCHECK-2</i> conteniendo wt-MALAT1 y MALAT1 mutado (Luc-MALAT1-mut), cotransfectadas con miR-34a.
D	Células KYSE-410, transfectadas con <i>psiCHECK-2</i> conteniendo wt-MALAT1 y MALAT1 mutado (Luc-MALAT1-mut), cotransfectadas con anti-miR-34a.
E	Células KYSE-410, transfectadas con <i>psiCHECK-2</i> conteniendo c-Myc, cotransfectado con miR-34a, wt-MALAT1 o MALAT1-mut.
F	Células KYSE-410, transfectadas con <i>psiCHECK-2</i> conteniendo c-Met cotransfectado con miR-34a, wt-MALAT1 o MALAT1-mut

Si MALAT1 actúa apantallando a miR-34a y el sitio de unión es específico, se esperará obtener:

A: Las células cotransfectadas con miR-34a, presentarán una menor actividad luciferasa del vector wt-MALAT1, en comparación con las cotransfectadas con miR-NC o miR-34a-mut. Esto será debido a que MALAT1 se estará uniendo a miR-34a.

B: Las células cotransfectadas con anti-miR-34a, presentarán una mayor actividad luciferasa del vector wt-MALAT1, en comparación con las cotransfectadas con miR-NC o miR-34a-mut. De nuevo, esto evidenciaría que MALAT1 se está uniendo a miR-34a.

C: En las células transfectadas con wt-MALAT1 y cotransfectadas con miR-34a, se esperará una disminución de la actividad de la luciferasa, por la unión entre ellos que se estará produciendo. Por otro lado, si la unión se produce en un sitio específico, al cotransfectar miR-34a a las células transfectadas con wt-MALAT1 mutado en el sitio de unión, esta unión no se producirá y por tanto no se detectará una disminución de la actividad de la luciferasa.

D: Siguiendo la misma hipótesis que en el ensayo C, al cotransfectar anti-miR-34a a células transfectadas con wt-MALAT1 y MALAT1-mut, en el primer caso se producirá un aumento de la actividad luciferasa por la unión que se está produciendo y en el segundo caso, no.

E y F: Si miR-34a es capaz de unirse a c-Myc y Met, la actividad luciferasa disminuirá con las células cotransfectadas con miR-34a. Además, a las células cotransfectadas con miR-34a, se cotransfectarán también con wt-MALAT1 y MALAT1-mut. Se espera que al cotransfectar con wt-MALAT1, se pueda recuperar (aumentar) la actividad de la luciferasa al regular la expresión de miR-34a, pero que al hacerlo con MALAT1-mut, esta recuperación no se produzca.

5.5. Confirmación de la unión directa y específica de MALAT1 a miR-34a en células de cáncer de esófago

Si los experimentos anteriores revelan que se produce una unión directa de lncRNA MALAT1 a miR-34a, en células en cultivo los datos serán comprobados por otra aproximación experimental independiente que puede demostrar el mismo hecho. Para ello se añadirá una etiqueta de biotina a miR-34a y a otros derivados mutados o inespecíficos y se precipitarán a partir de lisados celulares con partículas Dynabeads unidas a streptavidina con alta afinidad por biotina (*Pull-down*). Se analizará después la presencia de lncRNA MALAT1 en los *Pull-down*

5.5.1. *Biotin pull-down assay*

En primer lugar, se realizará la transfección de las células KYSE-410 con biotina-miR-34a, biotina-miR-34a-mut y biotina-miR-NC (sintetizados por Qiagen, GmbH) de forma separada. Las células se incubarán a 37°C y 5% de CO₂. Transcurridas 48h de la transfección, se añadirán a las células 250 µL de tampón de lisis (10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl a pH 7.5, 5 mM dithiothreitol), RNasin (Promega) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Promega). Las células con el tampón de lisis se incubarán en hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se centrifugará durante 5 minutos a 12,000 x g, y se le añadirán 500 µL de NaCl (1M) y 30 µL de las *beads Dynabeads MyOne Streptavidin C1*, (Thermo Fisher Scientific Inc.). Antes de añadir las *beads* al

sobrenadante, se lavarán 5 veces con una solución compuesta de NaOH 0.1M y NaCl 0.05 M, luego 3 veces con NaCl 0.1M y, por último, serán bloqueadas con 1mg/ml de *Bovine Serum Albumin* (Thermo Fisher Scientific Inc.) y 1mg/ml de tRNA de levadura (Thermo Fisher Scientific Inc.) durante toda la noche. El lisado y las *beads*, se incubarán en una noria rotatoria durante 4 horas a 4°C. Seguidamente, las *beads* se lavarán 5 veces con un tampón de lavado (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) y, por último, el RNA se extraerá de las *beads* con el reactivo *TRIzol* (Thermo Fisher Scientific Inc.). El RNA se analizará por PCR de transcripción reversa empleando el Kit *Reverse Transcription System* (Promega) para conseguir moldes de ADNc, y los moldes se analizarán por qPCR según el método descrito en el apartado 5.3.

En los resultados, se analizarán los niveles de MALAT1 y GADPH de los tres tipos de transfecciones. Se esperará que si MALAT1 se une a miR-34a de una forma específica de secuencia, solamente se encuentren valores elevados de MALAT1 en las células transfectadas con biotina-miR-34a y, por el contrario, no pueda unirse cuando el sitio de unión de MALAT1 a miR-34a esté mutado.

5.6. Confirmación de si MALAT1 y miR-34a están presentes en el mismo complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC)

A fin de comprobar si MALAT1 y miR-34a interactúan con la proteína Ago2 en el complejo RISC, se utilizará un ensayo de inmunoprecipitación de proteínas, etiquetando previamente la proteína Ago2 con el péptido FLAG para el que existen anticuerpos comerciales.

5.6.1. *Ensayo de inmunoprecipitación de proteínas y qPCR*

Las secuencias de MALAT1 y MALAT1-mut se ligarán por separado en el vector *pLVX-IRES-Puro* (Nova Lifetech, Inc.) para conseguir los plásmidos de sobreexpresión de MALAT1 y MALAT1-mut. La línea celular KYSE-410, se transfectará con el vector FLAG-Ago2 (Sino Biological). A continuación, la línea celular se volverá a transfectar con miR-NC, miR-34a, miR-34a-mut y/o el vector de expresión de MALAT1 (MALAT1 y MALAT1-mut). Las células se recolectarán a las 48 horas de la transfección y se lisarán añadiéndoles 1mL de la solución de lisis (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5%

NP-40, 2 mM EDTA, 1 mM NaF and 0.5 mM dithiothreitol) con RNasin (Promega) y el cóctel inhibidor de proteasas (Promega). El sobrenadante se centrifugará a 12,000 x g durante 30 minutos y, a continuación, se le añadirán 30 µL de las *beads anti-FLAG M2* (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) que se unirán a las proteínas de fusión que contienen la secuencia FLAG. Se mezclarán las *beads anti-FLAG M2* y el lisado en una noria rotatoria durante 4 horas a 4°C y después, las *beads* se lavarán tres veces con la solución de lavado (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl a pH 7.4, 1mM MgCl₂ y 0.1% NP-40). El RNA se extraerá de las *beads* con el reactivo *TRIzol*, (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se analizará por PCR de transcripción reversa empleando de nuevo el Kit *Reverse Transcription System* (Promega) para conseguir moldes de ADNc. Los moldes se analizarán por qPCR para evaluar:

- Los niveles de MALAT1 asociados a Ago2 por separado en las células transfectadas con miR-NC, miR-34a y miR-34a-mut. Como control, se analizarán también los niveles de GAPDH asociados a Ago2. GAPDH es un gen que codifica un mRNA para una proteína enzimática y para el que no se espera una interacción específica con Ago2. Se espera que los niveles de MALAT1 sean elevados en las células transfectadas con miR-34a, pero no en las células transfectadas con miR-34a-mut, hecho que indicaría que la unión de miR-34a a MALAT1 es necesaria para la formación del complejo con Ago2.

6. Plan de trabajo

El proyecto tendrá una extensión de nueve meses, de los cuales los seis primeros corresponderán a la realización de los análisis y extracción de conclusiones. Los últimos tres-cuatro meses serán empleados para la redacción, publicación y divulgación del estudio.

Tareas	Meses								
Stock de recursos	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º
Obtención de los tejidos									
Obtención y cultivo de líneas celulares									
Pedido y recepción de cebadores y sondas, miRNAs, siRNAs, Kits, etc.									

Análisis experimental									
Análisis de MALAT1 y miR-34a en líneas celulares y tejidos por qPCR (5.3)									
Transfección siRNA y análisis qPCR (5.4.1)									
Subclonación, transfección y ensayo de la luciferasa (5.4.2)									
Transfección y ensayo <i>biotin pull-down</i> (5.5.1)									
Ensayo de inmunoprecipitación y qPCR (5.6.1)									
Conclusiones									
Análisis de los datos obtenidos y elaboración de las conclusiones									
Difusión de los resultados									
Redacción y publicación del estudio									
Participación en jornadas divulgativas y congresos									

7. Cuestiones éticas

De todos los pacientes incluidos en este estudio, se habrá tenido seguimiento y se poseerá la información anonimizada completa de sus datos clínico-patológicos. Además, cada paciente proporcionará por escrito y firmado, el consentimiento informado aprobado por el comité ético del hospital donde proceda. Todos los consentimientos informados, serán guardados en el biobanco donde se depositen las muestras.

También, todos los procedimientos de este estudio, se llevarán a cabo de acuerdo a la declaración de Helsinki y serán aprobados también por el comité ético oficial del que dependa el centro donde se pueda desarrollar este estudio.

En este estudio no se trabajará con animales ni con material orgánico ni genético de países en desarrollo o de protección especial. Asimismo, el presente trabajo carece de usos militares o potencialmente dañinos.

Los ensayos se llevarán a cabo empleando los equipos de protección individual (EPIs) recomendados y todos los residuos patogénicos serán esterilizados antes de desecharlos o serán gestionados por una empresa especializada en la recogida y tratamiento de residuos sanitarios.

8. Aplicabilidad

El estudio de los objetivos propuestos, permitirá conocer los niveles de MALAT1 y miR-34a en células y tejidos con cáncer de esófago, su correlación y sus posibles mecanismos de acción en las células EC. Los hallazgos de este proyecto servirán como base para poder llevar a cabo futuras investigaciones que permitan desarrollar nuevas estrategias y fármacos para mejorar el tratamiento de pacientes con cáncer de esófago y aumentar la tasa de supervivencia.

9. Plan para la difusión de resultados

Una vez finalizado el estudio, analizado los resultados obtenidos y extraído las conclusiones, en el 6º y 7º mes se llevará a cabo la redacción del artículo científico y su publicación. La publicación se enviará a las revistas Cancer cell y Journal of Clinical Oncology, con un SJR (SCImago Journal Rank) de 11.909 y 10.054 respectivamente (<https://www.scimagojr.com/journalrank.php?category=1306>).

Por otro lado, en el 8º y 9º mes se elaborará el material necesario para la participación tanto en congresos (como los organizados por la Sociedad Española de Oncología Médica), como en cursos, jornadas y charlas. Todas estas acciones tendrán como finalidad la divulgación del estudio, formación y resolución de dudas de los asistentes.

10. Recursos necesarios

10.1. Infraestructura (aparatos y servicios)

10.1.1. Aparatos-equipos

- Congelador
- Estufas de CO₂
- Centrífugas
- Cámara de flujo laminar
- Nevera
- Micropipetas
- Termociclador

- Equipo de qPCR
- Luminómetro
- Vórtex
- Agitador rotatorio
- Servicio de recogida de material biológico

10.2. Fungibles

10.2.1. Material específico del estudio

Material específico del estudio	Proveedor	Cantidad	Coste aprox. en euros
Tejidos sanos	Hospitales	50	N/A
Tejidos EC	Hospitales	50	N/A
Línea celular Het-1A	American Type Culture collection (ATCC). Nº Cat: CRL-2692	1	595
Línea celular KYSE-410	Public Health England. Nº Cat: 94072023	1	450
Cebador directo y reverso MALAT1	(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)	1 µmol	45,4
Cebador directo y reverso miR-34a	(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)	1 µmol	46,5
Cebador directo y reverso U6	(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)	1 µmol	45,2
Cebador directo y reverso GADPH	(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)	1 µmol	42,8
siRNA control	(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)	5 nmol	224
siRNA MALAT1	(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)	5 nmol	181
miR-34a	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	311
Control negativo de miRNA (miR-NC)	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
miR-34a mutante	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
anti-miR-34a	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
anti-miR34a-mut	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300

Luc-MALAT1-wt	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
Luc-MALAT1-mut	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
Luc-c-myc	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
Luc-c-Met	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
biotina-miR-34a,	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
biotina-miR-34a-mut	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
biotina-miR-NC	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	5 nmol	300
TOTAL			5240,9

10.2.2. Reactivos y fungibles

Reactivos y fungibles	Proveedor	N.º de catálogo	Cantidad	Coste aprox. en euros
BEGM Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BulletKit	Lonza Corporation	CC-3170	1	379,42
Medio RPMI-1640 (Hyclone; GE Healthcare)	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	11541811	2L	52,6
Suero fetal bovino inactivado por calor (FBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	A3840001	50mL	83,75
Penicilina	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany	P3032-1MU	1000000 unidades	21
Estreptomina	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany	S9137-25G	25g	44,7
TriZol Plus RNA purification Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	12183555	50 preparaciones	415
Agua RNAsa Free	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	10320995	1 x 1000 mL	127

Kit Reverse Transcription System	Promega Co., Madison, WI, USA	A3500	100 reacciones	668
Kit QuantiTect SYBR Green PCR	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	204143	200 reacciones	459
Plásmidos psiCHECK-2	Qiagen GmbH (Hilden, Alemania)	C8021	5 nmol	300
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	11668030	5 nmol	300
Kit Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega Co., Madison, WI, USA	E1910	5 nmol	300
Beads (Dynabeads MyOne Streptavidin C1)	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	65001	2mL	532
Anticuerpo anti-Ago2	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany	SAB4200085-25UL	25 µL	113
Vector pLVX-IRES-Puro	Nova Lifetech Inc.	PVT2304	2 µg	225
Bolas magnéticas anti-FLAG M2	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany	M8823-1ML	1 mL	426
vector FLAG-Ago2	Sino Biological	MG50683-NF	1 ud	320
RNasin Ribonuclease Inhibitors	Promega Co., Madison, WI, USA	N2111	2,500 uds	113
Protease Inhibitor Cocktail	Promega Co., Madison, WI, USA	G6521	1 mL	121
Bovine Serum Albumin	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	B14	5 mg	23,34
Yeast tRNA	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	15401011	25 mg	188
Tris-HCl	Promega Co., Madison, WI, USA	H5121	100 g	63
NaCl	Promega Co., Madison, WI, USA	H5271	500 g	56
MgCl ₂	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany	208337	100 g	29,5
NP-40	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany	492016-100ML	100 mL	69,4
NaF	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	S25547	100 g	11,75

Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	R0861	5 g	52,25
EDTA 0.5 M, pH 8.0 UltraPure	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA	15575020	4x100 mL	118
Pipetas serológicas 5 mL	Labolan	100551	200 uds	38
Placas de cultivo celular	Labolan	703001	50 uds	62,4
Frascos de cultivo celular 250 ML	Labolan	708003	100 uds	115
Puntas micropipetas	Labolan	121000, 120200,120020	10x96	55
Probetas	Labolan	16340050	1	7,5
Botellas	Labolan	1671500	1	19,6
Tubos eppendorf estériles	Labolan	640440	1000 uds	13,8
Gradilla múltiple (Falcon y eppendorf)	Labolan	42902G	1	9,3
Tubos Falcon 15 ml	Labolan	100479	750 uds	84,4
Tubos Falcon 50 mL	Labolan	100489	500 uds	64
TOTAL				6080,71

Al tratarse de un proyecto hipotético, no se especifican las instalaciones en las que se podría llevar a cabo, pero tanto los equipos de trabajo necesarios, como las técnicas que sería necesario implementar, pueden encontrarse y desarrollarse en muchos de los laboratorios de los grupos de investigación que participan en la impartición de este máster tanto en la Facultad de Ciencias o en el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidad de la Coruña como en el Instituto de investigaciones Biomédicas de A Coruña (INIBIC) dependiente del Servicio Gallego de Salud (SERGAS).

11. Bibliografía

11.1. Bibliografía citada en el proyecto

1. van Hagen P, Hulshof M, van Lanschot J, Steyerberg EW, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BP, Richel DJ, Nieuwenhuijzen GA, Hospers GA, Bonenkamp JJ, et al: Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med* 366: 2074-2084, 2012.
2. Pohl H, Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(2):142–6.
3. Rustgi AK, El-Serag HB. Esophageal carcinoma. *N Engl J Med.* 2014;371(26): 2499–509.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015) Cancer statistics, 2015. *CA* 65(1):5–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>
5. GroupMRCOCW (2002) Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 359(9319):1–1733
6. Shapiro J, van Lanschot JJB, Hulshof MCCM, van Hagen P, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BPL, van Laarhoven HWM, Nieuwenhuijzen GAP, Hospers GAP, Bonenkamp JJ (2015) Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus surgery alone for oesophageal or junctional cancer (CROSS): long-term results of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 16(9):1090–1098.
7. Van HP, Hulshof MC, van Lanschot JJ, Steyerberg EW, Mi VBH, Wijnhoven BP, Richel DJ, Nieuwenhuijzen GA, Hospers GA, Bonenkamp JJ (2012) Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *New Engl J Med* 43(2):215–219
8. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJH, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ (2008) Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *New Engl J Med* 355:1–11.
9. Gutschner, T., Richtig, G., Haemmerle, M. & Pichler, M. From biomarkers to therapeutic targets-the promises and perils of long non-coding RNAs in cancer. *Cancer & Metastasis Reviews* 37, 83–105 (2018).

10. Huang, X. et al. Advances in esophageal cancer: A new perspective on pathogenesis associated with long non-coding RNAs. *Cancer Lett* 413, 94 (2018).
11. Zhang, F., et al AFAP1-AS1: A novel oncogenic long non-coding RNA in human cancers. *Cell Prolif* (2018).
12. Xu, M. et al. lncRNA SNHG6 regulates EZH2 expression by sponging miR-26a/b and miR-214 in colorectal cancer. *J Hematol Oncol* 12, 3 (2019).
13. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, Sahu A, Hosono Y, Barrette TR, Prensner JR, Evans JR, Zhao S, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet.* 2015;47(3):199–208.
14. Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature.* 2002; 420(6915):563–73.
15. Ponjavic J, Ponting CP, Lunter G. Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs. *Genome Res.* 2007; 17(5):556–65.
16. Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol.* 2013;10(6):925–33.
17. Devaux Y, Zangrando J, Schroen B, Creemers EE, Pedrazzini T, Chang CP, Dorn GW 2nd, Thum T, Heymans S. Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(7):415–25.
18. Gutschner, T., Richtig, G., Haemmerle, M. & Pichler, M. From biomarkers to therapeutic targets—the promises and perils of long non-coding RNAs in cancer. *Cancer & Metastasis Reviews* 37, 83–105 (2018).
19. Li, Q., Dai, Z., Xia, C. et al. Suppression of long non-coding RNA MALAT1 inhibits survival and metastasis of esophagus cancer cells by sponging miR-1-3p/CORO1C/TPM3 axis. *Mol Cell Biochem* 470, 165–174 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03759>
20. Cho S-F, Chang Y, Chang C-S, Lin S-F, Liu Y-C, Hsiao H-H, Chang J-G, Liu T-C (2014) MALAT1 long non-coding RNA is Overexpressed in multiple myeloma and may serve as a marker to predict disease progression. *BMC Cancer* 14(1):809.
21. Brown JA, Bulkley D, Wang J, Valenstein ML, Yario TA, Steitz TA, Steitz JA (2014) Structural insights into the stabilization of MALAT1 noncoding RNA by a bipartite triple helix. *Nat Struct Mol Biol* 21(7):633–640.

22. Gutschner T, Hammerle M, Diederichs S (2013) MALAT1—a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. *J Mol Med* 91(7):791–801.
23. Huang C, Yu Z, Yang H, Lin Y (2016) Increased MALAT1 expression predicts poor prognosis in esophageal cancer patients. *Biomed Pharmacother* 83:8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.044>.
24. Elbashir, SM, Harborth, J, Lendeckel, W, Yalcin, A, Weber, K and Tuschl, T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498.
25. Pecot, CV, Calin, GA, Coleman, RL, Lopez-Berestein, G and Sood, AK (2011). RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer* 11: 59–67.
26. Kim, DH and Rossi, JJ (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8: 173–184.
27. Ha, M and Kim, VN (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:509–524.
28. Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015;4(9): e252. Published 2015 Sep 15. doi:10.1038/mtna.2015.23.
29. Cesana M, Davide C, Ivano L, Tiziana S, Olga S, Mauro C, Anna T, Irene B (2011) A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* 147(2):1–369
30. Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP (2014) The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature* 505(7483):344–352. <https://doi.org/10.1038/nature12986>
31. Yamakuchi, M., Ferlito, M. & Lowenstein, C. J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 13421–13426 (2008).
32. He, L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130–1134 (2007).
33. Mraz, M. et al. miR-34a, miR-29c, and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia* 23, 1159–1163 (2009).
34. Gearhart, J., Pashos, E. E. & Prasad, M. K. Pluripotency redux--advances in stemcell research. *N. Engl. J. Med.* 357, 1469–1472 (2007).

35. Campbell, K. J. & White, R. J. MYC regulation of cell growth through control of transcription by RNA polymerases I and III. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, a018408 (2014).
36. Kong, L. M. et al. A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 74, 3764–3778 (2014).
37. Zhang, L. et al. The impact of C-MYC gene expression on gastric cancer cell. *Mol. Cell. Biochem.* 344, 125–135 (2010).
38. Zhang, Q. et al. Domain-specific c-Myc ubiquitylation controls c-Myc transcriptional and apoptotic activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, 978–983 (2013).
39. Kwon, Y., Smith, B. D., Zhou, Y., Kaufman, M. D. & Godwin, A. K. Effective inhibition of c-MET-mediated signaling, growth and migration of ovarian cancer cells is influenced by the ovarian tissue microenvironment. *Oncogene* 34, 144–153 (2015).
40. Sennino, B., Ishiguro-Oonuma, T., Schriver, B. J., Christensen, J. G. & McDonald, D. M. Inhibition of c-Met reduces lymphatic metastasis in RIP-Tag2 transgenic mice. *Cancer Res.* 73, 3692–3703 (2013).
41. Sennino, B. et al. Suppression of tumor invasion and metastasis by concurrent inhibition of c-Met and VEGF signaling in pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Discov.* 2, 270–287 (2012).
42. You, W. K. et al. VEGF and c-Met blockade amplify angiogenesis inhibition in pancreatic islet cancer. *Cancer Res.* 71, 4758–4768 (2011).
43. Elia, G. et al. Mechanisms regulating c-met overexpression in liver-metastatic B16-LS9 melanoma cells. *J. Cell. Biochem.* 81, 477–487 (2001).
44. Feng, Y. et al. SPSB1 promotes breast cancer recurrence by potentiating c-MET signaling. *Cancer Discov.* 4, 790–803 (2014).
45. Ozasa, H. et al. Significance of c-MET overexpression in cytotoxic anticancer drug-resistant small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 105, 1032–1039 (2014).
46. Xu, X. et al. c-Met and CREB1 are involved in miR-433-mediated inhibition of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer by regulating Akt/ GSK-3 β /Snail signaling. *Cell Death. Dis.* 7, e2088 (2016).

47. Zhao, L. et al. c-Met identifies a population of matrix metalloproteinase 9-producing monocytes in peritumoural stroma of hepatocellular carcinoma. *J. Pathol.* 237, 319–329 (2015).
48. Li F, Li X, Qiao L, Liu W, Xu C, Wang X. MALAT1 regulates miR-34a expression in melanoma cells. *Cell Death Dis.* 2019;10(6):389. Published 2019 May 17. doi:10.1038/s41419-019-1620-3.
49. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262).

11.2. Otra bibliografía consultada

1. Zhou H, Yang L, Xu X, et al. miR-34a inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression via regulation of FOXM1. *Oncol Lett.* 2019;17(1):706-712. doi:10.3892/ol.2018.9593
2. Dash, S., Balasubramaniam, M., Dash, C., Pandhare, J. Biotin-based Pull-down Assay to Validate mRNA Targets of Cellular miRNAs. *J.Vis. Exp.* (136), e57786, doi:10.3791/57786 (2018).
3. Yoon JH, Gorospe M. Cross-Linking Immunoprecipitation and qPCR (CLIP-qPCR) Analysis to Map Interactions Between Long Noncoding RNAs and RNA-Binding Proteins. *Methods Mol Biol.* 2016; 1402:11-17. doi:10.1007/978-1-4939-3378-5_2