



EL miRNA *bta-miR19a* REGULA LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL GEN *DICER*

POR:

Q. B. P. ANA KAREN TORRES GARCÍA

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias**

Área Mayor: Reproducción y Genética Animal

Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

Secretaría de Investigación y Posgrado

El miRNA *Bta-miR19a* regula la expresión génica del gen *Dicer*. Tesis presentada por Ana Karen Torres García como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:



M. A. Luis Raúl Escarceda Preciado
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología



M. C. Antonio Humberto Chávez Silva
Secretario de Investigación y Posgrado



D. Ph. Pablo Fidel Mancillas Flores
Coordinador Académico



D. Ph. María Eduviges Burrola Barraza
Presidente

JULIO 05 - 2016

Fecha

Comité:

D. Ph. María Eduviges Burrola Barraza
Dr. Everardo González Rodríguez
Ph. D. Juan Alberto Grado Ahuir
Ph. D. Alma Delia Alarcón Rojo

© Derechos Reservados

Ana Karen Torres García
PERIFÉRICO FRANCISCO R.
ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA,
CHIH., MÉXICO C.P. 31453

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme permitido culminar una meta más en mi vida, gracias por darme la fuerza y el ímpetu.

El agradecimiento más profundo es para mi familia, sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible cumplir este sueño.

A mí esposo, mi apoyo incondicional, por no dejarme desistir e impulsarme, te agradezco infinitamente tu gran ayuda.

A la D. Ph. María Eduvigis Burrola Barraza, mi más amplio agradecimiento por haber confiado en mí, por su valiosa dirección y sobre todo por su paciencia para llegar a la culminación de esta meta.

A mis compañeros de laboratorio Claudia, Bertha y Macario, gracias por los momentos que compartimos, porque de cada uno aprendí algo importante.

Agradezco al M. C. Ricardo Gámez y al Rastro Municipal TIF 366 de Cd. Chihuahua, por permitirme el acceso y facilitarme la obtención de muestras para la presente investigación.

Al CONACYT por haber financiado mis estudios de maestría otorgándome una beca, así como el financiamiento al proyecto número 168981 de ciencia básica: "Identificación de factores parácrinos involucrados en el proceso de competencia".

DEDICATORIA

A mi hermosa familia Adán, Noelia, Tito, Anayeli, Ali, Jaquelin, Noely, Paulina y Eleazar, quienes me brindaron su entera confianza sin dudar un solo momento de mí, por ustedes soy lo que soy ahora, porque esto es algo que juntos logramos. Los amo.

A mi esposo José Pablo, por ser el principal pilar para la culminación de este proyecto. Gracias por tu paciencia y apoyo incondicional, hoy hemos alcanzado un triunfo más, porque mis logros son tuyos. Te amo.

RESUMEN

EL miRNA *Bta-miR19a* REGULA LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL GEN *DICER*

POR:

Q. B. P. ANA KAREN TORRES GARCÍA

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D. Ph. María Eduvigis Burrola Barraza

La activación del genoma embrionario implica la degradación masiva de los RNAm almacenados durante la ovogénesis por acción de microRNAs. El objetivo del presente estudio fue demostrar que *Dicer* es un RNAm que es regulado por un miRNA. Para lo cual se realizó cultivo de células de la granulosa, se incubaron a 38.5 °C con una atmósfera de 5 % de CO₂, el medio se cambió a las 18 h. Al término de las 48 h de cultivo se llevó a cabo la transfección del *bta-miR-19a*, utilizando diferentes concentraciones: 10 nM, 30 nM y 50 nM, a las 5 h de transfección se reemplazó el medio para mantener el cultivo celular durante 48 h a 38.5 °C con 5 % de CO₂. Se retiraron las células empleando tripsina y se procedió a la extracción de RNA y síntesis de cDNA para seguir con el análisis por PCR en tiempo real, utilizando como gen interno *RNA 18S*. Se observó que a mayor concentración del *bta-miR-19a*, es menor la expresión de *Dicer*. Además se realizó la extracción de proteínas provenientes de cada tratamiento del cultivo, empleando el reactivo CellLytic M™ (Sigma), para evaluar la expresión de *Dicer* a nivel de proteína. El ensayo de *western*

blot demostró que la presencia de la proteína DICER se ve regulada por la acción del *bta-miR-19a* en el cultivo, afectando en mayor proporción a una concentración de 50 nM. Los resultados demuestran que el *miR-19a* regula la expresión de *Dicer*, tanto a nivel de RNAm y proteína.

ABSTRACT

DICER GENE EXPRESSION IS REGULATED BY Bta-miR19a IN THE CLASSICAL PATHWAY OF miRNAs

BY:

ANA KAREN TORRES GARCÍA

The activation of the embryonic genome involves massive degradation of mRNA stored during oogenesis by the action of microRNAs. The objective of this study was to prove that Dicer is a mRNA that is regulated by a miRNA. For which it was performed the culture of granulosa cells at 38.5 °C with 5 % CO₂ in humidity air, at 18 h the media was changed. After 48 h of culture the transfection was conducted with the mimic *bta-miR-19a* by different concentrations: 10 nM, 30 nM and 50 nM, after 5 h of transfection the media was replaced and the culture cell continued for 48 h at 38.5 °C with 5 % CO₂. Cells from each culture was removed using trypsin and proceeded to RNA extraction and cDNA synthesis to continue the analysis by real-time PCR using *RNA18S* as internal gene. It was showed-observed that when the concentration of *bta-miR-19a* is higher the expression of *Dicer* decreases. Furthermore, protein extraction from each treatment culture was performed using the CellLytic M™ reagent (Sigma), to evaluate the expression at the protein level. The western blotting assay demonstrated that the expression of the DICER protein is regulated by the *bta-miR-19a*, in a concentration of 50 nM. The results show that *miR-19a* in granulosa cell culture down-regulated Dicer expression at both the mRNA and protein level.



CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Características de los RNAm Maternos.....	4
Transición Ovocito-Embrión.....	7
Regulación de los RNAm Maternos.....	8
Procesamiento de microRNAs.....	9
Efecto del <i>cluster</i> miR-17-92.....	11
Características de la Proteína DICER.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Determinación <i>in silico</i> de un miRNA Candidato que Regule a <i>Dicer</i> Bovino.....	15
Identificación del UTR´3 de <i>Dicer</i> bovino.....	15
Identificación y selección del miRNA en miRmap.....	15
Acción del miRNA <i>bta-miR-19a</i> Sobre la Expresión de <i>Dicer</i> Bovino.....	17
Cultivo de células de la granulosa.....	17
Transfección de células de la granulosa con el <i>bta-miR-</i> <i>19a</i>	18
Extracción de RNAm de células de la granulosa por Trizol.....	19
Reacción en cadena de la polimerasa–transcriptasa reversa.....	19
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	20
Acción del miRNA <i>bta-miR-19a</i> Sobre la Expresión de la	



Proteína DICER Bovino.....	20
Extracción de proteínas de células de la granulosa por CellLytic M.....	20
Western blot.....	21
Análisis Estadístico.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
Determinación <i>in silico</i> de un miRNA Candidato que Regule a <i>Dicer</i> Bovino.....	24
Identificación del UTR´3 de <i>Dicer</i> bovino.....	24
Identificación y selección del miRNA en miRmap.....	24
Acción del miRNA <i>bta-miR-19a</i> Sobre la Expresión de <i>Dicer</i> Bovino.....	28
Acción del miRNA <i>bta-miR-19a</i> Sobre la Expresión de la Proteína DICER Bovino.....	33
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	35
LITERATURA CITADA.....	36



LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Parámetros de predicción del software miRmap	29



LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Hibridación de <i>Dicer</i> humano en el genoma de <i>Bos taurus</i> ...	25
2	Secuencia del extremo UTR'3 de <i>Dicer</i> bovino.....	26
3	Identificación del extremo UTR'3.....	27
4	Células de la granulosa en cultivo celular.....	30
5	Amplificación del gen <i>Dicer</i> en cDNA de células de la granulosa obtenidas en cultivo celular.....	31
6	Nivel de expresión de RNAm <i>Dicer</i> en células de la granulosa bovina transfectadas con <i>bta-miR-19a</i>	32
7	Expresión proteica de DICER en células de la granulosa bovina transfectadas con <i>bta-miR-19a</i>	34



INTRODUCCIÓN

La identificación y caracterización de los genes que participan en la regulación del crecimiento del ovocito y de la transición ovocito-embrión, son requeridos para entender los mecanismos maduración, fertilización y desarrollo embrionario bovino. Los RNAm maternos provienen del ovocito y son utilizados durante su maduración y en la transición ovocito-embrión (De la Fuente, 2006; Bettegowda *et al.*, 2008). Durante el desarrollo inicial, el ovocito es transcripcionalmente activo y se encuentra almacenando RNAm para ser utilizado en la etapa de maduración hacia la metafase II. Una vez que ocurre arresto en metafase II, se torna transcripcionalmente inactivo y continúa así, aún después de la fecundación. Cuando se encuentra inactivo, los RNAm almacenados son los encargados de mantener el desarrollo embrionario después de la fertilización hasta la activación del genoma embrionario (Tesfaye *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios de RNAm maternos se han realizado en ratón y zebrafish (Saitou *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2003; Payer *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Bortvin *et al.*, 2004). En el caso particular del ganado bovino, se han identificado diversos RNAm maternos; *Mater* (Pennetier *et al.*, 2006), *Nobox* (Tripurani *et al.*, 2011), *Nucleoplasmina* (Lingenfelter *et al.*, 2011) y *Zar1* (Brevini *et al.*, 2004) entre otros. En este sentido Burrola-Barraza *et al.* (2011) analizaron la expresión durante el desarrollo embrionario bovino, del gen *Dicer*, que participa en el procesamiento de los microRNAs. Este grupo de investigadores encontraron que *Dicer* se expresa en el ovocito inmaduro, maduro y en el embrión de 2-4 células, decayendo abruptamente durante la



activación del genoma embrionario en bovino. Dicha activación ocurre en el embrión de ocho células y se observa su expresión en la etapa de mórula. Este patrón de expresión es similar al que presentan los genes maternos como *Mater* (Pennetier *et al.*, 2006), lo que sugiere que *Dicer* tiene un patrón de expresión correspondiente a un RNAm materno.

En el modelo humano se ha demostrado que la expresión de *Dicer* es regulada por la acción de los miRNAs *Let-7a* y *miRNA-18a* (Tokumaru *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2011). Estudios recientes en diferentes especies, incluyendo bovino, demuestran que los microRNAs están relacionados con la regulación de los RNAm maternos y, por consiguiente, con la activación del genoma embrionario (Bettegowda *et al.*, 2008; Tripurani, 2011). Tokumaru *et al.* (2008) analizaron la regulación de *Dicer* en líneas celulares de cáncer humano frente al microRNA *let-7*, obteniendo como resultado una disminución de la expresión de *Dicer*. Estos investigadores determinaron que *Dicer* es el blanco de *let-7*, el cual tiene un efecto en la expresión de microRNAs. En este sentido Tao *et al.* (2011) analizaron la expresión de *Dicer* en las células T24 (células de cáncer de vejiga de humano) donde el microRNA *miR-18a* disminuyó la expresión de *Dicer* a nivel de RNAm y proteína.

Se ha demostrado que en bovinos los RNAm maternos como *Nobox* y *Nmp2* se regulan vía los miRNAs; *196a* y *181a*, respectivamente (Lingenfelter *et al.*, 2011; Tripurani *et al.*, 2011). Se tiene el antecedente de que en humano *Dicer* es regulado por los microRNAs *let-7* (Tokumaru *et al.*, 2008) y el *miR-18a* (Tao *et al.*, 2011), es probable que en el bovino este gen con perfil de expresión materno sea regulado por algún microRNA, de igual manera que sucede en el



humano. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo, fue demostrar que el gen *Dicer* es un RNAm que es regulado por un microRNA, cuya acción está implicada con el desarrollo embrionario temprano. Esclarecer este proceso permitirá obtener conocimiento básico para dilucidar los procesos moleculares que enmarcan el desarrollo embrionario temprano.



REVISIÓN DE LITERATURA

Características de los RNAm Maternos

Durante la foliculogénesis, desde folículo primario hasta folículo antral el ovocito permanece en un continuo crecimiento. Durante esta etapa, el ovocito es transcripcionalmente activo y una vez que ocurre el arresto en metafase II se torna transcripcionalmente inactivo y continúa así, aún después de la fecundación. Cuando el ovocito es transcripcionalmente activo, los RNAm que son sintetizados se almacenan para ser utilizados para la síntesis de proteínas en la etapa de maduración hacia la metafase II. Es por esto que se les denomina RNAm maternos, ya que provienen del ovocito y son utilizados durante su maduración y en la transición ovocito-embrión (De la Fuente, 2006; Bettegowda *et al.*, 2008). Durante la maduración meiótica la transcripción en el ovocito es inactiva y se tiene como único soporte de proteínas el proveniente de los RNAm almacenados, por lo que en esta etapa comienzan a activarse y a ser traducidos (Bettegowda *et al.*, 2008). Estos RNAm maternos deben ser degradados durante la activación del genoma embrionario. Embriones deficientes en la expresión de algún RNAm materno son arrestados en las primeras etapas del desarrollo embrionario. La mayor parte de la información que se ha generado al respecto de los RNAm maternos, ha sido obtenida del modelo murino (Li *et al.*, 2010).

En este modelo se han descrito varios factores maternos que participan en la regulación de la epigénesis embrionaria, es decir, la regulación de cualquier alteración meiótica o mitótica sobre el DNA, que no ocasiona cambio en su secuencia, sin embargo si afecta el desarrollo del organismo (Burrola y



González, 2012). Uno de los factores con función conocida es el DNMT3a, dicha función es la unión al residuo desmetilado en la lisina 4 de la histona 3, ocasionando que esta proteína materna metile *de novo* las secuencias ICR (regiones de control de impresión) maternas. En ovocitos que tienen suprimido el gen del factor DNMT3a, se observa hipometilación en las regiones ICR (Kaneda *et. al.*, 2004)

Tet3 se expresa de manera predominante en ovocitos y en cigoto, es una enzima proteica de origen materno, cuya función está relacionada con la desmetilación del genoma paterno, catalizando la reacción de oxidación de 5 metilcitosina a 5-hidromethylcitosina. Embriones deficientes de este gen presentan una pérdida de la desmetilación durante la etapa de cigoto en el pronúcleo masculino (Gu *et. al.*, 2011).

Stella es una proteína de origen materno requerida para el desarrollo embrionario (Burrola y González, 2012), ovocitos con este gen suprimido tienen una metilación adecuada en las ICR, sin embargo los embriones derivados se encuentran hipometilados en estas regiones, tanto en el genoma materno como paterno; debido a que la función de esta proteína es unirse a la lisina 9 de la histona 3 reduciendo la unión de la enzima TET3 (Nakamura *et. al.*, 2007).

Zfp57 es un factor de transcripción necesario en el establecimiento de la metilación en la línea germinal, así mismo este RNAm con efecto materno está involucrado en el mantenimiento de los patrones de metilación en la embriogénesis temprana (Burrola y González, 2012).

En ratón la proteína embrionaria de unión de adeninas (ePAB), se expresa en ovocito y en embriones de 2 a 4 células, una vez que se activa el



genoma embrionario la expresión de la ePAB se suprime, por lo cual es considerada un RNAm materno. La importancia de la proteína durante estas etapas se debe a que durante la activación de la traducción de los RNAm almacenados, evita la deadenilación de los mismos adicionando adeninas al UTR'3 estabilizando al UTR'5 para la correcta traducción del RNAm (Seli *et al.*, 2005).

En el bovino se conoce poco sobre la acción de estas biomoléculas, ejemplos representativos de genes maternos en esta especie son los genes *Nobox* (Tripurani *et al.*, 2011), *Npm2* (Lingenfelter *et al.*, 2011), *Mater* (Pennetier *et al.*, 2006) y *Zar1* (Brevini *et al.*, 2004).

Nobox es un factor de transcripción que participa en el desarrollo embrionario, Tripurani *et al.* (2011) demostraron que es un factor crítico para el desarrollo el cual se agota durante la embriogénesis temprana y es regulado por el *miR-18a*.

Nucleoplasmina (NPM2) es un factor nuclear específico de ovocito, el RNAm se encuentra presente de forma abundante en ovocito inmaduro y maduro, disminuye su expresión en las primeras etapas del desarrollo y escasamente detectable en las etapas de mórula y blastocisto. Lingenfelter *et al.* (2011) identificaron en el transcrito de *Npm2* un sitio de unión para el *miR-181* en el UTR'3, realizaron una transfección en células Hela donde obtuvieron que la expresión de la proteína NPM2 se reducía en células que expresaban el *miR-181* en comparación con células sin el *miR-181*, lo que demuestra que la traducción de NPM2 es reprimida por el *miR-181* (Lingenfelter *et al.*, 2011).



Mater ha sido detectado en los ovocitos de folículos primarios, manteniéndose activo hasta la metafase II y es mínimo a nivel de la mórula y blastocisto (Pennetier *et al.*, 2006).

Zar1 se expresa en el ovocito, cigoto y durante el desarrollo embrionario hasta blastocisto, se ha observado que durante la etapa de 4 células se encuentran niveles elevados; estudios realizados indican que la transcripción del gen inicia en la etapa de 4 células, lo que significa que se expresa antes de la activación del genoma embrionario (Brevini *et al.*, 2004).

Transición Ovocito-Embrión

Uno de los procesos más importantes que suceden durante la transición del ovocito al embrión consiste en la inactivación del material genético proveniente del ovocito y la activación del genoma embrionario. La activación del genoma embrionario en distintas especies, ocurre en diferentes etapas del desarrollo embrionario, para los bovinos la activación ocurre en el embrión de 8 a 16 células (Telford *et al.*, 1990), a diferencia del ratón que ocurre en la etapa de 2 células (Schultz, 1993), mientras que en *Xenopus laevis* sucede en la etapa de gástrula media (Newport y Kirschner, 1982); en el caso del humano la activación del genoma embrionario ocurre durante la etapa del embrión de 8 células (Telford *et al.*, 1990).

Durante este proceso existe una degradación masiva de los RNAm maternos almacenados en el ovocito (De la Fuente, 2006), lo que es clave para que se dé una adecuada activación del genoma embrionario (Bettegowda *et al.*, 2008). La activación del genoma embrionario se ha relacionado con cambios epigenéticos a nivel de la acetilación de histonas, metilación del DNA y por la



desadenilación del extremo 3' no traducido (UTR'3, por sus siglas en inglés) de los RNAm. Estudios realizados en ratón y el pez cebra demuestran que los microRNAs (miRNAs) están relacionados con el proceso de activación del genoma embrionario ya que participan promoviendo la degradación del RNAm y en consecuencia inhiben la síntesis de proteínas que estos codifican (Bettegowda *et al.*, 2008).

Regulación de los RNAm Maternos

Los ovocitos almacenan gran cantidad de RNAm que son requeridos durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, debido a que la maquinaria transcripcional se encuentra inactiva. En esta etapa los mecanismos de regulación post transcripcional que controla la estabilidad y traducción del RNAm, generalmente son negativos. Los RNAm son suprimidos a nivel de la traducción y este silenciamiento es promovido por la deadenilación del RNAm, el enmascaramiento del RNAm por proteínas, por acción de microRNAs y por asociaciones repetidas de siRNA (Bettegowda y Smith, 2007).

La deadenilación del RNAm materno está determinado por la longitud en la cola de poli(A), una extensión de la cola de poli(A) origina un aumento de la traducción mientras que una reducción se relaciona con el silenciamiento de la traducción (Richter, 1999). No obstante algunos RNAm maternos son silenciados por el mecanismo de deadenilación, es decir, acortamiento de la cola de poli(A) en el extremo UTR'3 del RNAm (De Moor y Richter, 2001). Los mecanismos que realizan la deadenilación específica de los RNAm maternos así como los mediadores implicados se desconocen (Bettegowda y Smith, 2007). Durante la ovogénesis el ovocito almacena RNAm de forma latente, que



son reclutados en períodos del desarrollo temprano en respuesta a las señales fisiológicas (Eichenlaub-Ritter y Peschke, 2002). En estudios para conocer el mecanismo del enmascaramiento del RNAm materno por interacciones no específicas se dio a conocer que en *Xenopus*, el 80 % de los RNAm maternos inactivos están asociados con una ribonucleoproteína materna (mRNP), la unión del RNAm con la mRNP reprime la traducción ya que previene la unión del RNAm a los polirribosomas (Spirin, 1994; De Moor y Richter, 2001).

La regulación de la degradación de los RNAm maternos dada por miRNAs y asociaciones de siRNA sugiere que los miRNAs son moléculas reguladoras de la degradación de los RNAm maternos. Los miRNAs regulan la expresión génica a nivel post transcripcional (Bartel, 2004). En los mamíferos tenemos a las nucleasas, Drosha y Dicer que actúa en el núcleo y en el citoplasma respectivamente, las cuales son importantes para el procesamiento de los miRNA hasta originar un miRNA maduro (Plasterk, 2006), una vez que es procesado, el miRNA maduro se une a un complejo para participar en el reconocimiento del RNAm blanco y de esta forma reprime la expresión del RNAm materno (Witold *et al.*, 2008).

Procesamiento de microRNAs (miRNAs)

En la mayoría de los mamíferos, los miRNAs están localizados en regiones intergénicas y/o dentro de regiones intrónicas. Los que están codificados en regiones intergénicas se expresan bajo la acción de la RNA polimerasa II y se denominan pri-miRNAs (miRNA primario), posteriormente estos pri-miRNAs son procesados en el núcleo por un complejo ribonucleico proteico denominado microprocesador, compuesto por la enzima RNasa III



Drosha y la proteína de unión a RNA de doble cadena denominada DGCR8, este microprocesador cortan al pri-miRNA y genera un precursor más pequeño conocido como pre-miRNA con estructura de tallo burbuja. Los miRNAs que se encuentran codificados en regiones intrónicas se expresan de acuerdo al gen donde se encuentren formando lo que se conoce como “Mirtron” y son liberados durante el splicing en forma de tallo burbuja. Sea cual sea la vía de procesamiento del tallo-burbuja, el resultado es el mismo, un precursor de miRNA (pre-miRNA) con estructura tallo burbuja, al finalizar la etapa de procesamiento en el núcleo, el pre-miRNA es reconocido por el factor nuclear Exportina 5 (Exp5) que junto con la proteína de unión a GTP Ran transportan por los poros del núcleo al pre-miRNA hacia el citoplasma, donde es reconocido y cortado por la RNasa III DICER, para obtener 2 miRNAs complementarios de aproximadamente 20 pb. Una de las cadenas se selecciona para funcionar como un miRNA maduro, mientras que la otra cadena es degradada. En ocasiones, las dos hebras de la horquilla del pre-miRNA dan lugar a dos miRNAs maduros (Bushati y Cohen, 2007; Lugo-Trampe *et al.*, 2009). Para continuar con el procesamiento, los miRNAs son ensamblados en un complejo de ribonucleoproteínas llamado complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISCs, por sus siglas en inglés) conformado por proteínas de la familia de las Argonautas. Una vez que los miRNAs son ensamblados en el miRISCs, los nucleótidos de la posición 2 al 8 en el extremo 5' del miRNA, participan en el reconocimiento del extremo UTR'3 del RNAm diana. Cuando se lleva a cabo la unión del miRNA con el UTR'3 del RNAm diana, las proteínas argonautas pueden reprimir la expresión del RNAm diana, si el acoplamiento es completo



se inhibe la traducción y se induce una degradación endonucleolítica, si el acoplamiento es desigual se induce una degradación por exonucleasas (Witold *et al.*, 2008).

Efecto del *cluster* miR-17-92

La evidencia experimental de los últimos años indica que los miRNAs son reguladores clave en la expresión génica y tienen una función importante en el desarrollo, la homeostasis y las enfermedades (Concepcion *et. al.*, 2012). Los miRNAs se encuentran localizados en exones e intrones de RNA no codificante o en intrones de RNA codificantes (Lugo-Trampe *et. al.*, 2009). Interesantemente muchos miRNA se localizan en *clusters* policistrónicos, donde múltiples miRNAs son generados a partir de un transcrito primario, en este sentido se ha demostrado que aproximadamente el 50 % en *D. melanogaster* y un menor porcentaje en el humano de miRNAs se encuentran agrupados (Aravin *et. al.*, 2003; Altuvia *et. al.*, 2005), está alta conservación de *clusters* entre las especies sugiere una coerción para mantener dicha organización (Concepcion *et. al.*, 2012). Dentro de los *clusters* mejor caracterizados se encuentra el miR-17-92, el cual codifica para seis miRNAs individuales: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b y miR-92a, los miembros de este *cluster* fueron los primeros miRNA oncogénicos identificados (Tao *et. al.*, 2011).

He *et al.* (2005) evaluaron la expresión del *cluster* miR-17-92 en linfomas de células B, donde observaron que en el 65 % de las muestras evaluadas se obtuvo una sobreexpresión de este *cluster* de miRNAs. Así mismo, demostraron que el rol oncogénico es debido a la inhibición de la apoptosis celular concurrente con los linfomas inducidos por c-Myc. Sin embargo cada miRNAs



tiene diferentes funciones, por lo que es interesante dilucidar la contribución de cada miembro (Tao *et. al.*, 2011).

En base en la homología de las secuencias, los miRNAs del *cluster* miR-17-92 se pueden clasificar en tres categorías: miR-17/miR-20a/miR-18a, miR-19a/miR-19b y el miR-92a. Los miR-17 y miR-20a se encuentran estrechamente relacionados, únicamente difieren en 2 nucleótidos (nt) fuera de la región semilla (secuencia complementaria al RNAm blanco, corresponde de los nucleótidos de la posición 2 a la 8), mientras que la región semilla del miR-18a es similar, sin embargo comparte una identidad de secuencia significativa con estos miRNAs. La segunda categoría formada por el miR-19a y miR-19b, se diferencian únicamente por un nucleótido en la posición 11, esta región no tiene relevancia para el reconocimiento de los RNAm. Por último la región semilla del miR-92a es la que se distingue de los miembros del *cluster* (Olive *et. al.*, 2009).

Olive *et al.* (2009) evaluaron en ratones el potencial oncogénico de los miembros del miR-17-92, demostraron que el miR-19a puede ser un componente oncogénico clave para el *cluster* debido a que tiene como blanco al RNAm del gen supresor de tumores PTEN. Los demás miembros pueden ser prescindibles para la oncogénesis o pudieran desempeñar la actividad de mejorar el potencial oncogénico. Sin embargo, no queda claro cómo es que estos miRNA regulan los procesos biológicos.

Feng *et. al.* (2014) analizaron los niveles del miR-19a en células de cáncer de vejiga, observaron que la expresión de este miRNA fue significativamente alta, demostrando que la sobreexpresión podría ser relevante para el desarrollo del cáncer de vejiga, el aumento o disminución de la función



de este miRNA indica que puede promover el crecimiento celular, lo que es consistente su rol en otros tipos de cáncer.

Los miRNA regulan varios procesos biológico, en el bovino el *cluster* miR-17-92 se identificado en procesos como la adipogenesis (Romao *et. al.*, 2014), sin embargo es poco el conocimiento que se tiene acerca de las funciones de este *cluster* en el bovino.

Características de la Proteína DICER

DICER es una ribonucleasa perteneciente a las RNasa III que se encuentra en el citoplasma de las células. DICER corta al pre-microRNA proveniente del núcleo en dos microRNAs maduros de 20 pares de bases (pb). Esta enzima contiene un dominio ATPasa/ARN helicasa, un dominio PAZ que reconoce a los nucleótidos en el extremo 3' y dos dominios catalíticos RNasa III (RIIIa y RIIIb).

Tang *et al.* (2007) con el fin de analizar el efecto de DICER en el desarrollo embrionario temprano en ratón, utilizaron ovocitos de ratones deficientes para expresar el gen que codifica para esta proteína, los cuales maduraron y fertilizaron *in vitro*, y observaron que a diferencia de ovocitos maduros de ratones normales, los embriones deficientes de *Dicer* presentaron un desensamblaje total del huso mitótico lo que impidió que las cromátidas migraran a los polos de forma correcta, además encontraron que, a diferencia de los embriones de 2 células de ratones normales, en los embriones deficientes para el gen *Dicer* el crecimiento de las blastomeras fue desorganizado (Tang *et al.*, 2007).



En base a la investigación de Tang *et al.* (2007) se puede plantear que en el bovino *Dicer* pudiera tener un comportamiento similar al reportado en ratón y que podría ser indispensable para el desarrollo embrionario temprano dada la importancia en la biogénesis de los miRNAs.

Se ha estudiado la regulación de *Dicer* en el humano en líneas celulares de cáncer y se ha demostrado que es regulada por miRNAs, tal es el caso del estudio realizado por Tokumaru *et al.* (2008), donde analizaron la regulación de *Dicer* en líneas celulares de cáncer humano frente al miRNA *let-7* (relacionado con las fases del ciclo celular y el crecimiento celular), en el estudio demuestran que la expresión de *Dicer* está inversamente correlacionada con los niveles de expresión de *let-7* en la líneas celulares empleadas. La sobreexpresión de *let-7* disminuyó significativamente la expresión de *Dicer* tanto en la proteína, como en los niveles de RNAm, así como otros miRNAs maduros, mientras que el deficiente de *let-7* aumentó los niveles. Esto sugiere una posible existencia de una retroalimentación, y que *let-7* es la clave para el equilibrio de *Dicer* y varios miRNAs.

En este mismo sentido Tao *et al.* (2011) demostraron que el *miR-18a* que pertenece al grupo *miR-17-92*, suprime la proliferación celular en las células T24 de cáncer de vejiga, además que el *miR-18a* regula la expresión de *Dicer*, mientras que la inhibición del *miR-18a* mediante oligonucleótidos antisentido aumenta la expresión de *Dicer* en células T24. En la región UTR'3 se encuentran dos sitios de unión, esto se demostró mediante un ensayo de luciferasa que ambos pudieran mediar la expresión de forma *in vitro*.



MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó bajo condiciones controladas en el laboratorio de Transgénesis Animal y Fertilización *in vitro* de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Francisco R. Almada Km.1 Chihuahua, Chihuahua, México.

Determinación *in silico* de un miRNA Candidato que Regule a *Dicer* Bovino

Identificación del UTR´3 de *Dicer* bovino. El análisis para la identificación se realizó en el programa BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), la herramienta se utilizó para buscar homología entre el extremo UTR´3 del gen *Dicer* de humano (NM_177438.2) y el bovino (NM_203359.1) ya reportados en el genebank, en base al porcentaje de identidad entre las secuencias (>80 %) se procedió a analizar la secuencia alineada en el genoma de *Bos taurus*, una vez alineada las secuencias, se analizó el alineamiento en el genoma de *Bos taurus*. Identificando el codón de paro del gen (extremo UTR´3) y la secuencia de poliadenilación para determinar el posible UTR´3.

Identificación y selección del miRNA en miRmap. Para examinar la posible regulación del gen *Dicer* por microRNA se utilizó el software miRmap (<http://cegg.unige.ch/mirmap/>), este software utiliza diferentes parámetros para realizar predicciones, estas se dividen en cuatro categorías y cada una tiene características particulares, para dar un total de 11 parámetros de predicción. La primera categoría hace referencia a las interacciones termodinámicas del complejo miRNA-RNA_m, que incluye “ ΔG dúplex”, es decir, la energía libre mínima de plegado (MFE, por sus siglas en inglés) del complejo miRNA-RNA_m,



“ ΔG binding” la energía libre de enlace basada en la MFE, “ ΔG open” hace referencia a la energía libre de accesibilidad del miRNA, para desplegar la región UTR’3 de los RNAm blancos, y “ ΔG total” (“ ΔG dúplex” o “ ΔG open”) alude a la energía total del sistema, la suma del valor de “ ΔG dúplex” o “ ΔG binding” y el valor de “ ΔG open”. En la segunda categoría analizan la probabilidad de unión, donde se determina la probabilidad de encontrar al menos n apariciones del sitio de unión completo del miRNA en los RNAm blancos utilizando dos métodos, en el primero una distribución de probabilidad que se aproxima con una distribución binomial (P.over binomial, por sus siglas en inglés), mientras que en el segundo método se calcula la distribución de la probabilidad exacta (P.over exact, por sus siglas en inglés); en la tercer categoría se identifica los sitios blanco conservados entre especies para los miRNAs empleados en los UTRs’3, en esta categoría se basan en análisis filogenéticos de especies de mamíferos descartando las especies que no poseen sitios blanco para miRNAs donde determinan la longitud de las ramas para obtener la escala de longitud de las ramas (BLS por sus siglas en inglés), el programa PhyloP se utiliza para evaluar la evidencia de una selección negativa en los sitios blanco de los miRNAs. Como cuarta y última categoría se analiza las características de la secuencia blanco, que incluye la relación de los nucleótidos A y U que determina la accesibilidad de la región de unión del miRNA al RISC, la distancia entre el sitio blanco y el extremo UTR’3 más cercano y por último el apareamiento compensatorio al sitio UTR’3 (Vejnar, 2012).



Acción del miRNA *bta-miR-19a* Sobre la Expresión de *Dicer* Bovino

Cultivo de células de la granulosa. Las células de la granulosa fueron aisladas de acuerdo a lo reportado por Grado-Ahuir *et al.* (2009). Brevemente se utilizaron ovarios de vacas adultas provenientes de la Empacadora Ganadera de Chihuahua, S.A. de C.V. TIF-55, lo cuales se transportaron al laboratorio en NaCl 0.15 M estéril a temperatura ambiente (22-25 °C). Una vez en el laboratorio, se limpiaron con NaCl 0.15 M estéril por triplicado, fueron sumergidos en etanol al 70 % por 30 s y se lavaron 3 veces con NaCl 0.15 M estéril. Posteriormente, se seleccionaron folículos pequeños de 1 a 5 mm de diámetro y se aspiraron con una aguja de calibre 18 (BD 18G X 11/2") que se conecta a un sistema acoplado a una bomba de vacío con presión de ~5 mmHg. El fluido folicular se centrifugó a ~291 g por 7 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, se resuspendió y lavó el botón celular por triplicado con 7 mL de medio DMEM/Ham's nutriente mixture F12 (SIGMA) libre de suero, durante cada lavado las células se separaron del medio por centrifugación a ~291 g por 7 min a 4 °C. Después de la última centrifugación, el botón celular se resuspendió con 2 mL de DMEM/Ham's nutriente mixture F12 (SIGMA) suplementado con 1 mg/mL de DNase y 2.5 mg/mL de collagenase para prevenir la aglutinación de las células. Se incubaron 6×10^5 células viables en cajas Petri NUNC (8.8 cm²) con 3 mL de DMEM/Ham's nutriente mixture F12 suplementado con 5 % de suero de ternero fetal (FCS, por sus siglas en inglés) y gentamicina 0.12 mM, se mantuvieron a 38.5 °C con una atmósfera de 5 % de



CO₂ por 48 h, el medio se cambió cada 18 h. Durante las primeras 48 h de cultivo las células se mantuvieron en 5 % de suero de ternero fetal.

Transfección de células de la granulosa con el *bta-miR-19a*. Para llevar a cabo la transfección del *bta-miR-19a* en el cultivo de células de la granulosa se plantearon los siguientes tratamientos, se utilizaron las concentraciones de 10, 30 y 50 nM del *bta-miR-19a* (MC10649; Applied Biosystems) y como controles, un tratamiento únicamente con lipofectamina y otro sin lipofectamina. Se diluyeron 3 µL del *miR-19a* en 50 µL de Opti-MEM (Invitrogen™), correspondiente a cada tratamiento, mientras que en otros tubos se diluyeron 3 µL de lipofectamina (Invitrogen™) en 50 µL de Opti-MEM (Invitrogen™); se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se agregaron los complejos lipofectamina-DNA a cada cultivo celular, incubándolos con esta mezcla 5 h a 37 °C con 5 % de CO₂. Al terminar el tiempo de incubación, se descartó el medio Opti-MEM con lipofectamina-DNA y se reemplazó con medio DMEM/Ham's nutriente mixture F12 para mantener el cultivo celular durante 48 h a 37 °C con 5 % de CO₂. Para retirar las células del cultivo se removió el medio y se lavó la capa celular con PBS 1X, se adiciono 500 µL de Tripsina-EDTA 1X (Sigma®) incubando en placa de calentamiento a 37 °C, aproximadamente por 5 min o hasta que las células se separaron de la superficie del plato de cultivo. Las células en suspensión se centrifugaron a 1000 rpm por 5 min a 4 °C para descartar el sobrenadante y resuspender el botón en 1 mL de PBS 1X y centrifugar nuevamente. Para finalizar, el botón celular se resuspendió en 500 µL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA)



Extracción de RNAm de células de la granulosa por TRizol. El RNA total fue aislado de las células de la granulosa provenientes de cada tratamiento, se lisaron con 500 μ L del reactivo TRizol, las células lisadas se transfirieron a tubos de 1.5 mL y se incubaron en TRizol durante 5 min a temperatura ambiente, al término de la incubación se añadió 0.10 mL de cloroformo y se procedió a dar vórtex durante 15 s y se incubó 3 min a temperatura ambiente, después las muestras se centrifugaron a 3500 g durante 30 min a 4 °C y la fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo. Posteriormente, el RNA se precipitó con 0.25 mL de alcohol isopropílico, se mezcló manualmente y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, seguida por centrifugación a 3500 g durante 10 min a 4 °C; el sobrenadante obtenido se retiró y el sedimento de RNA se lavó con 0.5 mL de etanol al 70 %, después se centrifugó 5 min a 3500 g a 4 °C, el sobrenadante se eliminó y se dejó secar el precipitado de RNA durante 5 min a temperatura ambiente, después al RNA se adicionó 10 μ L del buffer TE. El RNA eluído se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific) a una longitud de onda de 260 nm. El RNA obtenido se almacenó a -80 °C hasta la síntesis de cDNA.

Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR). La síntesis de cDNA para cada tratamiento se realizó empleando la técnica de RT-PCR, partiendo de 10 ng de RNA total, empleando el kit SuperScript® VILO™ (Invitrogen™) en un volumen final 20 μ L. Las reacciones se colocaron en un termociclador Techne bajo el siguiente programa: temperatura de ajuste de 25 °C por 10 min seguida de 60 min a 42 °C, para desactivar la enzima a una temperatura de 85 °C por 5 min y por último se



mantuvo el sistema a 4 °C. Finalmente, el cDNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific) a una longitud de onda de 260 nm. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Las reacciones se realizaron en el equipo StepOne Plus de Applied Biosystems, las regiones específicas para la amplificación se obtuvieron utilizando los kits TaqMan® Universal Master Mix II y TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems™) que incluye sonda específica con el reportero FAM para el gen *Dicer* (Bt03217754_m1; Applied Biosystems™), utilizado como gen interno *RNA 18S* (Applied Biosystems™), las reacciones se realizaron conforme las condiciones del fabricante. La cuantificación de la expresión del gen *Dicer* se normalizó tomando como referencia la amplificación del gen interno *RNA 18S*.

Acción del miRNA *bta-miR-19a* Sobre la Expresión de la Proteína DICER Bovino

Para el análisis de la acción del *bta-miR-19a* sobre la expresión de la proteína DICER en las células de la granulosa, se llevó a cabo el cultivo de las células y se transfectaron con las mismas condiciones para los tratamientos establecidos (10, 30 y 50 nM del *bta-miR-19a* (MC10649; Applied Biosystems), como controles se utilizó, un cultivo únicamente con lipofectamina y otro sin lipofectamina, y se siguió la metodología descrita en el apartado de cultivo de células de la granulosa.

Extracción de proteínas de células de la granulosa por CellLytic M™.

Se siguieron las especificaciones del fabricante para cada tratamiento empleando el reactivo CellLytic M™ (Sigma). Se retiró el medio de cultivo y se



realizó un lavado con PBS que se descartó. Se añadieron 400 μ L de CellLytic M y 20 μ L de Protease inhibitor cocktail (GE Healthcare), se incubaron durante 15 min en agitación constante, al término se tomó el lisado de células y se procedió a centrifugar por 15 min a 12 000 g, el sobrenadante que contiene el extracto de proteínas se transfirió a un tubo nuevo. Se cuantificaron las proteínas empleando el kit de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) de Bio-Rad en un espectrofotómetro Nanodrop (ThermoScientific). Las proteínas se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Western blot. Los extractos de proteínas totales obtenidos de cada tratamiento del cultivo de células de la granulosa transfectados con el *bta-miR-19a* se separaron por SDS-PAGE para evaluar la presencia de la proteína DICER y como control interno se utilizó la proteína ACTINA. Primeramente se preparó el gel separador al 7 %, para lo cual se mezcló 3.5 mL de Acrilamida-Bisacrilamida (30 % - 0.8 %), 3.75 mL de 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8, 7.75 mL de agua, 50 μ L de persulfato de amonio al 10 % y 10 μ L de TEMED (BioRad), se agito suavemente y se adiciono en las placas de vidrio del equipo de electroforesis, se dejó que el gel polimerizara a temperatura ambiente. Al polimerizar el gel separador se procedió a preparar el gel concentrador al 3.9 %, adicionando 0.65 mL de Acrilamida-Bisacrilamida (30 % - 0.08 %), 1.25 mL de 4x Tris-Cl/SDS pH 6.8, 3.05 mL de agua, 25 μ L de persulfato de amonio al 10 % y 5 μ L de TEMED, se agitó suavemente y se adiciono sobre el gel separador ya polimerizado, se acoplo el peine formador de pozos y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Se procedió a realizar la electroforesis para lo cual se utilizó una concentración de proteínas para cada tratamiento de 54 μ g, las



condiciones de corrida fueron 1 h a 80 volts, seguido de 1 h a 100 volts para ACTINA y 2 h a 100 volts para la proteína DICER, cada corrida se realizó por duplicado, un gel se utilizó para la electrotransferencia de proteínas y el otro como control para teñir con azul de Coomassie. Se prosiguió a realizar la transferencia de las proteínas por electroforesis a una membrana de nitrocelulosa en condiciones de temperatura constante a 4 °C con 100 volts por 1 h, al terminar la transferencia la membrana se tiño con rojo de ponceau para confirmar la presencia de las proteínas. Se realizaron lavados con PBS 1X hasta eliminar el colorante y se dejó en solución de bloqueo PBS1X-Tween20 0.05 % y leche *svelty* baja en grasa al 5 % durante toda la noche a 4 °C con agitación constante. Para la detección de las proteínas se realizó una incubación con el anticuerpo policlonal contra DICER (H-212, Santa Cruz Biotechnology) y el anticuerpo policlonal contra ACTINA (H-300, Santa Cruz Biotechnology), ambos con dilución 1:200 y una concentración de 200 µg/mL, el periodo de incubación fue de 3 h a temperatura ambiente y agitación constante, al término se realizaron 5 lavados con PBS1X-Tween20 al 0.1 % para realizar la detección de los anticuerpos se incubó con un segundo anticuerpo de cabra anti-conejo IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnolgy) diluido 1:1000 con una concentración de 200 µg/mL, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Al concluir la incubación del segundo anticuerpo se lavaron las membranas con PBS1X-Tween20 al 0.1 % y se procedió al revelado con el kit ECL western blotting substrate (Promega™) siguiendo las especificaciones del fabricante.



Análisis Estadístico

Para el análisis de expresión génica se analizó la variable abundancia relativa del RNAm del gen *Dicer* bovino, esta abundancia se calculó de acuerdo al método de $\log 2^{-\Delta\Delta Ct}$ sugerido por Livak y Schmittgen (2001). Para el análisis de *Western blot*, posterior a la digitalización en formato JPG de la placa autorradiográfica; la concentración de DICER se estimó con el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>), seleccionando el área de la mancha y obteniendo densidad óptica relativa; este procedimiento se realizó 3 veces de forma independiente. Para todos los casos se realizó un análisis de varianza simple mediante el procedimiento GLM de SAS (2006), sólo se tuvieron repeticiones técnicas y no de muestreo. La comparación de medias se realizó con una prueba Tukey con un valor de $P < 0.05$.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación *in silico* de un miRNA Candidato que Regule a *Dicer* Bovino

Identificación del UTR´3 de *Dicer* bovino. Para determinar *in silico* el miRNA responsable de la regulación de la expresión del gen *Dicer*, primero se realizó la búsqueda en el NCBI del gen *Dicer* con número de acceso NM_203359.1, el cual tiene un tamaño reportado de 5828 pb, con una región codificante que inicia en la base 17 y termina en la base 5788, lo que deja una longitud de 40 pb para la región UTR´3, que es muy corta para poder determinar la unión de un miRNA. Dado que el resto de la secuencia que compone el UTR´3 no estaba reportado, se procedió a la identificación completa de esta región, para lo cual se realizó una búsqueda de homología con el programa BLAST en el NCBI, con la secuencias del UTR´3 humano (NM_177438.2) contra el genoma de *Bos taurus* UMD 3.1 reportado en el NCBI.

El resultado mostro un 83 % de identidad entre el UTR´3 humano con el cromosoma 21 de *Bos taurus*, (Figura 1). Una vez identificado en el cromosoma 21 el codón de paro, fue posible ubicar la señal de poliadenilación, lo que llevó a determinar una región de 4370 pb que conforman el UTR´3 del gen *Dicer* bovino (Figura 2), la cual esta después del gen *Dicer* (NM_203359) anteriormente analizado (Figura 3).

Identificación y selección del miRNA en miRmap. Una vez determinado el extremo UTR´3 del gen *Dicer* bovino, se procedió a identificar el miRNA que pudiera participar en la degradación de su RNAm, para lo cual se utilizó el software miRmap (Vejnar, 2012), el cual se basa en interacciones termodinámicas del complejo miRNA-RNAm, la probabilidad de unión,



```

>AGTTACAGGATTGCCAAGTCTGCAGCAGCAAGAAGAGCCCTGCGAAGCCTCAAAGCTAATCAACCTCAGGTTCCCAATAGCTGAAAACCCCTTTTTAAATTA
AAAAAAAAAGGAAAGCAGAATTAAGGTGGAAAATATTTAAGTTGAAAAGGATGATTTAAAACCTGATAGTGAGTGGAACGAGTTGAAGGCAGAACGTAAGTTT
ATAACAAGATAGATTACAGAATAAAACATTTAACCTATGTATAAAAATTTTGGAACTAACGTAGTTTTAGTTTTTTGGCGCAAACACAATCTTCTTGTCTT
CACTTCTGCTTTGTTTAAATCACGAGAGTGCCTTACTGATGACATTTTCGCAAGTGTCAAAGTGATTTTGACAGTTTTTGTCTTGTTCATTTAGTTTAA
TCGGTTTTGCTTAGAGTTAGGAGTCCAAGGAGCTTAAACCTGAAACAGCACCCCCCCACAACGGGTCTGTTGAGAGCTCTGGGCAGCCATCAGCGTGC
CCCGCCCTGCGGCCTCGATAAGCCGAGCAGAGGGATGCGGTTTTGAGAGAGGAGTGTGCTGGTGTCTCTCTCCCTTCCACGTTGTGTGCGATAAGAC
TCACTGTTGCACTTACTAGTAAGGGACAGACTGTTGATCAGCATGGGCCGGCGTGTGGCAGATCACATTCAGTTTTCTCATGCCATGCTATCTTGCA
TCTTGCCTTAAAAGTAAAATCCTTGTGGATAATCTTTCACCTCTGATCTTCTGGAACAACTGTTCCACATTCCTTTCATTCTGTCTATTTATGCATTA
AGCGTGATACCTAACGACTCACTAGTATAGCTGTAACCTAACTAATGACAGGATATATGAGAATTTCTGTGAGGTGTACTGAAGACATTTTCAAACCAG
ACCTATGGATTTTTTAAAAGATACATCATAAGAATCATCTTTGGCTAAAATACCCCACTTTTACTAGAAACCTCCAGCTAGGTAGTTCCACGGATGGA
CAAATAACCTTGCCCTGTAGGCTGTGCTCTAACAAAATAAATTTATACATATCACACCTAAAATATGCTGCAGATCTTACAATGGATTGATTACTTAA
GCAGAACAGAGCACCTTACCCTGAGTCTTCTCACATACATTTCTTACTGTGCTTTTCACAGTGTTCATGCAGACTTCACCTACCAAAGCTGTGCTGT
AAGTTTTAACCTTTGCGATAAACTGCCGTAATTTTGATATGTCTGTGATTTAGGCCATTAATAATTTAGTAACTAGCTCATTGTTTCCATCTTTGG
AAAAGACACTTTTAGGCGTTTGCCTAAGTTTCTTAAATTAGACTTGTAGGCACCTTCACTTAAATACCTCAGTTCTTTTCTTTTGCATGCATGTTTCC
TGGTGCTACGTTTATGTATTATGCTTGAATTTTAAATTTTTTTTTTTTGCATGTAACATAATACCTCTTAAATTTACCTTTTAAAAGCTGTGGGT
CCCAACATACCAGTAGAGTTTTGCTGCAATTTGCCCTTAAATTAAGTTGAAATTCAGAAAGCTGAGCAGAGGTGTCTGTAATTTCCAGCACATCAAT
TGACGCCTCATATAATGCTGCATTGATTTTTGAATTCAGTCAATACTGTACTTCTCGCTTATCTGCGCCACCCACCCAGAGAAACACCTCTGCACG
CCAGAAACCTGTCCGCTCCGCTTCTAAGGAGACCCGAGTGAAGGGAGCATTAGCTTCTCCACATGGTTTGTGCTCTCCAACCTTAAACTTCCACTG
TACTAAACGAGCTTTAGAGCAAATTTATTTGGATGGACATGTTTTTAAAATTTAATTCGATTTGGAACCTTTGATTTCTATTTGATTTTTTTTTTAA
CCATGTAAGATCTCCTGACAATGTAAAACCGCGCTTCTTGAATTCATAACTGTAAATGTGTGAGCTGGATATGAATTTTCTTGTGAGGGTGTTCG
CTGTATCACAAATCTCTTGATAAGTATAAACTACCTGCTGCCAGGAGCTTAGGGCCTTGCGTTGTGTCTAATGCACTAATCCAGTGTGAGGGCCTCT
GGCACAAAATCAGATTTGTTTACAGTTACAATCCCCGTTGGGAGAAAATGCCCAATATAATTTGTAACCTTAAAGAGATTTTTTTGTTAATACTAAA
GACTTGGATAAGATTAGTTCACACAGTCTCAGGGTTCAAATTTCTGCTATCAATCAAATGTTTTTCAACAGCAGACTTTAGCTATTGCTTTTTTTT
CCTTTTGGTTGGAGGACAGTAGCAGATTTTAGTTTTGTGACTCACACTTTGAAGCAATCTCTGATCCCCGTTCCCAAGTTGAAAAGTCAAACCTCTG
CGAAATGGTTATGAATGCTTTTGTGCTGCTGATTTTTTAAATGCTGTAACTTCCCCCAGTTAGCTTACTGAAATGTTTTGCATCCATTTAATTAAG
AAATGCTCTCTGTCACCCACTCGACCACCTTGTCTGTCATCCTTTTGTTCCTGTGATTGCCACGTGGGACCCGGTGTGATCTGGAAGCCCCCTGGT
TTGTACGGCCAGCACACGCGGGAAGGACTGGCGGGCAGTTTTGAAAAGCAACTGCAGAAATTCCTTACGATGATTTGTGTGAGGTTAGTTGGCATGA
TAAATGTTTTTTGATTTTTTTTTTTAAATAACTTTTTCAGCAGTCTGACTATGCTGCGTTTTGTAAGGCTTTTTTCCCTCTGTTCTGTTTATGTA
CATTGCACCTGGTACCATGCTTTACCTCATTTCAAGGAAAATATGCTTAAACGAGAGGAAAAATGTGGTTTGGCCTCGCTGCTGTTTTGATAAACG
AAGATAATATAATGCCTGCAATGTGTCATATACTTGCACAACCTAAATAGGTCATTTTTGTCTGTGGCATTTTTACTGTTTTGTGAAAGTATGACA
TGAACCTTAAATTTATGTTTTAAAGATGTTTTTAACTTTTTCTTTTCTTTTACGTTATGTGAAATGATTAATTTAGAACAACCTTCAACACTCCTG
TTTTAAATGCTAGTATTTTTCTCTCTTAAATAATAGCTTGCCTCAGAAAGATTCAAACCTACCTGCCTAAAATAGCAAGAGACTGGAGGCTACTCG
CAGTTTATAAGTACAATTTTACACAGCAGTCCGGCTCTTGGAGTCATCACCTGACATTTGGCCGGTACTGCAGAGTGCAGAGACTGATCGAGATGC
GTTTCAAGTCTTCAAGCCCCGTTGATTTAAAACCTTCTATCTTGTCTGTTAGGGTATCTAATCCTTTTACACAACATTTAAGCCACCAAACCTGAG
TTTTGAAACAGCATCTGAAGTTCTGTTAGCGCCCTGAACCAAGTTTGTGTTTTCGCTACGGAACGAAACTCATGTTGTTTATTTACCTATATGGT
AAATAGGTATATTTTTCAACCCTGATTGCTTTTTCAGGAACCTAATTTTCCAAAATAAATTTCTTTATTTATATTTGATACATGAGAAGTTTTTAA
ACCAAGAATATTGAAATGATTTTTAAAAGTTGTTGAAATTTGCCAGTAGCAACTAGGGAATTTGCATTTGAGACTATTGATTTTCCACTAGAGGTG
TTGAAACTAATCTGTAATATATTTTAACTATTGTGTTTTTGTTTTTTCCCTCTAGTCCATTTTATTGGACATCACCCACCTTTAAATTTTCTAGAT
CAGAATCACTGCAGCAGCAGTTACGTAGCAAAAATGCAAAGGTGAACAGAAAGTGAATTTCTGGCTTTTCTGCTGTAATAAGAACGAAAGAAAATG
AAGTAAAGACTAACATGTATAATTTGACAATAAAATACTTAGCATCACATGCTGCAGCTGTTTTAAGGAACATGATGTGATTCGTTTACATACGGAAT
GTTCGAGTCTGCACCTTAAAGGGTACGATTACCTTTAGTCTGTTTTTGTTTTTTGTCTTTCTTTTGTAAATAATTTGAGCCAAGTAAATCTCCAAATAA
TGTTCACTTTG

```

Figura 2. Secuencia del extremo UTR 3 de Dicer bovino. En formato FASTA, determinada por análisis *in silico*. Indicando secuencia de paro (TGA), sitio de unión del miR-19a (TTTGCGC) y la secuencia de poliadenilación (AATAAA).

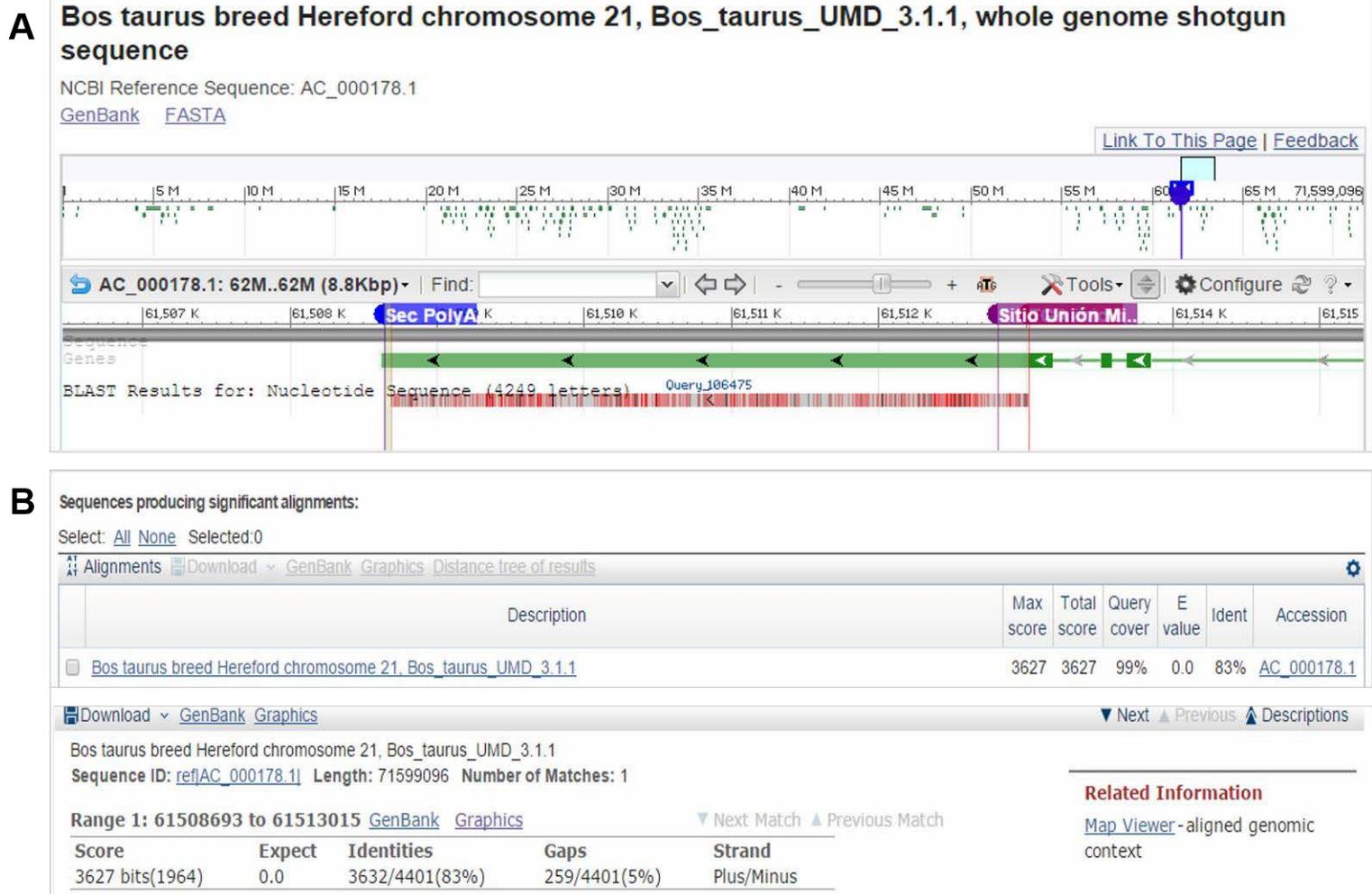


Figura 3. Identificación del extremo UTR´3. (A) Identificación de las secuencias de Poliadenilación y codón de paro para la secuencia codificante del gen. (B) Porcentaje de identidad del UTR´3 obtenido en el genoma de *Bos taurus*.



identificación de sitios blanco conservados entre especies y analiza las características de la secuencia blanco. En la base de datos del miRmap se tiene reportados para el bovino alrededor de 500 miRNAs. Al realizar el análisis de cada uno de los miRNA frente al UTR'3 de *Dicer* bovino, se logró identificar al *bta-miR-19a* con sitio de unión para *Dicer* (Cuadro 1).

Acción del miRNA *bta-miR19a* Sobre la Expresión de *Dicer* Bovino

Para demostrar la acción del *bta-miR19a* sobre la regulación del RNAm *Dicer*, fue necesario introducir esta molécula en un sistema celular de origen bovino que tuviera una expresión endógena del gen *Dicer*, razón por la cual se escogió al cultivo de células cumulares como modelo celular para evaluar la acción de este miRNA. En concordancia con lo reportado por Grado-Ahuir *et al.* (2009) las células fueron cultivadas de manera exitosa (Figura 4) y mostraron una expresión positiva del gen *Dicer* (Figura 5) de acuerdo a lo reportado por Burrola-Barraza *et al.* (2011). El resultado que se obtuvo de la expresión de *Dicer* después de que la células fueron transfectadas con diferentes concentraciones del *bta-miRA19a* se observa en la Figura 6, donde se muestra que el *bta-miR-19a* es capaz de disminuir la expresión del RNAm de *Dicer* bovino. Aunque no se encontró diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) en ninguno de los tratamientos, se observa una clara tendencia a la disminución de la expresión de *Dicer* al transfectar las células de la granulosa con una concentración de 50 nM del *bta-miR-19a*. Esto implica que *Dicer* bovino pueda regularse de una forma similar a lo que lo hace *Dicer* humano (Tao *et al.*, 2011), es decir *Dicer* bovino puede ser regulado mediante la acción del microRNA *bta-miR-19a*.



Cuadro 1. Parámetros de predicción del software miRmap

PARÁMETROS	<i>bta-miR-19a</i>
ΔG open	15.11
ΔG total	1.71
Probability exact	0.25
Conservation PhyloP	1.00
miRmap score	0.18
Secuencia	5'-AGUCAAAACGUAUCUAAACGUGU-3'

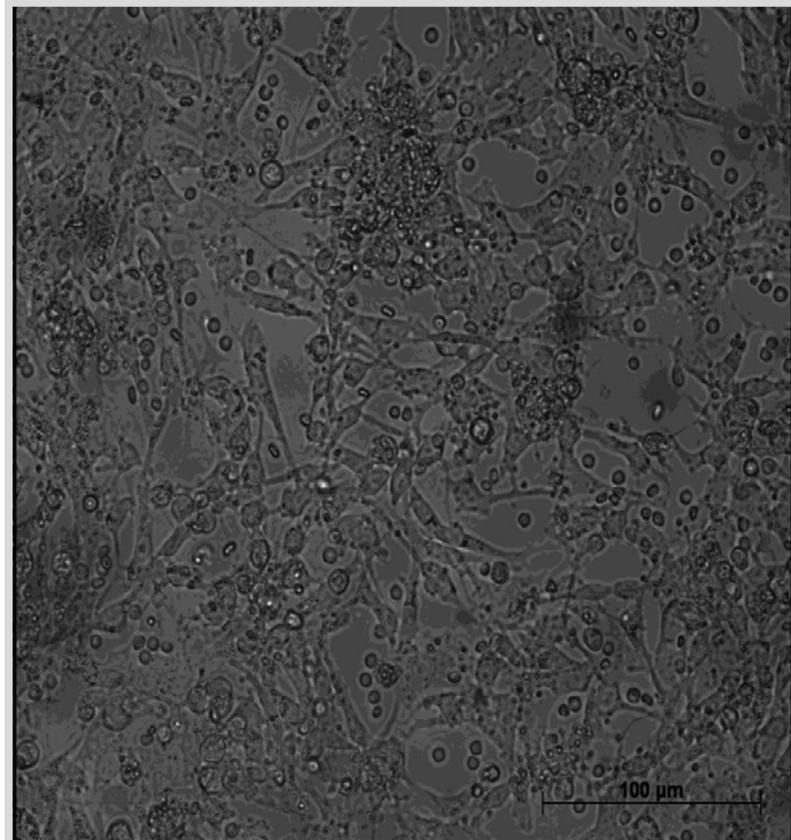


Figura 4. Células de la Granulosa en cultivo celular. Foto tomada con el microscopio Axiovert 40 CFL (Zeiss) en campo claro a un aumento de 20X.

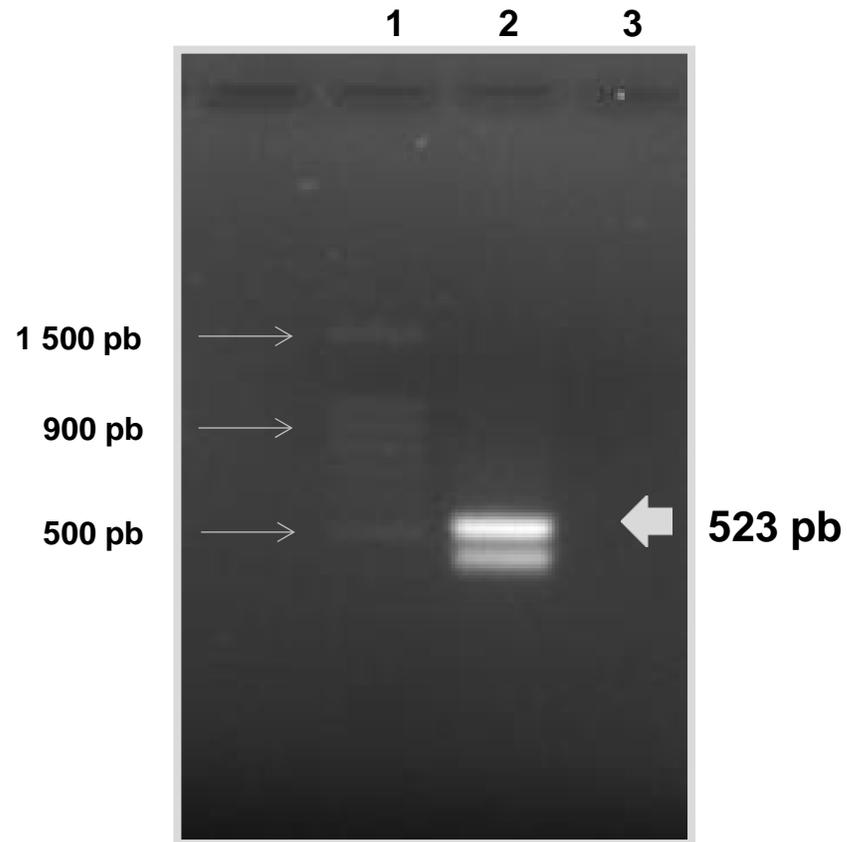


Figura 5. Amplificación del gen *Dicer* en cDNA de células de la granulosa obtenidas en cultivo celular. 1, Marcador de peso molecular; 2, cDNA de células granulosa y 3, Control negativo (Burrola-Barraza et al, 2011).

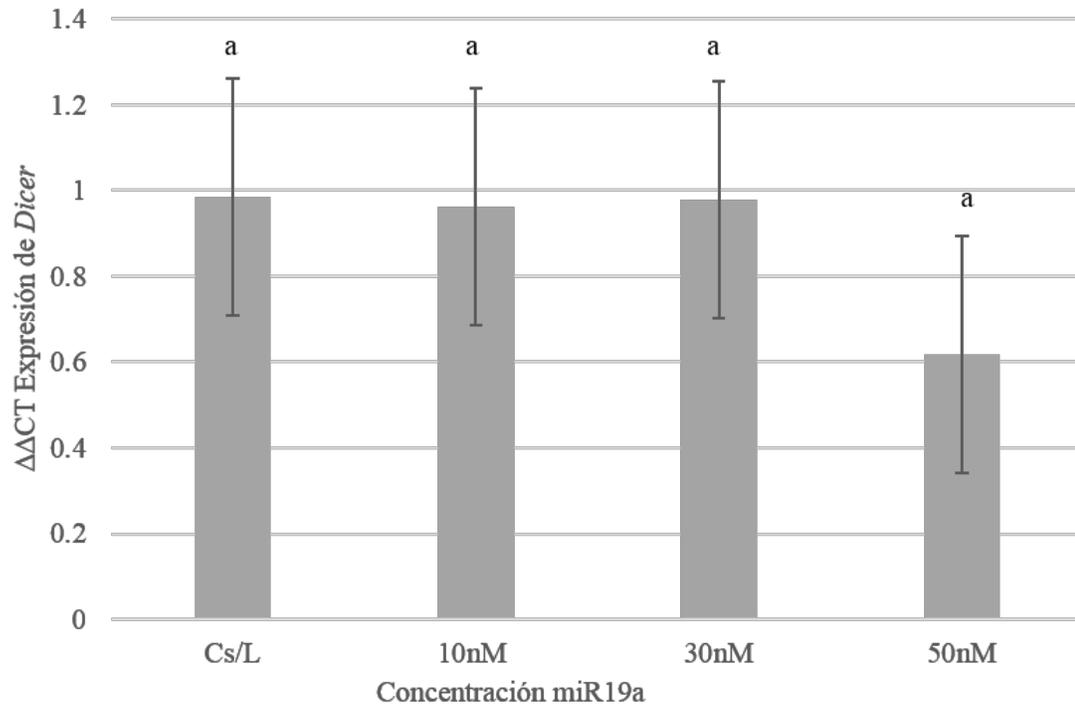


Figura 6. Nivel de expresión de RNAm *Dicer* en células de la granulosa bovina transfectadas con *bta-miR-19a*. Letras en minúsculas diferentes sobres las barras representan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).



Acción del miRNA *bta-miR-19a* Sobre la Expresión de la Proteína DICER

Bovino

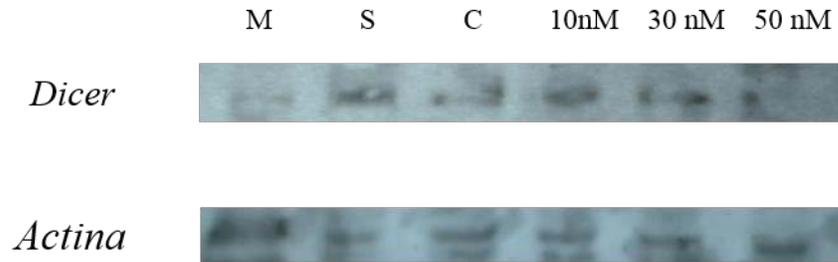
Para confirmar que esta depresión de la expresión del gen *Dicer*, afectaba la traducción de la proteína, se realizaron ensayos de *Western blot* con extractos proteicos provenientes de células de la granulosa transfectadas con el *bta-miR19a*. Los resultados indicaron que en las células de la granulosa transfectadas con 50 nM de *bta-miR19a*, la presencia de la proteína DICER disminuye en comparación con los otros tratamientos, aunque sin diferencia significativa ($P > 0.05$; Figura 7). Sin embargo aunque no se observó diferencia estadística es claro como la concentración de la proteína DICER se deprime por la acción del *bta-miR19a*.

En este sentido se ha demostrado en diferentes investigaciones que *Dicer* es regulado por acción de miRNAs. Tokumaru *et al.* (2008) reportaron la regulación de *Dicer* por acción del miRNA *let-7*. He *et al.* (2014) demostraron que el miR-130 tiene como blanco al RNAm de *Dicer*. Así mismo, Tao *et al.* (2011) demostraron que el miR-18a es otro miRNA que tiene la función de regular la expresión de *Dicer*. Las investigaciones sugieren fuertemente que *Dicer* puede ser regulado por varios miRNAs.

El miR-19a se ha identificado como miembro del *cluster* miR-17-92 en diferentes especies (Aravin *et al.*, 2003; Altuvia *et al.*, 2005; Romao *et al.*, 2014), al cual también pertenece el miR-18a, quien a su vez regula a *Dicer*. En este estudio se demostró que el miR-19a pudiera regular la expresión de *Dicer* en células de la granulosa de bovino por medio de la interacción con el UTR'3 de su RNAm.



A



B

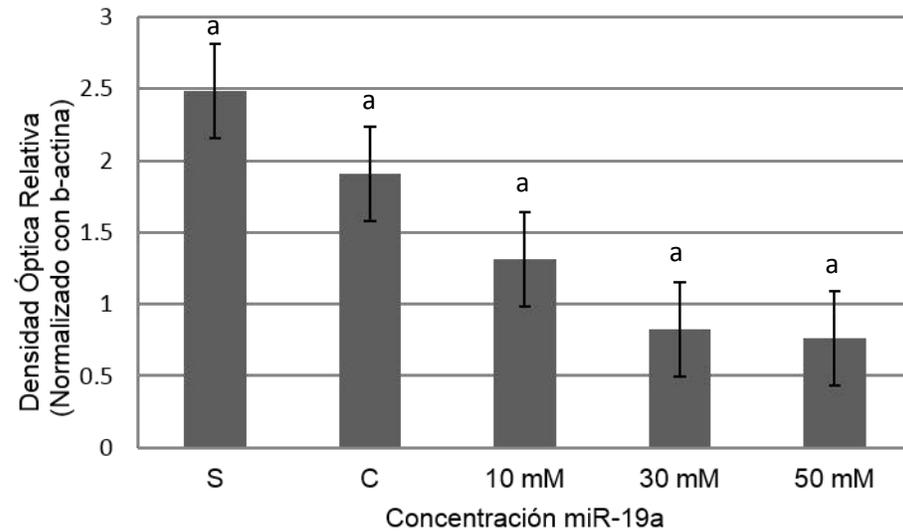


Figura 7. Expresión proteica de DICER en células de la granulosa bovina transfectadas con *bta-miR-19a*. Letras en minúsculas diferentes sobres las barras representan diferencia estadísticamente significativa (P<0.05). M, Marcador de peso molecular; S, Control sin lipofectamina; C, Control con lipofectamina.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En cultivos de células de la granulosa bovina transfectadas con el *bta-miR-19a*, la síntesis de la proteína, así como la presencia del RNAm que la codifica disminuyen significativamente, estos resultados se sustentan en los análisis realizados por *western blot* y PCR en tiempo real.

Estos resultados implican que *Dicer* bovino puede ser regulado por la vía de acción de miRNA, forma homologa a lo que lo hace *Dicer* humano, lo que supone un mecanismo de regulación de expresión similar, al igual que lo observado en otros RNAm maternos bovinos como *Nobox* y *Nmp2*.

Por lo tanto se puede concluir que, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la expresión del gen *Dicer* bovino tiende a ser regulada a través de la acción del *bta-miR-19a*.

Se recomienda aumentar la concentración del *bta-miR-19a* al llevar a cabo el experimento de transfección en el cultivo de células de la granulosa, así como realizar una transfección estable.



LITERATURA CITADA

- Altuvia, Y., P. Landgraf, G. Lithwick, N. Elefant, S. Pfeffer, A. Aravin, M. J. Brownstein, T. Tuschl y H. Margalit. 2005. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research*. 33: 2697–2706.
- Aravin A. A., M. Lagos-Quintana, A. Yalcin, M. Zavolan, D. Marks, B. Snyder, T. Gaasterland, J. Meyer y T. Tuschl. 2003. The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Developmental Cell*. 5: 337–350.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116: 281-297.
- Bettegowda, A. y G. W. Smith 2007. Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. *Front. Biosci.* 12:3713-3726.
- Bettegowda A., K. Lee y G. W. Smith. 2008. Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 45-53.
- Bortvin, A., M. Goodheart, M. Liao y D. C. Page. 2004. Dppa/Pgc7/stella is a maternal factor and is not required for germ cell specification in mice. *Dev. Biol.* 4: 1-15.
- Brevini, T. A., F. Cillo, S. Colleoni, G. Lazzari, C. Galli y F. Gandolfi. 2004. Expression pattern of maternal factor zygote arrest 1 (Zar1) in bovine tissues, oocyte, and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 69: 375-389.
- Burns, K. H., M. M. Viveiros, Y. Ren, P. Wang, F. J. DeMayo, D. E. Frail, J. J. Eppig y M. M. Matzuk. 2003. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization oocytes and embryos. *Science*. 300: 633-636.
- Burrola-Barraza, M. E., R. Hernández-Seañez, M. Barcelo-Fimbres, F. A. Rodríguez-Almeida, E. González-Rodríguez, S. García-Quiñonez, J. A. Grado-Ahuir y V. Moreno-Brito. 2011. Dicer gene expression during early bovine embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 78: 622.
- Burrola-Barraza, M. E. y E. González-Rodríguez. 2012. Efectos de los RNAm maternos sobre la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano en mamíferos. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 6: 39-68.
- Bushati, N. y S. M. Cohen. 2007. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Bi.* 23: 175-205.
- Concepcion, C. P., C. Bonetti y A. Ventura. 2012. The miR-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J.* 18: 262-267.
- De La Fuente, R. 2006. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev. Biol.* 292: 1-12.
- De Moor C. H. y J. D. Richter. 2001. Translational control in vertebrate development. *Int. Rev. Cytol.* 203: 567-608.
- Eichenlaub-Ritter U. y M. Peschke. 2002. Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Hum. Reprod. Update.* 8: 21-41.
- Feng, Y., J. Liu, Y. Kang, Y. He, B. Liang, P. Yang y Z. Yu. 2014. miR-19a acts as an oncogenic microRNA and is up-regulated in bladder cancer. *J. Exp. Clin. Canc. Res.* 33: 67-77.



- Gu, T. P., F. Guo, H. Yang, H. P. Wu, G. F. Xu, W. Liu, Z. G. Xie, L. Shi, X. He, S. G. Jin, K. Iqbal, Y. G. Shi, Z. Deng, P. E. Szabó, G. P. Pfeifer, J. Li y G. L. Xu. 2011. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*. 477: 606-610.
- Grado-Ahuir, J. A., P. Y. Aad, G. Ranzenigo, F. Caloni, F. Cremonesi y L. J. Spicer. 2009. Microarray analysis of insulin-like growth factor-I-induced changes in messenger ribonucleic acid expression in cultured porcine granulosa cells: possible role of insulin-like growth factor-I in angiogenesis. *J. Anim. Sci.* 87: 1921-1933.
- He, L., H. Y. Wang, L. Zhang, L. Huang, J. D. Li, Y. Xiong, M. Y. Zhang, W. H. Jia, J. P. Yun, R. Z. Luo y M. Zheng. 2014. Prognostic significance of low DICER expression regulated by miR-130a in cervical cancer. *Cell Death Dis.* 5: 1205-12015.
- He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon y S. M. Hammond. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 435: 828-833.
- Kaneda, M., M. Okano, K. Hata, T. Sado, N. Tsujimoto, E. Li y H. Sasaki. 2004. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting, *Nature*. 429: 900-903.
- Lugo-Trampe, A. y K. C. Trujillo-Murillo. 2009. MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Rev. Med. Univ.* 11: 187-192.
- Li, L., P. Zheng y J. Dean. 2010. Maternal control of early mouse development. *Development*. 137: 859-870.
- Lingenfelter, B., S. Tripurani, J. Tejomurtula, G. Smith y J. Yao. 2011. Molecular cloning and expression of bovine nucleoplasmin 2 (NPM2): a maternal effect gene regulated by miR-181a. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9: 40-48.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25: 402-408.
- Nakamura, T., Y. Arai, H. Umehara, M. Masuhara, T. Kimura, H. Taniguchi, T. Sekimoto, M. Ikawa, Y. Yoneda, M. Okabe, S. Tanaka, K. Shiota y T. Nakano. 2007. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature Cell Biology* 9: 64 – 71.
- Newport, J. y M. Kirschner. 1982. A mayor developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell*. 30: 675-686.
- Olive, V., M. J. Bennett, J.C. Walker, C. Ma, I. Jiang, C. Cordon-Cardo, Q. J. Li, S. W. Lowe, G. J. Hannon y L. He. 2009. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Gene Dev.* 23: 2839-2849.
- Payer, B., M. Saitou, S. C. Barton, R. Thresher, J. P. Dixon, C. Zahn, W. H. Colledge, M. B. Carlton, T. Nakano y M. A. Surani. 2003. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr. Biol.* 13: 2110-2117.
- Pennetier, S., C. Perreau, S. Uzbekova, A. Thelie, B. Delaleu, P. Mermillod y R. Dalbies-Tran. 2006. MATER protein expression and intracellular



- localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *Dev. Biol.* 6: 26-35.
- Plasterk, R. H. 2006. Micro RNAs in animal development. *Cell.* 124: 877-881.
- Romao, J. M., W. Jin, M. He, T. McAllister y L. L. Guan. 2014. MicroRNAs in bovine adipogenesis: genomic context, expression and function. *BMC Genomics.* 15:137-152
- Richter, J. D. 1999. Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 446-456.
- SAS. 2006. User's guide: Statistics (versión 9.0). SAS Inst. Inc., Cary, N. C.
- Saitou, M., S. C. Barton y M. A. Surani. 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature.* 418: 293-300.
- Schultz, R. M. 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays.* 15: 531-538.
- Seli, E., M. D. Lalioti, S. M. Flaherty, D. Sakkas, N. Terzi y J. A. Steitz. 2005. An embryonic poly(A)-binding protein (ePAB) is expressed in mouse oocytes and early preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 367-372.
- Spirin, A. S. 1994. Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side?. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 107-117.
- Tang F., M. Kaneda, D. O'Carroll, P. Hajkova, S. C. Barton, Y. A. Sun, C. Lee, A. Tarakhovsky, K. Lao y M. A. Surani. 2007. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Gene. Dev.* 21: 644-648.
- Tao, J, D. Wu, P. Li, B. Xu, Q. Lu y W. Zhang. 2011. microRNA-18a, a member of the oncogenic miR-17-92 cluster, targets Dicer and suppresses cell proliferation in bladder cancer T24 cells. *Mol. Med. Rep.* 5: 167-172.
- Telford, N. A., A. J. Watson y G. A. Schultz. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 90-100.
- Tesfaye, D., D. Worku, F. Rings, C. Phatsara, E. Tholen, K. Schellander y M. Hoelker. 2009. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. *Mol. Reprod. Dev.* 76: 665-677.
- Tokumar, S, M. Suzuki, H. Yamada, M. Nagino, y T. Takahashi. 2008. Let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis.* 29: 2073-2077.
- Tong, ZB., L. Gold, K. E. Pfeifer, H. Dorward, E. Lee, C. A. Bondy, J. Dean y L. M. Nelson. 2002. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat. Genet.* 26: 267-268
- Tripurani, S., K. Lee, G. Wee, G. Smith y J. Yao. 2011. MicroRNA-196a regulates bovine newborn ovary homeobox gene (NOBOX) expression during early embryogenesis. *Dev. Biol.* 11: 25-33.
- Tripurani, S., K. Lee, L. Wang, G. Wee, G. Smith, Y. Lee, K. Latham y J. Yao. 2011. A Novel Functional Role for the Oocyte-Specific Transcription Factor Newborn Ovary Homeobox (NOBOX) during Early Embryonic Development in Cattle. *Endocrinology.* 152: 1013-1023.



- Vejnar, C. y E. Zdobnov. 2012. miRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength. *Nucleic Acids Res.* 40: 11673-11683.
- Witold, F., S. N. Bhattacharyya y N. Sonenberg. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature.* 9: 102-104.
- Wu, X., M. M. Viveiros, J. J. Epping, Y. Bai, S. L. Fitzpatrick y M. M. Matzuk. 2003. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat. Genet.* 33: 187-191.