



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
Maestría en Ciencias Biomédicas



Efecto de la sobreexpresión de miR-23b en los niveles de fosforilación de Gab1 y FAK vía c-Met y en la migración e invasión en líneas celulares de cáncer cervico uterino

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

QBP. Alma Edith Longinos González

Directora de tesis: Dra. Gloria Fernández Tilapa

Co-directora de tesis: Dra. Hilda Jiménez Wences

Chilpancingo, Guerrero, México. Enero de 2019.

Efecto de la sobreexpresión de miR-23b en los niveles de fosforilación de Gab1 y FAK vía c-Met y en la migración e invasión en líneas celulares de cáncer cérvico uterino

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica y Laboratorio de Investigación en Biomoléculas de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) y en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) Laboratorio 5 Planta Alta del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).

Bajo la dirección de

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Codirección de:

Dra. Hilda Jiménez Wences

y la asesoría de:

Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Mario César López Camarillo

Los experimentos se realizaron en el equipo adquirido a través del proyecto Apoyo al fortalecimiento de la Infraestructura Científica y Tecnológica: Adquisición de infraestructura científica para la creación del laboratorio de Investigación en Biomoléculas, para el fortalecimiento del estudio *in vitro* de la relación agente infecciosos y cáncer. INFR-2016-01, Clave 271186, financiado por el CONACyT en la convocatoria 2016.

Esta Investigación se desarrolló con el financiamiento de CONACYT obtenido en la Convocatoria 2012 de Ciencia Básica, proyecto No. 183341 y con recursos otorgados por el Programa de Fortalecimiento de la Calidad Educativa PFCE-SEP 2017 de la Secretaría de Educación Pública. Cuerpo Académico Agentes Infecciosos y Cáncer (Consolidado, UAGro-CA194). Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Alma Edith Longinos González, recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis

Dra. Gloria Fernández Tilapa, gracias por su gran apoyo y dedicación, por su conocimiento brindado, su paciencia y sus palabras de motivación ya que han sido fundamentales para mi formación como investigadora, gracias por haberme aceptado como parte de su grupo de tesis, gracias por su afecto y amistad.

A mis sinodales

Dra. Hilda Jiménez Wences, Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo, Dra. Mónica Espinoza Rojo, Dr. Mario César López Camarillo, por su valiosa asesoría en todo el proceso de realización de esta tesis, su paciencia que me tuvieron al momento de revisarme, sus sugerencias y observaciones, hasta culminar con éxito este trabajo de tesis.

A la MCB Gabriela Elizabeth Campos Viguri

Gracias por tu ayuda incondicional durante cada una de las etapas del desarrollo de esta tesis, por tus consejos, paciencia, cariño y motivación constante, por tu ejemplo de trabajo y principalmente tu amistad.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Investigación Clínica, Laboratorio de Investigación en Bacteriología y de la generación de la MCB 2016-2018

Gracias por el apoyo que me brindaron, las pláticas, armonía grupal y convivencia. ¡Gracias compañeros y amigos!

DEDICATORIAS

A Dios

Por darme la sabiduría y fortaleza para continuar, porque a pesar de momentos difíciles que he pasado nunca me has abandonado, por esa maravillosa familia que me has prestado, por ayudarme a cumplir uno de mis tantos sueños, por permitirme vivir y seguir luchando por cumplir todos mis propósitos. ¡Gracias Dios!

A mi hijo

Dante Peralta Longinos, que tú has sido mi principal motivación para seguir adelante, concluir con éxito este proyecto, superándome profesional y personalmente. ¡Te amo!

A mi esposo

Jonathan Peralta Hernández, gracias por tu apoyo incondicional, la ayuda que me has brindado, por tus enseñanzas, tu apoyo, comprensión, cariño y amor. ¡Te amo!

A mis padres

Margarita González Ávila e Ignacio Longinos Salgado, porque gracias a su amor, guía, sus consejos y motivación constante, he llegado a realizar una de mis más grandes metas de vida, fruto de su inmenso apoyo, amor y cariño, que constituye una de la herencia más valiosa que pudiera recibir y por la cual les viviré eternamente agradecida. ¡Los amo!

A mi hermano

Guiper Abimael Longinos González, tú eres el mejor hermano que Dios pudo darme y parte importante de mi vida, gracias por tu confianza, apoyo y tus buenos consejos, te amo con todo mi corazón.

A mis amigos

Abril, Arturo, Kenia, Isabel, Alejandra, gracias por su apoyo moral, sus ánimos, sus consejos locos, su amistad, por esas salidas para distraernos un poco. No olviden que siempre estaré ahí cuando lo necesiten.

Con amor y respeto

Alma Longinos

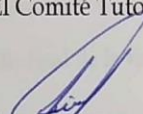


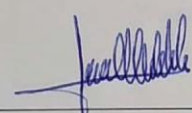
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

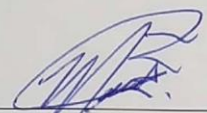
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 27 días del mes de agosto de dos mil dieciocho, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de la sobreexpresión de miR-23b en los niveles de fosforilación de Gab1 y FAK vía c-Met y en la migración e invasión en líneas celulares de cáncer cérvico uterino", presentada por la alumna Alma Edith Longinos González, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

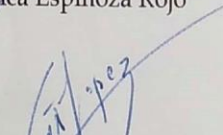
El Comité Tutorial


Dra. Gloria Fernández Tilapa
Dirección de tesis


Dra. Hilda Jiménez Wences
Codirección de tesis


Dra. Mónica Espinoza Rojo


Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo


Dr. Mario César López Camarillo

Vo. Bo

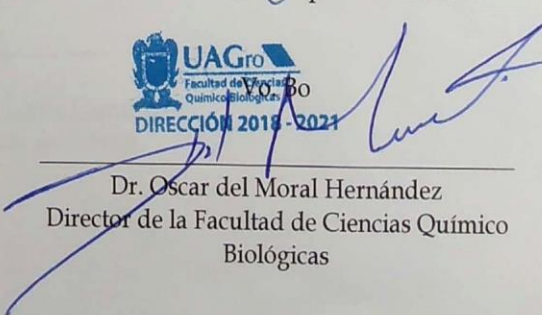
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



Coordinación del
Coordinador de la Maestría en Ciencias

Coordinación 2014-2018




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

ÍNDICE

Contenido	Pág.
I. RESUMEN.....	ii
II. ABSTRACT.....	iii
III. INTRODUCCIÓN.....	1
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	4
V. RESULTADOS	8
VI. DISCUSIÓN	16
VII. CONCLUSIONES.....	19
VIII. REFERENCIAS	20

I. RESUMEN

A nivel mundial el cáncer cérvico uterino (CaCU) es el segundo cáncer más frecuente en mujeres y la infección persistente por VPH-AR es el principal factor de riesgo para su aparición. Los factores epigenéticos como la expresión desregulada de microRNAs (miRNAs) también contribuyen a su desarrollo ya que tienen como función regular la expresión de genes que al traducirse a proteínas participan como moléculas clave de vías de señalización, por ejemplo, las vías EGFR, PI3K/Akt, MAPK, STAT3, Notch y HGF/c-Met, que favorecen procesos de proliferación, migración, invasión e inhiben la apoptosis. La región 3' UTR del mRNA de c-Met tiene sitios de unión para miR-23b, además, c-Met se encuentra sobreexpresado en tejidos y en líneas celulares de CaCU (C33A, HeLa y CaSki) y se relaciona inversamente con el nivel de expresión de miR-23b, en consecuencia, disminuye la migración e invasión en varios tipos de cáncer, incluyendo CaCU. Por otro lado, en cáncer pulmonar y melanoma se ha reportado que la activación de moléculas río abajo de c-Met, tales como: Gab1 y FAK aumenta la proliferación, migración e invasión celular. En CaCU la sobreexpresión de c-Met se ha asociado con aumento en la migración e invasión celular, sin embargo, el mecanismo de regulación de c-Met sigue siendo desconocido. **Objetivo:** Analizar en la vía c-Met el nivel de fosforilación de Gab1 y FAK y la actividad migratoria e invasiva de células HaCaT, C33A y CaSki en respuesta a la sobreexpresión de miR-23b. **Materiales y métodos:** Se utilizaron las líneas celulares HaCaT, C33A y CaSki transfectadas con un plásmido inductor de miR-23b-3p y se determinó la capacidad migratoria e invasiva mediante ensayos de cierre de herida y ensayos con cámaras Transwell revestidas con Matrigel; para conocer los niveles de fosforilación de Gab1 (Tyr 307) y FAK (Tyr 397) se realizaron ensayos de Western Blot con anticuerpos específicos para estas moléculas. **Resultados:** Se encontró que en células CaSki la sobreexpresión con pMIR23b-3p disminuye la migración, invasión celular y el nivel de fosforilación de Gab1 (Tyr 307) y FAK (Tyr 397). **Conclusión:** miR-23b disminuye la migración e invasión celular a través de la vía de señalización c-Met/Gab1/FAK en células CaSki.

Palabras clave: Cancer cérvico uterino, miR-23b-3p, c-Met, Gab1, FAK.

II. ABSTRACT

Cervical uterine cancer (CaCU) is the second most frequent cancer in women and persistent infection by HPV-AR is the main risk factor for its onset.

Epigenetic factors such as the deregulated expression of microRNAs (miRNAs) also contribute to their development since they have as a function to regulate the expression of genes that when translated into proteins participate as key molecules of signaling pathways, for example, EGFR, PI3K/Akt, MAPK, STAT3, Notch and HGF/c-Met, which favor processes of proliferation, migration, invasion and inhibit apoptosis. The 3' UTR region of c-Met mRNA has binding sites for miR-23b, in addition, c-Met is overexpressed in tissues and cell lines of CaCU (C33A, HeLa and CaSki) and is inversely related to the level expression of miR-23b, consequently, decreases migration and invasion in several types of cancer, including CaCU. On the other hand, in lung cancer and melanoma it has been reported that the activation of molecules downstream of c-Met, such as: Gab1 and FAK increases proliferation, migration and cellular invasion. In CaCU the overexpression of c-Met has been associated with increased migration and cellular invasion, however, the mechanism of regulation of c-Met remains unknown. **Objective:** to analyze the level of phosphorylation of Gab1 and FAK in the c-Met pathway and the migratory and invasive activity of HaCaT, C33A and CaSki cells in response to the overexpression of miR-23b. **Materials and methods:** HaCaT, C33A and CaSki cell lines transfected with a miR-23b-3p inducer plasmid were used and migratory and invasive capacity was determined by wound closure assays and trials with Transwell Chambers coated with Matrigel; to know the phosphorylation levels of Gab1 (Tyr 307) and FAK (Tyr 397), western blot assays were performed with specific antibodies for these molecules. **Results:** It was found that in CaSki cells overexpression with pMIR23b-3p decreases migration, cellular invasion and the level of phosphorylation of Gab1 (Tyr 307) and FAK (Tyr 397). **Conclusion:** miR-23b decreases cell migration and invasion through the c-Met/Gab1/FAK signaling pathway in CaSki cells.

Key words: Cervical uterine cancer, miR-23b-3p, c-Met, Gab1, FAK

III. INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es el segundo cáncer más frecuente en mujeres y la séptima neoplasia con mayor incidencia en el mundo, con un estimado de 528,000 casos nuevos y 266,000 muertes por año (GLOBOCAN, 2012). La infección persistente por virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) es la principal causa para su desarrollo (Au-Yeung *et al.*, 2017), sin embargo, no es suficiente para inducir cambios malignos; otros factores de tipo ambientales, genéticos y epigenéticos como la regulación mediada por microRNAs (miRNAs) contribuyen al desarrollo del CaCU (Sato *et al.*, 2011; Díaz-González *et al.*, 2016).

Los miRNAs son pequeños RNAs endógenos no codificantes cuya función principal es la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante su unión a la región 3' no traducida (3' UTR) de un mRNA blanco, induciendo la degradación o inhibición de la traducción del mismo (Reddy., 2015; González-Quintana *et al.*, 2016). Diversos estudios señalan que existe desregulación en los perfiles de expresión de miRNAs en cáncer; principalmente miRNAs que tienen como blanco mRNAs que codifican para proteínas reguladoras de diferentes vías de señalización tales como ligandos, receptores, moléculas adaptadoras y factores de transcripción (Frixia *et al.*, 2015; Peng & Croce., 2016).

La desregulación de miRNAs induce alteraciones en vías de señalización como las vías EGFR, PI3K/Akt, MAPK, STAT3, Notch y HGF/c-Met; que conllevan a cambios negativos en procesos celulares como diferenciación, proliferación, apoptosis, angiogénesis, control del ciclo celular, migración e invasión celular (Chen, 2015).

Se ha reportado una disminución en los procesos de proliferación, migración e invasión mediados por la cinasa Src, cuando se sobreexpresa miR-23b en cáncer de próstata (Majid *et al.*, 2012), en cáncer de vejiga por la alteración de ZEB1 y c-Met (Chiyomaru *et al.*, 2015), en cáncer de ovario a través de CCNG1 y RUNX2 (Yang *et al.*, 2016), en glioblastoma a través de Pyk2 (Loftus *et al.*, 2012), en cáncer hepatocelular a través de c-Met (Salvi *et al.*, 2009) y en CaCU a través de uPA y c-Met (Au-Yeung *et al.*, 2011; Au-Yeung *et al.*, 2017). Adicionalmente, en CaCU se ha reportado que la desregulación en la actividad de la vía c-Met/HFG aumenta la capacidad de migración, proliferación e invasión celular (Boromand *et al.*, 2017).

c-Met regula procesos como migración e invasión en varios tipos de cáncer, incluyendo CaCU, pero se desconoce el mecanismo por el cual modula estos procesos. La evidencia indica que la región 3' UTR del mRNA de c-Met tiene sitios putativos de unión para miR-23b (Campos-Viguri *et al.*, 2015). Salvi *et al.*, (2009), mediante ensayos de luciferasa confirmaron que la región 3' UTR del mRNA de c-Met interacciona con miR-23b en células de carcinoma hepatocelular, reportando que el transcrito de c-Met tiene 3 sitios con secuencias complementarias a miR-23b. Chiyomaru *et al.*, (2015) validaron dos sitios de unión al mRNA de c-Met, en las posiciones 1019-1026 y 2065-2072 en células de cáncer de vejiga, sitios también predichos por análisis bioinformático. Basados en estas evidencias, es muy probable que miR-23b regule la expresión de c-Met en CaCU.

c-Met es un receptor tirosina cinasa (RTKs) de superficie celular que activa múltiples vías de transducción de señales a través de su unión al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Este receptor está integrado por una cadena extracelular α de 50 kDa y una cadena transmembranal β de 140 kDa (Zhang *et al.*, 2018). La unión del HGF a c-Met conduce a la homodimerización y autofosforilación del receptor en sus residuos de tirosina; los aminoácidos fosforilados funcionan como sitios de acoplamiento para moléculas adaptadoras como Gab1, que al fosforilarse en el residuo Tyr 307 induce la activación de moléculas como la cinasa de adhesión focal (FAK). Las señales que viajan por esta vía promueven motilidad, migración, invasión y metástasis (Cao *et al.*, 2015). Gab1 es una proteína adaptadora de 110 kDa que promueve la tumorigénesis y actúa como proteína amplificadora de la señalización de múltiples receptores, principalmente de RTKs como c-Met (Wang *et al.*, 2015). El incremento de la expresión de Gab1 contribuye a la progresión tumoral en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Hoeben *et al.*, 2013), cáncer de ovario (Hu & Li., 2016) y colangiocarcinoma intrahepático (Sang *et al.*, 2015). En este último tipo de cáncer, se reporta que la proliferación e invasión está regulada por la vía PI3K/Akt. La cinasa de adhesión focal (FAK) es una proteína tirosina cinasa intracelular citoplasmática de 125 kDa que tiene un papel esencial durante el desarrollo embrionario; así como en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Zeng *et al.*, 2016). Se ha reportado que FAK se encuentra en sitios de unión de matriz celular e involucrada en migración, invasión y apoptosis. La expresión mRNA y proteína de FAK está

desregulada en cáncer de pulmón, de ovario, de mama y CaCU (Kong *et al.*, 2017). El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la sobreexpresión de miR-23b en la migración e invasión de líneas celulares de CaCU y conocer si los cambios en esos procesos celulares se relacionan con la activación de Gab1 y FAK y con el nivel de c-Met.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se utilizaron líneas celulares CaSki (ATCC® CRL-1550™) (450 a 600 copias de VPH-16 integrado en su genoma), C33A (ATCC® HTB-31™) (Negativo para VPH) y HaCaT (queratinocitos inmortalizados); las cuales se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o en medio DMEM/F12, ambos suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU). Las células se incubaron a una temperatura de 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, hasta obtener una confluencia del 80%.

Transfección del plásmido inductor de miR-23b-3p

Las células CaSki, C33A y HaCaT fueron transfectadas con 5 µg del plásmido inductor pMIR23b-3p con el reactivo de transfección FuGENE (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Extracción de RNA total y obtención de proteínas

La extracción de RNA total y obtención de proteínas de las líneas celulares antes y después de la transfección se hizo con el reactivo *TRIzol* (Invitrogen Carlsbad, California, EE. UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación y pureza del RNA total se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU) a una longitud de onda de 260 nm. La integridad del RNA total se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El RNA se almacenó a -70°C y las proteínas totales a -20°C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas totales

Para cuantificar las proteínas totales provenientes de las líneas celulares, se hizo una curva estándar utilizando Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.) que se leyó en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU) a una longitud de onda de 562 nm. La concentración de proteínas se cuantificó usando el método de ácido bicinconínico (BCA) con el Kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU).

Expresión de miR-23b por RT-qPCR

La expresión de miR-23b-3p se determinó en un equipo ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU), utilizando ensayos TaqMan para miRNAs de acuerdo a las instrucciones del fabricante, hsa-miR-23b-3p (000400, AUCACAUUGCCAGGGAUUACC, Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU). La expresión de miR-23b se normalizó con el control endógeno hsa-miR-92a (000431, UAUUGCAUUGUCCCGGCCUGU, Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU). La transcripción reversa se realizó utilizando 5 ng de RNA total en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se determinó el nivel de expresión relativa de miR-23b mediante el método comparativo $-2^{\Delta\Delta CT}$. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Western Blot

Se separaron 30 μ g de extracto proteico mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% y 14%; las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU), durante 105 min en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, 0.03% SDS, pH 8.3). Al término de la electrotransferencia las membranas fueron bloqueadas con leche baja en grasa al 5% o con BSA al 3% en TBS-Tween 20 a temperatura ambiente durante 1 h, posteriormente las membranas se incubaron con diluciones apropiadas de anticuerpos primarios específicos durante toda la noche a 4°C, en agitación constante, seguido de incubación con anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. Las bandas obtenidas fueron observadas en un equipo de quimioluminiscencia ChemiDoc MP System (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU). La intensidad de la banda de proteínas se analizó mediante el software Image Lab (V.6.0.). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: FAK (D2R2E) (Cat. #13009, Cell Signaling Technology, Massachusetts, EE. UU) dilución 1:3000, Phospho-FAK (Tyr397) (D20B1) (Cat. #8556, Cell Signaling Technology, Massachusetts, EE. UU) dilución 1:1000, Gab1 total (Cat. #3232, Cell Signaling Technology, Massachusetts, EE. UU) dilución 1:1000, Phospho-Gab1 (Tyr307) (Cat. #3234, Cell Signaling

Technology, Massachusetts, EE. UU) dilución 1:3000, GAPDH (6C5, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE. UU) dilución 1:5000.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti IgG-HRP de conejo (Cat. #7075, Cell Signaling Technology, Massachusetts, EE. UU) dilución 1:5000 y anti IgG-HRP de ratón (115-035-003, Jackson ImmunoResearch, EE. UU) dilución 1: 20,000.

Ensayo de migración celular

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de miR-23b en la migración de células HaCaT, C33A y CaSki se realizó un ensayo de cierre de herida. 6×10^4 células previamente transfectadas con 5 μg de pMIR23b-3p, pSilencer y células no transfectadas en medio libre de SFB (48 h) se cultivaron en placas de 6 pozos con medio DMEM suplementado con 10% de SFB hasta obtener una confluencia del 80%. Se realizó una herida lineal (estría) a la monocapa de células con una punta estéril de una micropipeta de 200 μL . Los residuos celulares se eliminaron lavando la monocapa con PBS 1X, pH 7.4. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. El progreso de la migración celular y cierre de la herida se cuantificó utilizando un microscopio invertido con cámara acoplada a las 0, 24 y 48 h. Los datos se presentaron como porcentaje de migración. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayo de invasión celular

Los ensayos de invasión celular se realizaron en placas de cultivo de 24 pozos usando cámaras Transwell (Corning, BioCoat #354578, New York, EE. UU), cada inserto tiene un filtro de membrana de policarbonato con poro de 8 μm previamente recubiertas con 200 μg de Matrigel de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Corning, #354239, Matrigel Growth Factor Reduced, New York, EE. UU). En la parte superior del inserto se sembraron 1×10^5 células en medio DMEM libre de SFB. Las células fueron transfectadas 72 h antes del ensayo de invasión con 5 μg de pMIR23b-3p, pSilencer y células no transfectadas. En la parte inferior de la cámara se añadieron 500 μL de medio suplementado con 10 % de SFB que sirvió como quimioatrayente. Los cultivos se incubaron por 48 h a 37°C, posteriormente, con un hisopo estéril se retiraron suavemente las células no invasoras y el Matrigel del interior de los insertos. Las células invasoras se fijaron con paraformaldehído al 4% por 5 min seguido de 30 min con metanol absoluto; se tiñeron con cristal violeta al

0.5% por 20 min a temperatura ambiente; se lavaron y se secaron los insertos. Las células se contaron en seis campos aleatorios bajo microscopio óptico. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Para analizar la diferencia entre dos grupos los datos se analizaron con la prueba estadística t de Student, utilizando el paquete estadístico STATA (V. 11.1). Un valor $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo. Las imágenes de los ensayos de migración e invasión se analizaron con el software Image J y los datos se presentaron como media \pm SD de tres experimentos independientes usando el programa GraphPad Prism 5.0.

Tabla 1. Vías de señalización y procesos celulares modulados por c-Met que están alterados en cáncer

Vía de señalización	Procesos celulares que regula la vía	Tipo de cáncer	Proteínas involucradas	Referencia
MAPK	Proliferación, motilidad y diferenciación	Cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma	c-Met, Grb2, Sos, Ras, Raf, MEK, ERK, MAPK	(Ma <i>et al.</i> , 2007; Meier <i>et al.</i> , 2005)
RAC1/PAK	Organización de la actina	Cáncer de ovario	c-Met, Sos, Gab1, Rack1, Pak1	(Fan, 2017)
PI3K/AKT	Supervivencia celular y apoptosis	Melanoma	c-Met, Gab1, PI3K, PDK 1/2, Akt	(Meier <i>et al.</i> , 2005)
STAT3	Invasión tubulogénica, invasión	Cáncer de piel de células no escamosas	c-Met, STAT3	(Syed <i>et al.</i> , 2011)
c-Met/Gab1/FAK	Migración e invasión	Melanoma	c-Met, Gab1, FAK, Pak	(Cao <i>et al.</i> , 2015)

Abreviaturas: MAPK= proteína cinasa activada por mitógenos, PAK= proteína cinasa serina/treonina, PI3K= fosfoinositol 3-cinasa, STAT3= transductor de señales y activador de transcripción 3, FAK= cinasa de adhesión focal, Grb2= proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2, PDK= proteína cinasa dependiente de fosfoinositide.3

Nivel de expresión de miR-23b en células transfectadas con el plásmido inductor de pMIR23b-3p.

Para estudiar el papel de miR-23b-3p como supresor de tumor, se transfectaron las líneas celulares HaCaT, C33A y CaSki con 5 µg del plásmido inductor de miR-23b-3p (pMIR23b-3p). Después de la transfección, se midió en nivel de expresión de miR-23b por RT-qPCR, la expresión de miR-23b-3p incrementó significativamente en células transfectadas con pMIR23b-3p (barras negras) comparado con las células transfectadas con pSilencer (barras de trama) y con las células no transfectadas (barras blancas), (*p < 0.05, Figura 2).

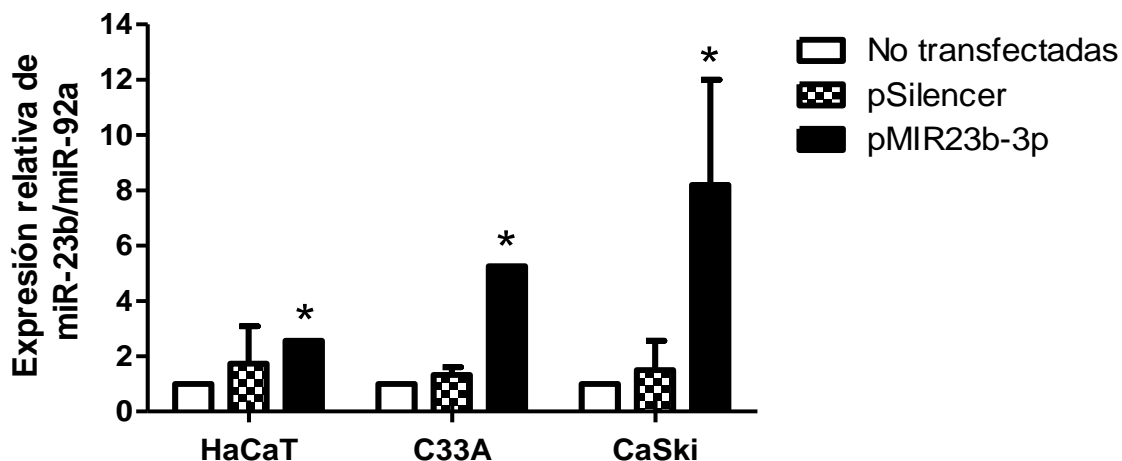
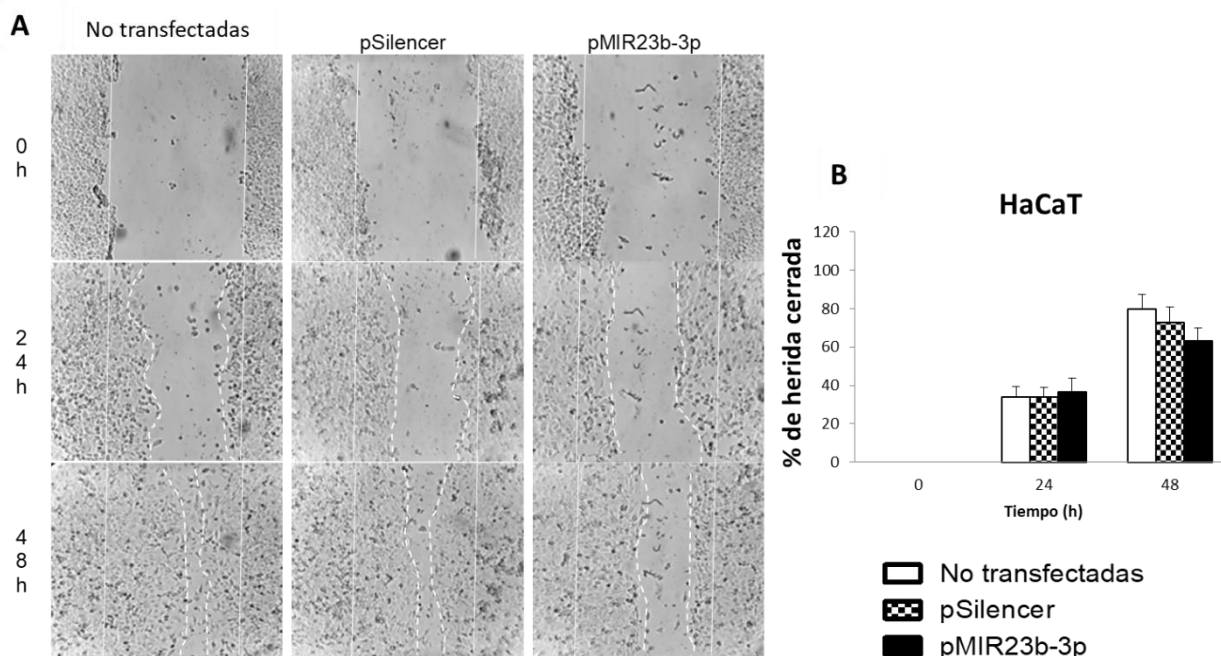


Figura 2. Sobreexpresión de miR-23b en las líneas celulares HaCaT, C33A y CaSki transfectadas con pMIR23b-3p. La expresión de miR-23b se determinó por RT-qPCR en células HaCaT, C33A y CaSki sin transfectar y transfectadas con 5 µg de pMIR23b-3p o pSilencer. El incremento de la expresión de miR-23b-3p es significativo en las tres líneas celulares transfectadas con pMIR23b-3p. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$); pSilencer: vector vacío control; pMIR-23b-3p: plásmido inductor de miR-23b-3p.

La sobreexpresión de miR-23b disminuye la migración de células CaSki.

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de miR-23b en la migración de células HaCaT, C33A y CaSki se realizaron ensayos de cierre de herida. Los ensayos muestran que la sobreexpresión de miR-23b disminuye significativamente el porcentaje de cierre de la herida en las células CaSki (barras negras) a las 24 y 48 h en comparación con los grupos control (células sin tratamiento o tratada con



pSilencer) (Barras blancas y de trama) ($*p < 0.05$), (Figura 3E, F). En células C33A y HaCaT no se observaron cambios significativos (Figura 3A, B, C, D).

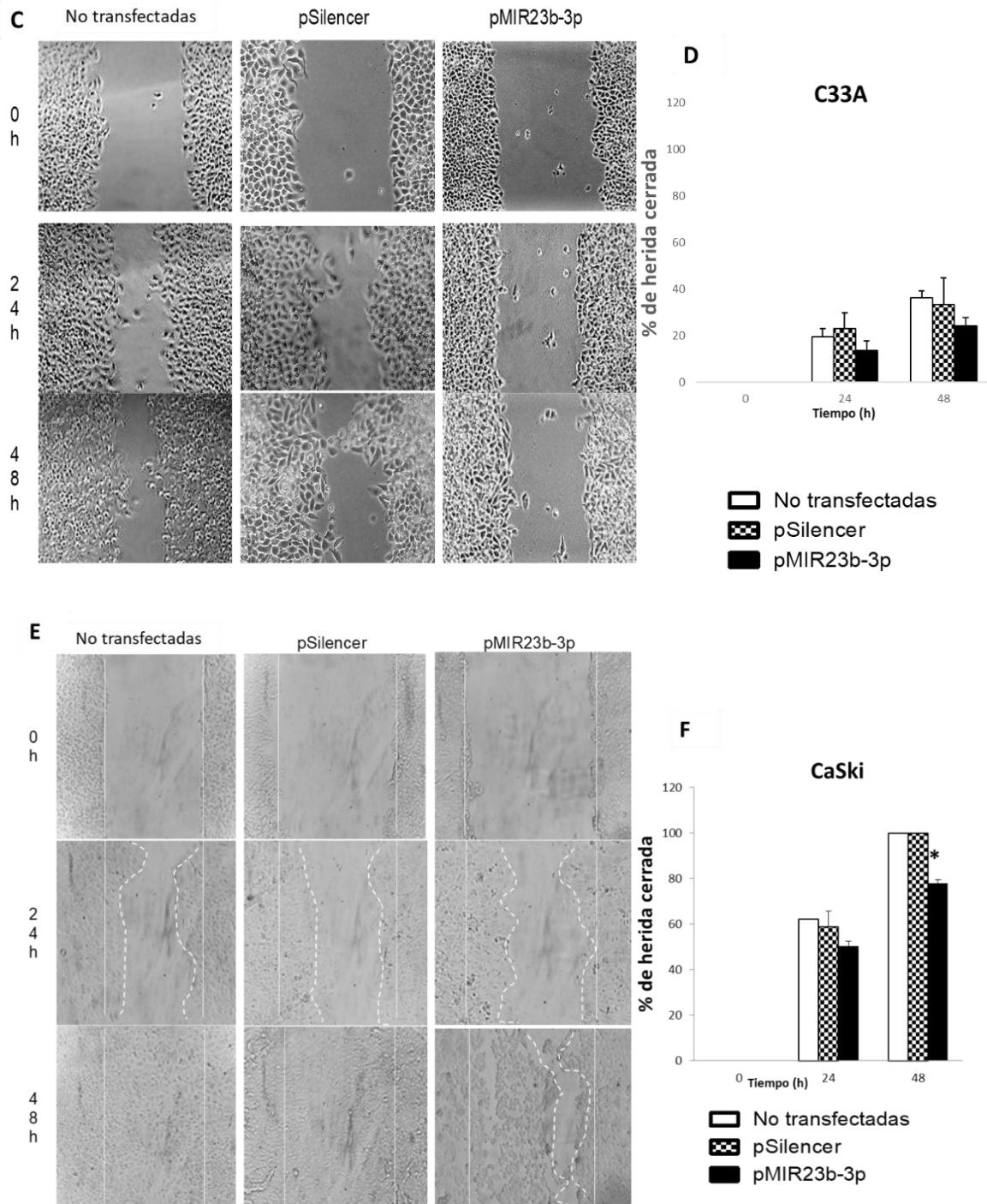
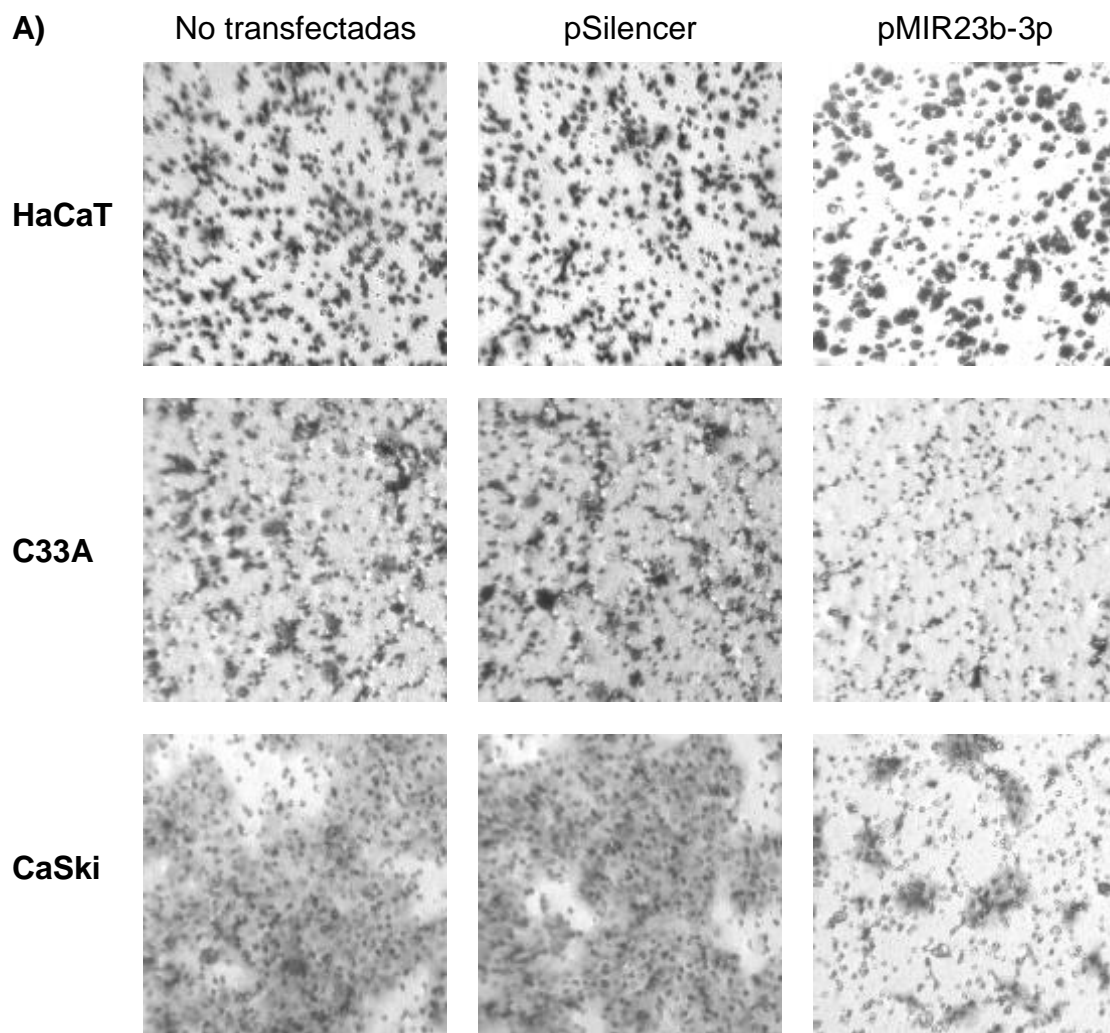


Figura 3. La sobreexpresión de miR-23b disminuye la migración en células CaSki. Microfotografías representativas de ensayos de cierre de herida en células HaCaT (A), C33A (C) y CaSki (E) no transfectadas, pSilencer y pMIR23b-3p. Gráficas representativas del porcentaje del ancho de la herida cerrada a las 24 y 48 h en las tres condiciones en células HaCaT (B), C33A (D) y CaSki (F). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$); pSilencer: vector vacío control; pMIR23b-3p: plásmido inductor de miR-23b-3p

La sobreexpresión de miR-23b disminuye la invasión en células C33A y CaSki.

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de miR-23b-3p en la invasión de células HaCaT, C33A y CaSki se realizaron ensayos de invasión en cámaras Transwell revestidas con Matrigel. Los resultados a las 48 h indican que la sobreexpresión de miR-23b-3p disminuye la capacidad de invasión de las células C33A y CaSki, en comparación con los grupos control (pSilencer y células no transfectadas) (Figura 4). Estos resultados sugieren que miR-23b es capaz de modular la expresión de genes que regulan la migración e invasión en células Caski.



B)

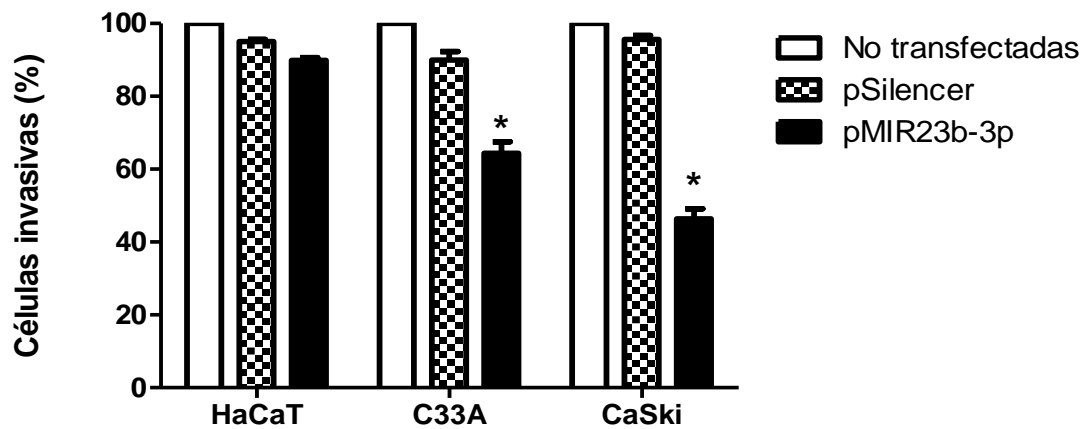
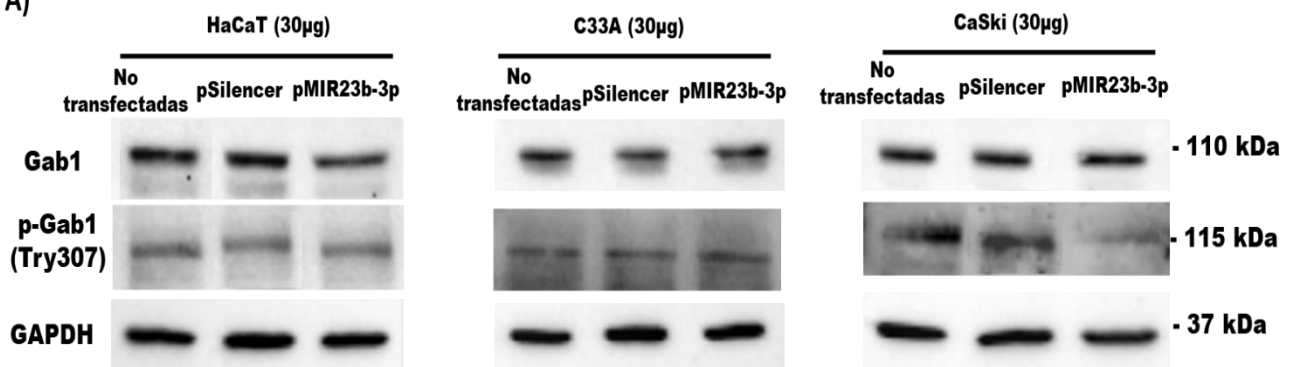


Figura 4. La sobreexpresión de miR-23b disminuye la invasión en células C33A y CaSki. A) Microfotografías representativas de tres ensayos de invasión en células HaCaT, C33A y CaSki no transfectadas, pSilencer y pMIR23b-3p. B) Gráfica representativa del porcentaje de invasión celular. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$); pSilencer: vector vacío control; pMIR23b-3p: plásmido inductor de miR-23b-3p.

La sobreexpresión de miR-23b disminuye el nivel de fosforilación de Gab1 (Tyr 307) y FAK (Tyr 397) en células CaSki

Para determinar si miR-23b-3p disminuye la actividad de la vía c-Met/Gab1/FAK, se determinaron los niveles de p-Gab1 (Tyr 307), p-FAK (Tyr 397), Gab1 y FAK total mediante ensayos de Western Blot a partir de las proteínas totales obtenidas de las células HaCaT, C33A y CaSki. No se observaron cambios significativos en los niveles de Gab1 total (Figura 5B). En contraste, se encontró que el nivel de p-Gab1 (Tyr 307) disminuye en células CaSki transfectadas con pMIR23b-3p respecto a los grupos control (células no transfectadas y pSilencer). No se observaron cambios significativos en el nivel de fosforilación de esta proteína en las células HaCaT y C33A (Figura 5B).

A)



B)

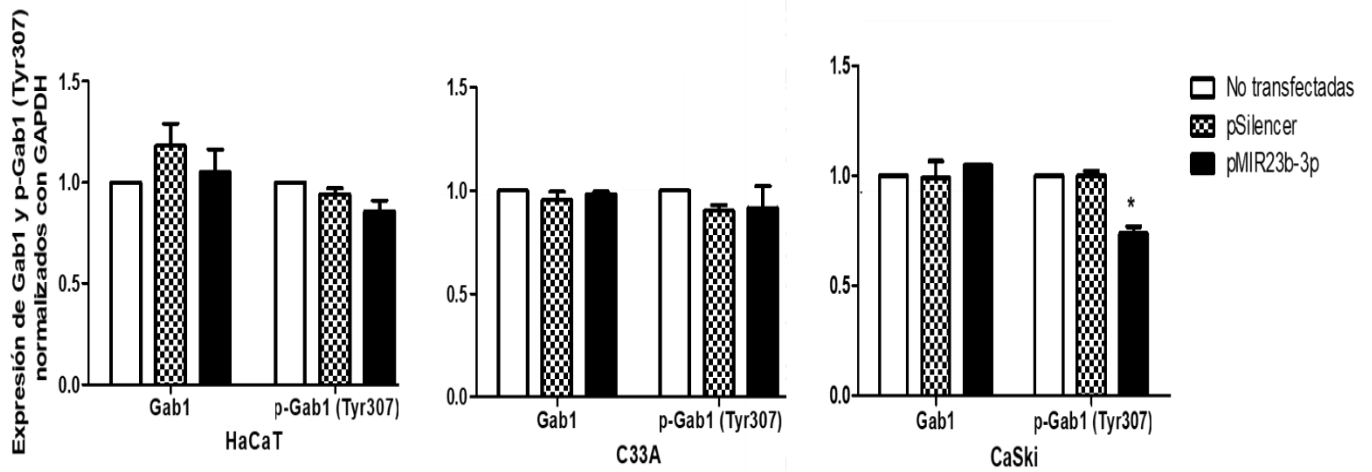
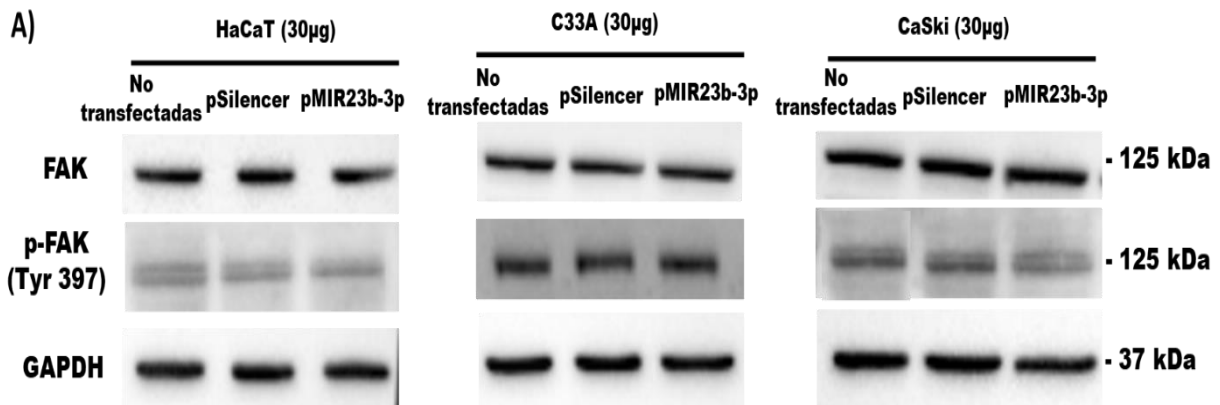


Figura 5. La sobreexpresión de miR-23-b disminuye el nivel de fosforilación de Gab1 (Tyr 307) en células CaSki. La detección de Gab1 total y p-Gab1 (Tyr 307) en células HaCaT, C33A y CaSki se hizo por ensayo de Western Blot. GAPDH se utilizó como control endógeno. A) Imágenes representativas de Western Blot, se cargaron 30 µg de proteína en cada carril. B) Gráfica representativa del análisis densitométrico de tres experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) pSilencer: vector vacío control; pMIR23b-3p: plásmido inductor de miR23b-3p

Por otro lado, los resultados muestran una disminución en el nivel de p-FAK (Tyr 397) en las células CaSki transfectadas, respecto a los grupos control (Figura 6B). No se encontraron cambios significativos de p-FAK (Tyr 397) en las células HaCaT y C33A. En conjunto, estos datos demuestran que la sobreexpresión de miR-23b-3p disminuye la activación de moléculas río abajo de c-Met como Gab1 y FAK.



B)

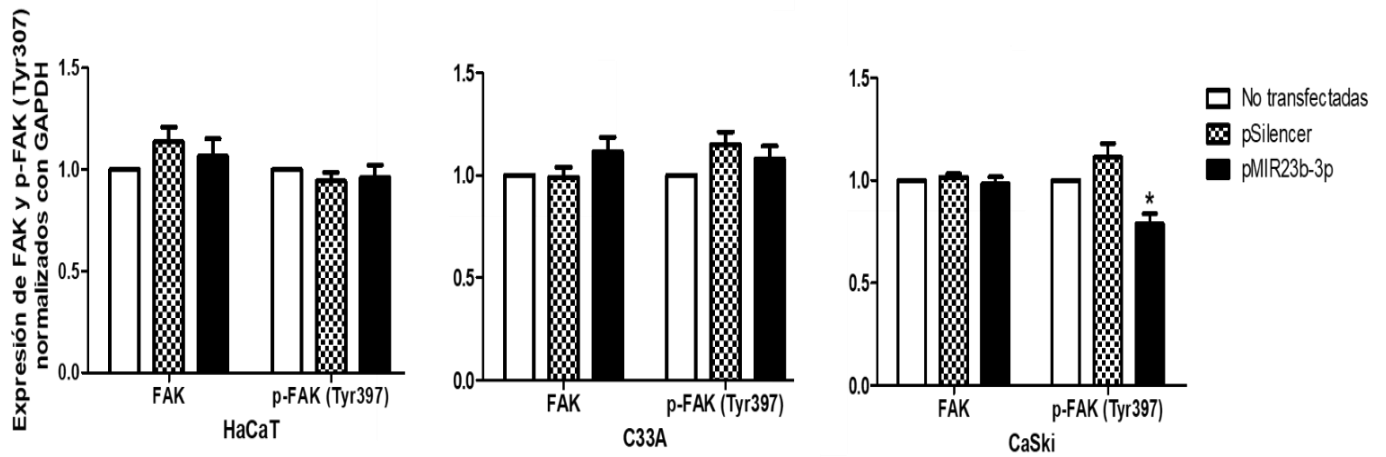


Figura 6. La sobreexpresión de miR-23-b disminuye el nivel de fosforilación de FAK (Tyr 397) en células CaSki. La detección de FAK total y p-FAK (Tyr 397) en células HaCaT, C33A y CaSki se hizo por ensayo de Western Blot. GAPDH se utilizó como control endógeno. A) Imágenes representativas de Western Blot, se cargaron 30 µg de proteína en cada carril. B) Gráfica representativa del análisis densitométrico de tres experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) pSilencer: vector vacío control; pMIR23b-3p: plásmido inductor de miR23b-3p

VI. DISCUSIÓN

Uno de los factores relacionados con muerte por CaCU es la alta capacidad migratoria e invasiva de las células cancerosas que conllevan a la metástasis. A pesar de los avances en su estudio aún no se logran elucidar los factores y mecanismos que desregulan estos procesos, por lo que es importante seguir con la búsqueda de moléculas que inhiben, disminuyen o favorecen estos procesos biológicos. Se ha reportado que aproximadamente el 60% de los genes que codifican proteínas que participan en migración, invasión, proliferación y apoptosis, son regulados por miRNAs, modulando diferentes vías de señalización celular.

Estudios han reportado que la disminución de la expresión de miR-23b favorece la migración e invasión celular en varios tipos de cáncer, incluyendo CaCU (Salvi *et al.*, 2009; Au-Yeung *et al.*, 2011; Majid *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Chiyomaru *et al.*, 2015; Hao & Yu., 2017). Campos-Viguri *et al.*, (2015) y Au-Yeung *et al.*, (2017), reportaron que c-Met es un gen candidato como blanco de miR-23b en CaCU, sin embargo, en este tipo de cáncer esta interacción aún no ha sido validada.

Los MRE son secuencias en la 3' UTR del mRNA a través de las cuales los miRNAs hibridan con el transcrito, suprimen o inhiben la traducción a proteína de su gen blanco. En el análisis bioinformático se encontró que la región 3' UTR del mRNA de c-Met tiene cinco elementos de respuesta a miR-23b en las posiciones 559-566, 1007-1014, 1019-1026, 2053-2060 y 2065-2072, sugiriendo que c-Met es un gen blanco de miR-23b. Es posible que la regulación de la expresión de c-Met en CaCU se lleve a cabo a través del reconocimiento de alguno de los elementos de respuesta a miR-23b mencionados. Estos resultados coinciden con los reportados por Salvi *et al.*, 2009; quienes confirman por ensayos de luciferasa 3 sitios específicos de unión, sitios también reportados en este trabajo, Chiyomaru *et al.*, 2015, confirman dos sitios putativos de unión similares, la diferencia del número de sitios se debe a las herramientas bioinformáticas utilizadas. Acorde a estos reportes es muy probable que miR-23b esté regulando la expresión de c-Met en CaCU. En los sitios no reportados previamente, la hibridación entre la región semilla del miRNA y la 3' UTR de c-Met es de tipo 8-mer, lo cual le confiere mayor probabilidad de unión. En el grupo de trabajo se realizaron ensayos de luciferasa para determinar la posible unión c-Met: miR-23 de los cinco MRE encontrados, se validó que en las posiciones MRE-1, MRE-2 y MRE-4 hay hibridación entre c-Met: miR.23b en células de CaSki y C33A (datos no publicados).

c-Met regula diferentes vías de señalización celular, estas vías regulan procesos como migración, invasión, proliferación, motilidad y supervivencia celular, sobre las que puede estar regulando miR-23b por medio de c-Met. Diversos estudios reportan que la expresión de c-Met y sus vías de señalización pueden ser reguladas por miRNAs. En cáncer hepatocelular la expresión de c-Met puede ser regulada por miR-34a, miR-198 y miR-23b, en cáncer de mama por miR-340 y en CaCU por miR-138 y miR-454-3p (Li *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2011; Salvi *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016; Chiyomaru *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2018). Esta información soporta la propuesta de que miR-23b regula a c-Met en CaCU y, en consecuencia, la vía c-Met/Gab1/FAK, la migración e invasión celular.

En CaCU el aumento en la actividad del complejo HGF/c-Met aumenta la capacidad de migración, proliferación e invasión celular (Boromand *et al.*, 2017). Salvi *et al.*, (2009) y Chiyomaru *et al.*, (2015) demostraron que en carcinoma hepatocelular y de vejiga la sobreexpresión de miR-23b disminuye la migración, invasión y proliferación celular a través de c-Met, poniendo de manifiesto el papel supresor tumoral de miR-23b. En tejidos y líneas celulares de CaCU, miR-23b se ha reportado disminuido y el nivel de expresión del mRNA (Campos-Viguri *et al.*, 2015) y la proteína de c-Met aumentados (datos no publicados).

Nosotros observamos que la sobreexpresión de miR-23b en células CaSki se relaciona con disminución de la capacidad de migración e invasión celular y disminuye también el nivel de p-Gab1 (Tyr 307) y p-FAK (Tyr 397), moléculas que señalizan río abajo del receptor c-Met. Estos resultados sugieren que miR-23b es un regulador de la migración e invasión en células CaSki a través de la vía c-Met/Gab1/FAK, sin embargo, en células C33A y HaCaT no se encontró activa esta vía. El efecto de la sobreexpresión de miR-23b en las diferentes líneas celulares se debe a características intrínsecas de las células estudiadas; una de las características de las células CaSki comparado con células C33A y HaCaT es su alto potencial metastásico, lo que obedece a desregulación de diferentes vías de señalización celular, como la vía c-Met/Gab1/FAK que modula migración e invasión celular, la vía STAT3 que modula invasión celular, la vía de las MAPK que regula proliferación y diferenciación celular y la vía PI3K/AKT que regula apoptosis (Tabla 1). Por otro lado, estas células tienen integrado en su genoma el genoma de VPH-16, virus que se ha reportado como regulador de miR-23b a través de metilación de

su promotor por DNMT1 o la hipermetilación del promotor de C9orf3; por otro lado, se ha reportado que este virus disminuye la expresión de miR-23b de manera dependiente de p53. Estos datos, soportan la idea de que en células CaSki, miR-23b regule la migración e invasión celular y en células C33A y HaCaT las vías antes mencionadas no estén activas. c-Met además de reclutar proteínas como Gab1 y FAK puede activar a otras moléculas como STAT3 la cual está involucrada en la regulación de la invasión celular en cáncer de piel. Este dato genera la posibilidad de que en células C33A, la sobreexpresión de miR-23b influya en la invasión celular por la vía STAT3 activada por c-Met mientras que la vía Gab1/FAK no esté activa en estas células.

Au-Yeung *et al.*, (2017), reportan que el VPH-16 en la línea celular SiHa, promueve la apoptosis a través de miR-23b y c-Met. Por otra parte, Au-Yeung *et al.*, (2011) y Bisio *et al.*, (2013), proponen que el VPH-AR disminuye la expresión de miR-23b al inducir la degradación de la proteína p53 factor de transcripción de miR-23b a través de su oncoproteína E6. Estos resultados y los hallazgos encontrados en este estudio en células sin infección por VPH como C33A y células no tumorales como HaCaT en las cuales no se observaron cambios significativos en la migración e invasión celular ni en los niveles de fosforilación de Gab1 y FAK soportan el hecho de que el VPH-16 está jugando un papel importante en la activación de la vía c-Met/Gab1/FAK a través de la disminución de la expresión de miR-23b, sin embargo, se requieren más estudios para confirmarlo.

Otra hallazgo importante es que en las tres líneas celulares se observa disminución en la migración e invasión celular, sin embargo estos cambios no fueron significativos, a excepción de las células CaSki. Se ha reportado que las tres líneas celulares tienen sobreexpresión de c-Met y su ligando HGF, sin embargo, la expresión es diferencial en cada célula, estando más disminuida en células HaCaT, seguido C33A y más elevada en CaSki. Por lo tanto, no podemos excluir las posibilidades de que la sobreexpresión de miR-23b disminuya la migración, invasión mediante la modulación de otras vías río abajo de c-Met, ya que estos procesos disminuyeron parcialmente y no se inhibieron totalmente, sin embargo la vía c-Met/Gab1/FAK, juega un papel importante en la regulación de la migración e invasión en células CaSki.

VII. CONCLUSIONES

Basados en el análisis *in silico* se sugiere que c-Met es un blanco de miR-23b, además que este miRNA puede modular la migración e invasión celular a través de la vía de señalización c-Met/Gab1/FAK en células metastásicas de CaCU, mecanismo por el cual miR-23b ejerce su papel supresor de tumor. Los hallazgos de este estudio son un nuevo aporte ya que hasta la fecha no se ha reportado la regulación de migración e invasión dada por miR-23b en células HaCaT, C33A y CaSki, ni de las proteínas que participan en la traducción de señales que regulan estos procesos. Estos resultados apoyan en el seguimiento para realizar más estudios que confirmen la relación VPH/miR-23b/c-Met/ Gab1/FAK.

VIII. REFERENCIAS

- Au Yeung, C.L., Tsang, T.Y., Yau, P.L., Kwok, T.T. (2011). Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene*, 30 (21), 2401–2410.
- Au Yeung, C.L., Tsang, T.Y., Yau, P.L., Kwok, T.T. (2017). Human papillomavirus type 16 E6 suppresses microRNA-23b expression in human cervical cancer cells through DNA methylation of the host gene C9orf3. *Oncotarget*, 8 (7), 12159-12173.
- Bisio, A., Sanctis, V., Vescovo, V., Denti, M., Jegga, A., Inga, A., *et al.* (2013). Identification of new p53 target microRNAs by bioinformatics and functional analysis. *BMC Cancer*, 13: 552.
- Boromand, N., Hasanzadeh, M., Sales, S., Farazestanian, M., Gharib, M., Fiuji, H., *et al.* (2017). Clinical and Prognostic Value of the c-Met/HGF Signaling Pathway in Cervical Cancer, *Journal of Cellular Physiology*, 6 (233), 4490-4496.
- Campos-Viguri, G.E., Jiménez-Wences, H., Peralta-Zaragoza, O., Torres-Altamirano, G., Soto-Flores, D.G., Hernández-Sotelo, D., *et al.* (2015). miR-23b as a potential tumor suppressor and its regulation by DNA methylation in cervical cancer. *Infectious Agents and Cancer*, 10 (42).
- Cao, H.H., Cheng, C-Y., Su, T., Fu, X-Q., Guo, H., Li, T., *et al.* (2015). Quercetin inhibits HGF/c-Met signaling and HGF-stimulated melanoma cell migration and invasion. *Molecular Cancer*, 14 (103).
- Chen, J. (2015). MicroRNAs, signaling pathways and diseases. *Annals of Translational Medicine*, 3 (21), 329.
- Chiyomaru, T., Seki, N., Inoguchi, S., Ishihara, T., Mataka, H., Matsuchita, R., *et al.* (2015). Dual regulation of receptor tyrosine kinase genes EGFR and c-Met by the tumor-suppressive microRNA-23b/27b cluster in bladder cancer. *International Journal of Oncology*, 46 (2).
- Díaz-González, S-M., Deas, J., Benítez-Boijseauneau, O., Gomez-Cerón, C., Bermúdez-Morales, V-H., Rodríguez-Dorantes, M., *et al.* (2015). Utility of microRNAs and siRNAs in cervical carcinogenesis. *BioMed Research International*, 2015.
- Fan, G. (2017). FER mediated HGF-independent regulation of HGFR/MET activates RAC1-PAK1 pathway to potentiate metastasis in ovarian cancer. *Small GTPases Journal*.
- Frixa, T., Donzelli, S., Blandino, G. (2015). Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. *Cancers*, 7(4), 2466-2485.
- González-Quintana, V., Palma-Berre, L., Campos-Parra, A., López-Urrutia, E., Peralta-Zaragoza, O., Vazquez-Romo, R., *et al.* (2016). MicroRNAs are involved in cervical cancer development, progression, clinical outcome and improvement treatment response (Review) *Oncology Reports*, 35 (1), 3-12.
- GLOBOCAN. (2012). International Agency for Research on Cancer (IARC). Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012.

Consultado el 15 de Mayo de 2018 en:
<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp#TOP>.

- Guo, Y., Tao, M., Jiang, M. (2018). MicroRNA-454-3p inhibits cervical cancer cell invasion and migration by targeting c-Met. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15, 2301-2306.
- Hoeben, A., Martín, D., Clement, M., Cools, J., Gutkind, J. (2013) Role of grb2-associated binder 1 (GAB1) in epidermal growth factor receptor (EGFR)-induced signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal Cancer*, 132(5), 1042–1050.
- Hu, L y Liu, R. (2016). Expression of GAB1 Is Associated with Poor Prognosis of Patients with Epithelial Ovarian Cancer. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 239 (3), 177-184.
- Hao, L., Yu, H. (2017). MiR-23b inhibits cell migration and invasion through targeting PDE7A in colon cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10 (9), 9436-9443.
- Kong, D., Chen, F., Sima, N. (2017). Focal adhesion kinases crucially regulate TGF β -induced migration and invasion of bladder cancer cells via Src kinase and E-cadherin. *Oncotargets and Therapy*, 10, 1783-1792.
- Li, N., Fu, H., Tie, Y., Hu, Z., Kong, W., Wu, Y., *et al.* (2009). miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*, 275 (1), 44-53.
- Li, W., Liu, Z., Chen, L., Zhou, L., Yao, Y. (2014). MicroRNA-23b is an independent prognostic marker and suppresses ovarian cancer progression by targeting runt-related transcription factor-2. *FEBS Letters*, 588 (9), 1608-1615.
- Li, B., Yang, X., Wang, D., Ji, H. (2016). MicroRNA-138 inhibits proliferation of cervical cancer cells by targeting c-Met. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20 (6), 1109-1114.
- Li, G-C., Cao, X-Y., Li, Y-N., Qui, Y-Y., Li, Y-N., Liu, X-J., *et al.* (2018). MicroRNA-374b inhibits cervical cancer cell proliferation and induces apoptosis through the p38/ERK signaling pathway by binding to JAM-2. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 7379-7390.
- Liang, C., Ding, J., Yang, Y., Deng, L., Li, X. (2017). MicroRNA-433 inhibits cervical cancer progression by directly targeting metadherin to regulate the AKT and β -catenin signalling pathways. *Oncology Reports*, 6 (38), 3639-3649.
- Loftus, J.C., Ross, J.T., Paquette, K.M., Paulino, V.M., Nasser, S., Yang, Z., *et al.* (2012). miRNA Expression Profiling in Migrating Glioblastoma Cells: Regulation of Cell Migration and Invasion by miR-23b via Targeting of Pyk2. *PLoS One*, 7 (6).
- Ma, P., Tretiakova, M., Nallasura, V., Jagadeeswaran, R., Husain, A., Salgia, P. (2007). Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion. *British Journal of Cancer*, 97, 368-377.
- Majid, S., Dar, A.A., Saini, S., Arora, S., Shahryari, V., Zaman, M.S., *et al.* (2012). microRNA-23b represses proto-oncogene Src kinase and functions as

- methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer. *Cancer Research*, 72 (24), 6435-6446.
- Majid, S., Dar, A.A., Saini, S., Deng, G., Chang, I., Greene, K., *et al.* (2013). MicroRNA-23b Functions as a Tumor Suppressor by Regulating Zeb1 in Bladder Cancer. *PLoS One*, 8 (7).
- Meier, F., Schittek, B., Busch, S., Garbe, C., Smalley, K., Satyamoorthy, K., *et al.*, (2005). The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Frontiers in Bioscience*, 10, 2986-3001.
- Peng, Y., Croce, C. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1, 15004.
- Reddy, K. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer cell International*, 15 (38).
- Salvi, A., Sabelli, C., Moncini, S., Venturin, M., Arici, B., Riva, P., *et al.* (2009). MicroRNA-23b mediates urokinase and c-Met downmodulation and a decreased migration of human hepatocellular carcinoma cells. *The FEBS Journal*, 276 (11), 2966–2982.
- Sang, H., Li, T., Li, H., Liu, J. (2015). GAB1 regulates proliferation and migration through the PI3K/Akt signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Tumour Biology*, 36(11), 8367-8377.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., Shimizu, K. (2011). MicroRNAs and epigenetics. *The FEBS Journal*, 278, 1598-1609.
- Syed, Z., Yin, W., Hughes, K., Gill, J., Shi, R., Clifford, J. (2011). HGF/c-met/Stat3 signaling during skin tumor cell invasion: indications for a positive feedback loop. *BioMed Central Cancer*, 11, 180.
- Tan, S., Li, R., Ding, K., Lobie, P.E., Zhu, T. (2011). miR-198 inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting the HGF/c-Met pathway. *FEBS Letters*, 585 (14), 2229-2234.
- Wang, W., Xu, S., Ying, M., Jin, Z.G. (2015). Essential roles of GAB1 tyrosine phosphorylation in growth factor-mediated signaling and angiogenesis. *International Journal of Cardiology*, 15 (181), 180-184.
- Wu, Z-S, Quiang, W., Wang, C-Q., Wang, X., Jing, H., Zhao, J.J., *et al.* (2011). miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met. *Cancer*, 117 (13), 2842-2852.
- Yang, J., Jiang, J-Y., Meng, X-N., Xiu, Y-L., Zong, Z-H. (2016). MiR-23b targets cyclin G1 and suppresses ovarian cancer tumorigenesis and progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35, 31.
- Zeng, X-Q, Li, N., Ma, L-L., Tseng, Y-J, Zhao, N-Q., Chen, S-Y. (2016). Prognostic Value of Focal Adhesion Kinase (FAK) in Human Solid Carcinomas: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 11(9).
- Zhang, Y., Xia, M., Jin, K., Wang, S., Wei, H., Fan, C., *et al.* (2018). Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Molecular Cancer*, 17 (1), 45.