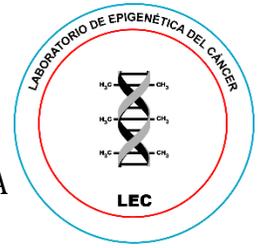




**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**Red de regulación hsa\_circ\_0009910/miR-198/c-MET: posible papel en la  
carcinogénesis cervical**

**T E S I S**

que para obtener el grado de

**Maestría en ciencias biomédicas**

Presenta

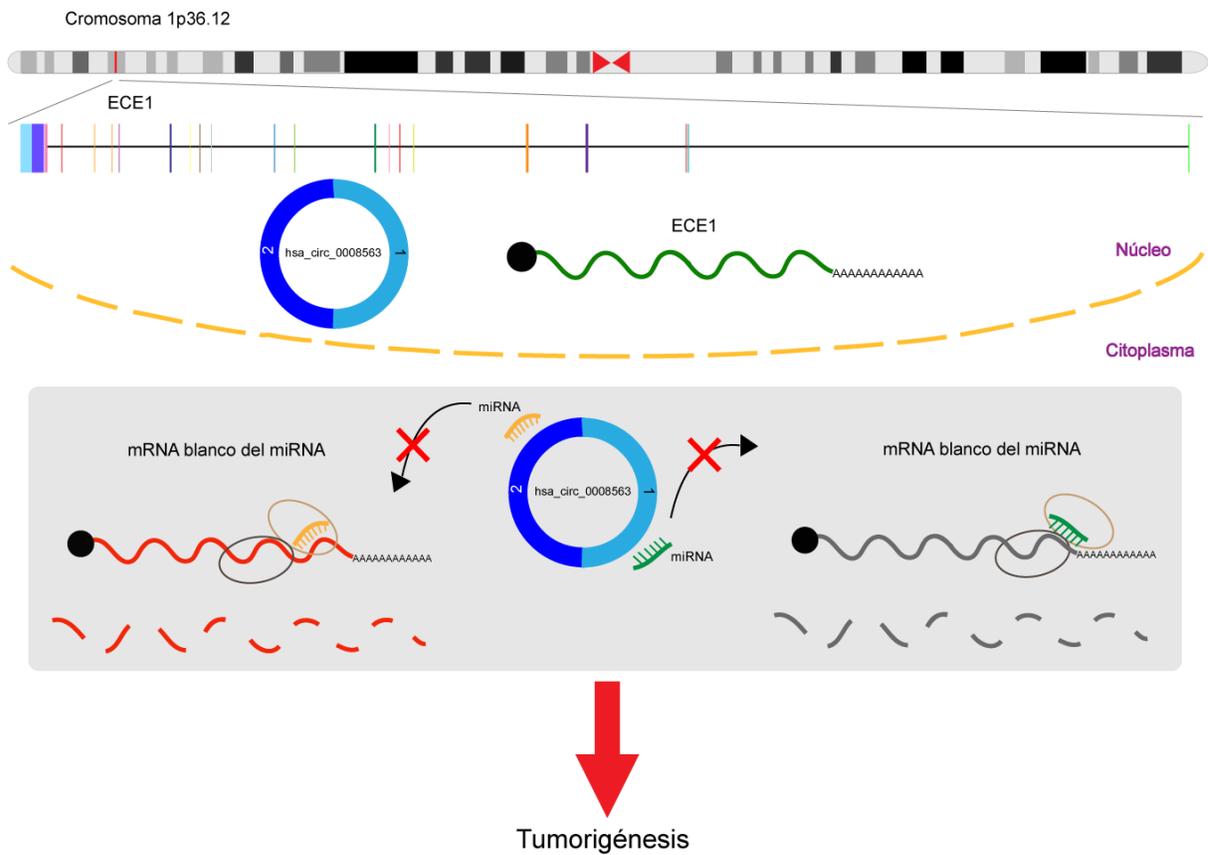
Q.B.P. Sara Itzel García Bustamante

Director de tesis

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Chilpancingo de los Bravo, Gro., junio de 2021.

# Red de regulación hsa\_circ\_0009910/miR-198/c-MET: posible papel en la carcinogénesis cervical



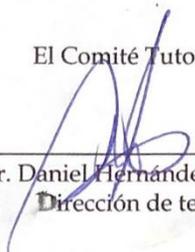


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 22 días del mes de marzo de dos mil veintiuno, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **“Red de regulación hsa\_circ\_0009910/miR-198/c-MET: posible papel en la carcinogénesis cervical”**, presentada por la alumna **Sara Itzel García Bustamante**, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

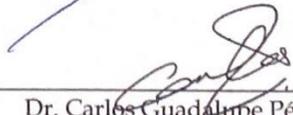
El Comité Tutorial

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Daniel Hernández Sotelo  
Dirección de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Mónica Espinoza Rojo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Oscar del Moral Hernández

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Napoleón Navarro Tito

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Guadalupe Pérez Plasencia



DIRECCIÓN 2018 - 2021

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

Vo. Bo



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

Vo. Bo

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Epigenética del Cáncer en la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo de los Bravo, Guerrero. Bajo la asesoría de:

Director de tesis

**Dr. Daniel Hernández Sotelo**

Comité tutorial

**Dra. Mónica Espinoza Rojo**

**Dr. Oscar Del Moral Hernández**

**Dr. Napoleón Navarro Tito**

Asesor externo

**Dr. Carlos G. Pérez Plasencia**

Durante el periodo en el que la C. Sara Itzel García Bustamante cursó la maestría en Ciencias Biomédicas, recibió la beca CONACYT número de registro CVU 899124.

*La diferencia entre genética y epigenética probablemente puede compararse con la diferencia que existe entre escribir y leer un libro. Una vez que el libro ha sido escrito, el texto (los genes o la información almacenada en el DNA) será el mismo en todas las copias que se distribuyan entre los lectores. Sin embargo, cada lector podría interpretar la historia del libro de una forma ligeramente diferente, con sus diferentes emociones y proyecciones que pueden ir cambiando a medida que se desarrollan los capítulos. De una forma muy similar, la epigenética permitiría diferentes interpretaciones de un molde fijo (el libro o código genético) y resultaría en diferentes lecturas, dependiendo de las condiciones variables en las que se interprete el molde.*

**Thomas Jenuwein (Viena, Austria).**

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. ABSTRACT</b> .....	2
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	5
<b>V. RESULTADOS</b> .....	8
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	17
<b>VII. REFERENCIAS</b> .....	23

## I. RESUMEN

**Antecedentes:** Los RNAs circulares (circRNAs) son un tipo de RNA no codificante recientemente identificados como reguladores de la tumorigénesis al ser competidores endógenos (ceRNAs) eficaces, y regular procesos importantes como la transcripción, proliferación, invasión, entre otros. Sin embargo, para varios de estos se desconocen sus perfiles de expresión y funciones en cáncer cervical, entre estos están hsa\_circ\_0008563 y hsa\_circ\_0009910. **Objetivo:** Identificar circRNAs diferencialmente expresados (DECs), realizar redes de regulación circRNAs-miRNAs-mRNAs y evaluar su papel en la regulación de la expresión de mRNAs en células HeLa. **Material y métodos:** Se realizó un análisis bioinformático utilizando el repositorio de Gene Expression Omnibus (GEO) para identificar DECs en células HeLa. Los candidatos seleccionados se validaron mediante RT-qPCR. Además, se construyó una red de regulación circRNA-miRNA-mRNA y posteriormente se realizó Gene Ontology (GO) de los mRNAs de cada red. Se disminuyó la expresión de hsa\_circ\_0009910 transfectando RNAs de interferencia y se midieron los niveles de expresión de c-MET por RT-qPCR. **Resultados:** Se identificaron 25 DECs en células HeLa, de los cuales hsa\_circ\_0008563 y hsa\_circ\_0009910 mostraron una mayor expresión en células HeLa. La red de interacción reveló que hsa\_circ\_0008563 puede regular a cuatro miRNAs, tres proteínas y 92 mRNAs (a los mRNAs de manera indirecta); mientras que hsa\_circ\_0009910 puede regular diez miRNAs, siete proteínas y 135 mRNAs. A su vez, estos 135 mRNAs regulan procesos como apoptosis, adhesión, proliferación celular y otros procesos biológicos importantes implicados en el desarrollo del cáncer. Asimismo, el GO de los mRNAs regulados por hsa-miR-198 participan en procesos como proliferación, ciclo celular, muerte celular y otros procesos biológicos. Además, la disminución de hsa\_circ\_0009910 mostró una disminución de la expresión de c-MET en células HeLa. **Conclusión:** La sobreexpresión de hsa\_circ\_0009910 promueve la carcinogénesis cervical al favorecer la expresión del oncogén c-MET, posiblemente a través de su función como ceRNA.

**Palabras clave:** hsa\_circ\_0008563, hsa\_circ\_0009910, hsa-miR-198, c-MET, ceRNA, cáncer cervical.

## II. ABSTRACT

**Background:** Circular RNAs (circRNAs) are a type of non-coding RNA recently identified as regulators of tumorigenesis due they are efficient competing endogenous RNAs (ceRNAs) and regulate important processes such as transcription, proliferation, invasion, among others. However, the expression profiles, and possible roles of hsa\_circ\_0008563 and hsa\_circ\_0009910 in cervical cancer are unknown. **Objective:** Identify differentially expressed circRNAs (DECs), perform circRNAs-miRNAs-mRNAs regulatory networks, and evaluate their role in regulating mRNA expression in HeLa cells. **Material and methods:** Bioinformatic analysis was performed using the Gene Expression Omnibus (GEO) repository to identify DECs in HeLa cells. Selected candidates were validated by RT-qPCR. In addition, a circRNA-miRNA-mRNA regulatory network was established and Gene Ontology (GO) of the mRNAs of each network was subsequently performed. Knockdown of hsa\_circ\_0009910 was made by transfecting interference RNAs and the mRNA levels of c-MET was evaluated by RT-qPCR. **Results:** 25 DECs were identified in HeLa cells, of which hsa\_circ\_0008563 and hsa\_circ\_0009910 were overexpressed in HeLa cells. The interaction network revealed that hsa\_circ\_0008563 can regulate four miRNAs, three proteins and 92 mRNAs (indirectly to mRNAs); while hsa\_circ\_0009910 can regulate ten miRNAs, seven proteins and 135 mRNAs. GO analysis suggested that the 135 mRNAs of hsa\_circ\_0009910 network are involved in processes such as apoptosis, cell adhesion, cell proliferation and other important biological processes in cancer development. Likewise, the GO of the mRNAs regulated by hsa-miR-198 participate in processes such as proliferation, cell cycle, cell death and other biological processes. Furthermore, hsa\_circ\_0009910 knockdown showed a decrease in c-MET expression in HeLa cells. **Conclusion:** Overexpression of hsa\_circ\_0009910 promotes cervical carcinogenesis by of overexpression of the c-MET oncogene, possibly through its function as a ceRNA. **Key words:** hsa\_circ\_0008563, hsa\_circ\_0009910, has-miR-198, c-MET, ceRNA, cervical cancer.

### III. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical es la cuarta causa de muerte entre las mujeres a nivel mundial (Ferlay *et al.*, 2019) y es la tercera causa de muerte en las mujeres en países subdesarrollados (Marth *et al.*, 2017), además, es la neoplasia ginecológica más común (Huang *et al.*, 2019). La infección persistente del virus del papiloma humano (VPH) es la causa del cáncer cervical; esta infección es detectada en el 99% de los casos de cáncer cervical, particularmente los subtipos oncogénicos 16 y 18 son los más comúnmente detectados en cáncer (Marth *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019; Yi *et al.*, 2019). Sin embargo, los mecanismos moleculares específicos implicados con el inicio y progresión del cáncer cervical aún no han sido completamente dilucidados.

El RNA no codificante (ncRNA) es una molécula de RNA funcional que es transcrita del DNA pero no es traducida a proteína, y tiene una importante función como regulador de la expresión de genes (Yi *et al.*, 2019). Los RNAs circulares (circRNAs) son miembros de la familia de los ncRNAs y se caracterizan por su estructura de bucle cerrado, debido a la unión covalente entre los extremos 3' y 5' de los exones y/o intrones que los conforman (Chaichian *et al.*, 2019). Además, los circRNAs se conservan entre diferentes especies, son resistentes a la degradación por RNAsas, tienen una vida media >48 horas, y también, tienen alta especificidad de tipo celular durante las diferentes etapas del desarrollo y en enfermedades; estas tres características (conservación, estabilidad y especificidad) son relevantes para su estudio (Huang *et al.*, 2019; Guria *et al.*, 2020). Recientemente, varios estudios demuestran que los circRNAs tienen funciones como RNAs competidores endógenos (ceRNA), como esponjas de proteínas de unión a RNA (RBPs), y regulan la transcripción y el empalme alternativo (Haque y Harries, 2017; Dragomir y Calin, 2018). La función más estudiada de los circRNAs es como ceRNA, secuestrando a miRNAs blanco y alterando la estabilidad y traducción de los mRNAs blanco de miRNAs (Panda *et al.*, 2017; Quian *et al.*, 2018). Varios trabajos de investigación estudian redes de regulación entre RNAs, específicamente circRNAs-miRNAs-mRNAs o también llamadas redes ceRNA, en distintos tipos de cáncer humano (Wang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Yi *et al.*, 2019), y algunas, incluso, encuentran

interacciones con RBPs que regulan la biogénesis de circRNAs (Ji *et al.*, 2019), demostrando el gran impacto que tienen los ncRNAs en la regulación de otros RNAs en la tumorigénesis.

Se ha reportado que la alteración en la expresión de los circRNAs se asocia con el inicio y progresión del cáncer cervical, al actuar como ceRNAs y de esta manera regulan procesos como la proliferación, migración e invasión (Chaichian *et al.*, 2019; Tornesello *et al.*, 2020). Entre estos reportes, en células HeLa se ha descrito un eje regulatorio entre hsa\_circ\_0031288/hsa-miR-139-3p/Bcl-6 que promueve la migración e invasión celular, debido a que hsa\_circ\_0031288 actúa como ceRNA de hsa-miR-139-3p permitiendo la traducción del mRNA Bcl-6 (Xu *et al.*, 2019). Hsa\_circ\_0007534 secuestra a miR-498 previniendo la represión postranscripcional del mRNA BMI-1, causando el aumento en la proliferación e invasión de células de cáncer cervical (Rong *et al.*, 2019). También se ha caracterizado a circSLC26A4 como un oncogén, que actúa como ceRNA en células de cáncer cervical, formando un eje regulador QKI/circSLC26A4/miR-1287-5p/HOXA7 y favoreciendo procesos como la proliferación celular. Este estudio revela la importancia de QKI, una RBP que permite un aumento en la biogénesis de circSLC26A4 en cáncer cervical (Ji *et al.*, 2019). Sin embargo, aún quedan muchos circRNAs por estudiar.

Recientemente, el análisis bioinformático de datos de alto rendimiento ha tomado relevancia para el entendimiento y caracterización de circRNAs, sin embargo, hay pocos reportes de circRNAs caracterizados en cáncer cervical. Por lo tanto, para comprender mejor el papel potencial de los circRNAs en cáncer cervical, se identificaron circRNAs diferencialmente expresados (DECs) en la línea celular HeLa y se predijeron posibles redes ceRNA de dos circRNAs sobreexpresados. Además, se evaluó si la disminución en la expresión de hsa\_circ\_0009910 afecta la expresión de c-MET, con la finalidad de describir una posible red de ceRNA (hsa\_circ\_0009910/miR-198/c-MET) y el impacto de este mecanismo de regulación en la oncogénesis cervical.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

**Recopilación de datos.** La expresión de circRNAs en cinco líneas celulares de cáncer de cuello uterino (HeLa, CaSki, SiHa, C-33A, SW756) se comparó con la expresión de circRNAs en la línea de células epiteliales cervicales normales HCErEpiC. Los datos del microarreglo de expresión fueron obtenidos de datos GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y se puede acceder a ellos con el ID: GSE113696.

**Análisis de expresión diferencial.** Se utilizó la herramienta interactiva en línea GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) para el análisis de expresión diferencial, en la que se pueden comparar dos o más grupos de muestras de las series en GEO. Los niveles de expresión de los circRNAs en HeLa fueron comparados con los niveles en células HCErEpiC para identificar los circRNAs diferencialmente expresados (DECs). Se ajustaron los valores de  $p$ , para reducir la tasa de falsos positivos utilizando el método de tasa de descubrimiento falso (FDR) de Benjamini y Hochberg.

**Predicción de las estructuras de los circRNAs.** La estructura y los elementos de respuesta a miRNAs (MREs) de los DECs fueron predichos utilizando la base de datos Cancer-Specific CircRNA (CSCD, <https://gb.whu.edu.cn/CSCD/>) y Circular RNA interactome (<https://circinteractome.nia.nih.gov/>).

**Construcción de las redes de RNAs competidores endógenos.** Debido al potencial de regulación entre circRNA-miRNA-mRNA-RBP, se construyeron redes para el posterior análisis experimental. Se utilizó la base de datos Circular RNA interactome (<https://circinteractome.nia.nih.gov/>) para predecir las interacciones entre circRNA-miRNA y circRNA-RBP, se excluyeron aquellas interacciones con un porcentaje de score inferior a 90. Las interacciones entre miRNAs-mRNAs fueron establecidas utilizando la plataforma TarBase v.8 by DIANA Tools ([http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana\\_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex](http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex)), y miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>). Para incrementar la precisión de la predicción, los genes blancos se seleccionaron utilizando los siguientes criterios: a) El score de la predicción debe ser  $>0.443$ , b) al menos un artículo original tiene que respaldar la interacción, c) los experimentos realizados en el artículo para demostrar

la interacción miRNA-mRNA deben ser: ensayos reporteros, western blot o qPCR (evidencia sólida). Finalmente se construyó una red de interacción circRNA-miRNA-mRNA-RBP combinando los pares circRNA-miRNA, circRNA-RBP y miRNA-mRNA.

**Gene Ontology de los mRNAs en la red.** Para predecir las implicaciones funcionales de los mRNAs en la red, se realizó Gene Ontology (GO) con PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). De acuerdo con el programa, las vías con un FDR <0.05 son consideradas vías enriquecidas significativamente.

**Cultivo celular.** La línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT) y la línea de cáncer cervical positiva a VPH 18 (HeLa) se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, E.U.A.). Ambas células se cultivaron en medio DMEM/Ham's F12 1:1 (CAISSON Labs, Smithfield, UT, E.U.A.). Suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (CAISSON Labs, Smithfield, UT, E.U.A.). Las células se cultivaron a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Transfección y siRNA.** Para la disminución de hsa\_circ\_0009910, fue sintetizado un RNA de interferencia pequeño (siRNA) en IDT (San Diego, CA, E.U.A.), que hibride en la secuencia donde se unen los extremos del circRNA. Las células HeLa se sembraron en placas de 12 pozos, posteriormente las células fueron transfectadas con el siRNA (1.25 nM) utilizando el reactivo de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La secuencia del siRNA fue: sicirc9910-5'-rArGrC rArGrG rGrArC rArUrU rGrCrG rCrGrG rCrCrA. Después de 24 horas de la transfección, las células fueron cosechadas y se realizaron los demás experimentos.

**Extracción de RNA y retro-transcripción con PCR cuantitativa (RT-qPCR).** El RNA total se extrajo con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Un espectrofotómetro Nano-Drop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, E.U.A.) fue usado para determinar la cantidad y calidad del RNA extraído. La RT-qPCR fue realizada para detectar la expresión de hsa\_circ\_0008563, hsa\_circ\_0009910, c-MET y GAPDH usando el kit CYBRFast™ 1-Step RT-qPCR Lo-ROX Kit (TONBO bioscience, San Diego, CA, E.U.A.) de acuerdo

con las instrucciones del fabricante usando el equipo QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Waltham, MA, E.U.A.). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un volumen de 10  $\mu$ L, incluidos 2  $\mu$ L de RNA (50 ng/ $\mu$ L), 0.5  $\mu$ L de primer forward (10  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ L de primer reverse (10  $\mu$ M), 5  $\mu$ L de Master Mix y 2  $\mu$ L de agua. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, hibridación a 60°C o 61°C durante 20 segundos, extensión 72°C durante 30 segundos. Las reacciones se realizaron por triplicado y la expresión relativa se calculó usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y se normalizaron con respecto a GAPDH. Las secuencias de los iniciadores utilizados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Secuencias de iniciadores de los genes utilizados en este estudio**

<b>Genes</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>
hsa_circ_0008563	F: GCGAAGCTTGTGTCTCAGTG R: GTTCCCAGAGGTTGCTGAAG
hsa_circ_0009910	F: AGGTTCTGGACGTCAAAGGTT R: TTGCATCGAGAGAAGAGCAGG
c-MET	F: TATTTCCCAGATCATCCATTGCA R: AATGTAGGACTGGTCCGTCAAAA
GAPDH	F: GACCCCTTCATTGACCTCAAC R: GTGGCAGTGATGGCATGGAC

F, forward; R, reverse

**Análisis estadísticos.** Los datos son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos por triplicado y los datos fueron analizados utilizando el software SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc, San José, CA, E.U.A.). La significancia fue analizada utilizando la prueba de t de Student y un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado como significativo.

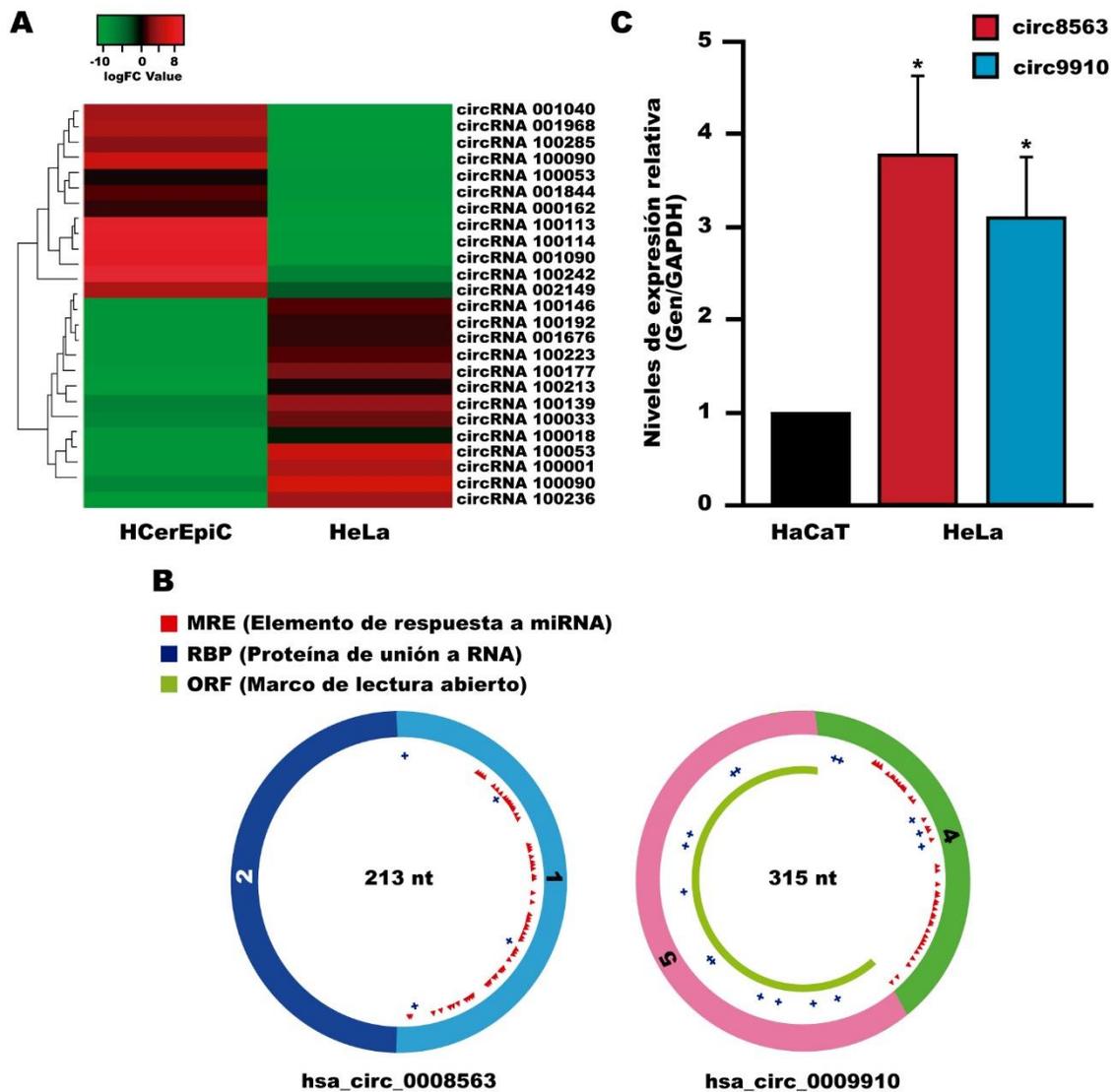
## V. RESULTADOS

### **Hsa\_circ\_0008563 y hsa\_circ\_0009910 están sobreexpresados en cáncer cervical**

Para identificar los circRNAs diferencialmente expresados en cáncer cervical, analizamos los perfiles de expresión de circRNAs del conjunto de datos GSE113696, comparando células epiteliales cervicales HCEpIC con la línea celular HeLa. Encontramos 25 DECs (12 disminuidos y 13 sobreexpresados), con base en un valor de corte de  $\log_{2}FC < -4.3$  o  $> 4.1$  y  $FDR \leq 0.1266$  (Figura 1A). En la Tabla 2 se muestra la información básica de cada circRNA: el gen del que se derivan los circRNAs, tipo de circRNA y su localización. A partir de los 25 DECs, se seleccionaron dos circRNAs que estaban sobreexpresados en HeLa; elegimos a hsa\_circ\_0008563 y hsa\_circ\_0009910 para este estudio. Ambos circRNAs tienen su propia estructura, contienen exones, elementos de respuesta a miRNAs e interactúan con RBPs (Figura 1B). Para validar el nivel de expresión de hsa\_circ\_0008563 y hsa\_circ\_0009910 (de ahora en adelante referidos como circ8563 y circ9910) obtenidos del análisis del microarreglo de expresión, se evaluó su expresión por RT-qPCR. Encontramos que circ8563 y circ9910 tenían alta expresión en HeLa en comparación con células HaCaT (Figura 1C).

### **Construcción de redes de regulación de ceRNA: circ8563 y circ9910**

Para identificar las posibles funciones de los circRNAs en cáncer, construimos una red de interacción de circRNA-miRNA-mRNA-RBP. Primero, predijimos las interacciones circRNA-mRNA utilizando circular RNA interactome e identificamos las interacciones miRNA-mRNA, las cuales se establecieron utilizando TarBase v.8 y miRTarBase. El circ8563 podría interactuar con tres RBPs, regular cuatro miRNAs y afectar la expresión de 92 mRNAs (Figura 2A). Por otra parte, el circ9910 podría interactuar con siete RBPs, regular 10 miRNAs y regular posiblemente 135 mRNAs (Figura 2B).



**Figura 1. circ9910 y circ8563 están sobreexpresados en células HeLa.** A) La expresión de veinticinco DECs en células HeLa y HCrEpiC se representan en el mapa de calor; el color verde indica disminución de la expresión y el color rojo aumento en la expresión. B) La estructura de circ8563 y circ9910 se predijo utilizando Cancer Specific CircRNA Database (CSCD, <http://gb.whu.edu.cn/CSCD/>). Los colores del circRNA representan exones, los triángulos rojos representan la posición donde los miRNAs pueden unirse, las cruces azules representan la posición donde las RBPs pueden unirse y la línea verde representa el marco de lectura abierto. C) Los niveles de expresión de circ8563 y circ9910 se midieron mediante RT-qPCR en las líneas celulares HaCaT y HeLa, y se normalizaron con GAPDH. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. circRNA: RNA circular, DECs: circRNAs diferencialmente expresados, miRNA: microRNA, mRNA: RNA mensajero. \* $p < 0.05$

**Tabla 2. Características básicas de los veinticinco circRNAs diferencialmente expresados**

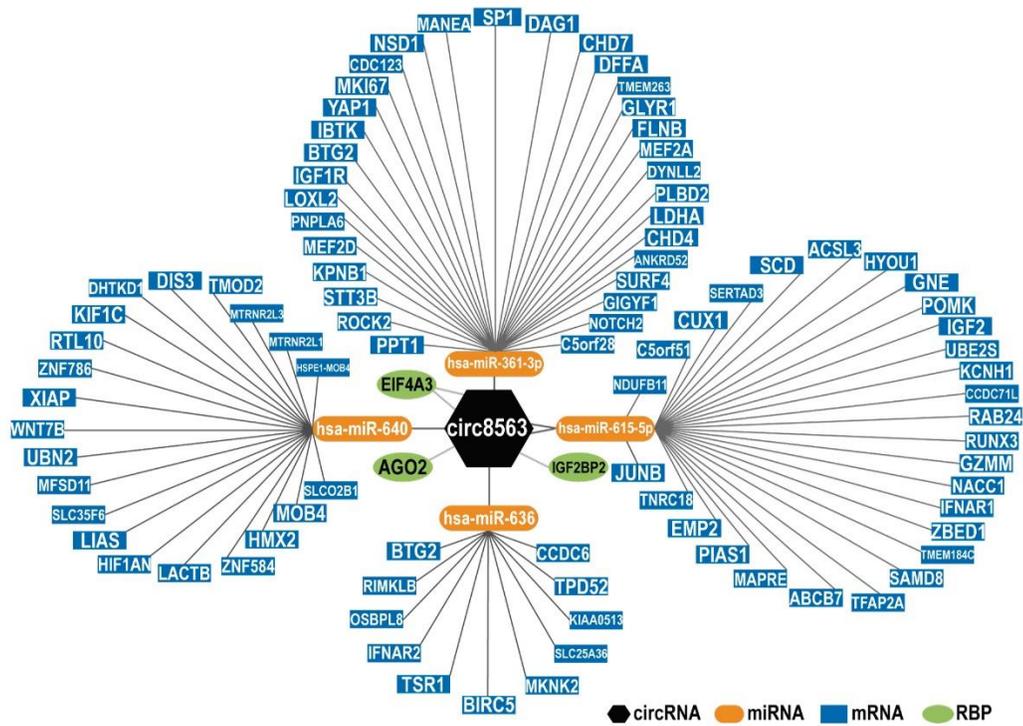
circRNA	logFC	FDR	Expresión	Tipo	Crom.	Símbolo gen
hsa_circ_0000379	-10.45	0.0442	Disminuido	Intrónico	12	PLBD1
hsa_circRNA_001968	-10.45	0.0442	Disminuido	/	/	/
hsa_circ_100285	-10.81	0.0442	Disminuido	/	/	/
hsa_circ_0008563	7.79	0.0639	Aumentado	Exónico	1	ECE1
hsa_circ_0009910	7.22	0.0639	Aumentado	Exónico	1	MFN2
hsa_circ_0000263	-7.8	0.0639	Disminuido	Exónico	10	TCONS_00017720
hsa_circ_0012634	7.76	0.0639	Aumentado	Exónico	1	TMEM59
hsa_circ_0013222	-7.23	0.0639	Disminuido	Exónico	1	GCLM
hsa_circ_0000488	-7.67	0.0782	Disminuido	Intrónico	13	DLEU2
hsa_circ_100113	-6.02	0.0782	Disminuido	/	/	/
hsa_circ_0011279	5.86	0.0782	Aumentado	Exónico	1	SERINC2
hsa_circ_0011692	5.61	0.0782	Aumentado	Exónico	1	STK40
hsa_circ_0009581	5.45	0.0782	Aumentado	Exónico	1	RERE
hsa_circ_0005866	-5.6	0.0782	Disminuido	Exónico	1	RPA2
hsa_circRNA_001844	-8.37	0.0782	Disminuido	/	/	/
hsa_circ_0009189	6.65	0.0782	Aumentado	Exónico	1	SAMD11
hsa_circ_0012417	7.09	0.082	Aumentado	Exónico	1	EPS15
hsa_circ_0011385	5.7	0.082	Aumentado	Exónico	1	EIF3I
hsa_circRNA_001090	-10.53	0.0883	Disminuido	/	/	/
hsa_circ_0000069	5.65	0.1165	Aumentado	Exónico	1	STIL
hsa_circ_0012107	6.01	0.1165	Aumentado	Exónico	1	ST3GAL3
hsa_circ_0000423	6.04	0.1165	Aumentado	Exónico	12	PPP1R12A
hsa_circRNA_100242	-4.77	0.1233	Disminuido	/	/	/
hsa_circ_0001627	-4.21	0.1266	Disminuido	Intrónico	6	BACH2
hsa_circ_0009361	4.17	0.1266	Aumentado	Exónico	1	GNB1

La / indica falta de datos. Crom: cromosoma.

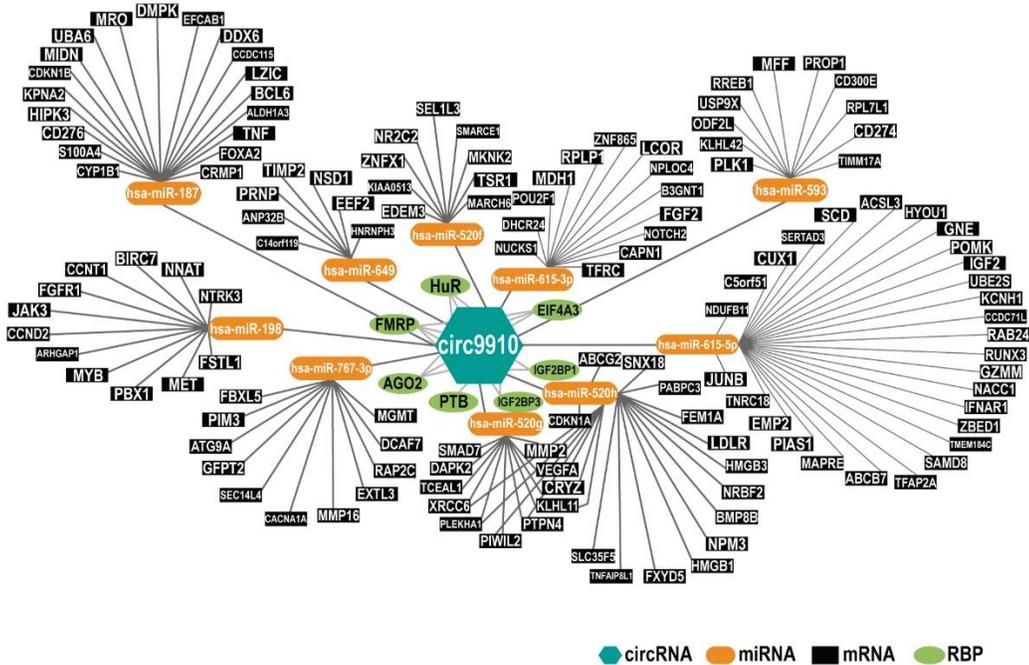
## **Análisis de las vías en las que participan los mRNAs relacionados en las redes de ceRNA**

Está bien demostrado que los miRNAs inducen silenciamiento de sus genes blanco a través de su unión al 3'-UTR del mRNA, dependiendo del grado de complementariedad puede promover la degradación y/o inhibición de la síntesis de proteínas. Debido al gran número de mRNAs que son regulados por los miRNAs, decidimos realizar GO utilizando el sistema de clasificación PANTHER para conocer los posibles procesos biológicos que se alteran por efecto de circ8563 y circ9910. El circ9910 puede regular indirectamente la expresión de 135 mRNAs y estos genes están implicados en la regulación negativa de procesos apoptóticos, en la regulación negativa de la adhesión célula-célula, la regulación negativa de la diferenciación celular, la regulación positiva de la proliferación celular endotelial-vascular, la regulación positiva de la proliferación y migración de células epiteliales y endoteliales, el desarrollo de órganos embrionarios y otros procesos biológicos importantes en el desarrollo de cáncer (Figura 3A).

**A**



**B**



**Figura 2. Red de ceRNA de interacciones circRNA-miRNA-mRNA-RBP.** A) La red consta de un circRNA (circ8563), cuatro miRNAs, tres RBPs y 92 mRNAs. B) La red consta de un circRNA (circ9910), diez miRNAs, siete RBPs y 135 mRNAs. Las líneas grises que conectan un nodo con otro, cuanto más larga se represente, es menor la probabilidad de interacción y si la línea es más corta, hay mayor probabilidad de interacción. Algunos miRNAs o RBPs pueden tener más de un sitio de unión al circRNA. circRNA: RNA circular, miRNA: microRNA, mRNA: RNA mensajero.

Además, los mRNAs posiblemente regulados por hsa-miR-198 (blanco de circ9910) están involucrados específicamente en la regulación positiva de la proliferación celular, regulación positiva de la mitosis, regulación negativa de la muerte celular y otros procesos biológicos, algunos implicados en el desarrollo de cáncer (Figura 3B).

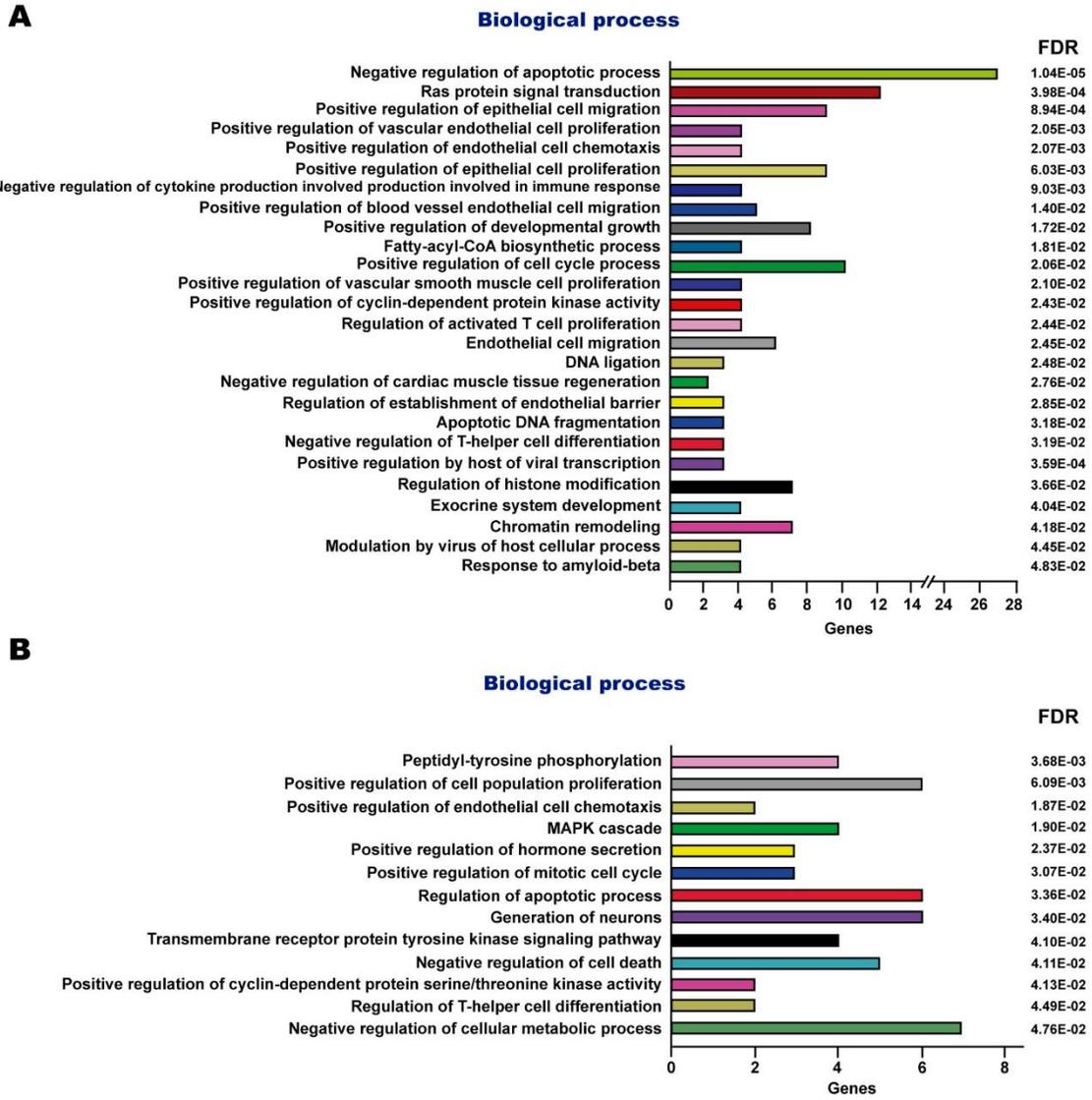
### **Circ9910 podría actuar como esponja e interactuar con miR-198**

Al ser el nodo de hsa-miR-198 (referido de ahora en adelante como miR-198) el único grupo de mRNAs con implicaciones en procesos biológicos relacionados con la tumorigénesis, se buscó la estructura secundaria del pre-miRNA-198 (Figura 4A), y el perfil de expresión de miR-198 en diferentes células normales (Figura 4C). También se identificó la secuencia semilla con la que circ9910 se une a miR-198 y se representa en la figura 4B.

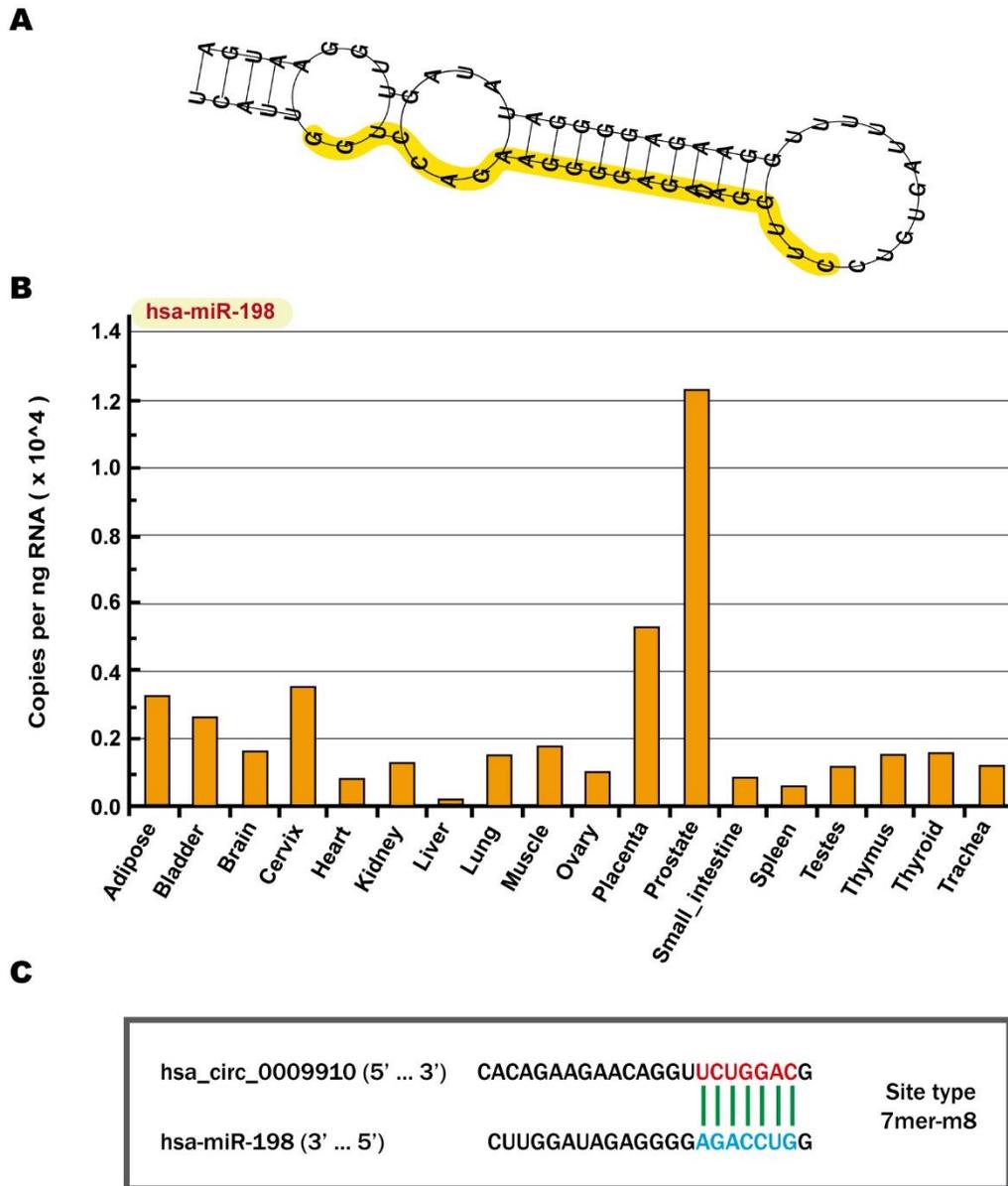
### **La disminución de la expresión de circ9910 disminuye la expresión de c-MET**

Para investigar la posible función de circ9910 en HeLa, realizamos experimentos de pérdida de función por medio de un siRNA (Figura 5A), y posteriormente se midieron los niveles de expresión por RT-qPCR de un mRNA blanco de la red de ceRNA de circ9910. Para seleccionar el mRNA a estudiar, se tomaron en cuenta los siguientes criterios: a) la función del mRNA, b) la fuerza de la interacción miRNA-mRNA, y c) reportes del mRNA sobreexpresado en cáncer cervical. Siguiendo con los criterios antes mencionados, seleccionamos a c-MET como blanco potencial de miR-198 y medimos sus niveles de mRNA en HaCaT y HeLa (Figura 5B). En la figura 5C se muestra que el knockdown de circ9910, disminuye la expresión de c-MET, y en la figura 5D se muestran los posibles sitios de unión de miR-198 en la región 3'-UTR de c-MET.

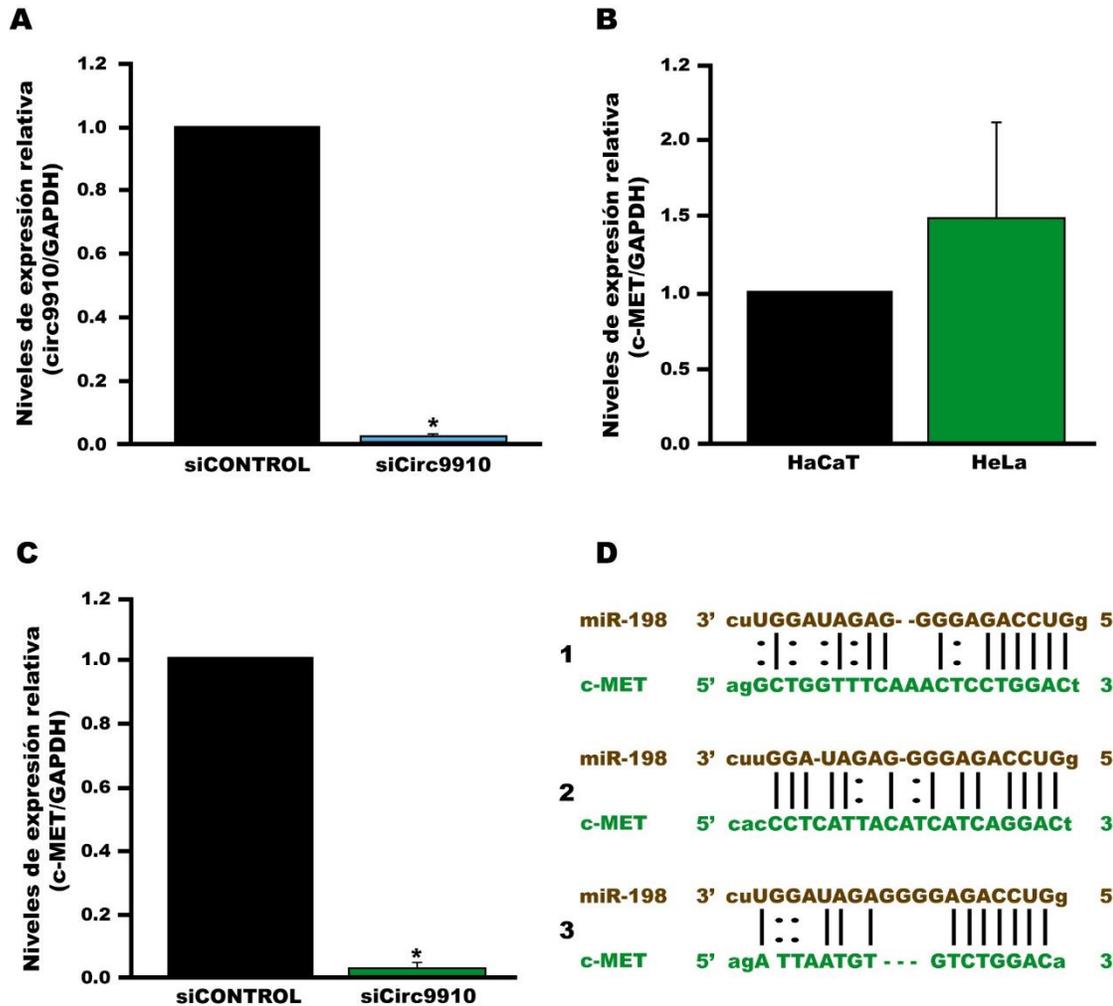
En general, estos datos podrían sugerir un posible eje regulador circ9910/miR-198/c-MET (Figura 5).



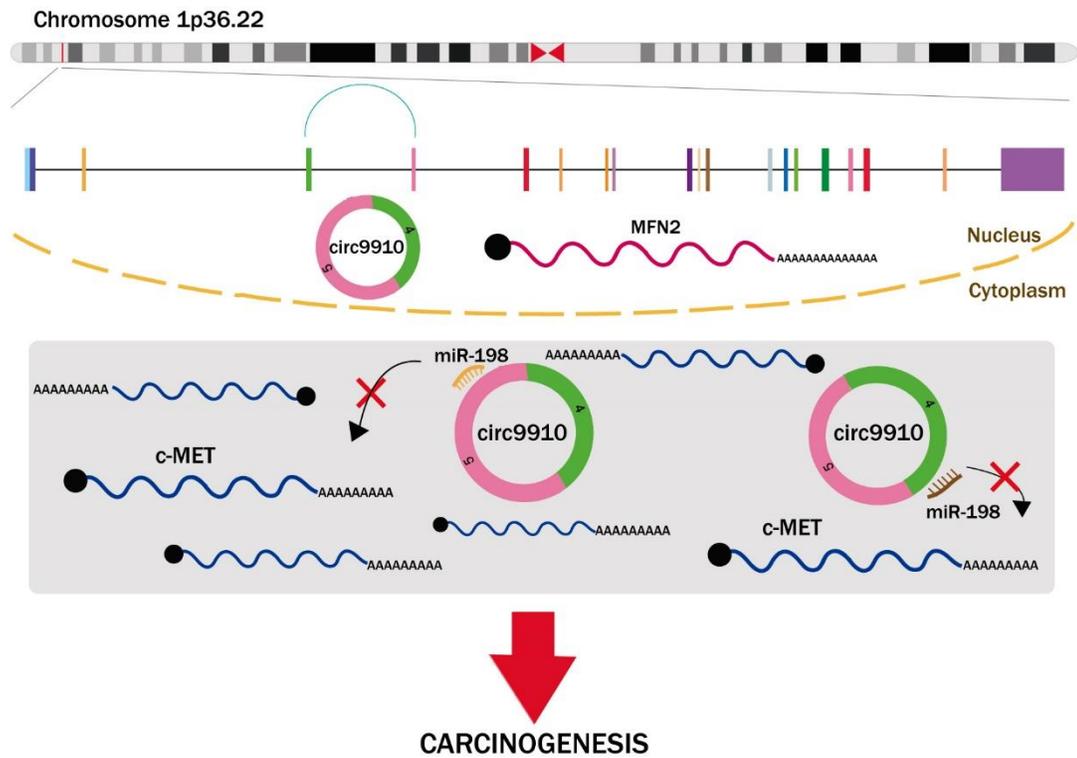
**Figura 3. Gene Ontology (GO) de los mRNA en la red ceRNA de circ9910.** A) Se realizó el análisis de enriquecimiento de vías de los 135 mRNAs regulados en la red de ceRNA. B) Análisis de enriquecimiento de vías de los mRNA regulados por miR-198. FDR <0.05 fue considerada como una diferencia estadísticamente significativa.



**Figura 4. Interacción circ9910/miR-198.** A) Esquema de la estructura secundaria del pre-miRNA-198. La secuencia madura del miRNA se resalta en amarillo. B) Niveles de expresión de miR-198 en diferentes tipos celulares no tumorales. Los datos fueron obtenidos de miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>). C) Sitio de unión de circ9910/miR-198, la secuencia semilla consta de 7 nucleótidos mostrados en rojo en la secuencia de circ9910 y en azul en la secuencia de miR-198, el tipo de unión es 7mer-m8 con un porcentaje de score de 91. Las interacciones circRNA-miRNA se obtuvieron de Circular RNA Interactome (<https://circinteractome.nia.nih.gov/>).



**Figura 5. La disminución de circ9910 afecta la expresión de c-MET.** A) Expresión relativa de circ9910 en HeLa transfectada con sicirc9910 o el control. B) Niveles de expresión basales de c-MET en HaCaT y en HeLa C) Niveles de expresión de c-MET en HeLa transfectada con sicirc9910 o el control. D) Secuencias predichas en miRTarBase de tres sitios de unión de miR-198 (color café) al 3'-UTR de c-MET (color verde). El sitio 1 está ubicado en la posición 704-727 del 3' UTR de c-MET, tiene un score de 122.00 y MFE de -16.40; el sitio 2 está ubicado en la posición 1669-1692 del 3' UTR de c-MET, tiene un score de 123.00 y MFE de -10.42; el sitio 3 está ubicado en la posición 2104-2122 del 3' UTR de c-MET, tiene un score de 141.00 y MFE de -11.50. El nivel de expresión se midió mediante RT-qPCR y se normalizaron utilizando a GAPDH con gen endógeno. Todos los datos presentados son de al menos tres experimentos independientes y son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0.05$ . MFE: energía mínima libre.



**Figura 6. Propuesta de eje de regulación circ9910/miR-198/c-MET.** El esquema muestra que circ9910 promueve la carcinogénesis cervical, regulando a miR-198 y de manera indirecta a c-MET formando una red de ceRNA.

## VI. DISCUSIÓN

El circRNA es un tipo de ncRNA generado por corte y empalme, capaz de regular procesos celulares importantes en cáncer. El cáncer cervical es la neoplasia ginecológica más común y la cuarta causa de muerte entre las mujeres a nivel mundial. Varios circRNAs están anormalmente expresados en cáncer cervical y contribuyen a la carcinogénesis principalmente por su función como ceRNA (Yi *et al.*, 2019, Guria *et al.*, 2020, Tornesello *et al.*, 2020). Recientemente, como resultado del desarrollo de la secuenciación de RNA de alto rendimiento y el uso de herramientas bioinformáticas, se ha podido demostrar la importancia de los circRNAs en el inicio y desarrollo de distintas enfermedades, incluido el cáncer (Cheng *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020, Zhu *et al.*, 2020, Wu *et al.*, 2019, Qiu *et al.*, 2020). Además, es mucho más rápido y menos costoso conocer los perfiles de expresión y la actividad ceRNA de estos circRNAs en diferentes tipos celulares; esto nos permite identificar nuevos circRNAs y su posible papel en el cáncer cervical.

En el presente trabajo, identificamos los circRNAs diferencialmente expresados en células de cáncer cervical a partir de los datos de microarreglo globales obtenidos de bases de datos GEO. Los resultados mostraron que circ8563 y circ9910 fueron los que tenían la mayor expresión en células HeLa comparado con las células control HCEpiC. Los cambios en la expresión de circ8563 y circ9910 fueron validados por RT-qPCR en células HeLa y fueron concordantes con los datos obtenidos del análisis por GEO2R.

Consistentes con nuestros resultados, estudios previos han reportado que circ9910 está sobreexpresado en leucemia mieloide aguda y crónica (Lei *et al.*, 2019, Cao *et al.*, 2020), carcinoma hepatocelular (Wu *et al.*, 2019, Qiu *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2020), cáncer gástrico (Liu *et al.*, 2018) y osteosarcoma (Deng *et al.*, 2018), demostrando que circ9910 a través de su función como ceRNA, tiene un papel oncogénico debido a que regula procesos como la resistencia a fármacos, proliferación, crecimiento tumoral, apoptosis, adhesión, invasión y migración celular. Circ8563 sólo ha sido reportado con sobreexpresión en carcinoma hepatocelular (Qiu *et al.*, 2019).

En cáncer, se ha demostrado que la alteración en el corte y empalme (splicing) canónico y alternativo contribuyen con la progresión de la enfermedad, siendo los factores del splicing elementos clave, ya que su sobreexpresión puede causar eventos de empalme anormales que promuevan la carcinogénesis (Anczuków y Krainer, 2016, Sveen *et al.*, 2016). En el cáncer cervical, los factores de corte y empalme contribuyen en la tumorigénesis por dos mecanismos distintos pero convergentes: 1) al permitir la generación de las isoformas del mRNA del VPH y con ello la expresión de sus oncoproteínas; y 2) generando nuevas isoformas de mRNAs celulares que favorezcan la carcinogénesis cervical (Cerasuolo *et al.*, 2020). Tomando en cuenta estos datos, hipotetizamos que los niveles de expresión de los circRNAs son regulados por la expresión de ciertos factores del splicing.

Kramer *et al.*, reportaron que múltiples proteínas SR (serina-arginina) y hnRNP (ribonucleoproteína nuclear heterogénea) actúan de forma combinatoria para regular los niveles de expresión de circRNAs, ya que estas proteínas se unen a sitios específicos que permiten o bloquean el ensamblaje del espliceosoma. Diversos autores han demostrado que las proteínas hnRNP y SR actúan como oncoproteínas o supresores de tumor en cáncer cervical (Fay *et al.*, 2009; Dvinge *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2018), sin embargo, aún no existen reportes de que estas proteínas regulen la biogénesis de circRNAs en cáncer cervical.

Recientemente, un estudio reveló que la RBP Quaking (QKI) promueve la biogénesis del circSLC26A4 en cáncer cervical, al tener elementos de respuesta a QKI en los intrones del gen parental SLC26A4 (Ji *et al.*, 2019). Precedente a este estudio, ya se había descrito que QKI era un factor de empalme alternativo clave en génesis de circRNAs e incluso, la adición de motivos de unión QKI es suficiente para la génesis de circRNAs de *nov*o a partir de transcripciones que no generan back-splicing (Conn *et al.*, 2015). Por lo que sugerimos, que la alta expresión de circ8563 y circ9910 se debe a la alta expresión y mayor actividad de RBPs implicadas con el splicing alternativo, aunque tenemos claro que estos eventos no fueron valorados en este trabajo.

Para conocer aspectos adicionales respecto a circ8563 y circ9910, su origen y estructura fue investigada en CSCD. Los resultados muestran que ambos son circRNAs exónicos y se originan del cromosoma 1, pero de diferentes genes. Circ8563 contiene el exón 1 y 2 que son eliminados por empalme alternativo de su gen parental ECE1; circ8563 tiene varios MREs y 4 sitios de unión a RBPs. Por otra parte, circ9910 se genera a partir de los exones 4 y 5 de su gen parental MFN2, tiene muchos MREs y al menos 16 sitios de unión para RBPs, además de un marco de lectura abierto que abarca todo el exón 5.

Las RBPs son una amplia clase de proteínas que pueden interactuar específicamente con moléculas de RNA, incluidos los circRNAs. Los circRNAs pueden regular la disponibilidad de las RBPs en la célula e influir en los destinos postranscripcionales de los mRNAs que interactúan con las RBPs (Hase *et al.*, 2013, Abdelmohsen *et al.*, 2017, Zang *et al.*, 2018). Las proteínas que son reguladas por ambos circRNAs (circ8563 y circ9910), están involucradas en la estabilidad y la traducción de mRNAs. Debido al tamaño de circ9910 (315 nt), tiene numerosos sitios de unión a RBPs. La familia de proteínas argonauta (AGO) funcionan como factor central en el proceso de silenciamiento de mRNA. Se unen a un miRNA para participar en la degradación o inhibición de la traducción del mRNA. En la red, se observa que ambos circRNAs pueden interactuar con AGO2, se ha reportado que la mayoría de los circRNAs reducen la capacidad de los miRNAs de unirse a sus mRNAs blanco al servir como plataforma de unión para AGO2 y miRNAs (Hase *et al.*, 2013, Memczak *et al.*, 2013, Zang *et al.*, 2018). Lo que sugiere una forma de doble regulación postranscripcional, secuestrando a miRNAs o AGO2.

Un aspecto funcional importante es que todos los circRNAs identificados con actividad de ceRNA están en el citoplasma y tienen exones (Kulcheski *et al.*, 2016, Zhong *et al.*, 2018, Ragan *et al.*, 2019). Los circRNAs con exones largos, o aquellos de gran tamaño, tienden a tener más MREs, haciéndolos esponjas mucho más efectivas (Ragan *et al.*, 2019, Zhu *et al.*, 2020); por lo tanto, circ9910 tiene más MREs y sitios de unión a RBPs debido a que es mucho más grande que circ8563 (213 nt).

En cáncer cervical, circ8563 y circ9910 posiblemente actúen como ceRNAs al ser esponjas de miRNAs y regular la expresión de los mRNAs blancos de miRNAs. Utilizando herramientas bioinformáticas, predijimos las interacciones circRNAs-miRNAs, así como miRNAs-mRNAs y construimos redes de ceRNAs de cada circRNA de manera independiente, proporcionando nuevos datos para futuras investigaciones de redes ceRNA de circ8563 y circ9910. Para comprender qué procesos biológicos se ven afectados por la desregulación de la expresión de circ8563 y circ9910, realizamos GO de todos los mRNA de la red. En la red circ9910, las funciones de los mRNAs blanco de los miRNAs estaban particularmente asociadas con la regulación negativa de procesos apoptóticos, regulación negativa de la adhesión célula-célula, regulación negativa de la diferenciación celular, regulación positiva de la proliferación de células endoteliales vasculares, la muerte celular, transducción de señales de la proteína Ras, regulación positiva de la proliferación y migración de células epiteliales y endoteliales, desarrollo de órganos embrionarios y otros procesos biológicos. Estos procesos biológicos indicarían que circ9910 regula de manera indirecta mRNAs implicados con ciertas características del cáncer.

El grupo de mRNAs blancos del miR-198, están involucrados en procesos como la regulación positiva de la proliferación celular, regulación positiva de la mitosis, la regulación negativa de la muerte celular y otros procesos estrechamente relacionados con la carcinogénesis. miR-198 ya ha sido reportado disminuido en su expresión en diferentes tipos de cáncer incluido el gástrico, colorrectal, próstata, osteosarcoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón; regulando procesos como la proliferación, el arresto del ciclo celular y la apoptosis a través de sus genes blanco (Liang *et al.*, 2017, Georges *et al.*, 2018, Zhu *et al.*, 2018, Gu *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2019, Ray *et al.*, 2019). Además, a través de la plataforma miRTarBase se logró obtener los niveles de expresión de miR-198 en células normales y se observa que en tejido cervical normal miR-198 tiene altos niveles de expresión, siendo el tercer tejido con más expresión de miR-198. Sin embargo, no hay reportes que puedan indicar que miR-198 está disminuido en cáncer cervical.

Utilizando herramientas bioinformáticas, se predijeron los MREs de circ9910, por lo que hipotetizamos que circ9910 puede actuar como ceRNA al esponjear (secuestrar) a miR-198 y así inhibir la regulación postranscripcional de los mRNAs blanco de miR-198, que están involucrados en procesos biológicos importantes de la carcinogénesis como la regulación de la proliferación, la muerte celular y ciclo celular mitótico.

MET es un protooncogén que codifica al receptor tirosina-cinasa c-MET, y es activado únicamente por el ligando HGF (factor de crecimiento de hepatocitos). Se ha descrito que la alta expresión de c-MET se relaciona con la proliferación, supervivencia, migración e invasión celular, debido a que la constante activación de la vía de señalización HGF/c-MET es clave en el desarrollo embrionario, en la reparación de tejidos y regeneración celular (Boromand *et al.*, 2018, Li *et al.*, 2019, Guo *et al.*, 2020,). Existen reportes que indican que c-MET está sobreexpresado en cáncer cervical, y los pacientes positivos a VPH tienen niveles de expresión más altos en comparación con pacientes negativos a VPH (Boromand *et al.*, 2018, Cheng *et al.*, 2019, Campos-Viguri *et al.*, 2020).

Para conocer el posible papel de circ9910, realizamos la disminución de circ9910 en células HeLa y los resultados demostraron que el knockdown de circ9910 disminuye la expresión de c-MET, posiblemente, a través de miR-198. En estudios previos, describieron que la sobreexpresión de miR-198, disminuía la expresión de c-MET en adenoma y carcinoma colorrectal (Wang *et al.*, 2014), mientras que, Tan *et al.*, en 2011, identificaron a miR-198 como un supresor de invasión al regular negativamente la vía de señalización HGF/c-MET en células de hepatocarcinoma; además de encontrar el sitio de unión clave para miR-198 en el 3'-UTR de c-MET que logra regular la expresión de c-MET. Con ayuda de bases de datos como miRTarBase logramos predecir tres sitios de unión de miR-198 en el 3'UTR de c-MET, de los cuales dos de ellos ya han sido reportados por Tan *et al.*, en 2011 y estos datos sugieren que probablemente miR-198 regula la expresión de c-MET en cáncer cervical. Estos resultados proveen nuevos datos del mecanismo de ceRNA en cáncer cervical; sin embargo, los mecanismos específicos de acción deben ser confirmados.

En conclusión, sugerimos una posible red de regulación circ9910/miRNA-198/c-MET que promueve la carcinogénesis cervical a través de la regulación en la expresión del oncogén c-MET, cuya sobreexpresión se correlaciona con pobre supervivencia, por lo que puede ser un biomarcador diagnóstico en cáncer cervical.

## VII. REFERENCIAS

- Abdelmohsen, K., Panda, A. C., Munk, R., Grammatikakis, I., Dudekula, D. B., De, S., *et al* (2017). Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by circPABPN1. *RNA Biol.* 14(3):361-369. DOI: 10.1080/15476286.2017.1279788.
- Anczuków, O. y Krainer, A. R. (2016). Splicing-factor alterations in cancers. *RNA.* 22(9):1285-1301. DOI:10.1261/rna.057919.116.
- Boromand, N., Hasanzadeh, M., ShahidSales, S., Farazestanian, M., Gharib, M., Fiuji, H., *et al.* (2018). Clinical and prognostic value of the C-Met/HGF signaling pathway in cervical cancer. *J Cell Physiol,* 233(6):4490-4496. DOI: 10.1002/jcp.26232.
- Campos-Viguri, G. E., Peralta-Zaragoza, O., Jiménez-Wences, H., Longinos-González, A. E., Castañón-Sánchez, C. A., Ramírez-Carrillo, M., López-Camarillo, C., *et al.* (2020). MiR-23b-3p reduces the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cell lines via the reduction of c-Met expression. *Sci Rep.* 24;10(1):3256. DOI: 10.1038/s41598-020-60143-x.
- Cao, H-X., Miao, C-F., Sang, L-N., Huang, Y-M., Zhang, R., Sun, L., *et al.* (2020). Circ\_0009910 promotes imatinib resistance through ULK1-induced autophagy by sponging miR-34a-5p in chronic myeloid leukemia. *Life Sci.* 15;243:117255. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117255.
- Cerasuolo, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F.M. y Tornesello, M. L. (2020). The Role of RNA Splicing Factors in Cancer: Regulation of Viral and Human Gene Expression in Human Papillomavirus-Related Cervical Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 12;8:474. DOI: 10.3389/fcell.2020.00474.
- Chaichian, S., Shafabakhsh, R., Mirhashemi, S. M., Moazzami, B. y Asemi, Z. (2019). Circular RNAs: A novel biomarker for cervical cancer. *J Cell Physiol.* 235(2):7818-724. DOI: 10.1002/jcp.29009.
- Chen, G., Wang, Q., Yang, Q., Li, Z., Du, Z., Ren, M., *et al.* (2018). Circular RNAs hsa\_circ\_0032462, hsa\_circ\_0028173, hsa\_circ\_0005909 are predicted to promote CADM1 expression by function as miRNAs sponge in human osteosarcoma. *PLoS One.* 28;13(8)e0202896. DOI: 10.1371/journal.pone.0202896.
- Chen, Y., Yang, M. y Peng, J. (2019). Correlation the between the regulation of miRNA-1 in c-Met-induced EMT and cervical cancer progression. *Oncol Lett.* 17(3):3341-3349. DOI: 10.3892/ol.2019.9971.
- Conn, S. J., Pillman, K. A., Toubia, J., Conn, V. M., Salmanidis, M., Phillips, C.A., Roslan, S., *et al.*, (2015). The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell.* 12;160(6):1125-34. DOI: 10.1016/j.cell.2015.02.014.

- Deng, N., Li, L., Gao, J., Zhou, J., Wang, Y., Wang, C. *et al.*, (2018). Hsa\_circ\_0009910 promotes carcinogenesis by promoting the expression of miR-449a target IL6R in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1;495 (1): 189-196. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.1.028.
- Dragomir, M. y Calin, G. A. (2018). Circular RNAs in Cancer - Lessons Learned From microRNAs. *Front Oncol.* 28;8:179. DOI: 10.3389/fonc.2018.00179.
- Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O. y Bradley, R. K. (2016). RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer.* 16(7):413-430. DOI:10.1038/nrc.2016.51
- Fay, J., Kelehan, P., Lambkin, H. y Schwartz, S. (2009). Increased expression of cellular RNA-binding proteins in HPV-induced neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol.* 81(5):897-907. DOI: 10.1002/jmv.21406. PMID: 19319956.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros M., *et al.* (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 144: 1941–53. DOI: 10.1002/ijc.31937.
- Georges, S., Calleja, L. R., Jacques, C., Lavaud, M., Moukengue, B., Lecanda, F., *et al.*, (2018). Loss of miR-198 and -206 during primary tumor progression enables metastatic dissemination in human osteosarcoma. *Oncotarget.* 6;9(87):35726-35741. DOI: 10.18632/oncotarget.26284.
- Gu, J., Li, X., Li, H., Jin, Z. y Jin, J. (2019). MicroRNA-198 inhibits proliferation and induces apoptosis by directly suppressing FGFR1 in gastric cancer. *Biosci Rep.* 10;39(6):BSR20181258. DOI: 10.1042/BSR20181258.
- Guo, Q., Li, L., Bo, Q., Chen, L., Sun, L. y Shi, H. (2020). Long noncoding RNA PTPN1A-AS1 promotes cervical cancer progression through regulating the cell cycle and apoptosis by targeting the miR-876-5p/c-MET axis. *Biomed Pharmacother.*128:110072. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110072.
- Guria, A., Sharma, P., Natesan, S. y Pandi, G. (2020). Circular RNAs-The Road Less Traveled. *Front Mol Biosci.* 10;6:146. DOI: 10.3389/fmolb.2019.00146.
- Hanse, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Fisen, B., Damgaard, C. K., *et al.*, (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature.* 21;495(7441):384-388. DOI: 10.1038/nature11993.
- Haque, S. y Harries, L. W. (2017). Circular RNAs (circRNAs) in Health and Disease. *Genes (Basel).* 28;8(12):353. DOI: 10.3390/genes8120353.
- Huang, J., Zhou, Q. y Li, Y. (2019). Circular RNAs in gynecological disease: promising biomarkers and diagnostic targets. *Biosci Rep.* 31;39(5): BSR20181641. DOI: 10.1042/BSR20181641.

- Ji, F., Du, R., Che, T., Zhang, M., Zhu, Y., Luo, X., *et al.* (2019). Circular RNA circSLC26A4 accelerates cervical cancer progression via miR-1287-5p/HOXA7 axis. *Mol Ther Nucleic Acids*. 6;19:413-420. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.11.032.
- Kulcheski, F. R., Christoff, A. P. y Margis, R. (2016). Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker. *J Biotechnol*. 20;238:42-51. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.09.011.
- Lei, P., Chen, J-J., Liao, C-S., Liu, G-H. y Zhou, M. (2019). Silencing of circ\_0009910 inhibits acute myeloid leukemia cell growth through increasing miR-20a-5p. *Blood Cells Mol Dis*. 75:41-47. DOI: 10.1016/j.bcmd.2018.12.006.
- Li, H., Hong, J. y Wijayakulathilaka, W. S. M. A. (2019). Long non-coding RNA *SNHG4* promotes cervical cancer progression through regulating c-Met via targeting miR-148a-3p. *Cell cycle*.18(23):3313-3324. DOI: 10.1080/15384101.2019.1674071.
- Li, H-W. y Liu, J. (2020). Circ\_0009910 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma cells through miR-335-5p/ROCK1 axis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 24(4):1725-1735. DOI: 10.26255/eurrev\_202002\_20349.
- Li, L-X., Lam, I-H., Liang, F-F., Yi, S-P., Ye, L-F., Wang, J-T., *et al.*, (2019). MiR-198 affects the proliferation and apoptosis of colorectal cancer through regulation of ADAM28/JAK-STAT signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 23(4):1487-1493. DOI: 10.26355/eurrev\_201902\_17106.
- Liang, Y., Wang, H., Sun, Y., Chen, S., Wang, H., Huang, R., *et al.*, (2017). miR-198-induced upregulation of Livin may be associated with the prognosis and contribute to the oncogenesis of lung adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 38(4): 2096-2104. DOI: 10.3892/or.2017.5866.
- Liu, F., Dai, M., Xu, Q., Zhu, X., Zhou, Y., Jiang, S., *et al.*, (2018). SRSF10-mediated IL1RAP alternative splicing regulates cervical cancer oncogenesis via mIL1RAP-NF-κB-CD47 axis. *Oncogene*, 37(18), 2394–2409. DOI:10.1038/s41388-017-0119-6.
- Liu, M., Liu, K-D., Zhang, L., Cai, J., Yao, H-W., Bai, Y-K. *et al.*, (2018). Circ\_0009910 regulates growth and metastasis and is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 22(23):8248-8256. DOI: 10.26355/eurrev\_201812\_16519.
- Liu, Q., Zhang, W., Wu, Z., Liu, H., Hu, H., Shi, H., *et al.* (2019). Construction of a circular RNA-microRNA-messengerRNA regulatory network in stomach adenocarcinoma. *J Cell Biochem*. 21(2):1317-1331. DOI: 10.1002/jcb.29368.
- Marth, C., Landoni, F., Mahner, S., McCormack, M., Gonzalez-Martin, A. y Colombo, N. (2017). Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 1;28 (suppl 4):iv72–iv83. DOI: 10.1093/annonc/mdx220.

- Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., *et al.*, (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 21;495(7441):333-338. DOI: 10.1038/nature11928.
- Panda, A.C., Grammatikakis. I., Munk, R., Gorospe, M. y Abdelmohsen, K. (2017). Emerging roles and context of circular RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 8(2). DOI: 10.1002/wrna.1386.
- Qian, L., Yu, S., Chen, Z., Meng, Z., Huang, S., y Wang, P. (2018). The emerging role of circRNAs and their clinical significance in human cancers. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 1870(2):247-260. DOI: 10.1016/j.bbcan.2018.06.002.
- Qiu, L., Wang, T., Ge, Q., Xu, H., Wu, Y., Tang, Q. *et al.*, (2019). Circular RNA Signature in Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer*. 9;10(15):3361-3372. DOI: 10.7150/jca.31243.
- Qiu, Y., Pu, C., Li, Y. y Qi, B. (2020). Construction of a circRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveals the function of circRNAs in osteosarcoma. *Cancer Cell Int*. 10;20:48. DOI: 10.1186/s12935-020-1134-1.
- Ragan, C., Goodall, G. J., Shirokikh, N. E. y Preiss, T. (2019). Insights into the biogenesis and potential functions of exonic circular RNA. *Sci Rep*. 9:2048. DOI: 10.1038/s41598-018-37037-0.
- Ray, J., Hoey, C., Huang, X., Jeon, J., Taeb, S., Downes, M. R., *et al.*, (2019). MicroRNA-198 suppresses prostate tumorigenesis by targeting MIB1. *Oncol Rep*, 42(3):1047-1056. DOI: 10.3892/or.2019.7234.
- Rong, X., Gao, W., Yang, X. y Guo, J. (2019). Downregulation of hsa\_circ\_0007534 restricts the proliferation and invasion of cervical cancer through regulating miR-498/BMI-1 signaling. *Life Sci*. 15;235:116785. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116785.
- Shi, X., Ran, L., Liu, Y., Zhong, S. H., Zhou, P. P., Liao, M. X. y Fang, W. (2018). Knockdown of hnRNP A2/B1 inhibits cell proliferation, invasion and cell cycle triggering apoptosis in cervical cancer via PI3K/AKT signaling pathway. *Oncology reports*, 39(3), 939–950. DOI:10.3892/or.2018.6195.
- Sveen, A., Kilpinen, S., Ruusulehto, A., Lothe, R. A. y Skotheim, R. I. (2016). Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene*. 12;35(19):2413-27. DOI: 10.1038/onc.2015.318.
- Tan, S., Li, R., Ding, K., Lobie, P. E. y Zhu, T. (2011). miR-198 inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting the HGF/c-MET pathway. *FEBS Lett*. 21;585(14):2229-34. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.05.042.
- Tornesello, M. L., Faraonio, R., Buonaguro, L., Annunziata, C., Starita, N., Cerasuolo, A., *et al.* (2020). The Role of microRNAs, Long Non-coding RNAs, and Circular RNAs in Cervical Cancer. *Front. Oncol*. 20;10:150. DOI: 10.3389/fonc.2020.00150.

- Wang H., Zhao, Y., Che, M. y Cui, J. (2017). Identification of novel long non-coding and circular RNAs in human papillomavirus-mediated cervical cancer. *Front Microbiol.* 8:1720. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01720.
- Wang, F., Xu, X., Zhang, N. y Chen, Z. (2020). Identification and integrated analysis of hepatocellular carcinoma-related circular RNA Signature. *Ann Transl Med.* 8(6):294. DOI: 10.21037/atm.2020.03.06.
- Wang, M., Wang, J., Kong, X., Chen, H., Wang, Y., Quin, M., *et al.* (2014). MiR-198 represses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fucosyl transferase 8. *Sci Rep.* 1;4:6145. DOI: 10.1038/srep06145.
- Wu, J., Liu, S., Xiang, Y., Qu, X., Xie, Y. y Zhang, X. (2019). Bioinformatic analysis of circular RNA-Associated ceRNA network associated with hepatocellular carcinoma. *Biomed Res. Int.* Volume 2019, article ID 8308694, 14 pages. DOI: 10.1155/2019/8308694.
- Xu, Y. J., Yu, H. y Liu, G. X. (2019). Hsa\_circ\_0031288/hsa-miR-139-3p/Bcl-6 regulatory feedback circuit influences the invasion and migration of cervical cancer HeLa cells. *J Cell Biochem.* 1-10. DOI: 10.1002/jcb.29650.
- Yi, Y., Liu, Y., Wu, W., Wu, K. y Zhang, W. (2019). Reconstruction and analysis of circRNA-miRNA-mRNA network in the pathology of cervical cancer. *Oncol Rep.* 41 (4): 2209-2225. DOI: 10.3892/or.2019.7028.
- Zang, J., Lu, D. y Xu, A. (2018). The interaction of circRNAs and RNA binding proteins: An important part of circRNA maintenance and function. *J Neurosci Res.* 98(1):87-97. DOI: 10.1002/jnr.24356.
- Zhong, Y., Du, Y., Yang, X., Mo, Y., Fan, C., Xiong, F., *et al.*, (2018). Circular RNAs function as ceRNAs to regulate and control human cancer progression. *Mol Cancer.* 7;17(1):79. DOI: 10.1186/s12943-018-0827-8.
- Zhu, L., Xue, F., Xu, X., Xu, J., Hu, S., Liu, S., *et al.*, (2018). MicroRNA-198 inhibition of HGF/c-MET signaling pathway overcomes resistance to radiotherapy and induces apoptosis in human non-small-cell lung cancer. *J Cell Biochem.* 119(9):7873- 7886. DOI: 10.1002/jcb.27204.
- Zhu, Z., Chang, F., Liu, J., Wang, J. y Zhang, X. (2020). Comprehensive circular RNA profiling Reveals the regulatory role of circ\_100242/miR-145 pathway in bladder cancer. *Oncol Lett.* 19(4):2971-2978. DOI: 10.3892/ol.2020.11380.