



I N T E R C H

Control epigenético-microARN de la transición epitelio-mesénquima de las células de la cresta neural

Tesis para optar por el título de
“Doctora en Biología Molecular y Biotecnología”
Universidad Nacional de San Martín

Gen. Estefania Sanchez Vasquez

Director: Dr. Pablo H. Strobl-Mazzulla

Chascomús – Argentina

2020

“A medida que la ciencia progresa y nuestros conocimientos se expanden, pensamos que lo comprendemos todo, y tendemos a volvernos sobre-confiados. Creo que siempre subestimamos la complejidad de la vida y de la naturaleza. El día de hoy es un día de celebración a esa belleza y esa complejidad”

Craig C. Mello
Co-descubridor del fenómeno de ARN de interferencia
en el día de su recepción del Premio Nobel de Fisiología o Medicina, 2006

AGRADECIMIENTOS

A las entidades que financiaron este proyecto: CONICET, NIH; y en especial al CONICET y al gobierno argentino, que me dieron la oportunidad de realizar un doctorado en Biología Molecular y Biotecnología.

A mi Director, Dr. Pablo Strobl-Mazzulla, por enseñarme a pensar y cuestionar como una científica. Por su apoyo en la realización de esta tesis y por la confianza para juntos sacar adelante este proyecto.

A la Dra. Marianne Bronner por sus consejos, esfuerzo y dedicación con este proyecto y conmigo. Gracias por dejarme ser parte de tu familia y de educarme y apoyarme con cariño y respeto.

A la Dra. Natalia de Miguel por su apoyo y confianza, gracias inmensas por recomendarme para la beca Pew.

A la Dra. Analía Sannazzaro por ser mi asesora de doctorado.

Al laboratorio de Biología del Desarrollo (INTECH), muchas gracias Dr. Juan I. Fernandino, Luisa Arias, Omar Moreno, Diana Castañeda y Nagif Alata; en nuestra pequeña comunidad del laboratorio, aprendimos a convivir, a respetarnos y a entender que estamos ahí para apoyarnos e intentar sacar lo mejor de nosotros.

A la comunidad del INTECH, instituto tan particular para hacer ciencia en comunidad. En especial a Vero, Aye, Lucre, Marion, Diego, Vale, Diani, Eli, Naza, Maru, Pato, Marian. En especial también a Carina López por su inmenso trabajo en histología.

A la comunidad de Chascomús, por demostrarme que, aunque este a más de mil kilómetros de donde nací, se puede encontrar un hogar. En especial a mis amigas del futbol “El rejunte” y a mi vecina Lucia Otondo.

A Rosario, te quiero.

A mi familia, porque las distancias son cortas cuando hay amor.

En estos tiempos tan difíciles donde se nos ha demostrado que somos meros animales sujetos a los poderes de la evolución y la selección natural, quiero dar un especial agradecimiento a todas las personas que, conociéndome o sin conocerme, fueron gentiles conmigo y siempre deciden ser gentiles con los demás. Gracias a todas aquellas personas que no se dejan llevar por sus emociones personales durante su trabajo y siempre permanecen profesionales y entienden que la ciencia es algo que se debe construir con amor, paciencia y dedicación. Esperemos que este tiempo de distancia con el prójimo, nos enseñe que nada somos sin los demás. Porque la vida no vale nada si no es para perecer porque otros puedan tener lo que uno disfruta y ama.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. Abstract	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3. 1. Desarrollo de las células de la cresta neural	3
3. 1. 1.Relevancia médica	10
3. 2. Transición epitelio-mesénquima (TEM)	13
3. 2. 1.Transición epitelio-mesénquima en las células de la cresta neural y cáncer	14
3. 2. 2.Factores de transcripción promotores de la transición epitelio-mesénquima (FT-TEM)	16
3. 3. Regulación epigenética de la transición epitelio-mesénquima	20
3. 3. 1.Generalidades de las regulaciones epigenéticas	20
3. 3. 2.Regulación epigenética de la transición epitelio-mesénquima en las células de la cresta neural	26
3. 3. 3.Regulación epigenética de la transición epitelio-mesénquima en cáncer ..	29
3. 4. Regulación epigenética-microARNs durante la transición epitelio- mesénquima	32
3. 4. 1.Biogénesis y función de los microARNs.....	32
3. 4. 2.Regulación epigenética-microARNs durante la transición epitelio- mesénquima.....	34
4. OBJETIVOS	38
4. 1. General	38
4. 2. Específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5. 1. Análisis <i>in silico</i> de los microARNs reguladores de <i>Phf12</i> y <i>Snail2</i>	39
5. 2. Obtención y manipulación del material biológico	39
5. 3. Hibridación <i>in situ</i> (Greenberg and Bourc'his) con sondas LNA	39
5. 4. Hibridación <i>in situ</i> (Greenberg and Bourc'his) con sondas de RNA	41
5. 5. Montaje de embriones en gelatina y secciones transversales	42
5. 6. Inmunohistoquímica (IHQ)	43
5. 7. Extracción de ARN y stem-loop RT-qPCR	43
5. 8. Generación de plásmidos para ganancia y pérdida de función de miR-203.	48
5. 9. Electroporación de plásmidos y morfolidos	49
5. 9. 1.Ensayo de ganancia de función de miR-203.....	51
5. 9. 2.Ensayo de pérdida de función de miR-203.....	51

5. 9. 3. Ensayo de los posibles reguladores de la metilación del gen de miR-203.	51
5. 9. 4. Método estadístico.....	52
5. 10. Secuenciación bisulfito	52
6. RESULTADOS	55
6. 1. Identificación <i>in silico</i> de microARNs capaces de regular la TEM en las células de la cresta neural	55
6. 2. Patrón de expresión espacio-temporal del miR-203.....	58
6. 3. Efecto de la ganancia función del miR-203 sobre la migración de las células de la cresta neural	62
6. 4. Efecto de la pérdida de función del miR-203 durante el desarrollo de las células de la cresta neural	68
6. 5. Comprobación de los blancos de miR-203.....	71
6. 6. Regulación epigenética de la expresión de miR-203 en el desarrollo de las células de la cresta neural	73
6. 6. 1. Metilación del contexto genómico de miR-203 en el desarrollo normal de las células de la cresta neural	73
6. 6. 2. Análisis de los reguladores de la metilación del gen de miR-203.....	75
6. 7. Reversibilidad en la regulación epigenética de miR-203 durante la condensación de las células de la cresta neural	77
7. DISCUSIÓN	81
8. CONCLUSIONES	89
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
10. APÉNDICE	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Desarrollo de las células de la cresta neural	9
Figura 2: Transición epitelio-mesénquima durante el desarrollo del cáncer y de las células de la cresta neural	16
Figura 3: Estructura general de los factores de transcripción de la familia SNAIL	19
Figura 4: Ciclo dinámico de metilación- demetilación de la citosina	25
Figura 5: Modelo esquemático de la represión transcripcional de la <i>Cad6b</i> en las células de la cresta neural pre-migratorias para dar inicio a la TEM	29
Figura 6: Biogénesis, procesamiento y acción de los microARNs	33
Figura 7: Regulación epigenética-microARNs durante el desarrollo del cáncer .	36
Figura 8: Descripción esquemática de la técnica Stem Loop RT-qPCR	44
Figura 9: Cálculo de eficiencias de amplificación para cada par de oligonucleótidos de los genes analizados.	46
Figura 10 Expresión específica de miR-203 y miR-16	46
Figura 11: Mapa del vector “esponja”, pSmiR-203.....	49
Figura 12: Electroporación de embriones de pollo	50
Figura 13: Localización espacial de los oligonucleótidos diseñados para la PCR anidada en el contexto genómico del gen <i>gga-miR-203</i>	53
Figura 14: Representación gráfica de los tentativos sitios de unión de microARNs conservados a los 3'UTR de PHF12 y SNAIL2 (TargetScan y miRDB)	56
Figura 15: Alineamiento múltiple de la secuencia de miR-203 maduro en vertebrados	58
Figura 16: Análisis estadio-específico de la expresión de miR-203 mediante hibridación <i>in situ</i> con sonda LNA	59
Figura 17: La expresión de miR-203 es específica de las células de la cresta neural pre-migratorias	60
Figura 18: La expresión de miR-203 es recíproca a sus blancos tentativos <i>Snail2</i> y <i>Phf12</i>	61
Figura 19: Plásmido de sobreexpresión constitutiva de miR-203.....	63
Figura 20: Determinación de la funcionalidad del vector de sobreexpresión de miR-203.....	64

Figura 21: Sobreexpresión de miR-203 inhibe la migración de las células de la cresta neural	65
Figura 22: Sobreexpresión constitutiva de miR-203 no afecta la especificación de las células de la cresta neural	66
Figura 23: Sobreexpresión de miR-203 inhibe la expresión de SNAIL2 y genera una acumulación de CAD6B	67
Figura 24: Sobreexpresión de miR-203 afecta la vía SNAIL2/PHF12-Cad6b.....	68
Figura 25: Pérdida de función de miR-203 causa migración prematura de las células de la cresta neural	70
Figura 26: <i>Snail2</i> y <i>Phf12</i> son blancos de miR-203	72
Figura 27: El gen de miR-203 se encuentra hipermetilado en las células de la cresta neural pre-migratorias	74
Figura 28: SNAIL2 y DNMT3B son necesarios para la metilación del ADN en el gen de miR-203 en las células de la cresta neural pre-migratoria.	76
Figura 29: Patrón de expresión de los genes TET1-3 durante los estadios de desarrollo de las células de la cresta neural	78
Figura 30: miR-203 se expresa durante el desarrollo del ganglio trigémino.....	80
Figura 31: Modelo hipotético de regulación epigenética-microARN durante la migración de las células de la cresta neural.....	85
Figura 32: Modelo hipotético de regulación epigenética-microARN durante la diferenciación de las células de la cresta neural.....	88

1. RESUMEN

Las células de la cresta neural (CCN) conforman una población transitoria presente solo en etapas tempranas del desarrollo embrionario de vertebrados. Estas células se caracterizan por su multipotencia y capacidad migratoria, y es sabido que defectos durante su desarrollo conlleva a severos trastornos congénitos conocidos como neurocristopatías. Para iniciar su migración, las CCN sufren un proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM), similar al que ocurre durante el inicio de la metástasis tumoral. Se ha determinado que la regulación epigenética de ciertos microARNs conforma un paso clave para el inicio de la TEM tumoral, sin embargo, no se ha estudiado la participación de estos mecanismos durante el desarrollo normal de las CCN en un sistema *in vivo*. En este contexto, considerando las similitudes de la TEM entre las CCN y el cáncer, nos planteamos como objetivo determinar la existencia de una red regulatoria epigenética-microARN que desempeñe un papel importante en la migración de las mismas. En este trabajo de tesis reportamos que miR-203, supresor de tumores con funciones conocidas en metástasis, regula a dos factores claves de la TEM en las CCN, *Phf12* y *Snail2*. La expresión de este microARN es recíprocamente inversa con los ARN mensajeros de PHF12 y SNAIL2 e interactúa directamente con sus 3'UTRs. Nuestros experimentos de ganancia y pérdida de función, demostraron que el mantenimiento ectópico de miR-203 inhibe la migración, mientras que su inhibición funcional promueve la delaminación prematura de las CCN. Además, se demostró que la represión de miR-203 para dar inicio a la TEM está mediada por la metiltransferasa de ADN DNMT3B, cuyo reclutamiento a las regiones reguladoras de este microARN está dirigido por el propio SNAIL2 en un circuito de retroalimentación negativa. Luego, cuando las CCN se encuentran migrando, hemos observado que la metilación de miR-203 es rápidamente revertida, y esto ocurre de manera coincidente con la detección en la expresión de los genes TET involucrados en la demetilación del ADN. Finalmente, hemos evidenciado que miR-203 vuelve a expresarse en las CCN que requieren su condensación para formar el ganglio trigémino. Considerando nuestros resultados en conjunto, planteamos la existencia de una dinámica en la expresión de miR-203, regulada epigenéticamente, durante la delaminación y condensación de las CCN. Colectivamente, los resultados de esta tesis tienen implicancias importantes para comprender los errores que puedan conducir a una migración anormal de las CCN.

Palabras clave: epigenética, microARNs, metilación, cresta neural

2. Abstract

Neural crest cells (NCC) are a transient population present only in early stages of vertebrate embryonic development. These cells are characterized by their multipotency and migratory capacity, and it is known that defects during their development lead to severe congenital disorders known as neurocristopathies. To start their migration, NCCs undergo an epithelial-mesenchymal transition (EMT) process, similar to the one that occurs during the beginning of tumor metastasis. The epigenetic regulation of certain microRNAs has been determined to be a key step in the initiation of tumor EMT. However, the participation of these mechanisms during the normal development of NCCs in an *in vivo* system has not been studied. In this context, considering the similarities of the EMT in NCCs and cancer, we aim to determine the existence of an epigenetic-microRNA regulatory network that plays an important role in NCC migration. In this thesis, we report that miR-203, a tumor suppressor with known functions in metastasis, regulates two key factors of NCC EMT, *Phf12* and *Snail2*. The expression of this microRNA is reciprocally inverse with the messenger RNAs of PHF12 and SNAIL2 and interacts directly with their 3'UTRs. Our gain-and-loss-of-function experiments demonstrated that ectopic maintenance of miR-203 inhibits migration, while its functional inhibition promotes premature delamination. Furthermore, it was shown that during the initiation of the NCC EMT, the repression of miR-203 is mediated by the DNA methyltransferase *de novo* DNMT3B, whose recruitment to the regulatory regions of this microRNA is directed by SNAIL2 itself, forming a negative feedback loop. Then, when the NCCs are migrating, we have observed that the miR-203 methylation is rapidly eliminated, and this occurs in a way that coincides with the detection in the expression of the TET proteins, involved in DNA demethylation. Finally, we have shown that miR-203 is re-expressed in the NCCs that require condensation to form the trigeminal ganglion. Considering our results as a whole, we propose the existence of a dynamics in the expression of miR-203, regulated epigenetically, during the delamination and condensation of the NCCs. Collectively, the results of this thesis have important implications for understanding the errors that can lead to abnormal migration of NCCs.

Key words: epigenetics, microRNAs, methylation, neural crest

3. INTRODUCCIÓN

3. 1. Desarrollo de las células de la cresta neural

Las células de la cresta neural (CCN) son una población transitoria de progenitores multipotentes, los cuales se forman exclusivamente durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, y se caracterizan por poseer una gran capacidad migratoria (Martik and Bronner, 2017). Inicialmente, las CCN fueron identificadas por Wilhelm His (1868), el cual las denominó *Zwischenstrang* (cordón intermedio), por observarlas en el embrión de pollo, como una banda de células entre el tubo neural y el ectodermo no neural. Desde esa primera observación han pasado más de 150 años estudiando a estas células (Creuzet and Saint-Jeannet, 2018; Gouignard et al., 2018), las cuales han revelado, hasta el momento, una gran complejidad de procesos celulares y moleculares que siguen fascinando a los investigadores. El desarrollo de las CCN se puede dividir en 5 etapas fundamentales: inducción, especificación, delaminación, migración y diferenciación (Fig. 1).

Inducción: durante el proceso de gastrulación, se establecen límites restrictivos entre la placa neural, que luego dará lugar a la formación del sistema nervioso central (SNC), y el ectodermo no neural (epidermis), para formar el borde de la placa neural (Milet and Monsoro-Burq, 2012) (Fig. 1A). Estos límites restrictivos son consecuencia de la combinación de vías de señalización (BMP, WNT, NOTCH y FGF) que inician una cascada de activación transcripcional para dar lugar a las CCN y progenitores placodales (células que dan origen a células sensoriales de ojos, nariz y oído y los ganglios epibranquiales y craneales) en el borde de la placa neural (Schille and Schambony, 2017). Sin embargo, este proceso que depende de gradientes de morfógenos es muy dinámico, observando que muchas de las células del borde de la placa neural pueden contribuir tanto a la placa neural como a la epidermis durante la gastrulación. En este sentido, estudios recientes han demostrado que estos progenitores del borde de la placa neural se encuentran en un estado de “*priming*”, y resuelven el destino celular recién hacia el final del cierre del tubo neural (Roellig et al., 2017). Por otro lado, es importante destacar que el proceso de inducción del borde de la placa neural es altamente conservado entre diferentes especies de

vertebrados, y que cualquier defecto en estadios tan tempranos implica un cambio fenotípico drástico en el adulto (Simoès-Costa and Bronner, 2015).

Especificación: durante el inicio de la neurulación (formación del SNC), los bordes de la placa neural comienzan a elevarse para formar los pliegues neurales. Es en este momento cuando las células más dorsales de los pliegues neurales se comprometen o especifican a ser CCN (Fig. 1B). En varios vertebrados como pollo, rana y pez cebra, se ha descrito que las vías de señalización WNT y BMP, activan un grupo de factores de transcripción (FT) especificadores de las CCN tales como *FoxD3*, *Sox10*, *Ets1*, *cMyb* y *Pax7* (Martik and Bronner, 2017). En este contexto, la especificación de las CCN involucra la activación de este grupo de FT y pasan a tomar el nombre de CCN pre-migratorias. Además, se ha descrito que estos FT, principalmente *FoxD3* y *Sox10*, tienen la función de mantener a las CCN pre-migratorias en un estado no diferenciado y con un alto grado de plasticidad celular. Es por este motivo, que esta población de CCN pre-migratorias se considera aún multipotentes (Buitrago-Delgado et al., 2015).

Aun luego de su especificación, las CCN pre-migratorias, posicionadas en la parte más dorsal del tubo neural, se encuentran fuertemente unidas formando un epitelio el cual es mantenido por la expresión de ciertas cadherinas y ocludinas (Theveneau and Mayor, 2012). Al finalizar el proceso de neurulación los pliegues neurales se conectan y fusionan para formar un tubo a partir del cual se desarrollará el SNC. Es en este momento en donde las CCN comienzan el proceso de delaminación del epitelio del tubo neural para dar lugar a su posterior migración (Simoès-Costa and Bronner, 2015). Es importante destacar, que los FT especificadores son capaces de activar programas transcripcionales que luego desencadenarán dicha delaminación y migración (explicado en más detalle en la siguiente sección).

Delaminación y migración: La delaminación es el proceso celular por el cual las CCN pre-migratorias se desprenden del tubo neural (Fig. 1C) (Theveneau and Mayor, 2012). De manera general, las CCN pre-migratorias que residen en el tubo neural dorsal tienen características epiteliales (expresión de cadherinas de unión estrecha, membrana basal, matriz extracelular escasa), las cuales son perdidas al delaminar y adquirir características mesenquimales (poco contacto

célula-célula y capacidad de migrar) (Nieto, 2013). Este cambio es conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM) el cual, como se explicará en más detalle en secciones posteriores, presenta grandes similitudes en cuanto a los cambios celulares y moleculares que ocurren durante la metástasis tumoral.

Si bien en todas las especies de vertebrados las CCN se someten a TEM, esto no necesariamente conlleva a la inmediata delaminación y migración de las CCN como ocurre en el embrión de pollo (Rogers et al., 2013). En el caso del ratón, la activación de la TEM ocurre antes que la delaminación y migración de las CCN, causando que las CCN tengan una migración coordinada (Soldatov et al., 2019). En el embrión de pollo, la activación de la TEM es secuencial, en donde las primeras células que activaron la TEM proceden a delaminar y migrar, mientras que otras células residentes en el tubo neural recién se encuentran activando este programa. Por otro lado, en la rana, la TEM ocurre después de la delaminación de las CCN (Theveneau and Mayor, 2012). Esta particularidad ocurre como consecuencia de que las CCN delaminan del tubo neural de manera conjunta, sin separarse entre ellas, y migran colectivamente como un cúmulo de células (Barriga and Mayor, 2015). Durante esta migración, y previo a su diferenciación, estas células activan la TEM lo que causa una eliminación de las moléculas de adhesión y se activa la migración “mesenquimal” hacia el lugar de diferenciación. Considerando lo dicho, es importante recalcar que, si bien los procesos celulares de la TEM pueden ocurrir en diferentes momentos dependiendo de la especie, existe un alto nivel de conservación a nivel transcripcional para dar inicio a dicha transición (Martik and Bronner, 2017). En este contexto, estudios en rana, pollo y pez cebra, han descrito que los principales FT involucrados en el inicio de la TEM (FT-TEM) son *Snail2*, *Sox9*, *Twist*, *Ets*, y *Sip1 (Zeb)* (Khudyakov and Bronner-Fraser, 2009).

De manera general, la activación de FT-TEM como *Sip1* y *Snail2* reduce la expresión de cadherinas epiteliales Cad-E y Cad6b, respectivamente, lo que disminuye la adhesividad célula-célula (Duband et al., 2015; Taneyhill et al., 2007). Por otro lado, este proceso también involucra cambios en la superficie celular por la expresión de proteasas, tales como ADAM10, capaces de degradar cadherinas extracelulares y secretar metaloproteasas de matriz (MMP) que degradan la lámina basal subyacente del tubo neural. Una vez que las células

poseen poco contacto célula-célula y la lámina basal es degradada, las CCN son capaces de delaminar e iniciar la migración (Fig. 1C).

Una vez que han iniciado la migración, las células adquieren características mesenquimales, en donde se expresan cadherinas de poca adherencia como la Cad-N y Cad-7 (Gougnard et al., 2018). Por otra parte, ocurren cambios en el citoesqueleto que le permiten la producción de protrusiones celulares, adhesiones focales y fuerzas de tracción necesarias para la migración (Shellard and Mayor, 2016) (Fig. 1D). Además, como consecuencia de la TEM, las CCN migratorias comienzan a expresar un nuevo grupo de FT importantes para la migración, tales como: *Lmo4*, *RxrG*, *Ltk*, *Arnt2* y *Hes5* (Simoes-Costa et al., 2014; Williams et al., 2019). Estos TF no solo son requeridos para el proceso de migración, sino que también les otorgan la capacidad de responder a las señales ambientales e iniciar la diferenciación. Sin embargo, si bien existe un grupo de FT específicos para las CCN migratoria (Williams et al., 2019), es importante destacar que la expresión de varios genes especificadores de las CNN, como *FoxD3*, *Ets1* y *Sox10*, se mantienen (Betancur et al., 2010; Khudyakov and Bronner-Fraser, 2009) mientras que la expresión de los FT-TEM disminuye progresivamente con la distancia de la migración (Bhattacharya et al., 2018).

Por otro lado, las CCN migratorias también presentan profundas diferencias en la regulación genómica de la expresión de ciertos FT, comparado con las CCN pre-migratorias (Simoes-Costa and Bronner, 2015). Un ejemplo de esto es la regulación transcripcional de uno de los especificadores más importantes: *FOXD3* (Simoes-Costa et al., 2012). Se sabe que en las CCN pre-migratorias, la expresión de *FoxD3* está controlada por un enhancer de activación temprana denominado: NC1, que inicia la expresión de *FoxD3* durante la especificación de las CCN y se mantiene hasta la delaminación de las mismas. Consecuentemente, la expresión de *FoxD3* en CCN migratorias se reactiva y mantiene por la activación del enhancer denominado: NC2; ambos enhancers, NC1 y NC2, son activados por diferentes sets de FT en estos dos estadios de las CCN. Este ejemplo demuestra que, si bien las células pre-migratorias y migratorias comparten varios FT, la activación a nivel genómico puede variar mucho dependiendo el estadio de desarrollo de las CCN.

Es importante destacar que, durante la migración de las CCN, varios sistemas de señalización participan en la orientación de la migración y el establecimiento de las rutas migratorias (Takahashi et al., 2013). En este contexto se sabe que las CCN migratorias son complejas desde un punto de vista transcripcional, debido a que están constantemente expuestas a diferentes señales ambientales que dependen de su posición en el embrión, es decir, la población migratoria es altamente heterogénea (Soldatov et al., 2019). Considerando lo dicho, existe poca información sobre cómo las CCN responden a las diversas moléculas de señalización durante su migración y cómo la expresión de receptores específicos es regulada transcripcionalmente. Sin embargo, se ha determinado que SOX10 es importante para expresar receptores que censan las señales externas durante la migración tales como el receptor de neuregulina *ErbB3* (Britsch et al., 2001) y los receptores *Robo* (Samant et al., 2011), y que ayudan a las CCN a reconocer dónde está el nicho específico al que tienen que migrar para diferenciarse.

Diferenciación: las CCN migran a través del embrión usando los tejidos subyacentes, para finalmente alcanzar los diferentes sitios en donde se diferenciarán en una gran variedad de linajes celulares (Fig. 1F) (Martik and Bronner, 2017). Tomando en cuenta la gran variedad de tipos celulares que se originan a partir de las CCN, muchos autores consideran que se las debe denominar la cuarta capa germinal de vertebrados (Hall, 2000; Shyamala et al., 2015). Es importante destacar que dependiendo de la ubicación antero-posterior del embrión, las CCN se clasifican en cuatro grupos principales (Fig. 1E) (Simoës-Costa and Bronner, 2015):

-CCN craneal o cefálica: Esta es la primera subpoblación que inicia la TEM y delamina del tubo neural. Están ubicadas en la parte más anterior del embrión y llevan el nombre de craneal debido a que durante su migración colonizan gran parte de la cabeza. Entre sus principales derivados se encuentran huesos y cartílagos que dan lugar a la formación de la mayoría de las estructuras craneofaciales y el oído medio, así como neuronas y células gliales que contribuyen a la formación de los ganglios craneales, tales como el ganglio trigémino encargado de percibir las sensaciones de la cara. Además, se diferencian en odontoblastos que darán lugar a los primordios de los dientes, y células de la glándula tiroides y paratiroides.

-CCN vagal: Esta subpoblación se origina desde el somito 1 al 7, entre las CCN craneal y troncal. En esta subpoblación existe un pequeño subconjunto que se originan entre los somitos 1-3 y que comprenden a las CCN cardíacas, las cuales llevan su nombre por tener la capacidad de contribuir a la formación del tejido musculo-conectivo de las arterias grandes, las válvulas semilunares y el tabique interventricular del corazón. Por otra parte, las células que migran más tardíamente de esta región son capaces de diferenciarse principalmente en melanocitos. Otros dos subconjuntos se originan a partir de esta región y migran ventralmente desde los somitos 1-3 y 4-6 para formar el sistema nervioso entérico del intestino anterior y el estómago, respectivamente.

-CCN troncal: ubicadas en la parte posterior del embrión, dan lugar a dos poblaciones de células. Un grupo de células destinadas a convertirse en melanocitos, por lo que migran a través de todo el embrión, y un segundo grupo de células que migran cortas distancias y se diferencian en neuronas y glía del sistema nervioso periférico (ganglios de la raíz dorsal, los ganglios simpáticos) y células adrenales.

-CCN sacral: Estas tienen un rol fundamental en la contribución al sistema nervioso entérico, debido a que dan lugar a la formación de ganglios que inervan el intestino medio y están encargados de su movimiento peristáltico.

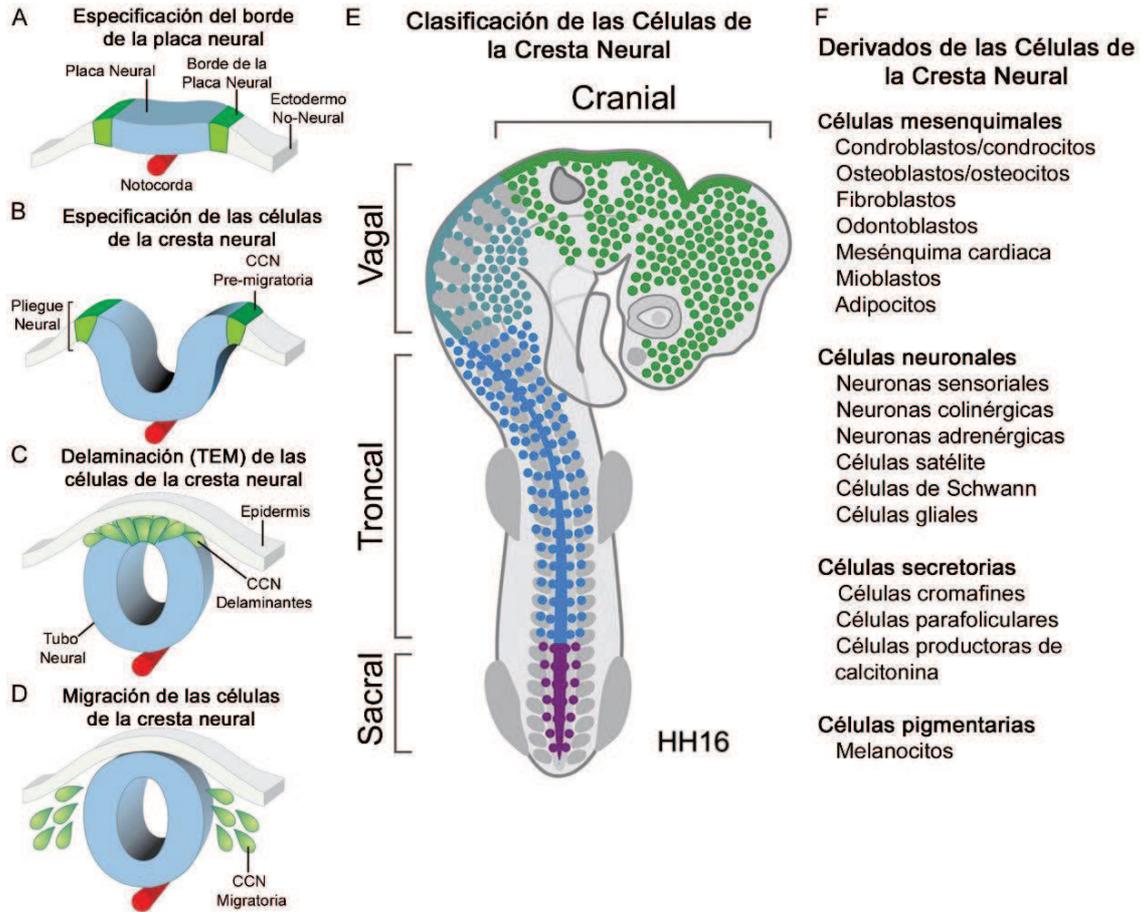


Figura 1: Desarrollo de las células de la cresta neural

Las células de la cresta neural (CCN) se forman por una serie de eventos muy bien descritos:

A) Inducción: Durante la gastrulación, vías de señalización coordinan la formación del borde de la placa neural entre los territorios que darán lugar a la formación de la placa neural y el ectodermo no neural. B) Especificación: Al inicio de la neurulación, momento en que los pliegues neurales se elevan, las CCN se especifican y toman el nombre de CCN pre-migratorias. C) Delaminación: Al finalizar el proceso de neurulación, las CCN que residen ahora en la parte más dorsal del tubo neural, empiezan a perder sus características epiteliales en un proceso conocido como transición epitelio-mesenquima (TEM), lo cual les permite adquirir características mesenquimales y migratorias. D) Migración: Las CCN migratorias, viajan largas distancias a lo largo de todo el embrión para llegar a diferentes sitios en donde se diferencian en una amplia gama de derivados. E) Clasificación de las CCN de acuerdo a su posición antero-posterior en el embrión F) Lista de derivados de las CCN identificados hasta el momento. Adaptado de Simoes-Costa & Bronner (2015).

3. 1. 1. Relevancia médica

La importante contribución de las CCN en el desarrollo embrionario hacen que cualquier defecto en el desarrollo normal de las mismas esté asociado a una gran variedad de patologías humanas conocidas como neurocristopatías (Vega-Lopez et al., 2018). Este grupo de enfermedades comprende un amplio espectro de malformaciones congénitas que afectan a muchos recién nacidos. Además, se ha descrito que la mayoría de este tipo de enfermedades están asociadas a defectos genéticos hereditarios. Sin embargo, en la actualidad, se conoce que factores ambientales también tiene una importante contribución en la incidencia de estos defectos (Sato et al., 2019). En particular, se ha descrito muy bien la influencia de teratógenos, tales como el alcohol, como principal causante de este tipo de enfermedades.

Entre las neurocristopatías más comunes se encuentran las diversas malformaciones craneofaciales tales como labio leporino y paladar hendido, desórdenes del espectro alcohólico fetal, enfermedad de Hirschsprung, síndrome de Charge, de Treacher Collins y de DiGeorge, entre otras. Sin embargo, también se incluyen como neurocristopatías a diversos tipos de cáncer tales como melanoma, neuroblastoma, carcinoma de células de Merkel y neoplasia endócrina múltiple (Bonnomet et al., 2010; Hall, 2008). Para destacar la importancia médica del estudio de las CCN, a continuación, se detallan algunas de las características de ciertas neurocristopatías:

-Trastornos del espectro alcohólico fetal: la exposición prenatal al alcohol causa lo que se denomina como el síndrome del espectro alcohólico fetal, el cual es un grupo de malformaciones y desórdenes que se encuentra entre los defectos de nacimiento más comunes (Kiecker, 2016). Se ha determinado que en este grupo de trastornos la migración de las CCN se encuentra gravemente afectadas (Baker and Stoler, 2020), como lo demuestran las evidentes anormalidades craneofaciales que los caracteriza. Concretamente, utilizando al pez cebra, se demostró que embriones expuestos a etanol presentan un menor número de CCN migratorias. Además, las pocas CCN que migran lo hacen de manera aberrante y por distancias menores, afectando la formación de estructuras craneofaciales (Smith et al., 2014). A pesar de este trabajo en pez cebra, y otros estudios realizados en pollo y rana (Eason et al., 2017; Shi et al., 2014; Zhang et al.,

2017), queda mucho por descubrir a nivel molecular y celular sobre cómo el etanol afecta el desarrollo de las CCN.

-Enfermedad de Hirschsprung: es un trastorno motor del intestino que se origina como consecuencia de un defecto en la migración de las CCN hacia el colon (Rogers, 2016). La enfermedad de Hirschsprung se manifiesta en 1 cada 5000 recién nacidos a nivel mundial y presenta su mayor incidencia en Europa (Tsai et al., 2011). Los defectos en la migración de las CCN hacia el intestino distal generan una falta de inervación neuronal y fallas en el peristaltismo, que puede conducir al agrandamiento del colon (megacolon), obstrucción de los intestinos o incluso un crecimiento infantil más lento relacionada a la poca absorción de alimentos. En un modelo de esta enfermedad utilizando embriones de ratón se determinó que, para que las CCN migren hacia el intestino y formen los ganglios entéricos, la vía de señalización tirosina quinasa es esencial. Por lo tanto, cuando esta vía de señalización se interrumpe, se produce aganglionosis o falta de estos ganglios entéricos (Zimmer and Puri, 2015). Por otro lado, en humanos, se ha determinado que la enfermedad de Hirschsprung es un trastorno netamente genético, a veces asociado con síndrome de Down, y que presenta herencia autosómica dominante. En este contexto, se han identificado al menos 11 genes cuyas mutaciones pueden provocar esta enfermedad (Coyle et al., 2015; Facer et al., 2001).

-Síndrome de Charge: es un síndrome con fenotipos bastante severos y que es causado por alteraciones genéticas en un gen remodelador de la cromatina: la proteína de unión al cromodominio de la ADN helicasa 7 (CHD7, chromodomain helicase DNA binding protein 7) (Pauli et al., 2017). Si bien este síndrome es poco frecuente, con una incidencia de 1 cada 15000 nacimientos, es una de las neurocristopatías más severas y mejor estudiadas. Se caracteriza por una combinación muy variable de anomalías congénitas, tales como coloboma (fisura en el iris del ojo), defectos cardíacos, malformaciones craneofaciales, aberturas patológicas en las fosas nasales, crecimiento y desarrollo retrasados, hipoplasia genital, anomalías del oído y sordera. Experimentos en rana y en células humanas reprogramadas para ser CCN, han establecido un papel fundamental de CHD7 en la migración de las CCN (Bajpai et al., 2010). Es así que se ha descrito que la proteína CHD7 se une a complejos reguladores de la cromatina

en potenciadores (enhancers) específicos que controlan la expresión de los FT-TEM (*Sox9*, *Snail2* y *Twist*). Es así que mutaciones en *CHD7* afecta la migración de las CCN y la diferenciación de la mayoría de sus derivados celulares.

-Síndrome de Treacher Collins: este síndrome abarca severas malformaciones craneofaciales causadas por mutaciones en el gen *TCOF1*, las cuales hacen que las CCN entren en apoptosis durante su desarrollo (Trainor, 2010). El gen *TCOF1* o Treacle está implicado en la transcripción del ADN ribosómico, y está activo durante el desarrollo embrionario temprano en los derivados de las CCN que se diferencian en huesos, cartílagos y músculos de la cara. Entre las principales características de este síndrome se encuentran la ausencia de pómulos, ausencia de pestañas, anomalías en el oído externo, paladar hendido, y malformaciones en la mandíbula (Aljerian and Gilardino, 2019). Si bien esta enfermedad tiene una incidencia de 1 de cada 50000 nacimientos, es interesante mencionar que la mayoría de estos bebés se encuentran en Estados Unidos. Con el objetivo de crear conciencia sobre esta enfermedad, en el año 2017, se estrenó una película llamada “extraordinario”, la cual relata el proceso de adaptación a la escuela primaria de un niño con esta neurocristopatía (Wonder, Lions Gate Entertainment).

-Síndrome de DiGeorge: es un síndrome con causas genéticas asociadas a deleciones o translocaciones de un pequeño segmento en el cromosoma humano 22, por lo que también se denomina como síndrome de deleción 22q11.2 (Sullivan, 2019). Se ha determinado que la región cromosómica 22q11.2 alberga aproximadamente 50 genes, la mayoría de los cuales son importantes para el desarrollo de las CCN. Entre estos se encuentran *CHD7* (mismo gen que da origen al síndrome de Treacher Collins), *TBX1* (T-box transcription factor 1, involucrado en la diferenciación de estructuras craneofaciales derivadas de las CCN) y *DGCR8* (gen importante durante la biogénesis de los microARNs). Sin embargo, por razones aún desconocidas, la aneuploidia en esta región afecta en su mayoría al desarrollo de las CCN cardíacas (Kochilas et al., 2002). En este contexto, los defectos más comunes asociados a esta enfermedad incluyen defectos cardíacos congénitos, defectos faciales como paladar hendido, bajos niveles de calcio en sangre y algunas discapacidades neurológicas y de aprendizaje.

Si bien las neurocristopatías son el resultado de problemas en la especificación, migración o diferenciación de las CCN; es importante destacar que la severidad de la neurocristopatía asociada se incrementa mientras más temprano en el desarrollo embrionario ocurre la falla, debido a que esto conlleva a defectos en múltiples derivados celulares (Vega-Lopez et al., 2018). Considerando lo dicho, y la extraordinaria variedad de neurocristopatías, es esencial entender los distintos mecanismos que regulan el desarrollo de las CCN como un prelude a la comprensión de sus orígenes, el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de las mismas.

3. 2. Transición epitelio-mesénquima (TEM)

De forma general, los principales procesos que las células epiteliales deben someterse para adquirir propiedades mesenquimales se pueden resumir de la siguiente manera (Nieto, 2013): 1- pérdida de unión célula-célula causada por un remplazo de cadherinas adherentes por otras poco adherentes; 2- pérdida de polaridad apico-basal; 3- cambios en la organización del citoesqueleto; 4- degradación de la membrana basal; 5- fluidez de la matriz extracelular; y 6- adquisición de propiedades migratorias e invasivas.

Durante el desarrollo embrionario temprano de vertebrados, muchas células se especifican con características epiteliales para luego desprenderse de ese epitelio y migrar a través del embrión, hasta los lugares de residencia final en donde se diferenciarán y/o proliferarán, dependiendo del tipo celular (Thiery et al., 2009). Recientemente se ha determinado que, durante el inicio de la metástasis tumoral, las células cancerosas reactivan la TEM siguiendo vías moleculares utilizadas normalmente durante el desarrollo embrionario temprano (Nieto et al., 2016). Lamentablemente, esta reactivación de programas embrionarios les da la capacidad a las células tumorales de promover la formación de metástasis y generar tumores secundarios.

A pesar de existir grandes similitudes entre la TEM ocurrida durante el desarrollo embrionario normal y la metástasis tumoral, también existen actores exclusivos. Es por este motivo que la TEM puede ser clasificada de tres formas distintas (Kalluri and Weinberg, 2009): tipo 1, se refiere a los procesos de TEM que ocurren de manera normal durante el desarrollo embrionario y que involucran migración de las células, ej., formación de las capas germinales (gastrulación) y durante la

migración de las CCN; tipo 2, denota la TEM relacionada con la curación de heridas, regeneración de tejidos y fibrosis; y el tipo 3 indica la TEM patológica característica de la metástasis tumoral.

Dentro de las principales diferencias de los tipos de TEM debemos considerar que tanto en la tipo 2 como en la 3, existe una alta respuesta inflamatoria en el contexto debido a que ocurre en el adulto (Kalluri and Weinberg, 2009). Por otro lado, la TEM tipo 2 se caracteriza por la aparición de miofibroblastos los cuales secretan un exceso de moléculas de matriz extracelular en respuesta a la inflamación. Además, la adquisición de características mesenquimales se considera el paso final de diferenciación en los procesos de curación de heridas o degeneración de los órganos. Es así que estas células nunca llegan a migrar, a diferencia de lo que se observa en otros tipos de TEM. En cuanto al tipo 1 y tipo 3, su principal diferencia radica en cómo se activa la TEM. Si bien en ambos casos se deben activar vías de señalización que involucran a TGF β /BMP, WNT y FGF (explicado en más detalle en la siguiente sección); en el caso de las CCN esta señalización está finamente controlada durante el desarrollo del borde de la placa neural. Mientras que en las células tumorales la activación patológica de estas vías de señalización son consecuencia de mutaciones hereditarias y/o agentes cancerígenos.

3. 2. 1. Transición epitelio-mesénquima en las células de la cresta neural y cáncer

Dentro de las características de las CCN que más llaman la atención son las similitudes en los cambios celulares y moleculares que experimentan durante el proceso de delaminación y migración comparado con una célula tumoral durante la metástasis (Fig. 2) (Theveneau and Mayor, 2012). En este contexto, algunos autores sugieren que los mecanismos moleculares que se activan durante la metástasis tumoral son una reminiscencia de las estrategias moleculares observadas durante el desarrollo del embrión (Mayor and Carmona-Fontaine, 2010; Nieto, 2013). Particularmente, las CCN se han convertido en un modelo *in vivo* para estudiar los mecanismos moleculares y celulares que podrían también estar implicados en el desarrollo tumoral (Kerosuo and Bronner-Fraser, 2012; Theveneau and Mayor, 2012).

Se ha descrito que, previo a la delaminación, tanto las CCN pre-migratorias como las células tumorales, muestran altos niveles de activación de las vías TGF β /BMP, WNT y FGF (Fig. 2A). Estas vías de señalización se caracterizan por inducir la expresión de un grupo de FT que dan inicio a la TEM y son altamente conservados en ambos tipos celulares (FT-TEM) (Fig. 2B). Estos FT, pertenecientes a las familias *Snail*, *Twist*, *Sox*, *Fox*, *Zeb* y *Ets*, se caracterizan por generar cambios en la expresión de ciertas cadherinas, y de esta forma disminuir la adhesión célula-célula y permitir que las CCN y las células tumorales delaminen (Fig. 2C). Consecuentemente, la dispersión celular inicia cuando se expresan diversas proteasas, tales como ADAM10, capaces de degradar cadherinas extracelulares. Además, son secretadas metaloproteasas (MMPs) que promueven la remodelación de la matriz extracelular y la eliminación de las proteínas de superficie tales como cadherinas y ocludinas (Fig. 2D). Una vez completados estos procesos, la migración se lleva a cabo usando estructuras preexistentes, tales como los nervios y los vasos sanguíneos para las células tumorales, o nervios y la membrana basal de los epitelios (como el ectodermo y los somitas, precursores de los músculos) para el caso de las CCN (Fig. 2E) (Theveneau and Mayor, 2012).

Como se describió en el párrafo anterior, las CCN y las células tumorales metastáticas muestran sorprendentes similitudes en términos de expresión génica y comportamiento celular (Kerosuo and Bronner-Fraser, 2012; Strobl-Mazzulla and Bronner, 2012a; Theveneau and Mayor, 2012). Sin embargo, es importante destacar que, de todos los niveles de similitud, los FT que dan inicio a la TEM (Fig. 2B) son los más conservados entre ambos procesos. Mientras que los efectores de estos FT, tales como cadherinas y proteasas, pueden variar dependiendo del tipo celular y de la especie en estudio (Nieto, 2013).

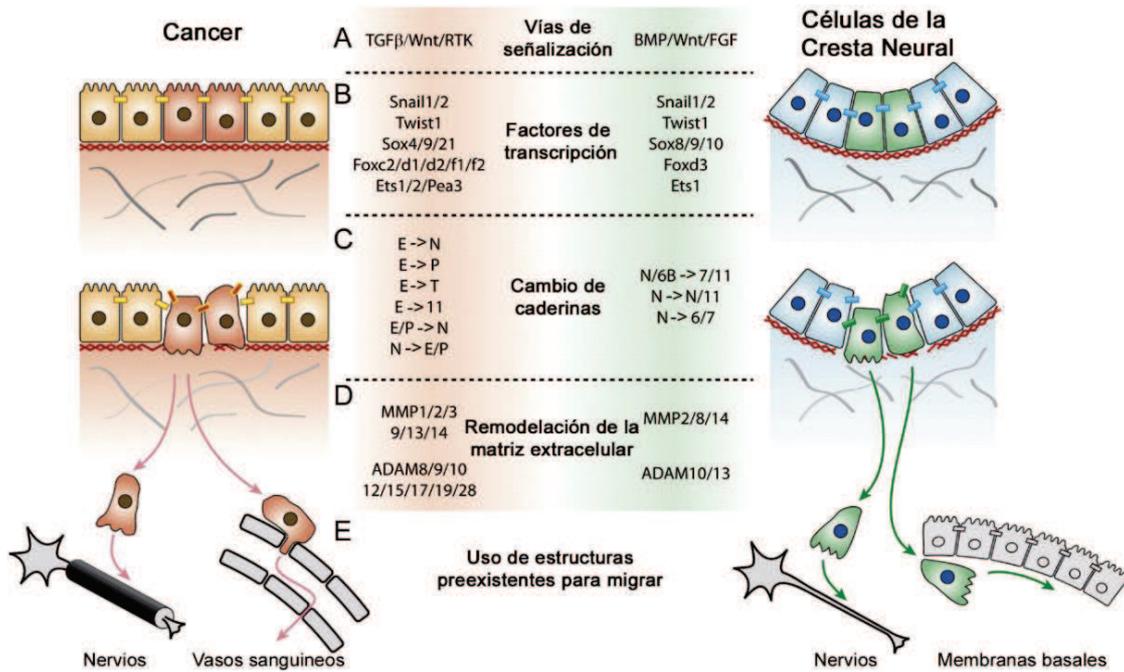


Figura 2: Transición epitelio-mesénquima durante el desarrollo del cáncer y de las células de la cresta neural

Para adquirir propiedades migratorias, las células de cáncer y las CCN exhiben similitudes sorprendentes: A) Inicialmente, vías de señalización del tipo TGF β /BMP, Wnt y FGF activan los factores de transcripción que dan inicio a la transición epitelio-mesénquima (TEM). B) Los factores de transcripción encargados de activar la TEM son altamente conservados entre ambos modelos y pertenecen a las familias del tipo *Snail*, *Twist*, *Sox*, *Fox* y *Ets*. C) La activación de los anteriores factores de transcripción genera un cambio de caderinas adherentes por caderinas poco adherentes, particularmente, en embriones de pollo existe un cambio entre la caderina 6b por la caderina 7, mientras que en la mayoría de tipos de cáncer existe un cambio entre la caderina E por la caderina N. D). Los factores de transcripción que inician la TEM también se encargan de expresar proteasas de las familias MMP y ADAM que remodelan la matriz extracelular. E) Finalmente, la migración se produce a través de las estructuras preexistentes. Adaptado de Theveneau & Mayor (2012).

3.2.2. Factores de transcripción promotores de la transición epitelio-mesénquima (FT-TEM)

Como se mencionó en la sección anterior, pese a las diferencias específicas de cada tipo de TEM, las características generales de este proceso son producto de señales extracelulares que generan la activación de un grupo de FT promotores de la TEM (FT-TEM) pertenecientes a las familias *Snail*, *Twist*, *Sox*, *Fox*, *Zeb*, y *Ets* (Ansieau et al., 2014; Matysiak et al., 2017). De forma general, estos FT-TEM tienen como función principal la de reprimir las características epiteliales, principalmente inhibir la expresión de cadherinas adherentes y promover la expresión de cadherinas poco adherentes. Además, son requeridos para promover la adquisición de características mesenquimales, incluyendo modificaciones en las proteínas del citoesqueleto necesarias para aumentar su

motilidad, capacidad de degradar la membrana basal y la matriz extracelular, aumento de la proliferación y protección de la activación de la muerte celular programada (Nieto et al., 2016).

Estudios realizados en cultivos celulares han demostrado que la sobreexpresión individual de estos FT-TEM produce un fenotipo de migración específico. En el caso de la sobreexpresión de la familia *Snail*, se produce un fenotipo de migración caracterizado por ausencia total de contacto entre las células, debido a la inhibición de la expresión y degradación de ciertas cadherinas. A esta se la conoce como TEM completa y resulta en una migración adireccional debido a la falta de estímulos externos. Por otra parte, la sobreexpresión de *Twist*, genera una TEM parcial como consecuencia de que las células no eliminan totalmente las cadherinas epiteliales en la membrana plasmática. Esto hace que las mismas mantengan contacto parcial y genera una migración colectiva (Wang et al., 2016b). En este contexto, el análisis de las redes de regulación génica (Gene Regulatory Network) en cáncer y durante el desarrollo de las CCN han demostrado que, durante la inducción de la TEM, la expresión de los FT de la familia SNAIL preceden a la expresión de los otros factores (Martik and Bronner, 2017; Skrypek et al., 2017). Estos resultados demuestran la jerarquía principal que tiene la familia SNAIL en la activación inicial del fenotipo mesenquimal, sin embargo, esta familia no sería la encargada de que las células puedan migrar e invadir otros tejidos. Además, es importante destacar que más allá de existir esta jerarquía, frente a alguna falla en la expresión inicial de las proteínas de la familia SNAIL, otros FT aguas abajo pueden mantener la robustez y asegurar la implementación del programa; aunque generalmente ocurre a través de una TEM parcial (Peinado et al., 2007). Estos estudios de análisis de las redes de regulación génica comparando entre el desarrollo del cáncer y el de las CCN son muy importante para entender las fallas en la delaminación y migración de las CCN que pueden estar sucediendo durante las diversas neurocristopatías, así como lo que sucede durante el inicio de la metástasis tumoral.

- Factores de transcripción de la familia SNAIL:

Como se mencionó anteriormente, los FT de la familia SNAIL son reguladores esenciales para dar inicio a la TEM, los cuales han sido involucrados en procesos tan importantes como la gastrulación, migración de las CCN y la metástasis tumoral (Molina-Ortiz et al., 2012). Estos factores se caracterizan por tener en su extremo C-terminal, dominios dedos de zinc capaces de interactuar con secuencias de ADN denominadas cajas-E (5'-CACCTG-3' o 5'-CAGGTG-3') (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005). Además, presentan un dominio SNAG presente también en otros FT asociados a funciones de represión génica. En la región central contienen un dominio rico en serina (SRD), involucrado en su estabilidad, y una secuencia de exportación nuclear (NES) (Fig. 3). En estos dominios centrales, se ha descrito la interacción de la proteína CRM1 al sitio NES para translocarlas al citoplasma, lugar en donde las proteínas β -TrCP1 y FBXL14 son capaces de unirse al dominio SRD (Dominguez et al., 2003). Dependiendo del grado de fosforilación de las mismas, estas son capaces de promover la ubiquitinización y subsecuente degradación de las proteínas SNAIL.

En vertebrados, la familia SNAIL está compuesta por tres miembros: SNAIL (SNAIL1), SLUG (SNAIL2) y SMUC (SNAIL3) (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009). Entre las características particulares de cada miembro se encuentra que, tanto SNAIL2 como SNAIL3 presentan 5 dedos de zinc, mientras que SNAIL1 presenta 4 (de Herreros et al., 2010). Por otro lado, solo la proteína SNAIL2 presenta el dominio Slug, que consiste en una secuencia de 29 aminoácidos altamente conservada en vertebrados y de función desconocida (Nieto, 2018).

Respecto a las funciones de cada miembro de la familia, tanto SNAIL1 como SNAIL2 parecerían tener una redundancia funcional, debido a que son capaces de unirse a los mismos promotores (Nieto, 2018). Ambas participan como iniciadoras de la TEM al reprimir transcripcionalmente la expresión de ciertos tipos de cadherinas adherentes y así disminuir el contacto célula-célula. En cáncer, SNAIL1-2 inhibe la expresión de la cadherinas E (Cad-E) (Lin et al., 2010) mientras que en las CCN, SNAIL2 inhibe la expresión de la cadherinas 6b (Cad6b) (Taneyhill et al., 2007). Por otro lado, si bien SNAIL3 tiene la capacidad de unirse a las cajas-E (Kataoka et al., 2000), su eliminación en ratones no es esencial ni genera ningún fenotipo aparente (Bradley et al., 2013). Sin embargo,

recientemente se ha demostrado la expresión de SNAIL3 durante el desarrollo embrionario temprano y el desarrollo de los ovarios, y se plantea que pueda tener alguna función durante la foliculogénesis, luteinización y gastrulación (Guo et al., 2018).

Es importante destacar, que el dominio SNAG es altamente conservado en todos los animales y ha sido involucrado en mecanismos de regulación epigenética formando complejos de represión con deacetilasas de histonas (HDAC) y miembros del grupo Polycomb 2 (PRC2) (Fig. 3) (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009; de Herreros et al., 2010). También se demostró que la interacción de SNAIL con estos modificadores epigenéticos no es directa, y se requiere de proteínas intermediarias, tal como es el caso de SIN3A y AJUBA, respectivamente (Langer et al., 2008; Peinado et al., 2004). Estos resultados, y de manera similar a los estudios realizados por nuestro grupo en las CCN (ver más adelante), pusieron en evidencia una importante conexión entre la regulación epigenética de la TEM en combinación con el nivel de regulación de la transcripción guiada por los FT-TEM.

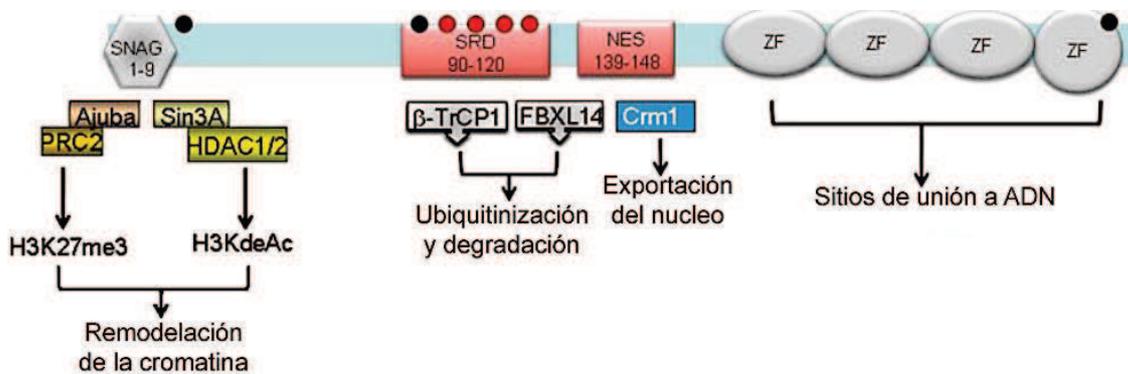


Figura 3: Estructura general de los factores de transcripción de la familia SNAIL

La figura muestra un diagrama que representa los diferentes dominios de la familia SNAIL, las proteínas que interactúan con estos dominios y las funciones asociadas. De forma general, en el extremo N-terminal presenta un dominio SNAG (aa 1-9) asociado a funciones de represión de la expresión génica, mientras que en el C-terminal se encuentran los dominios de unión a ADN dedos de zinc (ZF, zinc finger). SRD, dominio esteroil reductasa (aa 90-120) rico en serinas involucrado en la regulación de la estabilidad de la proteína. NES, dominio de exporte nuclear (aa 139-148). Los sitios de fosforilación son indicado como puntos (negros, fosforilaciones activadoras; y rojos, fosforilaciones inhibitoras). PRC2 (Grupo de proteínas polycomb), HDAC1/2 (desacetilasa de histonas), CRM1 (Chromosomal Maintenance 1, más conocida como exportina 1), β -TrCP1 (Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein ligase, proteína ubiquitina ligasa), FBXL14 (F-box/LRR-repeat protein 14, proteína ubiquitina ligasa). Adaptado de De Herreros y colaboradores (2010).

3. 3. Regulación epigenética de la transición epitelio-mesénquima

3. 3. 1. Generalidades de las regulaciones epigenéticas

En 1942, Waddington acuñó el término "Epigenética" (del griego *epi*: en o sobre, -genética) para explicar las complejas y dinámicas interacciones entre el entorno ambiental en el que ocurre el desarrollo embrionario y el genoma de los mismo, y que conducen a la producción del fenotipo del adulto (Waddington, 1942). Actualmente, la epigenética se define como una rama de la Biología que estudia la influencia del ambiente sobre la regulación heredable de patrones de expresión génica, que no son consecuencia de alteraciones en la secuencia primaria del ADN (Cavalli and Heard, 2019).

Entre los mecanismos epigenéticos más estudiados se incluyen a las modificaciones post-traduccionales de las histonas, los modificadores de la cromatina, las variantes de histonas, los ARN no codificantes (ncARNs) y la metilación del ADN (Chen et al., 2017). Dependiendo del tipo de modificación epigenética, el resultado puede conducir a la activación o represión génica mediante la compactación o relajación de la cromatina, respectivamente. Esto hará que FT puedan o no acceder a sus sitios de unión específicos o afectar la maquinaria transcripcional para finalmente regular la expresión de los genes (Allis and Jenuwein, 2016). Es importante destacar que todas las modificaciones epigenéticas conocidas son dinámicas y reversibles, y establecen un código epigenético donde existen "escritores", "borradores" y "lectores" involucrados en coordinar el establecimiento de programas de expresión génica, y, por lo tanto, controlan las identidades celulares (Biswas and Rao, 2018).

Dentro de las principales y más estudiadas regulaciones epigenéticas se encuentran las modificaciones de las histonas (modificaciones post-traduccionales) y la metilación del ADN.

- Modificaciones de las histonas:

Dentro del núcleo, el ADN se encuentra empaquetado en nucleosomas (Brahma and Henikoff, 2020). Cada nucleosoma abarca aproximadamente 147pb de ADN envuelto alrededor de un octámero formado por las histonas 3 y 4 (H3-H4) y dos dímeros de la histona 2 (H2A-H2B). Si bien los nucleosomas protegen y compactan al ADN, existe una gran dinamismo en el grado de compactación en diferentes regiones del genoma (Orlandi and McKnight, 2020). Esta dinámica en el empaquetamiento del ADN en el nucleosoma existe principalmente para controlar la expresión de genes específicos y se logra gracias a cambios post-traduccionales en las regiones N- y C-terminal de dichas histonas.

Como toda regulación epigenética, las modificaciones post-traduccionales de las histonas son dinámicas, existiendo proteínas denominadas “escritoras”, encargadas de modificar los residuos en aminoácidos específicos, y existen también proteínas denominadas “borradoras”, encargadas de eliminar las modificaciones. De esta forma se establece un “código de histonas” (Tabla 1) (Prakash and Fournier, 2018), el cual es interpretado por proteínas “lectoras” que se encargan de reclutar complejos capaces de modificar la estructura de la cromatina y regular la expresión génica (Biswas and Rao, 2018).

Dentro de los principales tipos de proteínas que se encargan de la dinámica del código de histonas se encuentran (Prakash and Fournier, 2018):

- Las acetiltransferasas de histonas (HAT; “Histone acetyltransferase”), encargadas de adicionar grupos acetilo; mientras que las deacetilasas de histonas (HDAC; “Histone deacetylase”) se encargan de remover dichos grupos.
- Las metiltransferasas de histonas (HMT; “Histone methyltransferase”), que se encargan de agregar grupos metilo y las demetilasas que se encargan de eliminarlos.
- Las quinasas y fosfatasas encargadas de adicionar o remover grupos fosfato, respectivamente.
- La ubiquitina, encargada de la ubiquitinación, y el complejo Ubp2 (deubiquitinasa), para la remoción de esta marca.

De estas modificaciones, la acetilación y la metilación son las más estudiadas (Yen et al., 2016). De manera general, la acetilación ocurre sobre las lisinas de la histona 3 y está relacionada con el desempaquetamiento de los nucleosomas y por consiguiente se la asocia con una alta actividad transcripcional. Por otro lado, la metilación ocurre en argininas y lisinas, y su relación con la transcripción depende del grado de metilación y del aminoácido involucrado (Tabla 1) (Biswas and Rao, 2018). Es importante mencionar que existe una relación secuencial entre algunas modificaciones de las histonas, por ejemplo, se ha descrito que la ubiquitinación puede preceder a la metilación de determinadas lisinas (Sun and Allis, 2002). Mientras que durante el inicio de la mitosis, la fosforilación en las histonas 2A, 3 y 4, se lleva a cabo después de la metilación de las histonas 3 lisina 9 (K9) (Fischle et al., 2005).

Una vez establecido un código de histonas en el contexto genómico del gen a regular o para iniciar algún proceso importante como la mitosis, las proteínas “lectoras” se encargaran de interpretar este código (Zhao et al., 2019). Entre las principales proteínas lectoras se encuentran las que contienen dominios Chromo, MBT, PHD (inglés “plant homeodomain”) y Tudor capaces de reconocen metilaciones. Mientras que las que contienen bromodominios reconocen las acetilaciones (Biswas and Rao, 2018). Generalmente, las proteínas lectoras del código de histonas reconocen modificaciones específicas y facilitan la unión de otros complejos, los cuales van a coordinar la expresión o el silenciamiento de los genes a los que están regulando (Balasubramani, 2017). Específicamente, se ha descrito que tanto las HAT como las HDAC forman complejos con proteínas lectoras del tipo PHD para cumplir roles en la transcripción y el remodelamiento de la cromatina.

Tabla 1: Código de histonas

Descripción del código de histonas con su respectivo efecto en la transcripción. K: lisina; R: arginina; S: serina; T: treonina. Adaptado de Prakash y colaboradores (2018).

Modificación	Histona	Residuo	Efecto en la transcripción
Acetilación	H2A	K5	Activación
	H2B	K5, K12, K15, K20	Activación
	H3	K4, K14, K18, K23, K27	Activación
		K9	Deposición de histonas
	H4	K5, K12	Deposición de histonas
K8, K16		Activación	
Metilación	H3	K4, K79	Eucromatina
		K9, K27	Silenciamiento
		R17	Activación
		K36	Elongación
	H4	R3	Activación
		K20	Silenciamiento
Fosforilación	H2A	S1, T119	Mitosis
	H3	T3, S10, T11, S28	Mitosis
	H4	S1, T119	Mitosis
Ubiquitinación	H2A	K119	Silenciamiento
	H2B	K120	Activación

- Metilación de las citosinas:

La metilación del ADN en las citosinas (5mC) forma parte de un ciclo dinámico reversible según: establecimiento (metilación de ADN *de novo*), mantenimiento y demetilación (Fig. 4A) (Leoni et al., 2015; Cavalli and Heard, 2019). Inicialmente, durante el desarrollo embrionario de vertebrados, la mayoría de las citosinas se encuentran sin metilar. Luego dos ADN metiltransferasas, DNMT3A y DNMT3B, son las principales enzimas encargadas de establecer la metilación del ADN *de novo* (Okano et al., 1999). Estas enzimas se encargan de restringir los linajes celulares durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario. Si bien la metilación del ADN *de novo* puede ocurrir en cualquier citosina, solo la metilación de los nucleótidos CpGs se mantiene tras la replicación del ADN. Este mantenimiento de la metilación luego de la división mitótica es llevado a cabo por la actividad de la enzima DNMT1 (Jeltsch et al., 2019). Como toda modificación epigenética, la metilación de ADN también es un proceso reversible, en donde las citosinas metiladas pueden entrar en un ciclo de demetilación activa la cual es llevada a cabo por las proteínas TET1, 2 o 3

(TET=ten-eleven translocation) (Greenberg and Bourc'his, 2019). Estas se encargan de oxidar progresivamente la 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). Es importante destacar que todas las formas oxidadas pueden promover la demetilación del ADN por dilución pasiva durante la replicación o bien por escisión directa de la citosina modificada (Fig. 4A).

Una vez establecida la metilación de las citosinas, estas pueden ser reconocidas por proteínas de unión a ADN metilado (MBD=Methyl-CpG Binding Domain), las cuales son capaces de reclutar complejos proteicos tales como HMT o HDAC, capaces de modificar la cromatina y alterar la expresión génica (Fig. 4A) (Leoni et al., 2015). De forma general, la metilación de las citosinas ocurre en transposones o las regiones regulatorias de genes y ha sido involucrada con la represión transcripcional de los genes blanco (Fig. 4B). Sin embargo, se ha identificado recientemente metilación de citosinas en los cuerpos de genes transcripcionalmente activos, en donde es capaz de influir en el splicing alternativo de los mismos (Guerrero-Bosagna, 2020).

Diversos estudios han demostrado que los mecanismos epigenéticos, tales como las modificaciones de las histonas y la metilación del ADN, forman un nuevo nivel de regulación de la TEM. En las siguientes secciones describiremos el conocimiento actual de estas regulaciones tanto en el contexto de la TEM de las CCN como también en la metástasis tumoral.

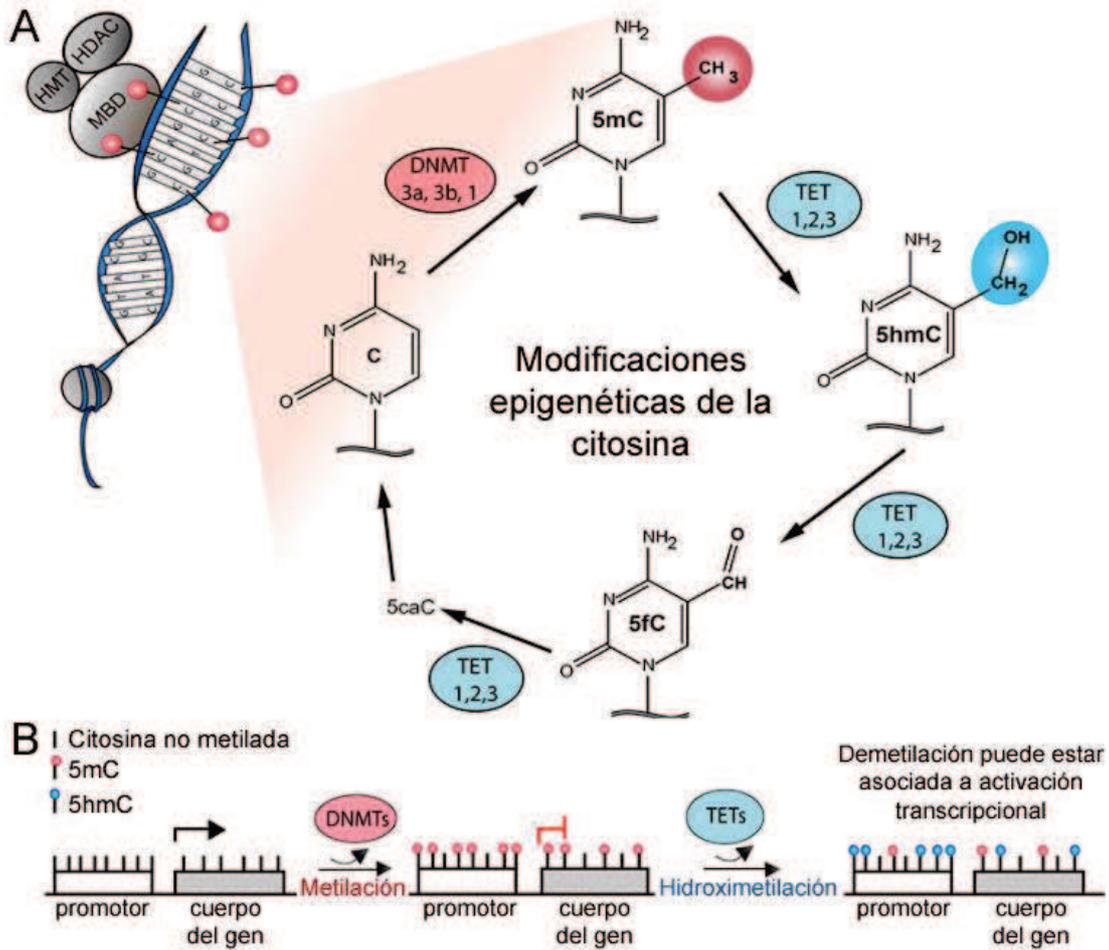


Figura 4: Ciclo dinámico de metilación- demetilación de la citosina

Las modificaciones dinámicas de la citosina son marcas epigenéticas muy importantes con consecuencias funcionales en la expresión génica. A) El ciclo inicia cuando las enzimas DNMT metilan la citosina para dar lugar a 5mC. Por otro lado, esta 5mC puede entrar a un ciclo de demetilación activa, esto ocurre cuando las enzimas TET oxidan esta base y generan 5hmC, 5fC y 5caC, para finalmente obtener la citosina no metilada y acabar con el ciclo. El ADN metilado puede ser reconocido por las proteínas MBD que puede reclutar complejos modificadores de histonas (HMT y HDAC). B) La metilación del ADN se puede producir en regiones reguladoras (como los promotores) pero también en los cuerpos de los genes. Las enzimas DNMT son responsables de la generación de 5mC, que a menudo sucede en el promotor y que resulta en la represión transcripcional del gen involucrado. Consecuentemente, la actividad de las proteínas TET puede conducir a la demetilación de estas regiones, las mismas que tienen un potencial de activación transcripcional. 5caC=5-carboxilcitosina; 5fC=5-formilcitosina; 5hmC=5-hidroximetilcitosina; 5mC=5-metilcitosina; DNMT=ADN metiltransferasa; HDAC=histona deacetilasa; HMT=histona metiltransferasa; MBD=Proteínas de unión a DNA metilado y cáncer familia MBD (Methyl-CpG Binding Domain); TET=ten-eleven translocation. Adaptado de Leoni y colaboradores (2015).

3.3.2. Regulación epigenética de la transición epitelio-mesénquima en las células de la cresta neural

Si bien se ha estudiado de manera bastante exhaustiva el rol de los principales FT involucrados en el desarrollo de las CCN (Martik and Bronner, 2017; Simoes-Costa and Bronner, 2015; Williams et al., 2019), muy poco se conocía respecto de los aspectos epigenéticos involucrados. En este contexto, en los últimos años, varias investigaciones han mostrado que las regulaciones epigenéticas cumplen un papel clave durante los diversos estadios de desarrollo de las CCN (Duband et al., 2015; Hu et al., 2014a). Particularmente, nuestro grupo estuvo involucrado en los primeros trabajos que demostraron la importancia de las regulaciones epigenéticas, tales como las modificaciones de histonas (Strobl-Mazzulla and Bronner, 2012b; Strobl-Mazzulla et al., 2010), y la metilación del ADN (Hu et al., 2012; Hu et al., 2014b) durante el desarrollo de las CCN utilizando como modelo de estudio embriones de pollo. Tomando en cuenta lo dicho, en esta sección nos enfocamos en describir los resultados relacionados con la regulación epigenética de la delaminación y migración de las CCN.

Como se mencionó anteriormente, la metilación del ADN es una de las modificaciones epigenéticas más importantes, y que, de forma general, produce la represión transcripcional (Greenberg and Bourc'his, 2019). Se describió que tanto la ADN metiltransferasa *de novo* A (DNMT3A) como la B (DNMT3B) tienen funciones claves durante el desarrollo de las CCN en pollo (Hu et al., 2012; Hu et al., 2014b) y en ratón (Jacques-Fricke et al., 2012). Específicamente, durante el desarrollo embrionario de pollo la *Dnmt3a* se expresa en las CCN pre-migratorias y migratorias (Hu et al., 2012). La pérdida de función de la DNMT3A causa una expansión del territorio neural, hacia el borde del tubo neural, afectando la especificación de las CCN. Esto ocurre como consecuencia de la falta de represión del gen *Sox2*, mediada por metilación del ADN en regiones regulatorias del mismo. De manera similar, nuestro grupo describió cómo la deficiencia folato, y por ende la deficiencia de S-adenosil metionina (molécula donadora universal de grupos metilo), afecta la correcta metilación y represión de *Sox2* en el territorio de las CCN (Alata Jimenez et al., 2018). La pérdida de folato fenocopia la expansión del territorio neural a expensas de las CCN, de manera similar a lo observado ante la pérdida de función de la *Dnmt3a*.

Respecto a la función de la *Dnmt3b*, es importante destacar que tanto en pollo como en ratón, su expresión es mayoritaria en las CCN pre-migratorias y migratorias (Hu et al., 2014b; Jacques-Fricke et al., 2012). En este trabajo pudimos demostrar que la pérdida de función de la *Dnmt3b* mantiene la expresión de FT-TEM, tales como *Snail2* y *Sox9*, luego de la finalización normal de la delaminación de las CCN (Hu et al., 2014b). Esto ocurre como consecuencia de una falta de represión transcripcional de *Sox10*, mediado por metilación de su región promotora, extendiendo así el tiempo en el que continúan delaminando las CCN del tubo neural.

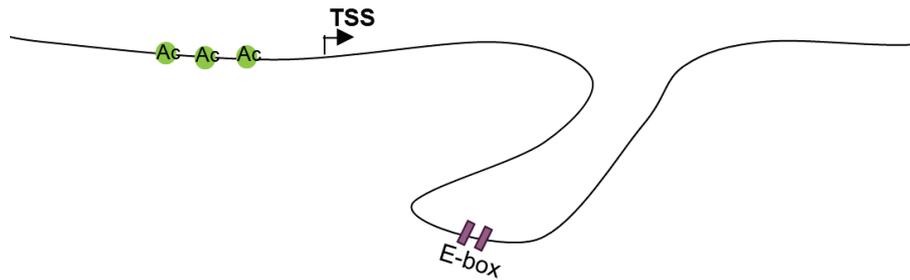
Hasta el momento, no se ha determinado cómo la metilación del ADN afecta específicamente la TEM de las CCN; sin embargo, se ha descrito que las modificaciones de las histonas juegan un papel fundamental durante dicho proceso (Hu et al., 2014a). En este contexto, una de las investigaciones más interesantes comparó el desarrollo *in vitro* de las CCN humanas contra un modelo *in vivo* utilizando la rana *Xenopus* (Bajpai et al., 2010). En esta investigación se demostró que la proteína remodeladora de la cromatina CHD7 (chromodomain helicase DNA-binding domain 7), cumple un papel fundamental en la regulación de la expresión de los FT-TEM. Bajpai y colaboradores describieron que CHD7 se expresa específicamente en las CCN pre-migratorias, donde su principal función es unirse a los potenciadores (enhancers) de *Snail2*, *Sox9* y *Twist1* y promover su expresión. Además, describieron que CHD7 es dirigida hacia estos potenciadores por el complejo PBAF (polybromo- and BRG1-associated factor-containing complex), el cual reconoce la marca activadora H3K4me. Es importante destacar que, como se mencionó anteriormente, cualquier mutación en CHD7 genera la neurocristopatía denominada síndrome de CHARGE.

Otro ejemplo claro de que la metilación de las histonas juega un papel fundamental durante el desarrollo de las CCN fue descrito por nuestro grupo (Strobl-Mazzulla et al., 2010). En esta investigación se describió que la demetilasa de histonas, JumonjiD2A (*Jmjd2A/KDM4A*), es fundamental para la especificación y migración de las CCN. La pérdida de la expresión de *Jmjd2A* causa la inhibición de genes muy importantes durante el desarrollo de las CCN tales como *Snail2*, *FoxD3* y *Sox10*. Esto ocurre como consecuencia de que se

demonstró que en los promotores de *Sox10* y *Snail2* se encuentran enriquecidos con la marca represiva H3K9me3. En el momento en que estos genes tienen que ser activados para que las CCN se especifiquen y migren, JMJD2A se une a sus regiones promotoras para demetilar dichas marcas represivas.

Las investigaciones anteriores pusieron en evidencia que la metilación de las histonas y el ADN juegan un rol importante en la delaminación y migración de las CCN. Adicionalmente, los estudios realizados por nuestro grupo demostraron que la acetilación de histonas tiene una gran influencia en la regulación de genes importantes en la TEM de las CCN (Strobl-Mazzulla and Bronner, 2012b). Como se mencionó en secciones anteriores, es sabido que las CCN pre-migratorias presentan altos niveles de expresión de la cadherina 6B (*Cad6B*), necesario para mantener el estado epitelial de las mismas (Taneyhill et al., 2007). Además, Taneyhill y colaboradores describieron que, previo a la migración de las CCN, SNAIL2 es capaz de unirse a sitios regulatorios (E-box) presentes en el locus de la *Cad6b* para reprimir su expresión y de esta forma dar inicio a la TEM. Sin embargo, se desconocían cuáles eran los mecanismos implicados por los cuales SNAIL2 era capaz de reprimir a la *Cad6b*. En este sentido, nuestro grupo de investigación demostró el requerimiento de SNAIL2, capaz de interactuar con los sitios E-box, y PHD12, capaz de reconocer marcas epigenéticas activadoras, para formar un puente molecular capaz de reclutar al complejo Sin3A/HDAC (Strobl-Mazzulla and Bronner, 2012b). Este complejo finalmente llevará a la deacetilación de las lisinas en la H3 localizadas en las regiones promotoras de la *Cad6b*, lo cual conlleva a la represión transcripcional de esta cadherina para dar inicio a la TEM de las CCN (Fig. 5). Así, la doble coordinación entre lectores de la cromatina y lectores del ADN dan la especificidad temporo-espacial necesarias para regular cooperativamente el inicio de la TEM de las CCN.

Gen de la Cad6b activado



Gen de la Cad6b reprimido

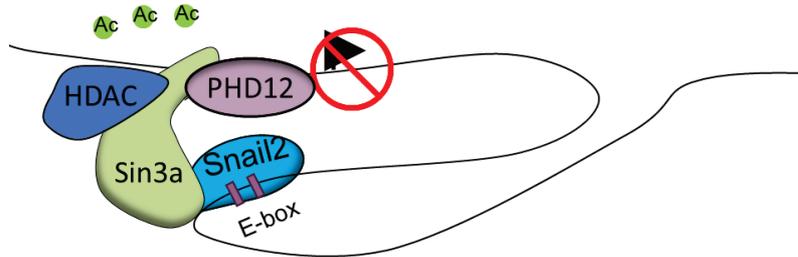


Figura 5: Modelo esquemático de la represión transcripcional de la *Cad6b* en las células de la cresta neural pre-migratorias para dar inicio a la TEM

Durante el desarrollo de las CCN, inicialmente, en estadios pre-migratorios, el gen de la *Cad6b* se encuentra activado por la presencia de altos niveles de H3Kac (Ac) en su promotor. Al momento de la delaminación, las proteínas PHD12 (plant homeodomain 12) y SNAIL2 son capaces de reclutar el complejo Sin3A/HDAC para deacetilar las lisinas presentes en la histona H3 y de esta forma inhibir su expresión para dar inicio a la delaminación. TSS, sitio de inicio de la transcripción. Adaptado de Strobl-Mazzulla & Bronner (2012b).

3. 3. 3.Regulación epigenética de la transición epitelio-mesénquima en cáncer

Diversas investigaciones han determinado que las modificaciones epigenéticas tales como las modificaciones de las histonas y la metilación del ADN, juegan un papel clave durante el desarrollo del cáncer (Biswas and Rao, 2018; Dongre and Weinberg, 2019; Lu and Kang, 2019). En este contexto, las regulaciones epigenéticas son claves para regular la TEM y, de forma general, son importantes para mediar las funciones de los FT-TEM. Es importante destacar que el origen del cáncer depende del tipo celular, de los mutágenos o factores hereditarios propios del contexto celular y del genoma del individuo. Sin embargo, todos los factores externos coinciden en la activación de un mismo grupo de FT que inician la TEM (Lu and Kang, 2019).

Actualmente existen diferentes modelos para estudiar el desarrollo del cáncer, donde se sobreexpresan o activan vías de señalización que finalmente activarán algunos o todos los FT-TEM. Uno de los modelos más usados es el estudio *in vitro* de metástasis causado por la sobreexpresión de la vía de señalización TGF- β (Zhang et al., 2014). Durante la TEM inducida por el incremento de TGF- β en células epiteliales, de forma general, la marca de heterocromatina H3K9me se reduce, mientras que las marcas de eucromatina asociada con una mayor transcripción, H3K4me y H3K36me, se incrementan (McDonald et al., 2011). Estos cambios parecen ser cruciales para la migración celular y la quimioresistencia, y dependen en gran medida de la demetilasa específica de lisinas 1 (LSD1). Además, se ha determinado que LSD1 interactúa con SNAI1 para suprimir la expresión de la *CadE* y de esta forma iniciar la TEM en varios tipos de cáncer (Ferrari-Amorotti et al., 2013; Lin et al., 2010). Otras demetilosas de histonas como KDM6B (Ge et al., 2019; Tokunaga et al., 2016) y PHF8 (Li et al., 2017; Liu et al., 2020), así como también las metiltransferasas PRMT5 (Chiang and Davies, 2018; Ge et al., 2020; Stopa et al., 2015), EZH2/SUZ12 (Benard et al., 2014; Lee et al., 2015; Liu et al., 2015), SUV39H1 (Dong et al., 2013; Rodrigues et al., 2019) y G9a (Casciello et al., 2015; Dong et al., 2012), regulan la expresión de los FT-TEM, o bien interactúan con ellos, para promover el fenotipo mesenquimal de las células tumorales.

Además de la metilación de las histonas, la acetilación también juega un rol importante en la modulación de la TEM (Lu and Kang, 2019). Similar a lo que describimos en las CCN pre-migratorias, se ha demostrado que tanto Pf1 (PHD Zinc Finger Protein) como SNAIL son capaces de interactuar con el complejo HDAC/SIN3A en células tumorales (Gong et al., 2005; Patnaik et al., 2018; Yochum and Ayer, 2001). Esta interacción es requerida para deacetilar las histonas en el promotor de la *CadE* y reprimir su expresión (Peinado et al., 2004). De manera similar, el FT-TEM ZEB1, también ha sido involucrado en la regulación epigenética de la *CadE* (Byles et al., 2012). Específicamente, se ha descrito que ZEB1 coopera con la deacetilasa de histonas sirtuina 1 (SIRT1) en el promotor de la *CadE* para reducir la abundancia de H3Kac y por consiguiente la unión de la ARN polimerasa II. En conjunto, la acción de los miembros de la familia SNAIL con ZEB aseguran la implementación de la TEM en cáncer y un incremento en la metástasis tumoral (Wang and Shang, 2013).

Respecto a la metilación del ADN, es muy interesante destacar que en las células tumorales existe una hipometilación global del genoma. Sin embargo, solo en regiones específicas denominadas islas CpGs se ha observado una hipermetilación (Ehrlich, 2002; Kiesslich et al., 2013). En este contexto, varios autores afirmaron que la mayoría de los genes cuyo contexto genómico se encuentra en islas CpG, han sido involucrado con el fenotipo epitelial (Greenberg and Bourc'his, 2019). Un ejemplo claro de lo mencionado anteriormente es la hipermetilación del promotor de la *CadE*, el mismo que se encuentra inmerso en una isla CpG, y es un paso clave para el inicio de la TEM en diversos tipos de cánceres humanos (Sun et al., 2019; Tamura et al., 2000). Es importante mencionar que la metilación del ADN no está desligada de otras modificaciones que ocurren en las histonas y de los FT-TEM, sino que existe una clara interconexión entre todos estos actores implicados en la metástasis tumoral (Lu and Kang, 2019). Por ejemplo, se ha demostrado que ZEB1, un importante FT-TEM, es capaz de reclutar no solo a modificadores de histonas sino también a la DNMT1 hacia la región promotora de la *CadE* para reprimir su expresión (Chen et al., 2003; Fukagawa et al., 2015).

Cabe mencionar que en el adulto, una activación patológica de la TEM conlleva a fenotipos muy perjudiciales, tales como fibrosis y cáncer (Nieto et al., 2016), y se hipotetiza que debe existir varios niveles de regulación que aseguren la homeostasis epitelial. En este contexto, la mayoría de las investigaciones han estado enfocadas a entender los mecanismos genéticos, transcripcionales y epigenéticos que inician y mantienen la TEM en cáncer (Dongre and Weinberg, 2019; Lu and Kang, 2019). Es así que se propone que uno de los niveles de regulación más importante durante el desarrollo del cáncer se debe a las modificaciones epigenéticas que afectan la expresión de microARNs supresores de tumores durante el inicio de la TEM (Morales et al., 2017; Shukla et al., 2020).

3. 4. Regulación epigenética-microARNs durante la transición epitelio-mesénquima

3. 4. 1. Biogénesis y función de los microARNs

Los microARNs pertenecen al grupo de los ARNs pequeños no codificantes (19-25 nucleótidos) capaces de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional al unirse a sitios específicos en el extremo 3'UTR de sus ARNm blanco (Ambros, 2001; O'Brien et al., 2018). La expresión de muchos microARNs se encuentra estrictamente regulada a nivel tejido y tipo celular específico, donde juegan papeles importantes durante el desarrollo, la diferenciación, la proliferación y la muerte celular (Alvarez-Garcia and Miska, 2005; Kloosterman and Plasterk, 2006). En animales, la biogénesis de microARNs comienza con la transcripción de su gen por la ARN polimerasa II o III para formar lo que se denomina pri-microARN. Luego este es clivado por la ARNasa DROSHA, junto con la proteína DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), para generar un precursor de aproximadamente 60-70 nucleótidos conocido como pre-microARN. Este es luego transportado al citoplasma a través de la proteína Exportina-5 (XPO-5) para ser luego procesado por DICER y generar el microARN dúplex. Finalmente, es conducido hacia el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que contiene a la proteína AGO2 (ARNasa que constituye el componente catalítico) quien seleccionará a la hebra guía, mientras que la otra hebra será degradada. Después de su integración en el complejo RISC, ahora activado, los microARN se unen por complementariedad de bases con el ARNm blanco para finalmente inhibir su traducción o inducir su degradación (Fig. 6).

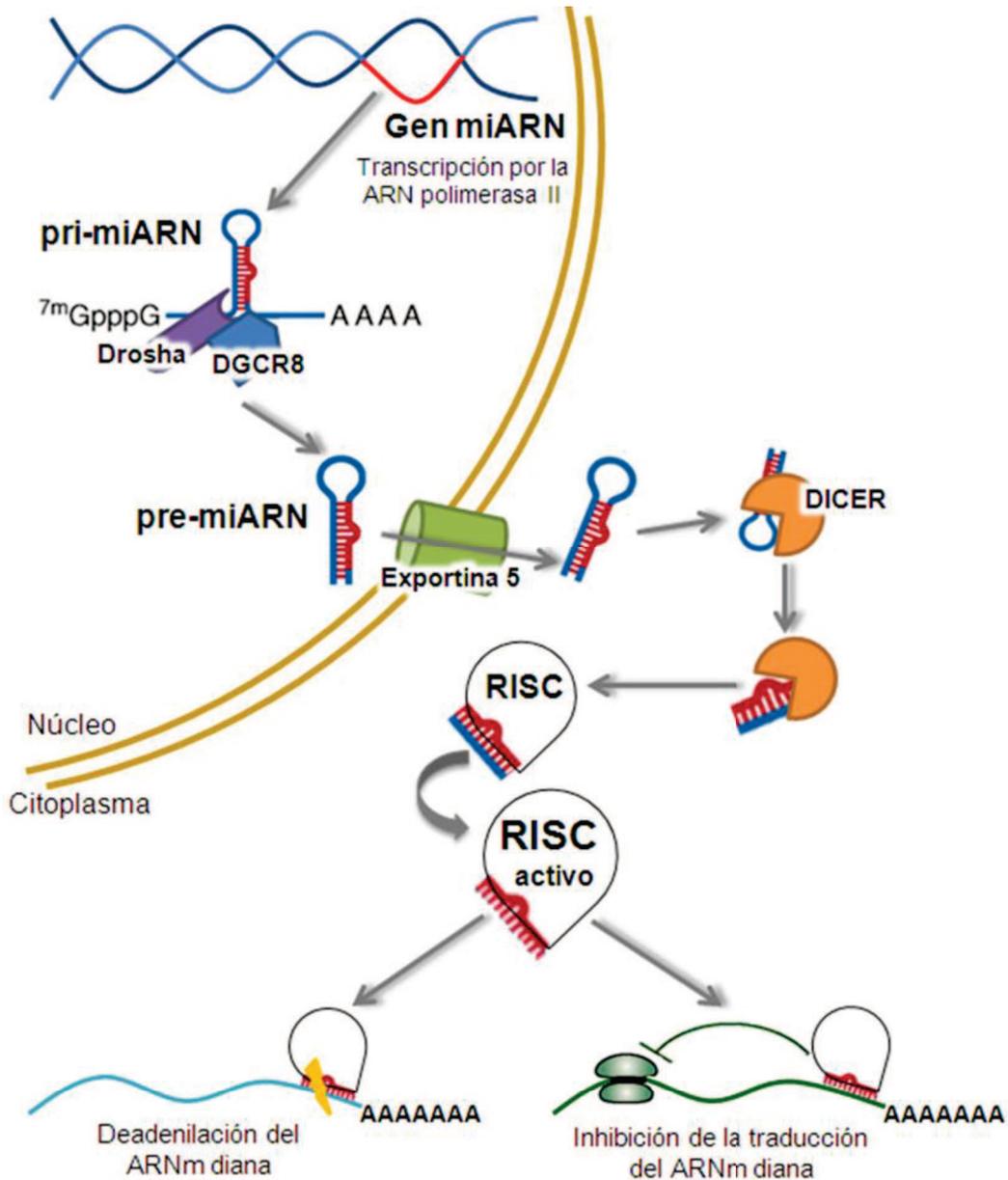


Figura 6: Biogénesis, procesamiento y acción de los microARNs

Biogénesis: transcripción de un microARN por la ARN polimerasa II o III; el ARN transcrito luego se pliega denominándose pri-microARN. **Procesamiento:** desde el pri-microARN, la proteína DROSHA junto con la proteína DGCR8 cortan ciertos nucleótidos y generan un precursor denominado pre-microARN; este se transporta al citoplasma a través de la proteína exportina-5 donde es procesado por la enzima DICER para formar el microARN dúplex. DICER conduce al microARN dúplex hacia el complejo RISC el cual elimina una cadena del microARN dúplex formando así el complejo RISC activo. **Acción:** RISC activo usa al microARN para buscar a su ARNm diana e inhibir su traducción o inducir su degradación.

3.4.2.Regulación epigenética-microARNs durante la transición epitelio-mesénquima

Como se mencionó anteriormente, solo las metilaciones en los dinucleótidos CpGs son capaces de ser mantenidas luego de la división celular (Jeziorska et al., 2017). Sin embargo, el genoma de los vertebrados es generalmente pobre en dinucleótidos CpGs, con la excepción de las islas CpGs. Estas son regiones genómicas relativamente pequeñas (~1 kb en promedio) que contienen más del 50% de sus secuencias constituidas por dinucleótido CpGs. Se ha reportado que aproximadamente el 50% de las regiones genómicas en donde se ubican los microARNs (~265 microARNs) están asociados a islas CpGs, y que su expresión es principalmente regulada a nivel epigenético mediante la metilación de las citosinas en estas islas (Weber et al., 2007). Esta regulación epigenética-microARNs representa un nivel muy importante de regulación fina de los genes blanco a los que regulan postranscripcionalmente los propios microARNs.

En la actualidad, todo lo que se conoce sobre el control epigenético-microARN proviene de investigaciones realizadas en cáncer, donde se ha determinado que este tipo de control es crucial para el correcto mantenimiento de la arquitectura genómica local y global, así como la correcta expresión génica (Shukla et al., 2020; Wiklund et al., 2010). En los últimos años, se ha demostrado que los cambios en la expresión de ciertos microARNs están involucrados en la patogénesis de todos los tipos de cáncer humanos (Holubekova et al., 2017). En este contexto, varias investigaciones han descubierto que las desregulaciones en las vías de control epigenético-microARN son eventos claves durante la activación patológica de la TEM (Ahmad et al., 2014; Diaz-Lopez et al., 2014; Ding, 2014; Holubekova et al., 2017).

De forma general, durante el desarrollo del cáncer, ocurren dos eventos epigenéticos principales (Biswas and Rao, 2018). Por un lado, se observa una hipometilación global de los residuos de CpGs, no asociados a islas CpGs, que genera inestabilidad genómica, activación de transposones y la expresión patológica de oncogenes. Mientras que por otro lado, ocurre una hipermetilación en regiones promotoras que contienen islas CpGs, asociadas con el silenciamiento de genes de microARNs (Ehrlich, 2002; Kiesslich et al., 2013). Es interesante destacar, que recientemente mediante el uso de herramientas

bioinformáticas se ha descrito que en el genoma humano existen “puntos calientes” o *hotspots* para la metilación de microARNs en los cromosomas 1, 2, 9, 11, 16, 17 y 19 (Morales et al., 2017). Entre los microARNs inmersos en estos *hotspots* se destacan las familias de miR-200 y miR-124, el miR-203 y miR-375 (Furuta et al., 2010), los mismo que son denominados supresores de tumores por poseer un rol fundamental durante la metástasis (Tomasetti et al., 2019).

Durante el desarrollo de un adulto, existe una homeostasis epitelial en tejidos tales como epitelio mamario, epidermis, músculo, y la mayoría de órganos tales como riñón, hígado, estomago. Durante el crecimiento y desarrollo de estos tejidos y órganos, existe una expresión regulada de microARNs supresores de tumores que funcionan como “buffers” y controlan la expresión patológica de genes promotores del crecimiento (entre los cuales se encuentran muchos de los denominados pro-oncogenes) (Fig. 7A). Sin embargo, en una célula tumoral, la hipermetilación de las islas CpGs reprime la expresión de estos microARNs y conlleva a la expresión patológica de los pro-oncogenes (Fig. 7B) (Zavesky et al., 2015).

Entre los principales microARNs supresores de tumores se encuentran aquellos microARNs que regulan directamente la expresión de los FT-TEM (Lu and Kang, 2019). Entre los más estudiados se encuentran los microARNs que regulan a ZEB1/2, entre los que se están los miembros de la familia de los miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, y miR-429) y miR-205 (Bracken et al., 2008; Burk et al., 2008; Gregory et al., 2008; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008; Wellner et al., 2009). Se ha observado en diversos tipos de cáncer que la expresión de los miR-200s y miR-205 es epigenéticamente inhibida, lo que lleva a la expresión patológica de los FT del tipo ZEB (Park et al., 2008; Tryndyak et al., 2010). Otros ejemplos de microARNs supresores de tumores regulados epigenéticamente, son aquellos capaces de interactuar con los miembros de la familia SNAIL. Entre estos se destacan a miR-1, que puede inhibir la expresión de SNAI2 (Liu et al., 2013); y los que pueden regular a SNAI1, como miR-34 (Siemens et al., 2011), miR-203 (Moes et al., 2012) y miR-29b (Ru et al., 2012) desregulados en cáncer colorrectal, mama cáncer y células de cáncer de próstata, respectivamente.

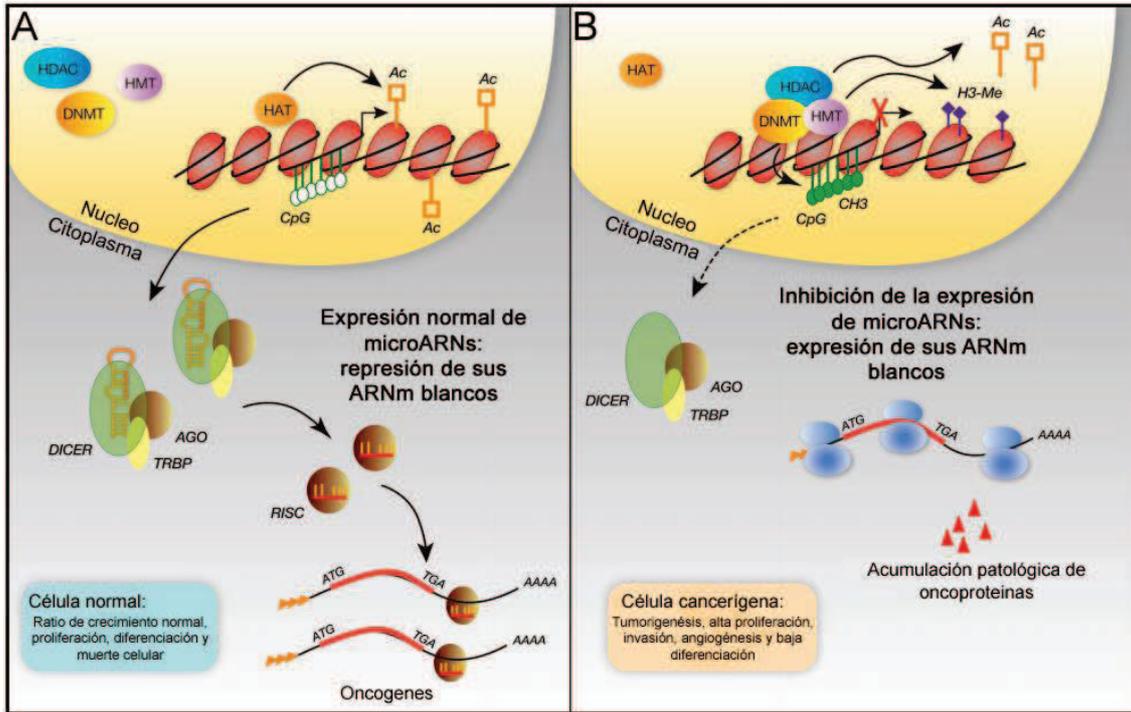


Figura 7: Regulación epigenética-microARNs durante el desarrollo del cáncer

A) En una célula normal, los promotores de los genes de los microARNs supresores de tumores no se encuentran metilados. Esto permite su expresión normal y su adecuada función de inhibir post-transcripcionalmente la traducción de oncogenes. B) Durante el desarrollo del cáncer, factores externos cancerígenos provocan una hipermetilación de las islas CpG. Esta hipermetilación del genoma genera la inhibición de la expresión de microARNs supresores de tumores. Esta inhibición de los microARNs supresores tumorales permite la expresión patológica de oncoproteínas. En este contexto, la regulación epigenética-microARNs es uno de los principales niveles afectados durante la formación de tumores. Modificado de Zavesky y colaboradores (2015). HMT=histona metil-transferasa; HDAC=histona desacetilasa; DNMT=ADN metil-transferasa; HAT=histona acetil-transferasa; ATG=codón de inicio de traducción; TGA=codón de stop de la traducción.

Es importante destacar que los mecanismos epigenéticos subyacentes a la regulación de la expresión de microARN proporcionan un blanco terapéutico potencial, debido a que las metilaciones de los nucleótidos CpG pueden ser farmacológicamente moduladas (Holubekova et al., 2017). En este contexto, actualmente se están probando fármacos que inhiben la metilación o promueven la demetilación para reactivar la expresión de genes epigenéticamente silenciados y que se reconocen como elementos clave de la patogénesis de ciertas enfermedades (Morales et al., 2017). Particularmente en cáncer este tipo de fármacos es capaz de conducir a la reexpresión de microARNs que fueron silenciados epigenéticamente y de esta forma suprimir la metástasis (Boros and Nagy, 2019; Holubekova et al., 2017; Li et al., 2015a; Rusek et al., 2015). Por lo

tanto, podemos considerar a los microARNs como nuevos potenciales blancos "farmacológicos".

La información que se ha logrado coleccionar hasta la fecha sobre la regulación epigenética-microARN en cáncer y la evidente conservación en los otros niveles de regulación de la TEM, pone de manifiesto que aún queda mucho por aprender sobre la regulación de la TEM durante el desarrollo embrionario normal. Considerando las similitudes que se encuentran durante la TEM que ocurre en la metástasis tumoral y durante la delaminación de las CCN, es posible que existan circuitos reguladores epigenético-microARN similares entre ambos modelos (Kerosuo and Bronner-Fraser, 2012). En este contexto, es necesario realizar estudios en sistemas animales, en los cuales se puedan entender la regulación epigenética-microARN durante procesos no patológicos. Es así que, por las razones anteriormente mencionadas, esta tesis busca estudiar este importante nivel de regulación epigenética-microARN durante el desarrollo de las CCN. Nosotros hipotetizamos que existe un circuito regulador epigenético-microARN que desempeña un papel importante durante la TEM de las CCN de pollos como modelo de desarrollo de vertebrados. Los resultados obtenidos durante la presente tesis podrían ayudar al entendimiento de los procesos que conducen a un desarrollo anómalo de las CCN. Además, también pueden ayudar a tener una mejor comprensión de la metástasis tumoral, debido a las similitudes entre ambos procesos migratorios.

4.OBJETIVOS

4. 1. General

Algunos autores consideran que las diferentes estrategias que las células tumorales utilizan para migrar son una reminiscencia de los mecanismos utilizados por las células migratorias embrionarias, como los que ocurren en las CCN. En este contexto, en los últimos años se ha descubierto que las desregulaciones en el control epigenético-microARN son eventos claves durante la activación patológica de la TEM en cáncer. Tomando en cuenta la similitud entre la metástasis tumoral y la migración de las CCN; es que proponemos evaluar la existencia de circuitos regulatorios epigenético-microARN que puedan tener un papel importante durante la transición epitelio-mesénquima de las CCN en vertebrados.

4. 2. Específicos

En base a lo mencionado nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Identificar *in silico* posibles microARNs capaces de regular a los principales genes involucrados en la transición epitelio-mesénquima de las CCN.
- Caracterizar la expresión espacio-temporal de dicho(s) microARN(s).
- Evaluar el efecto de la ganancia y pérdida de función de dicho(s) microARN(s) y establecer su función en la delaminación de las CCN.
- Demostrar la asociación directa entre los ARN mensajeros blanco y el/los microARN(s).
- Determinar el rol de la metilación de ADN en la regulación espacio-temporal de dicho(s) microARN(s) durante el desarrollo de las CCN.
- Analizar una posible dinámica en la regulación epigenética-miARN durante la delaminación y condensación de las CCN.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5. 1. Análisis *in silico* de los microARNs reguladores de *Phf12* y *Snail2*

Se utilizaron los softwares de los programas de predicción de unión microARN-ARN mensajero: miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) (Wang, 2008; Wong and Wang, 2014) y TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) (Lewis et al., 2005), la base de datos de expresión de microARNs y ARN mensajeros en pollo: GEISHA (http://geisha.arizona.edu/geisha/quick_search.jsp?table=mir) y la base de datos de microARNs: miRBase (<http://www.mirbase.org/>) (Griffiths-Jones, 2006; Griffiths-Jones, 2010; Griffiths-Jones et al., 2008). Las secuencias de microARNs obtenidas fueron alineadas en el programa ClustalX (Thompson et al., 2002).

5. 2. Obtención y manipulación del material biológico

Para todos los experimentos, el material biológico usado correspondió a embriones de pollo (*Gallus gallus*) provenientes de fuentes comerciales locales. Los huevos fertilizados obtenidos fueron incubados a 38°C hasta el estadio embrionario deseado de acuerdo con los criterios de Hamburger y Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1951).

5. 3. Hibridación *in situ* (HIS) con sondas LNA

Previo a realizar la HIS, la sonda LNA (locked nucleic acid) complementaria a miR-203 (gga-miR-203: CAAGTGGTCCTAAACATTTTCAC) fue obtenida de la empresa EXIQON (Wholemount *in situ* hybridisation with LNA probes, EXIQON) y fue marcada en el extremo 3' utilizando el kit DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd generation (ROCHE), según especificaciones del fabricante. El protocolo para la realización de HIS con sondas LNA fue adaptado de los protocolos realizados por Darnell (Darnell et al., 2006) y Sweetman (Sweetman, 2011), según:

Fijación: Los embriones fueron colectados inicialmente en medio Ringer frío y posteriormente fueron fijados con PFA 4% frío durante 16hs a 4°C.

Deshidratación: Pasado el tiempo de fijación, los embriones fueron lavados tres veces con PBSw-DEPC durante 5 minutos, para luego proceder con la deshidratación utilizando concentraciones crecientes de metanol (25% MeOH + PBSw-DEPC; 50% MeOH + PBSw-DEPC; 75% MeOH + PBSw-DEPC; 100%

MeOH) durante 10 minutos cada una. Posteriormente se dejaron los embriones en 100% MeOH por lo menos 1 hora a -20°C para finalizar la deshidratación.

Pre-hibridación: Los embriones fueron rehidratados utilizando concentraciones decrecientes de metanol (100% MeOH; 75% MeOH + PBSw-DEPC; 50% MeOH + PBSw-DEPC; 25% MeOH + PBSw-DEPC) durante 10 minutos. A continuación, se lavó con PBSw-DEPC 2 veces durante 20 minutos para luego ser lavados 2 veces con solución de pre-hibridación (formamida 50%, SSC 0.5X pH 5, blocking poder 2%, EDTA 5mM pH8, tween-20 0.1%, CHAPS 0.1%, tARN 0.5mg/ml, heparina 50ug/ml) por 20 minutos. Antes de la hibridación, los embriones son incubados durante al menos 2 horas en solución de pre-hibridación a 70°C.

Hibridación: Se incubaron los embriones junto con la sonda marcada para miR-203 en solución de hibridación a 52°C durante 16hs.

Lavados post-hibridación: La solución de hibridación para miR-203 fue removida y almacenada a -20°C para ser re-usada. Luego, se realizaron 3 lavados de 20 minutos con solución 2x SSC con 0.1% CHAPS, seguido de 3 lavados de 20 minutos con 0.2x SSC con 0.1% CHAPS, ambos a la temperatura de hibridación. Finalmente se lavó 2 veces por 10 minutos con MABT (Ácido maleico 0.147M pH 7,5, NaCl 0.187M, NaOH 0.24M, 0.1% tween-20) fresco a temperatura ambiente.

Hibridación con el anticuerpo: Los embriones fueron bloqueados con la solución de bloqueo (1x MABT, Suero Fetal Bovino 20%, Blockin Reagent Roche 2%) por 3 horas. Seguidamente, se incubaron los embriones con el anticuerpo Anti-Dig-AP (1:2500, Roche), diluido en solución de bloqueo, durante 16 horas a 4°C en constante agitación. Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 1 hora en solución MABT a temperatura ambiente y un último lavado en MABT durante 16 horas en agitación a 4°C.

Revelado: Se realizaron 2 lavados por 30 minutos cada uno con TrisHCl 100mM (pH 9.5). Luego se lavó con solución NTMT (NaCl 100mM, TrisHCl 100mM pH 9.5, MgCl₂ 50mM, Tween20 0.1%) durante 30 minutos. La reacción de revelado se realizó a temperatura ambiente con 4.5µL de NBT (cloruro de tetrazolio nito-azul) y 3.5µL de BCIP (sal de 5-bromo-4cloro-3'-indolifosfato p-toluidina) diluidos en 1mL de NTMT, protegiendo los embriones de la luz. Una vez obtenida la coloración deseada, la reacción fue detenida con 2 lavados de

TrisHCl 100mM (pH 9.5) por 5 minutos cada uno. Luego se realizaron 3 lavados con PBSw durante 5 minutos cada uno. Finalmente, los embriones fueron deshidratados utilizando concentraciones crecientes de metanol. Previo a la visualización y fotografía, los embriones fueron rehidratados y lavados con PBS como se describiera previamente. Las fotos fueron tomadas utilizando el software AxoVision (Carl Zeiss) con un microscopio (Stemi SVII; Carl Zeiss) y el software Image-Pro Plus 5.1 Biological (Media Cybernetics) en una lupa estereoscópica (Nikon SMZ800). Algunos de los embriones fueron posteriormente embebidos en gelatina y seccionados en criostato.

5. 4. Hibridación *in situ* (HIS) con sondas de ARN

Se realizó la HIS para ARN mensajeros en embriones enteros según el protocolo descrito por Acloque (Acloque et al., 2008). En breve, los embriones fueron fijados en PFA 4% a 4°C durante 16hs y lavados en PBSw-DEPC y deshidratados en concentraciones crecientes de MeOH/PBSw-DEPC a temperatura ambiente antes de ser guardados a -20°C. Luego de ser rehidratados en concentraciones decreciente de MeOH/PBSw-DEPC, fueron lavados en PBSw-DEPC tres veces durante 5-10 minutos. Los embriones fueron permeabilizados utilizando Proteinasa K (10ug/ml) durante distintos tiempos dependiendo del estadio embrionario. Se incubó 10 minutos con PBSw-DEPC con 2mg/ml de glicina, para frenar la permeabilización y se realizaron luego dos lavados de 5 minutos con PBSw-DEPC. Durante la permeabilización y los posteriores lavados los tubos conteniendo los embriones se mantuvieron inmóviles hasta que fueron nuevamente fijados en PFA 4%, 0.2% de glutaraldehído durante 20 minutos. Se lavaron nuevamente los embriones tres veces durante 5 minutos con PBSw-DEPC y se realizó un prehibridación con la solución de hibridación durante 2 a 3 horas a 70°C. A continuación, se hibridó a 70°C durante 16hs con la sonda de ARN marcada con DIG correspondiente (según se quisiera analizar expresión de *Sox10* o *Tfap2b*). Al día siguiente se retiró la sonda y se lavó los embriones dos veces durante 15 minutos con solución de hibridación de lavado a 70°C (formamida 50%, SSC 3X pH 5, EDTA 5mM pH8, Tween20 0.1%, CHAPS 0.1%). Se realizaron 4 lavados más durante 30 minutos a 70°C. A continuación, se realizó un lavado por 30 minutos con una dilución 1:1 de solución de hibridación de lavado y buffer MABT (Ácido maleico 0.147M pH 7.5, NaCl 0.187M, NaOH 0.24M, 0.1% tween-20) a 70°C. Luego se

realizaron 4 lavados de 30 minutos y se bloqueó los embriones durante 1-3hs con solución de bloqueo (MABT, Suero Fetal Bovino 20%, BBR 2% (Blockin Reagent, Roche)). La inmunodetección se realizó incubando con un anticuerpo anti-DIG-AP (Roche) en una dilución 1:2000 en solución de bloqueo durante 16hs a 4°C en agitación constante. Al día siguiente se realizaron dos lavados rápidos de 5 minutos, 2 de 30 minutos y 6 de una hora con MABT a temperatura ambiente. Finalmente, se dejó lavando toda la noche a 4°C con MABT en agitación. Al día siguiente, se realizaron dos lavados de 30 minutos con TrisHCl 100mM pH 9.5 y una vez con solución NTMT (NaCl 100mM, TrisHCl 100mM pH 9.5, MgCl₂ 50mM, Tween20 0.1%) 30 minutos. La reacción de revelado se realizó a temperatura ambiente en presencia de los sustratos NBT/BCIP (tetrazolio nitroazul/5-bromo-4-cloro-3-idolil fosfato) diluidos en NTMT (1ml NTMT, 4.5 µl NBT, 3.5µl BCIP) protegiendo a los embriones de la luz y colocándolos en agitación constante. Una vez que se obtuvo la coloración deseada se detuvo la reacción con dos lavados de 5 minutos con TrisHCl 100mM pH 9.5. Los embriones fueron fijados nuevamente con PFA 4% por 2hs y lavados 3 veces 5-10 minutos con PBS para luego ser deshidratados en concentraciones crecientes de MeOH/PBS como se describió anteriormente. Previo a la visualización y fotografía los embriones fueron rehidratados y lavados con PBS como se describiera previamente. Las fotos fueron tomadas utilizando el software AxoVision (Carl Zeiss) con un microscopio (Stemi SVII; Carl Zeiss) y el software Image-Pro Plus 5.1 Biological (Media Cybernetics) en una lupa estereoscópica (Nikon SMZ800). Algunos de los embriones fueron posteriormente embebidos en gelatina y seccionados en criostato para ser fotografiados.

5. 5. Montaje de embriones en gelatina y secciones transversales

Para realizar los cortes transversales los embriones fueron embebidos primero en PBS, sucrosa 5% durante 16hs a 4°C. A continuación, se dejaron en PBS, sucrosa 15% por 16hs a 4°C. Seguidamente, se incubaron en PBS, sucrosa 15%, gelatina 7.5% (SigmaAldrich) por lo menos 4hs a 37°C. Los embriones fueron colocados luego en moldes y una vez que la gelatina endureció se realizó un congelado rápido sumergiendo los mismos en nitrógeno líquido. Los embriones se guardaron a -80°C hasta su posterior disección. Con el uso de criostato a -30°C se realizaron secciones transversales de 14-18µm. Los cortes fueron montados en portaobjetos tratados con TESPA (Sigma-Aldrich) y

guardados a -20°C para su posterior utilización o directamente desgelatinizados a 42°C durante 10 minutos en PBS-T (PBS, TritónX100 0.5%) para ser fotografiados.

5. 6. Inmunohistoquímica (IHQ)

Embriones enteros o cortes transversales, previa desgelatinización a 42°C durante 10 minutos en PBS-T (PBS, TritónX100 0.5%), fueron permeabilizaron incubando 10 minutos con PBS-T a temperatura ambiente. Luego, se bloqueó en PBS-T + BSA 3% (albúmina sérica bovina) por 45 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la incubación con el correspondiente anticuerpo primario: ratón IgG1 anti-Snail2 (1:100; Developmental Studies Hybridoma Bank), conejo IgG anti-FoxD3 (1:300; gentilmente cedido por la Dra. P. Labosky, Vanderbilt University Medical Center, TN) o ratón IgG1 anti-Pax7 (1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank) durante toda la noche a 4°C . Posteriormente se procedió a 3 lavados con PBS-T antes de la incubación con los anticuerpos secundarios: cabra anti-ratón IgG1 y cabra anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 y 594 (Molecular Probes, 1:500), por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las imágenes fueron tomadas usando el software NIS-Elements-AR4.00 (Nikon) en un microscopio Eclipse E600 (Nikon).

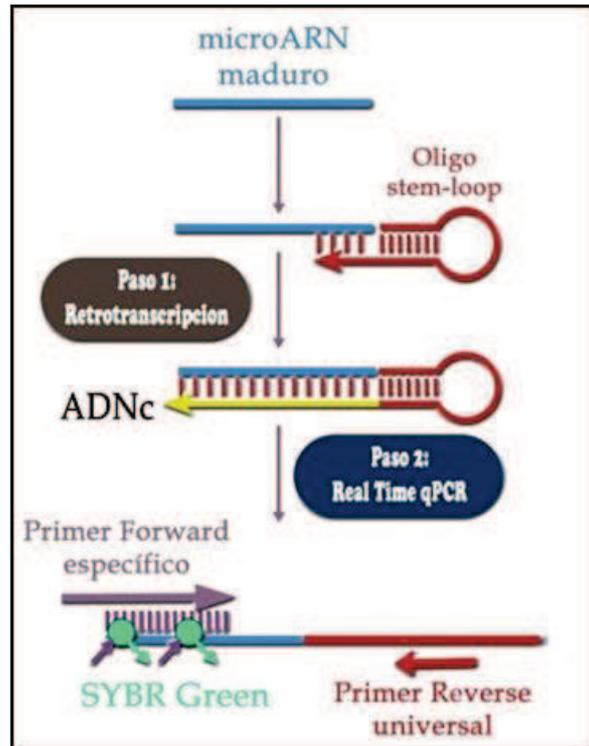
5. 7. Extracción de ARN y stem-loop RT-qPCR

Para la cuantificación de la expresión de microARNs se utilizó el método “stem loop RT-qPCR” (Chen et al., 2005). Para esto se extrajo ARN total utilizando el kit comercial RNAqueous®-Micro Kit (AMBION) y se incluyó el paso de enriquecimiento de ARNs pequeños siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez obtenido el ARN el mismo fue cuantificado y guardado a -80°C para su posterior utilización. Se diseñaron oligonucleótidos complementarios para cada microARN para luego realizar las retrotranscripciones según el esquema de la figura 8. Luego, el producto es amplificado mediante qPCR utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para cada microARNs estudiados (Primer forward específico) y otro oligonucleótido reverse universal que se une al stem loop (Fig. 8).

Figura 8: Descripción esquemática de la técnica Stem Loop RT-qPCR

La técnica incluye dos pasos:

- 1) Retrotranscripción con oligonucleótidos stem-loop (SLO) y
- 2) Cuantificación por PCR en tiempo real.



Para la cuantificación relativa de la expresión de miR-203, se procedió a la RT-qPCR convencional utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 2. Es importante destacar que como normalizador para nuestros experimentos decidimos utilizar el miR-16 (Lardizabal et al., 2012). Además, mediante el uso de RT-qPCR convencional, analizamos en los mismos estadios la expresión relativa de *Snail2* y *Phf12*, usando como normalizador al gen *Hprt1* (Simoes-Costa and Bronner, 2015).

Retrotranscripción

Previamente a la reacción de retrotranscripción, 1ug de ARN extraído se trató con el kit DNase I amplification grade (Invitrogen) en un volumen final de 10 μ L, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc, a cada muestra se adicionó 1 μ L del mix de los oligos stem-loop para miR-16, y miR-203 (1 μ M de cada oligo stem-loop (SLO)) o 1ul de oligonucleótidos random (300ng/ μ l) y 1 μ L de mix dNTPs (10mM). Se calentó lo obtenido a 65°C por 5 minutos para luego, rápidamente, ponerlo en hielo. Se adicionó 4 μ L de 5x First-Strand *Buffer*, 2 μ L 0.1M DTT, 1 μ L RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/ μ L). Rápidamente se procede a incubar 2 minutos a 16°C (microARNs) o 25°C (cebadores random). Pasado el tiempo se agregaron 0.5 μ L de SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) para sintetizar el cADN según: en el caso de microARN se incubó 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C

y 60 minutos a 50°C; mientras que para los ARNm se incubó 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C. Finalmente, se realizó la inactivación de la reacción calentando 15 minutos a 70°C. Las muestras de ADNc finales se almacenaron a -20°C.

Tabla 2: Cebadores utilizados en la técnica Stem Loop RT-qPCR y RT-qPCR estandar
Oligonucleótidos stem-loop (SLO) utilizados en la retrotranscripción y cebadores utilizados para la cuantificación por PCR en tiempo real. Se denota en negrita la secuencia específica para cada microARN analizado.

Nombre	Secuencia
SLO-203	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGGAGAC CAAGTG
SLO-16	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGGAGAC CACCAA
miR-203 Forward	CCGGCGTGAAATGTTTAGG
miR-16 Forward	CGCCGCTAGCAGCACGTAAA
Primer reverse universal	GAGGTATTTCGCACCAGAGGA
Snail2 Fwd	GCCAACTACAGCGAACTGG
Snail2 Rev	CGGAGAGAGGTCATTGGGTA
Phf12-Fwd	CTGAGGAACCCTTGCAGAAG
Phf12-Rev	AGAGTCCCAAAGCGAAGTCA
Hprt1-Fwd	TGGTGAAAGTGGCCAGTTTG
Hprt1-Rev	TCATTGTAGTCGAGGGCGTATC

Stem loop q-PCR

Las reacciones de q-PCR se llevaron a cabo en un Termociclador Real Time Stratagene™ Mx3005P qPCR Instrument utilizando FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (ROCHE). Para cada set de oligonucleótidos se calculó la eficiencia de amplificación (Nolan et al., 2006; Schmittgen and Livak, 2008) mediante la construcción de curvas estándares por la amplificación de diluciones seriadas de un mix de ADNc utilizando diferentes concentraciones de oligonucleótidos. Se graficaron los valores de Cq promedio para cada dilución de ADNc y para cada concentración de oligonucleótidos en función del logaritmo del factor de dilución correspondiente. A partir de estos resultados se utilizó la concentración de oligonucleótidos que presentaron una eficiencia cercana al 100% (Fig. 9). La amplificación específica de cada producto se confirmó mediante la observación de un único pico en la curva de disociación y por la obtención de una única banda de tamaño esperado en una electroforesis en gel de agarosa 1% (Fig.10).

Es importante destacar que las concentraciones efectivas ya eran conocidas para los productos de los ARN mensajeros: *Snail2* y *Phf12* (Strobl-Mazzulla and Bronner, 2012b) y para *Hprt1* (Simoes-Costa and Bronner, 2015).

Figura 9: Cálculo de eficiencias de amplificación para cada par de oligonucleótidos de los genes analizados.
Las curvas estándares se crearon mediante diluciones seriadas de un mix de ADNc.

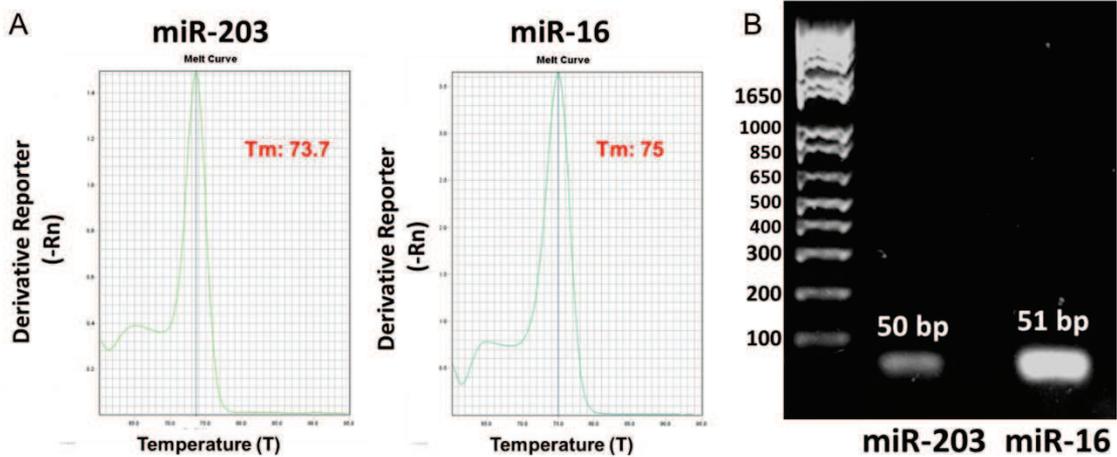
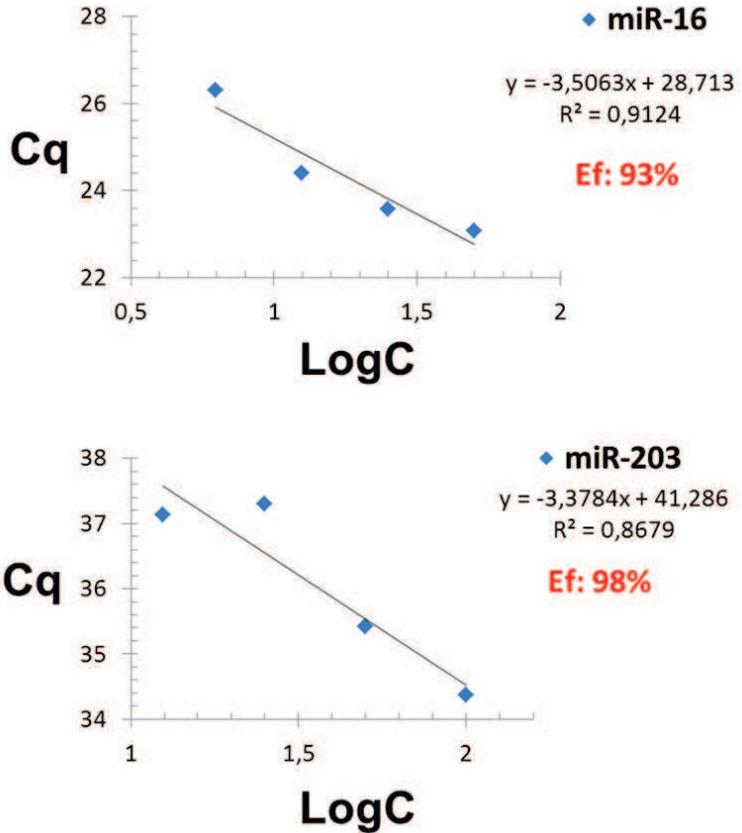


Figura 10: Expresión específica de miR-203 y miR-16

Curvas de disociación específicas para cada microARN y la consecuente banda específica del tamaño esperado.

Finalmente, la mezcla de la reacción para analizar la expresión en los distintos estadios se realizó en un volumen final de 15uL según:

Concentración final	miR-203 (F: 1.4μM-R:0.7μM)	miR-16 (F-R: 0.9μM)	Snail2/Phf12/HPRT1 (F-R: 0.8μM)
oligonucleótidos:			
2x SYBR Green Master mix	7.5μL	7.5μL	7.5μL
Oligonucleótido forward (10μM)	2.2μL	1.35μL	1.2μL
Oligonucleótido reverse (10μM)	1.1μL	1.35μL	1.2μL
ADNc	1μL	0.5μL	0.5μL
Agua UP	3.2μL	4.3μL	4.6μL

Las reacciones de q-PCR se iniciaron con 5 minutos de incubación a 95°C, seguida de 40 ciclos de 95°C por 20 segundos y 60°C por 1 minutos. Se realizó una curva de disociación al final de cada corrida dentro del rango de temperaturas 55°C-95°C, aumentando 0.5°C cada 2 segundos. La línea de base y el Cq se determinaron automáticamente utilizando el programa del termociclador. Por cada diferente reacción con un par de oligonucleótidos se incluyeron controles negativos (sin templados) y cada reacción se llevó a cabo por triplicado.

Análisis de datos

Se calcularon los valores de cantidad relativa (Milet and Monsoro-Burq, 2012) a partir de los Cq mediante el método delta-Cq (Livak and Schmittgen, 2001), incorporando los valores de eficiencia de amplificación de qPCR calculados para cada gen (Pfaffl, 2001). Una vez obtenidos los valores de RQ, se procedió a graficar estos valores por estadio. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5.0 y el paquete estadístico online <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>. Considerando las tres repeticiones analizadas se procedió a analizar la significancia estadística usando el método de *t*-student.

5. 8. Generación de plásmidos para ganancia y pérdida de función de miR-203

Tomando como base un vector constitutivo vacío pCAG, que contenía el promotor constitutivo fuerte de CMV early enhancer/chicken β actin y el sitio poli-A de terminación de la transcripción, se procedió a generar el vector de sobreexpresión constitutiva de miR-203 (pCAG-203). Este vector contiene la secuencia genómica del miR-203, incluyendo 250pb río arriba y abajo, para formar la estructura de tallo-bucle necesaria para su correcto procesamiento (Furukawa et al., 2011). Para ello, se amplificó la región codificante de miR-203 del genoma del pollo con los sitios de clonado XhoI y EcoRV, según:

Nombre	Descripción	Secuencia
Forward	Po_gga-miR203F_XhoI	AAACTCGAGCTCCGAGCTGAGAAGAATGG
Reverse	Po_gga-miR203R_EcoRV	AAAGATATCCGCGCACTACAAGCCTATTT

	1x
Agua UP	16.2 μ L
Cebador F (10uM)	0.5 μ L
Cebador R (10uM)	0.5 μ L
5x GoTaq Buffer(Promega)	2.5 μ L
GoTaq® DNA Polymerase (Promega)	0.3 μ L
dNTPs (10mM) (Roche)	0.5 μ L
DMSO (4%)	1 μ L
ADN genómico (40ng/ul)	1 μ L
Volumen final	25 μ L

Protocolo de PCR:		
35 ciclos	95°C	5 min
	94°C	30 seg
	55°C	30 seg
	72°C	45 seg
	72°C	5 min

Los plásmidos “esponjas” generan transcritos con secuencias en tándem antisentido al microARN blanco al que regulan, y de esta forma funcionan como señuelos artificiales capaces de secuestrar los microARNs endógenos (Ebert and Sharp, 2010). En nuestro caso, se diseñó un vector “esponja” para miR-203 (pSmiR-203), basándonos en el protocolo previamente descrito por Kluiwer y colaboradores (Kluiwer et al., 2012). Este plásmido contiene 6 sitios complementarios al miR-203 en la región 3’UTR del ARNm de la proteína EGFP, el mismo que se encuentra bajo la influencia de un promotor constitutivo pCAG (Fig. 11). Como control, se diseñó un vector “esponja” conteniendo la secuencia complementaria a miR-203 pero de manera aleatoria (pScramble-miR-203).

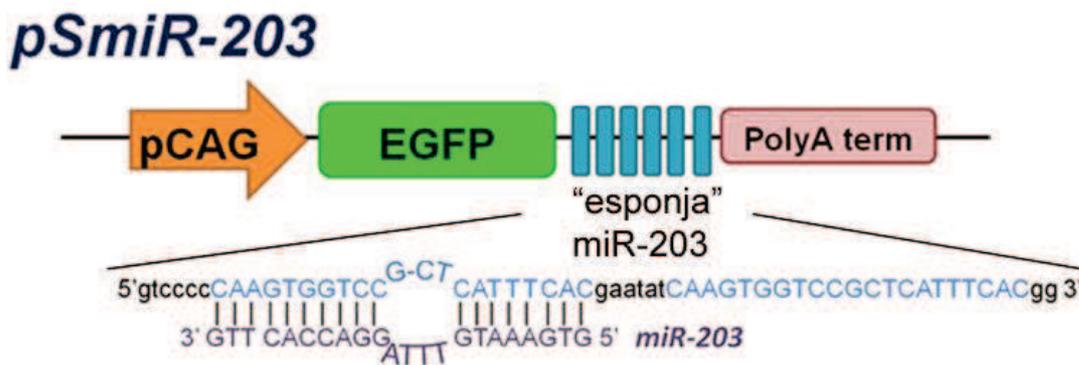


Figura 11: Mapa del vector “esponja”, pSmiR-203

Esquema del vector esponja pSmiR-203, vector de pérdida de función de miR-203. Este vector contiene en el extremo 3’UTR del gen codificante para el reportero EGFP (Enhanced green fluorescent protein) 6 repeticiones antisentido de miR-203. Mientras que posee el promotor constitutivo pCAG (CMV early enhancer/chicken β actin), y el sitio poli-A de terminación de la transcripción (polyA term).

5. 9. Electroporación de plásmidos y morfolinós

La técnica de electroporación *ex ovo* utilizada para transfectar vectores de expresión (plásmidos) o morfolinós en estadios tempranos del desarrollo de embriones de pollo se realizó siguiendo protocolos ya descritos con anterioridad (Sauka-Spengler and Barembaum, 2008). De forma general, los embriones fueron extraídos mediante pinzas y tijeras de disección en anillos de papel filtro y fueron lavados en solución isotónica Ringer’s. Posteriormente los embriones fueron colocados en un electrodo negativo lleno con Ringer’s (Fig. 12A-B). Los plásmidos o morfolinós fueron diluidos a la concentración pertinente y se les agregó colorante Fast Green (Sigma-Aldrich) para poder visualizarlos al momento de realizar la inyección. Se inyectó unilateralmente mediante el uso

microagujas de vidrio y presión de aire en estadio de gastrulación temprana (st. 5) (Fig. 12C). Una vez inyectada la solución se colocó rápidamente un electrodo positivo sobre el embrión y se procedió a realizar la electroporación a 5 pulsos de 5.5mV con una duración de 50 milisegundos intervalos de 100 milisegundos. Luego, los embriones se ubicaron en placas de cultivo de 35mm (Corning® CellBIND®) las cuales contenían 700 μ L de albumina colectada previamente durante la extracción de los embriones, para finalmente incubarlos a 38°C durante 17-24 horas, tiempo aproximado en el cual alcanzan el estadio a analizar. Finalmente, los embriones fueron lavados en PBS y se verificó la eficiencia de la inyección y electroporación mediante visualización en lupa de fluorescencia (Fig. 12D).

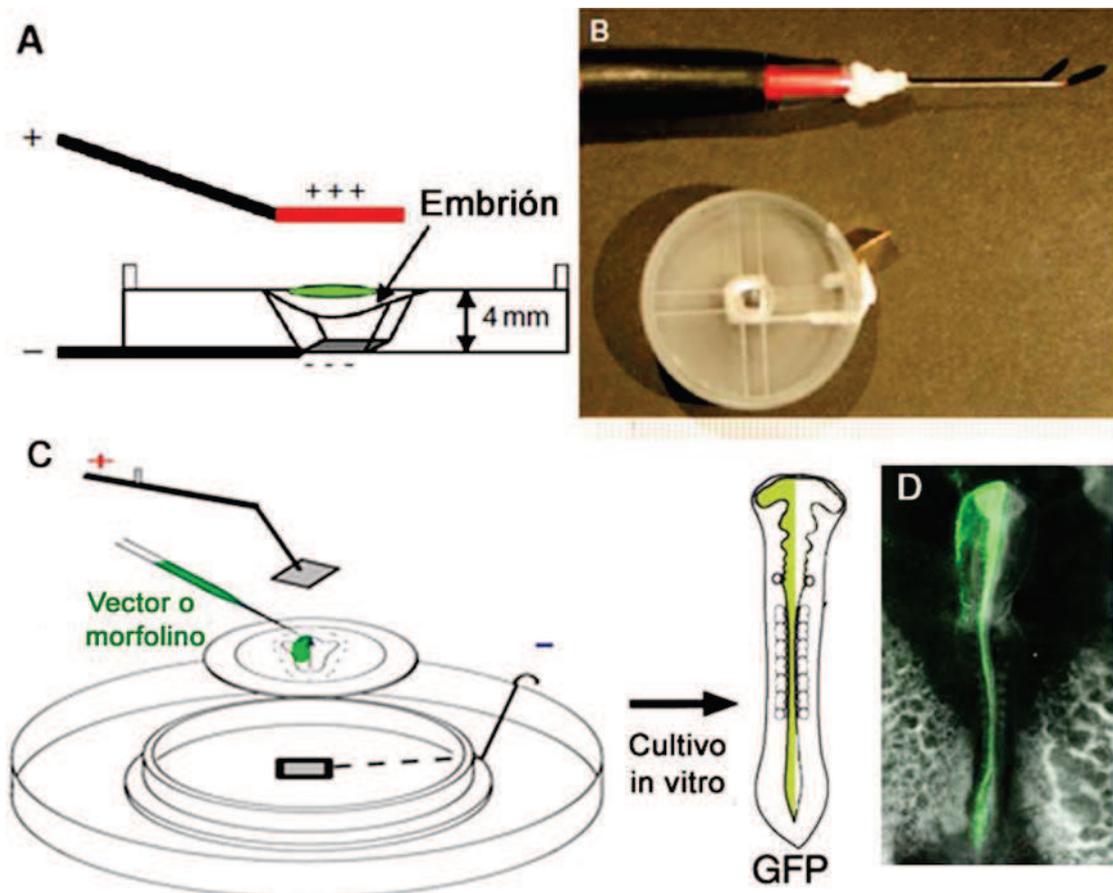


Figura 12: Electroporación de embriones de pollo

A) Representación esquemática del aparato utilizado para la electroporación *ex ovo* en embriones de gástrula temprana (estadio st. 5). B) El Aparato de electroporación consiste en el electrodo de platino y una cámara de electroporación en forma de plato petri cubierta en el fondo con una fina capa de platino. C) Disposición de los electrodos positivo (+) y negativo (-), microagujas y el embrión dispuesto ventralmente. D) Embrión de pollo electroporado unilateralmente con un plásmido que expresa el gen reportero GFP.

Siguiendo los parámetros previamente descritos para electroporación de embriones, los plásmidos y morfolidos usados por experimentos se describen a continuación:

5. 9. 1. Ensayo de ganancia de función de miR-203

Diseño experimental:

Vector de sobreexpresión miR-203 (pCAG-203) y vector control vacío (pCAG). Los plásmidos se inyectaron junto con un vector fluorescente verde (pCIG-GFP) a la siguiente concentración: pCAG-203/pCAG (3µg/ µL) + pCIG-GFP (0.5 µg/ µL). En el caso de los experimentos de rescate de función, se utilizó los mismos lineamientos descritos en el párrafo anterior, pero se inyectó además el morfolino contra la *Cad6b* (Taneyhill et al., 2007) o control a una concentración de 1mM.

5. 9. 2. Ensayo de pérdida de función de miR-203

Se realizó la pérdida de función mediante la electroporación de “esponjas” de microARNs y para corroborar esos resultados utilizamos otra estrategia mediante la pérdida de función por un morfolino complementario al miR-203. Es importante recalcar que el morfolino complementario al miR-203 (miR-203 MO: GGTC AAGTGGTCCTAAACATTTT CAC) fue adquirido de la fuente comercial GENE TOOLS, LCC (https://www.gene-tools.com/blocking_mirnas).

Diseño experimental:

Vector esponja contra miR-203 (pSmiR-203) y vector control scramble (pSmiR-scramble). Los plásmidos se inyectaron en embriones independientes a una concentración de 1.5 µg/ µL.

Morfolino complementario a miR-203 (miR-203 MO) y morfolino control (Control MO). Los morfolidos se inyectaron en embriones independientes a una concentración de 0.5mM.

5. 9. 3. Ensayo de los posibles reguladores de la metilación del gen de miR-203

Se procedió a realizar los experimentos de pérdida de función con morfolidos previamente caracterizados para *Dnmt3a* (Hu et al., 2012), *Dnmt3b* ((Hu et al., 2012; Hu et al., 2014b) y *Snail2* (Taneyhill et al., 2007) a una concentración de 1mM. Una vez obtenidos los embriones, se disecaron tubos neurales dorsales (CCN pre-migratoria) y se realizó el secuenciado luego del tratamiento con bisulfito.

5. 9. 4. Método estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5.0 y el paquete estadístico online <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>. Se utilizó un análisis de tabla de contingencia seguido de *Chi*-cuadrado para la evaluación de la significancia.

5. 10. Secuenciación bisulfito

Tratamiento de ADN genómico con bisulfito: Se disectaron tubos neurales dorsales y ventrales (n=5) de embriones en estadio 9 y CCN migratorias a partir de embriones en estadio 12 y se utilizó el kit EpiTect® Plus Bisulfite Conversion kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente:

- Se añadió a los tejidos disectados 15µL de buffer de lisis *FTB* y 5µL de proteinasa K y se incubó durante 30 minutos a 56°C.
- Conversión bisulfito: se agregó 85µL de *Bisulfite Mix* y 35µL de *DNA Protect Buffer*. Nota: la reacción debe virar de verde a azul después de la adición de *Bisulfite Mix*, lo que indica una mezcla suficiente y pH correcto para la reacción de conversión de bisulfito.
- Se realizó la reacción de conversión de ADN con bisulfito usando un termociclador, según el siguiente programa:

Condiciones del termociclador para la conversión de ADN con bisulfito	
95°C	5 minutos
60°C	25 minutos
95°C	5 minutos
60°C	85 minutos
95°C	5 minutos
60°C	175 minutos
20°C	10 minutos

- Una vez terminada la reacción de bisulfito, se llevó a cabo la purificación del ADN tratado mediante el uso de columnas de sílica siguiendo las instrucciones del fabricante.

Después de obtener el ADN tratado, se realizó la cuantificación de ADNss, los valores de la proporción 260/280 se encontraron cercanos a 2.2, lo que indica una alta conversión del ADN tratado (Correa et al., 2012; Frommer et al., 1992).

Amplificación, clonado y secuenciación: A partir de las muestras de ADN convertidas con bisulfito, se procedió a amplificar dos regiones regulatorias en el contexto del gen *gga-miR-203*. Se realizaron dos rondas de PCR anidadas para amplificar las regiones F1R1 (región 1: 235pb y 19 CpGs); y F3R3 (región 2: 252pb y 20 CpGs) (Fig. 13).

Las regiones F1R1 y F3R3 son determinadas por sets de oligonucleótidos utilizados (Fig. 13), los cuales fueron diseñados utilizando el programa Methyl Primer Express (Applied Biosystems):

Región F1R1	Secuencia	Región F3R3	Secuencia
F	TTTATATTTGTTGAGGGGAAGG	F2	AGGTAGTTTGGAAAAATTGGTTT
R	TTTCCAAACTACCTTCTCCCTA	R2	CTCCTTTAAAAACATTACAACCC
F1	TTGTGTGAGGTTGGTAGTTAGG	F3	AAGTTTTGTTGTTGTTGTTATTTT
R1	ATCATCATCATCTAAAACAACCC	R3	TAAACTATTA AAAACCACTACACCA

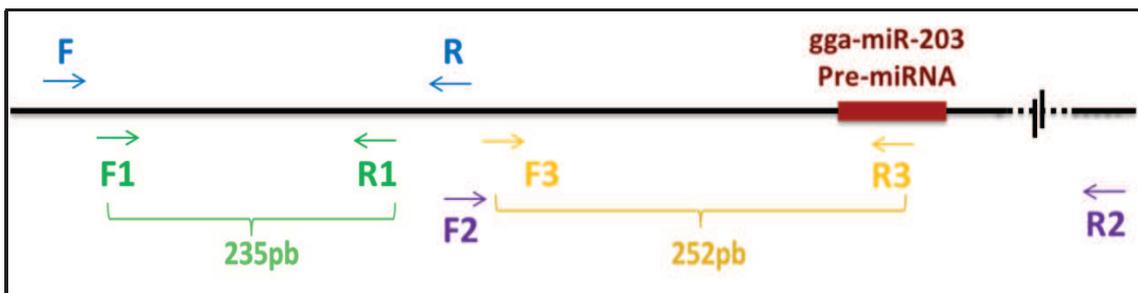


Figura 13: Localización espacial de los oligonucleótidos diseñados para la PCR anidada en el contexto genómico del gen *gga-miR-203*: se denota la división en dos regiones F1R1 y F3R3.

Se realiza la primera PCR usando 2µL del ADN convertido e inmediatamente la segunda PCR (se toma 2µL de la PCR anterior). Al finalizar, se caracterizan los productos correspondientes en un gel de agarosa 1%, los mismos que son cortados del gel y purificados utilizando kit AccuPrep® Gel Purification Kit (Bioneer), siguiendo el protocolo del fabricante.

La primera PCR y la PCR anidada consistieron en la repetición del siguiente protocolo:

	1x
Agua UP	10.95 μ L
Cebador F o F2 (10 μ M)	0.15 μ L
Cebador R o R2 (10 μ M)	0.15 μ L
10x Buffer Taq DNA Polymerase (Roche)	1.5 μ L
Taq DNA Polymerase (Roche)	0.5 μ L
dNTPs (10mM) (Roche)	0.2 μ L
DMSO (4%)	0.75 μ L
ADN convertido con bisulfito (1era PCR) / Producto anterior (PCR anidada)	2 μ L
Volumen final	15 μ L

Protocolo de PCR:		
	95°C	5 minutos
45 ciclos	95°C	30 segundos
	50°C	1 minutos
	72°C	1 minutos
	72°C	7 minutos

Los fragmentos purificados de las regiones 1 y 2 fueron ligados al vector de clonado pCR®2.1-TOPO (Invitrogen) y se procedió a transformar células *E. coli* competentes y cultivarlas toda la noche a 37°C en placas LB agar con ampicilina. Antes de sembrar la suspensión bacteriana, se agregaron sobre la superficie del agar 8 μ L de IPTG (0.1M) y 40 μ L de X-Gal (50mg/mL) considerando las características del vector pCR®2.1-TOPO. Las colonias positivas (blancas) fueron repicadas en 100 μ L del medio de cultivo LB líquido más ampicilina, e incubadas 1 hora a 37°C en agitación. Pasada la hora, se procedió a realizar la colony PCR con los oligonucleótidos M13 reverse y T7 forward para identificar qué colonias tenían el inserto del tamaño adecuado. A todas aquellas colonias positivas se realizaron mini-preparaciones plasmídicas utilizando el kit comercial AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer) y los plásmidos obtenidos fueron enviados a secuenciar (Macrogen Inc.). Las secuencias obtenidas fueron alineadas usando el programa ClustalX y analizadas.

6. RESULTADOS

6. 1. Identificación *in silico* de microARNs capaces de regular la TEM en las células de la cresta neural

Como se describió en la introducción, estudios previos han caracterizado el rol de las proteínas SNAIL2 y PHD12 (llamada actualmente PHF12) como factores claves en la regulación del inicio de la TEM de las CCN en pollo (Strobl-Mazzulla and Bronner, 2012). En la búsqueda de identificar los posibles microARNs capaces de regular a dichos genes es que realizamos un análisis *in silico* utilizando los predictores TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) y miRDB (<http://mirdb.org/>). Este análisis resultó en una lista de microARNs conservados en vertebrados que potencialmente podrían unirse a los 3'UTR de SNAIL2 y/o PHF12 y regular su expresión (Fig. 14). Estos resultados fueron combinados además con una profunda investigación bibliográfica sobre las funciones, blancos conocidos y expresión espacio-temporal (<http://geisha.arizona.edu/geisha/>) de los microARNs obtenidos (Tabla 3).

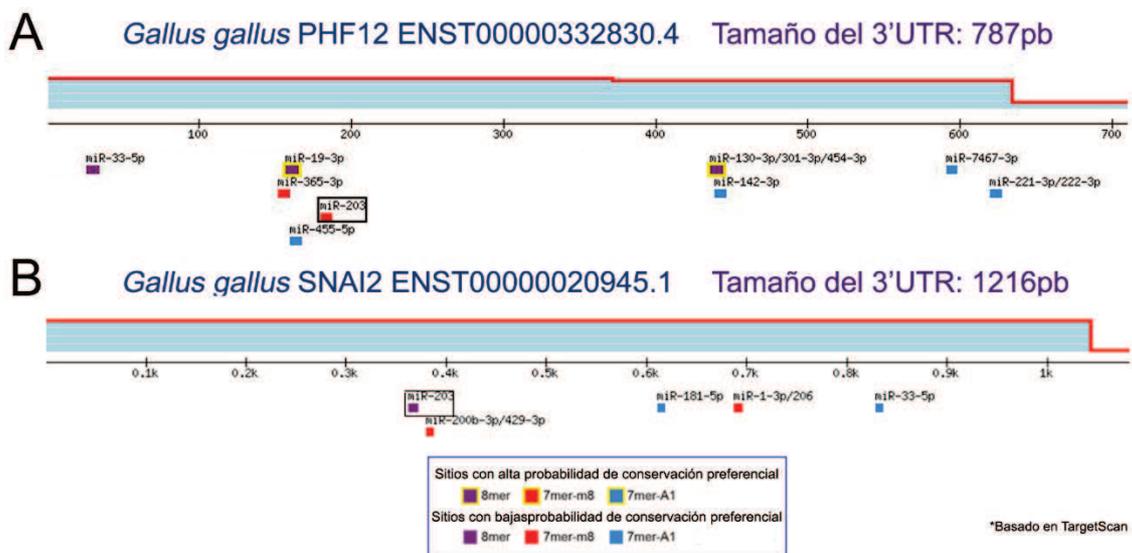


Figura 14: Representación gráfica de los tentativos sitios de unión de microARNs conservados a los 3'UTR de PHF12 y SNAIL2 (TargetScan y miRDB)

Se muestran la ubicación de los microARNs conservados obtenidos de los softwares de predicción, targetScan y miRDB, que pueden unirse a los 3'UTR de A) PHF12 o B) SNAIL2. miR-203 está resaltado dentro de un cuadrado.

En conjunto, estos análisis destacan al miR-203 por cuatro motivos principales:

- 1- Se demostró que regula a SNAIL2 durante el inicio de la TEM en diversos tipos de cáncer: mama (Taube et al., 2013; Zhang et al., 2011), pulmón (Benaich et al., 2014; Ding et al., 2013), próstata (Qu et al., 2013) e hígado (Xiao et al., 2017).
- 2- Interesante para nuestro modelo, miR-203 podría regular simultáneamente a los dos factores principales involucrados en la TEM de las CCN de pollo, *Snail2* y *Phf12*.
- 3- miR-203 es exclusivo de los vertebrados, ya que no ha sido identificado en otros clados, al igual que lo es la característica sinapomórfica de poseer CCN (Heimberg et al., 2010; Hockman et al., 2019).
- 4- Su alta homología en vertebrados (ver figura 15) implica una función altamente conservada, es decir, una conservación en los ARN mensajeros blancos a los que puede regular en estas especies. Nuestro alineamiento múltiple de 8 especies de vertebrados pertenecientes a distintos linajes mostró una conservación perfecta en su región semilla y un solo cambio en la posición 21 en mamíferos y lampreas (modelo de vertebrados basal).

Tabla 3: Análisis *in silico* de los sitios de unión de microARNs conservados y poco conservados a los 3'UTR de PHF12 y SNAIL2 (TargetScan)

En la tabla también se describe las funciones de estos microARNs, sus genes blancos conocidos y su expresión en pollo (Geisha).

		Sitios conservados			Sitios poco conservados				Pct	Función Conocida	Gen blanco demostrado	Referencia
		8mer	7mer-m8	7mer-1A	8mer	7mer-m8	7mer-1A	6mers				
PHF12	miR-19-3p	1	0	0	0	0	0	1	0,85	Oncogen	Pten,Bim,TNF- α	Olive et al. 2008; Mavrikis et al. 2012; Liu et al. 2011
	miR-130-3p /301-3p /454-3p	1	0	0	0	0	0	0	0,77	Oncogen	Coiled-coil domain-containing protein 6 (CCDC6), Smad4, Pten	Leone et al. 2015; Leone et al. 2015; Egavol et al. 2016; Lv et al. 2016
	miR-365-3p	0	1	0	0	0	0	1	0,41	Supresor de tumores	KRAS, MAX, PAX6	Wang et al. 2012; Gastaldi et al. 2012
	miR-142-3p	0	0	1	0	0	0	0	0,4	Supresor de tumores, desarrollo hematológico	Interferon regulatory factor 7 (Irf7), interleukin 6 signal transducer (IL6st), transforming growth factor beta receptor 1(TGFBR1)	Lu et al. 2013; Sun et al. 2013; Borgatti et al. 2016; Dickmar et al. 2017
	miR-455-5p	0	0	1	0	0	0	0	0,38	Supresor de tumores	RAB18, ZEB1, RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (RAF1)	Chai et al. 2015; Wang et al. 2016; Liu et al. 2016
	miR-221-3p /222-3p	0	0	1	0	0	0	0	0,36	Desarrollo de osteoblastos y osteocitos	RUNX2, Smad5, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), ADP-ribosylation factor 4(ARF4)	Tagigawa et al. 2012; Yan et al. 2016; Wang et al. 2017
	miR-33-5p	1	0	0	0	0	0	0	0,32			
	miR-203	0	1	0	0	0	0	0	0,31			
miR-7467-3p	0	0	1	0	0	0	0	0,24	Desconocido	Desconocido	Desconocido	
Snail2	miR-1-3p/206	0	1	0	0	1	0	0	0,72	Desarrollo cardiovascular	ER β 1, myocardin, telokin	Heidersbach et al. 2013; Wylstub et al. 2013; Wei et al. 2013
	miR-181-5p	0	0	1	0	1	0	1	0,47	Supresor de tumores	KRAS,matrix metalloproteinase MMP-14, c-Met	Korhan et al. 2015; Ma et al. 2015
	miR-200b-3p /429-3p	0	1	0	0	0	0	1	0,43	Supresor de tumores	Zeb1, multiple members of RAB family, extracellular-regulated protein kina	Ye et al. 2014; Wu et al. 2016; Gui et al. 2016
	miR-203	1	0	0	0	0	0	1	0,38	Supresor de tumores, desarrollo de la piel	p63, Snail2, LIM and SH3 domain protein 1 (LASP1)	Yi et al. 2008; Wang et al. 2010; Zhang et al. 2011; Benaich et al. 2014; Shi et al. 2014
	miR-33-5p	0	0	1	0	1	0	1	0,31	Desarrollo de osteoblastos y osteocitos	Special AT-rich sequence-binding protein 2 (SATB2), high-mobility group AT-hook 2(HMGA2)	Mi et al. 2016; Wang et al. 2016
	miR-155	0	0	0	0	1	0	0	0,23	Oncogen	ELK3 (ETS Transcription Factor), several mRNAs	Gracias et al. 2012; Robertson et al. 2012; Forzati et al. 2012
	miR-32-5p /92-3p/367	0	0	0	0	0	1	0	0,22	Oncogen	Pten, Smad7, estrogen-related receptor β (ER β 1)	Zhu et al. 2013; Zhang et al. 2015; Sharifi et al. 2016; Salehi 2016

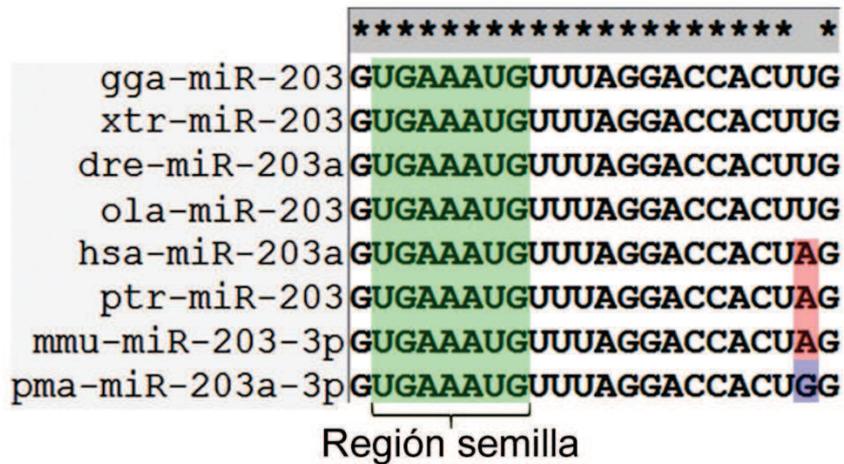


Figura 15: Alineamiento múltiple de la secuencia de miR-203 maduro en vertebrados

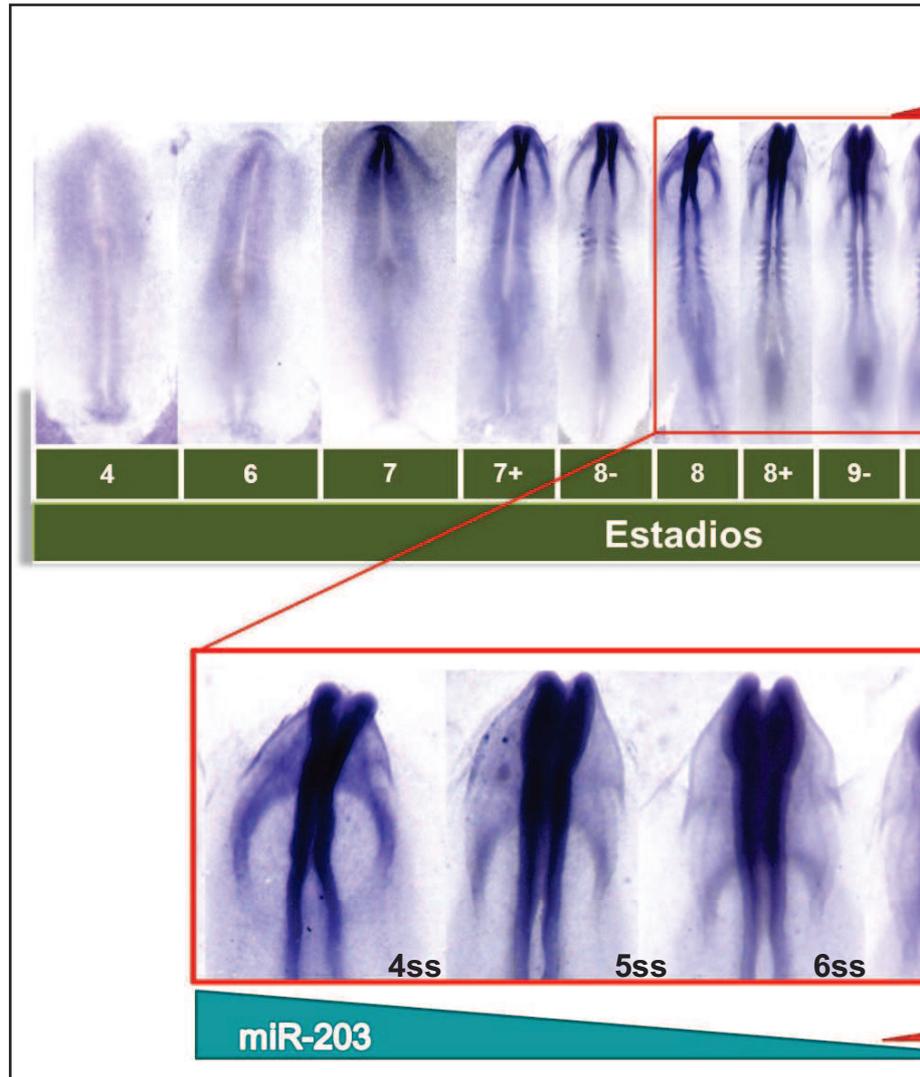
Marcado en verde se encuentra la región semilla de alta conservación entre todas las especies de vertebrados analizados. En rojo y azul un SNP en mamíferos y en un ejemplo de vertebrado basal, respectivamente. gga (*Gallus gallus*, gallo), xtr (*Xenopus tropicalis*, rana), dre (*Danio rerio*, pez cebra), ola (*Oryzias latipes*, medaka común), hsa (*Homo sapiens*, humano), ptr (*Pan troglodytes*, chimpancé), mmu (*Mus musculus*, ratón) y pma (*Petromyzon marinus*, lamprea).

6. 2. Patrón de expresión espacio-temporal del miR-203

Con el fin de determinar si miR-203 podría cumplir algún rol en la regulación del desarrollo de las CCN es que decidimos estudiar su expresión espacio-temporal mediante HIS utilizando una sonda LNA específica. Nuestros resultados muestran que miR-203 se expresa desde etapas muy tempranas del desarrollo (st. 4) en la placa neural y el borde de la placa neural, lugar donde se especifican las CCN. También observamos marca en el borde del surco primitivo en donde las células se invaginan y luego delaminan durante la gastrulación. Luego, la expresión se evidencia notoriamente en los pliegues neurales desde estadio 8 (4ss, 4 somitos) y se va atenuando en estadio 9 (7ss), momento en el cual las CCN comienzan a delaminar del tubo neural (Fig. 16). Finalmente, en estadios mayores al 10 (10ss) no fue posible evidenciar expresión en las CCN migratorias.

Figura 16: Análisis estadio-específico de la expresión de miR-203 mediante hibridación *in situ* con sonda LNA

Se muestra el patrón de expresión del gen gga-miR-203 en embriones de pollo desde el estadio 4 hasta estadio 10. miR-203 se expresa desde el estadio 4 en el ectodermo neural y no neural y, a partir del estadio 8 en la región del tubo neural. En la imagen se recalca como a partir del estadio 9 empieza a disminuir la señal del miR-203, lo que concuerda con el inicio de la migración de las CCN.



Para evaluar en mejor detalle la expresión de miR-203, decidimos realizar cortes transversales de las HIS al momento del inicio de la TEM (7ss) y luego de que todas las CCN hayan delaminado del tubo neural (9ss). Además, decidimos detectar en estos mismos cortes, mediante IHQ, las proteínas PAX7 y SNAIL2 involucradas en la especificación y migración de las CCN, respectivamente. Nuestros resultados demuestran claramente que miR-203 se expresa en las CCN pre-migratorias, ubicadas en la región más dorsal del tubo neural (Fig. 17 A). Mientras que en las CCN delaminantes y migratorias su expresión es evidentemente menor (Fig. 17B). Contrariamente a esto, observamos que SNAIL2 es fuertemente detectado en las CCN migratorias y en las más dorsales del tubo neural próximas a delaminar. Por otro lado, el marcador PAX7, como era de esperar, fue homogéneamente detectado en todas las CCN (Fig. 17C). Estos resultados muestran una expresión antagónica entre miR-203 y su posible blanco funcional SNAIL2, lo cual refuerza su posible rol regulatorio relacionado con la TEM de las CCN.

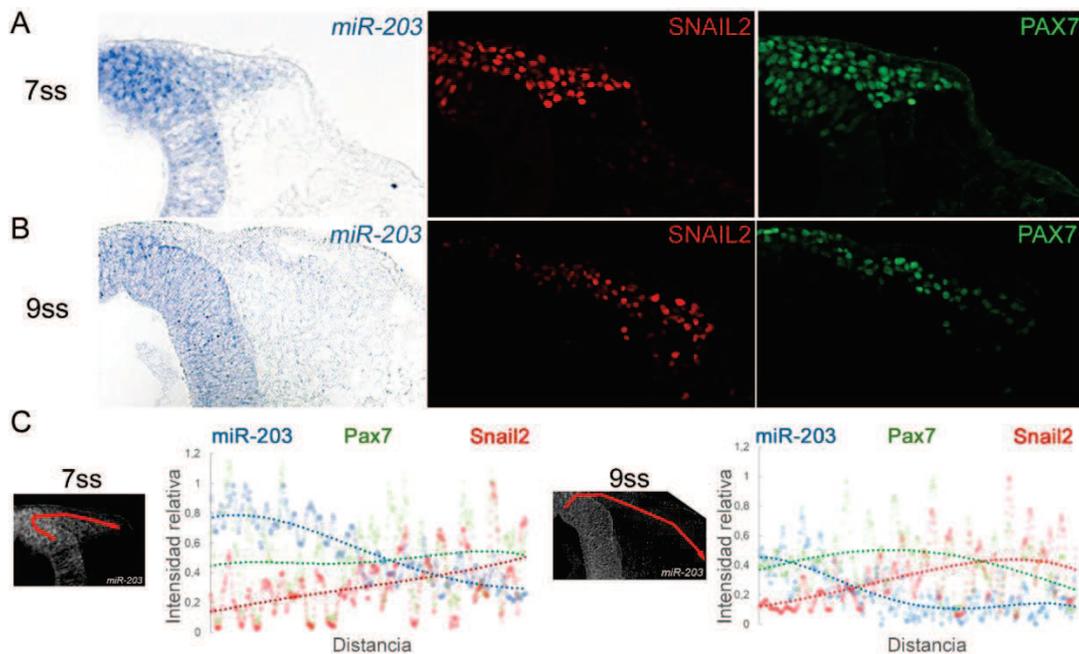


Figura 17: La expresión de miR-203 es específica de las células de la cresta neural pre-migratorias.

Secciones transversales de la ISH de miR-203 seguidas de IQH contra SNAIL2 (rojo) y PAX7 (verde). Podemos observar claramente que, en estadio 7ss, miR-203 se expresa en las CCN pre-migratorias y delaminantes (A). Mientras que en estadio 9ss, miR-203 no se encuentra en las CCN migratorias (B). C) Análisis de intensidad demuestran que durante el inicio de la TEM (7ss), mientras más distancia las CCN migran del tubo neural presentan mayor intensidad de SNAIL2, mientras que no existe diferencias en el marcador PAX7 cuando las CCN delaminan (7ss) o migran (9ss).

Considerando los resultados anteriores, y para obtener información cuantitativa acerca de los niveles de expresión de miR-203 durante diferentes estadios del desarrollo de las CCN, así como también relacionar su expresión con la de sus posibles blancos funcionales *Snail2* y *Phf12*, realizamos RT-qPCR durante los estadios 5ss hasta 9ss. Nuestros resultados confirman que miR-203 se detecta en estadios pre-migratorios (5ss), y luego, previo al inicio de la migración (6ss), una disminución en sus niveles de expresión es coincidente con un aumento en la expresión de sus tentativos blancos *Snail2* y *Phf12* (Fig. 18). Tomando en conjunto estos resultados demuestran que la expresión de miR-203 es reprimida al momento de la delaminación de las CCN, pudiendo esto ser un paso clave durante el inicio de la TEM de estas células.

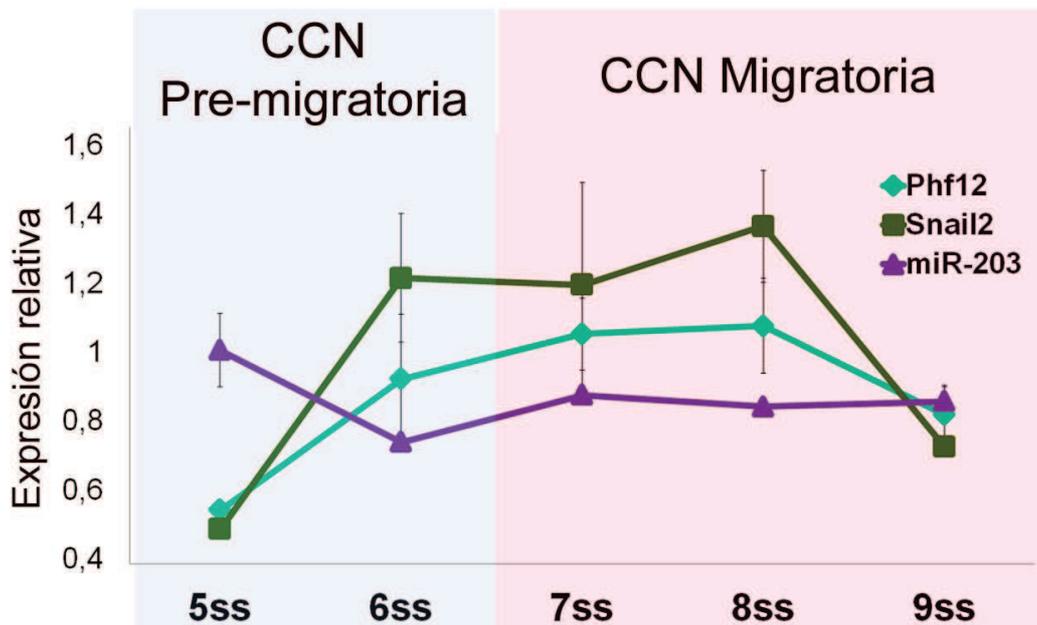


Figura 18: La expresión de miR-203 es recíproca a sus blancos tentativos *Snail2* y *Phf12*

Los análisis de RT-qPCR muestran que la expresión relativa de miR-203 va reduciéndose durante los estadios 5 a 6ss, momento en el que los blancos tentativos *Snail2* y *Phf12* aumentan su expresión para dar comienzo a la TEM de las CCN. Este mismo patrón recíproco se observa más adelante en las CCN migratorias (estadios 7-9ss).

6. 3. Efecto de la ganancia de función del miR-203 sobre la migración de las células de la cresta neural

Con el fin de determinar si miR-203 tenía algún rol funcional sobre la TEM de las CCN, procedimos a realizar experimentos de ganancia de función. Para realizar estos experimentos, se diseñó y obtuvo un vector de sobreexpresión constitutiva que contiene la secuencia genómica del miR-203 (pCAG-203), incluyendo 250pb a cada lado del microARN, requerida para la correcta formación y procesamiento de la estructura de tallo-bucle (ver esquema en la figura 19A). Inicialmente, validamos mediante HIS con la sonda LNA contra miR-203, que la electroporación de este vector en el lado derecho de los embriones (Fig. 19B) mostraba una expresión robusta (Fig. 19C). Por otro lado, para probar el correcto procesamiento y consecuente funcionalidad de este microARN, decidimos utilizar un vector sensor dual (pSdmiR). De manera general, este vector contiene dos promotores constitutivos que regulan la expresión de un marcador fluorescente rojo (RFP) y verde (d4GFP), este último conteniendo en la región 3'UTR sitios de unión a miR-203, pSDmiR-203 (Fig. 20A). El diseño del experimento fue el siguiente (Fig. 20B): en el lado izquierdo, lado control, se inyectó el vector sensor junto al vector de sobreexpresión control (pCAG), mientras que en el lado derecho se inyectó el sensor junto con el vector de sobreexpresión de miR-203 (pCAG-203). La funcionalidad de este vector fue demostrada al observar que en lado control todas las células expresan tanto RFP como d4EGFP, mientras que en lado donde se sobreexpresó miR-203 la expresión de d4EGFP se redujo considerablemente (Fig. 20C).

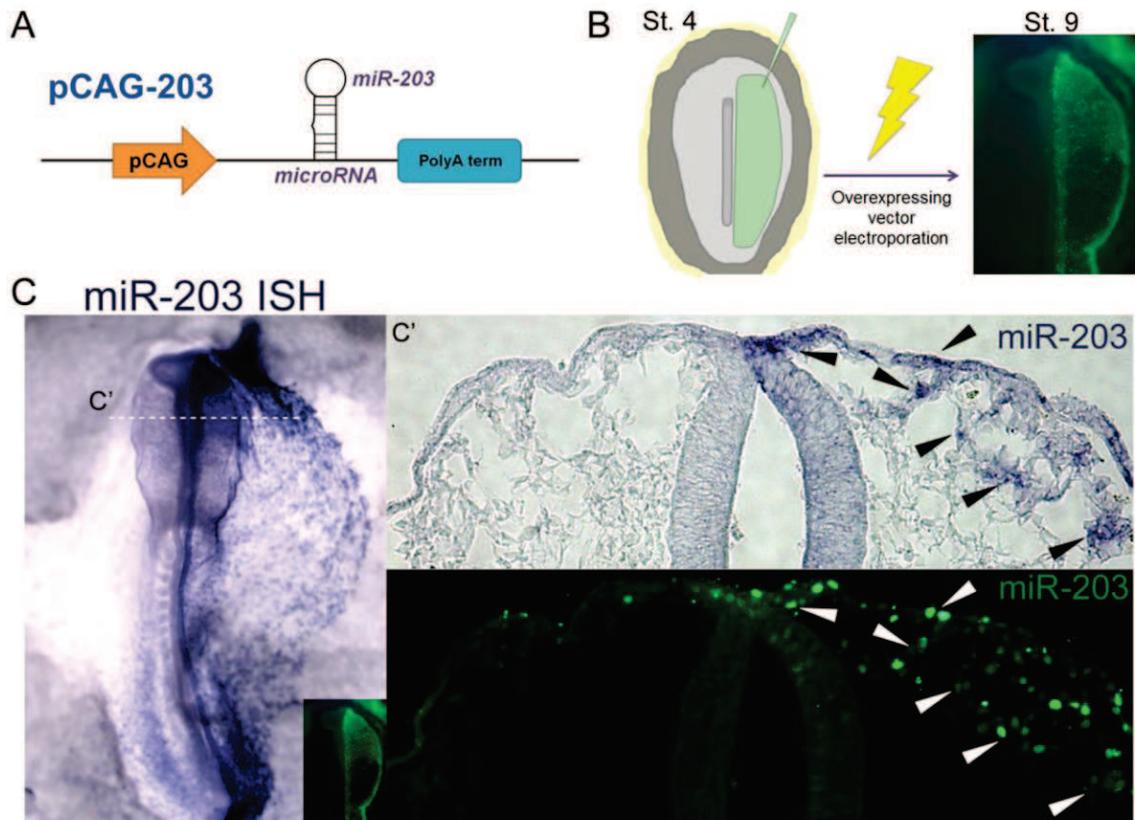


Figura 19: Plásmido de sobreexpresión constitutiva de miR-203

A) Vector de sobreexpresión constitutiva de miR-203. Este vector cuenta con el promotor constitutivo fuerte pCAG y el sitio poli-A. B) Descripción esquemática de la electroporación del vector de sobreexpresión y control en estadio 4. Después de 20 horas de cultivo *in vitro* se determina la eficiencia de electroporación en base a la fluorescencia verde. C) Hibridación *in situ* usando sondas LNA contra el miR-203. El vector de sobreexpresión pCAG-203 junto a un vector que expresaba la proteína fluorescente verde (GFP) fueron inyectados y luego electroporados en la región derecha del embrión. Podemos corroborar fácilmente que miR-203 se sobreexpresa en la región inyectada. C' Corte transversal donde se observa mejor que aquellas células más fluorescentes sobreexpresan mejor a miR-203 (ver flechas negras).

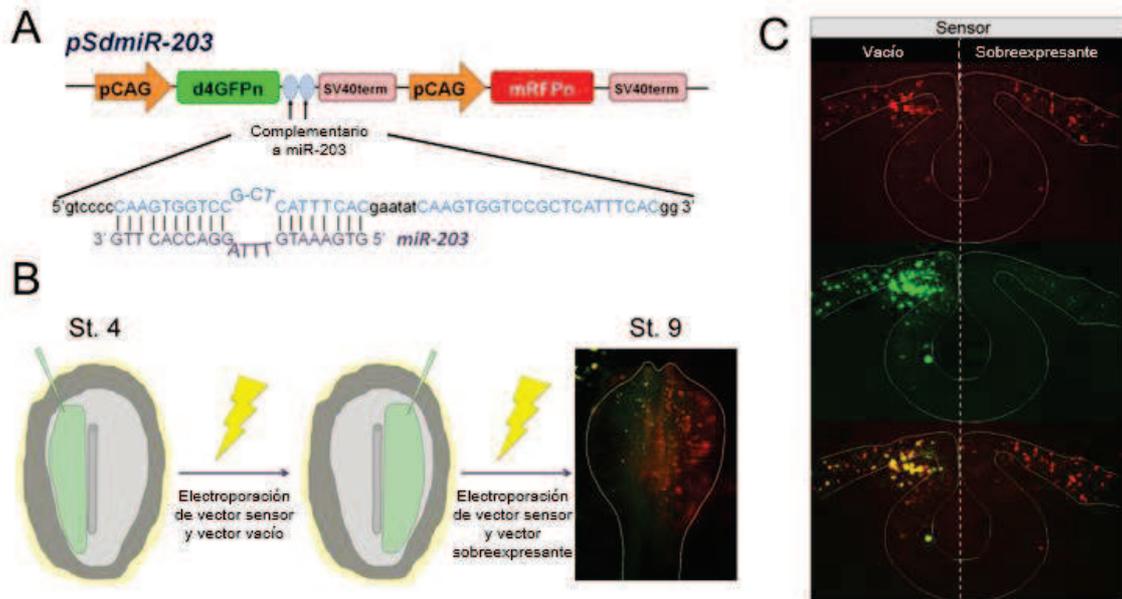


Figura 20: Determinación de la funcionalidad del vector de sobreexpresión de miR-203

A) Vector sensor, pSdmiR-203. Este vector se caracteriza por poseer dos marcadores fluorescentes bajo promotores independientes pCAG. Posee a la proteína fluorescente roja (RFP) como control de electroporación, y a la proteína fluorescente verde (d4GFP, 4 horas de vida media) la cual en su 3'UTR posee dos sitios de unión a miR-203. B) Diseño experimental para el análisis del vector sensor dual. En el lado izquierdo se inyectó el sensor junto al vector vacío y se procedió a dar un shock eléctrico; dejamos recuperar al embrión e inyectamos en el lado derecho al sensor junto con al vector de sobreexpresión y damos un segundo shock eléctrico. Finalmente cultivamos *in vitro* por 17 horas y analizamos los embriones. C) El vector pCAG-203 es capaz de inhibir la expresión de d4GFP. Podemos observar que el lado derecho presenta menos fluorescencia verde, y que cuando se realiza un merged de las fluorescencias, la mayoría de células del lado izquierdo son amarillas por la expresión de d4GFP y RFP, mientras que el lado derecho es rojo por la inhibición de GFP por miR-203.

Una vez demostrada la funcionalidad de nuestro plásmido de sobreexpresión de miR-203, procedimos a realizar los experimentos de ganancia de función para evaluar su efecto sobre la migración de las CCN. Considerando el rol de SNAIL2 y PHF12 en el desarrollo de las CCN, hipotetizamos que la sobreexpresión de miR-203 debería inhibir la migración de las mismas. En concordancia con esta hipótesis, mediante ISH contra *Tfap2b* e IHQ contra PAX7, se comprobó que la sobreexpresión de miR-203 reduce la migración de las CCN (Fig. 21). La cuantificación de embriones conteniendo dicho fenotipo, demuestra que la sobreexpresión de miR-203 aumenta significativamente el número de embriones que presentan defectos en la migración de las CCN, comparado con embriones control (Fig. 24B).

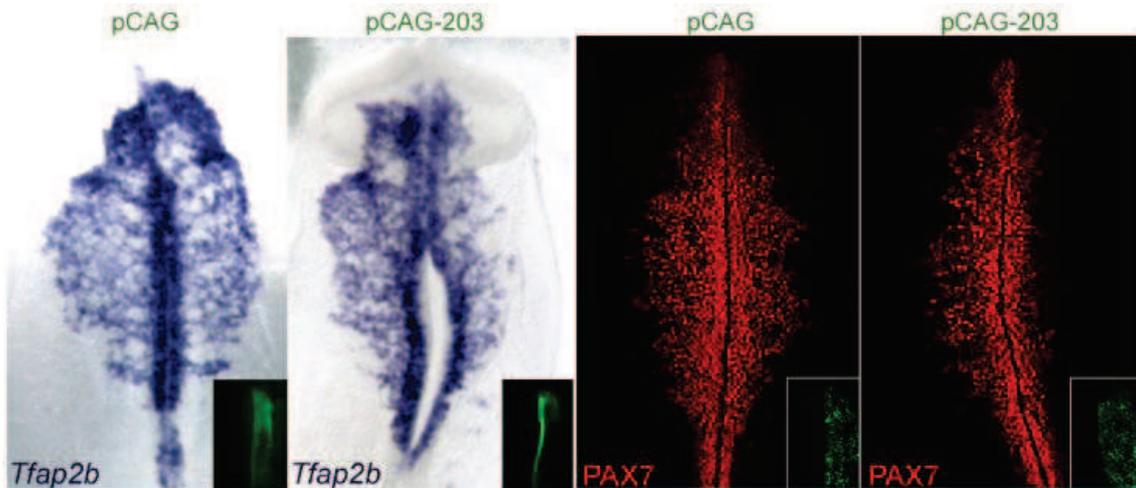


Figura 21: Sobreexpresión de miR-203 inhibe la migración de las células de la cresta neural

Hibridación *in situ* para *Tfap2b* e inmunofluorescencia contra PAX7 muestra inhibición de la migración de la CN en el lado inyectado con pCAG-203, en comparación con el lado no inyectado de los mismos embriones y con embriones inyectados con un vector pCAG vacío.

Los resultados anteriores demostraron que la sobreexpresión de miR-203 conduce a un menor número de CCN migratorias. Sin embargo, esto podría ser consecuencia de defectos en la especificación de las mismas que podría llevar dicha reducción. Con el fin de analizar esta posibilidad, evaluamos la expresión de FOXD3, uno de los FT que más temprano se expresa durante la especificación de las CCN; y SNAIL2 en un estadio pre-migratorio. Nuestros resultados de IHQ demuestran que la sobreexpresión de miR-203 produce una drástica disminución de las células SNAIL2+ (Fig. 22A), pero no afecta las células FOXD3+ (Fig. 22B). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de miR-203 afecta la expresión de SNAIL2 y la migración de las CCN, pero no su especificación.

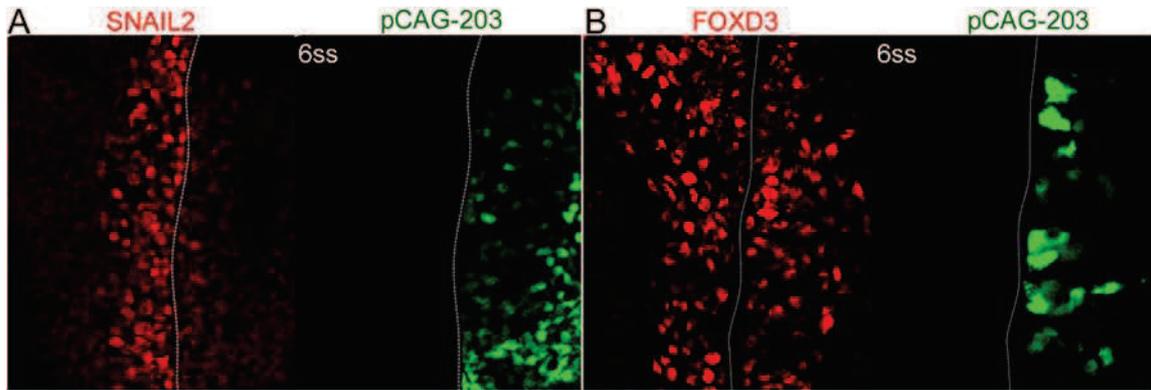


Figura 22: Sobreexpresión constitutiva de miR-203 no afecta la especificación de las células de la cresta neural.

Inmunohistoquímica contra los marcadores de las CCN A) FOXD3 y B) SNAIL2 en embrión electroporado con los vectores pCAG y pCAG-203. Nótese la disminución de la proteína SNAIL2 cuando se sobreexpresa miR-203, mientras que la proteína FOXD3 no se ve afectada.

Si bien estos resultados nos dieron el primer indicio de que miR-203 podría estar afectando la TEM a través de SNAIL2, es importante recordar que los principales reguladores de la TEM en las CCN son SNAIL2 y PHF12, quienes son requeridos para la represión transcripcional de la *Cad6b* (Strobl-Mazzulla and Bronner, 2012b). En este contexto, para determinar si miR-203 afecta la vía SNAIL2-PHF12/*Cad6b*, es que decidimos realizar un experimento de rescate epistático. Nosotros hipotetizamos que, al sobreexpresar miR-203 mantenemos reprimida la expresión de SNAIL2 y/o PHF12, y por lo tanto, no ocurriría la represión de la *Cad6b*. Considerando esta hipótesis nos planteamos que era posible rescatar el fenotipo de defectos en la migración mediante la pérdida de función de *Cad6b*. Esta pérdida de función se realizó mediante el uso de un morfolino contra la *Cad6b* (*Cad6b* MO) previamente caracterizado (Coles et al., 2007; Strobl-Mazzulla and Bronner, 2012b).

Para llevar a cabo este experimento de rescate, inicialmente validamos que la co-electroporación del vector de sobreexpresión de miR-203 junto con un morfolino control (pCAG-203/control MO) disminuye la expresión de SNAIL2 y genera una acumulación de la CAD6B en el lado inyectado (Fig. 23A-A'). Por otro lado, la co-electroporación del vector de sobreexpresión de miR-203 junto con *Cad6b* MO (pCAG-203/*Cad6b* MO) sigue causando la disminución de la expresión de SNAIL2, pero genera una depleción completa de la CAD6B en el tubo neural dorsal (Fig. 23A-A'').

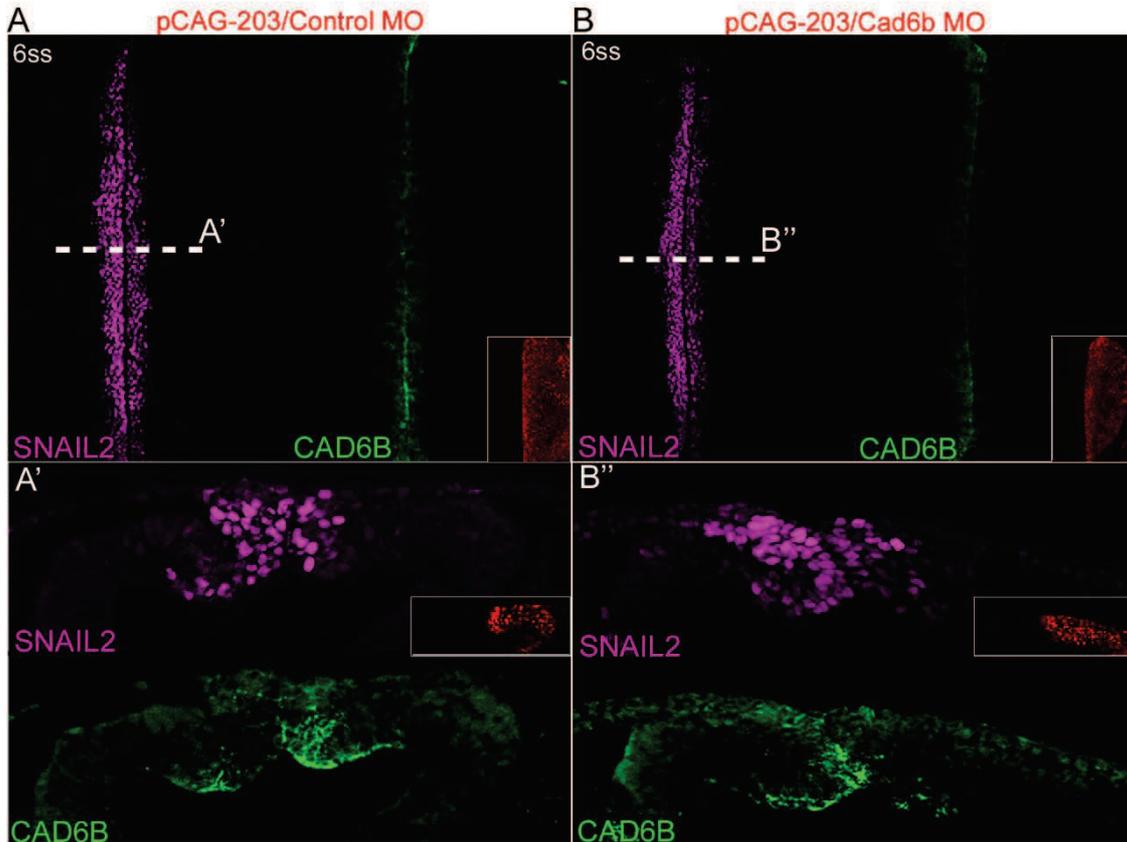


Figura 23: Sobreexpresión de miR-203 inhibe la expresión de SNAIL2 y genera una acumulación de CAD6B

A) En estadios de las CCN pre-migratorias (6ss), la co-inyección del vector que sobreexpresa miR-203 (pCAG-203) junto al control MO disminuye la expresión de SNAIL2 y genera una acumulación de la caderina 6b (CAD6B) en el tubo neural dorsal en comparación con el lado no inyectado (A'). B) Este fenotipo se rescata mediante la co-inyección de pCAG-203 con un morfolino contra la *Cad6b* (Cad6b MO), el sitio inyectado muestra una expresión similar de CAD6B en comparación con el lado no inyectado (B'').

Una vez demostrado que nuestro sistema funcionaba, decidimos realizar el experimento para rescatar el defecto observado en la migración de las CCN. Para ello, se co-electroporaron el vector pCAG-203 junto al control MO o Cad6b MO, se dejaron crecer los embriones hasta el estadio de 10ss y analizamos la expresión de *Tfap2b* y PAX7 (Fig. 24A). Los resultados obtenidos demuestran un rescate casi total de la migración de las CCN cuando se co-electroporaron pCAG-203 y Cad6b MO (Fig. 24B). Este experimento fue repetido tres veces de manera independiente y los embriones obtenidos fueron clasificados según el fenotipo de migración normal o inhibición de la migración en las CCN. Nuestro análisis estadístico de contingencia corrobora que la sobreexpresión de miR-203 (pCAG-203) inhibe la migración de las CCN, afectando la vía SNAIL2-PHF12/*Cad6b*, y que obtuvimos un rescate parcial al co-electroporar con el

Cad6b MO (Fig. 24B). Tomados estos datos en conjunto, nuestros resultados destacan el rol de miR-203 en la delaminación de las CCN, posiblemente afectando a los inductores de la TEM.

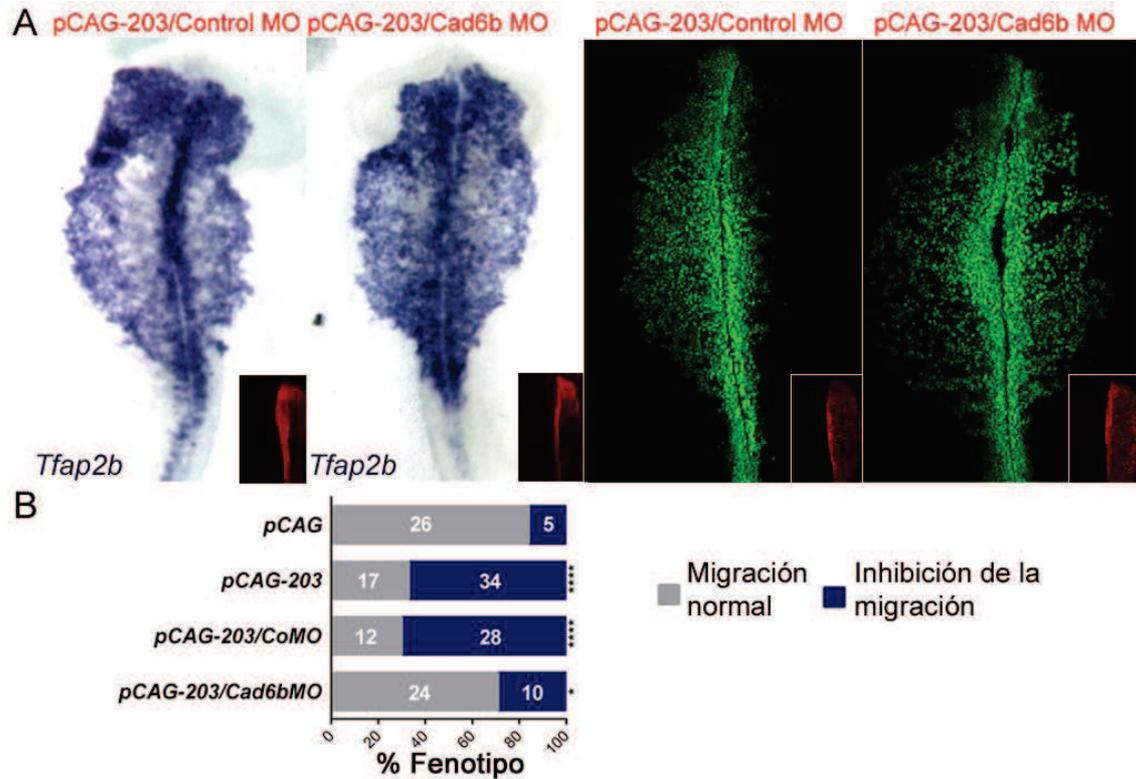


Figura 24: Sobreexpresión de miR-203 afecta la vía SNAIL2/PHF12-Cad6b

A) Hibridación *in situ* para *Tfap2b* e inmunofluorescencia contra PAX7 muestra inhibición de la migración de las CCN en el lado inyectado con pCAG-203/Control MO, en comparación con el lado no inyectado de los mismos embriones. Este fenotipo es parcialmente rescatado por la co-inyección de la Cad6b MO. B) Cuantificación de embriones de acuerdo a su fenotipo (migración normal versus inhibición de la migración) en el lado inyectado de pCAG, pCAG-203, pCAG-203/CoMO y pCAG-203/Cad6bMO. Los números en las gráficas representan los números de embriones analizados. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.05$ y **** $p < 0.0001$) en comparación con el vector pCAG por tabla de contingencia seguida de una prueba de X^2 .

6. 4. Efecto de la pérdida de función del miR-203 durante el desarrollo de las células de la cresta neural

Para demostrar la función endógena de miR-203 en la delaminación de las CCN planteamos realizar experimentos de pérdida de función. Para llevar adelante estos experimentos utilizamos dos métodos independientes, uno basado en el uso de un vector “esponja” diseñado en el laboratorio; y otro mediante el uso de un morfolino complementario al microARN maduro obtenido de fuentes comerciales.

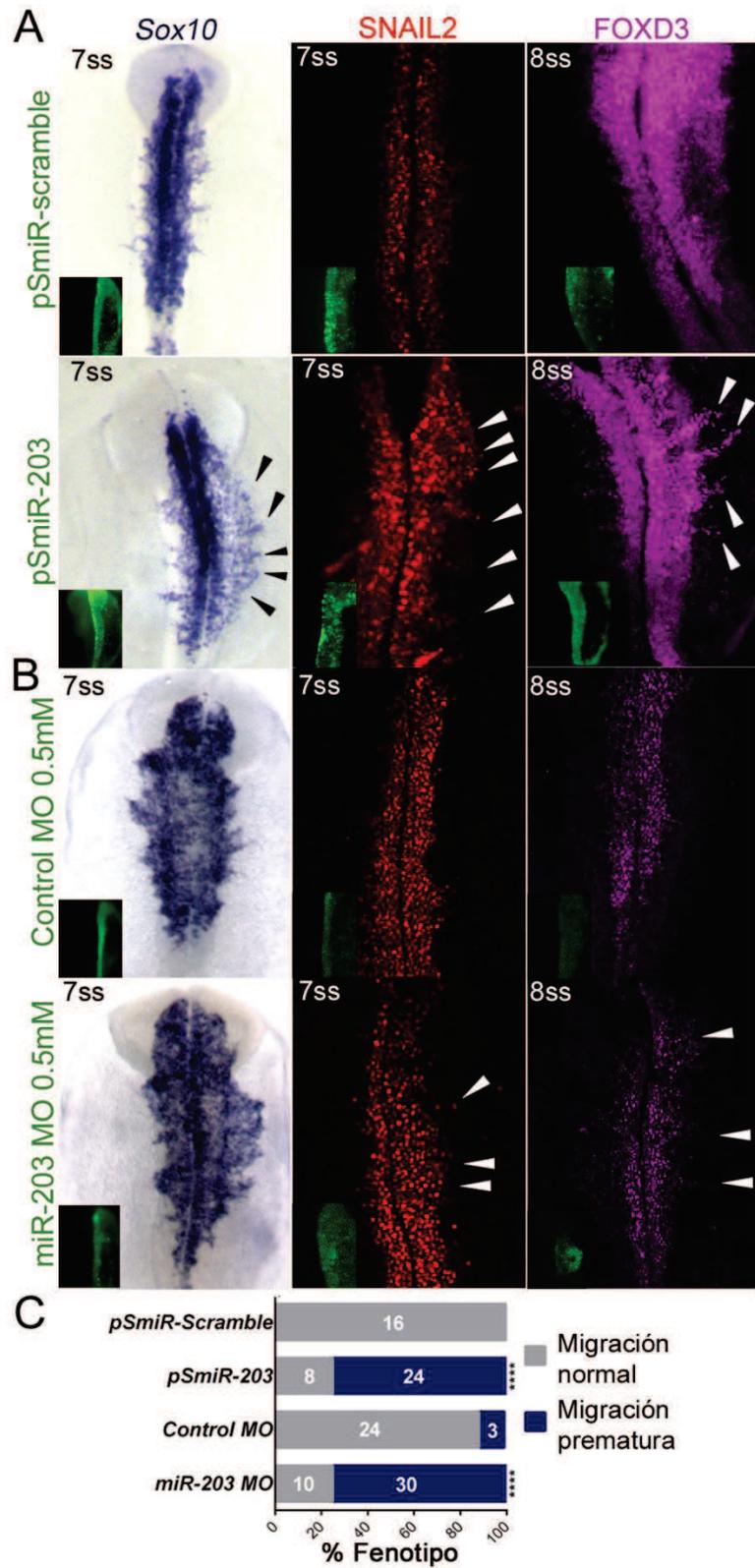
El vector esponja diseñado cuenta con un promotor constitutivo capaz de dirigir la expresión de EGFP, al cual se le ha insertado en su región 3'UTR 6 repeticiones de secuencias antisentido al miR-203 (ver materiales y métodos). La expresión de este vector funcionaría como una "esponja" capaz de capturar los miR-203 endógenos, produciendo una pérdida de la función de este microARN. Es importante destacar que, durante el diseño de este vector esponja se tuvo en cuenta la generación de secuencias semi-complementarias luego de la región semilla capaces de generar un bucle ("*bulged*") al interactuar con el miR-203, debido a que esto aumenta la efectividad de la esponja (Kluiver et al., 2012). Además, también se diseñó un plásmido control el cual contiene la secuencia de miR-203 al azar (pSmiR-scramble). Una vez obtenidos los mismos, los embriones fueron inyectados unilateralmente con estos plásmidos y luego electroporados antes de ser incubados hasta el estadio de análisis. Los resultados muestran que la pérdida de función del miR-203 lleva a una migración prematura de las CCN, evidenciada por los marcadores FOXD3, SNAIL2 y Sox10, comparada con el lado no inyectado o embriones electroporados con el vector scramble en donde aún no ha comenzado la migración (Fig. 25A).

Para aumentar la robustez de nuestros resultados de pérdida de función utilizando el vector esponja, es que decidimos utilizar un método alternativo como es el uso de un morfolino complementario a miR-203 (miR-203 MO). Los resultados también demuestran que la electroporación de miR-203 MO genera una migración prematura de las CCN (Fig. 25B), comparado con el lado no inyectado y con los inyectados utilizando un morfolino control (control MO).

Estos experimentos de pérdida de función fueron repetidos tres veces de manera independiente y los embriones obtenidos fueron catalogados según el fenotipo de migración normal o migración prematura de las CCN. Una vez cuantificados los embriones, nuestro análisis estadístico de contingencia corroboró que tanto pSmiR-203 como miR-203 MO generan migración prematura de las CCN comparado con los controles pSmiR-scramble y control MO, respectivamente (Fig. 25C). En conjunto, estos resultados demuestran que la pérdida de función del miR-203 endógeno lleva a una migración prematura de las CCN, posiblemente por la falta de inhibición de los posibles genes blanco *Phf12* y *Snail2* en estadios pre-migratorios.

Figura 25: Pérdida de función de miR-203 causa migración prematura de las células de la cresta neural

ISH para *Sox10* e IQH para *SNAIL2* y *FOXD3* muestra migración prematura de las células de la cresta neural en embriones electroporados con A) los vectores esponja: pSmiR-203/pSmiR-scramble o con B) los morfolinós: miR-203 MO/Control MO. Las puntas de flechas indican células de la cresta neural migrando prematuramente. C) Cuantificación de los embriones tratados con pSmiR-203, pSmiR-scramble, Control MO y miR-203 MO de acuerdo con la observación de migración prematura de las CCN. Los números en la gráfica representan los embriones analizados. **** $P < 0,0001$ por tabla de contingencia seguida de prueba de X^2 .



6. 5. Comprobación de los blancos de miR-203

Nuestros análisis *in silico* iniciales propusieron que los genes *Snail2* y *Phf12*, principales reguladores de la TEM de las CCN, podrían ser ambos blancos funcionales del miR-203. Por otro lado, los resultados obtenidos en las secciones previas evidenciaban que miR-203 sería un regulador clave en la delaminación de las CCN. Por este motivo, es que decidimos evaluar si los ARN mensajeros de *Snail2* y *Phf12* son efectivamente blancos directos de miR-203.

Considerando que los microARNs participan en la regulación post-transcripcional de sus ARN mensajeros blanco es que decidimos utilizar el vector sensor dual, mencionado con anterioridad, con la salvedad de que colocamos las regiones 3'UTR de *Snail2* o *Phf12* luego de la proteína fluorescente verde desestabilizada con solo 4 horas de vida media (d4EGFP) (Fig. 26A). Además, este vector contiene un segundo promotor que regula la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP) que sirve como control de que las células han sido electroporadas. Por otra parte, se diseñaron vectores que contienen mutaciones en los sitios de unión de miR-203 para ambos 3'UTRs (Fig. 26C-D).

El diseño experimental constó en inyectar en ambos lados del embrión el vector sensor conteniendo las regiones 3'UTRs normales (pUTR-*Snail2* o pUTR-*Phf12*) o mutadas (pUTR-mt*Snail2* o pUTR-mt*Phf12*), mientras que del lado derecho se co-inyectó junto al vector de sobreexpresión de miR-203 (pCAG-203) y en el lado izquierdo junto al control vacío (pCAG) (ver esquema de inyección y electroporación en la figura 26B). Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión de miR-203 disminuye notablemente los niveles de d4EGFP cuando contenían el 3'UTR de *SNAIL2* (pUTR-*Snail2*) o *PHF12* (pUTR-*Phf12*), comparado con el lado control izquierdo (Fig. 26C-D). Cabe destacar que cuando se mutaron los sitios de unión para miR-203 (dos para el caso de *Snail2* y uno para *Phf12*) no se observaron cambios en los niveles de fluorescencia a ambos lados del embrión (Fig. 26C-D). Estos experimentos demuestran fehacientemente que tanto *Snail2* como *Phf12* son blancos directos de miR-203.

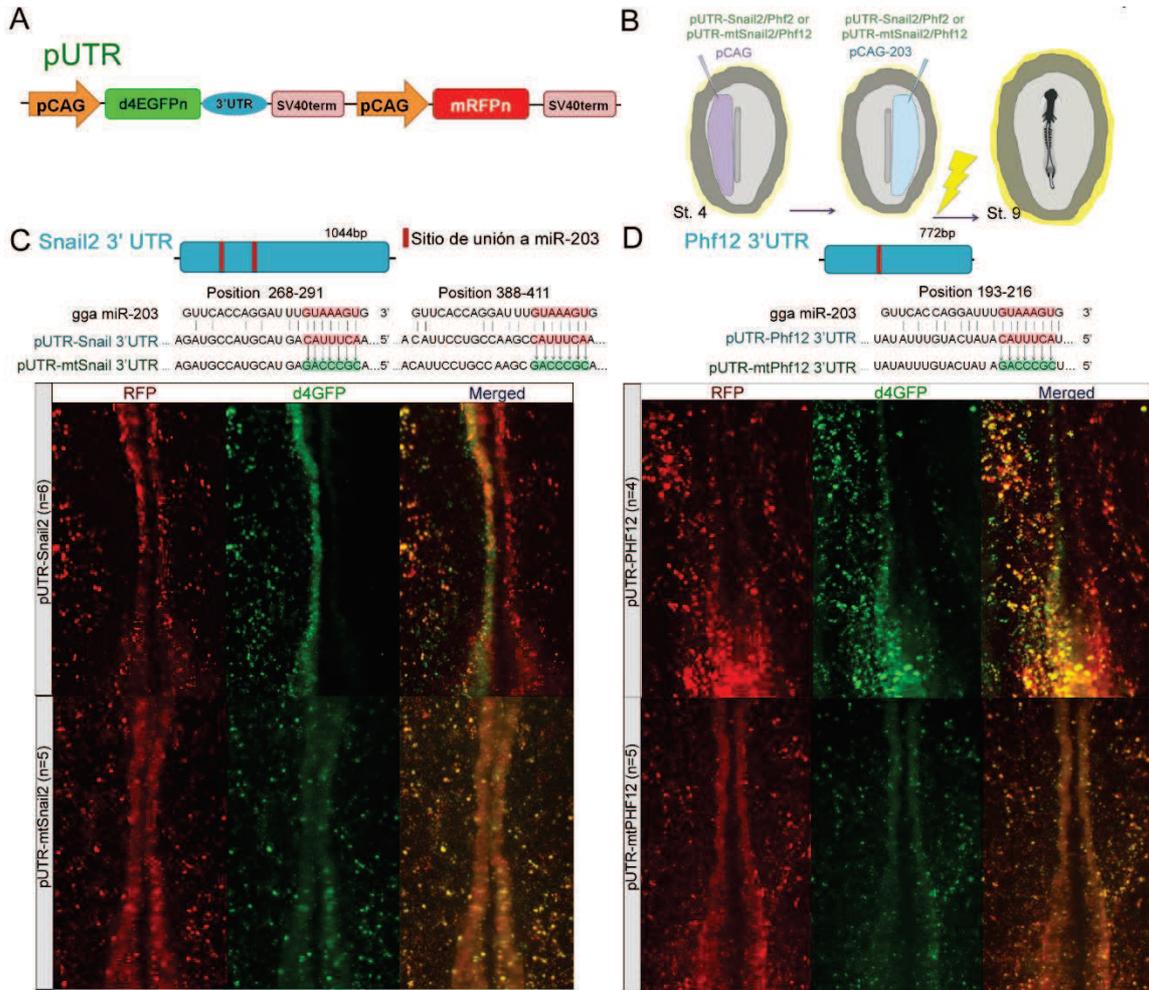


Figura 26: Snail2 y Phf12 son blancos de miR-203

A) Diagrama esquemático del vector sensor dual que contiene los 3'UTR wild type o mutadas (mt) de Snail2 (pUTR-Snail2) y Phf12 (pUTR-Phf12). pCAG, promotor de β-actina; d4EGFPn EGFP desestabilizada con localización nuclear con una vida media de 4 h; mRFPn, proteína fluorescente roja monomérica localizada en el centro nuclear. B) Diseño experimental para el ensayo GFP. Inicialmente, en estadio 4, se inyectará la mitad izquierda del embrión con el vector sensor correspondiente más el vector vacío, mientras que en el lado derecho se inyectará el mismo vector sensor con el sobreexpresante para miR-203. Se logró obtener dos vectores pUTR, uno con C) el 3'UTR de Snail2 y el otro con D) el 3'UTR de PHF12. Y como controles se generaron mutaciones en los sitios de unión del miR-203 en cada respectivo 3'UTR. La electroporación del vector sensor que contiene el 3'UTR para C) Snail2 (pUTR-Snail2) o D) Phf12 (pUTR-Phf12) junto con el vector de sobreexpresión de miR-203 (pCAG-203) causa una reducción constante en la expresión de d4EGFPn (lado derecho) comparado con el lado control (lado izquierdo). Mientras que los vectores controles, que poseen mutaciones de los sitios de unión de miR-203 en los 3'UTR de Snail2 (pUTR-mtSnail2) o Phf12 (pUTR-mtPhf12) rescatan esta reducción en la expresión de d4EGFPn. Se puede observar que la mayoría de las células electroporadas son amarillas, por la expresión de d4EGFPn y mRFPn, incluso cuando miR-203 se sobreexpresa (lado derecho).

6. 6. Regulación epigenética de la expresión de miR-203 en el desarrollo de las células de la cresta neural

6. 6. 1. Metilación del contexto genómico de miR-203 en el desarrollo normal de las CCN

Considerando que una gran parte de los microARNs antitumorales, incluyendo a miR-203 (Chim et al., 2011a; Chim et al., 2011b; Furuta et al., 2010; Huang et al., 2014; Moes et al., 2012; Taube et al., 2013; Wong et al., 2011; Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2011), son reprimidos epigenéticamente mediante metilación del ADN en sus regiones regulatorias (generalmente inmersas en islas CpGs), nos planteamos como objetivo evaluar si la represión de miR-203 al momento de la delaminación podría estar regulada epigenéticamente.

Inicialmente, se realizó un análisis *in silico*, usando la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) (Cunningham et al., 2014; Curwen et al., 2004; Hubbard et al., 2002), en donde pudo evidenciarse que miR-203 se encuentra inmerso en una isla CpG (Fig. 27A). Por otro lado, la metilación que regula microARNs ocurre principalmente en la región promotora, cercano al sitio de inicio de la transcripción (Ha and Kim, 2014; Vrba et al., 2013; Wang et al., 2012; Weber et al., 2007). Considerando lo anterior y con el fin de determinar qué regiones se analizarán, se realizó un análisis *in silico* mediante el uso del software Eponine (<https://www.sanger.ac.uk/science/tools/eponine>) en donde pudieron identificarse tres sitios tentativos para la iniciación de la transcripción del pri-miRNA. Estos resultados nos dieron una buena aproximación de la ubicación del promotor de miR-203, y decidimos analizar la metilación aguas arriba de la región promotora tentativa (región 1) y sobre el pri-miR-203 (región 2), ambas inmersas en la isla CpG (Fig. 27A). Finalmente, mediante secuenciación seguida del tratamiento con bisulfito, se analizó el estado de metilación de las dos regiones en muestras provenientes de CCN pre-migratorias (CCN-PM), CCN migratorias (CCN-M) y tubo neural ventral (TN).

Nuestros resultados mostraron un mayor porcentaje de metilación en las CpGs de ambas regiones para las muestras provenientes de las CCN-PM, comparado con las CCN-M y TN (Fig. 27B-C). Sin embargo, la región 2, próxima al pre-miR-203, fue la que presentó una mayor y significativa diferencia en las CCN-PM en

comparación con las otras muestras (Fig. 27C). En concordancia con nuestros resultados del patrón de expresión de miR-203, esta hipermetilación en su contexto genómico coincide con la disminución de su expresión al momento de iniciar el proceso de TEM en las CCN.

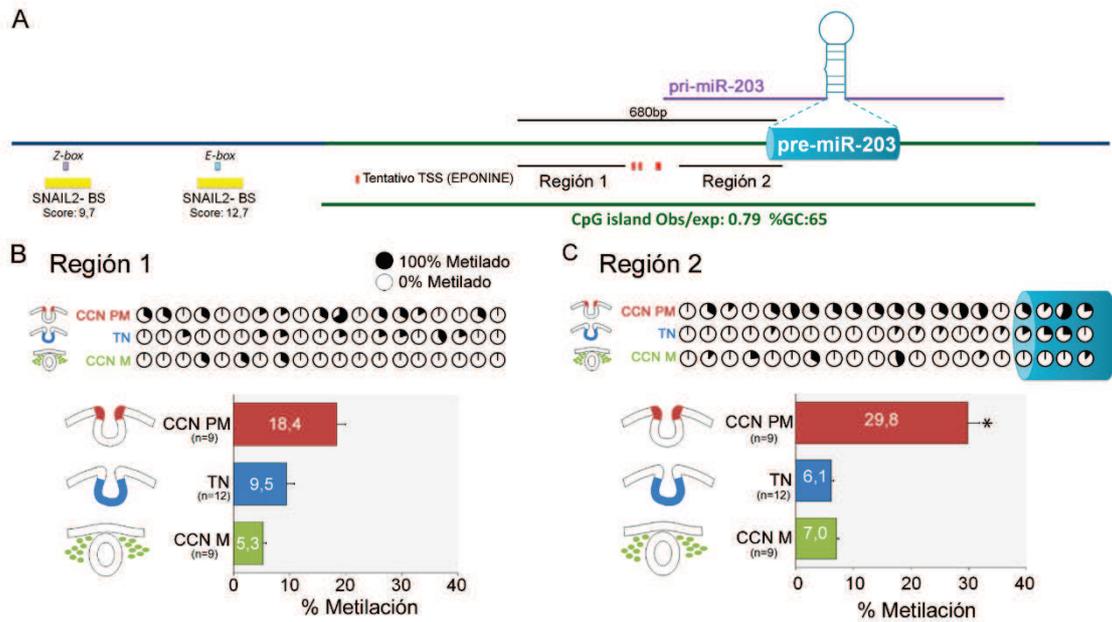


Figura 27: El gen de miR-203 se encuentra hipermetilado en las células de la cresta neural pre-migratorias

A) Contexto genómico del gen de miR-203. El contenido de la isla CpG (barra verde) para el gen miR-203 se identificó usando el navegador genómico UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>) y Ensembl (<http://www.ensembl.org/>). Los sitios putativos de inicio de la transcripción (TSS) se obtuvieron utilizando el software EPONINE (<https://www.sanger.ac.uk/science/tools/eponine>). Los supuestos sitios de unión para SNAIL2 se mapearon usando JASPAR 2018 (<http://jaspar.genereg.net/>). También mostramos las dos regiones utilizadas en nuestra secuenciación de bisulfito y el pre-miR-203 de acuerdo con el miRbase (<http://www.mirbase.org/>). Perfiles obtenidos por secuenciación de bisulfito de los sitios CpG metilados en la región 1 B) y la región 2 C). Se analizaron tres muestras: CCC pre-migratoria (CCN PM), CCN migratoria (CCN M) y tubo neural ventral (TN). El porcentaje de cada sitio CpG metilado se muestra dependiendo del relleno (100% metilado) y círculos abiertos (0% metilado). El gráfico de barras representa los porcentajes totales de metilación en los sitios CpG en las diferentes regiones para las tres muestras analizadas en la región 1 y en la región 2. Se puede observar un mayor porcentaje de sitios CpG metilados en las CCN PM en comparación con las otras muestras. El número entre paréntesis indicó las secuencias analizadas. El asterisco (*) indica diferencias significativas por ANOVA.

6. 6. 2. Análisis de los reguladores de la metilación del gen de miR-203

Los resultados anteriores nos sugieren que la represión de miR-203 podría estar mediada por la metilación de los nucleótidos CpG cercanos a su promotor. Con la finalidad de ahondar más sobre la represión transcripcional de miR-203 es que decidimos evaluar la participación de las metiltransferasas *de novo* DNMT3A y DNMT3B. Nosotros hipotetizamos que la pérdida de alguna de esta metiltransferasa afectará el estado de metilación de miR-203. Con el objetivo de comprobar nuestra hipótesis realizamos ensayos de pérdida de función mediante el uso de los morfolinolinos específicos DNMT3A-MO o DNMT3B-MO previamente caracterizados (Hu et al., 2012; Hu et al., 2014b). Para esto se inyectó unilateralmente cada morfolino en estadio 4, se electroporó y se dejó crecer los embriones hasta estadio pre-migratorio (7ss). Luego, los tubos neurales dorsales provenientes del lado inyectado (LI) o el lado control no inyectado (LNI) fueron disectados y se analizó mediante secuenciación por bisulfito, el porcentaje de metilación de la región 2. Los resultados muestran que la pérdida de función de la DNMT3B, pero no de la DNMT3A, resultó en una reducción significativa de la metilación en la región 2 del locus de miR-203 (Fig. 28A). Sin embargo, no descartamos que la DNMT3A pueda tener alguna participación menor en dicha regulación ya que observamos una aparente, pero no significativa, reducción en la metilación.

Si bien nuestros resultados demuestran que la metilación del locus de miR-203 es llevada a cabo mayoritariamente por la DNMT3B, esta requiere de otras proteínas para ser guiada al sitio de metilación. Generalmente este reclutamiento es mediado por factores de transcripción capaces de reconocer secuencias específicas de ADN (Okano et al., 1999). Es importante destacar que, durante la metástasis tumoral, SNAIL2 se une al promotor de miR-203 para inhibir su transcripción (Ding et al., 2013). Además, la inhibición de la expresión de miR-203 durante la metástasis tumoral también se lleva a cabo mediante la metilación de sus nucleótidos CpG (Taube et al., 2013). Considerando lo dicho, nosotros hipotetizamos que existe una relación entre la metilación y el reclutamiento de SNAIL2 en el contexto genómico de miR-203. Para verificar esto, inicialmente realizamos un análisis *in silico* usando el software JASPAR 2018 (<http://jaspar.genereg.net/>) en donde pudimos identificar dos sitios de

unión a SNAIL2 aguas arriba del promotor tentativo de miR-203 (Fig. 27A). Por otro lado, para poder determinar si el propio SNAIL2 podría estar involucrado en reclutar a la DNMT3B, y de esta forma reprimir epigenéticamente a miR-203 en las CCN pre-migratorias, es que decidimos realizar experimentos de pérdida de función usando un morfolino contra *Snail2* (Snail2-MO) previamente caracterizado (Taneyhill et al., 2007). Mediante el uso de Stem Loop RT-qPCR pudimos observar una mayor expresión ($p < 0.05$) de miR-203 a partir de tubos neurales dorsales disectados del lado inyectado con el Snail2-MO, comparado con el lado no inyectado (Fig. 28B). Coincidentemente, el análisis mediante secuenciación después del tratamiento con bisulfito demostró que este aumento en la expresión de miR-203 estaba acompañado con una disminución significativa en los niveles de metilación del locus de miR-203 (Fig. 28C). Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que el propio SNAIL2 podría ser el encargado de dirigir la metilación, mediada por la DNMT3B, al locus de miR-203 y de esta forma reprimir su expresión para dar inicio a la delaminación de las CCN.

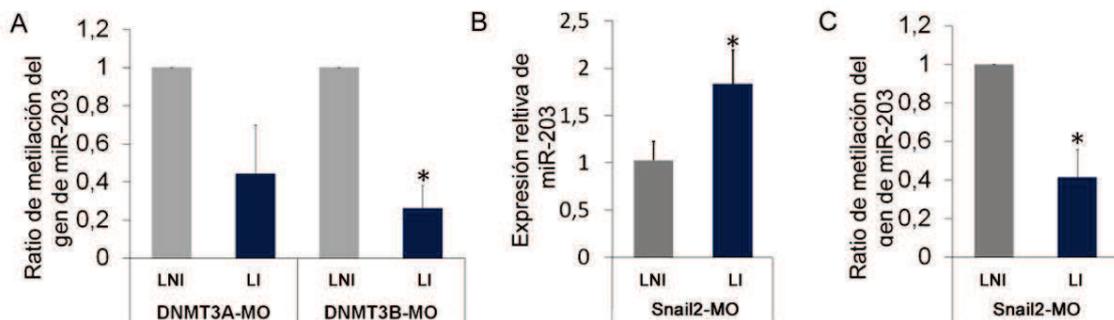


Figura 28: SNAIL2 y DNMT3B son necesarios para la metilación del ADN en el gen de miR-203 en las células de la cresta neural pre-migratoria.

A) La pérdida de función de las DNMT usando morfolinós: DNMT3A (DNMT3A-MO) y DNMT3B (DNMT3B-MO) da como resultado una reducción de los sitios CpG metilados en el lado inyectado (LI) en comparación con el lado no inyectado (LNI) del mismo grupo de embriones. Los clones independientes ($n = 10$) se secuenciaron a partir de dos muestras que contenían 6 embriones electroporados. B) Real time PCR muestra que, en los experimentos de pérdida de función mediante el uso de un morfolino contra *Snail2*, el nivel de miR-203 aumenta cuando la función de *Snail2* disminuye, lado inyectado (LI) comparado con el lado no inyectado (LNI). Consecuentemente, C) secuenciación bisulfito en los experimentos de pérdida de función de *Snail2* muestra que, en el lado inyectado (LI), el gen de miR-203 se encuentra hipometilado, comparado con el lado no inyectado (LNI). Estos resultados explican por qué el nivel de miR-203 aumenta en la pérdida de función de *Snail2*. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($P < 0.05$) según la prueba *t* de Student.

6. 7. Reversibilidad en la regulación epigenética de miR-203 durante la condensación de las células de la cresta neural

El análisis de metilación evidenció que el locus de miR-203 se metila para reprimir su expresión, y así permitir su delaminación de las CCN. Por otro lado, uno de los resultados que nos llamó mucho la atención es la rápida demetilación observada en las CCN migratorias (Fig. 27B-C). Sobre esta evidencia nos preguntamos si una demetilación activa de este microARN llevaría a su reactivación, posiblemente requerida durante la condensación de estas células.

Es importante recordar que las CCN, para adquirir capacidad migratoria, sufren una transición epitelio-mesénquima. De manera opuesta, al condensarse para formar ciertos ganglios craneales (trigémico, nodoso, petroso, geniculado y vestibuloacústico) se requiere la coalescencia de las mismas en un proceso de transición mesénquima-epitelio (TME) (Simoës-Costa and Bronner, 2015). Es importante destacar que la TME que ocurre durante la diferenciación de las CCN es similar a la que ocurre en las células tumorales durante la metástasis y el establecimiento de tumores secundarios (Takaishi et al., 2016; Yao et al., 2011). Esta evidente reversibilidad celular ocurre en varios tipos de cáncer, en donde además existe una dinámica reversible en las regulaciones epigenéticas de ciertos microARNs (DeCastro et al., 2013b; Morales et al., 2017; Nieto, 2013).

En este marco teórico, decidimos determinar si las principales proteínas que se encargan de la demetilación activa del ADN, las proteínas TET (Ten-elen translocation) (Cimmino et al., 2011; Jeltsch et al., 2018), se encuentran expresadas en el contexto del desarrollo de las CCN. Para esto, realizamos HIS con sondas específicas para las 3 TETs identificadas (TET1-3) y se evidenció la expresión de las mismas en las CCN pre-migratorias y migratorias (Fig. 29). Mientras que en estadios más avanzados la expresión de las TETs parece ser menos específica y más ubicua. Considerando que nosotros esperamos que las proteínas TET estén actuando en el gen de miR-203 durante la migración de las CCN, es importante destacar que en efecto se encuentran expresadas en este contexto.

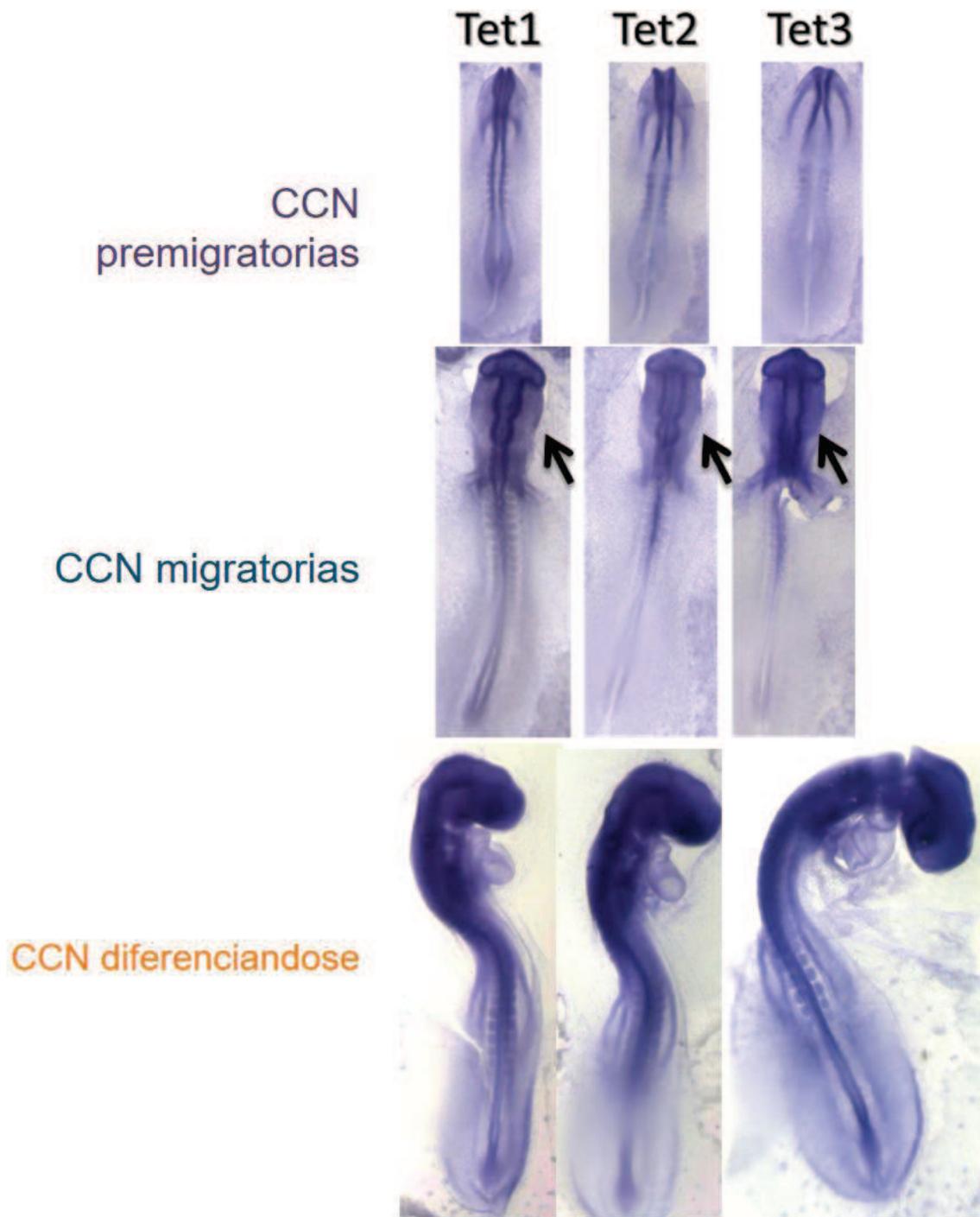


Figura 29: Patrón de expresión de los genes *TET1-3* durante los estadios de desarrollo de las células de la cresta neural

Hibridaciones *in situ* para los genes *TET1-3* durante estadios que representan la especificación, migración y diferenciación de las CCN. Es importante recalcar, que todas las proteínas de la familia TET se encuentra presentes en las CCN migratorias (flechas).

Es importante además mencionar que, no todos los derivados de las CCN tienen que someterse a la TME para diferenciarse. Aquellos que poseen propiedades mesenquimales como las CCN que van a formar estructuras craneofaciales no se someten a este proceso (Bronner, 2012). Sin embargo, los ganglios craneales derivados de las CCN tienen que condensarse previo a diferenciarse, para lo cual deben pasar por la TME (Shiau et al., 2008). Dentro de todos los ganglios craneales, el ganglio trigémino (GT) es el de mayor tamaño y su desarrollo temporo-espacial se encuentra bien descrito. En este contexto, nosotros hipotetizamos que, la re-expresión de miR-203 es un paso clave durante la activación de la TME en las CCN, similar a como ocurre en la formación de tumores secundarios (DeCastro et al., 2013a; Nieto, 2013), y proponemos que el GT es un buen modelo para estudiar la posible re-expresión de miR-203.

Considerando que nosotros observamos una rápida demetilación del locus de miR-203, esto no implica una re-expresión inmediata del gen de miR-203, de hecho, nuestros resultados de ISH no muestran expresión de miR-203 en las CCN que se encuentran migrando, evidenciadas por el marcador HNK1 (Fig. 30). Sin embargo, en estadio 16, momento en el cual las CCN empiezan a condensarse, pudimos observar algunas células que re-expresan miR-203 en lo que va a ser el core del GT. Luego, en estadio 20, pudimos observar claramente la re-expresión de miR-203 en el core del GT. Tomados en conjunto estos resultados demuestran que el miR-203 es expresado en un contexto en donde las CCN coalescen, junto con células provenientes de la placoda, para formar el ganglio trigémino (Shiau et al., 2008).

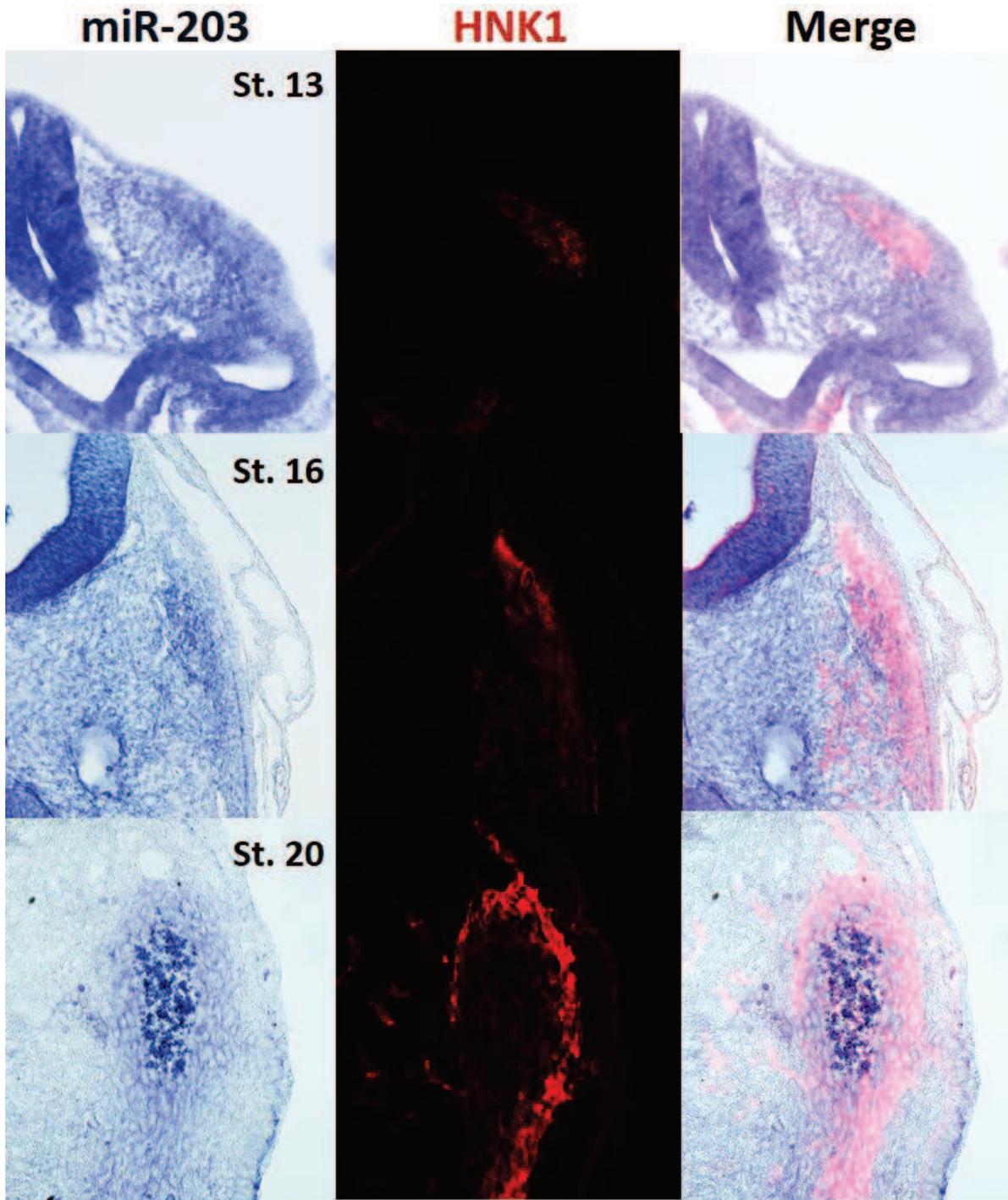


Figura 30: miR-203 se expresa durante el desarrollo del ganglio trigémino

Hibridación *in situ* contra miR-203 además de IQH contra HNK1 en cortes transversales de la cabeza. En estadio 13, momento en que las CCN migratorias llegan al nicho del ganglio trigémino, miR-203 parece estar enriquecido en el lugar HNK1+. En estadio 16, momento en el cual las CCN empiezan a condensarse, miR-203 parece estar expresado en el inicio del core del GT. Ambos resultados concuerdan con la expresión de miR-203 en estadio 20, donde se muestran cúmulos de expresión de miR-203 en el core del GT.

7. DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han demostrado la importancia de los microARNs durante el desarrollo de las CCN (Mayanil et al., 2015; Weiner, 2018). En un estudio reciente de secuenciado masivo se describió un conjunto de microARNs asociados al desarrollo temprano de las CCN, los cuales podrían cumplir roles importantes durante la especificación (Ward et al., 2018). Particularmente, se demostró que microARNs enriquecidos en las CCN, tales como miR-301a y miR-338, tendrían un rol importante en el mantenimiento de la multipotencia de las mismas en estadios pre-migratorios. Por otro lado, el mismo año se describió a let-7 como uno de los principales microARNs encargado de inhibir genes que otorgan multipotencia, tales como *FoxD3* y *Pax7*, permitiendo así que las CCN puedan diferenciarse a sus derivados craneales (Bhattacharya et al., 2018). Además de tener un rol importante en la especificación y el mantenimiento de la pluripotencia, los microARNs juegan un papel crucial durante la migración de las CCN. Un estudio realizado en el pez medaka, demostró que la sobreexpresión de miR-204 promueve la migración de las CCN hacia las células del cristalino del ojo (Avellino et al., 2013). De manera contraria, la pérdida de función, mediante el uso de un morfolino, causa una migración aberrante a lugares donde las CCN no llegan y una morfogénesis anormal del ojo. Además, demostraron que miR-204 regula a la anquirina 13 (*Ankrd13A*), proteína que controla la formación de adhesiones focales, las cuales son requeridas para la migración de las CCN. Si bien se han caracterizado microARNs que cumplen un rol importante durante la especificación, migración y diferenciación de las CCN (ver revisión de Weiner 2018), poco se conoce acerca del rol que cumplen durante la delaminación y condensación de las mismas. Principalmente teniendo en cuenta las similitudes de estos procesos al de la metástasis tumoral, en donde diversos trabajos han demostrado la importancia de los microARNs. En base a lo dicho anteriormente, los resultados obtenidos en esta tesis ponen de manifiesto la importancia de los microARNs en la TEM, y posiblemente en la TME, de las CCN.

Considerando que los genes claves para el inicio de la TEM en las CCN de pollo son *Snail2* y *Phf12* (Strobl-Mazzulla and Bronner, 2012b), realizamos un profundo análisis *in silico* y bibliográfico el cual nos llevó a caracterizar en profundidad el rol de miR-203. Este microARN no había sido caracterizado en el

contexto del desarrollo embrionario, pero sí había sido asociado con la diferenciación de osteoblastos (Liu et al., 2019) y queratinocitos humanos (Nissan et al., 2011), proliferación de progenitores neurales en el cerebro de ratón (Liu et al., 2017) y procesos de regeneración de la retina (Rajaram et al., 2014) y cola en pez cebra (Thatcher et al., 2008). También ha sido asociado a patologías tales como osteoartritis (Guo et al., 2020), dermatitis (Koury et al., 2019), miocarditis (Li et al., 2019), psoriasis (Sonkoly et al., 2007) y osteoporosis (Yin et al., 2018). Sin embargo, uno de los contextos en donde miR-203 cobra una gran importancia es en el desarrollo tumoral. Se ha demostrado la represión transcripcional de este microARN en una gran cantidad de tumores, tales como cáncer de próstata (Viticchiè et al., 2011), vejiga y riñones (Gottardo et al., 2007), ovario (Iorio et al., 2007), páncreas (Greither et al., 2010), colon (Schetter et al., 2008), esófago (Feber et al., 2008), mama (Zhang et al., 2011) y leucemias (Bueno et al., 2008). Todas estas investigaciones evidencian que miR-203 es un microARN característico de las células con fenotipo epitelial, y que es reprimido epigenéticamente durante el inicio de la metástasis. Resultados que concuerdan con el rol que encontramos en las CCN.

Nuestros experimentos de ganancia y pérdida de función de miR-203 demostraron que su desregulación afecta específicamente el inicio de la TEM de las CCN (Fig. 21-25), debido a que controla la expresión de los ARN mensajeros de *Snail2* y *Phf12* (Fig. 26). Además, demostramos que miR-203 cumple un rol en la migración de las CCN al afectar la vía SNAIL2/PHF12-Cad6b (Fig. 23), confirmando así que miR-203 controla la regulación temporal de la migración de las CCN. Estos resultados demostraron por primera vez un microARN que afecta el inicio de la TEM y consecuente delaminación y migración de las CCN, así como un rol de miR-203 durante el desarrollo temprano de vertebrados. Si bien es la primera vez que se reporta una función de miR-203 durante el desarrollo embrionario, no es la primera vez que se lo asocia con la regulación de SNAIL y la TEM, ya que antes fue reportada su función en células tumorales (Ding et al., 2013; Furuta et al., 2010; Gao et al., 2017; Qu et al., 2013; Shi et al., 2015; Xiao et al., 2017; Zhang et al., 2011). Es así que nosotros demostramos un rol del miR-203 en un contexto no patológico, pero que concuerda con su función durante la metástasis tumoral.

Es importante mencionar que miR-203 se encuentra conservado en diversos vertebrados con una identidad del 99% en su secuencia y con un 100% de identidad en la región “semilla”, importante para el reconocimiento de sus ARN mensajeros blancos (Fig. 15). Además, nuestro análisis de conservación incluyeron a la especie *Petromyzon marinus*, lamprea, representante vivo de los vertebrados más antiguo que existe y el cual, actualmente, está siendo bastante utilizado para determinar los mecanismos regulatorios conservados durante la evolución de las CCN (Medeiros, 2013; Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008). Estos resultados nos dan indicios de que esta red de regulación, la cual involucra al miR-203, *Snail2* y *Phf12* podría ser un mecanismo conservado durante el desarrollo normal de las CCN en todos los vertebrados y sería muy interesante validar esta afirmación en otros modelos embrionarios tales como pez cebra, lamprea y ratón.

Como se mencionó anteriormente, se han descrito varios microARNs que desempeñan funciones importantes en el desarrollo de las CCN (Weiner, 2018), aunque poco se conoce de cómo son regulados transcripcionalmente. Sin embargo, durante el desarrollo del carcinoma hepatocelular (Furuta et al., 2010), se describió por primera vez que el silenciamiento de miR-203 esta mediado por una hipermetilación de su promotor para dar inicio a la TEM tumoral. Este silenciamiento de miR-203 produce que su gen blanco *Snail* aumente su expresión, lo que causa la inhibición de la expresión de la *Cad-E*, proceso fundamental para dar inicio a la TEM tumoral (Furuta et al., 2010). Posteriormente se describió este tipo de silenciamiento epigenético del miR-203, durante la activación patológica de la TEM en cáncer de mama (Taube et al., 2013; Zhang et al., 2011), leucemia (Chim et al., 2011b), melanoma (Chim et al., 2011a), cáncer inducido por exposición a níquel (Zhang et al., 2013), cáncer de endometrio (Huang et al., 2014) y rhabdomyosarcoma (Diao et al., 2014). Todas estas investigaciones pusieron en evidencia que la regulación epigenética de miR-203 es un paso fundamental para dar inicio a la metástasis tumoral. En concordancia con estas investigaciones, esta tesis demostró por primera vez que la regulación epigenética-microARN de miR-203 ocurre en un contexto no patológico y describimos también que, durante la TEM de las CCN, la expresión

de miR-203 es regulado epigenéticamente mediante metilación en sus nucleótidos CpG (Fig. 27).

La metilación de islas CpG asociadas a microARNs es un mecanismo esencial de regulación de este tipo de ARN de cadena simple (Lujambio et al., 2008). A diferencia de lo observado en diversos tipos de células cancerosas, la mayoría de las islas CpG ubicadas en el genoma de una célula normal se encuentran no metiladas (Esteller, 2007). Sin embargo, la metilación en islas CpG durante el desarrollo normal es un proceso altamente regulado, y otorga características específicas a distintos linajes celulares (Morales et al., 2017). Existe muy poca información sobre cómo está regulada la metilación en locus específicos durante el desarrollo temprano, sin embargo, se ha demostrado en cáncer y en fibrosis pulmonar que existe una retroalimentación negativa entre los microARNs y su propia metilación genómica (Bracken et al., 2008; de Souza Rocha Simonini et al., 2010; Moes et al., 2012; Siemens et al., 2011; Sun et al., 2013; Wang et al., 2017). En este contexto, los microARNs, las DNMTs y ciertos factores de transcripción se encuentran fuertemente interconectados formando redes de retroalimentación negativa brindando señales de auto-refuerzo y robustez (Jaenisch and Bird, 2003; Kiefer, 2007; Kiesslich et al., 2013; Kim et al., 2013). En otras palabras, aquellos factores que promueven la metilación del ADN en regiones regulatorias de microARNs, están a su vez regulados postranscripcionalmente por los mismos microARNs a los que inhiben. Si bien estas redes de retroalimentación negativa no habían sido demostradas durante el desarrollo temprano, existen varios ejemplos durante la TEM tumoral: ZEB1-SIP1/familia miR-200 (Bracken et al., 2008), el receptor de estrógeno alfa/miR-375 (de Souza Rocha Simonini et al., 2010), DNMT3A/miR-200c (Li et al., 2016a), SNAIL1/miR-203 (Moes et al., 2012) y SNAIL2/miR-34 (Siemens et al., 2011). En este contexto, esta tesis describe por primera la existencia de una retroalimentación negativa entre miR-203 y el propio SNAIL2 (Fig. 28) durante la metilación del locus de miR-203 reclutando a la DNMT3B. Esta serie de eventos es requerida para dar inicio y mantener la activación de la TEM en las CCN pre-migratorias.

Todos los resultados obtenidos en esta tesis, en conjunto, demuestran la existencia de una red epigenética-miARN íntimamente ligada a la regulación

espacio-temporal de la delaminación de las CCN (Fig. 31). Nuestro modelo propone que el miR-203 prevendría la migración prematura de las CCN. Luego, el silenciamiento epigenético de este microARN, mediante metilación dirigida por SNAIL2 y la DNMT3B, llevaría a un aumento en la expresión de sus genes blanco, PHF12 y SNAIL2. Por último, estos factores son requeridos para formar un complejo represor que inhibe la expresión de la *Cad6b*, necesario para que las CCN pierdan sus características epiteliales y comiencen la delaminación (Sanchez-Vasquez et al., 2019).

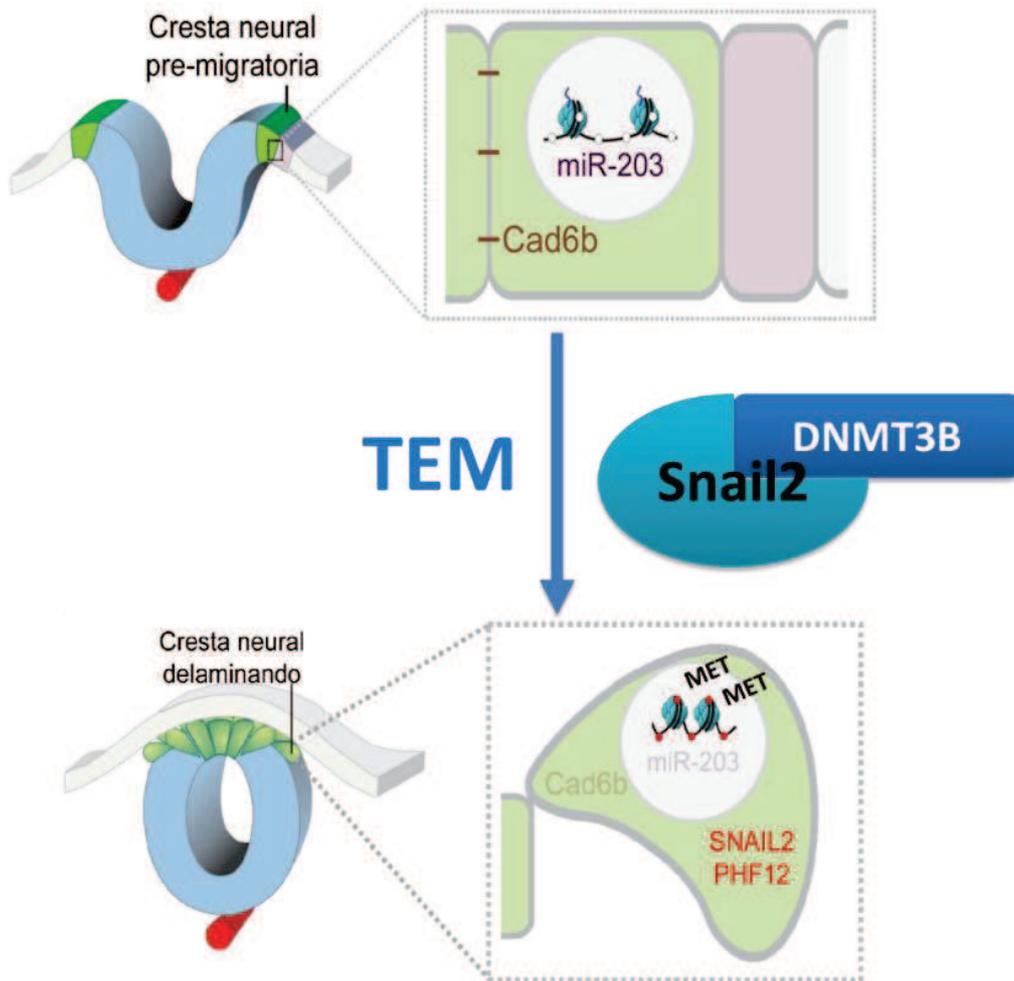


Figura 31: Modelo hipotético de regulación epigenética-microARN durante la migración de las células de la cresta neural

Nosotros describimos que, en las células de la cresta neural pre-migratoria, la DNMT3B y SNAIL2 inhiben epigenéticamente, a través de metilaciones, la expresión de miR-203, lo que permite indirectamente la expresión de sus genes blanco PHF12 y SNAIL2 y da inicio a la transición epitelio-mesénquima (TEM) de las células de la cresta neural.

Por otro lado, algo que llamo muchísimo la atención son nuestros resultados de bisulfito, los cuales mostraron una rápida demetilación del gen del miR-203 en las CCN migratorias (Fig. 27). Estos resultados nos llevaron a hipotetizar si las

CCN migratorias tienen la capacidad de reexpresar miR-203. Esta reexpresión podría estar relacionada con una reversibilidad del proceso de TEM y en la capacidad de que estas células puedan iniciar un proceso inverso de transición mesénquima-epitelio (TME), como el que ocurre en algunos sitios donde la diferenciación de los derivados epiteliales de las CNN se lleva a cabo (Simoès-Costa and Bronner, 2015). De manera similar, la reexpresión de microARNs, tales como miR-200 y miR-203, ha sido descrita en varios tipos de cáncer durante la formación de tumores secundarios (Davalos et al., 2012; DeCastro et al., 2013a; Gunasinghe et al., 2012; Yao et al., 2011). Además, considerando la función de miR-203 en la gran variedad de tipos de cáncer, recientemente se ha propuesto usar la expresión de miR-203 como un indicador de metástasis tumoral en cáncer colorectal (Hur et al., 2017).

Es importante considerar que nuestro resultado, mostrando una rápida demetilación en el locus de miR-203 en las CCN migratorias, indica un mecanismo de demetilación activa que no podría explicarse por una dilución de la marca como consecuencia de las divisiones celulares. En este contexto, describimos que los genes *Tet* (*Tet1*, *Tet2* y *Tet3*) se encuentran expresados en los estadios en donde ocurre la demetilación del locus de miR-203 (Fig. 29). Estos resultados son coincidentes con lo observado en un trabajo reciente en donde, mediante el análisis de secuenciado masivo de ARN, se demuestra la presencia de altos niveles de expresión de los genes *Tet*, siendo *Tet1* y *Tet2* los más expresados en CCN migratorias (Williams et al., 2019). Es importante considerar que, si bien las proteínas TET se encuentran expresadas en este contexto, son los factores de transcripción los que dan especificidad a la acción de las mismas para demetilar genes específicos (Pastor et al., 2013). Es así que, en un futuro, sería interesante poder determinar qué factores de transcripción podrían guiar la demetilación del locus de miR-203 y cuál de las proteínas TET contribuye mayoritariamente a esta demetilación.

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años se ha demostrado la existencia de redes regulatorias epigenética-microARNs capaces de controlar los procesos de TEM y TME en células tumorales (Dongre and Weinberg, 2019; Holubekova et al., 2017; Humphries et al., 2019; Jeziorska et al., 2017; Lu and Kang, 2019; Nieto et al., 2016; Skrypek et al., 2017). Sin embargo, el estudio *in*

vivo de la TME en cáncer es muy complejo e impredecible, ya que unas pocas células colonizan el nuevo tejido, que en muchos casos también pueden ser muy variable. En contraste, el desarrollo de las CCN está altamente regulado, se conocen las vías migratorias y el lugar en donde las mismas se condensarán para poder hacer estudios funcionales más precisos (Shiau et al., 2010; Shiau et al., 2008). Es por este motivo que profundizar en los mecanismos que llevan a la reactivación de miR-203 en las CCN y su posible rol en la condensación y TME de las mismas cobra gran relevancia.

Sobre la base de nuestros resultados finales presentados en esta tesis, en donde miR-203 se reexpresa a medida que las CCN coalescen para formar el ganglio trigémino (Fig. 30), es que planteamos una dinámica epigenética reversible (Fig. 32). En breve, durante la migración de las CCN, las proteínas TET demetilarían al locus de miR-203 para reactivar su expresión y dar inicio a la TME durante la condensación del ganglio trigémino. Experimentos que están siendo llevados a cabo en el laboratorio refuerzan el rol funcional de este microARN en dicho proceso, aunque aún queda el interrogante de encontrar cuales serían los blancos funcionales del mismo.

En resumen, durante esta tesis se demostró por primera vez una importante función de las regulaciones epigenética-microARN durante la TEM de las CCN, similar a los mecanismos descritos durante el desarrollo del cáncer (Cano and Nieto, 2008; Nieto et al., 2016). Además, proponemos una reversibilidad en la metilación-demetilación del locus de miR-203 durante la dinámica epitelio-mesénquima de las CCN. En este contexto, es importante destacar que, en cáncer, se ha propuesto utilizar la droga imatinib, una droga que demetila el ADN de forma global como mecanismo supresor de tumores en leucemias (Shibuta et al., 2013). Mediante secuenciado masivo, en esta investigación se demostró que imatinib indujo la demetilación de la región promotora miR-203, incrementando su expresión y afectando la traducción del gen BCR-ABL1. Esta reexpresión del gen de miR-203 inhibe la metástasis tumoral y produce la apoptosis de las células leucémicas. En concordancia con nuestra hipótesis de que la reexpresión de miR-203 es fundamental para la TME, queda preguntarse si la reexpresión de miR-203 no aumenta la formación de tumores secundarios *in vivo*. Por lo tanto, la aplicación de este tipo de fármacos tiene que ir acompañada de un

conocimiento certero de la etapa del desarrollo del cáncer en la que se encuentra el paciente, ya que podría promover la colonización de células metastáticas. Finalmente, esta tesis propone varias preguntas no solo durante el desarrollo normal de las CCN, sino que también en un contexto patológico. Una mejor comprensión de los mecanismos normales de esta red regulatoria en las CCN nos daría un mayor entendimiento de los errores que pueden conducir a la pérdida del estado diferenciado de estas células y el consiguiente desarrollo anormal, así como también sobre la metástasis tumoral.

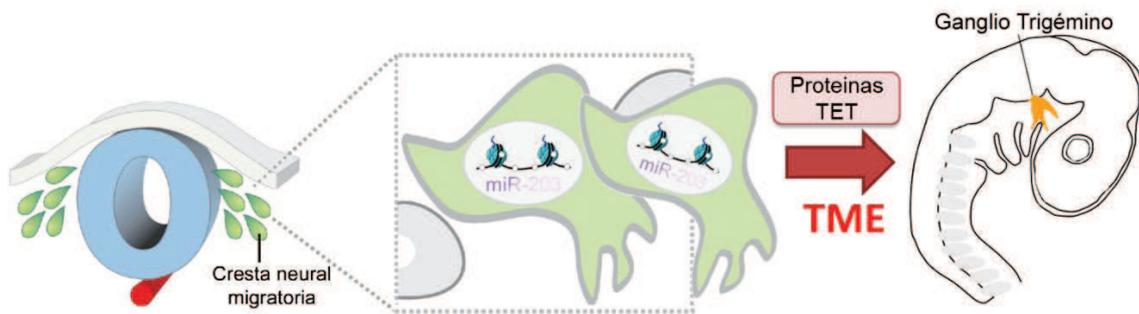


Figura 32: Modelo hipotético de regulación epigenética-microARN durante la diferenciación de las células de la cresta neural

Durante la migración de las CCN, alguna proteína TET se encarga de la demetilación del gen de miR-203, lo que conlleva a que las CCN intenten adquirir propiedades epiteliales nuevamente. Esto daría inicio al proceso de TME durante la condensación del ganglio trigémino.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó que reguladores claves de la TEM, los genes *Phf12* y *Snail2*, son blancos del mismo microARN, miR-203.
- Se determinó que la expresión de miR-203 inicia en el estadio 4 y continúa específicamente en la zona del desarrollo del tubo neural en estadio 8. Además, se observó que a partir del estadio de CCN pre-migratoria, su expresión se ve disminuida, mientras que la expresión de los genes blanco *Phf12* y *Snail2* aumenta para dar inicio a la TEM.
- Se observó que tanto la ganancia como la pérdida de función de miR-203 afecta específicamente la migración de las CCN, al afectar la vía PHF12/SNAIL2-*Cad6b*.
- Se determinó que la región genómica de miR-203 se encuentra hipermetilada en las CCN pre-migratorias, a diferencia de la hipometilación encontrada en las células del tubo neural ventral y CCN migratorias. La represión del locus de miR-203, mediante metilación del ADN, depende de la actividad de la DNMT3B la cual es dirigida por el propio SNAIL2.
- Se planteó un modelo hipotético de regulación epigenética-microARN ligado a la regulación espacio-temporal de la migración de las CCN (Sanchez-Vasquez et al., 2019).
- Basadas en los resultados de metilación, se hipotetizó que durante la migración de las CCN ocurre una demetilación del gen de miR-203 el cual puede estar dirigido por las proteínas TETs, las cuales se expresan en dicho contexto.
- Se describió que miR-203 se re-expresa durante la coalescencia de las CCN para formar el ganglio trigémino, lo cual puede ser consecuencia de demetilación de su locus y estar ligado al proceso de transición mesénquima-epitelio (TME).

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acloque, H., Wilkinson, D.G. and Nieto, M.A., 2008. In situ hybridization analysis of chick embryos in whole-mount and tissue sections. *Methods Cell Biol.* 87, 169-85.
- Ahmad, A., Li, Y., Bao, B., Kong, D. and Sarkar, F.H., 2014. Epigenetic regulation of miRNA-cancer stem cells nexus by nutraceuticals. *Mol Nutr Food Res.* 58, 79-86.
- Alata Jimenez, N., Torres Perez, S.A., Sanchez-Vasquez, E., Fernandino, J.I. and Strobl-Mazzulla, P.H., 2018. Folate deficiency prevents neural crest fate by disturbing the epigenetic Sox2 repression on the dorsal neural tube. *Dev Biol.* 444 Suppl 1, S193-S201.
- Aljerian, A. and Gilardino, M.S., 2019. Treacher Collins Syndrome. *Clin Plast Surg.* 46, 197-205.
- Alvarez-Garcia, I. and Miska, E.A., 2005. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development.* 132, 4653-62.
- Allis, C.D. and Jenuwein, T., 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet.* 17, 487-500.
- Ambros, V., 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell.* 107, 823-6.
- Ansieau, S., Collin, G. and Hill, L., 2014. EMT or EMT-Promoting Transcription Factors, Where to Focus the Light? *Front Oncol.* 4, 353.
- Avellino, R., Carrella, S., Pirozzi, M., Risolino, M., Salierno, F.G., Franco, P., Stoppelli, P., Verde, P., Banfi, S. and Conte, I., 2013. miR-204 targeting of Ankrd13A controls both mesenchymal neural crest and lens cell migration. *PLoS One.* 8, e61099.
- Bajpai, R., Chen, D.A., Rada-Iglesias, A., Zhang, J., Xiong, Y., Helms, J., Chang, C.P., Zhao, Y., Swigut, T. and Wysocka, J., 2010. CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature.* 463, 958-62.
- Baker, J.J. and Stoler, J.M., 2020. Recent developments in fetal alcohol spectrum disorder. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 27, 77-81.
- Balasubramani, A., 2017. PHDs crack the histone code. *Science.* 355, 1035-1037.
- Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M.A., 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 132, 3151-61.
- Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M.A., 2009. Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily. *Trends Genet.* 25, 248-52.
- Barriga, E.H. and Mayor, R., 2015. Embryonic cell-cell adhesion: a key player in collective neural crest migration. *Curr Top Dev Biol.* 112, 301-23.
- Benaich, N., Woodhouse, S., Goldie, S.J., Mishra, A., Quist, S.R. and Watt, F.M., 2014. Rewiring of an epithelial differentiation factor, miR-203, to inhibit human squamous cell carcinoma metastasis. *Cell Rep.* 9, 104-17.
- Benard, A., Goossens-Beumer, I.J., van Hoesel, A.Q., Horati, H., Putter, H., Zeestraten, E.C., van de Velde, C.J. and Kuppen, P.J., 2014. Prognostic value of polycomb proteins EZH2, BMI1 and SUZ12 and histone modification H3K27me3 in colorectal cancer. *PLoS One.* 9, e108265.

- Betancur, P., Bronner-Fraser, M. and Sauka-Spengler, T., 2010. Genomic code for Sox10 activation reveals a key regulatory enhancer for cranial neural crest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107, 3570-3575.
- Bhattacharya, D., Rothstein, M., Azambuja, A.P. and Simoes-Costa, M., 2018. Control of neural crest multipotency by Wnt signaling and the Lin28/let-7 axis. *Elife*. 7.
- Biswas, S. and Rao, C.M., 2018. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur J Pharmacol*. 837, 8-24.
- Bonnomet, A., Brysse, A., Tachsidis, A., Waltham, M., Thompson, E.W., Polette, M. and Gilles, C., 2010. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 15, 261-73.
- Borges, E., Jr., Setti, A.S., Braga, D.P., Geraldo, M.V., Figueira, R.C. and Iaconelli, A., Jr., 2016. miR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure - A pilot study. *JBRA Assist Reprod*. 20, 200-205.
- Boros, E. and Nagy, I., 2019. The Role of MicroRNAs upon Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Inflammatory Bowel Disease. *Cells*. 8.
- Bracken, C.P., Gregory, P.A., Kolesnikoff, N., Bert, A.G., Wang, J., Shannon, M.F. and Goodall, G.J., 2008. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 68, 7846-54.
- Bradley, C.K., Norton, C.R., Chen, Y., Han, X., Booth, C.J., Yoon, J.K., Krebs, L.T. and Gridley, T., 2013. The snail family gene *snai3* is not essential for embryogenesis in mice. *PLoS One*. 8, e65344.
- Brahma, S. and Henikoff, S., 2020. Epigenome Regulation by Dynamic Nucleosome Unwrapping. *Trends Biochem Sci*. 45, 13-26.
- Britsch, S., Goerich, D.E., Riethmacher, D., Peirano, R.I., Rossner, M., Nave, K.A., Birchmeier, C. and Wegner, M., 2001. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev*. 15, 66-78.
- Bueno, M.J., Perez de Castro, I., Gomez de Cedron, M., Santos, J., Calin, G.A., Cigudosa, J.C., Croce, C.M., Fernandez-Piqueras, J. and Malumbres, M., 2008. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell*. 13, 496-506.
- Buitrago-Delgado, E., Nordin, K., Rao, A., Geary, L. and LaBonne, C., 2015. NEURODEVELOPMENT. Shared regulatory programs suggest retention of blastula-stage potential in neural crest cells. *Science*. 348, 1332-5.
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S. and Brabletz, T., 2008. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep*. 9, 582-9.
- Byles, V., Zhu, L., Lovaas, J.D., Chmielewski, L.K., Wang, J., Faller, D.V. and Dai, Y., 2012. SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis. *Oncogene*. 31, 4619-29.
- Cano, A. and Nieto, M.A., 2008. Non-coding RNAs take centre stage in epithelial-to-mesenchymal transition. *Trends Cell Biol*. 18, 357-9.
- Casciello, F., Windloch, K., Gannon, F. and Lee, J.S., 2015. Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer. *Front Immunol*. 6, 487.
- Cavalli, G. and Heard, E., 2019. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*. 571, 489-499.

- Cimmino, L., Abdel-Wahab, O., Levine, R.L. and Aifantis, I., 2011. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell*. 9, 193-204.
- Coles, E.G., Taneyhill, L.A. and Bronner-Fraser, M., 2007. A critical role for Cadherin6B in regulating avian neural crest emigration. *Dev Biol*. 312, 533-44.
- Correa, P.A., Pujol-Borrell, R. and Colobran, R., 2012. Bisulfite genomic sequencing to uncover variability in DNA methylation: Optimized protocol applied to human T cell differentiation genes. *Inmunología*. 31, 97-105.
- Coyle, D., O'Donnell, A.M., Corcionivoschi, N., Gillick, J. and Puri, P., 2015. Rho-kinase expression in Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*. 31, 1077-85.
- Creuzet, S. and Saint-Jeannet, J.P., 2018. Preface: Celebrating 150 Years of Neural Crest Research. *Genesis*. 56, e23236.
- Chai, J., Wang, S., Han, D., Dong, W., Xie, C. and Guo, H., 2015. MicroRNA-455 inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer by targeting RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase. *Tumour Biol*. 36, 1313-21.
- Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., Lao, K.Q., Livak, K.J. and Guegler, K.J., 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 33, e179.
- Chen, C.L., Liu, S.S., Ip, S.M., Wong, L.C., Ng, T.Y. and Ngan, H.Y., 2003. E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer*. 39, 517-23.
- Chen, Z., Li, S., Subramaniam, S., Shyy, J.Y. and Chien, S., 2017. Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annu Rev Biomed Eng*. 19, 195-219.
- Chiang, K. and Davies, C.C., 2018. Linking PRMT5 to breast cancer stem cells: New therapeutic opportunities? *Mol Cell Oncol*. 5, e1441628.
- Chim, C.S., Wan, T.S., Wong, K.Y., Fung, T.K., Drexler, H.G. and Wong, K.F., 2011a. Methylation of miR-34a, miR-34b/c, miR-124-1 and miR-203 in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *J Transl Med*. 9, 197.
- Chim, C.S., Wong, K.Y., Leung, C.Y., Chung, L.P., Hui, P.K., Chan, S.Y. and Yu, L., 2011b. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies. *J Cell Mol Med*. 15, 2760-7.
- Darnell, D.K., Kaur, S., Stanislaw, S., Konieczka, J.H., Yatskievych, T.A. and Antin, P.B., 2006. MicroRNA expression during chick embryo development. *Dev Dyn*. 235, 3156-65.
- Davalos, V., Moutinho, C., Villanueva, A., Boque, R., Silva, P., Carneiro, F. and Esteller, M., 2012. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene*. 31, 2062-74.
- de Herreros, A.G., Peiro, S., Nassour, M. and Savagner, P., 2010. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 15, 135-47.
- de Souza Rocha Simonini, P., Breiling, A., Gupta, N., Malekpour, M., Youns, M., Omranipour, R., Malekpour, F., Volinia, S., Croce, C.M., Najmabadi, H., Diederichs, S., Sahin, O., Mayer, D., Lyko, F., Hoheisel, J.D. and Riazalhosseini, Y., 2010. Epigenetically deregulated microRNA-375 is

- involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Res.* 70, 9175-84.
- DeCastro, A.J., Dunphy, K.A., Hutchinson, J., Balboni, A.L., Cherukuri, P., Jerry, D.J. and DiRenzo, J., 2013a. MiR203 mediates subversion of stem cell properties during mammary epithelial differentiation via repression of DeltaNP63alpha and promotes mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell Death Dis.* 4, e514.
- DeCastro, A.J., Dunphy, K.A., Hutchinson, J., Balboni, A.L., Cherukuri, P., Jerry, D.J. and DiRenzo, J., 2013b. MiR203 mediates subversion of stem cell properties during mammary epithelial differentiation via repression of Δ NP63 α and promotes mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell Death and Disease.* 4, e514.
- Diao, Y., Guo, X., Jiang, L., Wang, G., Zhang, C., Wan, J., Jin, Y. and Wu, Z., 2014. miR-203, a tumor suppressor frequently down-regulated by promoter hypermethylation in rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem.* 289, 529-39.
- Diaz-Lopez, A., Moreno-Bueno, G. and Cano, A., 2014. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res.* 6, 205-16.
- Dickman, C.T., Lawson, J., Jabalee, J., MacLellan, S.A., LePard, N.E., Bennewith, K.L. and Garnis, C., 2017. Selective extracellular vesicle exclusion of miR-142-3p by oral cancer cells promotes both internal and extracellular malignant phenotypes. *Oncotarget.*
- Ding, X., Park, S.I., McCauley, L.K. and Wang, C.Y., 2013. Signaling between transforming growth factor beta (TGF-beta) and transcription factor SNAI2 represses expression of microRNA miR-203 to promote epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis. *J Biol Chem.* 288, 10241-53.
- Ding, X.M., 2014. MicroRNAs: regulators of cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Chin J Cancer.* 33, 140-7.
- Dominguez, D., Montserrat-Sentis, B., Virgos-Soler, A., Guaita, S., Grueso, J., Porta, M., Puig, I., Baulida, J., Franci, C. and Garcia de Herreros, A., 2003. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol.* 23, 5078-89.
- Dong, C., Wu, Y., Wang, Y., Wang, C., Kang, T., Rychahou, P.G., Chi, Y.I., Evers, B.M. and Zhou, B.P., 2013. Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer. *Oncogene.* 32, 1351-62.
- Dong, C., Wu, Y., Yao, J., Wang, Y., Yu, Y., Rychahou, P.G., Evers, B.M. and Zhou, B.P., 2012. G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J Clin Invest.* 122, 1469-86.
- Dongre, A. and Weinberg, R.A., 2019. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20, 69-84.
- Duband, J.L., Dady, A. and Fleury, V., 2015. Resolving time and space constraints during neural crest formation and delamination. *Curr Top Dev Biol.* 111, 27-67.
- Eason, J., Williams, A.L., Chawla, B., Apsey, C. and Bohnsack, B.L., 2017. Differences in neural crest sensitivity to ethanol account for the infrequency of anterior segment defects in the eye compared with

- craniofacial anomalies in a zebrafish model of fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Res.* 109, 1212-1227.
- Ebert, M.S. and Sharp, P.A., 2010. Emerging roles for natural microRNA sponges. *Curr Biol.* 20, R858-61.
- Egawa, H., Jingushi, K., Hirono, T., Ueda, Y., Kitae, K., Nakata, W., Fujita, K., Uemura, M., Nonomura, N. and Tsujikawa, K., 2016. The miR-130 family promotes cell migration and invasion in bladder cancer through FAK and Akt phosphorylation by regulating PTEN. *Sci Rep.* 6, 20574.
- Ehrlich, M., 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 21, 5400-13.
- Esteller, M., 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 8, 286-98.
- Facer, P., Knowles, C.H., Thomas, P.K., Tam, P.K., Williams, N.S. and Anand, P., 2001. Decreased tyrosine kinase C expression may reflect developmental abnormalities in Hirschsprung's disease and idiopathic slow-transit constipation. *Br J Surg.* 88, 545-52.
- Feber, A., Xi, L., Luketich, J.D., Pennathur, A., Landreneau, R.J., Wu, M., Swanson, S.J., Godfrey, T.E. and Litle, V.R., 2008. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 135, 255-60; discussion 260.
- Ferrari-Amorotti, G., Fragliasso, V., Esteki, R., Prudente, Z., Soliera, A.R., Cattelani, S., Manzotti, G., Grisendi, G., Dominici, M., Pieraccioli, M., Raschella, G., Chiodoni, C., Colombo, M.P. and Calabretta, B., 2013. Inhibiting interactions of lysine demethylase LSD1 with snail/slug blocks cancer cell invasion. *Cancer Res.* 73, 235-45.
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H. and Allis, C.D., 2005. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature.* 438, 1116-22.
- Forzati, F., De Martino, M., Esposito, F., Sepe, R., Pellicchia, S., Malapelle, U., Pellino, G., Arra, C. and Fusco, A., 2017. miR-155 is positively regulated by CBX7 in mouse embryonic fibroblasts and colon carcinomas, and targets the KRAS oncogene. *BMC Cancer.* 17, 170.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. and Paul, C.L., 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 1827-31.
- Fukagawa, A., Ishii, H., Miyazawa, K. and Saitoh, M., 2015. deltaEF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Med.* 4, 125-35.
- Furukawa, N., Sakurai, F., Katayama, K., Seki, N., Kawabata, K. and Mizuguchi, H., 2011. Optimization of a microRNA expression vector for function analysis of microRNA. *J Control Release.* 150, 94-101.
- Furuta, M., Kozaki, K.I., Tanaka, S., Arai, S., Imoto, I. and Inazawa, J., 2010. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 31, 766-76.
- Gao, P., Wang, S., Jing, F., Zhan, J. and Wang, Y., 2017. microRNA-203 suppresses invasion of gastric cancer cells by targeting ERK1/2/Slug/ E-cadherin signaling. *Cancer Biomark.* 19, 11-20.
- Gastaldi, C., Bertero, T., Xu, N., Bourget-Ponzio, I., Lebrigand, K., Fourre, S., Popa, A., Cardot-Leccia, N., Meneguzzi, G., Sonkoly, E., Pivarcsi, A.,

- Mari, B., Barbry, P., Ponzio, G. and Rezzonico, R., 2014. miR-193b/365a cluster controls progression of epidermal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 35, 1110-20.
- Ge, L., Wang, H., Xu, X., Zhou, Z., He, J., Peng, W., Du, F., Zhang, Y., Gong, A. and Xu, M., 2020. PRMT5 promotes epithelial-mesenchymal transition via EGFR-beta-catenin axis in pancreatic cancer cells. *J Cell Mol Med*. 24, 1969-1979.
- Ge, T., Zhou, Y. and Lu, H., 2019. The diagnostic performance of lysine(K)-specific demethylase 6B (KDM6B) in non-small cell lung cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 47, 2155-2160.
- Gong, W., Suzuki, K., Russell, M. and Riabowol, K., 2005. Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 37, 1054-65.
- Gottardo, F., Liu, C.G., Ferracin, M., Calin, G.A., Fassan, M., Bassi, P., Sevignani, C., Byrne, D., Negrini, M., Pagano, F., Gomella, L.G., Croce, C.M. and Baffa, R., 2007. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol*. 25, 387-92.
- Gougnard, N., Andrieu, C. and Theveneau, E., 2018. Neural crest delamination and migration: Looking forward to the next 150 years. *Genesis*. 56, e23107.
- Gracias, D.T., Stelekati, E., Hope, J.L., Boesteanu, A.C., Doering, T.A., Norton, J., Mueller, Y.M., Fraietta, J.A., Wherry, E.J., Turner, M. and Katsikis, P.D., 2013. The microRNA miR-155 controls CD8(+) T cell responses by regulating interferon signaling. *Nat Immunol*. 14, 593-602.
- Greenberg, M.V.C. and Bourc'his, D., 2019. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 20, 590-607.
- Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y. and Goodall, G.J., 2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*. 10, 593-601.
- Greither, T., Grochola, L.F., Udelnow, A., Lautenschlager, C., Wurl, P. and Taubert, H., 2010. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer*. 126, 73-80.
- Griffiths-Jones, S., 2006. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*. 342, 129-38.
- Griffiths-Jones, S., 2010. miRBase: microRNA sequences and annotation. *Curr Protoc Bioinformatics*. Chapter 12, Unit 12 9 1-10.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. and Enright, A.J., 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 36, D154-8.
- Guerrero-Bosagna, C., 2020. From epigenotype to new genotypes: Relevance of epigenetic mechanisms in the emergence of genomic evolutionary novelty. *Semin Cell Dev Biol*. 97, 86-92.
- Gui, Z., Luo, F., Yang, Y., Shen, C., Li, S. and Xu, J., 2017. Oridonin inhibition and miR200b3p/ZEB1 axis in human pancreatic cancer. *Int J Oncol*. 50, 111-120.
- Gunasinghe, N.P., Wells, A., Thompson, E.W. and Hugo, H.J., 2012. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 31, 469-78.

- Guo, S., Yan, X., Shi, F., Ma, K., Chen, Z.J. and Zhang, C., 2018. Expression and distribution of the zinc finger protein, SNAI3, in mouse ovaries and pre-implantation embryos. *J Reprod Dev.* 64, 179-186.
- Guo, Y., Tian, L., Du, X. and Deng, Z., 2020. MiR-203 regulates estrogen receptor alpha and cartilage degradation in IL-1beta-stimulated chondrocytes. *J Bone Miner Metab.*
- Ha, M. and Kim, V.N., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15, 509-24.
- Hall, B.K., 2000. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev.* 2, 3-5.
- Hall, B.K., 2008. The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci.* 33, 781-93.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 88, 49-92.
- Heidersbach, A., Saxby, C., Carver-Moore, K., Huang, Y., Ang, Y.S., de Jong, P.J., Ivey, K.N. and Srivastava, D., 2013. microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *Elife.* 2, e01323.
- Heimberg, A.M., Cowper-Sal-lari, R., Semon, M., Donoghue, P.C. and Peterson, K.J., 2010. microRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 19379-83.
- Hockman, D., Chong-Morrison, V., Green, S.A., Gavriouchkina, D., Candido-Ferreira, I., Ling, I.T.C., Williams, R.M., Amemiya, C.T., Smith, J.J., Bronner, M.E. and Sauka-Spengler, T., 2019. A genome-wide assessment of the ancestral neural crest gene regulatory network. *Nat Commun.* 10, 4689.
- Holubekova, V., Mendelova, A., Jasek, K., Mersakova, S., Zubor, P. and Lasabova, Z., 2017. Epigenetic regulation by DNA methylation and miRNA molecules in cancer. *Future Oncol.* 13, 2217-2222.
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P., Sauka-Spengler, T. and Bronner, M.E., 2012. DNA methyltransferase3A as a molecular switch mediating the neural tube-to-neural crest fate transition. *Genes Dev.* 26, 2380-5.
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P.H. and Bronner, M.E., 2014a. Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev Biol.* 396, 159-68.
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P.H., Simoes-Costa, M., Sanchez-Vasquez, E. and Bronner, M.E., 2014b. DNA methyltransferase 3B regulates duration of neural crest production via repression of Sox10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, 17911-6.
- Huang, Y.W., Kuo, C.T., Chen, J.H., Goodfellow, P.J., Huang, T.H., Rader, J.S. and Uyar, D.S., 2014. Hypermethylation of miR-203 in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol.* 133, 340-5.
- Humphries, B., Wang, Z. and Yang, C., 2019. MicroRNA Regulation of Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 11.
- Hur, K., Toiyama, Y., Okugawa, Y., Ide, S., Imaoka, H., Boland, C.R. and Goel, A., 2017. Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in human colorectal cancer. *Gut.* 66, 654-665.
- Iorio, M.V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C.G., Alder, H., Calin, G.A., Menard, S. and Croce, C.M., 2007. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 67, 8699-707.

- Jacques-Fricke, B.T., Roffers-Agarwal, J. and Gammill, L.S., 2012. DNA methyltransferase 3b is dispensable for mouse neural crest development. *PLoS One*. 7, e47794.
- Jeltsch, A., Broche, J. and Bashtrykov, P., 2018. Molecular Processes Connecting DNA Methylation Patterns with DNA Methyltransferases and Histone Modifications in Mammalian Genomes. *Genes (Basel)*. 9.
- Jeltsch, A., Broche, J. and Bashtrykov, P., 2019. Molecular Processes Connecting DNA Methylation Patterns with DNA Methyltransferases and Histone Modifications in Mammalian Genomes. *Genes (Basel)*. 10.
- Jeziorska, D.M., Murray, R.J.S., De Gobbi, M., Gaentzsch, R., Garrick, D., Ayyub, H., Chen, T., Li, E., Telenius, J., Lynch, M., Graham, B., Smith, A.J.H., Lund, J.N., Hughes, J.R., Higgs, D.R. and Tufarelli, C., 2017. DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity during differentiation and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114, E7526-E7535.
- Kalluri, R. and Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 119, 1420-8.
- Kataoka, H., Murayama, T., Yokode, M., Mori, S., Sano, H., Ozaki, H., Yokota, Y., Nishikawa, S. and Kita, T., 2000. A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res*. 28, 626-33.
- Kerosuo, L. and Bronner-Fraser, M., 2012. What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol*. 23, 320-32.
- Khudyakov, J. and Bronner-Fraser, M., 2009. Comprehensive spatiotemporal analysis of early chick neural crest network genes. *Dev Dyn*. 238, 716-23.
- Kiecker, C., 2016. The chick embryo as a model for the effects of prenatal exposure to alcohol on craniofacial development. *Dev Biol*. 415, 314-325.
- Kiesslich, T., Pichler, M. and Neureiter, D., 2013. Epigenetic control of epithelial-mesenchymal-transition in human cancer. *Mol Clin Oncol*. 1, 3-11.
- Kloosterman, W.P. and Plasterk, R.H., 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*. 11, 441-50.
- Kluiser, J., Gibcus, J.H., Hettinga, C., Adema, A., Richter, M.K., Halsema, N., Slezak-Prochazka, I., Ding, Y., Kroesen, B.J. and van den Berg, A., 2012. Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition. *PLoS One*. 7, e29275.
- Kochilas, L., Merscher-Gomez, S., Lu, M.M., Potluri, V., Liao, J., Kucherlapati, R., Morrow, B. and Epstein, J.A., 2002. The role of neural crest during cardiac development in a mouse model of DiGeorge syndrome. *Dev Biol*. 251, 157-66.
- Korhan, P., Erdal, E. and Atabey, N., 2014. MiR-181a-5p is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses motility, invasion and branching-morphogenesis by directly targeting c-Met. *Biochem Biophys Res Commun*. 450, 1304-12.
- Korpál, M., Lee, E.S., Hu, G. and Kang, Y., 2008. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem*. 283, 14910-4.
- Koury, J., Ramirez, A., Xie, C., Harb, J., Dong, C., Maki, C., Ramos, T., Izadyar, F., Clark, D., Drechsler, Y., Kaur, G. and Hao, J., 2019. Phosphodiesterase 4D, miR-203 and selected cytokines in the peripheral

- blood are associated with canine atopic dermatitis. *PLoS One*. 14, e0218670.
- Langer, E.M., Feng, Y., Zhaoyuan, H., Rauscher, F.J., 3rd, Kroll, K.L. and Longmore, G.D., 2008. Ajuba LIM proteins are snail/slug corepressors required for neural crest development in *Xenopus*. *Dev Cell*. 14, 424-36.
- Lardizabal, M.N., Nocito, A.L., Daniele, S.M., Ornella, L.A., Palatnik, J.F. and Veggi, L.M., 2012. Reference genes for real-time PCR quantification of microRNAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PLoS One*. 7, e36323.
- Lee, S.R., Roh, Y.G., Kim, S.K., Lee, J.S., Seol, S.Y., Lee, H.H., Kim, W.T., Kim, W.J., Heo, J., Cha, H.J., Kang, T.H., Chung, J.W., Chu, I.S. and Leem, S.H., 2015. Activation of EZH2 and SUZ12 Regulated by E2F1 Predicts the Disease Progression and Aggressive Characteristics of Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*. 21, 5391-403.
- Leone, V., Langella, C., Esposito, F., De Martino, M., Decaussin-Petrucci, M., Chiappetta, G., Bianco, A. and Fusco, A., 2015. miR-130b-3p Upregulation Contributes to the Development of Thyroid Adenomas Targeting CCDC6 Gene. *Eur Thyroid J*. 4, 213-21.
- Leoni, C., Vincenzetti, L., Emming, S. and Monticelli, S., 2015. Epigenetics of T lymphocytes in health and disease. *Swiss Med Wkly*. 145, w14191.
- Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120, 15-20.
- Li, S., Sun, A., Liang, X., Ma, L., Shen, L., Li, T., Zheng, L., Shang, W., Zhao, W. and Jia, J., 2017. Histone demethylase PHF8 promotes progression and metastasis of gastric cancer. *Am J Cancer Res*. 7, 448-461.
- Li, T., Gao, F. and Zhang, X.P., 2015a. miR-203 enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil by targeting thymidylate synthase in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 33, 607-14.
- Li, Y., Kuscu, C., Banach, A., Zhang, Q., Pulkoski-Gross, A., Kim, D., Liu, J., Roth, E., Li, E., Shroyer, K.R., Denoya, P.I., Zhu, X., Chen, L. and Cao, J., 2015b. miR-181a-5p Inhibits Cancer Cell Migration and Angiogenesis via Downregulation of Matrix Metalloproteinase-14. *Cancer Res*. 75, 2674-85.
- Li, Y., Liu, X., Du, A., Zhu, X. and Yu, B., 2019. miR-203 accelerates apoptosis and inflammation induced by LPS via targeting NFIL3 in cardiomyocytes. *J Cell Biochem*. 120, 6605-6613.
- Li, Y., Nie, Y., Tu, S., Wang, H., Zhou, Y., Du, Y., Cao, J. and Ye, M., 2016a. Epigenetically deregulated miR-200c is involved in a negative feedback loop with DNMT3a in gastric cancer cells. *Oncol Rep*. 36, 2108-16.
- Li, Y.J., Ping, C., Tang, J. and Zhang, W., 2016b. MicroRNA-455 suppresses non-small cell lung cancer through targeting ZEB1. *Cell Biol Int*. 40, 621-8.
- Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B.K. and Lu, J., 2010. Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 29, 4896-904.
- Liu, H., Chen, B. and Li, Y., 2019. microRNA-203 promotes proliferation, differentiation, and migration of osteoblasts by upregulation of Msh homeobox 2. *J Cell Physiol*. 234, 17639-17648.
- Liu, J., Zhang, J., Li, Y., Wang, L., Sui, B. and Dai, D., 2016. MiR-455-5p acts as a novel tumor suppressor in gastric cancer by down-regulating RAB18. *Gene*. 592, 308-15.

- Liu, M., Wang, Z., Yang, S., Zhang, W., He, S., Hu, C., Zhu, H., Quan, L., Bai, J. and Xu, N., 2011. TNF-alpha is a novel target of miR-19a. *Int J Oncol.* 38, 1013-22.
- Liu, P.P., Tang, G.B., Xu, Y.J., Zeng, Y.Q., Zhang, S.F., Du, H.Z., Teng, Z.Q. and Liu, C.M., 2017. MiR-203 Interplays with Polycomb Repressive Complexes to Regulate the Proliferation of Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cell Reports.* 9, 190-202.
- Liu, Q., Borcharding, N.C., Shao, P., Maina, P.K., Zhang, W. and Qi, H.H., 2020. Contribution of synergism between PHF8 and HER2 signalling to breast cancer development and drug resistance. *EBioMedicine.* 51, 102612.
- Liu, Y.L., Gao, X., Jiang, Y., Zhang, G., Sun, Z.C., Cui, B.B. and Yang, Y.M., 2015. Expression and clinicopathological significance of EED, SUZ12 and EZH2 mRNA in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 141, 661-9.
- Liu, Y.N., Yin, J.J., Abou-Kheir, W., Hynes, P.G., Casey, O.M., Fang, L., Yi, M., Stephens, R.M., Seng, V., Sheppard-Tillman, H., Martin, P. and Kelly, K., 2013. MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms. *Oncogene.* 32, 296-306.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 25, 402-8.
- Lu, W. and Kang, Y., 2019. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Dev Cell.* 49, 361-374.
- Lu, X., Li, X., He, Q., Gao, J., Gao, Y., Liu, B. and Liu, F., 2013. miR-142-3p regulates the formation and differentiation of hematopoietic stem cells in vertebrates. *Cell Res.* 23, 1356-68.
- Lujambio, A., Calin, G.A., Villanueva, A., Ropero, S., Sanchez-Cespedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J., Gallagher, W.M., Eccles, S.A., Croce, C.M. and Esteller, M., 2008. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 13556-61.
- Lv, M., Zhong, Z., Chi, H., Huang, M., Jiang, R. and Chen, J., 2016. Genome-Wide Screen of miRNAs and Targeting mRNAs Reveals the Negatively Regulatory Effect of miR-130b-3p on PTEN by PI3K and Integrin beta1 Signaling Pathways in Bladder Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 18.
- Ma, Z., Qiu, X., Wang, D., Li, Y., Zhang, B., Yuan, T., Wei, J., Zhao, B., Zhao, X., Lou, J., Jin, Y. and Jin, Y., 2015. MiR-181a-5p inhibits cell proliferation and migration by targeting Kras in non-small cell lung cancer A549 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 47, 630-8.
- Martik, M.L. and Bronner, M.E., 2017. Regulatory Logic Underlying Diversification of the Neural Crest. *Trends Genet.* 33, 715-727.
- Matysiak, M., Kapka-Skrzypczak, L., Jodlowska-Jedrych, B. and Kruszewski, M., 2017. EMT promoting transcription factors as prognostic markers in human breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 295, 817-825.
- Mavrakis, K.J., Wolfe, A.L., Oricchio, E., Palomero, T., de Keersmaecker, K., McJunkin, K., Zuber, J., James, T., Khan, A.A., Leslie, C.S., Parker, J.S., Paddison, P.J., Tam, W., Ferrando, A. and Wendel, H.G., 2010. Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Cell Biol.* 12, 372-9.

- Mayanil, C.S., Siddiqui, M.R., Ichi, S., Mania-Farnell, B., Tomita, T. and McLone, D., 2015. MicroRNAs in Neural Crest Development. 515-538.
- Mayor, R. and Carmona-Fontaine, C., 2010. Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol.* 20, 319-28.
- McDonald, O.G., Wu, H., Timp, W., Doi, A. and Feinberg, A.P., 2011. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Struct Mol Biol.* 18, 867-74.
- Medeiros, D.M., 2013. The evolution of the neural crest: new perspectives from lamprey and invertebrate neural crest-like cells. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2, 1-15.
- Mi, W., Shi, Q., Chen, X., Wu, T. and Huang, H., 2016. miR-33a-5p modulates TNF-alpha-inhibited osteogenic differentiation by targeting SATB2 expression in hBMSCs. *FEBS Lett.* 590, 396-407.
- Milet, C. and Monsoro-Burq, A.H., 2012. Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Dev Biol.* 366, 22-33.
- Moes, M., Le Behec, A., Crespo, I., Laurini, C., Halavatyi, A., Vetter, G., Del Sol, A. and Friederich, E., 2012. A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition. *PLoS One.* 7, e35440.
- Molina-Ortiz, P., Villarejo, A., MacPherson, M., Santos, V., Montes, A., Souchelnytskyi, S., Portillo, F. and Cano, A., 2012. Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction: modulation by serine 4 phosphorylation. *PLoS One.* 7, e36132.
- Morales, S., Monzo, M. and Navarro, A., 2017. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomol Concepts.* 8, 203-212.
- Nieto, M.A., 2013. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science.* 342, 1234850.
- Nieto, M.A., 2018. A snail tale and the chicken embryo. *Int J Dev Biol.* 62, 121-126.
- Nieto, M.A., Huang, R.Y., Jackson, R.A. and Thiery, J.P., 2016. Emt: 2016. *Cell.* 166, 21-45.
- Nissan, X., Denis, J.A., Saidani, M., Lemaitre, G., Peschanski, M. and Baldeschi, C., 2011. miR-203 modulates epithelial differentiation of human embryonic stem cells towards epidermal stratification. *Dev Biol.* 356, 506-15.
- Nolan, T., Hands, R.E. and Bustin, S.A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 1, 1559-82.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. and Peng, C., 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 9, 402.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99, 247-57.
- Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.J., Lowe, S.W., Hannon, G.J. and He, L., 2009. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* 23, 2839-49.
- Orlandi, K. and McKnight, J., 2020. Bulky Histone Modifications May Have an Oversized Role in Nucleosome Dynamics. *Bioessays.* 42, e1900217.
- Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E. and Peter, M.E., 2008. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 22, 894-907.

- Pastor, W.A., Aravind, L. and Rao, A., 2013. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14, 341-56.
- Patnaik, D., Esteve, P.O. and Pradhan, S., 2018. Targeting the SET and RING-associated (SRA) domain of ubiquitin-like, PHD and ring finger-containing 1 (UHRF1) for anti-cancer drug development. *Oncotarget.* 9, 26243-26258.
- Pauli, S., Bajpai, R. and Borchers, A., 2017. CHARGEd with neural crest defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 175, 478-486.
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M. and Cano, A., 2004. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol.* 24, 306-19.
- Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A., 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 7, 415-28.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Prakash, K. and Fournier, D., 2018. Evidence for the implication of the histone code in building the genome structure. *Biosystems.* 164, 49-59.
- Qu, Y., Li, W.C., Hellem, M.R., Rostad, K., Popa, M., McCormack, E., Oyan, A.M., Kalland, K.H. and Ke, X.S., 2013. MiR-182 and miR-203 induce mesenchymal to epithelial transition and self-sufficiency of growth signals via repressing SNAI2 in prostate cells. *Int J Cancer.* 133, 544-55.
- Rajaram, K., Harding, R.L., Hyde, D.R. and Patton, J.G., 2014. miR-203 regulates progenitor cell proliferation during adult zebrafish retina regeneration. *Dev Biol.* 392, 393-403.
- Robertson, E.D., Wasylyk, C., Ye, T., Jung, A.C. and Wasylyk, B., 2014. The oncogenic MicroRNA Hsa-miR-155-5p targets the transcription factor ELK3 and links it to the hypoxia response. *PLoS One.* 9, e113050.
- Rodrigues, C., Pattabiraman, C., Vijaykumar, A., Arora, R., Narayana, S.M., Kumar, R.V., Notani, D., Varga-Weisz, P. and Krishna, S., 2019. A SUV39H1-low chromatin state characterises and promotes migratory properties of cervical cancer cells. *Exp Cell Res.* 378, 206-216.
- Roellig, D., Tan-Cabugao, J., Esaian, S. and Bronner, M.E., 2017. Dynamic transcriptional signature and cell fate analysis reveals plasticity of individual neural plate border cells. *Elife.* 6.
- Rogers, C.D., Saxena, A. and Bronner, M.E., 2013. Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. *J Cell Biol.* 203, 835-47.
- Rogers, J.M., 2016. Search for the missing lncs: gene regulatory networks in neural crest development and long non-coding RNA biomarkers of Hirschsprung's disease. *Neurogastroenterol Motil.* 28, 161-6.
- Ru, P., Steele, R., Newhall, P., Phillips, N.J., Toth, K. and Ray, R.B., 2012. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling. *Mol Cancer Ther.* 11, 1166-73.
- Rusek, A.M., Abba, M., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Niklinski, J. and Allgayer, H., 2015. MicroRNA modulators of epigenetic regulation, the tumor microenvironment and the immune system in lung cancer. *Mol Cancer.* 14, 34.

- Samant, G.V., Schupp, M.O., Francois, M., Moleri, S., Kothinti, R.K., Chun, C.Z., Sinha, I., Sellars, S., Leigh, N., Pramanik, K., Horswill, M.A., Remadevi, I., Li, K., Wilkinson, G.A., Tabatabai, N.M., Beltrame, M., Koopman, P. and Ramchandran, R., 2011. Sox factors transcriptionally regulate ROBO4 gene expression in developing vasculature in zebrafish. *J Biol Chem.* 286, 30740-7.
- Sanchez-Vasquez, E., Bronner, M.E. and Strobl-Mazzulla, P.H., 2019. Epigenetic inactivation of miR-203 as a key step in neural crest epithelial-to-mesenchymal transition. *Development.* 146.
- Sato, T.S., Handa, A., Priya, S., Watal, P., Becker, R.M. and Sato, Y., 2019. Neurocristopathies: Enigmatic Appearances of Neural Crest Cell-derived Abnormalities. *Radiographics.* 39, 2085-2102.
- Sauka-Spengler, T. and Bronner-Fraser, M., 2008. Insights from a sea lamprey into the evolution of neural crest gene regulatory network. *Biol Bull.* 214, 303-14.
- Sauka-Spengler, T. and Barembaum, M., 2008. Chapter 12 Gain- and Loss-of-Function Approaches in the Chick Embryo. 87, 237-256.
- Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N., Yuen, S.T., Chan, T.L., Kwong, D.L., Au, G.K., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M. and Harris, C.C., 2008. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA.* 299, 425-36.
- Schille, C. and Schambony, A., 2017. Signaling pathways and tissue interactions in neural plate border formation. *Neurogenesis (Austin).* 4, e1292783.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 3, 1101-8.
- Sharifi, M. and Salehi, R., 2016. Blockage of miR-92a-3p with locked nucleic acid induces apoptosis and prevents cell proliferation in human acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Gene Ther.* 23, 29-35.
- Shellard, A. and Mayor, R., 2016. Chemotaxis during neural crest migration. *Semin Cell Dev Biol.*
- Shi, Y., Li, J., Chen, C., Gong, M., Chen, Y., Liu, Y., Chen, J., Li, T. and Song, W., 2014. 5-Mehtyltetrahydrofolate rescues alcohol-induced neural crest cell migration abnormalities. *Mol Brain.* 7, 67.
- Shi, Y., Tan, Y.J., Zeng, D.Z., Qian, F. and Yu, P.W., 2015. miR-203 suppression in gastric carcinoma promotes Slug-mediated cancer metastasis. *Tumour Biol.*
- Shiau, C.E., Hu, N. and Bronner-Fraser, M., 2010. Altering Glypican-1 levels modulates canonical Wnt signaling during trigeminal placode development. *Dev Biol.* 348, 107-18.
- Shiau, C.E., Lwigale, P.Y., Das, R.M., Wilson, S.A. and Bronner-Fraser, M., 2008. Robo2-Slit1 dependent cell-cell interactions mediate assembly of the trigeminal ganglion. *Nat Neurosci.* 11, 269-76.
- Shibuta, T., Honda, E., Shiotsu, H., Tanaka, Y., Vellasamy, S., Shiratsuchi, M. and Umemura, T., 2013. Imatinib induces demethylation of miR-203 gene: an epigenetic mechanism of anti-tumor effect of imatinib. *Leuk Res.* 37, 1278-86.
- Shukla, V., Adiga, D., Jishnu, P.V., Varghese, V.K., Satyamoorthy, K. and Kabekkodu, S.P., 2020. Role of miRNA clusters in epithelial to mesenchymal transition in cancer. *Front Biosci (Elite Ed).* 12, 48-78.

- Shyamala, K., Yanduri, S., Girish, H.C. and Murgod, S., 2015. Neural crest: The fourth germ layer. *J Oral Maxillofac Pathol.* 19, 221-9.
- Siemens, H., Jackstadt, R., Hunten, S., Kaller, M., Menssen, A., Gotz, U. and Hermeking, H., 2011. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle.* 10, 4256-71.
- Simoës-Costa, M. and Bronner, M.E., 2015. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development.* 142, 242-57.
- Simoës-Costa, M., Tan-Cabugao, J., Antoshechkin, I., Sauka-Spengler, T. and Bronner, M.E., 2014. Transcriptome analysis reveals novel players in the cranial neural crest gene regulatory network. *Genome Res.* 24, 281-90.
- Simoës-Costa, M.S., McKeown, S.J., Tan-Cabugao, J., Sauka-Spengler, T. and Bronner, M.E., 2012. Dynamic and differential regulation of stem cell factor FoxD3 in the neural crest is Encrypted in the genome. *PLoS Genet.* 8, e1003142.
- Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N. and Berx, G., 2017. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends Genet.* 33, 943-959.
- Smith, S.M., Garic, A., Flentke, G.R. and Berres, M.E., 2014. Neural crest development in fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 102, 210-20.
- Soldatov, R., Kaucka, M., Kastriti, M.E., Petersen, J., Chontorotzea, T., Englmaier, L., Akkuratova, N., Yang, Y., Haring, M., Dyachuk, V., Bock, C., Farlik, M., Piacentino, M.L., Boismoreau, F., Hilscher, M.M., Yokota, C., Qian, X., Nilsson, M., Bronner, M.E., Croci, L., Hsiao, W.Y., Guertin, D.A., Brunet, J.F., Consalez, G.G., Ernfors, P., Fried, K., Kharchenko, P.V. and Adameyko, I., 2019. Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science.* 364.
- Sonda, N., Simonato, F., Peranzoni, E., Cali, B., Bortoluzzi, S., Bisognin, A., Wang, E., Marincola, F.M., Naldini, L., Gentner, B., Trautwein, C., Sackett, S.D., Zanovello, P., Molon, B. and Bronte, V., 2013. miR-142-3p prevents macrophage differentiation during cancer-induced myelopoiesis. *Immunity.* 38, 1236-49.
- Sonkoly, E., Wei, T., Janson, P.C., Saaf, A., Lundeborg, L., Tengvall-Linder, M., Norstedt, G., Alenius, H., Homey, B., Scheynius, A., Stahle, M. and Pivarcsi, A., 2007. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One.* 2, e610.
- Stopa, N., Krebs, J.E. and Shechter, D., 2015. The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond. *Cell Mol Life Sci.* 72, 2041-59.
- Strobl-Mazzulla, P.H. and Bronner, M.E., 2012a. Epithelial to mesenchymal transition: New and old insights from the classical neural crest model. *Semin Cancer Biol.* 22, 411-6.
- Strobl-Mazzulla, P.H. and Bronner, M.E., 2012b. A PHD12-Snail2 repressive complex epigenetically mediates neural crest epithelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 198, 999-1010.
- Strobl-Mazzulla, P.H., Sauka-Spengler, T. and Bronner-Fraser, M., 2010. Histone demethylase Jmjd2A regulates neural crest specification. *Dev Cell.* 19, 460-8.
- Sullivan, K.E., 2019. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Immunol Rev.* 287, 186-201.

- Sun, X., He, Y., Huang, C., Ma, T.T. and Li, J., 2013. The epigenetic feedback loop between DNA methylation and microRNAs in fibrotic disease with an emphasis on DNA methyltransferases. *Cell Signal*. 25, 1870-6.
- Sun, Z., Liu, G. and Xu, N., 2019. Does hypermethylation of CpG island in the promoter region of the E-cadherin gene increase the risk of lung cancer? A meta-analysis. *Thorac Cancer*. 10, 54-59.
- Sun, Z.W. and Allis, C.D., 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*. 418, 104-8.
- Sweetman, D., 2011. In situ detection of microRNAs in animals. *Methods Mol Biol*. 732, 1-8.
- Takahashi, Y., Sipp, D. and Enomoto, H., 2013. Tissue interactions in neural crest cell development and disease. *Science*. 341, 860-3.
- Takaishi, M., Tarutani, M., Takeda, J. and Sano, S., 2016. Mesenchymal to Epithelial Transition Induced by Reprogramming Factors Attenuates the Malignancy of Cancer Cells. *PLoS One*. 11, e0156904.
- Takigawa, S., Chen, A., Wan, Q., Na, S., Sudo, A., Yokota, H. and Hamamura, K., 2016. Role of miR-222-3p in c-Src-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Int J Mol Sci*. 17, 240.
- Tamura, G., Yin, J., Wang, S., Fleisher, A.S., Zou, T., Abraham, J.M., Kong, D., Smolinski, K.N., Wilson, K.T., James, S.P., Silverberg, S.G., Nishizuka, S., Terashima, M., Motoyama, T. and Meltzer, S.J., 2000. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 92, 569-73.
- Taneyhill, L.A., Coles, E.G. and Bronner-Fraser, M., 2007. Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest. *Development*. 134, 1481-90.
- Taube, J.H., Malouf, G.G., Lu, E., Sphyris, N., Vijay, V., Ramachandran, P.P., Ueno, K.R., Gaur, S., Nicoloso, M.S., Rossi, S., Herschkowitz, J.I., Rosen, J.M., Issa, J.P., Calin, G.A., Chang, J.T. and Mani, S.A., 2013. Epigenetic silencing of microRNA-203 is required for EMT and cancer stem cell properties. *Sci Rep*. 3, 2687.
- Thatcher, E.J., Paydar, I., Anderson, K.K. and Patton, J.G., 2008. Regulation of zebrafish fin regeneration by microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 18384-9.
- Theveneau, E. and Mayor, R., 2012. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol*. 366, 34-54.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y. and Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139, 871-90.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G., 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics*. Chapter 2, Unit 2 3.
- Tokunaga, R., Sakamoto, Y., Nakagawa, S., Miyake, K., Izumi, D., Kosumi, K., Taki, K., Higashi, T., Imamura, Y., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Baba, Y., Miyamoto, Y., Yoshida, N., Oki, E., Watanabe, M. and Baba, H., 2016. The Prognostic Significance of Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 23, 678-85.
- Tomasetti, M., Gaetani, S., Monaco, F., Neuzil, J. and Santarelli, L., 2019. Epigenetic Regulation of miRNA Expression in Malignant Mesothelioma: miRNAs as Biomarkers of Early Diagnosis and Therapy. *Front Oncol*. 9, 1293.

- Trainor, P.A., 2010. Craniofacial birth defects: The role of neural crest cells in the etiology and pathogenesis of Treacher Collins syndrome and the potential for prevention. *Am J Med Genet A*. 152A, 2984-94.
- Tryndyak, V.P., Beland, F.A. and Pogribny, I.P., 2010. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. *Int J Cancer*. 126, 2575-83.
- Tsai, Y.H., Murakami, N. and Gariépy, C.E., 2011. Postnatal intestinal engraftment of prospectively selected enteric neural crest stem cells in a rat model of Hirschsprung disease. *Neurogastroenterol Motil*. 23, 362-9.
- Vega-Lopez, G.A., Cerrizuela, S., Tribulo, C. and Aybar, M.J., 2018. Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. *Dev Biol*. 444 Suppl 1, S110-S143.
- Viticchiè, G., Lena, A.M., Latina, A., Formosa, A., Gregersen, L.H., Lund, A.H., Bernardini, S., Mauriello, A., Miano, R., Spagnoli, L.G., Knight, R.A., Candi, E. and Melino, G., 2011. MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle*. 10, 1121-1131.
- Vrba, L., Munoz-Rodriguez, J.L., Stampfer, M.R. and Futscher, B.W., 2013. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One*. 8, e54398.
- Waddington, C.H., 1942. The epigenotype. *Int J Epidemiol*. 41, 10-3.
- Wang, H., Sun, Z., Wang, Y., Hu, Z., Zhou, H., Zhang, L., Hong, B., Zhang, S. and Cao, X., 2016a. miR-33-5p, a novel mechano-sensitive microRNA promotes osteoblast differentiation by targeting Hmga2. *Sci Rep*. 6, 23170.
- Wang, J., Wang, X., Wu, G., Hou, D. and Hu, Q., 2013. MiR-365b-3p, down-regulated in retinoblastoma, regulates cell cycle progression and apoptosis of human retinoblastoma cells by targeting PAX6. *FEBS Lett*. 587, 1779-86.
- Wang, S., Wu, W. and Claret, F.X., 2017. Mutual regulation of microRNAs and DNA methylation in human cancers. *Epigenetics*. 12, 187-197.
- Wang, X., 2008. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*. 14, 1012-7.
- Wang, X., Zhao, J., Huang, J., Tang, H., Yu, S. and Chen, Y., 2012. The regulatory roles of miRNA and methylation on oncogene and tumor suppressor gene expression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 425, 51-7.
- Wang, Y., Liu, J., Ying, X., Lin, P.C. and Zhou, B.P., 2016b. Twist-mediated Epithelial-mesenchymal Transition Promotes Breast Tumor Cell Invasion via Inhibition of Hippo Pathway. *Sci Rep*. 6, 24606.
- Wang, Y. and Shang, Y., 2013. Epigenetic control of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Exp Cell Res*. 319, 160-9.
- Ward, N.J., Green, D., Higgins, J., Dalmay, T., Munsterberg, A., Moxon, S. and Wheeler, G.N., 2018. microRNAs associated with early neural crest development in *Xenopus laevis*. *BMC Genomics*. 19, 59.
- Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B. and Lyko, F., 2007. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*. 6, 1001-5.

- Wei, T., Orfanidis, K., Xu, N., Janson, P., Stahle, M., Pivarcsi, A. and Sonkoly, E., 2010. The expression of microRNA-203 during human skin morphogenesis. *Exp Dermatol.* 19, 854-6.
- Wei, Y., Peng, S., Wu, M., Sachidanandam, R., Tu, Z., Zhang, S., Falce, C., Sobie, E.A., Lebeche, D. and Zhao, Y., 2014. Multifaceted roles of miR-185 in repressing the fetal gene program in the heart. *Cell Res.* 24, 278-92.
- Weiner, A.M.J., 2018. MicroRNAs and the neural crest: From induction to differentiation. *Mech Dev.* 154, 98-106.
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., Brunton, V.G., Morton, J., Sansom, O., Schuler, J., Stemmler, M.P., Herzberger, C., Hopt, U., Keck, T., Brabletz, S. and Brabletz, T., 2009. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 11, 1487-95.
- Wiklund, E.D., Kjems, J. and Clark, S.J., 2010. Epigenetic architecture and miRNA: reciprocal regulators. *Epigenomics.* 2, 823-40.
- Williams, R.M., Candido-Ferreira, I., Repapi, E., Gavriouchkina, D., Senanayake, U., Ling, I.T.C., Telenius, J., Taylor, S., Hughes, J. and Sauka-Spengler, T., 2019. Reconstruction of the Global Neural Crest Gene Regulatory Network In Vivo. *Dev Cell.* 51, 255-276 e7.
- Wong, N. and Wang, X., 2014. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.*
- Wu, J., Cui, H., Zhu, Z. and Wang, L., 2016. MicroRNA-200b-3p suppresses epithelial-mesenchymal transition and inhibits tumor growth of glioma through down-regulation of ERK5. *Biochem Biophys Res Commun.* 478, 1158-64.
- Wu, Q., Ren, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., Peng, Y., Xiao, Q., Li, T., Ouyang, C., Hu, Y., Zhang, Y., Zhou, W., Yan, W., Guo, K., Li, W., Hu, Y., Yang, X., Shu, G., Xue, H., Wei, Z., Luo, Y. and Yin, G., 2017. MiR-221-3p targets ARF4 and inhibits the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.*
- Wystub, K., Besser, J., Bachmann, A., Boettger, T. and Braun, T., 2013. miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development. *PLoS Genet.* 9, e1003793.
- Xia, X., Zhang, K., Cen, G., Jiang, T., Cao, J., Huang, K., Huang, C., Zhao, Q. and Qiu, Z., 2015. MicroRNA-301a-3p promotes pancreatic cancer progression via negative regulation of SMAD4. *Oncotarget.* 6, 21046-63.
- Xiao, J.N., Yan, T.H., Yu, R.M., Gao, Y., Zeng, W.L., Lu, S.W., Que, H.X., Liu, Z.P. and Jiang, J.H., 2017. Long non-coding RNA UCA1 regulates the expression of Snail2 by miR-203 to promote hepatocellular carcinoma progression. *J Cancer Res Clin Oncol.* 143, 981-990.
- Yan, J., Guo, D., Yang, S., Sun, H., Wu, B. and Zhou, D., 2016. Inhibition of miR-222-3p activity promoted osteogenic differentiation of hBMSCs by regulating Smad5-RUNX2 signal axis. *Biochem Biophys Res Commun.* 470, 498-503.
- Yao, D., Dai, C. and Peng, S., 2011. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res.* 9, 1608-20.

- Ye, F., Tang, H., Liu, Q., Xie, X., Wu, M., Liu, X., Chen, B. and Xie, X., 2014. miR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family. *J Transl Med.* 12, 17.
- Yen, C.Y., Huang, H.W., Shu, C.W., Hou, M.F., Yuan, S.S., Wang, H.R., Chang, Y.T., Farooqi, A.A., Tang, J.Y. and Chang, H.W., 2016. DNA methylation, histone acetylation and methylation of epigenetic modifications as a therapeutic approach for cancers. *Cancer Lett.* 373, 185-92.
- Yi, R., Poy, M.N., Stoffel, M. and Fuchs, E., 2008. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature.* 452, 225-9.
- Yin, Q., Wang, J., Fu, Q., Gu, S. and Rui, Y., 2018. CircRUNX2 through has-miR-203 regulates RUNX2 to prevent osteoporosis. *J Cell Mol Med.* 22, 6112-6121.
- Yochum, G.S. and Ayer, D.E., 2001. Pf1, a novel PHD zinc finger protein that links the TLE corepressor to the mSin3A-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol.* 21, 4110-8.
- Zavesky, L., Jandakova, E., Turyna, R., Langmeierova, L., Weinberger, V., Minar, L. and Kohoutova, M., 2015. New perspectives in diagnosis of gynaecological cancers: Emerging role of circulating microRNAs as novel biomarkers. *Neoplasma.* 62, 509-20.
- Zhang, J., Tian, X.J., Zhang, H., Teng, Y., Li, R., Bai, F., Elankumaran, S. and Xing, J., 2014. TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. *Sci Signal.* 7, ra91.
- Zhang, J., Zhou, Y., Wu, Y.J., Li, M.J., Wang, R.J., Huang, S.Q., Gao, R.R., Ma, L., Shi, H.J. and Zhang, J., 2013. Hyper-methylated miR-203 dysregulates ABL1 and contributes to the nickel-induced tumorigenesis. *Toxicol Lett.* 223, 42-51.
- Zhang, P., Wang, G., Lin, Z., Wu, Y., Zhang, J., Liu, M., Lee, K.K.H., Chuai, M. and Yang, X., 2017. Alcohol exposure induces chick craniofacial bone defects by negatively affecting cranial neural crest development. *Toxicol Lett.* 281, 53-64.
- Zhang, Z., Zhang, B., Li, W., Fu, L., Fu, L., Zhu, Z. and Dong, J.T., 2011. Epigenetic Silencing of miR-203 Upregulates SNAI2 and Contributes to the Invasiveness of Malignant Breast Cancer Cells. *Genes Cancer.* 2, 782-91.
- Zhao, S., Yue, Y., Li, Y. and Li, H., 2019. Identification and characterization of 'readers' for novel histone modifications. *Curr Opin Chem Biol.* 51, 57-65.
- Zhu, G., Chai, J., Ma, L., Duan, H. and Zhang, H., 2013. Downregulated microRNA-32 expression induced by high glucose inhibits cell cycle progression via PTEN upregulation and Akt inactivation in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 433, 526-31.
- Zhu, Z., Xu, Y., Zhao, J., Liu, Q., Feng, W., Fan, J. and Wang, P., 2015. miR-367 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells by targeting the Smad7-TGF-beta signalling pathway. *Br J Cancer.* 112, 1367-75.
- Zimmer, J. and Puri, P., 2015. Knockout mouse models of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 31, 787-94.

10. Apéndice

10.1. Tabla 1 Resultados obtenidos con Jaspar 2018 (<http://jaspar.genereg.net/>) para los sitios de unión al factor de transcripción SNAIL2 en el promotor tentativo de miR-203. Los sitios de alta unión (> 9) se mapearon en la figura 27 A.

Matrix ID	Name	Score	Relative score	Sequence ID	Start	End	Strand	Predicted sequence
MA0745.1	SNAI2	12,6931	0.999707221414	miR_203_tentative_promoter	-1162	-1153	+	AACAGGTGC
MA0745.1	SNAI2	9,71729	0.94034684341	miR_203_tentative_promoter	-1552	-1543	+	GGCAGGTAC
MA0745.1	SNAI2	8,48966	0.915858769456	miR_203_tentative_promoter	-1089	-1080	-	CACAGGTGG
MA0745.1	SNAI2	7,98092	0.905710714071	miR_203_tentative_promoter	-1273	-1264	-	ATCAGGTGG
MA0745.1	SNAI2	4,63965	0.839061031445	miR_203_tentative_promoter	-1599	-1590	-	TGCATGTTT
MA0745.1	SNAI2	3,94346	0.825173896668	miR_203_tentative_promoter	-1527	-1518	+	TCAAGGTGT
MA0745.1	SNAI2	3,5435	0.817195747557	miR_203_tentative_promoter	-1199	-1190	-	TGGAGGTGG
MA0745.1	SNAI2	3,51455	0.816618237138	miR_203_tentative_promoter	-1293	-1284	+	AGAAAGTGA
MA0745.1	SNAI2	3,24005	0.811142584031	miR_203_tentative_promoter	-1082	-1071	+	TGCCAGTGC

>miR_203_tentative_promoter Chr 5:50767590-50768212

AGGACTGGCTTGAGTTGCCTATATATTATAAAGAGCCAAAGATCATAGGATCTGGAGTGCCAGAATTCATACACAGCATATACAGCTCTTTAAACATGCAAAACACTCTATTAACATGA
GTGAAGCCTCATAAGATGAGGCAGGTACGCATTATCTCTCCTCAAGTGTGGCGAAGTGACTTGGTGAAGCCTGAGGCTGAGTCGCTGGCAGAGCAGGGCCGACTATCCACAACCT
TCCTACACCACACAGGCTGCCCCGTCAGCATGGCAAAGCGTGAAGGCCTTCCCGTCCACCCAGCAGCAGGGCTCCGAAAGCCAGTGGGTTGTGTTTCATTCTTCTCCTATAGACAAAG
AGGGTGAAATATTAATGGAAGAAAGTCAAATTCAGAGAAAGTGACTCCCGGAAGCAACCTGATTTCTGGAAGTTCATGAAATCATACAATTGTTGAGTTGGAAGGACCCCTAAAGG
CCATCCAGTCCAACCTCCATGCAATAAGTAGGGACTCCACGGCTCCAAACAGGTGTCAGAGCCCCGCTCCAGCCTGACCTTGGCTGTCTAAGGACAGGGCACCCACCATCTCTGGGCA
ACCTGTGCCAGTGCCCT

10.2. Abreviaturas

3'UTR	3' Untranslated region (Región 3' no traducida)
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNdc	ADN doble cadena
ADNsc	ADN simple cadena
AGO	Argonata
ALB	Albumina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	ARN de doble cadena
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina Sérica Bovina
cm	Centímetros
Cq	Ciclo de cuantificación
Da	Dalton
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNMT	ADN metiltransferasa
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxi ribonucleósidos tri-fosfato
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
K	Kilo
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de Potasio

KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de potasio
L	Litro
LB	Medio Luria broth
M	Molar
mA	Miliamperios
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
miARN	MicroARN
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PBSw	PBS y 0,1% Tween20
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
RISC	RNA Induced Silencing Complex (Complejo de silenciamiento inducido por ARN)
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minutos
RQ	Relative quantity (cantidad relativa)
RT	Reverse transcription (transcripción reversa)
RT-qPCR	RT-quantitative PCR
SDS	Sodio dodecil sulfato
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Solución salina de citrato de sodio
TBE	Tris/Borato/EDTA
TBS	Tris-buffered saline (<i>buffer</i> salino tris)
TEMED	Tetrametil etileno diamino
Tm	Melting temperature (temperatura de disociación)
Tris	Tris hidroximetil aminometano
U	Unidades
μL	Microlitros
UV	Ultravioleta
V	Voltios
W	Watts

El presente documento es la última versión de la tesis e incluye las correcciones sugeridas por los jurados.



PhD Estefanía Sánchez Vásquez
12 de Setiembre del 2022