



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Centro de  
Investigación en  
Dinámica Celular



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas



Instituto Nacional  
de Salud Pública

**Universidad Autónoma del Estado de Morelos**  
**Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas**  
**Centro de Investigación en Dinámica Celular**

**Diseño y construcción de plásmidos que generen siRNAs para el  
silenciamiento de PD-L1**

**T e s i s**

**para obtener el título de:**

**Licenciado en Ciencias en área terminal en Bioquímica y Biología Molecular**

**PRESENTA:**

**Samantha Margot Martínez Cortés**

**Generación 2018-2022**

**Director de tesis: Dr. Oscar Peralta Zaragoza**

**Asesora: Dra. Gabriela Elizabeth Campos Viguri**

**Cuernavaca, Morelos, México**

**Marzo 2023**

## Agradecimientos

Esta tesis de licenciatura se realizó en la Dirección de infecciones Crónicas y Cáncer del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP); bajo la Dirección del Dr. Oscar Peralta Zaragoza. La tesis está anidada al proyecto de investigación: “Caracterización de la respuesta inmune antitumoral contra células de cáncer cervical que tienen edición génica multiplex de PD-L1/PD-L2 y CMTM4/CMTM6”, el cual tienen un financiamiento por parte de la agencia financiadora de Ciencia de Frontera CONACYT convocatoria 2019, con clave del proyecto: CONACYT CF-MG-20191007114743133-61531. Además, este proyecto está registrado en el SIID del INSP con clave de proyecto: CISEI-2005. El Dr. Oscar Peralta Zaragoza es el responsable técnico del proyecto de investigación y es el Director de tesis.

## Dedicatorias

Para mis seres queridos, mi padre, madre y mi hermano que tuve un apoyo incondicional, siempre confiaron en mi y me animaron ante toda adversidad, a mi novio ahora mi prometido, siempre atrás de mi dándome ánimos y motivación. También a mi tutora de carrera que me motivo y me ayudo mucho en mi crecimiento personal.

Al Dr. Oscar Peralta le agradezco mucho por haberme integrado en su equipo de trabajo y darme la confianza trabajar con él, me ayudo a confrontar varias adversidades, guiándome y asesorarme ante cualquier problema o duda.

Pero principalmente, esta tesis es dedicada a mi mamá que lamentablemente no esta presente conmigo, pero yo se que le hubiera gustado presenciar este momento y acompañarme en todo este proceso, te agradezco mucho por la educación que me brindaste, por el amor y apoyo que siempre tuviste por mí, y donde quiera que estes te lo agradeceré eternamente, te amo mamá. Los amo a toda mi familia, la familia de mi novio y mi ahora prometido, estoy muy agradecida y bendecida por el gran amor que me brindan y el apoyo que me dan.

## Contenido

Agradecimientos.....	2
Dedicatorias .....	3
1. Resumen .....	6
2. Abreviaturas.....	8
3. Introducción .....	9
4. Planteamiento del problema .....	11
5. Marco teórico .....	12
5.1 Vectores de expresión.....	12
5.2 siRNAs: función y biogénesis. ....	13
5.3 Respuesta inmune antitumoral.....	16
5.4 Interacción del punto de control inmune PD-1/PD-L1. ....	16
6. Justificación .....	18
7. Hipótesis.....	18
8. Objetivos.....	20
8.1 Objetivo general .....	20
8.2 Objetivos específicos: .....	20
9. Metodología.....	21
9.1 Análisis bioinformático de los siRNAs .....	21
9.2 Análisis del patrón de restricción del plásmido pSilencer 1.0 U6 con las enzimas <i>ApaI</i> y <i>EcoRI</i> .....	21
9.3 Alineamiento de los oligonucleótidos .....	22
9.4 Clonación del inserto de DNA .....	23
9.5 Caracterización enzimática de las clonas con el inserto de DNA.....	24
9.6 Purificación de plásmidos por el sistema de columnas Midiprep (Promega) 24	
9.7 Secuenciación de DNA .....	24
10. Resultados.....	26
10.1 Diseño de Bioinformático de siRNAs .....	26
10.2 Alineamiento de oligonucleótidos.....	29

10.5	Verificación de insertos de clonas positivas.....	33
10.6	Secuenciación de las construcciones plasmídicas generadas.....	37
11.	Discusión .....	41
12.	Conclusiones .....	45
13.	Perspectivas .....	45
14.	Anexos.....	46
15.	Referencias.....	50

## 1. Resumen

**Introducción:** El estudio de la interacción PD-1/PD-L1 es de interés terapéutico, debido a que es un punto de control del sistema inmune clave en la evasión inmunológica de los tumores. PD-L1 se sobre-expresa en la superficie de las células tumorales, mientras que, el receptor PD-1 está presente en la superficie de linfocitos T; tras su reconocimiento y unión, la célula T es inactivada y no ejerce su actividad anti-tumoral. Por lo tanto, el silenciamiento del gen PD-L1 por medio de construcciones de plásmidos que expresen siRNAs, representa una oportunidad para estudiar las posibilidades terapéuticas de bloquear esta interacción ligando/receptor. **Objetivo:** Diseñar y generar plásmidos que contengan secuencias de siRNAs dirigidos a PD-L1. **Metodología:** Se realizó un análisis bioinformático para diseñar oligonucleótidos que contuvieran siRNAs dirigidos a PD-L1. Los oligonucleótidos se sinterizaron e hibridaron para generar un inserto de DNA, cuyos extremos fueron flanqueados por sitios de restricción enzimática para *EcoRI* y *ApaI*. El inserto de DNA se clonó en el sitio múltiple de clonación del plásmido pSilencer 1.0 U6. Bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ , se transformaron por choque térmico con las construcciones de plásmidos generadas y las colonias bacterianas resistentes a ampicilina fueron seleccionadas y destinadas a extracción de DNA. Se realizó una restricción enzimática con *HindIII* de los plásmidos obtenidos y su movilidad se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Posteriormente, la presencia del inserto de interés se confirmó por secuenciación de DNA, y los plásmidos fueron purificados a gran escala mediante un sistema de columnas. **Resultados:** Se obtuvieron los plásmidos pPDL1SIRNA1, pPDL1SIRNA2, pPDL1SIRNA3 y pPDL1SIRNA4, cada uno con una secuencia específica de siRNA dirigido a la región 3'-UTR del mRNA de PD-L1. **Conclusiones.** Los resultados indican que los plásmidos pPDL1SIRNAs tienen clonados siRNAs específicos para inducir el silenciamiento del gen de PD-L1. Eventualmente, se evaluará la funcionalidad de los plásmidos para silenciar a PD-L1 en células de cáncer cervical.

**Palabras clave:** Plásmidos, siRNAs, PD-1/PDL-1.



## 2. Abreviaturas

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

mRNA: RNA mensajero.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

NK: Natural Killers.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PD-1/PD-L1: Interacción de PD-1 con PD-L1.

PD-1: Proteína de muerte celular programada 1.

PD-L1: Ligando de la Proteína de muerte celular programada 1.

RISC: Complejo de Silenciamiento inducido por RNA.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAi: RNA de interferencia.

shRNA: RNA de horquilla corta.

siRNA: RNA de interferencia pequeño.

UPR: Proteína Reguladora Corriente Arriba.

UTR: Región no traducida.



### 3. Introducción

Los plásmidos son herramientas biotecnológicas que permiten incrementar, disminuir o silenciar la expresión de genes específicos. La fácil producción y versatilidad del diseño de los plásmidos, reduce sus costos e incrementa su uso en la investigación científica, puesto que su naturaleza de DNA circular, les permite duplicarse de manera exponencial en modelos bacterianos, aprovechando su maquinaria de replicación, incluso independientemente de si el huésped bacteriano está replicando su propio DNA. El conjunto de estas características hace que los plásmidos sean vehículos atractivos para introducir DNA exógeno, evaluar la funcionalidad de genes o modificar su expresión, usando moléculas como los mRNA, shRNAs, miRNAs, siRNAs, entre otros [1,2].

Los siRNAs son RNAs de interferencia cuya longitud oscila entre de 21 a 23 nucleótidos (nts) aproximadamente. Estas moléculas reconocen y se unen a un mRNA objetivo a través del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) del que forman parte, con la finalidad de silenciar o disminuir su expresión. Su particular especificidad hacia blancos determinados, hace de los siRNAs una excelente herramienta en diferentes campos de investigación, entre ellos, la inmunoterapia [3].

Las estrategias inmunoterapéuticas tienen como objetivo estimular al sistema inmune para reconocer y atacar a las células transformadas. Por ejemplo, la inmunoterapia basada en el bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 (proteína de muerte celular programada 1/ ligando de la proteína de muerte celular programada) ha demostrado efectos antitumorales prometedores en muchos tipos de cáncer, por lo que actualmente es una estrategia de interés en terapia antitumoral [4].

El ligando PD-L1 está sobre-expresado en la membrana de células tumorales, mientras que PD-1 en la de linfocitos T. La interacción de PD-1/PD-L1 reduce la activación de los linfocitos T, conduciendo a la evasión de la vigilancia inmune del huésped, y permitiendo, por lo tanto, el crecimiento tumoral[5]. Dado que es

importante analizar los eventos biológicos que representa el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1, el diseño y obtención de plásmidos con secuencias de pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) dirigidos a PD-L1, brindará una herramienta útil para evaluar los efectos del bloqueo de dicha interacción por silenciamiento de PD-L1 en investigaciones futuras.

#### 4. Planteamiento del problema

Las estrategias para combatir el cáncer son poco efectivas y las basadas en quimioterapia generan una toxicidad grave, bajo estas circunstancias, se necesita desarrollar tratamientos nuevos y efectivos. La inmunoterapia resulta ser una estrategia prometedora que tiene un historial de viabilidad y seguridad en el tratamiento del cáncer. Actualmente un blanco de la inmunoterapia es PD-L1, cuya sobre-expresión correlaciona con la progresión tumoral, debido a que su unión al receptor PD-1, restringe la respuesta antitumoral citotóxica de las células T CD8 +. Por lo tanto, en la presente tesis se planteó realizar el diseño y generación de plásmidos con secuencias de siRNAs específicos para el gen humano PD-L1, con la finalidad de que, en el futuro, estos plásmidos puedan servir como una herramienta en el estudio de procesos inmunes en modelos *in vitro*.

## 5. Marco teórico

### 5.1 Vectores de expresión

Los plásmidos son pequeños fragmentos circulares de DNA extracromosómico que pueden replicarse de manera independiente del DNA cromosómico del organismo que los aloje, generalmente bacterias y otros organismos microscópicos. Aunque no son esenciales para las bacterias, pueden conferirles una ventaja selectiva. Los plásmidos se utilizan para introducir, manipular o eliminar ciertos genes de la célula huésped, por lo que son considerados herramientas de gran valor en los campos de la biología molecular y la genética[1]. Estructuralmente poseen: 1) un origen de replicación, para garantizar que el vector se copie dentro de las bacterias; 2) un gen de resistencia a antibiótico, para seleccionar bacterias que contengan el plásmido; 3) un sitio de marcador múltiple o clonación múltiple, que consiste en un conjunto de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, que sirven de marco para la inserción de un DNA exógeno; 4) un marcador de selección para su utilización en otros organismos; y 5) una región promotora que será reconocida por la maquinaria de transcripción de la célula huésped y que impulsará la transcripción del gen diana de acuerdo a su naturaleza [2, 6]. El diseño de los plásmidos de expresión, se basa en la molécula que será insertada en ellos para su producción, y en este contexto, se consideran los procesos moleculares que ocurren de manera normal en las células, por ejemplo, la RNA polimerasa tipo II se encarga de la transcripción del mRNA y miRNAs (microRNAs), mientras que, la RNA polimerasa tipo III, se encarga de la transcripción de shRNA (RNA de horquilla corta) y siRNAs. Esto ofrece la posibilidad de dirigir el diseño dependiendo de la molécula que se desea expresar. Por otro lado, los vectores de expresión pueden emplearse para adquirir el producto génico, es decir, una proteína de interés. La longitud de los plásmidos varía respecto a los elementos que lo conforman y al tipo de inserto que se clone en ellos, siendo frecuentemente superior a las mil pares de bases [1, 2, 6, 7].

## 5.2 siRNAs: función y biogénesis.

La función de los RNA de interferencia (RNAi o siRNAs) es inducir el silenciamiento de genes a nivel postranscripcional con un alto grado de especificidad. Se ha mostrado que los siRNAs generan baja toxicidad, por lo que se han propuesto como una herramienta útil no solo en genómica funcional, sino también, para aplicaciones terapéuticas precisas y personalizadas [8].

A diferencia del mecanismo de acción de terapias basadas en moléculas pequeñas y anticuerpos, donde el reconocimiento espacial de proteínas blanco es clave, los siRNAs ejecutan su función mediante el emparejamiento completo de bases de Watson-Crick con el mRNA blanco al que se dirigen; siendo entonces, moléculas con alta actividad, afinidad y especificidad. No obstante, su uso en la terapia de enfermedades enfrenta una serie de restricciones; por ejemplo, el mecanismo de administración sin modificaciones previas en la molécula, aumenta el riesgo de su degradación, debido a que el enlace fosfodiéster queda expuesto a RNAasas y fosfatasas. Además, las cargas eléctricas del siRNA y de la membrana celular pueden repelerse, impidiendo que el siRNA llegue a su destino. Por lo tanto, los sistemas de administración terapéutica deben considerar dos barreras: 1) el transporte a través de la membrana celular y; 2) el escape de la vía endocítica [10–13].

Otra variable a considerar en la aplicación de siRNAs como terapia, es su diseño, debido a que cambios en su estructura condicionan su potencia y especificidad. Un siRNA convencional consta de 21 a 23 nucleótidos con dos nucleótidos salientes en el extremo 3' (generalmente TT y UU), que son importantes para su reconocimiento por parte de la maquinaria de RNAi[8,10,13]. Los algoritmos empleados en el diseño de siRNAs, se basan en el análisis de la secuencia blanco (mRNA) en su región 3' UTR y de los parámetros estructurales y termodinámicos propios del siRNA, que brinden mayor estabilidad y especificidad a la molécula, tales como: 1) que el sitio de hibridación del siRNA se ubique en la región 3'-UTR del mRNA blanco; 2) cumplir la regla de asimetría, es decir, que la estabilidad termodinámica relativa de los dos extremos del dúplex del siRNA contribuya a la selección de la hebra guía que

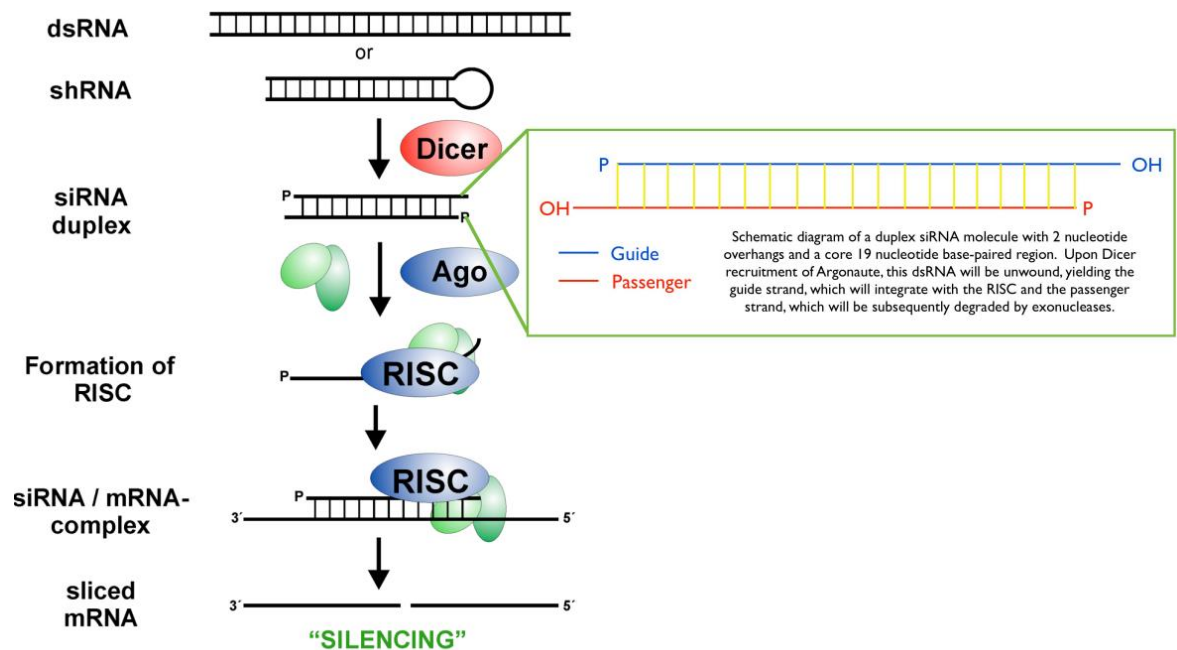
interactuará con el complejo RISC (siRNA funcional); y 3) que el contenido de G+C oscile entre el 37 % y el 47 %, dado que porcentajes inferiores pueden desestabilizar el apareamiento de bases y porcentajes mayores podrían impedir la acción de RISC y/o provocar la liberación del mRNA blanco[14].

A nivel celular, los RNAi se producen a través del procesamiento endonucleolítico de una secuencia larga de dsRNA (RNA de doble cadena) dirigido por la enzima Dicer, una RNAsa de tipo III que se caracteriza por contener 6 dominios ubicados desde el extremo amino terminal hasta el carboxilo terminal, teniendo el siguiente orden: un dominio DEXD/H ATPasa, un dominio DUF283, un dominio PAZ, dos dominios tándem de RNasa III y un dominio de unión a dsRNA (dsRBD)[15–18]. Dicer es la primera enzima que interactúa y escinde dsRNAs largos (precursores de siRNAs), dando lugar a estructuras de dsRNA de ~21-23 pb de longitud, en cuyos extremos 3' habrá un dinucleótido saliente, mientras que, en los extremos 5', un grupo monofosfato. Los extremos cohesivos del dsRNA son producto de la actividad de los dominios PAZ y RNasa III de Dicer. Después de la digestión, Dicer permanece asociada al siRNA dúplex intermediario de 22 pb y posteriormente es liberada por una helicasa [17–19].

Entonces el siRNA dúplex es reconocido eficientemente por el complejo proteico RISC, que incluye la proteína Argonauta 2 (AGO2). Estructuralmente, AGO2 tiene 2 lóbulos, el primero contiene un dominio PAZ y el segundo consiste de un dominio PIWI, flanqueado por dominios N-terminal (N) y medio (MID) [19].

Tras el reconocimiento del siRNA dúplex por RISC, el complejo se ancla a los extremos cohesivos del siRNA, a través de sus dinucleótidos salientes en los extremos 3', induciendo el desenrollamiento del dúplex, y subsecuente asociación estable de AGO2 con una de las cadenas del siRNA dúplex. Esta asociación implica que, espacialmente el dinucleótido 3' sea reconocido específicamente por el dominio PAZ de AGO2, mientras que el grupo fosfato del extremo 5' se inserte entre los dominios MID y PIWI, uniéndose a un ion de magnesio que a su vez está coordinado con el extremo C-terminal de la proteína [15, 16]. Finalmente, AGO2 se une a la hebra guía en el extremo 5' (menos estable termodinámicamente) y

posteriormente, corta la hebra pasajera para estimular su expulsión. En este complejo siRNA-RISC, las bases de la hebra guía desde su extremo 5' se encuentran descubiertas y libres para participar en el emparejamiento de bases de Watson-Crick con el mRNA objetivo para su silenciamiento[15, 16].



**Figura 1. Biogénesis de siRNAs.** Secuencias de dsRNA o shRNA son reconocidas y escindidas por la enzima Dicer, para formar siRNAs dúplex de 21 a 23 nucleótidos de longitud. Posteriormente, el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) reconocerá y se unirá a la cadena guía del siRNA dúplex, seguido por la unión de la proteína Ago. Una vez formado el complejo RISC, el siRNA hibridará por complementariedad de bases con secuencias específicas de un mRNA diana para degradarlo. Imagen tomada por Department of Chemistry, Hartig Group: Biopolymer Chemistry.

### **5.3 Respuesta inmune antitumoral**

En condiciones normales, el sistema inmune funciona para proteger al huésped contra la autoinmunidad, las alergias y las enfermedades infecciosas. Además, en el microambiente tumoral (TME) el sistema inmune ataca a las células tumorales por medio de linfocitos T que se encargan de eliminar de forma selectiva los patógenos y las células anormales, pero evita atacar a las células normales, a esto se le denomina como homeostasis inmunitaria. Esta respuesta inmune requiere de la co-estimulación de dos señales de las células presentadoras de antígeno (APC). La primera señal es específica y consiste en el reconocimiento del antígeno, mediante la interacción entre el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) antigénico y el receptor de células T (TCR); la segunda señal es independiente al antígeno, es una señal “co-estimuladora”, entre moléculas presentes en APC y en células T. Por otro lado, se han descrito señales co-estimuladoras negativas, es decir, co-inhibitorias, como lo son las señales emitidas por proteínas involucradas en puntos de control inmune, y que tienen como propósito modular negativamente la activación de las células T [20–22]. Los puntos de control inmune se refieren a un conjunto de vías de regulación inmunológica que mantienen la auto-tolerancia, previenen la autoinmunidad y mitigan los daños colaterales en los tejidos, entre ellas se encuentra, la interacción entre PD-1 y su ligando, PD-L1.

### **5.4 Interacción del punto de control inmune PD-1/PD-L1.**

PD-1 es una proteína que pertenece a la familia CD28/CTLA-4 y está presente en la superficie de diversas células del sistema inmune, especialmente linfocitos T y B, monocitos, células dendríticas (DC) y células asesinas naturales (NK) [22]. Por otro lado, PD-L1, el ligando de PD-1, es una proteína transmembranal, cuya sobre-expresión se asocia positivamente con metástasis tumorales, progresión tumoral y mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer [4, 22, 23].



En condiciones normales, la vía PD-1/PD-L1 induce y mantiene la tolerancia inmune, además, previene la inflamación excesiva de tejidos por enfermedad autoinmune. Sin embargo, durante el desarrollo y establecimiento del cáncer, en el TME, el eje PD-1/PD-L1 promueve el escape a la vigilancia inmunológica, y la subsecuente proliferación, diseminación y metástasis de las células tumorales hacia otros tejidos u órganos, al mismo tiempo que, suprime la llegada y proliferación de nuevos linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), así como inhibe la secreción de mediadores citotóxicos por las células T, principalmente, de citocinas inflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ . Por lo que, la expresión de PD-1 se define como un sello distintivo del agotamiento de las células T, identificado en la infección por virus y el desarrollo de cáncer.

Debido a la importancia que tiene restaurar el sistema inmune del huésped, la inmunoterapia contra el cáncer ha logrado grandes avances clínicos en los últimos años, especialmente en el bloqueo de puntos de control inmune, como PD-1/PD-L1, que han mostrado ser de interés en la erradicación del tumor mediada por el sistema inmunitario[22, 25, 26]. Aunque actualmente, se conoce que la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado el uso de anticuerpos para bloquear el eje PD-1/PD-L1[26–28], aún hay campo de investigación sobre los efectos que tendría el bloqueo de PD-L1, sobre diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer cervical.

## 6. Justificación

Los plásmidos son herramientas útiles para introducir, manipular o eliminar genes de interés. En los laboratorios de investigación se han usado ampliamente para expresar siRNAs, a través de la introducción de oligonucleótidos diseñados con las secuencias de estos RNAs pequeños con la finalidad de inducir el silenciamiento de genes de manera altamente específica. Este tipo de estrategias han sido de utilidad en el estudio de la heterogeneidad tumoral, debido a que se han logrado dilucidar mecanismos celulares y moleculares involucrados en la carcinogénesis. No obstante, hay procesos biológicos que necesitan ser estudiados con profundidad, entre ellos, los involucrados en la respuesta inmune contra tumores. En este sentido, el estudio de los puntos de control inmune, como PD-1-PD-L1, podrían ofrecer conocimiento para entender la regulación inmunológica de los tumores. Por lo tanto, la generación de plásmidos que contengan secuencias de siRNAs específicos para PD-L1, podría implicar el desarrollo de una herramienta útil en la evaluación de los efectos biológicos desencadenados por el bloqueo del eje PD-1/PD-L1.

## 7. Hipótesis

El análisis bioinformático en la región 3'UTR del gen humano PD-L1 proporcionará criterios de estructura y función adecuados para diseñar oligonucleótidos con secuencias de siRNAs específicos que puedan ser usados en la generación de plásmidos eficientes.



## 8. Objetivos

### 8.1 Objetivo general

Generar construcciones de plásmidos que contengan secuencias de siRNAs dirigidos al gen humano PD-L1.

### 8.2 Objetivos específicos:

1. Diseñar oligonucleótidos que contengan secuencias de siRNAs dirigidas al gen humano PD-L1 y obtenidas por análisis bioinformático.
2. Clonar insertos de DNA que contengan siRNAs dirigidos al gen humano PD-L1 en un plásmido de expresión de RNAs pequeños de interferencia.
3. Obtener y secuenciar las construcciones de plásmidos que contengan secuencias de siRNAs dirigidos al gen humano PD-L1.

## 9. Metodología

### 9.1 Análisis bioinformático de los siRNAs

El diseño bioinformático de los siRNAs dirigidos al gen humano PD-L1 ó CD274 (No. acceso: NM\_014143.4; NCBI; ID:29126) se realizó con la base de datos de siRNA Selection Server (<http://sirna.wi.mit.edu/>) [27] usando el formato FASTA de la región 3'UTR del transcrito de PD-L1. Los criterios de selección de los siRNAs candidato fueron: 1) contener un porcentaje de GCs en un rango de 37% a 47%; 2) un valor termodinámico menor a -3; 3) secuencias con mayor probabilidad de hibridación específica al mRNA de PD-L1 (filtrado mediante posición y localización por análisis de secuencias en Blast [27]).

Los siRNAs candidatos y sus correspondientes secuencias complementarias se usaron en el diseño de oligonucleótidos. Ambas secuencias constituyeron el oligonucleótido sentido y fueron posicionadas en dirección 5'-3', separadas por una secuencia loop o formadora de horquilla y flanqueadas por los sitios de restricción enzimática para *Apal* y *EcoRI*. El oligonucleótido anti-sentido consistió en una secuencia invertida complementaria. La hibridación de los oligonucleótidos dio lugar al inserto de DNA que se clonó en el plásmido p*Silencer*<sup>TM</sup> 1.0-U6 (Ambion Inc, Texas, USA), debido a que tiene un promotor con un sitio de inicio de la transcripción definido, el promotor U6 RNA polimerasa III, y además, tiene una secuencia de terminación de Pol III en una cadena de 4 a 5 uridinas. Incluso para los vectores de expresión de siRNA, los sitios diana deben tener AA terminales 5' porque, al plegarse, las horquillas de siRNA darán lugar a salientes UU. Estos salientes UU serán, por lo tanto, complementarios al AA en el sitio de destino. Seguido de que las secuencias diana de siRNA de 21 nucleótidos se comparan con una base de datos genómica adecuada para eliminar las secuencias con una homología significativa con otros genes.

### 9.2 Análisis del patrón de restricción del plásmido p*Silencer* 1.0 U6 con las enzimas *Apal* y *EcoRI*

El plásmido p*Silencer*<sup>TM</sup> 1.0-U6, fue producido a gran escala mediante transformación por choque térmico de bacterias *E. coli* calcio-competentes de la

cepa DH5 $\alpha$ , su integridad se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. La linearización del plásmido se hizo por restricción enzimática usando *ApaI* (Thermo Scientific™, Carlsbad, USA) y *EcoRI* (Thermo Scientific™, Carlsbad, USA) como se muestra en la **tabla 2** que, de acuerdo al mapa del sitio múltiple de clonación del plásmido, flanquean el sitio de restricción para *HindIII*. Se verificó el patrón de migración del plásmido antes y después de la digestión enzimática, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Tabla 2. Mezcla de reacciones de las enzimas <i>ApaI</i> y <i>EcoRI</i> .			
Enzimas	RxMx		Condiciones
ApaI	DNA	2 $\mu$ l	37°C a 2 h
	Buffer	1 $\mu$ l	
EcoRI	DNA	2 $\mu$ l	37°C a 2 h
	Buffer	1 $\mu$ l	
ApaI y EcoRI	DNA	2 $\mu$ l	37°C a 2 h
	Buffer	1 $\mu$ l	
EcoRI y ApaI	DNA	2 $\mu$ l	37°C a 2 h
	Buffer	1 $\mu$ l	

### 9.3 Alineamiento de los oligonucleótidos

El alineamiento de los oligonucleótidos sentido y anti-sentido, se realizó usando las condiciones mostradas en la tabla 3. Los alineamientos de DNA fueron verificados por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 10%.

Tabla 3. Condiciones de alineamiento de oligonucleótidos.	
Condición 1	A 10 min a 95°C + 10 min a 77°C
Condición 2	A 10 min a 95°C + disminución gradual de 1 h
Condición 3	A 10 min a 95°C + 1 h a 37°C
Condición 4	A 10 min a 95°C + choque térmico de 1 h

#### 9.4 Clonación del inserto de DNA

Los insertos de DNA fueron clonados en el plásmido p*Silencer*<sup>™</sup> 1.0-U6 (Ambion Inc, Texas, USA), que contiene el gen de resistencia para ampicilina; un origen F1 para el empleo de fagos; un origen de ColE1 para el empleo de bacterias; un sitio de clonación múltiple y un promotor de RNA polimerasa III (Pol III) U6. Se eligió RNA pol III para impulsar la expresión de siRNA porque expresa cantidades relativamente grandes de RNA pequeños en células de mamíferos y termina la transcripción al incorporar una cadena de 3 a 6 uridinas. La última característica es especialmente importante debido al requisito aparente de que los siRNA tengan extremos 3' definidos que se hibridarán con un mRNA diana (6). El promotor U6 se considera un promotor simple que se encuentran en la secuencia río arriba de la secuencia que se transcribe. Esto elimina cualquier necesidad de incluir la secuencia promotora dentro del siRNA. Brevemente, el plásmido p*Silencer*<sup>™</sup> 1.0-U6 previamente linearizado por *ApaI* y *EcoRI* cada inserto de DNA fue ligado con los extremos cohesivos generados por las mismas enzimas. Las relaciones de ligación comprendieron de relaciones vector:inserto (V:I) de 1:5 y 1:10, T4 ligasa [10 U/μL], buffer T4 ligasa [10X] y agua estéril. Una reacción solo con el vector fue incluida como control. Las reacciones se incubaron toda la noche a 14°C y posteriormente fueron usadas para transformar por choque térmico bacterias *E. coli* calcio-competentes de la cepa DH5α. Las bacterias transformadas fueron inoculadas en medio LB sólido con ampicilina [100 mg/ml] y las placas de cultivo se

incubaron de 16-20 h a 37°C. Las colonias bacterianas que crecieron fueron aisladas y destinadas para extracción de DNA por lisis alcalina (Anexo 1) y posteriormente por el sistema de columnas Midiprep (Promega, Massachusetts, USA).

### **9.5 Caracterización enzimática de las clonas con el inserto de DNA**

El DNA plasmídico extraído de las colonias bacterianas seleccionadas, así como el plásmido pSilencer™ 1.0-U6 sin inserto de DNA, fueron digeridos con la enzima *HindIII* [ 10 U/μL] y los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los plásmidos que no fueron digeridos con la enzima *HindIII* se secuenciaron para corroborar la clonación de los insertos de DNA que contenían los siRNAs candidatos.

### **9.6 Purificación de plásmidos por sistema de columnas**

Bacterias *E. coli* de la cepa DH5α transformadas con los plásmidos de interés, fueron concentradas por centrifugación a 3500 rpm durante 15 min. Las bacterias fueron resuspendidas en 600 μl de Buffer TE, y posteriormente lisadas con 100 μl de solución de Lisis celular. La reacción de lisis fue neutralizada con 350 μl de solución de neutralización (4-8°C), obteniéndose un precipitado, que posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min, El sobrenadante obtenido fue transferido a una minicolumna colocada a un microtubo y se adicionaron 200 μl de solución de lavado para eliminación de endotoxinas. La mezcla fue filtrada por centrifugación a 12,000 rpm durante 15 s. y la membrana de la columna se lavó con 400 μl de solución de lavado y usando las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, la columna se colocó en un microtubo nuevo y el DNA fue recuperado por centrifugación a 12,000 rpm durante 1 min, usando 30 μl de tampón de elución. Los plásmidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

### **9.7 Secuenciación de DNA**

Para la secuenciación, se preparó la muestra en una mezcla DNA/Oligo con un volumen final de 16 μl en un tubo eppendorf de tapa plana de 0.2 ml para PCR, sin tener ninguna anotación en la tapa. La mezcla DNA/oligo debe de tener 10 pmol de



los oligonucleótidos y de DNA se considera el tamaño del plásmido dado que se encuentra en el rango de tamaño de 3-5 Kb, por lo que se requiere de 300-500 ng de plásmido, para el oligonucleótido se llevó a un volumen final de 50  $\mu$ l donde contiene los 10 pmol deseado por lo que se tomó solo 1  $\mu$ l, en caso de los plásmidos purificados y que tiene diferentes concentraciones se ajusta a un volumen final de 15  $\mu$ l sumando así los 16  $\mu$ l necesarios para mandar a secuenciar. Para la visualización de resultados se requirió del software de nombre Chromas para poder visualizar los electroferogramas, como las búsquedas de las secuencias sentido para corroborar que se encuentra presente en el inserto.

## 10. Resultados

### 10.1 Diseño Bioinformático de siRNAs

El diseño y análisis *in silico* de los siRNAs candidato para PD-L1, se realizó ingresando la secuencia correspondiente a la región 3'-UTR del mRNA de PD-L1 en formato FASTA (ID:29126) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Anexo 2) a la plataforma bioinformática siRNA Selection Server (<http://sirna.wi.mit.edu/>). El filtrado de la matriz global de siRNAs, consideró un porcentaje de GCs de 37% a 47%, valores termodinámicos menores de -3, así como la localización y posición de los nucleótidos que hibridarán con la región 3'-UTR del mRNA de PD-L1. El análisis arrojó 4 siRNAs candidato (marcados en amarillo) (**tabla 4**), que fueron empleados en el diseño de oligonucleótidos. El oligonucleótido sentido se diseñó usando la secuencia de cada siRNA candidato (en naranja) y su secuencia complementaria (en verde), ambas posicionadas en dirección 5'-3', separadas por una secuencia generadora de horquilla (en amarillo) y flanqueadas por los sitios de restricción enzimáticos para *ApaI* y *EcoRI* (en azul), presentes en el sitio múltiple de clonación del plásmido pSilencer™ 1.0-U6; mientras que el oligonucleótido anti-sentido correspondió a una secuencia complementaria (**tabla 5**). Adicionalmente, apoyado en el software NEBCutter (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/prj/>) se realizó un análisis bioinformático para determinar que los oligonucleótidos diseñados no presentaran sitios de restricción enzimáticos presentes en el vector pSilencer™ 1.0-U6. Los oligonucleótidos diseñados fueron sintetizados por la Unidad de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Anexo 2).

<b>Tabla 4.</b> Resultados de candidatos de siRNAs ( <a href="http://sirna.wi.mit.edu">http://sirna.wi.mit.edu</a> )				
No.	Posición 3'UTR	siRNA	GC%	Valores termodinámicos
1	207	GAGACCTTGATACTTTCAAATGC	32	-5.9
2	103	TGCAGGCAATGTGGGACTTAAAA	47	-5.6
3	1226	GGGACGGTTGGATATACTTAAAC	37	-5.5
4	1089	AAGGAGCTCATAGTATAATGAGG	37	-5.2
5	1931	AGGGTGCACCTGAGTCAATCTAGT	47	-4.7
6	496	GTGTGGTTGTGAATGATTTCTTT	37	-4.6
7	1190	GTGTTGCCAAGAGGAGGAAATAG	47	-4.5
8	2254	TGGCCATATTCTGGTGTCAATGA	42	-4.5
9	1939	CTGAGTCAATCTAGTCCTAAAAA	37	-4.3
10	1710	TAGCAGATGGAATGAATTTGAAG	37	-4.3
11	372	GCCTCCACTCAATGCCTCAATTT	47	-3.8
12	1553	CTGCTACTGCCTTTCATTCATAT	42	-3.7
13	754	TGCAGTATCTGTTCCATTTAAAT	32	-3.7
14	1039	GTGCCAGGCATTGAATCTACAGA	47	-3.7
15	792	ATGTGGTAGCCTACACACATAAT	47	-3.6
16	1356	TTGCCTTTGCCATATAATCTAAT	37	-3.4
17	838	CTGTTGTGATAACCACTATTATT	32	-3.4
18	2200	TGGAGGTTTCGAGATTCAGATGC	42	-3.4
19	2430	AAGGCACATAGTCTACTCAGTCT	47	-3.3
20	2197	TCCTGGAGGTTTCGAGATTCAGA	47	-3.3
21	205	GGGAGACCTTGATACTTTCAAAT	37	-3.3
22	251	GTGACAGGGAGAAAGGATACTTC	47	-3.2

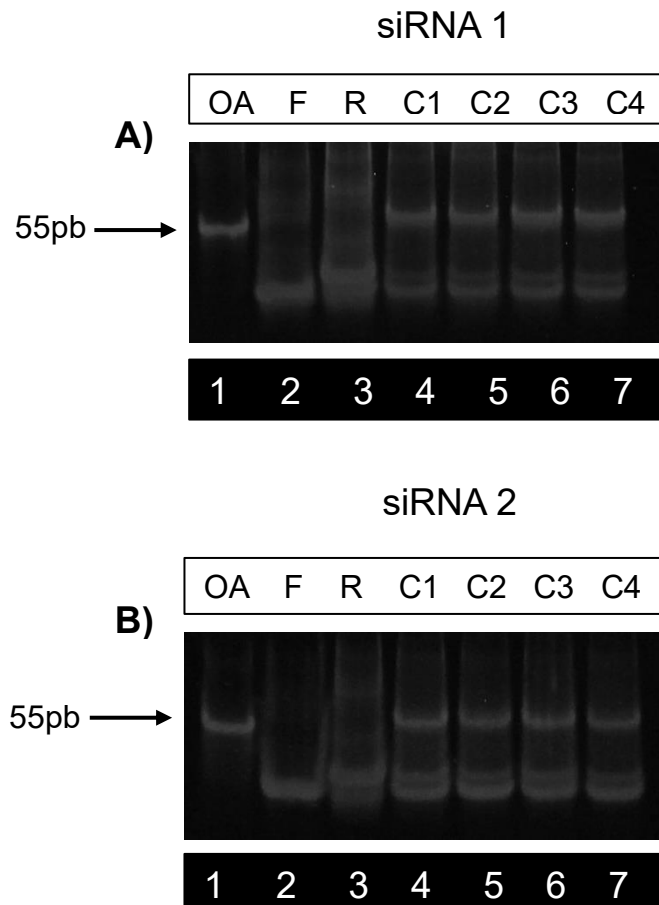
23	622	TGGTCTCCTCTATAACTACAAGT	37	-3.0
----	-----	-------------------------	----	------

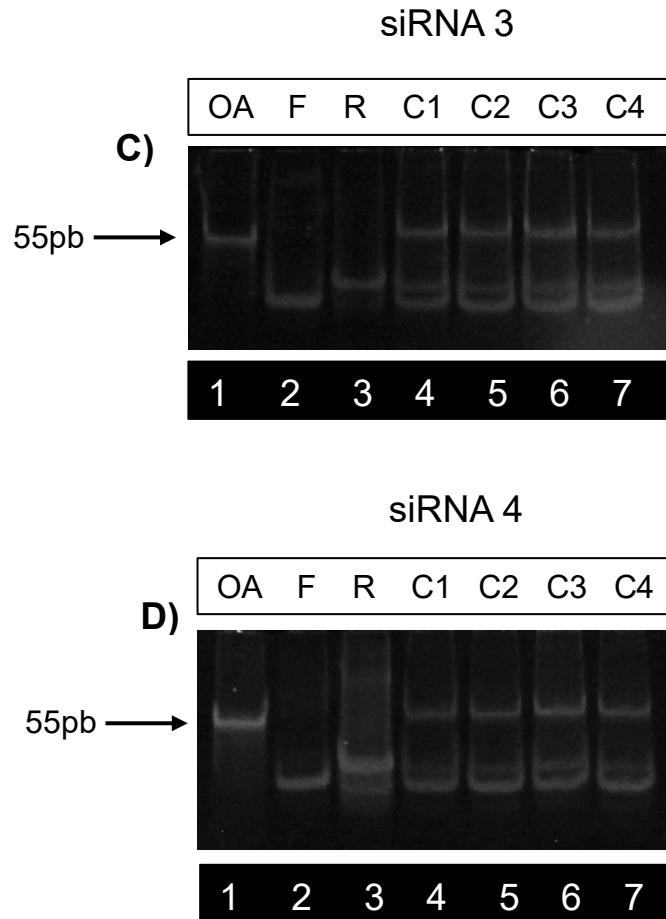
**Tabla 5.** Diseño de oligonucleótidos con las secuencias de los siRNAs candidato

Posición 3'UTR	Dirección	siRNA sentido	Secuencia generadora de horquilla	siRNA Anti-sentido	%GC	Valores termodinámicos
103	Forward	5'-CAGGCAATGTGGGACTTAATCAAGAGATTAAGTCCCACATTGCCTG TTTTTT-3'			47	-5.6 ( -11.5, -5.9)
	Reverse	5'-AATTAAAAA CAGGCAATGTGGGACTTAATCTCTTGAA TTAAGTCCCACATTGCCTG GGCC-3'				
1931	Forward	5'-GGTGCACTGAGTCAATCTATCAAGAGATAGATTGACTCAGTGCACC TTTTTT-3'			47	-4.7 ( -12.2, -7.5)
	Reverse	5'-AATTAAAAA GGTGCACTGAGTCAATCTATCTCTGAA TTAAGTCCCACATTGCCTG GGCC-3'				
1190	Forward	5'-GTTGCCAAGAGGAGGAAATTTCAAGAGAAATTCCTCCTCTTGGCAAC TTTTTT-3'			47	-4.5 ( -9.9, -5.4)
	Reverse	5'-AATTAAAAA GTTGCCAAGAGGAGGAAATCTCTTGAAATTCCTCCTCTTGGCAAC GGCC-3'				
2254	Forward	5'-GCCATATTCTGGTGTCAATTTCAAGAGAAATGACACCAGAATATGGC TTTTTT-3'			47	-3.8 ( -10.4, -6.6)
	Reverse	5'-AATTAAAAA GCCATATTCTGGTGTCAATCTCTTGAAATGACACCAGAATATGGC GGCC-3'				

## 10.2 Alineamiento de oligonucleótidos

Con la finalidad de generar los insertos de DNA de doble cadena que fueron clonados en el plásmido p*Silencer*<sup>™</sup> 1.0-U6 es necesario el apareamiento de bases de las 2 hebras (sentido y antisentido) por medio de distintas condiciones de tiempos y temperaturas para su incubación. En los siguientes geles de poliacrilamida al 10% de la figura A, B, C y D, las cuatro condiciones de incubación (carril 4, 5, 6 y 7) presentan la misma movilidad que el control (carril 1) que corresponde a un oligo alineado por parte del equipo de laboratorio que tiene un tamaño de 55 pares de bases (bp), concluyendo que el patrón de migración en geles de poliacrilamida al 10%, mostró que las 4 condiciones de incubación usadas, generan el alineamiento parcial de los oligonucleótidos (figura 2).

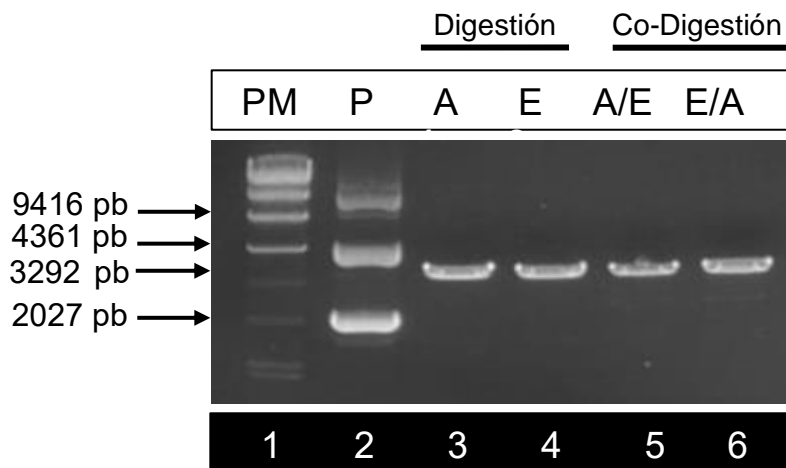




**Figura 2. Alineamiento de oligonucleótidos.** Los apareamientos de oligonucleótidos fueron corridos en un gel nativo de poliacrilamida al 10%. Los paneles A, B, C y D muestran el alineamiento parcial de los oligonucleótidos, que corresponde a la banda superior del carril 1, que es un control de migración que se obtuvo de un producto de alineamiento total de oligonucleótidos previamente probados por el grupo de trabajo que presenta un tamaño de 55 pb. Como A: Oligo alineado; F: oligo sentido; R: oligo anti-sentido; C1: condición 1, C2: condición 2, C3: condición 3 y C4: condición 4.

### 10.3 Linealización del vector

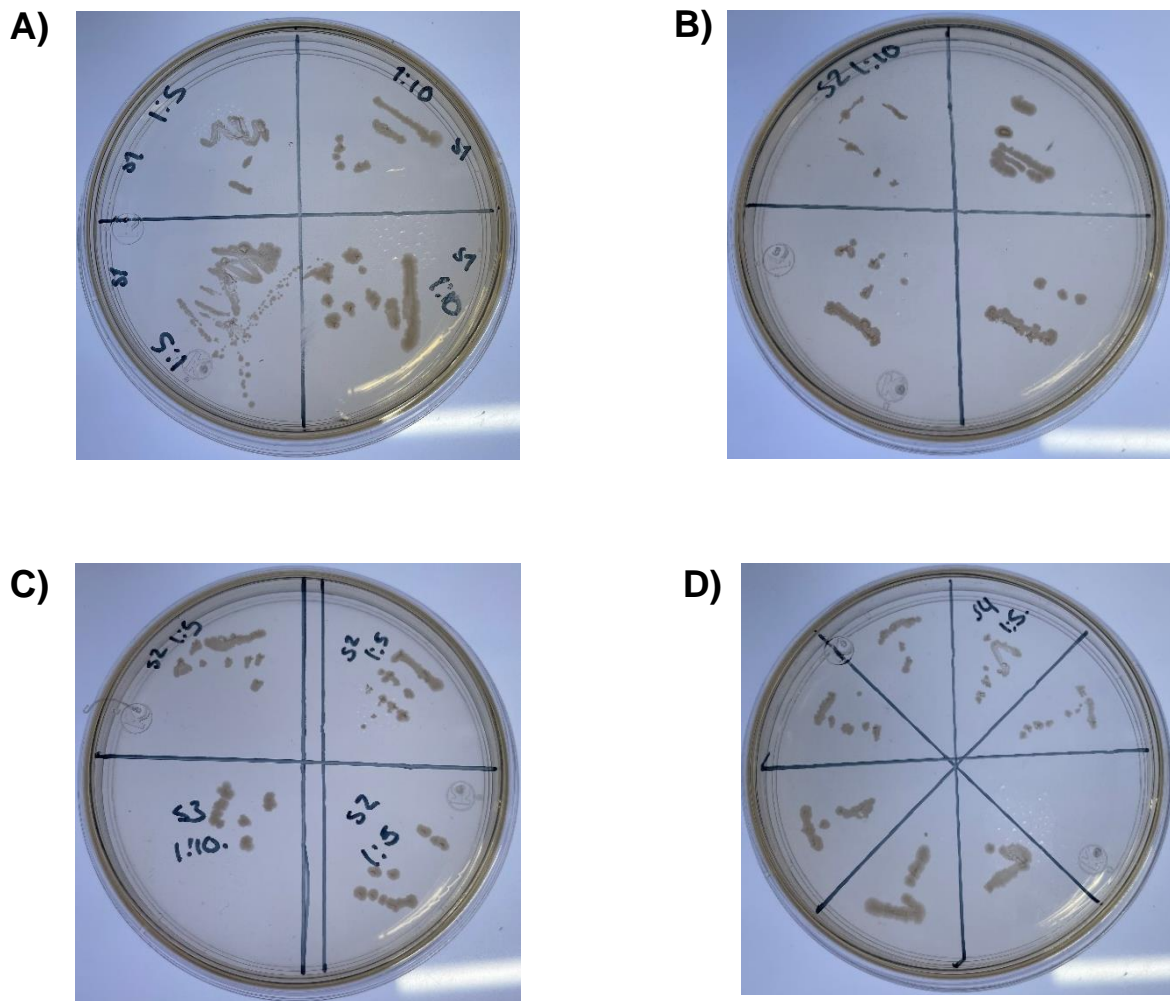
Para facilitar la inserción de los alineamientos de oligonucleótidos en el vector de expresión, el plásmido pSilencer™ 1.0-U6 es fundamental linealizarlo por medio de la digestión de las enzimas *ApaI* y *EcoRI*, recordando que estas dos enzimas se encuentran en los extremos de la secuencia de oligonucleótidos, reconociendo así su sitio de corte en el sitio múltiple de clonación y eliminando el fragmento deseado. En el siguiente gel de agarosa al 1% (figura 3), la digestión independiente con las enzimas *ApaI* y *EcoRI* ambas presentan la misma movilidad que además las bandas se encuentran ligeramente por debajo de la banda que corresponde al plásmido nativo con un tamaño de 3292 bp. Para las co-digestiones con *ApaI* y *EcoRI*, liberó un fragmento de 38 pb y redujo la longitud del plásmido a 3254 pb. Este resultado indica que la movilidad de las bandas para digestiones y co-digestiones se encuentra linealizado correspondiendo con la isoforma intermedia del DNA del plásmido nativo.



**Figura 3. Linealización del plásmido pSilencer 1.0 U6.** En el gel de agarosa al 1% se observa la movilidad de las linealizaciones con las enzimas *ApaI* y *EcoRI*, que corresponden con la banda del plásmido nativo. Para el carril 1: Marcado de peso molecular (PM); Carril 2: Conformaciones relajada (banda superior), intermedia (central) y superenrollada (inferior) del plásmido pSilencer 1.0 U6 (P) sin digerir; Carril 3: pSilencer digerido con *ApaI* (A); Carril 4: pSilencer digerido con *EcoRI* (E); Carril 5: pSilencer co-digerido con *ApaI* y *EcoRI* (A/E); Carril 6: pSilencer co-digerido con *EcoRI* y *ApaI* (E/A).

#### 10.4 Inserción de los alineamientos de DNA en el plásmido de expresión y transformación bacteriana

Posterior a la obtención de los extremos cohesivos en los insertos de DNA, y la linealización del plásmido, se realizó su ligación. Con las reacciones de ligación vector:inserto (V:I) 1:5 y 1:10, se obtuvieron colonias viables de bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  transformadas, como se observa en la figura 4.



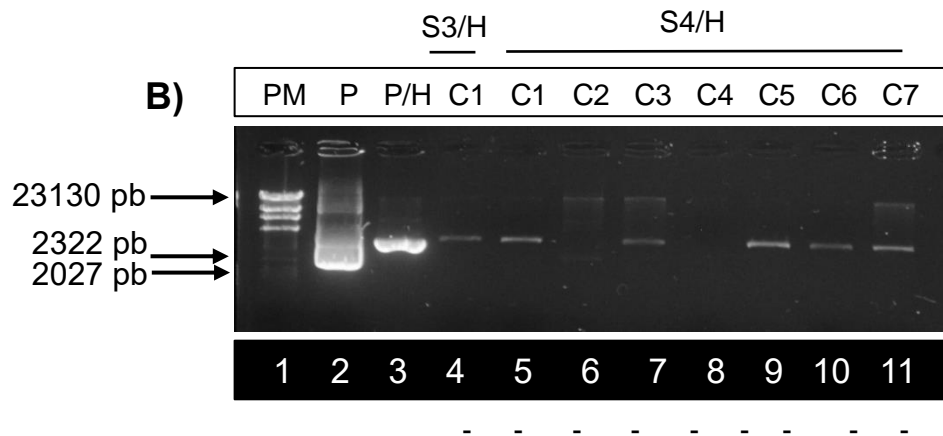
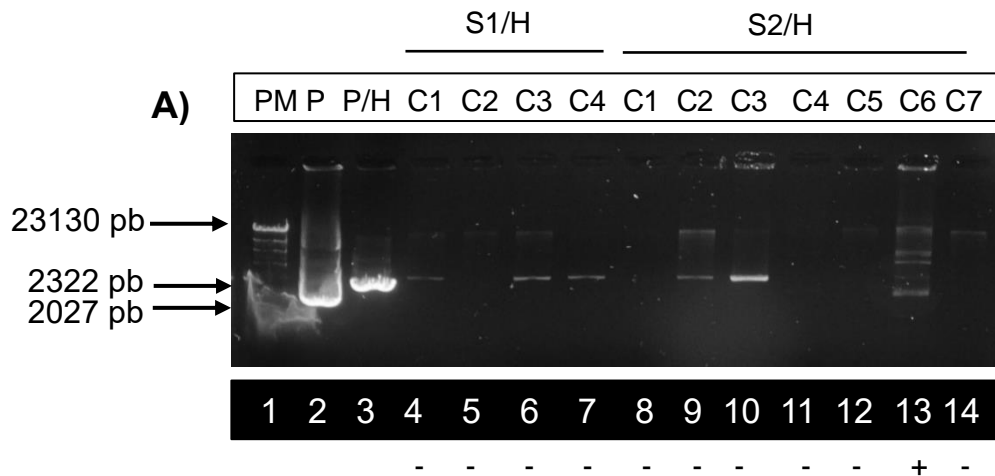
**Figura 4. Aislamiento de colonias resistentes a ampicilina.** Las colonias que crecieron en distintas relaciones (V:I) de cada siRNA se aislaron en placas de medio LB sólido con resistencia a ampicilina. Se obtuvo lo siguiente: S1 (siRNA 1 (1:5)): 2 colonias; S1 (1:10): 2 colonias; S2 (siRNA 2 (1:10)) :4 colonias; S2 (1:5):3 colonias; S3 (siRNA3 (1:10)): 1 colonia y S4 (siRNA 4(1:5)): 7 colonias.

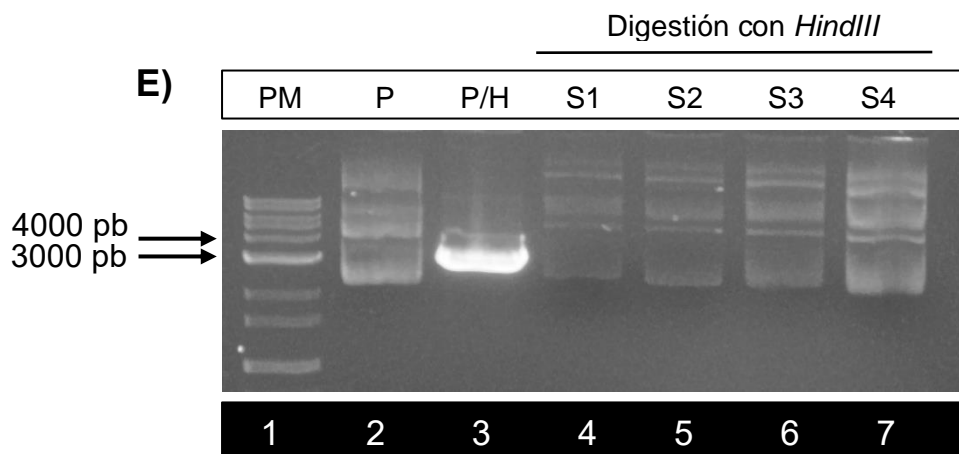
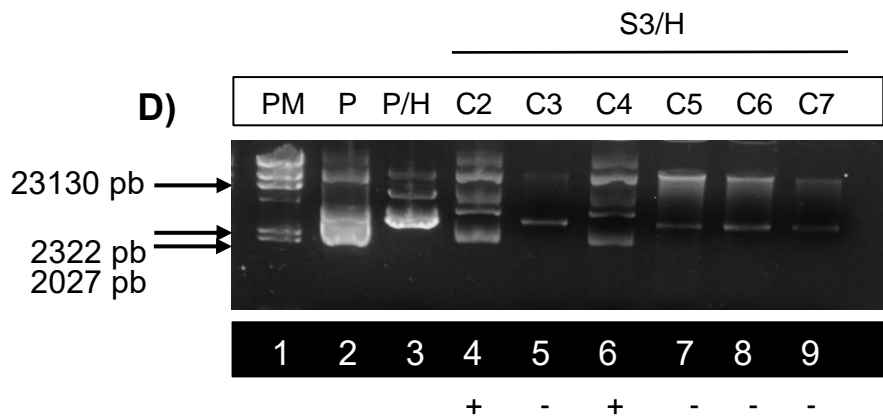
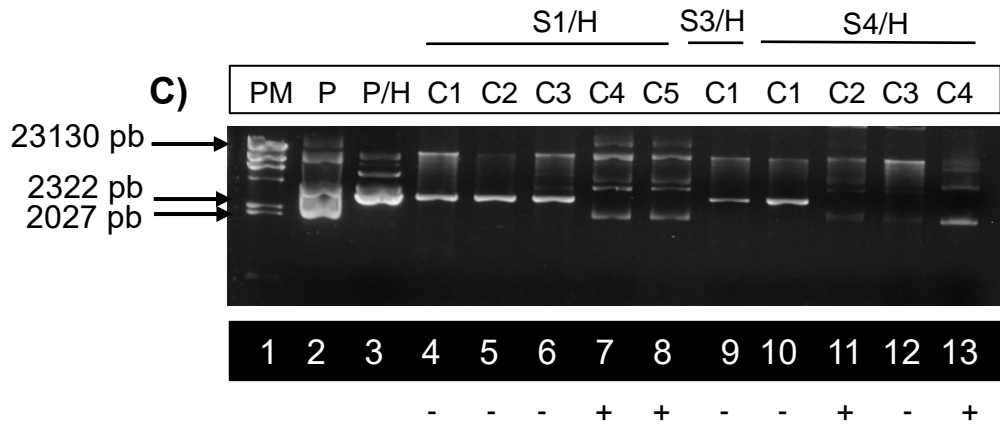


## **10.5 Verificación de insertos de clonas positivas**

Para corroborar que las bacterias captaran el plásmido con el inserto de DNA, las colonias aisladas fueron crecidas en 5 ml de LB con ampicilina y se realizó la extracción del DNA a pequeña escala. El DNA fue digerido con la enzima HindIII y se evaluó el patrón de digestión de cada clona bacteriana. De acuerdo al mapa del vector pSilencer™ 1.0-U6, en presencia del sitio de restricción para HindIII, el plásmido se linealizará; mientras que cuando una secuencia se inserte en el sitio múltiple de clonación del plásmido y sustituya el sitio de restricción para HindIII, se observarán las 3 conformaciones nativas del plásmido circular (relajada, intermedia y superenrollada), debido a que la enzima no hará el corte correspondiente. En el carril 13 de la figura 5A la caracterización enzimática mostró una probable clona positiva a la presencia del inserto con el siRNA 2. Los carriles 7 y 8 de la figura 5C, muestran probables clonas positivas que corresponden al siRNA1; los carriles 11 y 13 al siRNA4; y los carriles 4 y 6 al siRNA3 (figura 5D). La caracterización enzimática mostró probables clonas positivas a la presencia del inserto para el siRNA 1 (2 clonas), siRNA 2 (1 clona), siRNA 3 (2 clonas) y siRNA 4 (2 clonas). Adicionalmente, se realizó un panel de restricción enzimática final con HindIII de las construcciones plasmídicas con probable presencia de inserto de DNA como se muestra en la figura 5E (carriles 4, 5, 6 y 7). El patrón de migración del plásmido nativo y de las potenciales

construcciones moleculares, evidencian la correcta clonación de los alineamientos de DNA.





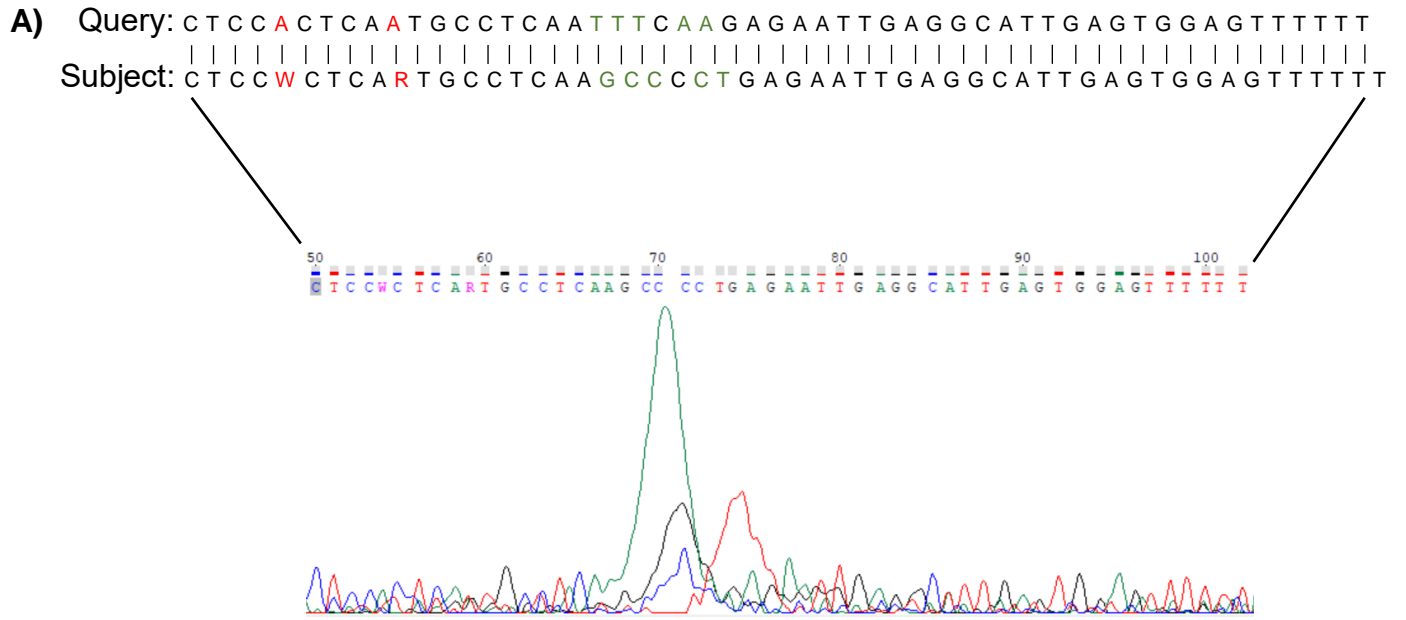
**Figura 5. Selección de colonias positivas.** La extracción de DNA por medio de lisis alcalina a pequeña escala, seguido de la restricción enzimática con *HindIII* y corridas por medio de electroforesis. Se obtuvieron las siguientes posibles clonas positivas para cada siRNA: siRNA 1: 2 colonias; siRNA 2: 1 colonia; siRNA 3: 2 colonias y siRNA 4: 1 colonia. Seguido de un ensayo de restricción enzimática con *HindIII* para verificar la clonación del inserto. PM: marcador de peso molecular (Marcador de DNA lambda/*HindIII*); P: plásmido nativo p*Silencer*<sup>TM</sup> 1.0-U6 y sus conformaciones: relajada (banda superior), intermedia (central) y superenrollada (inferior); P/H: p*Silencer* 1.0 U6 digerido con *HindIII*, linearizado; S1/H: siRNA 1 digerido con *HindIII*; S2/H: siRNA 2 digerido con *HindIII*; S3/H: siRNA 3 digerido con *HindIII*; S4/H: siRNA 4 digerido con *HindIII*; C#: colonias positivas; S1, 2, 3 y 4: construcciones moleculares digeridas con *HindIII*.

## **10.6 Secuenciación de las construcciones plasmídicas generadas**

Para verificar la presencia del inserto de DNA en el producto de clonación, las construcciones generadas fueron purificadas por un sistema de columnas con la finalidad de optimizar la calidad y pureza del DNA. Posteriormente, el DNA plasmídico fue preparado y enviado de acuerdo a las instrucciones del servicio de la Unidad de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, para su secuenciación. Posteriormente, los electroferogramas obtenidos de cada construcción plasmídica fueron comparados con el correspondiente diseño bioinformático de los oligonucleótidos. La secuenciación de DNA confirmó la presencia del inserto de DNA diseñado bioinformáticamente en los plásmidos pPDL1SIRNA3 y pPDL1SIRNA4, mientras que los resultados de secuenciación arrojaron secuencias ligeramente parciales en los plásmidos pPDL1SIRNA1, pPDL1SIRNA2.,. El electroferograma correspondiente al plásmido pPDL1SIRNA1 indicó la sustitución de 5 nucleótidos en la secuencia del oligonucleótido clonado (marcados en verde) y la presencia de algunos nucleótidos con la nomenclatura IUPAC (marcados de rojo) característicos en productos de secuenciación no legibles. De manera similar, el electroferograma del plásmido pPDL1SIRNA2 presentó nucleótidos que están representados por

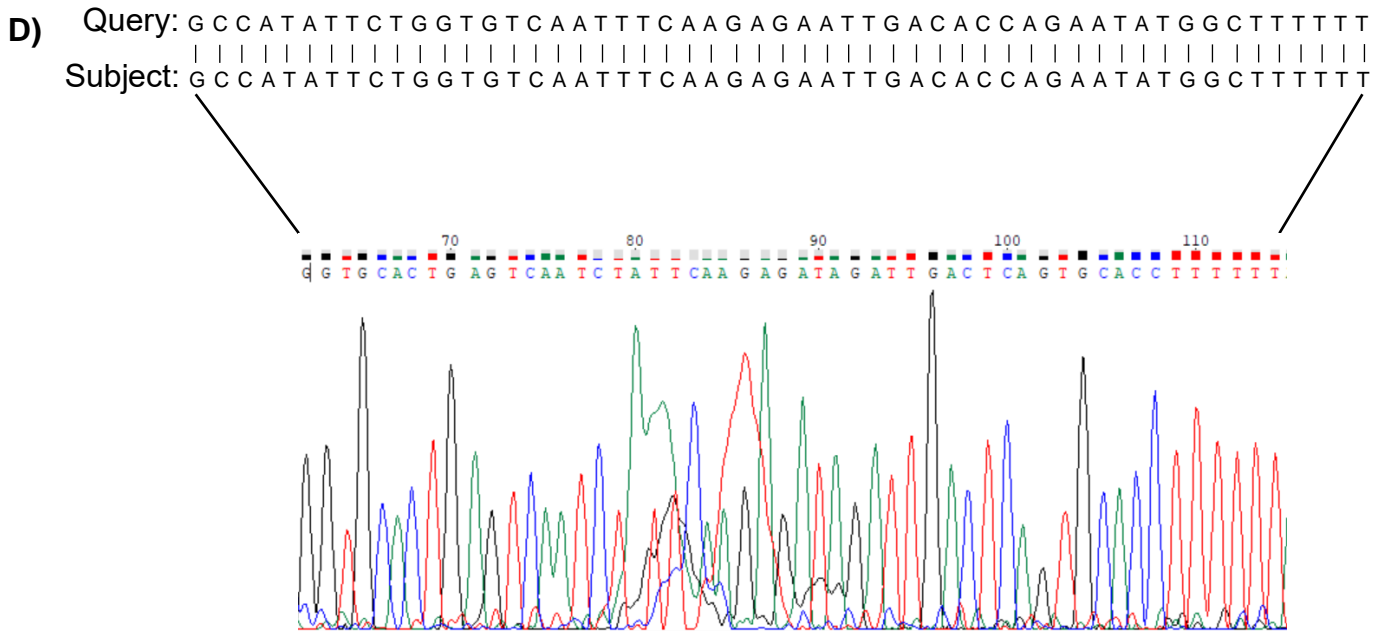
la nomenclatura IUPAC (figura 7), no obstante, los resultados sugieren que los cuatro plásmidos son funcionales.

### pPDL1SIRNA1





## pPDL1SIRNA4



**Figura 6. Resultados de secuenciación.** Los resultados obtenidos de cada uno de los electroferogramas para cada construcción molecular, sus curvas corresponden con las secuencias originales de cada siRNA.



## 11. Discusión

Diversos estudios epidemiológicos han evidenciado el papel de PD-L1 en el mantenimiento del fenotipo tumoral [21–23]. La interacción entre PD-1 y PD-L1 es considerada vital para mantener la homeostasis inmunitaria, debido a que es clave en la auto-tolerancia, previenen la autoinmunidad y mitiga los daños colaterales en los tejidos [24] [26]. Se ha evidenciado que PD-L1 se encuentra sobre-expresado en la superficie de las células tumorales, lo que ha motivado el desarrollo de estrategias basadas en terapia génica contra el cáncer y mitigar problemas adversos comunes en los tratamientos convencionales contra el cáncer. Entre estas estrategias, el uso de siRNAs es opción atractiva, dado que son moléculas, de RNA no codificantes con funciones importantes en la regulación de genes y que se han valorado en el tratamiento de una amplia gama de trastornos que incluyen diferentes tipos de cáncer e infecciones.

La diferencia principal es que antes del procesamiento de Dicer, el miRNA precursor es más largo de 70-100 nt, en cambio en los siRNAs es más corto, además de que el precursor es un RNA de doble cadena de 30-100 nt, entre otras es la manera en cómo silencian el mRNA, en los miRNAs se reprime la traducción mediante la degradación del mRNA, pero en los siRNAs regula la expresión génica mediante la escisión endonucleolítica. Además, el uso de siRNAs ha permitido el descubrimiento y desarrollo de fármacos, aprovechando sus ventajas como la alta especificidad y potencia en el apareamiento de bases al mRNA objetivo es por Watson-Crick que les confiere una ventaja ante el uso de anticuerpos dado que el principal problema de su uso se necesita reconocer la conformación espacial de ciertas proteínas e inclusive los costos de su elaboración son costosos debido a que su producción es un proceso relativamente laborioso e implica la fusión de ciertas células inmunes, como lo son los linfocitos B (células B) con células de mieloma para generar líneas celulares de hibridoma inmortalizadas. Por lo que las clonaciones de siRNAs en plásmidos podría ser una herramienta útil para la generación de siRNAs ante un gen blanco, en comparación de los siRNAs

comerciales, los elevados costos de adquisición son el principal impedimento para su uso en el laboratorio además de que los experimentos no sean de largo plazo, si no en menor medida y específicos. Pero las ventajas que presenta son que proporciona siRNAs de alta calidad y sintetizados químicamente de forma personalizada. También se han comparado la funcionalidad de silenciamiento con los miRNAs, pero existen ciertas diferencias como: el precursor del miRNA que es más largo de 70-100 nt, en cambio en los siRNAs es más corto, además de que el precursor es un RNA de doble cadena de 30-100 nt, entre otras es la manera en cómo silencian el mRNA, en los miRNAs se reprime la traducción mediante la degradación del mRNA pero en los siRNAs regula la expresión génica mediante la escisión endonucleolítica, además de, los miRNAs tienen varios mRNAs blancos pero en siRNAs es más específico para solo un mRNA.

Debido a los precios altos de los siRNAs comerciales, existen otras alternativas que son más económicas como lo es la clonación de siRNAs en plásmidos, que por medio del uso de software que presentan algoritmos estudiados, patrones, valores termodinámicos y contenido de GCs permite a los usuarios diseñar secuencias de oligonucleótidos específicas a un gen blanco bajo los criterios de cada autor. Para los valores termodinámicos, da apertura a la asimetría sesgada de la molécula de siRNA por RISC puede permitir la selectividad de la cadena, posiblemente a través de interacciones con el fosfato 5' recién liberado en la cadena antisentido.

Una vez que se forma RISC, debe tener una rotación múltiple del objetivo para tener un silenciamiento génico efectivo, un evento que requiere la disociación de la molécula objetivo después de la escisión en una posición opuesta al centro de la cadena guía (antisentido). La baja estabilidad observada de los siRNA funcionales, especialmente en la región de escisión (9–14 nt), puede facilitar la liberación del producto, lo que permite que RISC encuentre un segundo sustrato. Además, la diferencia entre la energía libre para los dinucleótidos terminales en los extremos 5' y 3' de la cadena antisentido de siRNA tiene la capacidad de discriminar entre las cadenas antisentido y sentido del dúplex, similar a los miRNAs. Las hebras antisentido de siRNA eficientes son ricas en U, especialmente en el extremo 5'. Los

dúplex de siRNA eficientes se caracterizan por una interacción menos estable en los extremos 5' y una interacción más estable en los extremos 3' de las hebras antisentido, lo contrario de los dúplex de siRNA ineficientes. Por lo que la maquinaria de silenciamiento de siRNA está modulada en gran medida por la estabilidad termodinámica del emparejamiento de bases de nucleótidos. El cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) entre la semilla de siRNA y el objetivo de mRNA es un marcador confiable de la estabilidad termodinámica de tales heterodúplex. La energía libre de la unión del heterodímero entre el siRNA y el mRNA objetivo es la consecuencia de dos contribuciones de energía. La primera es la energía utilizada para abrir el sitio de unión y la otra es la energía obtenida de la hibridación. El valor neto de  $\Delta G$  del dúplex mRNA-siRNA debe ser negativo para una mejor interacción. Cuanto mayor sea el valor negativo de  $\Delta G$ , más estable se formará el dúplex entre el siRNA y el mRNA diana.

También influye el contenido de GC siendo un parámetro importante en la eficiencia de los siRNA porque un bajo contenido de GC da lugar a una unión deficiente e inespecífica, mientras que un alto contenido de GC evita que la helicasa y el complejo RISC desenrollen el dúplex de siRNA.

De igual manera, para la selección del plásmido de expresión existe una gran variedad de plásmidos disponibles que se adecuan para cada perfil en su utilización, inclusive el uso de plásmidos minimiza los costos de su utilización dado que son fáciles de reproducir y mantener haciéndolos perfectos vehículos para la expresión de siRNAs[10].

El primer paso esencial para una terapia de siRNA exitosa es el diseño de una secuencia de siRNA que sea específica para el mRNA previsto para minimizar cualquier efecto fuera del objetivo, considerando esto, el diseño bioinformático de siRNAs propuesto y realizado que tiene como objetivo específico el gen humano PD-L1, expresados mediante un vector de expresión para su clonación, mediante el análisis bioinformático, en el software bioinformático siRNA Selection Server nos da la especificidad ante el gen deseado mediante su ID debido a que realiza una comparación mediante los datos otorgados por BLAST por medio de localización y

posición, es decir, que los resultados de BLAST que no tengan la longitud de nucleótidos deseados y que se unan a la hebra antisentido en las posiciones específicas serán descartadas. Respecto al vector de expresión, se utilizó pSilencer 1.0-U6 dado que es vector de expresión de RNAi que contiene elementos de secuencia para clonación y replicación bacteriana, es decir, origen f1, origen ColE1, gen de resistencia a ampicilina y sitio de clonación múltiple, además de un promotor de RNA polimerasa III (Pol III) U6 teniendo un sitio transcripción definido y además, de contar con una secuencia de terminación de Pol III finalizando la transcripción del inserto, en una cadena de 4 a 5 uridinas facilitando su ubicación para la secuenciación, este promotor se utiliza para generar transcritos de RNA pequeños, siendo perfecto para la expresión de siRNAs, además de que en su hoja técnica sugieren una secuencia de oligonucleótidos para el inserto de DNA que en sus extremos tienen las enzimas de restricción *ApaI* y *EcoRI* que a su vez también proporciona la verificación de la clonación del inserto por medio de la enzima *HindIII*.

Una vez que se hizo las construcciones moleculares pertinentes, la secuenciación es el paso final que da la certeza de constatar que las secuencias de oligonucleótidos están presentes. Donde hubo ciertos cambios dado que algunos nucleótidos fueron cambiados por la nomenclatura IUPAC o cambiados por otros nucleótidos, esto principalmente se debe a la maquinaria que los detecta ya sea porque la muestra no tiene un índice de purificación alto o porque la maquinaria de secuenciación pudiera tener problemas en su detección, En cambio, en la exploración de las curvas del electroferograma, se verifica que si corresponden los nucleótidos originales donde el traslape de curvas provoca dificultad en detectarlo.

## 12. Conclusiones

- a) Se diseñaron 4 secuencias siRNAs que bioinformáticamente cumplieron con los criterios estructurales y termodinámicos óptimos para silenciar de manera específica al gen humano PD-L1.
- b) Se clonaron los oligonucleótidos diseñados a partir de las 4 secuencias siRNAs seleccionadas, generando 4 construcciones plasmídicas: pPDL1SIRNA1, pPDL1SIRNA2, pPDL1SIRNA3 y pPDL1SIRNA4. Corregir la nomenclatura de los plásmidos.
- c) Se obtuvieron las construcciones plasmídicas que corresponden a pPDL1SIRNA1, pPDL1SIRNA2, pPDL1SIRNA3 y pPDL1SIRNA4, corroborando por medio de secuenciación la secuencia de oligonucleótidos del diseño original.

## 13. Perspectivas

- 1) Analizar la efectividad del silenciamiento de PD-L1 por siRNAs producidos por los plásmidos pPDL1SIRNA1, pPDL1SIRNA2, pPDL1SIRNA3 y pPDL1SIRNA4.
- 2) Transfectar las construcciones plasmídicas en un modelo celular humano, considerando controles, células sin tratamientos y células con tratamiento.
- 3) Realizar RT-qPCR con la finalidad de cuantificar el nivel de expresión del transcrito y por medio de Western Blot analizar a nivel de proteína la expresión de PD-L1.

## 14. Anexos

Anexo 1. mRNA del gen humano PD-L1 en la región 3'UTR.

Tabla 1. Secuencia FASTA de PD-L1 (ID: 29126), GENE: CD274

```
TCCAGCATTGGAACCTTCTGATCTTCAAGCAGGGATTCTCAACCTGTGGTTTA
GGGGTTCATCGGGGCTGAGCGTGACAAGAGGAAGGAATGGGCCCGTGGG
ATGCAGGCAATGTGGGACTTAAAAGGCCCAAGCACTGAAAATGGAACCTGG
CGAAAGCAGAGGAGGAGAATGAAGAAAGATGGAGTCAAACAGGGAGCCTG
GAGGGAGACCTTGATACTTTCAAATGCCTGAGGGGCTCATCGACGCCTGTG
ACAGGGAGAAAGGATACTTCTGAACAAGGAGCCTCCAAGCAAATCATCCAT
TGCTCATCCTAGGAAGACGGGTTGAGAATCCCTAATTTGAGGGTCAGTTCC
TGCAGAAGTGCCCTTTGCCTCCACTCAATGCCTCAATTTGTTTTCTGCATGA
CTGAGAGTCTCAGTGTGGAACGGGACAGTATTTATGTATGAGTTTTTCCTA
TTTTATTTGAGTCTGTGAGGTCTTCTTGTGATGTGAGTGTGGTTGTGAATGA
TTTTTTTTGAAGATATATTGTAGTAGATGTTACAATTTTGTGCGCCAAACTAAA
CTTGCTGCTTAATGATTTGCTCACATCTAGTAAAACATGGAGTATTTGTAAG
GTGCTTGGTCTCCTCTATAACTACAAGTATACATTGGAAGCATAAAGATCAA
ACCGTTGGTTGCATAGGATGTCACCTTTATTTAACCCATTAATACTCTGGTT
GACCTAATCTTATTCTCAGACCTCAAGTGTCTGTGCAGTATCTGTTCCATTTA
AATATCAGCTTTACAATTATGTGGTAGCCTACACACATAATCTCATTTCATCG
CTGTAACCACCCTGTTGTGATAACCACTATTATTTTACCCATCGTACAGCTG
AGGAAGCAAACAGATTAAGTAACTTGCCCAAACCAGTAAATAGCAGACCTC
AGACTGCCACCCACTGTCCTTTTATAATAAATTTACAGCTATATTTTACTTT
AAGCAATTCCTTTTATTCAAAACCATTTATTAAGTGCCCTTGCAATATCAATC
GCTGTGCCAGGCATTGAATCTACAGATGTGAGCAAGACAAAGTACCTGTCC
TCAAGGAGCTCATAGTATAATGAGGAGATTAACAAGAAAATGTATTATTACA
ATTTAGTCCAGTGTGATAGCATAAGGATGATGCGAGGGGAAAACCCGAGCA
GTGTTGCCAAGAGGAGGAAATAGGCCAATGTGGTCTGGGACGGTTGGATA
TACTTAAACATCTTAATAATCAGAGTAATTTTCATTTACAAAGAGAGGTCGGT
ACTTAAAATAACCCTGAAAATAACACTGGAATTCCTTTTCTAGCATTATATT
TATTCCTGATTTGCCTTTGCCATATAATCTAATGCTTGTTTATATAGTGTCTG
GTATTGTTTAAACAGTTCTGTCTTTTCTATTTAAATGCCACTAAATTTTAAATTC
ATACCTTTCCATGATTCAAAATTCAAAGATCCCATGGGAGATGGTTGGAAA
ATCTCCACTTCATCCTCCAAGCCATTCAAGTTTCCTTTCCAGAAGCAACTGC
TACTGCCTTTTATTTCATATGTTCTTCTAAAGATAGTCTACATTTGGAAATGTA
TGTTAAAAGCACGTATTTTTTAAATTTTTTCTAAATAGTAACACATTGTATG
TCTGCTGTGTACTTTGCTATTTTTATTTATTTAGTGTTCCTTATATAGCAGAT
GGAATGAATTTGAAGTTCCAGGGCTGAGGATCCATGCCTTCTTTGTTTCTA
AGTTATCTTTCCCATAGCTTTTTCATTATCTTTCATATGATCCAGTATATGTTAA
ATATGTCCTACATATACTTTAGACAACCACCTTTGTTAAGTATTTGCTCTA
GGACAGAGTTTGGATTTGTTTATGTTTGTCTCAAAGGAGACCCATGGGCTCT
```

CCAGGGTGCACTGAGTCAATCTAGTCCTAAAAAGCAATCTTATTATTA  
TACTCTGTCAAGTATA  
AACTTCACTTTGATGCTGTACTTGCAAATCACATTTTCTTTCTGGAAATTCC  
GGCAGTGTACCTTGACTGCTAGCTACCCTGTGCCAGAAAAGCCTCATTTCGT  
TGTGCTTGAACCCTTGAATGCCACCAGCTGTCATCACTACACAGCCCTCCT  
AAGAGGCTTCCCTGGAGGTTTCGAGATTCAGATGCCCTGGGAGATCCCAGA  
GTTTCCTTTCCCTCTTGGCCATATTCTGGTGTCAATGACAAGGAGTACCTTG  
GCTTTGCCACATGTCAAGGCTGAAGAAACAGTGTCTCCAACAGAGCTCCTT  
GTGTTATCTGTTTGTACATGTGCATTTGTACAGTAATTGGTGTGACAGTGTT  
CTTTGTGTGAATTACAGGCAAGAATTGTGGCTGAGCAAGGCACATAGTCTA  
CTCAGTCTATTCCTAAGTCCTAACTCCTCCTTGTGGTGTGGATTTGTAAGG  
CACTTTATCCCTTTTGTCTCATGTTTCATCGTAAATGGCATAGGCAGAGATG  
ATACCTAATTCTGCATTTGATTGTCACTTTTTGTACCTGCATTAATTTAATAAA  
ATATTCTTATTTATTTTGTACTTGGTACACCAGCATGTCCATTTTCTTGTTTT  
TTTGTGTTTAATAAAAATGTTTCAGTTTAACATCCCA

Anexo 2. Secuencias sentido y anti-sentido del diseño de oligonucleótidos de los 4 siRNAs.

Tabla 2. Síntesis de oligos				
#	Oligo	Nombre	Secuencia	# nt
1	Forward	PDL1SIN12 45F	5'-CTCCACTCAATGCCTCAATTTCAAGAGAATTGAGGCATTGAGTGGAGTTTTTT-3'	53
2	Reverse	PDL1SIN12 67R	5'-AATTAATAAACTCCACTCAATGCCTCAATTCTCTTGAATTGAGGCATTGAGTGGAGGGCC-3'	61
3	Forward	PDL1SIRN 2063F	5'- GTTGCCAAGAGGAGGAAATTTCAAGAGAATTCCTCCTCTTGGCAACTTTTTT-3'	53
4	Reverse	PDL1SIRN 2085R	5'-AATTAATAAAAGTTGCCAAGAGGAGGAAATTCTCTTGAATTTCTCCTCTTGGCAACGGCC-3'	61
5	Forward	PDL1SIRN 2804F	5'- GGTGCACTGAGTCAATCTATTCAAGAGATAGATTGACTCAGTGCACCTTTTTT-3'	53
6	Reverse	PDL1SIRN 2826R	5-'AATTAATAAAAGGTGCACTGAGTCAATCTATCTCTTGAATAGATTGACTCAGTGCACCGGCC-3'	61
7	Forward	PDL1SIN31 27F	5'- GCCATATTCTGGTGTCAATTTCAAGAGAATTGACACCAGAATATGGCTTTTTT-3'	53
8	Reverse	PDL1SIRN 3149R	5'-AATTAATAAAAGCCATATTCTGGTGTCAATTCTCTTGAATTGACACCAGAATATGGCGGCC-3'	61

Anexo 3. Como un producto del presente proyecto de investigación, se presentó el trabajo: "Silenciamiento de la expresión de PD-L1 por siRNAs en células de cáncer cervical" en el 19 congreso de Investigación en Salud Pública, efectuado el 16 de marzo del 2023, en Cuernavaca, Morelos, México.





Instituto Nacional  
de Salud Pública

El Instituto Nacional de Salud Pública  
otorga la presente

Constancia a:

**OSCAR PERALTA ZARAGOZA**

Por haber participado como PONENTE en la modalidad de CARTEL con el  
trabajo titulado:  
**Silenciamiento de la expresión de PD-L1 por siRNAs en células de cáncer  
cervical, el 16 de marzo de 2023.**

Autores:

SAMANTHA MARGOT MARTÍNEZ CORTES; GABRIELA ELIZABETH  
CAMPOS VIGURI; SEIDY YUDITH AGUILAR MARTÍNEZ; ARMANDO  
MÉNDEZ HERRERA; DÉBORAH TALINA POPOCA MORENO; CLAUDIA  
GÓMEZ CERÓN;

**Dr. Eduardo César Lázcano Ponce**

Director General del  
Instituto Nacional de Salud Pública

**Dra. Hortensia Reyes Morales**

Coordinadora Académica del 19 Congreso de  
Investigación en Salud Pública

## 15. Referencias

- [1] M. R. Monroe, "Plasmids 101: What is a plasmid?" <https://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid> (consultado el 21 de marzo de 2023).
- [2] K. Morgan, "Plasmids 101: The Promoter Region – Let's Go!" <https://blog.addgene.org/plasmids-101-the-promoter-region> (consultado el 21 de marzo de 2023).
- [3] W. Alshaer *et al.*, "siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches", *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 905, p. 174178, ago. 2021, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174178.
- [4] Y. Jiang, M. Chen, H. Nie, y Y. Yuan, "PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations", *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 15, núm. 5, pp. 1111–1122, 2019, doi: 10.1080/21645515.2019.1571892.
- [5] C. Ghosh, G. Luong, y Y. Sun, "A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway", *J. Cancer*, vol. 12, núm. 9, pp. 2735–2746, mar. 2021, doi: 10.7150/jca.57334.
- [6] A. C. Carroll y A. Wong, "Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox", *Can. J. Microbiol.*, vol. 64, núm. 5, pp. 293–304, may 2018, doi: 10.1139/cjm-2017-0609.
- [7] F. Ghaffarifar, "Plasmid DNA vaccines: where are we now?", *Drugs Today*, vol. 54, núm. 5, p. 315, 2018, doi: 10.1358/dot.2018.54.5.2807864.
- [8] W. Alshaer *et al.*, "siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches", *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 905, p. 174178, ago. 2021, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174178.
- [9] A. Qureshi, V. G. Tantray, A. R. Kirmani, y A. G. Ahangar, "A review on current status of antiviral siRNA", *Rev. Med. Virol.*, vol. 28, núm. 4, p. e1976, 2018, doi: 10.1002/rmv.1976.
- [10] P. Wang, Y. Zhou, y A. M. Richards, "Effective tools for RNA-derived therapeutics: siRNA interference or miRNA mimicry", *Theranostics*, vol. 11, núm. 18, pp. 8771–8796, ago. 2021, doi: 10.7150/thno.62642.
- [11] T. Ahmadzada, G. Reid, y D. R. McKenzie, "Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer", *Biophys. Rev.*, vol. 10, núm. 1, pp. 69–86, ene. 2018, doi: 10.1007/s12551-017-0392-1.
- [12] B. Hu *et al.*, "Therapeutic siRNA: state of the art", *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 5, núm. 1, Art. núm. 1, jun. 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0207-x.
- [13] Y. Dong, D. J. Siegwart, y D. G. Anderson, "Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 144, pp. 133–147, abr. 2019, doi: 10.1016/j.addr.2019.05.004.

- [14] “siRNA Design It’s All in the Algorithm - MX”. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/ambion-tech-support/rnai-sirna/tech-notes/sirna-design-it-s-all-in-the-algorithm.html> (consultado el 21 de marzo de 2023).
- [16] K. Gavrilov y W. M. Saltzman, “Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies”, *Yale J. Biol. Med.*, vol. 85, núm. 2, pp. 187–200, jun. 2012.
- [17] W. Alshaer *et al.*, “siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches”, *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 905, p. 174178, ago. 2021, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174178.
- [18] Y. Dong, D. J. Siegwart, y D. G. Anderson, “Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 144, pp. 133–147, abr. 2019, doi: 10.1016/j.addr.2019.05.004.
- [19] P. Wang, Y. Zhou, y A. M. Richards, “Effective tools for RNA-derived therapeutics: siRNA interference or miRNA mimicry”, *Theranostics*, vol. 11, núm. 18, pp. 8771–8796, 2021, doi: 10.7150/thno.62642.
- [20] Y. Jiang, M. Chen, H. Nie, y Y. Yuan, “PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations”, *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 15, núm. 5, pp. 1111–1122, 2019, doi: 10.1080/21645515.2019.1571892.
- [21] F. K. Dermani, P. Samadi, G. Rahmani, A. K. Kohlan, y R. Najafi, “PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy”, *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, núm. 2, pp. 1313–1325, 2019, doi: 10.1002/jcp.27172.
- [22] Y. Han, D. Liu, y L. Li, “PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer”, *Am. J. Cancer Res.*, vol. 10, núm. 3, pp. 727–742, mar. 2020.
- [23] A. Akinleye y Z. Rasool, “Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics”, *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, vol. 12, núm. 1, p. 92, sep. 2019, doi: 10.1186/s13045-019-0779-5.
- [24] F. Tang y P. Zheng, “Tumor cells versus host immune cells: whose PD-L1 contributes to PD-1/PD-L1 blockade mediated cancer immunotherapy?”, *Cell Biosci.*, vol. 8, p. 34, may 2018, doi: 10.1186/s13578-018-0232-4.
- [25] H. Tang *et al.*, “PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression”, *J. Clin. Invest.*, vol. 128, núm. 2, pp. 580–588, feb. 2018, doi: 10.1172/JCI96061.
- [26] K. Hudson, N. Cross, N. Jordan-Mahy, y R. Leyland, “The Extrinsic and Intrinsic Roles of PD-L1 and Its Receptor PD-1: Implications for Immunotherapy Treatment”, *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 568931, oct. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.568931.
- [27] “WI siRNA Selection Program”. <http://sirna.wi.mit.edu/> (consultado el 15 de agosto de 2022).





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CONTROL ESCOLAR DE LICENCIATURA



VOTOS DE APROBATORIOS

**SECRETARIA EJECUTIVA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**P R E S E N T E**

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el **C. MARTINEZ CORTES SAMATHA MARGOT** con número de matrícula **10018631** cuyo título es:

**Diseño y construcción de plásmidos que generen siRNAs para el silenciamiento de PD-L1**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 15 de marzo de 2024

Atentamente  
***Por una humanidad culta***

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE**  
**MTRA. ANGÉLICA ORTEGA GARCÍA**  
**DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA**  
**DRA. SONIA DÁVILA RAMOS**  
**DRA. GABRIELA ELIZABETH CAMPOS VIGURI**

**(PRESIDENTE)**  
**(SECRETARIO)**  
**(VOCAL)**  
**(SUPLENTE)**  
**(SUPLENTE)**



MIE/VRRC/eae

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo certificados.titulacionesiicba@uaem.edu.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**OSCAR PERALTA ZARAGOZA** | Fecha:2024-03-15 11:00:33 | Firmante

fN/vXAPZBZ4i8xzHrdqWs973oPgmjhw3YD1NXp5eQuC2P7GvrkpYnxSbyDxxf94i2YVcy22EgpJKyQISPUYAGTLpa1F6w7JKFXIW+PD2CmXylobxH4GEMBi7o4MIT8qnHDWWDeoWvlzCzZoSox+3sp0uSEVMrHUSsdN1GbiJ2Rpyrdj/sYwaLUPOe+0O3/N7S5T1QHoOERydGQ4Sqli3GS5GFDBjZLkw/AXk1qGvyK4xqcKpJmW2Q3+NBDHy4fT0+cGXJStwIDxAsTal6TssZxutO3VlrawrR7jZb+ShJbxX5AjlVq9YMfb0vAFb53/Yo/CnZhNm86Pi3vbXRdEA==

**ANGELICA ORTEGA GARCIA** | Fecha:2024-03-15 11:39:14 | Firmante

KgPGr/XkR6YssGXuGI6/lwbUbJPUL4soJweDi0NK7LU7vyD0wPZiKrGV2oFqW77+wfRyac1N5RZeRliiBiCknf7ujzBjTukTC5fHVKTqe6xa0HsdVrNRpFlryq2l08ylDvkPozQpxfJxY3Fp1Fo4YDctpCD2XT40QH7j67+FbkZ9NRI2WMccjaB2OaqA+XFMMOidiAEGly4X9Cki2VLXcbdiOIPMx8mG68T2ZqChjZxZU4XRvBrCEM8TQRBFwrCc39nTKPdxNav5RcPrwWf bvOVQjLSCGP+nPs1k0Sj5UqQ220a/5xJITGI5inXQw/oxOP46y0dVrL8n/nlmKzoboGQ==

**GABRIELA ELIZABETH CAMPOS VIGURI** | Fecha:2024-03-15 11:40:48 | Firmante

r0o1WSSohIWyRhAXR8qdmrRAVdf5JWtGdd1w6BMUGdu8QtAT7nXGvrpYu/xZkEBRDH2sFireT69BbhL/v3A1rbC4FJ7kkfSE4tFXaLgTmrw10EqdakSrW6A5h0SXIAJ2VKVs9ewDsXwalFHQJZ9aPPLRiNDhES1YzYBsvdUYAYVXOhgmiW+44GLNgk47zkUh5z9JXj08dYnhaXpLqXxy5FbQ6vTAJLOxn2LczK37XyBynQbjmK1eAx0H/Clo0M2K2OIRNE33H5jMDDrG30Asu0gAp3mZzs6kp/QOLNR8KlunSB0mf77RVAP6hC1IjnXzljZd6Wobu1U3stTg6ag==

**RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE** | Fecha:2024-03-19 09:58:09 | Firmante

I+LX9zONfVJ09NDuh5i9i0AtdmFmsL0cERnXssQs9o/vbQC8WN0mELtXb/HDiP29+0OjYmGyvUuakC/YQ2QtJu+/iIVX/MwPRSqluV8g154cajBYWF6hpa/Z/x9f1nrD7Od6/IFMtS qyX0uEfw3eGQ7U9T28tF0oolrsGgUvFbTZDF8y2mPSnUQLKfx+Dmzh1j4Jtd8X1X88YwzD0roYcKZ/UUwDhNdvCv6KdxKx08x0W0yXSM+LZQOxDeiRErcO6XBQMiolbx7qsp XsPpB55ZYHJl6Sd47rhS+hWStXOgLSjHQZkIGU42dike7XrXgqAX3/tXdIh8JqRITPtA==

**SONIA DAVILA RAMOS** | Fecha:2024-03-19 11:47:00 | Firmante

P3FLR6rs2mut+0a/5j3yx9TdfLoEkb/g20xrBs1+BFodta+h9Z7ktyP+935GnaqGQcu8ttGG0+/tFW9ufiJg2kadmEaf+/PJOKCZaztPLUUAyLphiTaoK8Y795fkzVWwic7ZwU3079sxLrMMM70MzPUW07LvQi+gTPOTUgCPHh2beWZZQLGVI+01rn91dlmjAlNuplfp1qLuM9CV42h5oHssX3ZlONRzmaj14NKHZcy7pTsBUhHZcbhVxt+Qhyzk+xG8zRjWjv/JVGNk8 Wmrl4eYnRAUyEBK7ujNkUolqzdHY66q/L2prYhFtZPiSMx0cNSqgzrTdqD5Rxe/1IwYQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



5zahY41Xw

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Rz0Mxqpb9hRCI4L7bCsarV3vWafsoXLQ>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029