



miR-592

7261 caaaac-

aaagtaatat-

gtgtcagtgtgtt-

ttatatgtt-

gtgtagt

548a-5p

67

7321 tatatg

Detección de secuencias de semillas de microRNAs celulares dentro del genoma de los virus del papiloma humano

David Pineda-Gómez,^a
Efraín Garrido,^b
Pedro Chávez,^b
Mauricio Salcedo^a

Detection of microRNAs seed sequences within human papillomavirus genomes

In this paper we are reporting for the first time the presence of seed sequences of human and viral microRNAs embedded within both high and low risk human papillomavirus (HPV) genomes. These seed sequences have high oncogenic potential. They were found using an *in silico* analysis based on the microRNA sequences added to Sanger's database. Among these sequences, it was observed a potential fingerprint harbouring several repeated sequences of microRNA 297 (miR-297) within the LCR region of HPV types 16, 18, 33, 45 and 52. Further analyses were performed for low risk HPV types 6 and 11 and we observed that the probable fingerprint was absent in HPV11, even when we detected other repeated sequences of miR-363. According to these findings, besides the fact that we detected the presence of microRNA sequences within HPV genomes, we suggest a common putative viral mechanism of gene expression regulation shared among human virus.

En el presente trabajo reportamos por primera vez la existencia de secuencias semilla de diferentes microRNAs (codificados en humano y de otros virus) en el genoma de los virus de papiloma humano (VPH). Estas secuencias tienen un alto poder oncogénico y se encontraron mediante un análisis *in silico* basado en las secuencias de microRNAs depositadas en la base de datos de Sanger. Entre ellas se detectó una posible huella que consiste en la presencia de varias repeticiones de la semilla del microRNA 297 (miR-297) en la región LCR y que fue detectada en los tipos virales 16, 18, 33, 45 y 52. Además, se realizó la búsqueda de semillas en los tipos virales de bajo poder oncogénico 6 y 11 y se observó que esta posible huella está ausente en el tipo 11, si bien se localizaron repeticiones de la semilla de otro microRNA, miR-363. Con base en este hallazgo, además de que se detectaron semillas de otros virus en las diferentes regiones de los seis tipos virales, se abre la posibilidad de la existencia de un mecanismo de regulación de la expresión de genes celulares a través de la transcripción de las diferentes regiones del genoma de los VPH de alto poder oncogénico que contienen las diferentes semillas de microRNAs.

Keywords

MicroRNAs
HPV

Palabras clave

MicroARN
VPH

^aUnidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social

^bDepartamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional

Comunicación con: Mauricio Salcedo
Teléfono: (55) 5627 6900, extensión 22706
Correo electrónico: maosal89@yahoo.com

Distrito Federal, México

Recibido: 22/10/2014

Aceptado: 15/05/2015

Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA de una longitud de 22 a 24 nucleótidos de longitud que juegan un importante papel en la regulación de la expresión génica a nivel de traducción.¹ Ejercen esta función gracias a su capacidad de integrarse a los complejos silenciadores de la traducción, los cuales son dependientes de RNA de interferencia (RISC). Estos inhiben la traducción al unirse a moléculas específicas de RNA mensajero (RNAm), silenciándolas o bien dirigiéndolas a degradación. Se han detectado casi 10 000 secuencias de microRNAs en una amplia variedad de especies, pero solo en una fracción de estas se han logrado identificar y caracterizar sus blancos fisiológicos; sin embargo, se ha demostrado que algunos microRNAs detectados en humano tienen blancos, ya sea relacionados con la regulación de ciclo celular, con la expresión de factores de crecimiento o con el desarrollo del individuo.²

Los microRNAs también se han relacionado con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer en el ser humano.¹ Su expresión se ha reportado en diferentes virus que infectan al humano y que desarrollan alguna patología.³ Aunque aparentemente este tipo de moléculas están ausentes en el genoma de los virus de papiloma humano (VPH), el cual es el principal agente etiológico del cáncer cervicouterino, en el presente trabajo reportamos la existencia de secuencias semilla de microRNAs en el genoma de diferentes tipos de VPH, las cuales han sido reportadas previamente en el genoma de otras familias de virus y en el humano.

Métodos

Se descargó de la página del Instituto Sanger la base de datos con las secuencias de microRNAs correspondiente a la versión 10.0 (<http://www.micorna.sanger.ac.uk/>).⁴⁻⁶ Se clasificaron las secuencias de microRNAs en familias, de acuerdo con la similitud en sus secuencias y se procedió a seleccionar las secuencias semilla de cada uno de ellos (tomando los nucleótidos 2-8 en el extremo 5') y a eliminar la redundancia de ellas, con lo cual se obtuvieron solamente 1253 semillas, cada una de ellas representativa de una familia (de estas semillas, 280 correspondieron a *H. sapiens*). A esta base de datos se le denominó Fam_miRNAs. A continuación, se descargaron de la página electrónica del National Center of Biotechnology Information (NCBI) las secuencias consenso de los genomas de VPH tipo 16 y 18 (NC_001526.1 y X01505, respectivamente) y de diferentes secuencias reportadas de los genomas completos de VPH6 (AF092932), -11 (EU918768, cepa LZod45-11), -33 (EU918766, cepa LZcc12-33), -45 (EF202164, cepa Qv25000) y -52 (X74481), todas en formato Fasta.

Se procedió a crear una hoja de cálculo en el programa Excel (parte de la suite Office de Microsoft, versión 2003) que permitiera detectar las diferentes semillas a partir de la base de datos Fam_miRNAs en el genoma de los VPH; se usó la función Encontrar, la cual requiere que en la misma hoja de cálculo se introduzca la secuencia del genoma viral de interés y las semillas contenidas en la base de datos Fam_miRNAs. La función generó un reporte, en el que se registraron aquellas semillas que se localizaban y la región viral en la cual se ubicaron. Con base en esta información, se generó una nueva base de datos, denominada miRNAs_VPH X, en la que la X representaba el tipo viral en el que se llevó a cabo la detección. Después de seleccionar las diferentes semillas de microRNAs de *H. sapiens*, se procedió a ubicarlas dentro de un mapa genético de los tipos virales; para ello se utilizó la secuencia génica de los virus cargada en el programa Word (suite Office de Microsoft, versión 2003) y el comando Buscar (que se ubica dentro de la opción Edición de la barra de herramientas), en el cual se introducía la secuencia de la semilla que se iba a localizar y el programa realizaba su detección en las diferentes regiones virales. Se procedió a marcar con diferentes colores las semillas, dependiendo de su origen (virales, diferentes a VPH y *H. sapiens*) y se anotó el número de copias de cada una de ellas, además de asentar cuáles semillas se superponían y cuáles se encontraban contiguas unas con otras.

Resultados

Con el objeto de trabajar con las secuencias genómicas representativas de cada uno de los tipos de VPH, se realizó la búsqueda de las secuencias en la base de datos Entrez de NCBI y esta únicamente arrojó las correspondientes a los tipos 16 y 18. De las otras secuencias de genomas virales buscadas, solamente se detectaron reportes de diferentes cepas, de las cuales se seleccionaron aquellas que contuvieran las secuencias genómicas completas.

Al aplicar la función Encontrar del programa Excel, se detectaron cantidades variables de semillas de microRNAs tanto de *H. sapiens* como de diferentes virus en los diferentes tipos virales de VPH analizados (cuadro I). El listado de las secuencias semilla correspondientes a los microRNAs de origen viral se encuentra en el anexo 1, mientras que en los anexos 2 y 3 se detallan las secuencias semilla de los microRNAs pertenecientes a *H. sapiens* detectadas en los tipos de VPH.

También se detectaron repeticiones de algunas de las semillas en diferentes regiones de los genomas, de

las cuales la más notable fue la registrada en la LCR de la semilla del miR-297 en los tipos 16, 18, 33, 45 y 52. En el anexo 4 se muestran las regiones LCR de los diferentes tipos de VPH incluidos en este estudio, en las cuales se indica la posición de dichas repeticiones.

Discusión

Desde principios del siglo XXI en que los microRNAs fueron descubiertos en *C. elegans* se ha reportado un número cada vez mayor de secuencias de microRNAs en diferentes organismos y se ha demostrado que forman parte de un mecanismo de regulación de la expresión génica, el cual apenas ha comenzado a estudiarse.^{7,8} Varias secuencias de microRNAs se han detectado en una variedad de virus patógenos, como en el caso de la familia *Herpesviridae* y en algunos miembros de las familias de los poliomavirus y adenovirus.³ Más recientemente se ha reportado la presencia de microRNAs en el genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁹ Estos datos sugerirían que los virus también poseen este tipo de elementos de regulación génica.

Aunque se han realizado varios intentos por detectar secuencias compatibles con microRNAs en el genoma de los VPH, las diferentes estrategias han fallado y se ha reportado solamente el hallazgo de microRNAs celulares, como en el caso del VPH31¹⁰ y los intentos de detección en líneas celulares VPH+.¹¹ Después de estos reportes identificamos secuencias compatibles de microRNAs celulares dentro de los genomas de VPH. Desafortunadamente en su momento los datos no fueron aceptados para su publicación (V Villegas, M Salcedo, comunicación personal, 2011). Sin embargo, recientemente ha sido reportada la presencia de microRNAs en los VPH de los tipos 16 (seis candidatos en dos de ellos localizados en la LCR), 38, 45 y 68 (un candidato en cada uno de ellos).¹² Con este reporte mostramos y sugerimos que los VPH contienen secuencias de semillas de microRNAs compartidas por secuencias de microRNAs humanos y de otros virus.

En el presente trabajo se presenta un análisis *in silico* que se implementó como una estrategia de detección de posibles microRNAs conservados entre las diferentes especies registradas en la base de datos del Instituto Sanger y distintos genomas del VPH; para esto, se utilizaron herramientas contenidas en dos programas de la *suite* Office de Windows. La metodología mostrada se propone como una alternativa al uso de otros programas que requieren conocimientos básicos de programación y de realización de *scripts*, como en el caso de Perl. Esta estrategia ha sido utilizada exitosamente para la detección de las semillas de aproximadamente 100 microRNAs

distintos que están codificados en *H. sapiens* y otros virus. No fue posible detectar secuencias completas de microRNAs maduros o de sus precursores (pre-miRNAs) en cualquiera de los genomas analizados al comparar las secuencias reportadas en la base de datos miRBase. Dada la longitud de los genomas de los VPH, pensamos que existe la posibilidad de que estos virus hayan desarrollado la estrategia de mantener en su genoma solamente las semillas de los microRNAs que pueden reportarles algún beneficio para su supervivencia, regulando negativamente genes que codifican para proteínas supresoras de tumores o de reconocimiento del sistema inmunológico, o bien, permitiendo de manera indirecta la síntesis de proteínas oncogénicas por mecanismos como los reportados por Esquela-Kerschner *et al.*¹ Por otra parte, se ha demostrado la existencia de un corte de intrones y un empalme de exones alternativo para la generación de una variedad de RNAs regulatorios en el VPH16, como ha sido demostrado anteriormente,¹³ por lo cual sugerimos que, como parte de este mecanismo, podrían transcribirse ciertas regiones donde se localizan las diferentes semillas de microRNAs, lo cual generaría una molécula de RNA no codificante que le permitiría ejercer, así, una posible función regulatoria.

De ser cierto lo anterior, es probable que estas secuencias las hayan adquirido como consecuencia de la evolución conjunta del VPH y *H. sapiens*, como fue propuesto por varios autores para el VPH16 y 18,¹⁴⁻¹⁷ y que pueden haberse conservado en el genoma viral como una estrategia de supervivencia que incluye evasión del sistema inmune y regulación del ciclo celular. Resulta intrigante, además, la presencia de semillas derivadas de microRNAs de otros virus que tienen como hospedero al humano, como es el caso del virus del sarcoma de Kaposi, el virus de Epstein-Barr o el citomegalovirus; podría especularse que todos estos virus comparten el mismo esquema de infección y una posible regulación de las funciones celulares. La baja o nula capacidad oncogénica de los VPH6 o 11 podría explicarse, al menos en parte, por este evento, ya que no pudo demostrarse una relación entre la evolución del virus y la aparición de las diferentes razas del hombre.¹⁸ Por otra parte, no se ha demostrado aún la existencia de una posible recombinación entre los diferentes tipos de VPH,¹⁷ por lo cual pensamos que la presencia de las semillas de microRNAs de humanos en el genoma viral es un evento causado por su coevolución.

En cuanto a los resultados del análisis bioinformático, existen claras diferencias en la cantidad de semillas presentes en los tipos de VPH de bajo y alto riesgo. Los primeros muestran pocas semillas de microRNAs de otros virus, si bien el tipo 11 muestra un número

elevado de copias de estas. Los tipos de alto riesgo muestran un número mayor de semillas de este tipo y un menor número de copias, lo cual puede significar que se requiere de un mayor número de estas semillas para que el VPH induzca una lesión en su hospedero y, posiblemente, el desarrollo de algún tipo de cáncer en el cérvix. La baja cantidad de semillas de otros virus en los tipos de VPH de bajo riesgo, en consecuencia, podría explicar, al menos en parte, que estos VPH solo sean capaces de inducir lesiones intraepiteliales de bajo grado.

Existen semillas que se sobreponen entre sí en los diferentes tipos virales (como es el caso de la correspondiente al miR-297), las cuales están presentes en la región LCR de los VPH16, 18, 33, 45 y 52. Este evento puede tener los siguientes significados: 1) que dicha superposición lleve a la inactivación de las semillas, de manera que, al transcribirse la región genómica donde se localizan, se generaría un RNA mensajero que codifica para la proteína viral y que no codifica para RNAs pequeños regulatorios; o bien, 2) que la superposición de semillas genere un posible microRNA exclusivo del virus, el cual puede interactuar con varios RNA mensajeros que sean objetivo a la vez. Este último evento ha sido demostrado en algunos casos cuando un pre-miRNA es policistrónico, es decir, que codifica para dos o más microRNAs en un solo transcrito,³ o bien que están agrupados en tándem, como es el caso de un conjunto de microRNAs detectados en el cromosoma 19 en el humano.¹⁹ Inclusive, la longitud de este hipotético microRNA de VPH podría poseer sitios de unión adicionales al RNAm objetivo, los cuales podrían favorecer la estabilización de la interacción microRNA-RNAm y la subsecuente regulación. Quedaría por demostrar, mediante técnicas moleculares, la existencia de este tipo de moléculas y si alguna de estas dos hipótesis puede tener algún significado para la actividad viral.

En lo que respecta a las semillas de microRNAs presentes en *H. sapiens*, también se observan diferencias entre los tipos de VPH de alto riesgo. Las mayores similitudes entre estas permiten agrupar a los tipos 18 y 45, mientras que los tipos 16, 33 y 52 formarían otro grupo, lo cual está en concordancia con los árboles filogenéticos desarrollados a partir de la proteína L1.²⁰ Esto puede deberse a que las semillas compartidas se encuentran en secuencias o dominios altamente conservados entre los diferentes tipos virales y posiblemente reflejan un mismo potencial de inducción de lesiones en los VPH pertenecientes a los dos grupos.

La presencia de las repeticiones de las semillas de *miR-297* en las LCR de los tipos virales de alto riesgo podría indicar que estas repeticiones forman

un agrupamiento o clúster que es necesario para la regulación de la expresión del genoma viral o celular, dada la localización particular de estas semillas (la LCR). Acorde con lo anterior, la presencia de varias repeticiones de la semilla de *miR-363* en la correspondiente LCR del VPH11 podría reflejar que es necesaria la presencia de repeticiones en dicha región, sin importar el microRNA particular al que pertenezcan, y este evento podría apuntar hacia una posible huella genética que permitiera identificar la presencia del VPH y diferenciarlo de otros virus que pudieran estar presentes en una misma muestra de tejido.

En resumen, en este trabajo se reporta una metodología sencilla para un análisis *in silico* que permitió detectar una variedad de semillas de microRNAs en el genoma de diferentes tipos de VPH. Esta estrategia de detección puede emplearse también para detectar secuencias de microRNAs conservados en genomas de otras especies, aun de aquellas que se encuentren en proceso de ensamble.

En conclusión, los virus de papiloma humano de alto poder oncogénico teóricamente comparten secuencias compatibles a microRNAs humanos y virales, lo que sugeriría mecanismos de regulación viral común. Estas secuencias al menos pueden presentarse en clústers o agrupamientos dentro de la región control LCR.

Agradecimientos

El presente trabajo se deriva de un proyecto aprobado por fondos sectoriales de CONACyT y el proyecto IMSS sobre la detección de microRNAs en los virus de papiloma humano.

Durante la realización del presente trabajo, David Pineda Gómez fue becario de CONACyT en el programa de Doctorado de Biotecnología y Biomedicina Molecular en la ENCB-IPN.

Nota aclaratoria: hace más de dos años enviamos a publicación el reporte de la existencia de microRNAs en los VPH a dos diferentes revistas indexadas y en ambas ocasiones fue rechazado. Sin embargo, en el 2013, fue publicado un artículo en la revista PLoS ONE que reportaba la presencia de los microRNAs en los VPH.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no ha sido reportado alguno que esté relacionado con este artículo.

Referencias

1. Esquela-Kerschner A, Slack FJ. Onomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:259-69.
2. Martello G, Zacchigna L, Inui M, Montagner M, Adorno M, et al. MicroRNA control of Nodal signalling. *Nature*. 2007;449:183-9.
3. Sarnow P, Jopling CL, Norman KL, Schütz S, Wehner KA. MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4:651-9.
4. Griffiths-Jones S. The miRNA Registry. *Nucleic Acids Res*; 2004;32:D109-D111.
5. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:D140-D144.
6. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D154-D158.
7. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*. 2004;116:281-97.
8. Vella MC, Slack FJ. *C. elegans* microRNAs. *Wormbook*. 2005;21:1-9.
9. Holland B, Wong J, Li M, Rasheed S. Identification of Human MicroRNA-like sequences embedded within the protein-encoding genes of the human immunodeficiency virus. *PLoS ONE*. 2013;8:e58586.
10. Cai X, Schäfer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers R, Edwards R, et al. Epstein-Barr Virus MicroRNAs Are Evolutionarily Conserved and Differentially Expressed. *PLoS Pathog*. 2006;2(3):e23.
11. Reshmi G, Pillai MR. Beyond HPV: Oncomirs as new players in cervical cancer. *FEBS Lett*. 2008;582:4113-6.
12. Qian K, Pietilä T, Rönty M, Michon F, Frilander MJ, et al. Identification and Validation of Human Papillomavirus Encoded microRNAs. *PLoS ONE*;2013;8(7): e70202.
13. Mole S, Milligan SG, Graham SV. Human papillomavirus type 16 E2 protein transcriptionally activates the promoter of a key cellular splicing factor, SF2/ASF. *J Virol*. 2009;83:357-67.
14. Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol*. 1992;66:2057-66.
15. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 1993;67:6413-23.
16. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol*. 1993;67:6424-31.
17. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 2006;118:1071-6.
18. Heinzl PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1746-54.
19. Bentwich I, Avniel a, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, et al. Identification of hundred of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Gen*. 2005;37:766-70.
20. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, et al. Assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction, restriction digest, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Inf Dis*. 1994;170:1077-85.

Anexo 2 Semillas de microRNAs presentes en el genoma de *H. sapiens*, detectadas en el genoma de VPH tipos 6, 11, 16 y 18

microRNA	VPH6			VPH11			VPH16			VPH18		
	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	
hsa-miR-141	6827	hsa-miR-143	1915	hsa-miR-143	3109	hsa-miR-141	5647					
hsa-miR-143	735	hsa-miR-144	5961	hsa-miR-220b	7103	hsa-miR-143	3428					
hsa-miR-144	5980	hsa-miR-147	260	hsa-miR-220c	6583	hsa-miR-144	4667					
hsa-miR-147	3477	hsa-miR-193b	3799	hsa-miR-223	409	hsa-miR-187	7632					
hsa-miR-187	6713	hsa-miR-200a	5516	hsa-miR-27b	2670	hsa-miR-220c	1039					
hsa-miR-193b	3803	hsa-miR-220b	3033	hsa-miR-297	286	hsa-miR-221	3772					
hsa-miR-220b	3034	hsa-miR-220c	1323	hsa-miR-298	5240	hsa-miR-223	3237					
hsa-miR-223	2842	hsa-miR-223	2841	hsa-miR-299b-1	5928	hsa-miR-23a	5764					
hsa-miR-297	3133	hsa-miR-297	7370	hsa-miR-323-5p	3319	hsa-miR-24-1	4888					
hsa-miR-298	5411	hsa-miR-298	6911	hsa-miR-325	4866	hsa-miR-296-5p	4531					
hsa-miR-299-5p	4806	hsa-miR-29a	3983	hsa-miR-326	6473	hsa-miR-297	776					
hsa-miR-29a	6409	hsa-miR-29b-1	5589	hsa-miR-331-5p	2416	hsa-miR-298	1676					
hsa-miR-29b-2	1796	hsa-miR-325	6621	hsa-miR-338-5p	716	hsa-miR-299-5p	5862					
hsa-miR-328	5623	hsa-miR-329	7708	hsa-miR-346	3920	hsa-miR-299b-1	961					
hsa-miR-329	4282	hsa-miR-331-5p	4583	hsa-miR-376c	1098	hsa-miR-300	2414					
hsa-miR-331-5p	7028	hsa-miR-339-5p	5166	hsa-miR-378	5074	hsa-miR-324-5p	893					
hsa-miR-338-5p	7592	hsa-miR-340	7207	hsa-miR-382	3517	hsa-miR-325	809					
hsa-miR-340	2853	hsa-miR-363	1349	hsa-miR-409-5p	6533	hsa-miR-328	3058					
hsa-miR-367	698	hsa-miR-367	296	hsa-miR-410	3000	hsa-miR-329	90					
hsa-miR-370	7233	hsa-miR-376c	1334	hsa-miR-411	1970	hsa-miR-337-5p	956					
hsa-miR-376c	1341	hsa-miR-378	580	hsa-miR-450b-5p	2726	hsa-miR-338-5p	1304					
hsa-miR-382	5845	hsa-miR-382	7498	hsa-miR-485-5p	928	hsa-miR-363	4405					
hsa-miR-410	5631	hsa-miR-409-5p	7901	hsa-miR-488	5913	hsa-miR-367	1766					
hsa-miR-411	617	hsa-miR-411	1374	hsa-miR-490-5p	3091	hsa-miR-376a	2872					
hsa-miR-433	5215	hsa-miR-450b-5p	170	hsa-miR-493	1920	hsa-miR-376c	184					
hsa-miR-450b-5p	5266	hsa-miR-452	4887	hsa-miR-495	380	hsa-miR-410	4629					
hsa-miR-452	6761	hsa-miR-454	5475	hsa-miR-500	2692	hsa-miR-411	1790					
hsa-miR-486-5p	3900	hsa-miR-483-5p	5281	hsa-miR-501-5p	2693	hsa-miR-412	6463					
hsa-miR-488	2270	hsa-miR-486-5p	3883	hsa-miR-504	4949	hsa-miR-433	5203					
hsa-miR-493	3879	hsa-miR-493	3853	hsa-miR-509-3-5p	3691	hsa-miR-450b-5p	2797					
hsa-miR-494	1285	hsa-miR-494	1278	hsa-miR-512-5p	1284	hsa-miR-483-5p	934					
hsa-miR-495	2802	hsa-miR-495	6216	hsa-miR-513-5p	2052	hsa-miR-486-5p	5321					
hsa-miR-501-5p	6139	hsa-miR-500	2961	hsa-miR-515-5p	1764	hsa-miR-488	3873					
hsa-miR-504	585	hsa-miR-502-5p	5892	hsa-miR-518a-5p	1469	hsa-miR-492	3597					
hsa-miR-509-3-5p	220	hsa-miR-504	584	hsa-miR-519a	3107	hsa-miR-493	4185					
hsa-miR-511	1485	hsa-miR-507	6508	hsa-miR-520d-5p	767	hsa-miR-504	5309					
hsa-miR-513-5p	7041	hsa-miR-513-5p	7025	hsa-miR-521	4438	hsa-miR-508-5p	4569					
hsa-miR-514	6379	hsa-miR-518a-5p	7167	hsa-miR-539	2894	hsa-miR-509-3-5p	5245					

Continúa en la página S148

VPH6		VPH11		VPH16		VPH18	
microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición
hsa-miR-519a	108	hsa-miR-518b	7210	hsa-miR-541	2070	hsa-miR-511	4144
hsa-miR-520d-5p	1770	hsa-miR-520d-5p	1769	hsa-miR-544	2341	hsa-miR-512-5p	3459
hsa-miR-520g	1772	hsa-miR-520g	1771	hsa-miR-548a-3p	7833	hsa-miR-513-5p	3290
hsa-miR-539	2443	hsa-miR-539	2554	hsa-miR-548a-5p	1543	hsa-miR-515-5p	6492
hsa-miR-544	4651	hsa-miR-543	5495	hsa-miR-549	615	hsa-miR-517	5729
hsa-miR-548a-3p	2244	hsa-miR-548a-5p	106	hsa-miR-551a	125	hsa-miR-520d-5p	1953
hsa-miR-548a-5p	1679	hsa-miR-549	270	hsa-miR-551b	1551	hsa-miR-539	2542
hsa-miR-550	6588	hsa-miR-550	292	hsa-miR-552	994	hsa-miR-541	1680
hsa-miR-551b	1741	hsa-miR-551b	319	hsa-miR-556-5p	2668	hsa-miR-543	7758
hsa-miR-553	41	hsa-miR-553	40	hsa-miR-558	155	hsa-miR-544	5807
hsa-miR-561	7133	hsa-miR-555	6268	hsa-miR-561	304	hsa-miR-548a-3p	7401
hsa-miR-564	471	hsa-miR-561	7117	hsa-miR-567	2419	hsa-miR-548a-5p	1529
hsa-miR-566	4774	hsa-miR-567	3278	hsa-miR-568	15	hsa-miR-550	416
hsa-miR-567	3279	hsa-miR-569	6194	hsa-miR-569	807	hsa-miR-552	3783
hsa-miR-569	6210	hsa-miR-570	2480	hsa-miR-575	6494	hsa-miR-553	47
hsa-miR-570	2784	hsa-miR-578	7331	hsa-miR-579	7825	hsa-miR-556-5p	2034
hsa-miR-576-5p	1993	hsa-miR-579	1486	hsa-miR-581	7290	hsa-miR-561	1174
hsa-miR-581	3473	hsa-miR-582-5p	1824	hsa-miR-582-5p	6751	hsa-miR-564	944
hsa-miR-582-5p	1825	hsa-miR-583	24	hsa-miR-584	3217	hsa-miR-567	1845
hsa-miR-583	3240	hsa-miR-586	1580	hsa-miR-585	28	hsa-miR-570	1196
hsa-miR-584	6374	hsa-miR-592	418	hsa-miR-586	2476	hsa-miR-577	4366
hsa-miR-586	2952	hsa-miR-596	4649	hsa-miR-587	476	hsa-miR-579	2432
hsa-miR-587	5936	hsa-miR-597	419	hsa-miR-592	2783	hsa-miR-584	7225
hsa-miR-592	419	hsa-miR-600	5097	hsa-miR-595	739	hsa-miR-586	2703
hsa-miR-596	288	hsa-miR-602	1216	hsa-miR-599	7302	hsa-miR-595	788
hsa-miR-597	420	hsa-miR-607	1812	hsa-miR-603	1412	hsa-miR-600	225
hsa-miR-598	3517	hsa-miR-608	1348	hsa-miR-605	7556	hsa-miR-602	5442
hsa-miR-599	4734	hsa-miR-611	7181	hsa-miR-606	7624	hsa-miR-606	6845
hsa-miR-609	4233	hsa-miR-612	779	hsa-miR-607	6500	hsa-miR-609	7356
hsa-miR-614	3468	hsa-miR-615-5p	5319	hsa-miR-608	1357	hsa-miR-611	1018
hsa-miR-620	4186	hsa-miR-620	4346	hsa-miR-609	1397	hsa-miR-612	496
hsa-miR-622	5618	hsa-miR-622	5599	hsa-miR-611	2732	hsa-miR-619	3560
hsa-miR-624	6792	hsa-miR-624	2896	hsa-miR-614	7677	hsa-miR-624	3432
hsa-miR-625	6578	hsa-miR-625	2317	hsa-miR-620	567	hsa-miR-630	6482
hsa-miR-626	1483	hsa-miR-627	5208	hsa-miR-626	1742	hsa-miR-631	3559
hsa-miR-629	3804	hsa-miR-629	3800	hsa-miR-632	3919	hsa-miR-632	6322
hsa-miR-632	6922	hsa-miR-630	3950	hsa-miR-633	2018	hsa-miR-634	2365
hsa-miR-634	3538	hsa-miR-632	6442	hsa-miR-635	3438	hsa-miR-640	919

Continúa de la página S147 y sigue en la página S149

VPH6			VPH11			VPH16			VPH18		
microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición
hsa-miR-637	4617	hsa-miR-636	4687	hsa-miR-636	7205	hsa-miR-641	7205	hsa-miR-641	181		
hsa-miR-639	507	hsa-miR-637	4661	hsa-miR-641	451	hsa-miR-642	451	hsa-miR-642	6488		
hsa-miR-641	386	hsa-miR-641	2172	hsa-miR-643	7208	hsa-miR-643	7208	hsa-miR-643	1842		
hsa-miR-642	6959	hsa-miR-643	7333	hsa-miR-647	5646	hsa-miR-646	5646	hsa-miR-646	849		
hsa-miR-644	3478	hsa-miR-644	261	hsa-miR-650	6867	hsa-miR-649	6867	hsa-miR-649	194		
hsa-miR-647	2222	hsa-miR-647	2221	hsa-miR-653	7167	hsa-miR-650	7167	hsa-miR-650	1184		
hsa-miR-649	6583	hsa-miR-649	4157	hsa-miR-655	4065	hsa-miR-652	4065	hsa-miR-652	105		
hsa-miR-653	366	hsa-miR-654-5p	6235	hsa-miR-656	3225	hsa-miR-654-5p	3225	hsa-miR-654-5p	4466		
hsa-miR-654-5p	6098	hsa-miR-655	4907	hsa-miR-665	6864	hsa-miR-655	6864	hsa-miR-655	1695		
hsa-miR-655	3870	hsa-miR-656	3193	hsa-miR-765	660	hsa-miR-656	660	hsa-miR-656	1709		
hsa-miR-656	3221	hsa-miR-656	3193	hsa-miR-766	6931	hsa-miR-660	6931	hsa-miR-660	4867		
hsa-miR-657	5119	hsa-miR-671-5p	2150	hsa-miR-768-5p	6831	hsa-miR-770-5p	6831	hsa-miR-770-5p	6625		
hsa-miR-660	1052	hsa-miR-765	6859	hsa-miR-802	3601	hsa-miR-802	3601	hsa-miR-802	7327		
hsa-miR-675	7789	hsa-miR-768-5p	6074	hsa-miR-873	5746	hsa-miR-871	5746	hsa-miR-871	346		
hsa-miR-768-5p	4584	hsa-miR-770-5p	5039	hsa-miR-874	2440	hsa-miR-873	2440	hsa-miR-873	543		
hsa-miR-770-5p	1821	hsa-miR-871	2705	hsa-miR-885-5p	711	hsa-miR-877	711	hsa-miR-877	4563		
hsa-miR-802	2524	hsa-miR-872	5111	hsa-miR-886-5p	490	hsa-miR-886-5p	490	hsa-miR-886-5p	1043		
hsa-miR-871	2706	hsa-miR-874	7683	hsa-miR-891a	3359	hsa-miR-889	3359	hsa-miR-889	1005		
hsa-miR-872	5121	hsa-miR-875-5p	6291	hsa-miR-891b	7883	hsa-miR-891a	7883	hsa-miR-891a	2504		
hsa-miR-873	2757	hsa-miR-885-5p	3827	hsa-miR-892a	430	hsa-miR-921	430	hsa-miR-921	7322		
hsa-miR-874	7729	hsa-miR-886-5p	862	hsa-miR-892b	2937	hsa-miR-922	2937	hsa-miR-922	445		
hsa-miR-877	4992	hsa-miR-889	3977	hsa-miR-921	322	hsa-miR-92a-1	322	hsa-miR-92a-1	7831		
hsa-miR-885-5p	7048	hsa-miR-890	4226	hsa-miR-922	1287	hsa-miR-935	1287	hsa-miR-935	5838		
hsa-miR-889	3664	hsa-miR-892a	2909	hsa-miR-934	3828	hsa-miR-939	3828	hsa-miR-939	1211		
hsa-miR-891a	130	hsa-miR-92a-2	3796	hsa-miR-935	209	hsa-miR-941	209	hsa-miR-941	5001		
hsa-miR-892b	4628	hsa-miR-935	5387	hsa-miR-936	4515	hsa-miR-943	4515	hsa-miR-943	3814		
hsa-miR-921	3737	hsa-miR-936	364	hsa-miR-940	4305	hsa-miR-944	4305	hsa-miR-944	6595		
hsa-miR-92a-1	4590	hsa-miR-938	7605	hsa-miR-944	3381						
hsa-miR-92a-2	6575	hsa-miR-940	1036								
hsa-miR-92b	7199	hsa-miR-944	6675								
hsa-miR-935	4857										
hsa-miR-938	6335										
hsa-miR-940	1037										

Continúa de la página S148

Anexo 3 Semillas de microRNAs presentes en el genoma de *H. sapiens*, detectadas en el genoma de VPH tipos 33, 45 y 52

VPH33			VPH45			VPH52			
microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición
hsa-miR-143	7701	hsa-miR-124	3587	hsa-miR-143	192	hsa-miR-143	192	hsa-miR-143	192
hsa-miR-144	2197	hsa-miR-141	5642	hsa-miR-144	2191	hsa-miR-144	2191	hsa-miR-144	2191
hsa-miR-187	6532	hsa-miR-143	1456	hsa-miR-187	209	hsa-miR-187	209	hsa-miR-187	209
hsa-miR-193b	4363	hsa-miR-144	2232	hsa-miR-220b	6877	hsa-miR-220b	6877	hsa-miR-220b	6877
hsa-miR-221	3665	hsa-miR-185	360	hsa-miR-221	3701	hsa-miR-221	3701	hsa-miR-221	3701
hsa-miR-222	1593	hsa-miR-187	3434	hsa-miR-222	2487	hsa-miR-222	2487	hsa-miR-222	2487
hsa-miR-223	414	hsa-miR-220b	5648	hsa-miR-223	287	hsa-miR-223	287	hsa-miR-223	287
hsa-miR-297	3652	hsa-miR-221	3736	hsa-miR-297	3680	hsa-miR-297	3680	hsa-miR-297	3680
hsa-miR-298	4735	hsa-miR-223	6078	hsa-miR-298	1593	hsa-miR-298	1593	hsa-miR-298	1593
hsa-miR-302a	7031	hsa-miR-24-1	4526	hsa-miR-298	5097	hsa-miR-298	5097	hsa-miR-298	5097
hsa-miR-323-5p	3313	hsa-miR-27b	806	hsa-miR-298-1	911	hsa-miR-298-1	911	hsa-miR-298-1	911
hsa-miR-328	5430	hsa-miR-297	778	hsa-miR-298-2	7646	hsa-miR-298-2	7646	hsa-miR-298-2	7646
hsa-miR-329	5331	hsa-miR-298	1634	hsa-miR-300	227	hsa-miR-300	227	hsa-miR-300	227
hsa-miR-331-5p	3212	hsa-miR-298-1	961	hsa-miR-323-5p	3307	hsa-miR-323-5p	3307	hsa-miR-323-5p	3307
hsa-miR-338-5p	5235	hsa-miR-302a	7517	hsa-miR-325	4500	hsa-miR-325	4500	hsa-miR-325	4500
hsa-miR-340	71	hsa-miR-326	4610	hsa-miR-329	3430	hsa-miR-329	3430	hsa-miR-329	3430
hsa-miR-376a	946	hsa-miR-329	1896	hsa-miR-331-5p	3740	hsa-miR-331-5p	3740	hsa-miR-331-5p	3740
hsa-miR-378	5046	hsa-miR-331-5p	5521	hsa-miR-338-5p	2997	hsa-miR-338-5p	2997	hsa-miR-338-5p	2997
hsa-miR-382	3472	hsa-miR-338-5p	1304	hsa-miR-370	5258	hsa-miR-370	5258	hsa-miR-370	5258
hsa-miR-410	3846	hsa-miR-367	1758	hsa-miR-376c	2200	hsa-miR-376c	2200	hsa-miR-376c	2200
hsa-miR-421	778	hsa-miR-370	7075	hsa-miR-378	5479	hsa-miR-378	5479	hsa-miR-378	5479
hsa-miR-452	1887	hsa-miR-411	6709	hsa-miR-379	1301	hsa-miR-379	1301	hsa-miR-379	1301
hsa-miR-485-5p	6401	hsa-miR-421	4928	hsa-miR-382	821	hsa-miR-382	821	hsa-miR-382	821
hsa-miR-486-5p	5639	hsa-miR-450b-5p	2755	hsa-miR-409-5p	7907	hsa-miR-409-5p	7907	hsa-miR-409-5p	7907
hsa-miR-490-5p	6043	hsa-miR-452	6372	hsa-miR-410	1954	hsa-miR-410	1954	hsa-miR-410	1954
hsa-miR-493	3225	hsa-miR-490-5p	4803	hsa-miR-433	1949	hsa-miR-433	1949	hsa-miR-433	1949
hsa-miR-494	1761	hsa-miR-491-5p	1416	hsa-miR-452	4094	hsa-miR-452	4094	hsa-miR-452	4094
hsa-miR-495	374	hsa-miR-492	2321	hsa-miR-453	7585	hsa-miR-453	7585	hsa-miR-453	7585
hsa-miR-500	2686	hsa-miR-493	1393	hsa-miR-483-5p	1304	hsa-miR-483-5p	1304	hsa-miR-483-5p	1304
hsa-miR-501-5p	2687	hsa-miR-494	1796	hsa-miR-486-5p	5685	hsa-miR-486-5p	5685	hsa-miR-486-5p	5685
hsa-miR-504	4993	hsa-miR-495	3606	hsa-miR-488	5907	hsa-miR-488	5907	hsa-miR-488	5907
hsa-miR-505	1795	hsa-miR-501-5p	5024	hsa-miR-490-5p	6272	hsa-miR-490-5p	6272	hsa-miR-490-5p	6272
hsa-miR-509-3-5p	6743	hsa-miR-509-3-5p	6769	hsa-miR-492	2280	hsa-miR-492	2280	hsa-miR-492	2280
hsa-miR-512-5p	1296	hsa-miR-510	1352	hsa-miR-493	3854	hsa-miR-493	3854	hsa-miR-493	3854
hsa-miR-514	5501	hsa-miR-514	1065	hsa-miR-494	1488	hsa-miR-494	1488	hsa-miR-494	1488
hsa-miR-517	2576	hsa-miR-516b	4428	hsa-miR-495	940	hsa-miR-495	940	hsa-miR-495	940
hsa-miR-518a-5p	3273	hsa-miR-517	5099	hsa-miR-500	2680	hsa-miR-500	2680	hsa-miR-500	2680
hsa-miR-518c	4743	hsa-miR-518a-5p	204	hsa-miR-501-5p	2681	hsa-miR-501-5p	2681	hsa-miR-501-5p	2681

Continúa en la página S151

VPH33		VPH45		VPH52	
microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición
hsa-miR-520d-5p	2134	hsa-miR-519a	88	hsa-miR-504	131
hsa-miR-520g	1158	hsa-miR-520d-5p	1911	hsa-miR-508-5p	3476
hsa-miR-539	2465	hsa-miR-520g	4334	hsa-miR-513-5p	7707
hsa-miR-548a-3p	2815	hsa-miR-539	2500	hsa-miR-518a-5p	3264
hsa-miR-548a-5p	2038	hsa-miR-548a-3p	7665	hsa-miR-520d-5p	2872
hsa-miR-549	168	hsa-miR-548a-5p	2073	hsa-miR-539	1924
hsa-miR-553	59	hsa-miR-549	3162	hsa-miR-541	1597
hsa-miR-556-5p	1255	hsa-miR-550	413	hsa-miR-544	4297
hsa-miR-561	1139	hsa-miR-552	1150	hsa-miR-548a-3p	3793
hsa-miR-564	1008	hsa-miR-553	44	hsa-miR-548a-5p	1327
hsa-miR-567	7195	hsa-miR-561	1174	hsa-miR-552	4442
hsa-miR-568	1566	hsa-miR-564	533	hsa-miR-553	43
hsa-miR-570	4792	hsa-miR-567	779	hsa-miR-554	4812
hsa-miR-574-5p	2863	hsa-miR-568	394	hsa-miR-555	6158
hsa-miR-580	6664	hsa-miR-570	1196	hsa-miR-560	6600
hsa-miR-582-5p	2185	hsa-miR-579	2390	hsa-miR-561	1124
hsa-miR-583	1491	hsa-miR-582-5p	6734	hsa-miR-564	5218
hsa-miR-584	1769	hsa-miR-584	7171	hsa-miR-567	3681
hsa-miR-587	5579	hsa-miR-586	2505	hsa-miR-568	408
hsa-miR-591	105	hsa-miR-591	5360	hsa-miR-569	456
hsa-miR-592	774	hsa-miR-592	6048	hsa-miR-570	356
hsa-miR-599	436	hsa-miR-595	788	hsa-miR-574-5p	1212
hsa-miR-605	4689	hsa-miR-600	809	hsa-miR-582-5p	7414
hsa-miR-606	814	hsa-miR-601	4375	hsa-miR-584	7388
hsa-miR-607	2009	hsa-miR-606	7553	hsa-miR-586	759
hsa-miR-608	1365	hsa-miR-609	5822	hsa-miR-587	5625
hsa-miR-609	3972	hsa-miR-611	2761	hsa-miR-592	7178
hsa-miR-624	4324	hsa-miR-612	493	hsa-miR-596	5256
hsa-miR-628-5p	3375	hsa-miR-622	3978	hsa-miR-598	548
hsa-miR-630	3279	hsa-miR-624	3390	hsa-miR-602	3538
hsa-miR-633	7646	hsa-miR-632	6320	hsa-miR-605	4845
hsa-miR-634	2288	hsa-miR-633	3788	hsa-miR-607	1022
hsa-miR-641	6685	hsa-miR-634	1660	hsa-miR-608	1350
hsa-miR-644	3049	hsa-miR-640	4532	hsa-miR-609	4413
hsa-miR-648	2864	hsa-miR-641	1527	hsa-miR-612	1150
hsa-miR-649	737	hsa-miR-642	4727	hsa-miR-620	2159
hsa-miR-653	6691	hsa-miR-646	849	hsa-miR-622	5303
hsa-miR-655	1460	hsa-miR-649	3875	hsa-miR-627	4603

Continúa de la página S150 y sigue en la página S152

VPH33		VPH45		VPH52	
microRNA	Posición	microRNA	Posición	microRNA	Posición
hsa-miR-656	1476	hsa-miR-650	1184	hsa-miR-628-5p	7700
hsa-miR-658	1167	hsa-miR-652	102	hsa-miR-632	1108
hsa-miR-758	3707	hsa-miR-655	383	hsa-miR-633	3633
hsa-miR-766	4724	hsa-miR-656	338	hsa-miR-641	449
hsa-miR-768-5p	525	hsa-miR-660	4859	hsa-miR-644	5649
hsa-miR-802	5993	hsa-miR-662	3565	hsa-miR-650	2979
hsa-miR-871	1378	hsa-miR-758	524	hsa-miR-651	3936
hsa-miR-873	6435	hsa-miR-802	1493	hsa-miR-655	1612
hsa-miR-876-5p	5849	hsa-miR-871	5053	hsa-miR-656	481
hsa-miR-877	1667	hsa-miR-877	4555	hsa-miR-660	2620
hsa-miR-890	6073	hsa-miR-885-5p	3713	hsa-miR-662	5369
hsa-miR-891a	219	hsa-miR-886-5p	1043	hsa-miR-758	719
hsa-miR-892a	300	hsa-miR-889	1005	hsa-miR-768-5p	2165
hsa-miR-892b	4417	hsa-miR-891a	125	hsa-miR-802	1329
hsa-miR-921	5614	hsa-miR-891b	2885	hsa-miR-871	1366
hsa-miR-922	994	hsa-miR-921	3791	hsa-miR-873	2560
hsa-miR-92a-2	1367	hsa-miR-922	442	hsa-miR-877	1390
hsa-miR-940	4556	hsa-miR-92a-1	7820	hsa-miR-885-5p	5489
hsa-miR-943	3710	hsa-miR-92a-2	1415	hsa-miR-888	2359
		hsa-miR-934	7089	hsa-miR-889	2344
		hsa-miR-936	813	hsa-miR-892a	5670
		hsa-miR-939	1211	hsa-miR-921	1838
		hsa-miR-943	6159	hsa-miR-922	1284
		hsa-miR-944	6530	hsa-miR-92a-2	1352
				hsa-miR-933	6601
				hsa-miR-936	2488
				hsa-miR-940	7066
				hsa-miR-944	6571

