



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



INSTITUT PASTEUR  
DE MONTEVIDEO

Laboratorio de Genómica Funcional  
Instituto Pasteur de Montevideo  
Facultad de Ciencias. UdelaR

# **Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos**

Tesis de Grado.

Fernanda Bangueses.

Tutor : Dra. María Catalina Güida.

Montevideo 2011.

# Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

Índice

---

<i>Introducción</i>	2
1. <i>MircroARNs</i>	2
2. <i>MicroARNs y Cancer</i>	5
3. <i>Leucemia linfoide crónica</i>	6
4. <i>CHD5</i>	7
<i>Objetivos</i>	10
<i>Materiales y Métodos</i>	12
1. <i>MicroARNs</i>	12
2. <i>Cultivo celulares</i>	13
2.1 <i>Líneas celulares</i>	13
2.2 <i>Mantenimiento celular</i>	13
2.3 <i>Recuento de células</i>	14
2.4 <i>Sembrado de células en placas</i>	14
3. <i>Transfecciones</i>	14
4. <i>Inmunofluorescencia</i>	15
5. <i>Viabilidad celular</i>	16
6. <i>Detección de apoptosis</i>	17
<i>Resultados</i>	19
1. <i>Puesta a punto de condiciones de transfección y evaluación del efecto fenotípico sobre las líneas celulares</i>	20
2. <i>Viabilidad celular</i>	23
3. <i>Apoptosis</i>	24

**Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en  
linfocitos B leucémicos**

Índice

---

<i>4. Efecto de los miARNs 1201, 1202 y 1203 sobre CHD5</i> .....	25
<i>Discusión y Conclusiones</i> .....	29
<i>Citas bibliográficas</i> .....	34

## Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

Agradecimientos

---

Agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Genómica Funcional del Instituto Pasteur de Montevideo por la paciencia y las ganas de ayudar.

Muy especialmente a Catalina quien me enseñó, con mucha paciencia y dedicación, la enorme mayoría de las cosas que me permitieron realizar mi tesis de grado.

A Alfonso, por darme la oportunidad de integrarme y formar parte de su laboratorio.

A Rosa, Braulio, Florencia, Juan Pablo, Julia y Mariana por la ayuda y buena onda de todos los días.

Muy especialmente, no solo agradezco sino que dedico mi trabajo, a toda mi familia: mamá, papá, hermanos, abuelos y novio por aguantarme todos estos años, especialmente el último, hablando de cosas que no entendían, pero igual así escuchaban.

A los integrantes del laboratorio de control de biofármacos del Instituto Pasteur de Montevideo (Larisa, Leticia y Ricciardi) quienes me ayudaron con la técnica de cristal violeta.

***“No solo no hubiera sido nada sin ustedes, sino con toda la gente que estuvo a mi alrededor desde el comienzo, algunos siguen hasta hoy....Gracias totales”*** (Soda stéreo)

# INTRODUCCIÓN

## 1. *MicroARNs*

Los MicroARNs (miARNs) son una clase de pequeños ARNs no codificantes de entre 19 y 22 nucleótidos que regulan la expresión génica mediante la degradación o inhibición de la traducción de los ARN mensajeros (ARNm) blancos, tanto en plantas como en animales <sup>#1</sup>. Existen más de 1400 genes de miARNs reportados en el genoma humano (<http://www.mirbase.org/> Release 17, Abril 2011), constituyendo una de las clases más grandes de genes reguladores <sup>#2</sup>.

Originalmente fueron descubiertos en *Caenorhabditis elegans* como reguladores del desarrollo. Actualmente se ha evidenciado que afectan diversos procesos biológicos como lo son la regulación del desarrollo celular, diferenciación, proliferación y apoptosis, jugando un importante rol en la carcinogénesis<sup>#3</sup>.

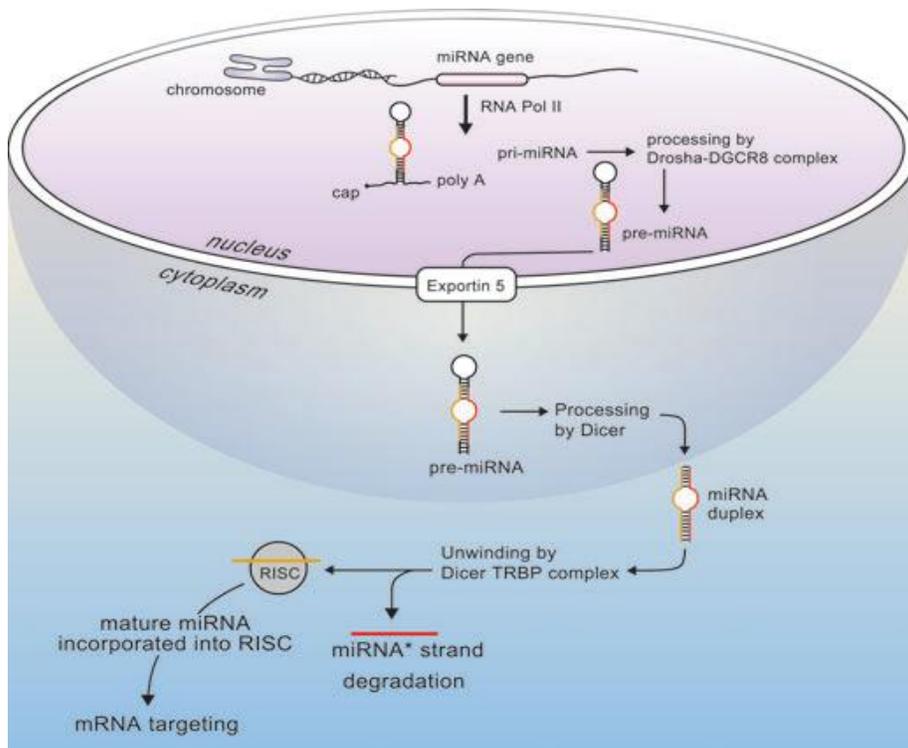
La biogénesis de estas moléculas pequeñas, sintetizadas de forma endógena y conservada evolutivamente <sup>#4</sup>, involucra tres procesos: transcripción del miARN primario (pri-miARN) a partir del gen de miARN, procesamiento parcial del precursor del miARN en el núcleo y maduración de los miARNs que fueron generados en el citoplasma <sup>#5</sup>.

Los miARNs son transcritos por la ARN polimerasa II al igual que los genes que codifican para proteínas. El transcripto primario (pri-miARN) sufre las mismas modificaciones post-traduccionales que los ARN mensajeros (ARNm) como son la poliadenilación en el extremo 3` y el agregado de una caperuza constituida por un residuo 7-metilguanosina al extremo 5`. El largo de las moléculas de pri-miARNs no es aún conocido pero se cree que contiene varios miARNs maduros en forma de clusters. Las moléculas de pri-miARN contienen estructuras en horquilla que son reconocidas por la enzima Drosha, una ARNasa tipo III. Estas estructuras en horquilla de los pri-miARNs son cortadas por el complejo Drosha-DGCR8 en el núcleo y el producto, uno o más precursores de los miARNs resultantes (pre-miARN), es transportado al citoplasma por la proteína transportadora *Exportin-5*. Los pre-

## Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

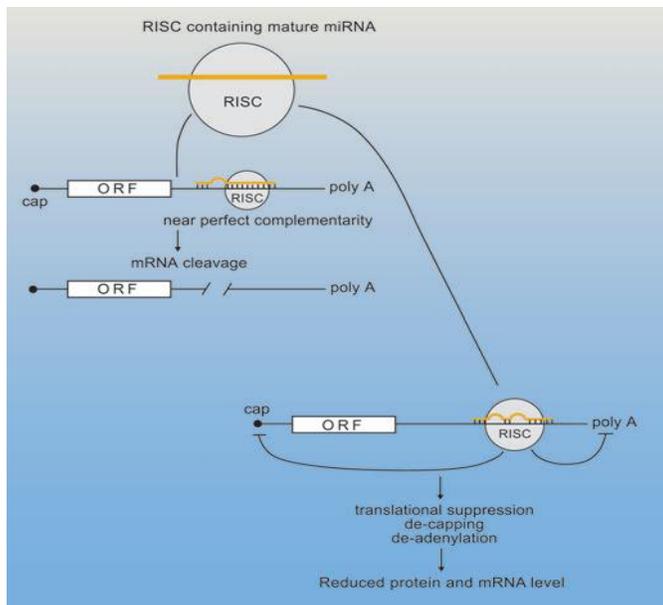
Introducción

miARNs son moléculas que usualmente constan de 70-90 nucleótidos de largo, con estructura secundaria muy estable en forma de horquilla. En el citoplasma la proteína Dicer, reconoce la horquilla, procesa los pre-miARNs y libera un dúplex maduro doble hebra de aproximadamente 21 nucleótidos. En un paso final, una de las hebras del dúplex de ARN maduro es incorporada al complejo RISC (RNA induced silencing complex) la cual se une a través de un apareamiento imperfecto a una secuencia específica del extremo 3'UTR del ARNm blanco, la hebra que no es incorporada al complejo RISC se denomina hebra miRNA\* y es degradada (Figura 1). Si el miARN se une a su secuencia blanco en el ARNm, y la complementariedad de bases es casi perfecta, RISC cliva al ARNm, en cambio si la complementariedad es menos extensa el ARNm blanco no puede ser clivado, en su lugar se suprime la traducción del blanco mediante la eliminación de la caperuza 5' y la eliminación de la cola poli A del extremo 3' #6 (Figura 2).



**Figura 1.**  
Biogénesis de los  
microARNs #6.

Los miARNs animales, salvo raras excepciones, se aparean de forma imperfecta a sitios específicos, generalmente localizados en la región 3' no traducida (3'UTR) del ARNm blanco y en múltiples copias <sup>#7</sup>. Dichos sitios en los ARNm se denominan “secuencias semilla” y generalmente se encuentran entre las posiciones 2 y 8 desde el extremo 5'. Cuando estas secuencias semilla están muy cercanas (entre 10 y 40 nucleótidos) tienden a actuar de forma cooperativa, es decir, su efecto es mayor a la sumatoria de las contribuciones independientes <sup>#8</sup>. Un mismo miARN puede participar en distintas vías, teniendo diferentes efectos en cuanto a la supervivencia celular, crecimiento y proliferación dependiendo del tipo celular y el patrón de expresión génica. La naturaleza combinatoria de las interacciones miARN-ARNm significan que el mismo miARN puede tener diferentes blancos, y un mismo ARNm puede ser blanco de diferentes miARNs en diferentes tipos celulares <sup>#9</sup>. Este hecho plantea el potencial de un miARN para tener como blanco múltiples ARNm. De hecho, análisis computacional de la “secuencia semilla” y del 3'UTR, el sitio blanco más común, predice que más de un tercio de los genes que codifican para proteínas en los seres humanos, están regulados por miARNs <sup>#10</sup>.



**Figura 2.** Acciones de los miARNs dependiendo del tipo de complementariedad que exista entre el miARN y el ARNm blanco <sup>#6</sup>.

## **2. *MicroARNs y cancer***

El primer indicio de que la expresión aberrante de los miARNs podría contribuir al desarrollo del cáncer derivó de Calin et al. quienes encontraron frecuentes deleciones de miR15a/16-1 en células B de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) <sup>#10</sup>. Estudios recientes revelan que la desregulación de los miARNs se correlaciona con varios tipos de cáncer y está involucrada en el inicio y progresión de enfermedades malignas en humanos. La expresión aberrante de ciertos miARNs contribuye a la carcinogénesis promoviendo la expresión de oncogenes y/o inhibiendo la expresión de genes supresores tumorales. Los miARNs, incluso un mismo miARN, pueden actuar tanto como oncogenes o como supresores tumorales para inhibir la expresión de genes relacionados con el desarrollo del cáncer <sup>#11</sup>. Un oncogén es un gen que promueve la proliferación celular de forma incontrolada, incrementando la posibilidad de que una célula normal se convierta en una célula tumoral. A diferencia del rol de los oncogenes, los supresores tumorales reprimen la división celular y formación de tumores <sup>#12</sup>. La sobre-expresión, amplificación, o pérdida del silenciamiento epigenético de un gen que codifica para un miARN que tiene como blanco uno o más supresores tumorales puede inhibir la actividad de una vía anti-oncogénica. Por contraste, deleciones o silenciamiento epigenético de un miARN que normalmente reprime la expresión de uno o más oncogenes puede desencadenar en el incremento de la expresión de una proteína con potencial oncogénico <sup>#13</sup>. Así como los miARNs afectan la expresión génica y aproximadamente el 50% de ellos están en regiones asociadas a cáncer, se los postuló como buenos candidatos a mantener el balance entre supresores de tumores y oncogenes funcionando como miARNs oncogénicos <sup>#6</sup>. Actualmente se los considera como actores adicionales en la complejidad epigenética por el rol que ejercen como blancos de esta maquinaria, efectores de la metilación del ADN y modificadores de histonas <sup>#14</sup>.

### **3. Leucemia linfoide crónica**

La LLC es la leucemia más frecuente en los países occidentales, y en individuos de edad promedio de 65 años <sup>#15</sup>. Dicha enfermedad está caracterizada por un número elevado de células B leucémicas circulantes. La mayoría de las células B leucémicas se encuentran generalmente en estado Go/G1, tendiendo a estar cinéticamente en reposo, fenotípicamente activas y funcionalmente anérgicas, con niveles reducidos de receptores antigénicos IgM, IgD y CD79b. Evidencia reciente indica que la LLC no es una enfermedad estática que resulta simplemente de la acumulación de linfocitos, sino que es un proceso dinámico en el cual las células proliferan y mueren pero con una cinética aberrante del ciclo celular, donde el recambio celular es menor al de las células normales<sup>#16</sup>.

En los pacientes portadores de leucemia se observa una gran heterogeneidad clínica, esta podría asociarse con marcadores moleculares recientemente descritos. De esta manera se distinguen dos grupos de pacientes según el grado de mutación de la región variable del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgVH), el nivel de expresión de la quinasa de tirosina ZAP-70 y de la glicoproteína CD38 <sup>#17</sup>. Los pacientes con evolución benigna o indolente poseen un perfil molecular caracterizado por presentar clones mutados y poca o nula expresión celular de CD38 y ZAP-70 asociado a ausencia de anomalías citogenéticas<sup>#17</sup>. Por el contrario, los pacientes con evoluciones agresivas y rápidamente fatales presentan un fenotipo con aumentada expresión de CD38 y ZAP-70 asociada a un perfil mutacional ausente y presencia de alteraciones citogenéticas <sup>#18</sup>.

A pesar de las numerosas evidencias que se conocen sobre las bases moleculares involucradas en el desarrollo y las distintas formas de progresión de la enfermedad (modificaciones epigenéticas, mutaciones génicas y actividad desregulada de miARNs); el origen preciso de la LLC es aún desconocido <sup>#18</sup>.

### **Antecedentes del laboratorio**

Teniendo en cuenta el aumento de investigaciones que involucran a los miARNs en la iniciación y progresión del cáncer, en el laboratorio de genómica funcional del Instituto Pasteur de Montevideo se decidió identificar la expresión de miARNs específicos en LLC y estudiar su relación con la patogenia y el pronóstico de la enfermedad. En este contexto, Marton et al., reportaron a través de técnicas de clonado y ensayos de *northern blot* de miARNs el patrón de expresión de 18 genes de miARNs en linfocitos B leucémicos. En dicho trabajo se comparó el nivel de expresión de miARNs en células B normales y células B leucémicas. Como resultado de esto se determinó: que ciertos genes de miARNs se encuentran sobre-expresados en células B leucémicas y otros presentan menores niveles de expresión que en células B normales; también se describieron 4 genes de miARNs nuevos que se expresan solamente en células B leucémicas.

Estos nuevos miARNs se describieron bajo la nominación miR-1200, miR-1201, miR-1202 y miR-1203, las secuencias están disponibles en base de datos pública (<http://micornasanger.ac.uk/sequences/index.shtml>). Se realizaron estudios *in silico* de los blancos putativos de los miARNs con los programas miRanda y Target Scan. Para cada miARN los genes blanco fueron seleccionados sobre la base de secuencias complementarias usando un algoritmo de alineamiento local asociado a la estabilidad termodinámica de los dúplex de ARN. Los resultados mostraron que los miARN 1201, 1202 y 1203 tienen como blanco, entre otros, a una cromohelicasa de unión al ADN (CHD5); siendo CHD5 el que presenta mayor sustento en la literatura como supresor tumoral.

## **4. CHD5**

La cromohelicasa de unión al DNA 5 (CHD5), pertenece a la superfamilia de proteínas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP, Swi/Snf.

CHD5 codifica un combinación única de dominios funcionales que consiste en dos cromodominios amino terminales (N-terminal), seguidos por un dominio ATPasa/helicasa de tipo SWI2/SNF2 y uno o más dominios de unión a ADN <sup>#19</sup>.

- Cromodominios N-terminal: es un modificador de la organización de la cromatina. Es un motivo cuya secuencia está conservada evolutivamente, involucrado en el reconocimiento y unión a nucleosomas induciendo la remodelación de la estructura de la cromatina y la regulación transcripcional de genes.
- Dominio ATPasa/helicasa: tiene fuerte similitud con la ATPasa SWI2/SNF2, y está localizado en la región central de la secuencia de la estructura proteica.
- Dominios de unión a DNA: ubicados en el extremo carboxi-terminal (C-terminal). Es el dominio menos conservado.

CHD5 se localiza en el locus génico 1p36, el cual está deletado en aproximadamente el 35% de los casos de neuroblastoma y en neoplasias malignas del tejido hematopoyético entre otros. Además de la delección génica, CHD5 puede ser suprimido por otros procesos como lo es la supresión epigenética por metilación del promotor <sup>#19</sup>.

Bagchi et al. identificaron a CHD5 como un gen supresor de tumores mediante análisis en modelos murinos. Los primeros reportes que describen al gen y su función biológica indican que CHD5 se expresa principalmente en el sistema nervioso y que tendría una función de supresor tumoral al regular la proliferación, apoptosis y senescencia celular a través de la vía p19/p53 <sup>#20</sup>.

La proteína p53 es el supresor tumoral mejor conocido. En aproximadamente el 50% de los cánceres humanos está mutada de forma que su función se ve comprometida. La pérdida o inhibición de p53 evita la senescencia celular y la apoptosis, lo cual contribuye a la tumorigénesis <sup>#21</sup>.

# OBJETIVOS

### ***Objetivo general***

Evaluar la capacidad oncogénica de los 3 nuevos miARNs (miR-1201, miR-1202 y miR-1203), identificados en linfocitos B leucémicos en el laboratorio de genómica funcional del Instituto Pasteur de Montevideo.

### ***Objetivos específicos***

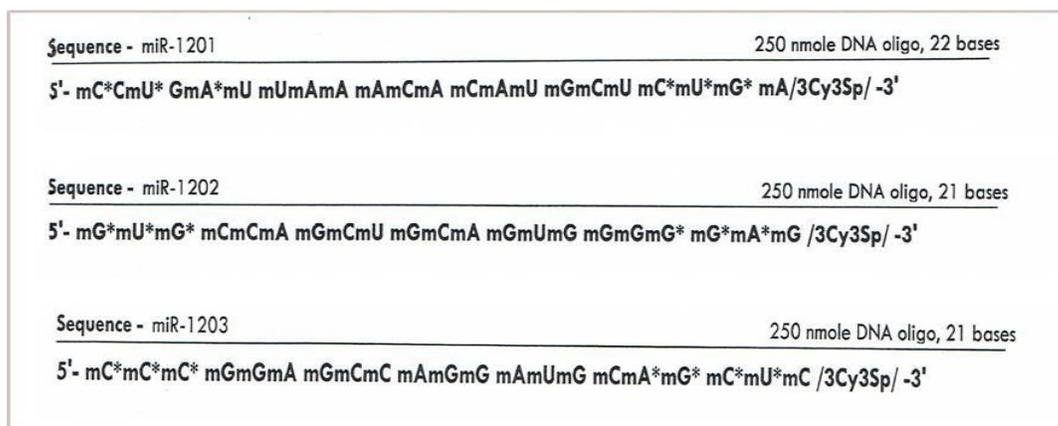
- Puesta a punto de condiciones de transfección con miARNs en distintas líneas celulares.
- Evaluación del posible efecto fenotípico de los miARNs en las líneas transfectadas.
- Estudio de viabilidad celular y apoptosis en las células tratadas.
- Detección y evaluación del comportamiento de uno de los posibles blancos de los miARNs: CHD5.

**MATERIALES**  
**Y**  
**METODOS**

## 1. MicroARNs.

En base a las secuencias de los miARNs maduros identificados en el laboratorio, se diseñaron miARNs sintéticos sentido (S) y anti-sentido (AS) con ribonucleótidos químicamente modificados. Las bases de los oligoribonucleótidos fueron metiladas con el agregado de 2-O-metilo y los enlaces fosfodiéster 5' y 3' fueron sustituidos por enlaces fosforotioato. Dichas modificaciones permiten una mayor estabilidad intracelular de los oligonucleótidos al inhibir la actividad de endonucleasas y exonucleasas. Las modificaciones realizadas se muestran en las figuras 3 y 4.

Para poder visualizar por microscopia o citometría de flujo los miARNs una vez transfectados, estos fueron marcados con Cyanine 3 en su extremo 3'. Cyanine 3 es un marcador fluorescente que tiene un pico de excitación de 550nm y un pico de emisión de 570nm.



**Figura 3.** Modificaciones químicas realizadas a los miARNs sentido. El sufijo *m* indica 2-O-metilo; el superíndice \* corresponde a una unión fosforotioato; y 3Cy3Sp corresponde a la marca con cyanine 3 en el extremo 3'.

## Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

Materiales y métodos.

Sequence - miR-1201as	250 nmole DNA oligo, 22 bases
5'- mU*mC*mA* mGmAmG mCmAmU mGmUmG mUmUmU mAmAmU mC*mA*mG* mG/3Cy3Sp/ -3'	
Sequence - miR-1202as	250 nmole DNA oligo, 21 bases
5'- mC*mU*mC* mCmCmC mCmAmC mUmGmC mA mGmC mUmGmG* mC*mA*mC /3Cy3Sp/ -3'	
Sequence - miR-1203as	250 nmole DNA oligo, 21 bases
5'- mG*mA*mG* mCmUmG mCmAmU mCmCmU mGmGmC mUmCmC* mG*mG*mG /3Cy3Sp/ -3'	

**Figura 4.** Modificaciones químicas realizadas a los miARNs anti-sentido. El sufijo *m* indica 2-O-metilo; el superíndice \* corresponde a una unión fosforotioato; y 3Cy3Sp corresponde a la marca con cyanine 3 en el extremo 3'.

## 2. Cultivos celulares

### 2.1 Líneas celulares.

Se trabajó con las líneas celulares adherentes: HeLa (derivadas de cáncer de cuello de útero de humano) y SK-N-SH (derivadas de neuroblastoma humano).

### 2.2 Mantenimiento celular

Las células se mantuvieron en botellas con medio RPMI 10% suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 mg/ml). Según los requerimientos de cada línea celular se realizaron pasajes como se describe: se lavaron las células con buffer fosfato salino (PBS) estéril, se tripsinaron con tripsina 0.02%. La acción de la tripsina se detuvo con el agregado de medio RPMI 10% SFB y antibióticos (RPMI completo). Las

células se sembraron en botellas con RPMI completo y se mantuvieron en estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.3 Recuento de células.

El recuento celular se realizó con el colorante de exclusión azul de tripano (*TrypanBlue*). Para ello se sembró en la cámara de Neubauer una mezcla al medio de suspensión de células y colorante.

### 2.4 Sembrado de células en placas.

Se utilizaron placas de 12, 48 y 96 pocillos según requerimiento experimental.

En las placas de 12 pocillos se sembraron:  $10 \times 10^4$  células por pocillo de la línea HeLa, y  $15 \times 10^4$  células por pocillo de la línea SK-N-SH en un volumen final de 1 ml por pocillo.

En las placas de 48 pocillos se sembraron:  $1 \times 10^4$  células por pocillo de la línea HeLa y  $3 \times 10^4$  células por pocillo de SK-N-SH en un volumen final de 300  $\mu$ l por pocillo.

En las placas de 96 pocillos se sembraron:  $0.5 \times 10^4$  células HeLa por pocillo y  $1.5 \times 10^4$  células por pocillo de la línea de neuroblastoma SK-N-SH con un volumen final de 150  $\mu$ l por pocillo.

## **3. Transfecciones.**

Se transfectaron células de ambas líneas en estudio: HeLa y SK-N-SH. Para la puesta a punto se utilizaron distintas concentraciones de miARNs sentido y anti-sentido (10 y 50 nM), y de lipofectamina 2000 (2, 4 y 6  $\mu$ l/ml)

Las transfecciones se realizaron según el protocolo de lipofectamine 2000, de Invitrogen, que puede ser obtenido en:

[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000_man.pdf)

Las células transfectadas con los miARNs se observaron al microscopio de epifluorescencia con el filtro para rodamina, se observaron las células a las 24, 48 y 72 hrs post-transfección para evaluar daño fenotípico y eficiencia de transfección.

En cada caso se transfectaron los miARNs por separado y un pool con los miARNs sentido y otro de anti-sentido. En ambos casos se mantuvo la concentración final de 50nM de los miARNs.

Los controles realizados fueron: células sin transfectar, células transfectadas con un ARN de transferencia (ARNt) anti-sentido de *Trypanosoma cruzi* (ARNt-ASP) y células expuestas solo a 2 µl/ml de lipofectamina.

#### **4. Inmunofluorescencia.**

Para poder visualizar la presencia y distribución subcelular de nuestra proteína de interés, CHD5, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia, en la cual se conjugan anticuerpos a fluorocromos para poder visualizarlos en el microscopio de epifluorescencia.

Las inmunofluorescencias se realizaron 48 horas post-transfección con 50nM de los distintos miARNs. Los ensayos fueron realizados en placas de 48 pocillos para ambas líneas celulares (HeLa y SK-N-SH). En ambos casos se utilizó el anticuerpo anti-CHD5 de Santa Cruz (1:100), y el anti-cuerpo secundario Alexa fluor 488 (1:1500).

Se fijaron las células con una solución de paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y se lavaron una vez con PBS. Luego se permeabilizaron las células con glicina 1M durante 10 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se incubaron las células con una solución de PBS-Tritón al 0.2% durante 10 minutos.

Se incubó el anticuerpo primario en PBS-BSA al 5% durante tres horas, se lavó cuatro veces con PBS-Tween al 0.6% y se incubó el anticuerpo secundario en PBS-BSA al 5% durante 45 minutos, cubriendo la placa de la luz. Se lavó cuatro veces con PBS-Tween al 1% y dos veces con PBS.

Para finalizar se realizó el montaje dispensando 5  $\mu$ l de solución de montaje: PBS-Glicerol al 50% y DAPI en dilución 1:1000.

El control negativo consistió en incubar células sin transfectar con el anticuerpo primario (anti-CHD5) y luego el anticuerpo secundario (Alexa flúor 488).

El control del anticuerpo secundario se realizó incubando solamente el anticuerpo secundario en un pocillo con células sin transfectar.

Las células se observaron al microscopio de epifluorescencia con los filtros FITC para el anticuerpo anti-CHD5 y DAPI para visualizar los núcleos celulares.

## 5. Viabilidad celular

Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de los miARNs, se determinó la viabilidad celular mediante tinción con cristal violeta de las líneas celulares utilizadas. El cristal violeta solamente penetra en las células vivas que fueron fijadas a la placa con paraformaldehído, por lo que es una técnica simple que permite determinar viabilidad celular.

El ensayo se realizó 24, 48 y 72 hrs post-transfección en placas de 96 pocillos, por cuadruplicado cada condición. Luego de descartar el medio en el que se encontraban las células, se lavó tres veces la placa con 100  $\mu$ l por pocillo de PBS frío, y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l de una solución fijadora de paraformaldehído al 5%. Se descartó el medio y se incubaron las células con 100  $\mu$ l de cristal violeta durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se lavó la placa con agua de grifo y se secó con papel absorbente. Luego se incubó 15 minutos con 100  $\mu$ l de etanol 95% y mediante el uso de un espectrofotómetro se determina la densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm.

## 6. Detección de apoptosis.

El estudio de detección de apoptosis se realizó 24 horas post-transfección mediante citometría de flujo utilizando Anexina-V. La anexina-V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, la cual tiene una gran afinidad de unión a los residuos fosfatidilserina. Por tanto la anexina-V puede unirse a los residuos de fosfatidilserina de las células apoptóticas al ser los residuos accesibles dado que se produce una translocación de los mismos hacia el exterior celular. De esta manera se puede discriminar entre células apoptóticas y células normales por la presencia de los residuos de fosfatidilserina en el exterior celular mediante el uso de un citómetro.

La tinción con anexina-V se realizó en placas de 12 pocillos a las 24 horas post-transfección de la siguiente manera: se recolectó el sobrenadante de cada pocillo y se mantuvo en hielo. Se lavaron los pocillos con PBS frío tres veces, se recolectó dicho PBS y se mantuvo en hielo. Se incubaron las células con 200  $\mu$ l de tripsina 0.02% durante 5 minutos a 37°C. Se neutralizó la tripsina con 200  $\mu$ l de RPMI, se recolectó el sobrenadante y se mantuvo en hielo.

Los sobrenadantes mantenidos en hielo se centrifugaron 5 minutos 260xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500  $\mu$ l de PBS frío. Se centrifugó nuevamente a 260xg durante 5 minutos a 4°C, se resuspendió el pellet en buffer de anexina 1X de forma tal que se contara con por lo menos  $1 \times 10^6$  células/ml. Se pasaron 100  $\mu$ l de la suspensión a eppendorfs nuevos. Luego se incubaron las células con 2,5  $\mu$ l de anexina a temperatura ambiente protegidas de la luz, se agregaron 300  $\mu$ l de buffer de anexina 1X y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la medición en el citómetro.

Como controles para el ajuste del citómetro se utilizaron: células sin marcación, células sin transfectar y sin exponer a anexina; células marcadas solo con anexina; y células transfectadas con los miARN sin incubar con anexina.

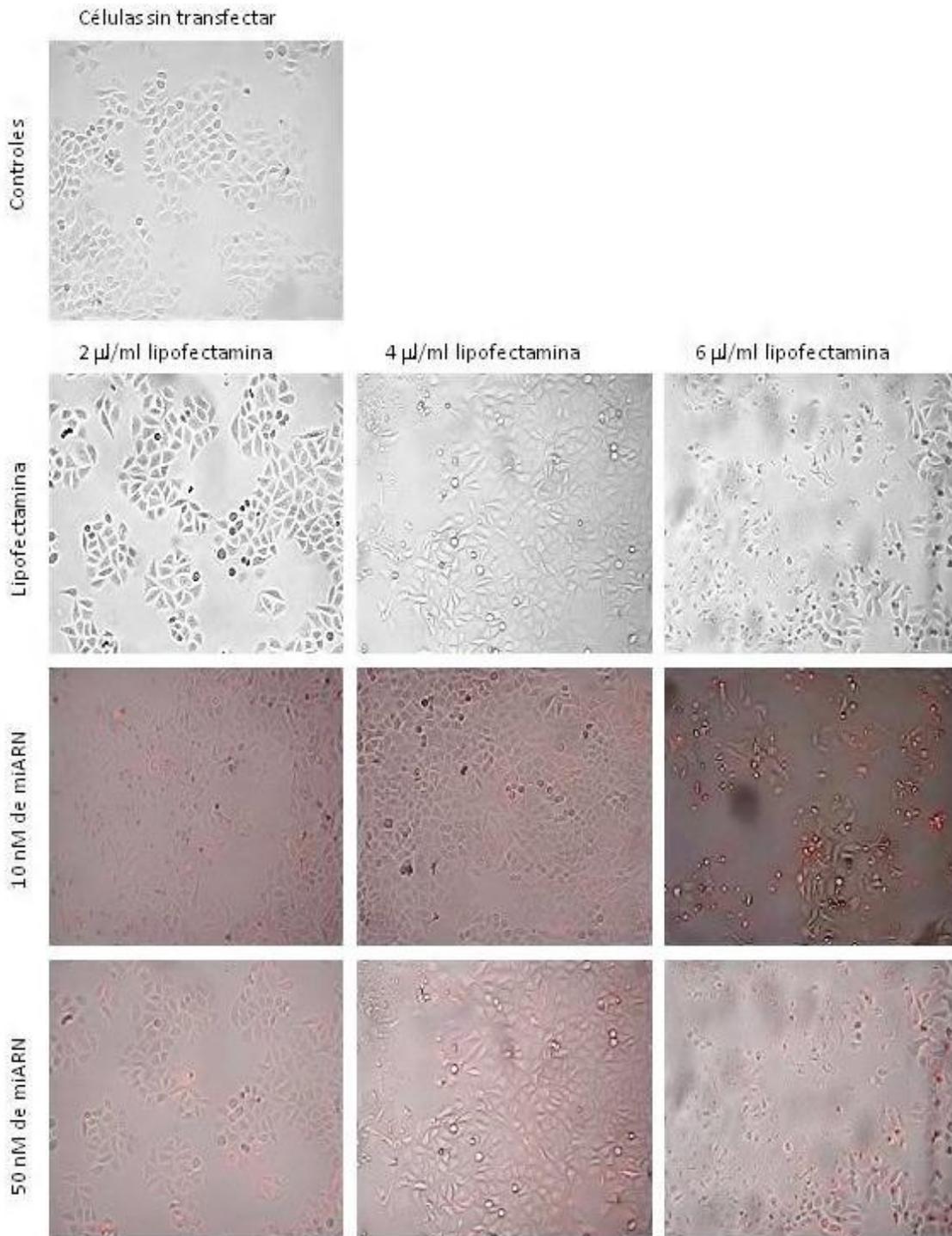
# RESULTADOS

- 
- 1. Puesta a punto de condiciones de transfección y evaluación del efecto fenotípico sobre las líneas celulares.

Se determinaron las condiciones óptimas de transfección en las líneas celulares HeLa y SK-N-SH. Con dicho fin se probaron distintas concentraciones de lipofectamina, miARNs y número de células a sembrar.

En la figura 5 se observa el efecto de las diferentes concentraciones de lipofectamina sobre la línea celular HeLa. Al transfectar con concentraciones de 2 y 4  $\mu\text{l/ml}$  no se observa daño celular significativo, siendo este visible a partir de concentraciones de lipofectamina de 6  $\mu\text{l/ml}$ . En la misma figura se evidencia que al transfectar con 10 nM de miARN la eficiencia de transfección (50-60%) es menor que al transfectar con 50 nM de oligonucleótidos (80-90%), siendo indistinta la concentración de lipofectamina utilizada (2 y 4  $\mu\text{l/ml}$ ) para cada concentración de miARN. En base a estos resultados se determinaron como concentraciones óptimas de transfección: 2  $\mu\text{l/ml}$  de lipofectamina y 50 nM de miARN. En SK-N-SH se realizaron los mismos ensayos, obteniendo resultados similares (resultados no mostrados).

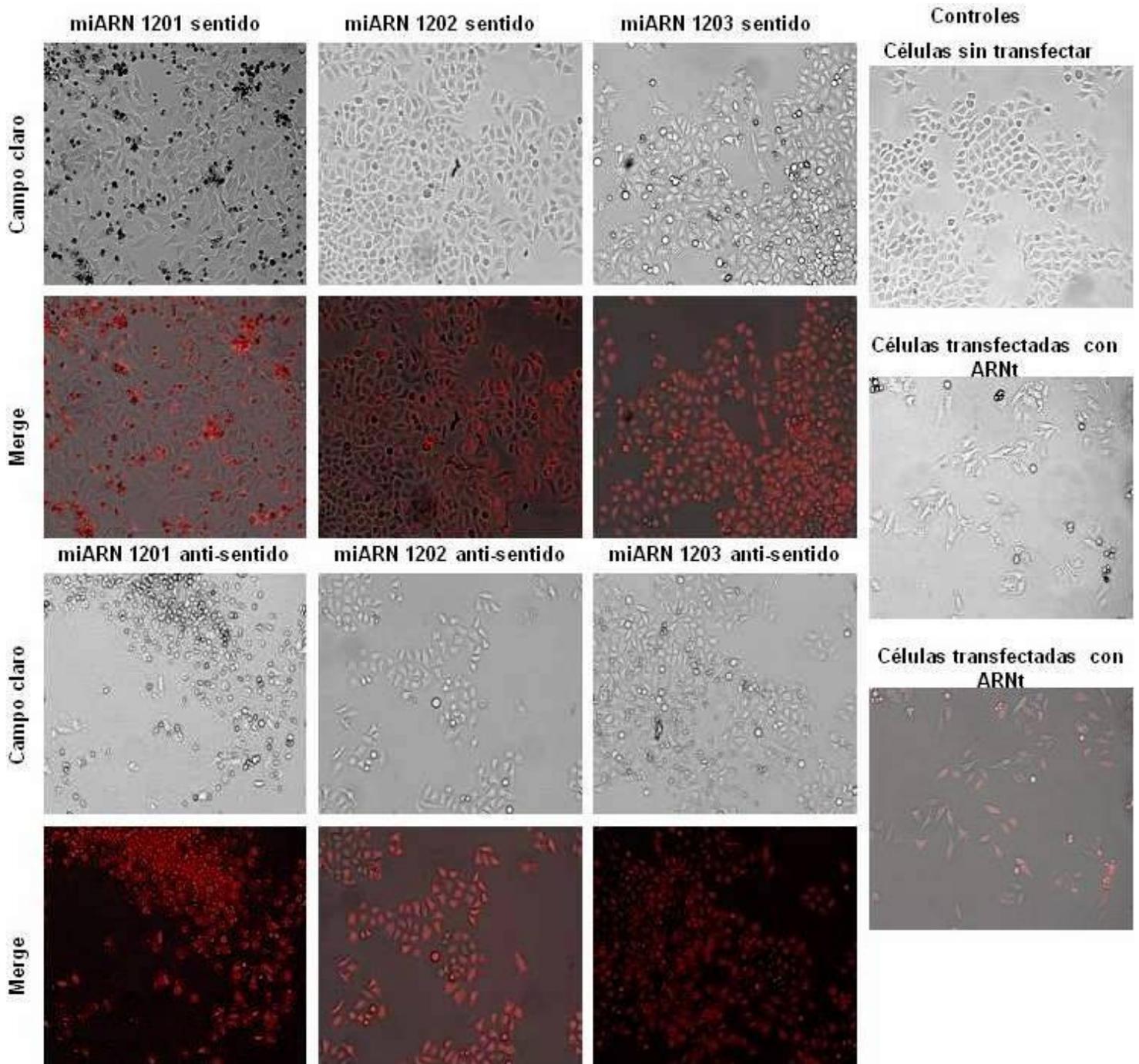
Se transfectaron células HeLa con cada uno de los miARNs en estudio y se observó daño fenotípico marcado, las células se desprendieron de la superficie y cambiaron su morfología, con los miARNs 1201 sentido y anti-sentido, y en menor magnitud con los miARNs 1203 sentido y anti-sentido, estos resultados se observan en la figura 6. En contraste, se observa que el miARN 1202 tanto sentido como anti-sentido no provoca daño fenotípico apreciable en las células transfectadas.



**Figura 5.** Microscopia óptica en campo claro y epifluorescencia de las células correspondientes a la línea celular HeLa. Las células fueron transfectadas con diferentes concentraciones de lipofectamina (2, 4 y 6  $\mu$ l/ml) y diferentes concentraciones del miARN 1202 sentido (10 y 50 nM).

Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

Resultados

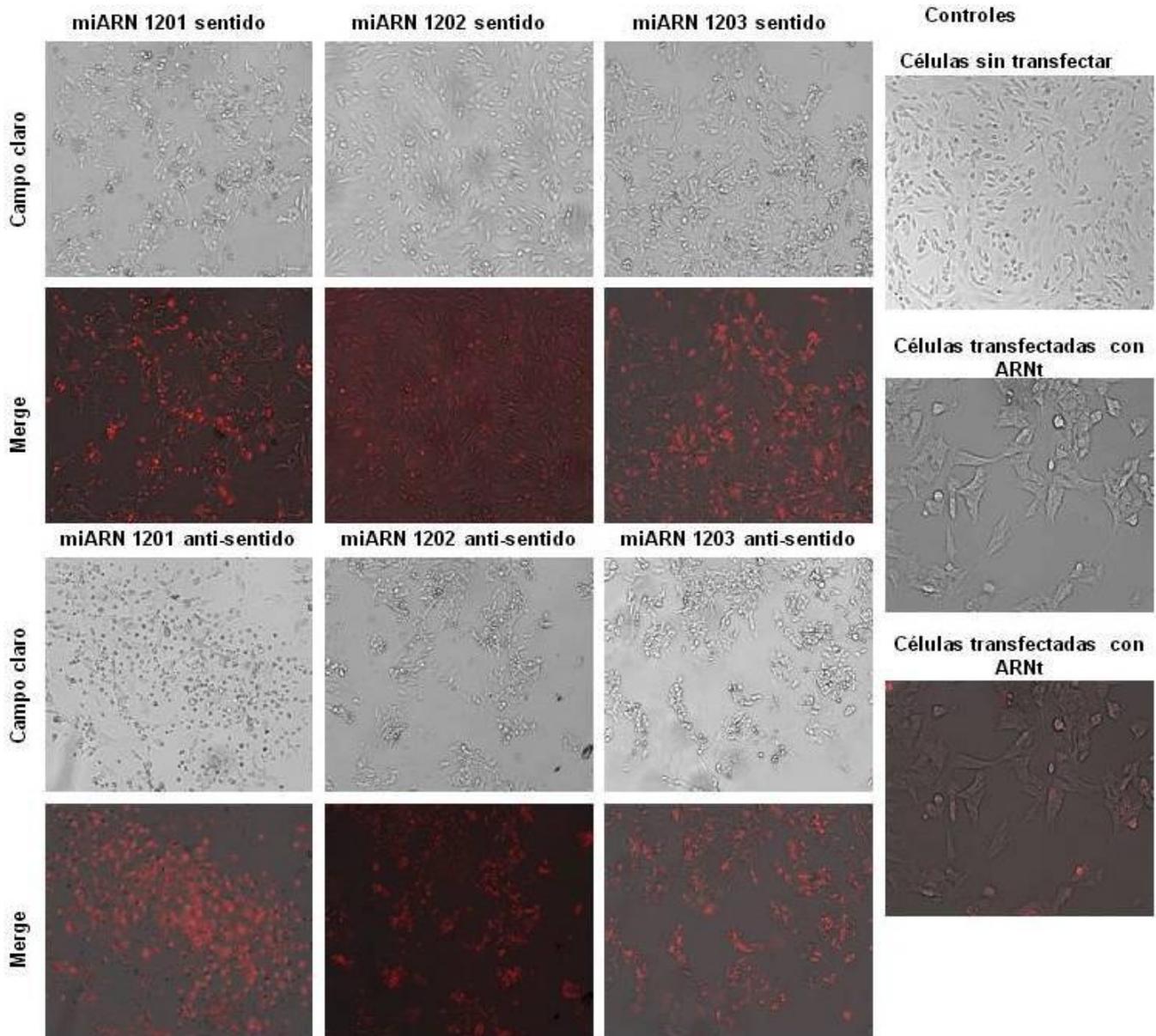


**Figura 6.** Microscopía óptica de células HeLa transfectadas con 50 nM de cada uno de los miARNs en estudio, y 2  $\mu$ l/ml de lipofectamina. En el panel superior se muestran las células transfectadas con los miARNs sentido. El panel inferior se corresponde con los miARNs anti-sentido. El panel de la derecha se corresponde con los controles realizados en el ensayo.

## Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

Resultados

En la línea celular de neuroblastoma, SK-N-SH los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con HeLa, causando un menor daño biológico con los miARNs 1203 sentido y anti-sentido, como se puede observar en la figura 7.



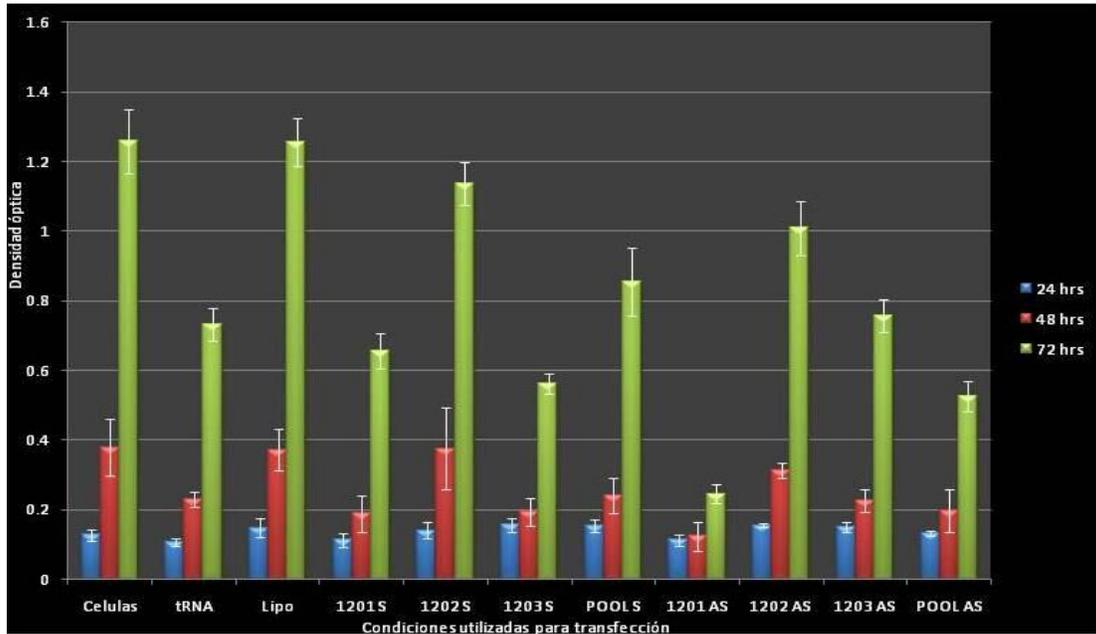
**Figura 7.** Imágenes de microscopía óptica donde se observan células SK-N-SH transfectadas con 50 nM de cada uno de los miARNs en estudio y 2  $\mu$ l/ml de lipofectamina. En el panel superior se muestra las células transfectadas con los miARNs sentido y el panel inferior se corresponde con los miARNs anti-sentido. El panel a la derecha se corresponde con los controles.

- 2.Viabilidad celular

El estudio de viabilidad se realizó por tinción con cristal violeta a las 24, 48 y 72 horas post-transfección. En dicho estudio se agregaron dos condiciones: un pool de miARNs sentido, y un pool de miARNs anti-sentido. En ambos casos la concentración final entre los tres miARNs fue de 50 nM. El agregado de dichas condiciones se realizó con el fin de evaluar un posible efecto sinérgico entre los miARNs.

En la figura 8 se puede observar que el cambio más evidente en la viabilidad celular es a las 48 y 72 horas post-transfección con el miARN 1201 AS, para el cual se observa que la viabilidad celular disminuye un 70%. En contraste, los miARNs 1202 S y AS provocan un aumento en el número de células viables a las 72 horas posteriores a la transfección. Con el miARN 1203 S se puede observar que el número de células viables es levemente menor que en los controles, mientras que con el miARN 1203 AS el número de células viables aumenta de forma moderada a las 72 horas post-transfección con respecto al control.

Con el pool de miARNs sentido se observa que el número de células viables aumenta de forma moderada con respecto al control con el oligonuclótido control. En contraste, con el pool de miARNs anti-sentido el número de células viables disminuye ligeramente con respecto al control con el ARNt.



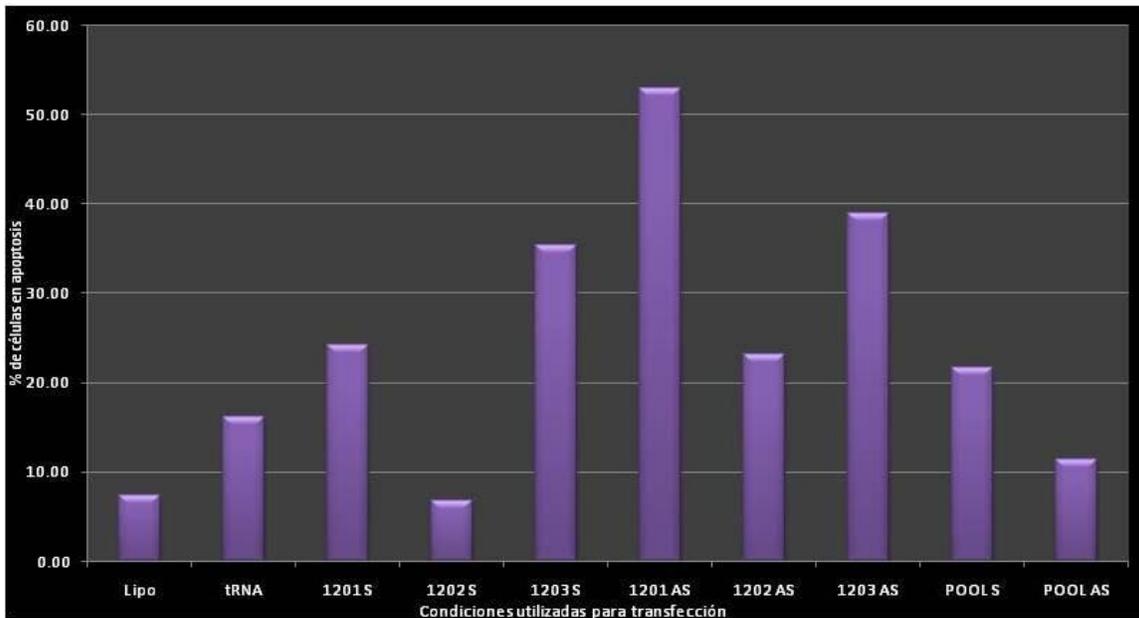
**Figura 8.** Gráfico de barras mostrando resultado del estudio de viabilidad en HeLa con cristal violeta. En el eje de las x se detallan las condiciones utilizadas para la transfección. En el eje y se encuentran los valores de densidad óptica a 595nm. *Lipo* corresponde a lipofectamina.

○ 3.Apoptosis

Se evaluó el porcentaje de células apoptóticas utilizando citometría de flujo, 24 horas luego de la transfección con cada uno de los miARNs en estudio.

Los datos obtenidos muestran un incremento de 2-3 veces en el número de células en apoptosis al bloquear el miARN 1201, mientras que con la sobre-expresión del miARN sentido no se observa ningún cambio significativo con respecto a los controles. La sobre-expresión del miARN 1202 disminuye el efecto apoptótico, mientras que al bloquear el mismo miARN, mediante la transfección con el anti-sentido, no se observan cambios significativos en el porcentaje de células en apoptosis en comparación con los controles utilizados en el ensayo. Los miARNs 1203 tanto sentido como anti-sentido causaron un incremento de 2 veces en el porcentaje de células en apoptosis cuando fueron transfectados. Estos datos se pueden observar en la figura 9. En la misma figura se puede

evidenciar que al transfectar las células con los pool de miARNs no hay cambios significativos en el porcentaje de células en apoptosis con respecto a los controles.



**Figura 9.** Grafico de barras donde se muestran los porcentajes de células HeLa en apoptosis, mediad por citometría de flujo, 24 horas post-transfección. En el eje de las y se detallan los porcentajes, mientras que en el eje de las x se pueden visualizar las condiciones de transfección.

○ 4. Efectos de los miARNs 1201, 1202 y 1203 sobre CHD5.

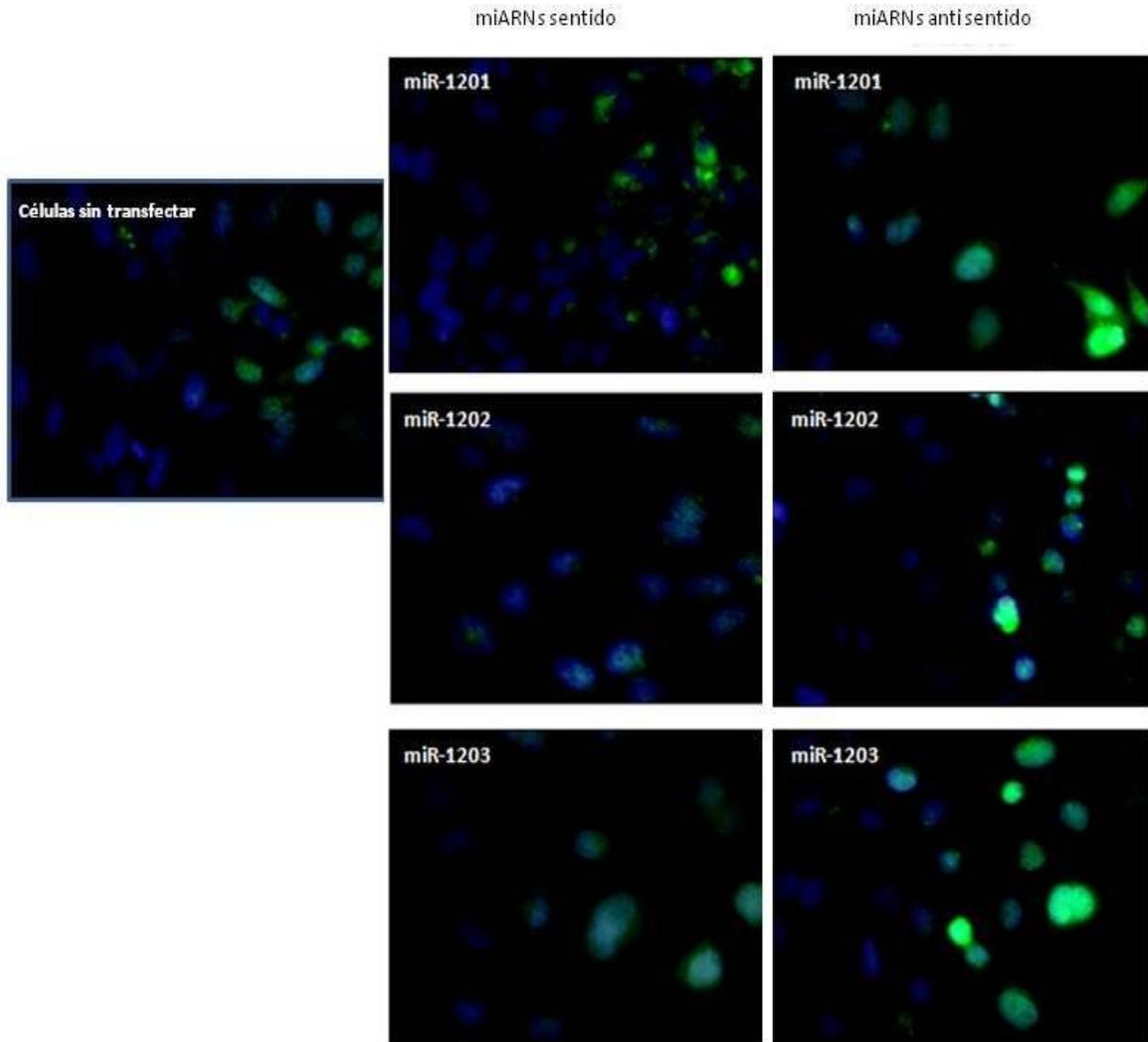
Para validar a CHD5 como blanco de los miARNs se evaluó su comportamiento celular mediante ensayos de inmunofluorescencia al sobre-expresar y bloquear los distintos oligonucleótidos en estudio en ambas líneas celulares.

En la figura 10 se puede observar que al sobre-expresar los miARNs 1201 y 1202 sentido en la línea celular HeLa, la expresión de CHD5 disminuye en comparación con las células control (células sin transfectar). En cambio, al bloquear el miARN 1201, la expresión de la proteína en estudio aumenta y se localiza fundamentalmente a nivel nuclear. La sobre-

## Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

Resultados

expresión y bloqueo en HeLa de los miARNs 1203 produce un aumento de CHD5 en comparación con las células control.

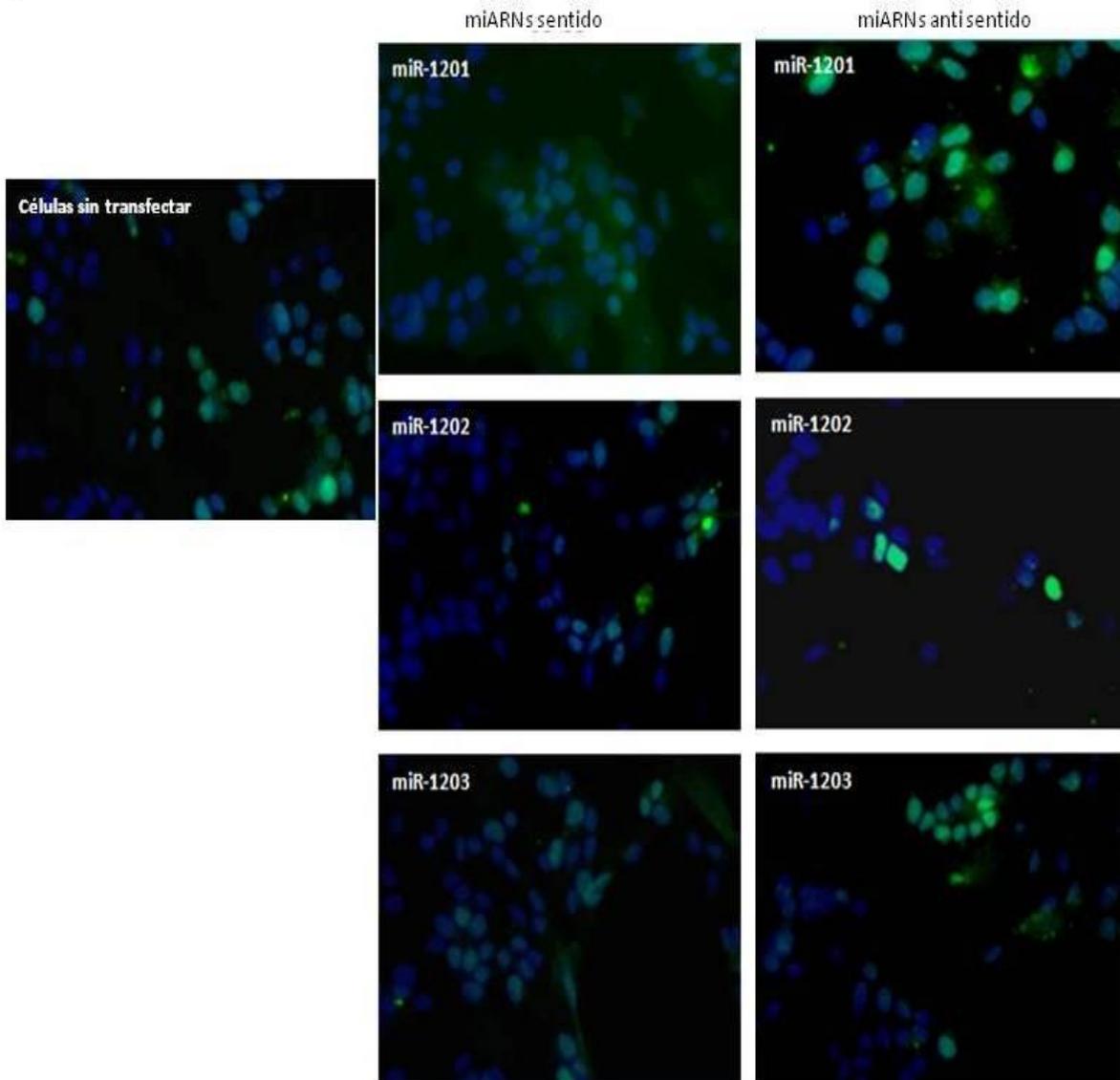


**Figura 10.** Se observan imágenes de microscopía de epi-fluorescencia de cultivos de la línea celular HeLa 48 horas post-transfección con 50 nM de los oligonucleótidos sintéticos. Los cultivos fueron tratados con DAPI. La inmunofluorescencia se realizó con los anticuerpos: anti-CHD5 (santa cruz) y Alexa fluor 488. En cada imagen se indica el oligonucleótido utilizado.

## Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

Resultados

Los resultados obtenidos al realizar la inmunofluorescencia en la línea celular de neuroblastoma, SK-N-SH, son similares a los obtenidos para HeLa, y se muestran en la figura 11.



**Figura 11.** Se observan imágenes de microscopía de epi-fluorescencia de cultivos de la línea celular SK-N-SH 48 horas post-transfección con 50 nM de los oligonucleótidos sintéticos. Los cultivos fueron tratados con DAPI. La inmunofluorescencia se realizó con los anticuerpos: anti-CHD5 (santa cruz) y Alexa fluor 488. En cada imagen se indica el oligonucleótido utilizado.

**DISCUSIÓN  
Y  
CONCLUSIONES**

Uno de los mayores descubrimientos de la biología molecular de las últimas décadas fue el de los pequeños ARNs, incluyendo a los microARNs. El campo de estos pequeños oligonucleótidos ha ido creciendo en los últimos años con evidencia que los implica en diversos procesos celulares <sup>#22</sup>. Generalmente reducen la estabilidad del ARNm incluyendo aquellos genes que median procesos tumorigénicos como los son: la inflamación, regulación del ciclo celular, respuesta al estrés, diferenciación, apoptosis e invasión celular <sup>#23</sup>

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial con alto impacto sanitario y socioeconómico. Entre ellos la LLC constituye el tipo de leucemia más frecuente en los países occidentales <sup>#15</sup>. A diferencia de otros tipos de leucemias, en cuya etiología participan determinadas mutaciones o translocaciones cromosómicas, las bases patogénicas de la LLC siguen siendo desconocidas <sup>#18</sup>.

Un estudio reciente de nuestro laboratorio reveló la existencia de 4 nuevos miARNs en pacientes con LLC (1200, 1201, 1202 y 1203). Mediante análisis bioinformático se han identificado los blancos más relevantes de cada uno de ellos, siendo la cromohelicasa CHD5 uno de ellos. CHD5 ha sido descrita como un supresor tumoral en cáncer humano por Bagchi et al. De los 4 nuevos miARNs descritos, el 1201, 1202 y 1203 comparten a CHD5 como blanco. Por este motivo el principal interés de este trabajo es analizar la capacidad oncogénica de los nuevos miARNs y la relación con uno de los putativos blancos: CHD5.

El modelo experimental se centró en líneas celulares derivadas de neuroblastoma (SK-N-SH) dado que la literatura indica que CHD5 se expresa fuertemente en estas líneas. También se utilizaron células de la línea HeLa ya que en nuestro laboratorio se detectó la expresión de CHD5 mediante la técnica de inmunofluorescencia.

Se optimizaron las condiciones de transfección en las líneas celulares HeLa y SK-N-SH con cada uno de los miARNs sentido y anti-sentido y el oligonucleótido control (ARNt), hasta

alcanzar una eficiencia de transfección cercana al 90%. Se determinaron como condiciones óptimas las concentraciones de 2  $\mu$ l/ml de lipofectamina y 50 nM de cada miARN, las cuales permitieron obtener la mejor eficiencia de transfección.

Durante la puesta a punto se observó cambio a nivel fenotípico en las células transfectadas con los distintos miARNs, siendo el efecto más notorio el producido por el miARN 1201 anti-sentido.

El potencial oncogénico de los 3 nuevos miARNs fue evaluado por análisis de viabilidad celular y estudio de características de muerte celular programada (apoptosis). En dichos ensayos se esperaba observar un aumento en el número de células viables al sobre-expresar los miARNs dado que estos estarían bloqueando, inhibiendo o degradando el ARNm blanco, el supresor tumoral CHD5. Por el contrario, al expresar los miARNs anti-sentido se esperaba observar una disminución del número de células viables ya que los oligonucleótidos anti-sentido bloquearían a los miARNs endógenos.

En concordancia con lo esperado, el análisis de viabilidad celular mostró un aumento moderado en el número de células viables al inducir la sobre-expresión del miARN 1202 sentido a las 72 horas post-transfección. Contrariamente el miARN 1201 indujo una disminución en el número de células viables a las 72 horas post transfección. En coincidencia con los resultados obtenidos con el ensayo de viabilidad, el estudio de apoptosis celular mostró un incremento de 2-3 veces el número de células en apoptosis al bloquear el miARN 1201, mientras que con el miARN sentido no se observó ningún cambio significativo en el número de células apoptóticas con respecto a los controles.

En suma, estos datos sugieren que las respuestas fisiológicas estarían relacionadas con los niveles endógenos de cada miARN en la línea celular HeLa. Este caso podría corresponderse con altos niveles de miARN 1201 endógeno, y una virtual ausencia del miARN 1202.

Los ensayos de viabilidad y apoptosis al transfectar con los miARNs 1203, sentido y anti-sentido, ofrecieron datos discordantes lo cual no permite sacar conclusiones con respecto a su oncogenicidad en HeLa.

Con los datos obtenidos a partir de transfectar con el pool de miARNs sentido y anti-sentido no podemos hablar de un efecto sinérgico entre los oligonucleótidos dado que la co-transfección de los 3 miARNs no provoca un efecto mayor al observado en la transfección de los miARNs de manera individual.

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron para determinar si la sobre expresión y bloqueo de los distintos miARNs, provoca cambios en la expresión de la proteína de interés: CHD5. Este ensayo también permite determinar la localización celular de la proteína.

En los ensayos de inmunofluorescencia de las células transfectadas con los miARNs 1201, 1202 y 1203 sentido, se observó una reducción del número de células con señal nuclear específica y una disminución de la intensidad de la misma. En contraste, con los miARNs anti-sentido se observó un incremento del número de células con señal nuclear positiva y en la intensidad de la señal. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenido al evaluar la oncogenicidad de los miARNs ya que la expresión de los miARNs anti-sentido debería bloquear a los miARN endógenos que estarían inhibiendo la traducción de la proteína que actúa como supresor tumoral (CHD5).

Los datos obtenidos estarían sugiriendo que el miARN 1202 tiene potencial oncogénico dado que aumenta la capacidad proliferativa de las células al bloquear la traducción del supresor tumoral CHD5 mediante la inhibición o degradación del ARNm blanco.

Por su parte, el miARN anti-sentido 1201 estaría actuando como anti-oncogénico ya que bloquearía al miARN endógeno permitiendo que se lleve a cabo la traducción del supresor tumoral CHD5 a partir del ARNm blanco.

### Importancia del trabajo

La identificación y caracterización de una nueva vía molecular de transformación maligna mediada por miARNs a través de la inhibición de la expresión de CHD5 aportaría nuevos conceptos en la biología molecular del cáncer.

El avance sobre la biología de los miARNs en su relación con el cáncer podría resultar en fines prácticos, como ser una nueva herramienta en el diagnóstico y/o pronóstico, junto al esclarecimiento de los mecanismos moleculares desencadenantes de esta enfermedad. Esto también aportaría herramientas apropiadas para un futuro desarrollo terapéutico. Aunque su potencial terapéutico ha sido recientemente propuesto, hay 2 posibles estrategias relacionadas a esto: bloquear los miARNs oncogénicos; o sobre-expresar los miARNs supresores de tumores.

### Trabajos a futuro

Poder establecer la capacidad oncogénica y niveles endógenos de los miARNs 1201, 1202 y 1203, mejorando los ensayos realizados en HeLa.

Determinar el potencial oncogénico de los miARNs en otras líneas tumorales como así también probar el efecto de dichos oligonucleótidos en cultivos primarios a fin de caracterizar el potencial de transformación maligna de células normales.

Validar a CHD5 como uno de los blancos de los miARNs mediante el estudio de la expresión génica co-transfectando una línea celular (HeLa) con un vector que contenga: la región 3'UTR del gen CHD5 (región de unión de los miARNs a sus genes blancos) y un gen reportero (Renilla/Luciferasa), para cada miRNA maduro, de manera tal de poder determinar la especificidad de unión de cada miARN a la región blanco.

**CITAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

## Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

Citas bibliográficas

---

1. Edyta Koscianska, et al, *Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs*. BMC Molecular Biology (2007), 8:79.
2. S. MArton, et al. *Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis*. Leukemia (2007), 1-9. Nature.
3. Mohammed Abba, Heike Allgayer. *MicroRNAs as regulatory molecules in cancer: a focus on models defining miRNA functions*. Elsevier DOI: 10.1016/j.ddmod.2009.01.002.
4. William CS Cho. *OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers*. Molecular Cancer (2007), 6:60.
5. Kevin J Beezhold, Vince Castranova, and Fei Chen. *Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention*. Molecular Cancer (2010), 9:134.
6. T. Dalmay. *MicroRNAs and cáncer*. Journal of internal medicine doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01926.x.
7. Bartel D P. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell (2004). 116: p. 281-97.
8. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg. *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet (2008). 9(2): p. 102-14.
9. George A. Calin and Carlo M . Croce. *MicroRNA signatures in human cancer*. Nature (2006) 857.

10. Carlos Rovira, Maria C. Güida and Alfonso Cayota. *MicroRNAs and other small silencing RNAs in cancer*. International union of biochemistry and molecular biology, v.,p.-2010. ISSN/ISBN:1521-6551.
11. Kai Ruan, Xiaoguang Fang, Gaoliang Ouyang. *MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer*. Elsevier doi:10.1016/j.canlet.2009.04.031.
12. Qi Liu et al.,. *Analyses of domains and domain fusions in human proto-oncogenes*. BMC Bioinformatics (2009), 10:88.
13. Andrea Ventura<sup>1</sup> and Tyler Jacks. *MicroRNAs and Cancer: Short RNAs Go a Long Way*. Elsevier (2009) Cell 136
14. Chen, J. Odenike, O. and Rowley, J.D. *Leukaemogenesis: more than mutant genes*. Nature reviews 10, 23-36.
15. Montserrat, E., and Rozman, C. (1995). *Chronic lymphocytic leukemia: present status*. Ann Oncol 6, 219-235
16. Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Ferrarini, M. (2005). *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med 352, 804-815
17. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., et al. (1999). *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood 94, 1840-1847.
18. Zenz, T., Mertens, D., Kuppers, R., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. *From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia*. Nature reviews 10, 37-50.

## Evaluación de la capacidad oncogénica de 3 nuevos MicroARNs identificados en linfocitos B leucémicos

Citas bibliográficas

---

19. Xian Wang<sup>1,2</sup>, Kenneth KK Lau<sup>1</sup>, Leo KY So<sup>1,3</sup> and Yun Wah Lam. *CHD5 is down-regulated through promoter hypermethylation in gastric cancer*. Journal of Biomedical Science (2009), 16:95
20. Anindya Bagchi, et al. *CHD5 Is a Tumor Suppressor at Human 1p36*. Elsevier (2007) Cell 128.
21. Patricia A. J. Muller, Karen H. Vousden, and Jim C. Norman. *p53 and its mutants in tumor cell migration and invasión*. J. Cell Biol. Vol. 192 No. 2 20+9–218.
- 22 Yong Sun Lee, Anindya Dutta. *MicroRNAs in cancer*. Annu Rev Pathol. 2009 ; 4: 199–227. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222,
23. Thalia A Farazi, Jessica I Spitzer, Pavel Morozov and Thomas Tuschl. *miRNAs in human cancer*. Journal of Pathology 2011; 223: 102–115