



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**TESIS DOCTORAL
FACULTAD DE MEDICINA**

PROGRAMA DE DOCTORADO

ORGANOGENESIS I ANATOMÍA CLÍNICA I APLICADA

BIENIO 2002-2004

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE
miRNAs EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO
DEL COLON, EL CÁNCER COLORECTAL Y EL
LINFOMA DE HODGKIN

Directores de Tesis

Dr. Mariano Monzó Planella

Dr. Álvaro Urbano Ispizua

Alfons Navarro Ponz

Barcelona, Enero de 2008

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y METODOS

Muestras embrionarias humanas

Los embriones y fetos utilizados en el estudio fueron donados con consentimiento escrito informado al Servicio de Donación de Cuerpos Sala de Disección (SDCSD) del departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, para estudios morfológicos y moleculares.

Las muestras utilizadas incluyen colon de embriones de 7 a 12 semanas de desarrollo según análisis ecográfico. La disección del colon se realizó bajo la lupa estereoscópica Olympus SZ61. Las muestras utilizadas para extracción de RNA fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta el momento de su análisis.

Muestras pacientes con cáncer colorectal

Se analizaron muestras de tejido tumoral y normal apareado de 22 pacientes adultos afectados de cáncer colorectal que fueron obtenidas por resección quirúrgica entre agosto del 2002 y Agosto de 2004 en el Hospital Municipal de Badalona. Previamente todos los pacientes dieron su consentimiento informado. El tejido fresco (tumoral y normal) obtenido de cada paciente, fue preservado en nitrógeno líquido para la posterior extracción de RNA. Todos los tejidos fueron confirmados como tumorales o normales por análisis histopatológico.

De estos 22 pacientes tal como podemos apreciar en la tabla de características clínicas (Tabla 11), 6 eran de estadio I (T2N0M0) y 16 de estadio II (T3N0M0). El 68% eran hombres y con edades comprendidas entre los 49 y los 87 años. El tamaño medio del tumor extraído fue de 5cm.

Características	N=22	%
Edad media (rango), años	69 (49-87)	
Sexo (Hombre/Mujer)	15/7	68.2/31.8
Apariencia histológica		
Pobrementemente diferenciado	1	4.5
Bien diferenciado	21	95.5
Estadio enfermedad		
I	6	27.3
II	16	72.7
Profundidad de la invasión		
T2N0M0	6	27.3
T3N0M0	16	72.7
Localización del Tumor		
Colon derecho	2	9.1
Colon izquierdo	2	9.1
Colon transverso	2	9.1
Colon sigmoideo	8	36.4
Recto	8	36.4
Tamaño medio del tumor (rango), cm	5 (3-14)	24
Adenocarcinoma mucinoso		
Si	5	22.7
No	17	77.3

Tabla 11. Principales características clínicas de los pacientes con cáncer colorectal de nuestro estudio.

Muestras pacientes con linfoma de Hodgkin

Se analizaron cuarenta y nueve muestras de ganglios linfáticos incluidos en parafina de pacientes diagnosticados con Linfoma de Hodgkin entre Enero de 1996 y Junio de 2005. De estos, 37 casos eran esclerosis nodular y 12 celularidad mixta, de acuerdo con la clasificación de la OMS²⁰². Todos los pacientes fueron diagnosticados y seguidos en el Hospital Clínic de Barcelona. Las principales características clínicas y biológicas de estos pacientes se muestran en la tabla 12. Como controles se utilizaron 10 ganglios reactivos de diferentes localizaciones. Además se utilizó un grupo de validación formado por 30 pacientes de características similares y 5 ganglios reactivos más.

Características	N=49	%
Edad media (rango), años	32 (15-80)	
Sexo (Hombre/Mujer)	27/22	55/45
Histología		
Esclerosis nodular	37	76
Celularidad mixta	12	24
VEB+*	16	36
Simtomatología B	25	51
Masa Bulky	11	22
Anemia (Hb <105 g/L)	12	24
Leucocitosis ($\geq 15 \times 10^9/L$)	9	18
Linfocitopenia ($< 0.6 \times 10^9/L$ or $< 8\%$ of WBC)	7	14
Hipoalbuminemia (< 40 g/L)	17	36
LDH elevada (> 450 UI/L)	18	37
β -2-microglobulina elevada (> 2.5 mg/dL)	12	29
Estadio III-IV	23	47
Índice de Hasenclever [†]	12	33

Tabla 12. Principales características clínicas de los pacientes con LH.

* 8/35 (26%) EN vs 7/10 (70%) CM (P=0.01). † Calculado sólo en 36 pacientes con enfermedad avanzada (estadios III-IV, sintomatología B o con masa Bulky).

Extracción de RNA

Se extrajo RNA total de muestras congeladas (muestras tejido embrionario, muestras tejido colorectal tumoral y normal, muestras tejido LH y de líneas celulares de LH), y de muestras incluidas en parafina (muestras tejido de LH y de ganglios reactivos).

La extracción de RNA de muestras congeladas se realizó mediante TRIPURE (Roche) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 1: Protocolos).

La extracción de RNA de muestras incluidas en parafina se realizó usando el kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation* (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 1: Protocolos).

La concentración de RNA fue cuantificada usando GeneQuant Spectrophotometer (Pharmacia).

Transcripción Reversa y cuantificación por PCR a tiempo real de miRNAs

Se sintetizó cDNA a partir de RNA total usando primers específicos para cada miRNA, mediante *TaqMan MicroRNA Assay Protocol* de Applied Biosystems (AB). Este sistema permite amplificar miRNAs maduros en dos pasos: 1º) síntesis de cDNA de cada miRNA usando primers específicos en stem-loop y 2º) cuantificación por PCR a tiempo real gracias al alargamiento de cadena producido por el desplegamiento del primer en stem-loop, que permite la unión de 2 primers y 1 sonda necesarios para la cuantificación (Figura 24).

En la reacción de RT-PCR se utilizaron 10ng de RNA total, 50nM de los primers de RT en stem-loop, 1X RT Buffer, 0.25mM de dNTPs, 3.33U/μl de transcriptasa reversa MultiScribe y 0.25U/μl de RNasa Inhibitor, todos ellos reactivos del kit *cDNA Archive kit* de AB. Estas reacciones de 7.5μl de volumen final se incubaron en el termociclador AB 9500 a 16° durante 30min, 42° durante 5min y 85° durante 5min.

La PCR a tiempo real se llevó a cabo en el equipo AB 7500 Sequence detector, donde se incubaron 10μl que incluían 0.67μl de producto de RT, 1X TaqMan Universal PCR master mix y 1μl de mezcla de primers y sonda del kit *TaqMan MicroRNA Assay protocol*. Las reacciones se incubaron en una placa óptica de 96 pocillos a 95° durante 10min, seguidos de 40 ciclos de 95° durante 15s y 60° durante 1min. El Ct se determinó usando la línea de base que por defecto asigna el sistema.

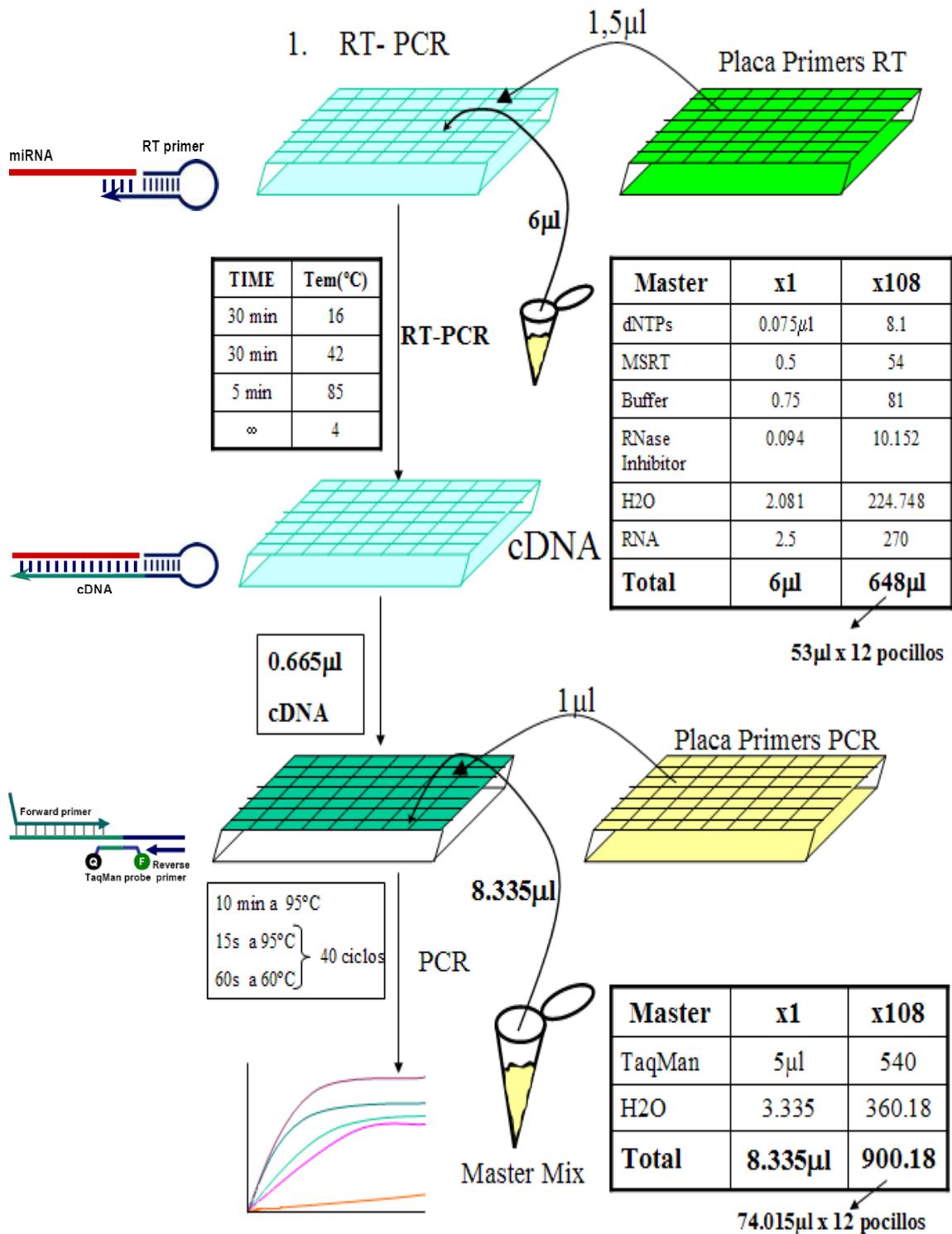


Figura 24. Proceso de amplificación y cuantificación de los miRNAs.

En la izquierda de la figura podemos apreciar los diferentes pasos de la stem-loop RT-PCR (Applied Biosystems). A la derecha, todos los pasos a realizar para la amplificación de los miRNAs a partir de RNA total.

Inmunohistoquímica

La Inmunohistoquímica fue realizada en secciones de tejido de LH incluidos en parafina. Estas secciones fueron puestas en portaobjetos pretratados con silano, fueron secadas y sujetas a eliminación de antígenos mediante *Target Retrieval solution* de DakoCytomation en una olla a presión para microondas. Se incubaron con los anticuerpos contra CD20 (L26, Dako), CD5 (NCL-CD5, Novocastra), CD30 (BerH2, Dako) y CD15 (Leu M1, Novocastra) y los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina de Gill y montados en Pertex (Histolab GMBH).

Análisis del VEB

La detección del VEB en las muestras de linfoma de Hodgkin fue estudiada en todos los casos por hibridación in situ para la detección del RNA del VEB (EBER 1 y 2, inform EBER, Ventana Medical System) en una plataforma automática BenchMark XT (Ventana Medical Systems) y por Real Time PCR usando sondas y primers específicos para el segmento altamente conservado BamH1W del VEB²⁵⁷.

Hibridación in situ de miRNAs

La hibridación in situ de miRNAs se realizó en la plataforma automática Bond Max de Vision Biosystems. En esta plataforma se realizaron todos los pasos de la hibridación:

1. Desparafinación de la muestra
2. Pretratamiento con proteasa
3. Incubación con la sonda
4. Revelado
5. Tinción

La hibridación se realizó sobre secciones de tejido previamente fijado en formol e incluido en parafina, que se colocaron en portaobjetos bañados con silano (de Vision Biosystems).

1. Desparafinación de la muestra

La muestra se desparafina lavando con la solución *Bond dewax* a 72°C y posteriormente con lavados con alcohol. Finalmente se realizan lavados con la solución de lavado *Bond Wash Solution*.

2. Pretratamiento con proteasa

Una vez desparafinado, se realiza un pretratamiento con proteasa (*Bond Enzyme*), para aumentar la accesibilidad al miRNA diana. Se incuba a 37°C con la proteasa durante 10 minutos.

3. Incubación con la sonda

A continuación se incuba con la sonda durante 2h/5h (dependiendo de la sonda) a 50 °C. Las sondas utilizadas para la hibridación de miRNAs, son sondas de tipo LNA (*Locked Nucleic acid*). Los LNA son un tipo nuevo de ácidos nucleicos que contienen un puente 2'O, 4'C (Figura 25). Este puente le da una conformación al ácido nucleico que lo hace ideal para las reacciones de hibridación, ya que hay un aumento de la estabilidad térmica de la sonda, así como un aumento en la especificidad. Por cada nucleótido LNA que contenga la sonda, la temperatura de melting aumenta de 3 a 8°C. Debido a esto, la temperatura de hibridación es mucho más alta que con sondas normales.

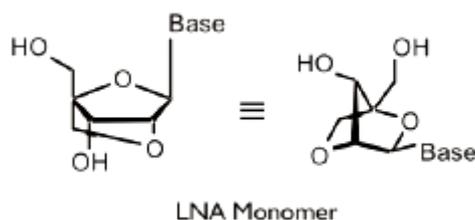


Figura 25. Monómero LNA.

Las sondas utilizadas para la detección de los miRNAs analizados estaban marcadas con Fluoresceína (FITC) en el extremo 5'. La concentración inicial era de 25µM, pero la concentración de trabajo es de 25nM (Dilución 1:1000).

Podemos ver las características de cada sonda en la tabla siguiente:

Sonda	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)
hsa-miR-21	TCAACATCAGTCTGATAAGCTA	72
hsa-miR-17-5p	ACTACCTGCACTGTAAGCACTTTG	74
hsa-miR-134	CCCTCTGGTCAACCAGTCACA	77
hsa-miR-138	GATTCACAACACCAGCT	70
hsa-miR-155	CCCCTATCACGATTAGCATTAA	71

Tabla 13. Características de las sondas tipo LNA usadas en la hibridación in situ.

4. Revelado

En el revelado se utilizó un anticuerpo hecho en ratón pre-diluido anti fluoresceína (anti-FITC) (Vision Biosystems) incubado durante 20-60 minutos. A continuación se incubó con un anticuerpo anti-ratón generado en cabra, unido a múltiples sitios de *horse radish peroxidase* (Sistema de detección refinado de Vision Biosystems). Se usó diamino bencidina (DAB) como activador de la reacción cromógena.

5. Tinción

Como contratinción se realizó una hematoxilina-eosina.

Protocolo realizado en Bond Max para la hibridación in situ

Previamente a poner en marcha el equipo:

1. Preparar la proteasa: diluimos una gota del *Bond Enzyme* en 9ml de *Bond enzyme dilution Buffer*.
2. Preparar la dilución de la sonda de hibridación del miRNA: desnaturalizamos a 80°C 5 minutos la sonda y la diluimos 1:1000 para que nos quede a 25nM.

- En el programa informático hay que elegir la opción de *Refill the Enzyme*, antes de empezar.

Pasos máquina:

Paso	Reactivo	Tiempo	°C
1.	<i>Bond Dewax Solution</i>	0	72
2.	<i>Bond Dewax Solution</i>	0	72
3.	<i>Bond Dewax Solution</i>	0	
4.	<i>Alcohol</i>	0	
5.	<i>Alcohol</i>	0	
6.	<i>Alcohol</i>	0	
7.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
8.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
9.	<i>Bond Wash Solution</i>	5	
10.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
11.	<i>Enzyme 1(Proteasa)</i>	10	37
12.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
13.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
14.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
15.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
16.	<i>S1 Probe</i>	0	
17.	<i>S1 Probe</i>	0	
18.	<i>No Reagent</i>	120	50

19.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	37
20.	<i>Bond Wash Solution</i>	1	37
21.	<i>Bond Wash Solution</i>	5	37
22.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
23.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
24.	<i>Bond Wash Solution</i>	1	
25.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
26.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
27.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
28.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
29.	<i>Peroxide Block</i>	5	
30.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
31.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
32.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
33.	<i>ANTI-FITC</i>	60	
34.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
35.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
36.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
37.	<i>Post Primary</i>	20	
38.	<i>Bond Wash Solution</i>	2	
39.	<i>Bond Wash Solution</i>	2	
40.	<i>Bond Wash Solution</i>	2	

41.	<i>Polymer</i>	40	
42.	<i>Bond Wash Solution</i>	2	
43.	<i>Bond Wash Solution</i>	2	
44.	<i>Deionized water</i>	0	
45.	<i>Mixed DAB Refine</i>	0	
46.	<i>Mixed DAB Refine</i>	10	
47.	<i>Deionized water</i>	0	
48.	<i>Deionized water</i>	0	
49.	<i>Deionized water</i>	0	
50.	<i>Hematoxylin</i>	5	
51.	<i>Deionized water</i>	0	
52.	<i>Bond Wash Solution</i>	0	
53.	<i>Deionized water</i>	0	

Microscopia electrónica de rastreo

Para la observación de las muestras embrionarias con microscopía de rastreo, las muestras fueron fijadas en una solución consistente en 2.5% de Glutaraldehído en tampón fosfato 0.1M (pH 7.2), postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo tampón fosfato, deshidratadas en un gradiente de alcoholes y procesadas para el punto crítico de secado (Polaron). Las muestras fueron observadas en un microscopio Zeiss DSM 940A operado a 10kV.

Microscopia electrónica de transmisión

Para la observación de las muestras embrionarias con microscopía electrónica de transmisión, estas fueron fijadas en una solución consistente en 2% de paraformaldehído y 2.5% de glutaraldehído en tampón fosfato 0.1M (pH 7.2), postfijadas en tetraóxido de osmio en el mismo tampón fosfato y deshidratadas en un gradiente de acetonas e incluidas en resina de Spurr. Se realizaron delgados cortes de 0.5-1 μ m para seleccionar zonas propicias para ser exploradas en el microscopio electrónico. A continuación, se realizaron cortes ultrafinos (60-80nm) que se cortaron con un ultramicrotomo Leica UCT usando una cuchilla de diamante Diatome. Las secciones ultrafinas fueron montadas en rejillas de cobre y posteñidas primero con acetato de uranilo al 2% durante 10 minutos y con citrato durante 20 minutos.

El análisis ultra-estructural fue realizado usando un microscopio Jeol EM1010, operado a 80kV con una cámara digital Bioscan 812 (Gatan).

Western immunoblot

Proteína total de tejido embrionario, tumoral y normal se extrajo usando el kit Qiagen *Qproteome Mammalian Protein prep* siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraída la proteína fue cuantificada mediante el método Bradford, utilizando una recta estándar de albúmina sérica bovina (BSA). Una vez cuantificadas, se cargaron 50 μ g de proteína en un gel SDS-poliacrilamida para su separación mediante electroforesis. Se utilizaron geles comerciales *Precast Ready gel* de Biorad al 10% Tris-HCL. Una vez separadas las proteínas en el gel, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Trans-Blot Transfer Medium*, Biorad). Se incubaron las membranas con el anticuerpo

monoclonal de ratón contra E2F1 a una dilución 1:200 de Santa Cruz y con α -tubulina a una dilución 1:5000 de Sigma.

La hibridación del anticuerpo se reveló con incubación con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de Sigma. La señal quimioluminiscente fue detectada usando el kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* de Pierce y leída en un sistema Chemidoc de Biorad. La densidad proteica de las bandas fue cuantificada usando el programa Quantity One v.4.2.6 y la cuantificación relativa se calculó referida a la señal de α -tubulina (Anexo 1: Protocolos).

Inhibición mediante oligonucleótidos antisense del cluster miR-17-92

Para el análisis de los niveles de la proteína E2F1, se transfectaron en la línea celular DLD de cáncer colorectal 25 y 50pmol de cada uno de los antisense para miR-17-5p, miR-20a y miR-106 o 100pmol del oligonucleótido *scrambled* utilizado como control negativo de la transfección. Estas células se hicieron crecer en placas de 6 pocillos, en las que se plaquearon 250.000 células por pocillo 24 horas antes de la transfección. Se transfectaron utilizando Lipofectamina 2000 de Invitrogen. La eficiencia de transfección (>95%), se confirmó usando *Silencer FAM-labeled Negative Control* de Ambion. Los lisados celulares se recolectaron a las 24h, 48h y 72h postransfección y se analizó la expresión de miRNAs mediante PCR a tiempo real y los niveles de E2F1 mediante Western Blot.

Análisis de la proliferación celular

Para el análisis de la proliferación celular, a las 24h de la transfección se tripsinizaron las células y se traspasaron 3000 células viables en placas de 96 pocillos o 5000 células viables en placas de 6 pocillos. El análisis del crecimiento celular se realizó con el kit no radioactivo *CellTiter 96 non radioactive cell proliferation assay kit* (MTS) de Promega, y contando con el sistema automático de conteo de células NucleoCounter de Chemometec, y se visualizó después de fijarlo y teñirlo con cristal violeta (Anexo 1: Protocolos).

ESTUDIOS DE INHIBICION CLUSTER MIR17-5P, 20a, 106a

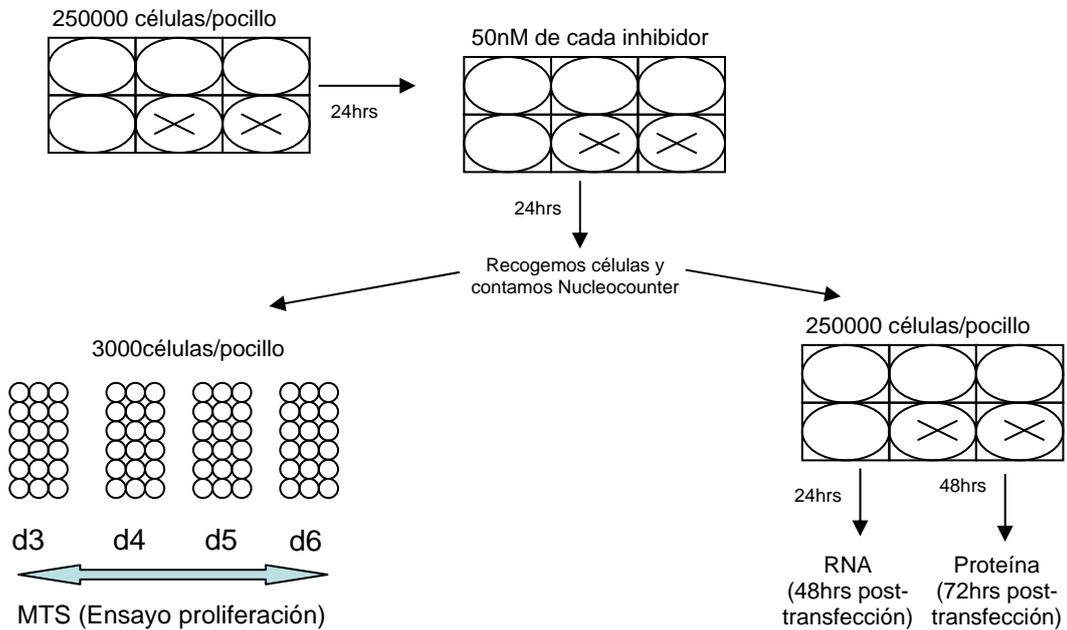


Figura 26. Esquema del plaqueo de células realizado en el estudio de inhibición de miR-17-5p, miR-20a y miR-106a en líneas celulares.

Se transfectan 250.000 células en placas de 6 pocillos 24 horas antes de realizar la transfección. A las 24h se transfecta con lipofectamina, con 50nM de cada inhibidor y 24h después se realiza el conteo celular y se plaquean por un lado 3.000 células por pocillo en 4 placas de 96 pocillos, para la medición de la proliferación por MTS a los días 3 (d3), 4 (d4), 5 (d5) y 6 (d6) post-transfección. Por otro lado, se plaquean 250.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, para realizar extracción de RNA a las 48h para el análisis de eficiencia inhibición de los miRNAs y extracción de proteína a las 72h para el análisis de dianas por western blot.

Análisis estadístico

El proceso de normalización de los datos de expresión es esencial para un correcto proceso de cuantificación de los niveles de mRNA y en este caso de miRNA. Normalmente el método utilizado en el proceso de normalización es el uso de un gen *housekeeping*. Pero en el caso de los miRNAs todavía no hay suficientes datos de cuales pueden utilizarse como controles endógenos, de forma que los datos de expresión de miRNAs fueron normalizados por dos aproximaciones diferentes: miRNA let-7a y por la mediana global. En el caso de la normalización por la mediana global, como se realiza en los análisis de microarrays de expresión, los valores brutos de Ct se analizaron y normalizaron con el programa BRB Array Tools.

La cuantificación relativa de la expresión de los miRNAs fue calculada por el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*AB User Bulletin N° 2* [P/N 4303859]) para la normalización por let-7a y $2^{-\Delta Ct}$ para la normalización por la mediana global. Los datos fueron presentados como \log_{10} de la cuantificación relativa calibrados con la mediana de las muestras utilizadas como normales en cada caso.

Los datos fueron analizados usando los programas BRB Array Tools versión 3.5.0 (disponible en <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>), TIGR Multiexperiment viewer versión 4.0 (disponible en <http://www.tm4.org/mev.html>) y SPSS v.14. Para identificar miRNAs con expresión significativamente diferente entre diferentes grupos, se realizaron 2 análisis multivariados de permutaciones: *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) con un *False discovery Rate* <10%, y T-Student basada en permutaciones multivariadas (con modelo de varianza randomizada). En este último análisis diferencias entre miRNAs fueron consideradas significativas si el p-valor era menor que 0.001. El *Prediction Analysis of Microarrays* (PAM) y el *Class Prediction Methods* (BRB Array Tools) se utilizaron para determinar aquellos miRNAs que eran capaces de clasificar una muestra en un grupo u otro de los analizados. De forma que con estos dos métodos se consiguió reducir el grupo de miRNAs con importancia según las características analizadas.

Para la identificación de posibles genes dianas de los miRNAs con significancia, se utilizaron las predicciones de interacción de las bases de datos Mirbase²⁵⁸ y TargetScan²⁵⁹. Y para el análisis de las interacciones funcionales de estos genes candidatos entre si, se utilizaron los programas de clusterización de genes por funciones: DAVID database²⁶⁰ y GENIG (<http://alggen.lsi.upc.edu>).